

**Universidade de São Paulo**  
**Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

***Pratylenchus brachyurus* x algodoeiro:**  
**patogenicidade, métodos de controle e caracterização molecular de populações**

**Andressa Cristina Zamboni Machado**

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia.**  
**Área de concentração: Fitopatologia**

**Piracicaba**

**2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Andressa Cristina Zamboni Machado**  
**Engenheiro Agrônomo**

***Pratylenchus brachyurus* x algodoeiro:  
patogenicidade, métodos de controle e caracterização molecular de populações**

Orientador:

Prof. Dr. LUIZ CARLOS CAMARGO BARBOSA FERRAZ

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em  
Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia**

**Piracicaba**

**2006**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Machado, Andressa Cristina Zamboni

*Pratylenchus brachyurus* x algodoeiro: patogenicidade, métodos de controle e caracterização molecular de populações / Andressa Cristina Zamboni Machado. - - Piracicaba, 2006.

132 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.  
Bibliografia.

1. Adubo verde 2. Algodão 3. Nematóides parasitos de plantas 4. Pastagens  
5. Seqüenciamento genético I. Título

CDD 633.51

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

*Aos meus pais **Rita e Nivaldo**, por todo incentivo e apoio, amor e dedicação que me possibilitaram chegar até aqui*

*Aos meus avós **Antonia e José**, pelo carinho constante*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por guiar meus passos e me permitir alcançar meus objetivos

À **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, ESALQ, campus de Piracicaba, onde cursei a graduação e o doutorado, pelos conhecimentos adquiridos e pelo corpo docente de alto nível e sempre acessível

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão da bolsa de estudo

A **Luis Cláudio Cabral Motta**, pelo apoio, companheirismo, paciência e carinho dedicados em todos os momentos, e pelo auxílio na instalação, condução e avaliação de experimentos

Em especial ao prof. **Luiz Carlos Camargo Barbosa Ferraz**, pela orientação, pela boa amizade, confiança, apoio e incentivo em todas as dificuldades encontradas no decorrer desta tese

Ao meu grande mestre **Mário Massayuki Inomoto**, pelas boas risadas, inestimável amizade, e por me ensinar os primeiros passos na profissão que adotei, guiando-me até aqui

Ao pesquisador científico e grande amigo **Cláudio Marcelo Gonçalves de Oliveira**, pela paciência, sugestões e grande auxílio durante a condução e execução desta tese

À amiga MSc. **Kércya Maria Simões de Siqueira**, pela amizade, alegria e auxílio na instalação, condução e avaliação de experimentos

Aos colegas da Nematologia, Sônia R. Antedomênico, Rosângela A. Silva, Melissa D. Tomazzini, Rosana Bessi, Viviane P. Santos, Roberto K. Kubo, prof. Aílton R. Monteiro e Joaquim Souza Dias pela amizade e agradável convivência

Aos colegas Vera, José Luiz, Lázaro, Edmílson, Alexandre, Rock, Patrícia e Millor, pelos inúmeros favores, pela descontraída amizade e pelas boas risadas compartilhadas

Aos professores dos Setores de Zoologia Agrícola e Fitopatologia da ESALQ, pelo apoio técnico, conhecimentos transmitidos, conselhos e incentivo

Ao professor Luís Eduardo Aranha Camargo e à técnica Maria Antonia Ladalardo Etchegaray, pelo auxílio e aconselhamento nas técnicas biomoleculares utilizadas na execução desta tese

À Piraí Sementes, grupo MDM Ltda e Embrapa Algodão pelo fornecimento das sementes utilizadas neste trabalho

Aos colegas Roberto K. Kubo, Vilmar Gonzaga, Edivaldo Cia, César Bauer, Cláudio Marcelo G. de Oliveira e à Clínica Nematológica da ESALQ pelo fornecimento das amostras de solo e/ou raízes contendo as diferentes populações de *Pratylenchus brachyurus* utilizadas nos testes biomoleculares

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação e da Biblioteca, pela atenção, presteza e por todos os serviços que prestaram sempre de forma solícita

E a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

*“Somos escultores de nosso próprio ser”*

Nietsche

*“É preciso força para sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê”*

Marcelo Camelo

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
Referências.....	18
2 EFEITO DE DIFERENTES DENSIDADES POPULACIONAIS INICIAIS DE <i>Pratylenchus brachyurus</i> NO CRESCIMENTO DOS ALGODOEIROS ‘DELTA OPAL’ E ‘FIBERMAX 966’ .....	21
Resumo.....	21
Abstract.....	21
2.1 Introdução.....	22
2.2 Desenvolvimento.....	23
2.2.1 Revisão Bibliográfica.....	23
2.2.2 Material e Métodos.....	26
2.2.3 Resultados.....	28
2.2.4 Discussão.....	36
2.3 Conclusões.....	38
Referências.....	38
3 REAÇÃO DE CULTIVARES DE ALGODOEIRO A TRÊS POPULAÇÕES DE <i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	41
Resumo.....	41
Abstract.....	41
3.1 Introdução.....	42
3.2 Desenvolvimento.....	43
3.2.1 Revisão Bibliográfica.....	43
3.2.2 Material e Métodos.....	45

3.2.3 Resultados e Discussão.....	47
3.3 Conclusões.....	53
Referências.....	53
4 REAÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS UTILIZADAS COMO ADUBOS VERDES, COBERTURAS VEGETAIS OU PASTAGENS A <i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	57
Resumo.....	57
Abstract.....	57
4.1 Introdução.....	58
4.2 Desenvolvimento.....	60
4.2.1 Revisão Bibliográfica.....	60
4.2.2 Material e Métodos.....	66
4.2.3 Resultados e Discussão.....	70
4.3 Considerações finais.....	82
Referências.....	84
5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE <i>Pratylenchus brachyurus</i> ATRAVÉS DE PCR-RFLP E SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO ITS-1 DO rDNA.....	90
Resumo.....	90
Abstract.....	90
5.1 Introdução.....	91
5.2 Desenvolvimento.....	93
5.2.1 Revisão Bibliográfica.....	93
5.2.2 Material e Métodos.....	97
5.2.3 Resultados.....	103
5.2.4 Discussão.....	121
5.3 Conclusões.....	124
Referências.....	124

## RESUMO

### ***Pratylenchus brachyurus* x algodoeiro: patogenicidade, métodos de controle e caracterização molecular de populações**

*Pratylenchus brachyurus* é um dos nematóides mais disseminados na cultura do algodão nas áreas produtoras do Brasil. Sua patogenicidade ao algodoeiro, entretanto, é pouco estudada. Os objetivos deste trabalho foram: i) correlacionar níveis populacionais iniciais crescentes de *P. brachyurus* (0, 12.000, 30.000 e 75.000 exemplares/ planta) com os danos causados ao algodoeiro 'Delta Opal'; ii) avaliar a patogenicidade de populações de *P. brachyurus* em algodoeiros 'Delta Opal' e 'Fibermax 966'; iii) testar cultivares de algodão em relação à reprodução de três populações de *P. brachyurus*; iv) caracterizar a relação parasito-hospedeiro (em termos de suscetibilidade/resistência) de alguns adubos verdes, coberturas vegetais e pastagens a *Pratylenchus brachyurus*; v) caracterizar molecularmente populações de *P. brachyurus*, através de PCR-RFLP e seqüenciamento da região ITS-1 do rDNA. Os resultados sugerem que *P. brachyurus* é patógeno pouco agressivo da cultura do algodão, já que não se verificaram danos significativos às plantas em densidades populacionais do nematóide inferiores a 12.000 exemplares/ planta. Em relação às cultivares, todas foram suscetíveis a *P. brachyurus*. Entre as espécies vegetais testadas, as que se mostraram resistentes a *P. brachyurus* foram *Crotalaria spectabilis*, *C. breviflora*, amaranto 'BRS Alegria', nabo forrageiro 'Comum' e as cultivares de aveia preta Campeira Mor, IPFA 99006, Comum, CPAO 0010 e Gara. As análises de PCR-RFLP revelaram variabilidade genética entre as diferentes populações de *P. brachyurus* estudadas, em função dos diferentes padrões de bandas encontrados para as populações estudadas. O seqüenciamento da região ITS-1 do rDNA confirmou a variabilidade observada pela digestão enzimática, além de evidenciar heterogeneidade das regiões 18S e ITS-1 do rDNA de *P. brachyurus*.

Palavras-chave: nematóide das lesões radiculares, cultivares, *Gossypium hirsutum*, adubos verdes, coberturas vegetais, pastagens, PCR-RFLP, seqüenciamento

## ABSTRACT

### ***Pratylenchus brachyurus* x cotton: pathogenicity, control methods and molecular characterization of populations**

Although *Pratylenchus brachyurus* is widespread in Brazilian cotton fields, information about its importance as a cotton pathogen is scarce. The objectives of this work were: i) correlate crescent initial population densities (0; 12,000; 30,000; and 75,000 nematodes/ plant) with damage on cotton 'Delta Opal'; ii) measure the pathogenic effect of *P. brachyurus* on cotton 'Delta Opal' and 'Fibermax 966'; iii) characterize the reaction of cotton cultivars to three populations of *P. brachyurus*; iv) characterize the host reaction (in terms of susceptibility/resistance) of some green manures, cover crops and pastures to two populations of *P. brachyurus*; v) characterize different populations of *P. brachyurus* by PCR-RFLP and sequencing of ITS-1 rDNA region. Results suggest that *P. brachyurus* is an eventual pathogen of cotton, since high population levels were necessary to reduce plant growth (< 12,000 nematodes/ plant). All cotton cultivars tested were rated as susceptible to *P. brachyurus*. In relation to crop species tested, *Crotalaria spectabilis*, *C. breviflora*, amaranth 'BRS Alegria', oil radish 'Comum', and the black oat cultivars Campeira Mor, IPFA 99006, Comum, CPAO 0010, and Garoa were resistant to *P. brachyurus*. PCR-RFLP showed intraspecific variability for different population of *P. brachyurus* studied. Sequencing of the ITS-1 rDNA region confirmed the results of the enzymatic digestion and demonstrated heterogeneity of 18S and ITS-1 rDNA regions of *P. brachyurus*.

Key-words: root lesion nematode, cultivars, *Gossypium hirsutum*, green manures, cover crops, pastures, PCR-RFLP, sequencing

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Plantas de algodão ‘Delta Opal’ inoculadas com diferentes densidades populacionais da população Pb <sub>20</sub> de <i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	29
Figura 2.2 - Escurecimento de raízes de algodoeiro ‘Delta Opal’ inoculadas com <i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	29
Figura 2.3 – Efeito de densidades populacionais iniciais (Pi) da população Pb <sub>20</sub> de <i>Pratylenchus brachyurus</i> na massa seca da parte aérea de plantas de algodão ‘Delta Opal’.....	30
Figura 2.4 - Efeito de densidades populacionais iniciais (Pi) da população Pb <sub>20</sub> de <i>Pratylenchus brachyurus</i> na altura do algodoeiro ‘Delta Opal’.....	31
Figura 5.1 – Representação esquemática do DNA ribossômico, evidenciando os três genes ribossômicos, 18S, 5.8S e 28S (26S) e as regiões espaçadoras, ITS-1 e ITS-2.....	95
Figura 5.2 – Fragmentos de restrição da região ITS-1 amplificada de <i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	104
Figura 5.3 – Posição esquemática dos <i>primers</i> universais BL18, 5818, 18S e RN58SR, localizados nas regiões 18S e 5.8S do rDNA.....	106
Figura 5.4 – Alinhamento das seqüências da região ITS-1 do rDNA das populações Pb03ps, Pb07ps, Pb20ps e Pb21ps de <i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	107
Figura 5.5 – Amplificação da região ITS-1 de algumas populações de <i>Pratylenchus brachyurus</i> pelos <i>primers</i> universais 18S e RN58SR.....	108

- Figura 5.6 – Alinhamento das seqüências de Pb23 e Pb24 com uma população do Japão, mostrando as regiões onde foram desenhados os *primers* ACM1R, ACM2R, ACM3F e ACM4F..... 109
- Figura 5.7 – Posição esquemática dos *primers* ACM1R, ACM2R, ACM3F e ACM4F, localizados na região ITS-1 do rDNA..... 110
- Figura 5.8 – Exemplo de eletroferograma obtido para a população Pb30, mostrando a mistura de seqüências a partir da base 200..... 112
- Figura 5.9 – Alinhamento correspondente à região 18S das populações de *Pratylenchus brachyurus* e outras espécies de *Pratylenchus*..... 115
- Figura 5.10 – Árvore filogenética (*maximum likelihood*) mostrando as relações entre as populações de *Pratylenchus brachyurus* e outras espécies de *Pratylenchus*, baseada nas seqüências da região 18S..... 116
- Figura 5.11 - Alinhamento correspondente à região ITS-1 das populações de *Pratylenchus brachyurus* e outras espécies de *Pratylenchus*..... 118
- Figura 5.12 - Árvore filogenética (*maximum likelihood*) mostrando as relações entre as populações de *Pratylenchus brachyurus* e outras espécies de *Pratylenchus*, baseada nas seqüências da região ITS-1..... 119
- Figura 5.13 – Alinhamento correspondente à região ITS-1 de *Pratylenchus brachyurus*, evidenciando a variabilidade genética entre as diferentes populações..... 120

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Efeitos sobre a altura, acúmulo de massa seca da parte aérea e massa fresca de raízes decorrentes da inoculação dos algodoeiros ‘Delta Opal’ e Fibermax 966’ com 12.000 exemplares de <i>Pratylenchus brachyurus</i> por planta.....	33
Tabela 2.2 - Efeitos sobre a altura, acúmulo de massa seca da parte aérea e massa fresca de raízes decorrentes da inoculação dos algodoeiros ‘Delta Opal’ e Fibermax 966’ com 30.000 exemplares de <i>Pratylenchus brachyurus</i> por planta.....	34
Tabela 2.3 – Fator de reprodução e número de espécimes por grama de raízes de <i>Pratylenchus brachyurus</i> nos algodoeiros ‘Delta Opal’ e ‘Fibermax 966’ em casa de vegetação (Experimento 3).....	35
Tabela 2.4 - Fator de reprodução e número de espécimes por grama de raízes de <i>Pratylenchus brachyurus</i> nos algodoeiros ‘Delta Opal’ e ‘Fibermax 966’ em casa de vegetação (Experimento 4).....	35
Tabela 3.1 – Fator de reprodução e número de espécimes por grama de raízes das populações Pb <sub>20</sub> e Pb <sub>22</sub> de <i>Pratylenchus brachyurus</i> em cultivares de algodoeiro inoculadas com 1.000 exemplares/ planta (Experimento 1).....	49
Tabela 3.2 – Fator de reprodução e número de espécimes por grama de raízes das populações Pb <sub>20</sub> , Pb <sub>21</sub> e Pb <sub>22</sub> de <i>Pratylenchus brachyurus</i> em cultivares de algodoeiro inoculadas com 1.000 exemplares/ planta (Experimento 2).....	50
Tabela 3.3 – Fator de reprodução e número de espécimes por grama de raízes das populações Pb <sub>20</sub> e Pb <sub>22</sub> de <i>Pratylenchus brachyurus</i> em cultivares de algodoeiro inoculadas com 1.000 exemplares/ planta (Experimento 3).....	51

Tabela 4.1 – Fator de reprodução (Pf/Pi) e número de espécimes por grama de raízes de <i>Pratylenchus brachyurus</i> (populações Pb <sub>20</sub> e Pb <sub>24</sub> ) em espécies vegetais utilizadas como adubo verde.....	71
Tabela 4.2 – Fator de reprodução e número de espécimes por grama de raízes de <i>Pratylenchus brachyurus</i> (população Pb <sub>20</sub> ) em algumas plantas utilizadas como coberturas vegetais.....	77
Tabela 4.3 – Fator de reprodução (Pf/Pi) e número de espécimes por grama de raízes de <i>Pratylenchus brachyurus</i> (população Pb <sub>20</sub> ) em cultivares de aveia branca ( <i>Avena sativa</i> ), aveia amarela ( <i>A. byzantina</i> ) e aveia preta ( <i>A. strigosa</i> ).....	79
Tabela 4.4 – Fator de reprodução (Pf/Pi) e número de espécimes por grama de raízes de <i>Pratylenchus brachyurus</i> (populações Pb <sub>20</sub> e Pb <sub>24</sub> ) em plantas utilizadas como pastagem.....	81
Tabela 5.1 – Populações de <i>Pratylenchus brachyurus</i> utilizadas nos testes biomoleculares....	98
Tabela 5.2 – <i>Primers</i> universais utilizados nas reações de PCR.....	99
Tabela 5.3 – Populações de <i>Pratylenchus</i> spp., <i>Radopholus similis</i> e <i>Rotylenchulus reniformis</i> utilizadas na validação dos <i>primers</i> .....	103
Tabela 5.4 – Matriz de identidade (%) calculada pelo programa MatGat – Matrix Global Alignment Tool – entre <i>Pratylenchus</i> spp. e <i>Radopholus similis</i> baseada nas seqüências da região 18S do rDNA.....	114
Tabela 5.4 – Matriz de identidade (%) calculada pelo programa MatGat – Matrix Global Alignment Tool – entre <i>Pratylenchus</i> spp. baseada nas seqüências da região ITS-1 do rDNA.....	117

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura do algodoeiro tem grande valor comercial, representando uma das mais importantes atividades do agronegócio brasileiro. O Brasil participou com aproximadamente 6% da produção mundial de algodão na safra 2003/2004, sendo o quinto maior produtor mundial (FNP, 2005). Além de grande produtor, o país ocupa o quarto lugar entre os maiores exportadores de pluma, vendendo principalmente para os mercados consumidores da Indonésia, Turquia, Argentina e outros (ANUÁRIO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 2005).

Atualmente, os principais Estados produtores no Brasil são: Mato Grosso, Goiás, Bahia, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Paraná. Na região Centro-Oeste, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás são responsáveis por 73,8 % da produção nacional, superando outras regiões como o Nordeste e os Estados de São Paulo e Paraná (MELO FILHO; RICHETTI, 2003).

A partir da década de 1990, a cultura migrou para regiões anteriormente cultivadas com soja, como opção de plantio em áreas infestadas pelo nematóide de cisto da soja, *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952; tal fato proporcionou um crescimento espetacular para a cultura, com elevada produtividade em áreas de cerrado, onde é produzida com alta tecnologia (MELO FILHO; RICHETTI, 2003).

O deslocamento da produção de algodão para a região Centro-Oeste está ligado ao fato de ela apresentar melhores condições de cultivo que as regiões tradicionais, principalmente quanto ao clima, tamanho do empreendimento e nível tecnológico empregado (MELO FILHO; RICHETTI, 2003). Também contribuíram para isso problemas de ordem sanitária nos algodoais dos Estados de São Paulo e Paraná, entre eles os causados por nematóides fitoparasitos (LORDELLO, 1981).

Lordello (1976) estimou as perdas nacionais na produção de algodão em decorrência do ataque por nematóides em 8%; tal valor foi depois considerado abaixo do real, a julgar pelos efeitos depressivos sobre o desenvolvimento e a produtividade das plantas comumente observados sob condição de campo (GOULART; INOMOTO; MONTEIRO, 1997).

Há três espécies de nematóides consideradas mais daninhas à cultura do algodoeiro no Brasil (CURI; BONA, 1972; LORDELLO, 1981; MONTEIRO; FERRAZ, 1987; GOULART; INOMOTO; MONTEIRO, 1997; INOMOTO, 2001): o nematóide das galhas [*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949], o nematóide reniforme (*Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, 1940) e o nematóide das lesões radiculares [*Pratylenchus*

*brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev & Sch. Stekhoven, 1941]. Com importância secundária, é citado o nematóide das raízes em coto [*Paratrichodorus minor* (Colbran, 1956) Siddiqi, 1974]. Além dessas, há também registros de ocorrência de espécies dos seguintes gêneros, mas sem estudos conclusivos em relação aos danos possivelmente causados à cultura: *Aorolaimus*, *Criconemella*, *Helicotylenchus*, *Rotylenchus*, *Scutellonema* e *Xiphinema* (CARVALHO, 1964; LORDELLO, 1953; MONTEIRO; CHOUDHURY, 1978). Outras espécies potencialmente importantes para a cultura são: *Belonolaimus longicaudatus* Rau, 1958 e *Hoplolaimus columbus* Sher, 1961 (STARR, 1998), ainda não constatadas no Brasil (INOMOTO, 2001).

*Pratylenchus brachyurus* é uma espécie amplamente disseminada nos algodoeiros do Brasil (GIELFI; SANTOS; ATHAYDE, 2003; ASMUS, 2004; SILVA et al., 2004; MACHADO et al., 2005). É endoparasito migrador, de reprodução partenogenética. Normalmente, as fêmeas depositam os ovos dentro das raízes; a média é de 80 por fêmea. A primeira ecdise acontece ainda dentro do ovo e juvenis de segundo estágio eclodem e iniciam a alimentação. Não há formação de sítio permanente de alimentação, mas há absorção do conteúdo citoplasmático das células da raiz, geralmente do córtex, após um processo de digestão pré-oral. À medida que o nematóide se alimenta, aumenta de tamanho e passa por outras ecdises, avançando a juvenil de terceiro e de quarto estágios e, finalmente, chegando ao estágio adulto (fêmea). O nematóide geralmente completa todo o ciclo de vida dentro da raiz, mas quando esta não oferece mais condições favoráveis, abandona-a e passa para o solo, iniciando migração à procura de outras em melhor estado.

Ocorre principalmente nas regiões tropical e subtropical e apresenta certa preferência por solos arenosos. É encontrado em associação com outras espécies sedentárias, endoparasitas ou semi-endoparasitas, como *M. incognita* e *R. reniformis* no caso do algodoeiro, não sendo rara a sua presença como espécie predominante nas raízes.

Em algodoeiro, *P. brachyurus* foi relatado pela primeira vez nos Estados Unidos da América por Smith (1940). O autor observou que essa espécie, na época frequentemente confundida com outra, *P. pratensis* (de Man, 1880) Filipjev, 1936, estava largamente disseminada em lavouras de algodão do Estado da Geórgia, associada a sintomas de murcha, de onde surgiu a suspeita de provável relação desse nematóide com a murcha de *Fusarium* do algodoeiro, confirmada posteriormente por Michell e Powell (1972). Relatos da associação de *P. brachyurus* com o algodoeiro nos EUA também foram feitos por Martin, Newson e Schwegmann (1951),

Martin e Birchfield (1955), Fielding e Hollis (1956), Endo (1959), Bird, McCarter e Roncadori, (1971), Gay e Bird (1973) e Barker (1974).

No Brasil, a primeira ocorrência desse nematóide em algodoeiro foi relatada por Lordello e Arruda (1957). Esses autores relataram que, em plantas com sistemas radiculares altamente parasitados, se observava um enfezamento da parte aérea, com desenvolvimento bastante inferior ao das plantas não atacadas. Ferraz e Lordello (1961) descreveram os sintomas apresentados por algodoeiros atacados por *P. brachyurus*: “as plantas não conseguem se desenvolver, mantendo as hastes com diâmetro reduzido; o sistema radicular fica bastante debilitado, ocorrendo grande queda na produção, podendo ocorrer declínio prematuro e morte de plantas”. Lordello (1981) afirmou em relação ao parasitismo de *P. brachyurus* em algodoeiro: “as plantas atacadas por *P. brachyurus* têm o desenvolvimento bastante retardado; muitas sucumbem dentro de um lapso de tempo variável; os algodoeiros infestados mostram-se com a haste muito fina, quando comparados a pés sadios, sendo a doença, em certas áreas do Estado de São Paulo, por esse motivo, denominada por lavradores *mal do cipozinho*”.

Embora haja evidências de campo da importância de *P. brachyurus* como patógeno do algodão, Sasser (1972) comentou que não haviam, até então, estudos realizados sob condições experimentais controladas que comprovassem a capacidade desse nematóide de causar danos à cultura do algodoeiro. Também Tihohod (1991) afirmou que a patogenicidade de *P. brachyurus* ao algodoeiro no Brasil é conhecida com base em observações feitas no campo, não tendo sido adequadamente avaliada. Na verdade, estudos sob condições controladas de casa de vegetação, embora muito esporádicos (ao que tudo indica, num total de dois) já foram publicados. No primeiro, Starr e Mathieson (1985) inocularam plantas de algodão com diferentes densidades populacionais de *P. brachyurus* e concluíram que ocorrem reduções no crescimento das plantas quando esse nematóide se encontra em níveis populacionais elevados. Inomoto et al. (2001) confirmaram tais observações em experimento semelhante. Além disso, demonstrou-se que a capacidade de *P. brachyurus* causar danos à planta de algodão varia com a cultivar; assim, cultivares como IAC 20 e IAC 22 são tolerantes, enquanto Deltapine Acala 90 é susceptível (GOULART; INOMOTO; MONTEIRO, 1997; INOMOTO et al., 2001; MACHADO; INOMOTO, 2001).

O controle de *P. brachyurus* é bastante difícil por ser uma espécie polífaga. Tem sido sugerido que o círculo de hospedeiros desse nematóide é maior que o de *R. reniformis* e mesmo

que o de *M. incognita* (INOMOTO et al., 2005), o que praticamente inviabiliza o uso da rotação de culturas. A escolha de uma cultura resistente a *P. brachyurus* em sucessão ao algodão é opção natural de controle desse nematóide. *Crotalaria spectabilis* Roth. e *C. breviflora* D.C. apresentam essa característica, mas sérias restrições econômicas (ausência de renda durante um ciclo) e de manejo (controle de ervas daninhas) impedem seu uso em larga escala (INOMOTO et al., 2005). A opção ficaria a cargo de cultivares de algodão resistentes ou menos suscetíveis a esse nematóide; entretanto, não existem muitas informações a esse respeito. Portanto, há a necessidade de maiores esforços para a obtenção de alternativas de manejo de *P. brachyurus*, principalmente considerando-se sua elevada freqüência nos algodoais brasileiros.

### Referências

ANUÁRIO BRASILEIRO DO ALGODÃO. A olhos vistos, Santa Cruz do Sul, 2005, p. 30.

ASMUS, G.L. Ocorrência de nematóides fitoparasitos em algodoeiro no Estado de Mato Grosso do Sul. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 77-86, 2004.

BARKER, K.R. Influence of geographic area and previous crop on occurrence and densities of plant parasitic nematodes in North Carolina. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 58, n. 11, p. 991-995, 1974.

BIRD, G.W.; McCARTER, S.M.; RONCADORI, R.W. Role of nematodes and soil-borne fungi in cotton stunt. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 3, n. 1, p. 17-22, 1971.

CARVALHO, J.C. Levantamento de nematóides vectores no solo de um algodoal. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 27-30, 1964.

CURI, S.M.; BONA, A. Ocorrência do nematóide reniforme em culturas de algodão e maracujá no Estado de São Paulo. **Biológico**, São Paulo, v. 38, p. 127-128, 1972.

ENDO, B.Y. Responses of the root lesion nematodes, *Pratylenchus brachyurus* and *P. zae* to various plants and soil types. **Phytopathology**, Lancaster, v. 49, p. 417-421, 1959.

FERRAZ, C.A.M.; LORDELLO, L.G.E. Interferência de nematódeos em culturas de algodão. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 36, p. 131-138, 1961.

FIELDING, M.J.; HOLLIS, J.P. Occurrence of plant parasitic nematodes in Louisiana soils. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 40, n. 5, p. 403-405, 1956.

FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS. Algodão. In: \_\_\_\_\_. **Agrianual 2005**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2005. p. 181-186.

GAY, C.M.; BIRD, G.W. Influence of concomitant *Pratylenchus brachyurus* and *Meloidogyne* spp. on root penetration and populations dynamics. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 5, n. 3, p. 212-217, 1973.

GIELFI, F.S.; SANTOS, J.M.; ATHAYDE, M.L.F. Reconhecimento das espécies de fitonematóides associadas ao algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) no Estado de Goiás. **Anais... CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO**, 4, 2003, Goiânia, GO. Goiânia: Fialgo e Embrapa Algodão, 2003. 1 CD-ROM.

GOULART, A.M.C.; INOMOTO, M.M.; MONTEIRO, A.R. Hospedabilidade de oito cultivares de algodoeiro a *Pratylenchus brachyurus*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 111-118, 1997.

INOMOTO, M.M. Algodão: atacado por nematóides. **Cultivar**, Pelotas, v. 3, n. 30, p. 5-7, 2001.

INOMOTO, M.M.; GOULART, A.M.C.; MACHADO, A.C.Z.; MONTEIRO, A.R. Effect of population densities of *Pratylenchus brachyurus* on the growth of cotton plants. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 26, n. 2, p. 192-196, 2001.

INOMOTO, M.M.; ASMUS, G.L.; MACHADO, A.C.Z.; SILVA, R.A. Nematóides do algodoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 25, 2005, Piracicaba, SP. **Mínicurso 2...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Nematologia, 2005. 31 p.

LORDELLO, L.G.E.; ARRUDA, H.V. Nota prévia acerca da ocorrência de nematódeos do gênero *Pratylenchus* em raízes de algodoeiro. **O Solo**, Piracicaba, v. 49, n. 1, p. 33-34, 1957.

LORDELLO, L.G.E. **Contribuição ao conhecimento de nematódeos do solo de algumas regiões do Estado de São Paulo**. 1953. 76 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1953.

LORDELLO, L.G.E. Perdas causadas por nematóides. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 51, n. 3/4, p. 222, 1976.

LORDELLO, L.G.E. **Nematóides das plantas cultivadas**. São Paulo: Nobel, 1981, 314 p.

MACHADO, A.C.Z.; INOMOTO, M.M. Efeito de diferentes níveis populacionais de *Pratylenchus brachyurus* em algodoeiro cv. IAC 20 e Deltapine Acala 90. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 3, 2001, Campo Grande, MS. **Resumos...** Campo Grande: Embrapa Algodão e Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2001. Resumo 125, p. 873.

MACHADO, A.C.Z.; SIQUEIRA, K.M.S.; GALBIERI, R.; CIA, E. Levantamento preliminar das espécies de fitonematóides associadas à cultura do algodão no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 5, 2005, Salvador, BA. **Resumos...** Salvador: Abapa e Embrapa Algodão, 2005. Resumo 352.

MARTIN, W.J.; NEWSON, L.D.; SCHWEGMANN, J. Nematode root rot of cotton in Louisiana. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 35, p. 8, 1951.

MARTIN, W.J.; BIRCHFIELD, W. Notes on plant parasitic nematodes in Louisiana. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 35, p. 3-4, 1955.

MELO FILHO, G.A.; RICHETTI, A. **Cadeia produtiva de algodão de Mato Grosso do Sul: Eficiência econômica e competitividade**. Dourados, MS: EMBRAPA, 2003. 72 p.

MICHELL, R.E.; POWELL, W.M. Influence of *Pratylenchus brachyurus* on the incidence of Fusarium wilt in cotton. **Phytopathology**, Lancaster, v. 62, n. 3, p. 336-338, 1972.

MONTEIRO, A.R.; CHOUDHURY, M.M. *Peltamigratus ibiboca* sp. n. from Brazil (Nemata: Hoplolaimidae). **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 53, n. 4, p. 189-192, 1978.

MONTEIRO, A.R.; FERRAZ, L.C.C.B. Reação de quinze variedades de arroz a *Rotylenchulus reniformis*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 48-54, 1987.

SASSER, J.N. Nematode diseases of cotton. In: WEBSTER, J. M. **Economic Nematology**. North Carolina: Academic Press, 1972, p. 187-214.

SILVA, R.A.; SERRANO, M.A.S.; GOMES, A.C.; BORGES, D.C.; SOUZA, A.A.; ASMUS, G.L.; INOMOTO, M.M. Ocorrência de *Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne incognita* na cultura do algodoeiro no Estado do Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 29, n. 3, p. 337, 2004.

SMITH, A.L. Distribution and relation of meadow nematode, *Pratylenchus pratensis*, to Fusarium wilt of cotton in Georgia. **Phytopathology**, Lancaster, v. 30, p. 710, 1940.

STARR, J.L. Cotton. In: BARKER, K.R.; PEDERSON, G.A.; WINDHAM, G.L. (Ed.). **Plant and nematode interactions**. Madison: American Society of Agronomy, 1998, cap. 17, p. 359-379.

STARR, J.L.; MATHIESON, T. Reproduction of *Pratylenchus brachyurus* on cotton and growth response to infection by the nematode. In: BELTWIDE COTTON PRODUCTION RESEARCH CONFERENCE, 1985, New Orleans. **Proceedings...** Memphis: National Cotton Council, 1985, p. 25.

TIHOHOD, D. **Controle de nematóides parasitos do algodoeiro através de seqüência de culturas e avaliação de métodos de amostragem e extração**, 1991. 117 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1991.

## 2 EFEITO DE DIFERENTES DENSIDADES POPULACIONAIS INICIAIS DE *Pratylenchus brachyurus* NO CRESCIMENTO DOS ALGODOEIROS ‘DELTA OPAL’ E ‘FIBERMAX 966’

### Resumo

Em vista do crescente aumento em área da cultura do algodão e do problema causado pelo plantio em solos do cerrado infestados por nematóides, além da ampla disseminação do nematóide das lesões radiculares, *Pratylenchus brachyurus*, nas principais áreas algodoeiras do Brasil, foram realizados quatro experimentos visando correlacionar níveis populacionais de *P. brachyurus* com os danos causados ao algodoeiro ‘Delta Opal’, além de verificar a possível existência de variabilidade entre duas populações do nematóide nas cultivares Delta Opal e Fibermax 966. As densidades populacionais utilizadas foram: 0, 12.000, 30.000 e 75.000 exemplares/planta. As variáveis de crescimento das plantas de algodão analisadas foram massa fresca de raízes, massa seca da parte aérea e altura de plantas; além disso, o fator de reprodução ( $Pf/Pi$ ) do nematóide foi avaliado nos diferentes tratamentos, tomando-se a sua população final ( $Pf$  substrato +  $Pf$  raízes) e dividindo-se esse valor pela população inicial ( $Pi$ ). Os resultados sugerem que *P. brachyurus* é patógeno pouco agressivo da cultura do algodão, já que não se verificaram danos significativos às plantas em densidades populacionais do nematóide inferiores a 12.000 exemplares/planta. Altas densidades, como 30.000 ou 75.000 exemplares/planta, causaram escurecimento de raízes e redução do crescimento da parte aérea das plantas de algodão. Além disso, a variabilidade em relação à capacidade reprodutiva das populações de *P. brachyurus* em plantas de algodão foi demonstrada.

### Abstract

Although the lesion nematode *Pratylenchus brachyurus* is frequently reported in cotton fields of Brazil, information about its importance as a cotton pathogen is scarce and data concerning cotton resistance to *P. brachyurus* are absent. Four greenhouse trials were carried out in order to measure the pathogenic effect of *P. brachyurus* on cotton and provide information about aggressiveness of two populations of the nematode on cotton cultivars. Initial population levels used were: 0; 12,000; 30,000; and 75,000 nematodes/plant. Growth variables analyzed were fresh root weight, dry shoot weight, and plant height; in addition, reproduction factor of the nematode ( $Pf/Pi$ ) were evaluated in different treatments, dividing its final population ( $Pf$  in substrate +  $Pf$  in roots) by its initial population ( $Pi$ ). It was concluded that *P. brachyurus* is a mild pathogen of cotton, as did not provoke severe symptoms in infected plants and adversely affected the plant growth only at high initial population levels, such 30,000 or 75,000 nematodes/plant. In addition, variability in *P. brachyurus* aggressiveness to cotton was demonstrated.

## 2.1 Introdução

O algodão é uma cultura de alto risco, muito sujeita a problemas sanitários, que são freqüentemente associados à baixa produtividade, contribuindo também para o aumento do custo de produção. Muitas das doenças importantes do algodoeiro são causadas por patógenos de solo, como os nematóides, que debilitam as plantas sem, entretanto, causar danos perceptíveis na parte aérea, dificultando o seu diagnóstico.

As perdas causadas por nematóides em algodoeiro têm crescido acentuadamente nos últimos anos, podendo chegar a 20 a 50% em áreas infestadas pelo nematóide reniforme (*Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira 1940– presente em cerca de 20% dos algodoads de Mato Grosso do Sul) e pelo nematóide de galhas (*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White 1919) Chitwood 1949 – 10 a 25% dos algodoads de Mato Grosso do Sul, Goiás e Bahia) (MACHADO, 2005).

*Pratylenchus brachyurus* (Godfrey 1929) Filipjev & Sch. Stekhoven 1941, referido como nematóide das lesões radiculares, é uma espécie amplamente disseminada nas áreas algodoeiras do Brasil. Levantamentos recentes evidenciam a alta incidência desse parasito nas principais regiões cotonicultoras, como Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e São Paulo (GIELFI; SANTOS; ATHAYDE, 2003; SILVA et al., 2004; ASMUS, 2004; MACHADO et al., 2005). Como regra, *P. brachyurus* ocorre em alta freqüência nos Estados mencionados, embora em baixas densidades populacionais.

As perdas causadas por essa espécie são difíceis de serem detectadas, provavelmente chegando a cerca de 10% (MACHADO, 2005); quando existe a associação desse nematóide com *R. reniformis* ou *M. incognita* os danos são mais facilmente percebidos. Em condições controladas, as perdas ocorrem quando o nematóide encontra-se em altas populações, o que pode ser verificado em áreas de plantio direto ou cultivo irrigado, sob seqüência de plantas suscetíveis. Esse nematóide causa danos nem sempre perceptíveis aos olhos do produtor. Os sintomas do ataque de *P. brachyurus*, ao contrário de *Meloidogyne*, não são característicos; por essa razão, essa alta freqüência com que *P. brachyurus* é encontrado nas áreas produtoras de algodão tem sido motivo de preocupação. No sistema radicular de plantas infestadas com *P. brachyurus*, observam-se longos trechos enegrecidos, causados pelo seu caminhar no interior das raízes, o que pode também ser ocasionado por vários outros grupos de patógenos, evidenciando a dificuldade do seu diagnóstico (MACHADO, 2005). Na parte aérea verifica-se apenas um menor

crescimento da planta, que pode ser também atribuído à deficiência nutricional. Além disso, as reboleiras causadas por *P. brachyurus* são bastante discretas e o sintoma típico de ataque de nematóides ao algodoeiro, a chamada folha “carijó”, não é observado. Esse quadro de subdesenvolvimento geral da parte aérea, sistema radicular menos volumoso e até declínio prematuro das plantas de algodão, já foi denominado por Lordello (1981) de “mal-do-cipozinho”.

Observações experimentais a campo mostraram não haver correlação entre baixas populações de *P. brachyurus* e a produção de algodão (MACHADO et al., 2006), mas, como resultados em casa de vegetação mostraram que essa espécie é patogênica ao algodoeiro, tal quadro não deve ser considerado permanente, uma vez que seqüências de culturas suscetíveis ao nematóide podem, no futuro, levar a densidades populacionais suficientemente altas para que os danos observados em casa de vegetação sejam reproduzidos no campo.

Para que o controle de *P. brachyurus* em algodoeiro através de métodos como a rotação de culturas ou a resistência genética possa ser devidamente estudado, é necessária a definição da importância desse nematóide como um patógeno da cultura. O objetivo desse trabalho, portanto, foi verificar, em condições de casa de vegetação, os danos possivelmente causados por diferentes densidades populacionais iniciais de *P. brachyurus* em duas das cultivares de algodão mais plantadas atualmente no Brasil.

## **2.2 Desenvolvimento**

### **2.2.1 Revisão bibliográfica**

O algodoeiro é uma cultura de grande valor comercial, tanto pela produção de fibra quanto de semente. O final da década de 1980 foi caracterizado pelo declínio dessa cultura em São Paulo e Paraná, até então os maiores produtores nacionais, devido às perdas causadas pelo bicudo (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843) e à concorrência do produto estrangeiro. No final da década dos anos 90 a área cultivada com algodoeiro voltou a crescer, principalmente nos Estados de Mato Grosso, Goiás e Bahia (SANTOS; SANTOS, 1999; BELTRÃO; CARDOSO, 2003).

O nematóide das galhas (raças 3 e 4 de *M. incognita*) e o nematóide reniforme (*R. reniformis*), foram responsáveis por grandes perdas nos Estados de São Paulo e Paraná, mas ainda não causam preocupação em Mato Grosso, provavelmente por serem de ocorrência muito localizada. Em levantamento efetuado nesse Estado, Silva et al. (2004) relataram que em apenas 25 das 623 amostras coletadas (4,01%) em 18 municípios, representando 21.793 ha, ocorreu *M.*

*incognita*, em contraste com os 94% de frequência de *P. brachyurus*. No estado do Mato Grosso do Sul, segundo Asmus (2004), há expressiva presença de *R. reniformis*, mas com predomínio do nematóide das lesões (29, 19 e 59% de frequência de *M. incognita*, *R. reniformis* e *P. brachyurus*, respectivamente, em 104 amostras). Na região algodoeira mais nova do Mato Grosso do Sul (Chapadão do Sul, Costa Rica e São Gabriel do Oeste), foram observadas altas frequências de ocorrência de *P. brachyurus* (respectivamente 82, 79 e 87%), porém em baixas populações (ASMUS, 2004).

No Estado de Goiás, Gielfi, Santos e Athayde (2003) coletaram 237 amostras de solo e raízes de algodoeiro, em dez municípios, encontrando *P. brachyurus* em todos os municípios e em 79% das amostras, predominando baixas densidades populacionais (menos que 30 nematóides por grama de raízes, em 146 amostras). Ruano et al. (1992) afirmou que altas populações de *P. brachyurus* têm sido encontradas no Estado do Paraná, mas os danos causados por esse nematóide à cultura ainda não foram caracterizados. Para o Estado de São Paulo, as informações disponíveis são incompletas ou muito antigas. Lordello (1976) efetuou um levantamento parcial em áreas algodoeiras do Estado, com o objetivo de verificar a distribuição dos nematóides do gênero *Meloidogyne*. Recentemente, Machado et al. (2005), em levantamento preliminar no Estado de São Paulo, verificaram que o nematóide predominante nas regiões amostradas é *R. reniformis*, mas que *P. brachyurus* estava presente em todas as amostras coletadas, embora em baixas densidades populacionais.

A alta frequência de *P. brachyurus* configura novidade e também motivo de preocupação em áreas produtoras de algodão, devido à escassez de informações sobre as relações entre esse nematóide e a cultura. Há décadas, reduções no crescimento de plantas de algodão têm sido atribuídas a *P. brachyurus* sob condições de campo (MARTIN; NEWSON; SCHWEGMANN, 1951; LORDELLO; ARRUDA, 1957; FERRAZ; LORDELLO, 1961), mas experimentos de casa de vegetação visando à avaliação dos danos que essa espécie causa na cultura são escassos (STARR; PAGE, 1993). Ainda discute-se a importância de *P. brachyurus* como patógeno do algodoeiro, provavelmente porque cause danos somente quando em elevadas densidades populacionais. Em experimentos em casa de vegetação, populações iniciais de 16.000 a 27.000 nematóides por planta foram necessárias para reduzir significativamente o crescimento de algodoeiro (STARR; MATHIESON, 1985; INOMOTO et al., 2001).

Em experimento de casa de vegetação, Starr e Mathieson (1985) inocularam plantas de algodão ‘TAMCOT SP37’ com densidades populacionais crescentes de *P. brachyurus* (1.000, 2.000, 4.000, 8.000 e 16.000 exemplares/ planta), observando redução na massa fresca de raízes ( $r = 0,79$ ;  $P = 0,05$ ). Não foi observada correlação entre a densidade populacional do nematóide e a massa seca da parte aérea das plantas, apesar de a maior população causar ligeiro decréscimo nessa variável. Foi observado ainda o aparecimento de lesões necróticas nas raízes, em função da invasão dos tecidos pelo nematóide. Os autores concluíram que o algodão é um hospedeiro desfavorável a *P. brachyurus*, mas que em densidades populacionais elevadas pode ocorrer alguma redução de crescimento das plantas.

Posteriormente, Inomoto et al. (2001), utilizando densidades populacionais de 0, 333, 1.000, 3.000, 9.000 e 27.000 exemplares/planta e duas cultivares de algodão, IAC 20 e IAC 22, verificaram que ambas se mostraram boas hospedeiras do nematóide, embora este não tenha afetado a altura e reduzido apenas ligeiramente a massa fresca das raízes e a massa seca da parte aérea das plantas, mesmo sob a densidade populacional mais alta (acima de 9.000 exemplares/planta).

Existem poucas informações de campo disponíveis sobre o patossistema algodão/ *P. brachyurus*. Destacam-se os trabalhos de Lordello e Arruda (1957) e Ferraz e Lordello (1961), que relataram a ocorrência do nematóide das lesões em algodoais de Ribeirão Preto, Campinas, Laranjal Paulista e Presidente Prudente, municípios do Estado de São Paulo. Na época, os autores atribuíram ao parasito a causa do declínio prematuro de plantas de algodoeiro, que possuíam sistemas radiculares deficientes, sintomas de carência nutricional e subdesenvolvimento geral da parte aérea. Mais tarde, Lordello (1981) denominou esse quadro de “mal-do-cipozinho”.

Recentemente, Machado et al. (2006) avaliaram populações de *P. brachyurus* nas raízes e as produções de plantios comerciais de algodoeiro, em duas fazendas no município de Campo Verde (MT) e uma no município de Primavera do Leste (MT), durante a safra de 2002/ 03, onde o algodoeiro havia sido utilizado como cultura de verão nas duas safras anteriores; não foi verificada correlação significativa entre a população de *P. brachyurus* e a produção de algodão.

Em vista do quadro apresentado acima, pode-se inferir que seqüências de culturas suscetíveis a *P. brachyurus* podem, no futuro, levar a densidades populacionais suficientemente altas para que os danos observados em casa de vegetação sejam reproduzidos no campo. Nesse sentido, a determinação do potencial de danos que essa espécie possa causar às culturas atacadas é

de grande importância para seu adequado manejo. A escolha de um modelo ou equação que correlacione a intensidade da população patogênica com os danos causados é de grande importância para a previsão de perdas na cultura e também para o estabelecimento de estratégias de manejo (BERGAMIN FILHO et al., 1995).

## 2.2.2 Material e Métodos

### Obtenção do inóculo

Foram utilizadas três populações de *P. brachyurus*, denominadas Pb<sub>20</sub>, Pb<sub>21</sub> e Pb<sub>22</sub>. A população Pb<sub>20</sub> foi obtida a partir de uma única fêmea, extraída de raízes de quiabeiro (*Abelmoschus esculentus* Moench.) coletadas no município de Seropédica, RJ. A população resultante foi mantida em laboratório em calos de alfafa (*Medicago sativa* L.), segundo o método de Riedel, Foster e Mai (1973), e também em casa de vegetação, em plantas de quiabeiro e milho (*Zea mays* L.). As outras populações, Pb<sub>21</sub> e Pb<sub>22</sub>, foram coletadas em plantios comerciais de algodão nos municípios de Serra do Ramalho, BA, e Campo Verde, MT, respectivamente. Inicialmente, plantas de milho foram cultivadas em vasos de argila contendo solo dessas localidades e posteriormente os nematóides foram extraídos de suas raízes (COOLEN; D'HERDE, 1972) e coletados um a um sob estereoscópio, para inoculação em plantas de quiabeiro, na proporção de 30 a 65 fêmeas por planta. As populações Pb<sub>21</sub> e Pb<sub>22</sub> foram mantidas em casa de vegetação e extraídas das raízes de quiabeiro três meses após a inoculação, para exame ao microscópio óptico e confirmação da espécie, com base em Handoo e Golden (1989).

Os espécimes de *P. brachyurus* utilizados como inóculo nos quatro experimentos foram obtidos de raízes de quiabeiro e milho, pelo método do Funil de Baermann modificado para recipiente raso (HOOPER, 1986). Na suspensão obtida, o número de exemplares por mililitro foi estimado, sob microscópio óptico e com auxílio de lâmina de Peters.

### Preparo e inoculação das plantas

Sementes de algodão 'Delta Opal' e 'Fibermax 966', obtidas da Embrapa Algodão (Campina Grande, PB) e MDM Ltda (Uberlândia, MG), foram semeadas em recipientes plásticos, com 500 cm<sup>3</sup> de capacidade, contendo cerca de 400 cm<sup>3</sup> de substrato tratado com brometo de metila (150 cm<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>). Imediatamente após a germinação (cerca de 3 a 4 dias após a semeadura), foi feito o desbaste das plântulas, de modo a deixar apenas uma por recipiente. As inoculações foram

realizadas aos 16 dias após a germinação, quando os algodoeiros emitiram o segundo par de folhas verdadeiras, mediante pipetagem de volumes pré-ajustados da suspensão contendo os nematóides, em dois orifícios de 2 cm de profundidade, feitos a 2 cm de distância do colo das plantas. Às testemunhas (plantas não inoculadas) foi adicionada água destilada. Antes de serem transferidas para a casa de vegetação, as plantas, recém-inoculadas, foram mantidas por dois dias em uma sala escura sob temperatura ambiente, buscando-se evitar a exposição do nematóide a temperaturas excessivamente elevadas durante esse período.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação dotada de sistema de refrigeração, na ESALQ/USP, em Piracicaba, SP, durante todo o período experimental, recebendo uma adubação por via líquida no solo 15 dias após a inoculação (0,5 g de sulfato de amônio + 0,5 g da fórmula 15N: 15P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 30K<sub>2</sub>O: 0,18Zn: 0,04Mn: 0,005Mo por planta). Duas pulverizações com etofemprox + protiofós e duas de tiametoxam foram feitas aos 10 e 30 dias após a inoculação, respectivamente, para o controle de ácaros e insetos sugadores, assim que detectados.

### **Experimentos 1 e 2. Efeito de diferentes densidades populacionais de *Pratylenchus brachyurus* no crescimento de algodoeiro ‘Delta Opal’**

Foram feitos dois experimentos de casa de vegetação visando determinar o efeito de diferentes densidades populacionais de *P. brachyurus* em algodoeiro. Para tal, plantas de algodão ‘Delta Opal’ foram inoculadas com quatro densidades populacionais iniciais (Pi) da população Pb<sub>20</sub> de *P. brachyurus*: 0 (testemunha), 12.000, 30.000 e 75.000 exemplares/planta. Densidades de inóculo menores que 12.000 não foram utilizadas porque trabalhos anteriores demonstraram que Pi < 16.000 exemplares/planta não foram suficientes para causar redução do crescimento dos algodoeiros testados (STARR; MATHIESON, 1985; INOMOTO et al., 2001). Foram feitas 10 repetições por tratamento, ou seja, para cada Pi utilizada.

A avaliação foi realizada aos 54 e 62 dias após a inoculação (d.a.i.) das plantas para os experimentos 1 e 2, respectivamente. O experimento 2 teve um maior período experimental por causa das temperaturas menos favoráveis para o desenvolvimento do nematóide observadas durante sua condução (de 08 de abril a 09 de junho de 2003), em comparação com o experimento 1 (de 12 de dezembro de 2002 a 06 de fevereiro de 2003). Ao final do período experimental, avaliou-se o crescimento das plantas [altura e massa seca da parte aérea (secagem em estufa a 60 °C) e massa fresca das raízes]. A população final de *P. brachyurus* (Pf) foi obtida através da

contagem dos nematóides extraídos do substrato (JENKINS, 1964) e das raízes (COOLEN; D'HERDE, 1972). O fator de reprodução do nematóide (Pf/Pi) foi estimado para cada repetição, dividindo-se a população final (Pf substrato + Pf raízes) pela inicial (Pi).

#### **Experimentos 3 e 4. Efeito de duas densidades populacionais de Pb<sub>20</sub> e Pb<sub>22</sub> no crescimento dos algodoeiros 'Delta Opal' e 'Fibermax 966'**

Plantas de algodão 'Delta Opal' e 'Fibermax 966' foram inoculadas com 12.000 (experimento 3) e 30.000 (experimento 4) exemplares das populações Pb<sub>20</sub>, Pb<sub>21</sub> e Pb<sub>22</sub> de *P. brachyurus*. Foram estabelecidas seis e cinco repetições para cada população e cultivar, nos experimentos 3 e 4, respectivamente, em função da disponibilidade de inóculo por ocasião da instalação dos mesmos. A avaliação foi realizada aos 53 e 51 dias após a inoculação, para os experimentos 3 e 4, respectivamente. O período experimental foi de 12 de julho a 01-03 de setembro de 2003. Ao final do período experimental, avaliou-se o crescimento das plantas e estimaram-se os valores do fator de reprodução, tal como descrito para os experimentos 1 e 2.

#### **Análise estatística**

Os quatro experimentos foram estabelecidos segundo delineamento inteiramente casualizado e os dados obtidos foram analisados sem transformação, utilizando-se o software SANEST (Departamento de Matemática e Estatística, ESALQ/USP, Piracicaba, SP). Os dados de crescimento das plantas obtidos nos experimentos 1 e 2 foram submetidos à análise de regressão. As médias das variáveis relativas ao crescimento das plantas obtidas nos experimentos 3 e 4 foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P = 0,05$ ).

### **2.2.3 Resultados**

#### **Experimentos 1 e 2. Efeito de diferentes densidades populacionais de *Pratylenchus brachyurus* no crescimento de algodoeiro 'Delta Opal'**

As plantas inoculadas não mostraram outros sintomas além da redução de crescimento. As densidades populacionais mais altas (30.000 e 75.000) causaram subdesenvolvimento das plantas, com folhas em menor número e de menor tamanho; todavia, clorose acentuada e/ou queda de folhas não foram observadas (Figura 2.1). Nas raízes das plantas inoculadas com 30.000 exemplares, observaram-se trechos de extensão variável nas raízes secundárias em que a

coloração estava alterada, mais escura, ao que tudo indica como resultado da coalescência das lesões internas causadas pelo parasito (Figura 2.2). Apesar disso, os sistemas radiculares não apresentaram diminuição significativa de volume, em comparação com a testemunha.

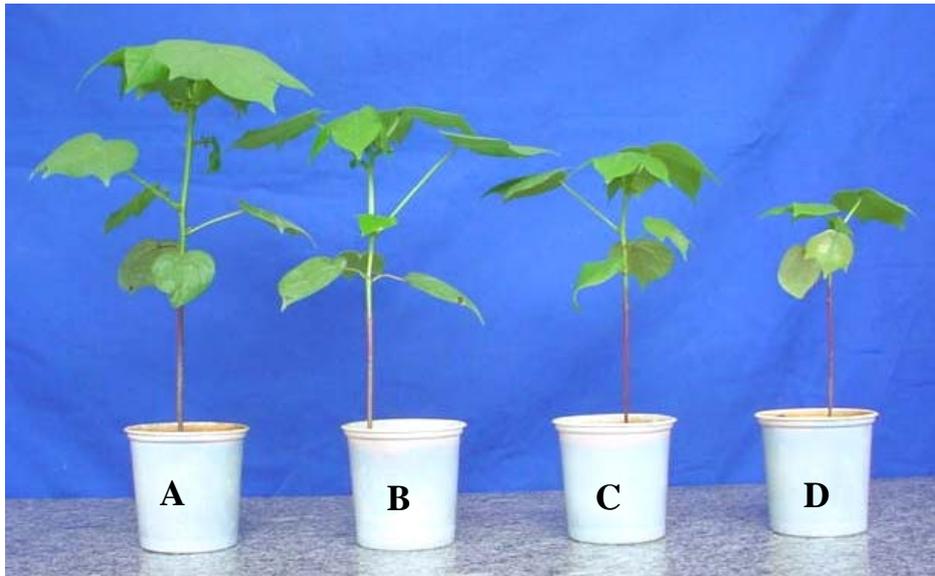


Figura 2.1 – Plantas de algodão ‘Delta Opal’ inoculadas com diferentes densidades populacionais (A = testemunha; B = 12.000; C = 30.000 e D = 75.000) da população *Pb*<sub>20</sub> de *Pratylenchus brachyurus*



Figura 2.2 – Escurecimento de raízes de algodoeiro ‘Delta Opal’ inoculadas com *Pratylenchus brachyurus* (*Pi* = 30.000 exemplares)

Avaliações quantitativas do crescimento das plantas confirmaram o efeito negativo de *P. brachyurus* em algodão ‘Delta Opal’ (Figuras 2.3 e 2.4). A análise de regressão mostrou um efeito negativo da população  $Pb_{20}$  na altura das plantas, no experimento 1 (Figura 2.4). A equação  $y = 33,96 - 0,0000561 x$  representa a relação entre a altura das plantas ( $y$ , em centímetros) e a  $Pi$  do nematóide ( $x$ , em número de exemplares de 0 a 75.000). Do mesmo modo, ficou evidenciado um efeito negativo de  $Pb_{20}$  na massa seca da parte aérea das plantas (Figura 2.3), representado pela equação  $y = 4,51 - 0,0000236 x$ , em que  $y$  é a massa seca da parte aérea das plantas (em gramas) e  $x$  é a  $Pi$  do nematóide (de 0 a 75.000 exemplares). A população do nematóide aumentou pouco ou mesmo decresceu durante o experimento 1 ( $Pf/Pi = 1,06; 0,245$  e  $0,081$  para  $Pi = 12.000, 30.000$  e  $75.000$ ).

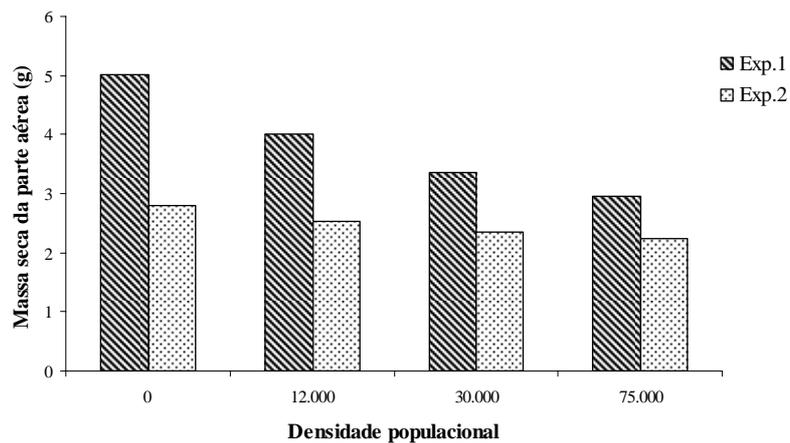


Figura 2.3 – Efeito de densidades populacionais iniciais ( $Pi$ ) da população  $Pb_{20}$  de *Pratylenchus brachyurus* (testemunha, 12.000, 30.000 e 75.000 exemplares/planta) na massa seca da parte aérea de plantas de algodão ‘Delta Opal’

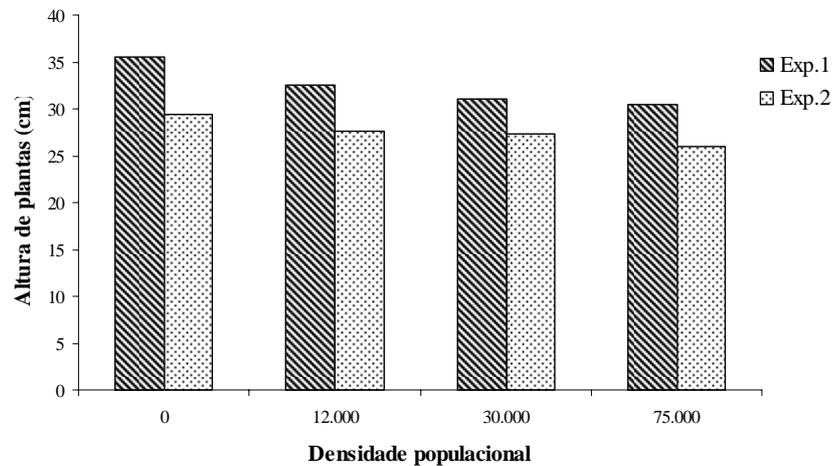


Figura 2.4 - Efeito de densidades populacionais iniciais ( $P_i$ ) da população  $Pb_{20}$  de *Pratylenchus brachyurus* (testemunha, 12.000, 30.000 e 75.000 exemplares/planta) na altura do algodoeiro 'Delta Opal'

No experimento 2 (avaliação aos 62 d.a.i.), foi verificado efeito negativo de  $Pb_{20}$  na altura das plantas, demonstrado pela equação  $y = 28,73 - 0,0000396 x$ , onde  $y$  é a altura das plantas (em centímetros) e  $x$  é a  $P_i$  do nematóide (de 0 a 75.000 exemplares). Entretanto, não foi verificado efeito negativo sobre a massa seca da parte aérea das plantas. A população do nematóide foi apenas mantida durante o período experimental ( $P_f/P_i = 1,00$  para  $P_i = 12.000$ ) ou mesmo decresceu ( $P_f/P_i = 0,70$  e  $0,34$  para  $P_i = 30.000$  e  $75.000$ ).

#### **Experimentos 3 e 4. Efeito de duas densidades populacionais de $Pb_{20}$ e $Pb_{22}$ no crescimento dos algodoeiros 'Delta Opal' e 'Fibermax 966'**

Nenhuma das três populações de *P. brachyurus* testadas ( $Pb_{20}$ ,  $Pb_{21}$  e  $Pb_{22}$ ), na densidade populacional de 12.000 exemplares/planta, afetou o crescimento dos algodoeiros 'Delta Opal' e 'Fibermax 966' no experimento 3 (Tabela 2.1). Houve decréscimo populacional do nematóide durante o período experimental, caracterizado por  $P_f/P_i < 1,0$ , não se verificando diferenças significativas entre as populações do nematóide e as cultivares de algodoeiro (Tabela 2.3).

No experimento 4, com  $P_i$  de 30.000 exemplares/planta, utilizando-se as populações  $Pb_{20}$  e  $Pb_{22}$ , o nematóide causou um efeito adverso pequeno na altura das plantas ( $P = 0,05$ ) e na massa seca da parte aérea ( $P = 0,05$ ). A população  $Pb_{20}$  não diferiu de  $Pb_{22}$ , considerando-se o efeito no

crescimento das plantas, entretanto, apenas Pb<sub>22</sub> diferenciou-se da testemunha (Tabela 2.2). Durante o experimento, a população de ambas as populações decresceu ( $P_f/P_i = 0,78$  para Pb<sub>20</sub> e 0,65 para Pb<sub>22</sub>) (Tabela 2.4).

Tabela 2.1 – Efeitos sobre a altura, acúmulo de massa seca da parte aérea (MSPA) e massa fresca de raízes (MFR) decorrentes da inoculação dos algodoeiros ‘Delta Opal’ (DO) e ‘Fibermax 966’ (FM) com 12.000 exemplares de *Pratylenchus brachyurus* (populações Pb<sub>20</sub>, Pb<sub>21</sub> e Pb<sub>22</sub>) por planta. Experimento 3

População de <i>Pratylenchus</i> <i>brachyurus</i>	MFR (g)			MSPA (g)			Altura (cm)		
	DO	FM	Média*	DO	FM	Média*	DO	FM	Média*
Testemunha	8,02	6,58	7,30 a	2,84	3,43	3,14 a	23,7	21,2	22,5 a
Pb <sub>20</sub>	8,29	6,80	7,54 a	3,21	3,28	3,25 a	25,4	22,5	24,0 a
Pb <sub>21</sub>	8,16	7,07	7,61 a	3,94	3,40	3,67 a	25,0	21,7	23,4 a
Pb <sub>22</sub>	9,75	6,71	8,23 a	3,49	3,25	3,37 a	26,0	21,9	24,0 a
<b>Média*</b>	8,55 A	6,76 B	..	3,37 A	3,34 A	..	25,1 A	21,9 B	..

\*Médias de seis repetições; médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si ao nível de significância de 5% segundo o teste de Tukey.

Tabela 2.2 – Efeitos sobre a altura, acúmulo de massa seca da parte aérea (MSPA) e massa fresca de raízes (MFR) decorrentes da inoculação dos algodoeiros ‘Delta Opal’ (DO) e ‘Fibermax 966’ (FM) com 30.000 exemplares de *Pratylenchus brachyurus* (populações Pb<sub>20</sub> e Pb<sub>22</sub>) por planta. Experimento 4

População de <i>Pratylenchus</i> <i>brachyurus</i>	MFR (g)			MSPA (g)			Altura (cm)		
	DO	FM	Média*	DO	FM	Média*	DO	FM	Média*
Testemunha	10,15	6,75	8,4 a	4,13	3,6	3,8 a	25,8	21,6	23,7 a
Pb <sub>20</sub>	8,9	7,76	8,3 a	2,94	3,27	3,1 ab	22,1	20,5	21,3 ab
Pb <sub>22</sub>	8,75	6,82	7,8 a	3,28	2,43	2,8 b	23,6	18,5	21,0 b
<b>Média*</b>	9,2 A	7,1 B	..	3,4 A	3,1 A	..	23,8 A	20,2 B	..

\*Médias de cinco repetições; médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si ao nível de significância de 5% segundo o teste de Tukey.

Tabela 2.3 - Fator de reprodução e número de espécimes por grama de raízes de *Pratylenchus brachyurus* (populações Pb<sub>20</sub>, Pb<sub>21</sub>, Pb<sub>22</sub>) nos algodoeiros ‘Delta Opal’ (DO) e ‘Fibermax 966’ (FM) em casa de vegetação. Experimento 3

População de <i>Pratylenchus</i> <i>brachyurus</i>	Fator de reprodução (Pf/Pi)			Número de nematóides/ grama de raízes		
	DO	FM	Média*	DO	FM	Média*
Pb <sub>20</sub>	0,54	0,61	0,58 a	922	1.282	1.102 a
Pb <sub>21</sub>	0,44	0,32	0,38 a	714	648	681 b
Pb <sub>22</sub>	0,68	0,39	0,54 a	936	817	877 ab
<b>Média*</b>	0,55 A	0,44 A	..	857 A	915 A	..

\*Médias de seis repetições; médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si ao nível de significância de 5% segundo o teste de Tukey.

Tabela 2.4 – Fator de reprodução e número de espécimes por grama de raízes de *Pratylenchus brachyurus* (populações Pb<sub>20</sub> e Pb<sub>22</sub>) nos algodoeiros ‘Delta Opal’ (DO) e ‘Fibermax 966’ (FM) em casa de vegetação. Experimento 4

População de <i>Pratylenchus</i> <i>brachyurus</i>	Fator de reprodução (Pf/Pi)			Número de nematóides/ grama de raízes		
	DO	FM	Média*	DO	FM	Média*
Pb <sub>20</sub>	1,06	0,51	0,78 a	3.386	1.920	2.653 a
Pb <sub>22</sub>	0,7	0,61	0,65 a	2.244	2.532	2.388 a
<b>Média*</b>	0,88 A	0,56 A	..	2.815 A	2.226 A	..

\*Médias de cinco repetições; médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si ao nível de significância de 5% segundo o teste de Tukey.

#### 2.2.4 Discussão

As três populações de *P. brachyurus* testadas mostraram-se patógenos fracos da cultura do algodão. Nenhuma causou sintomas severos nas plantas inoculadas, tais como a clorose acentuada e a desfolha tipicamente provocadas por *Meloidogyne incognita* em algodoeiro (STARR; PAGE, 1993; KINLOCH; SPRENKEL, 1994). Um atraso no desenvolvimento das plantas foi observado, mas somente em densidades populacionais elevadas, como 30.000 ou 75.000 exemplares/planta. Comparativamente, a população Pb<sub>20</sub>, utilizada no presente trabalho, causou efeito adverso no crescimento de plantas de quiabo e café (*Coffea arabica* L.) em Pi muito menores, como 3.000 exemplares/planta, em trabalhos anteriores de casa de vegetação (INOMOTO et al., 2002; INOMOTO; SILVA; PIMENTEL, 2004).

Nos experimentos 1 e 2, a população Pb<sub>20</sub> afetou negativamente o crescimento das plantas de algodão, mas tal efeito foi pequeno. Por exemplo, no experimento 1, a equação obtida para a relação entre a massa seca da parte aérea e a Pi do nematóide ( $y = 4,51 - 0,0000236 x$ ) indicou que uma alta Pi, como 30.000 exemplares, pode causar uma diminuição na massa seca da parte aérea das plantas de apenas 0,708 gramas. Esse valor representa apenas 15,7% da massa estimada para plantas não inoculadas.

Os resultados dos experimentos 3 e 4 estão de acordo com os obtidos nos experimentos 1 e 2. A população Pb<sub>22</sub> causou decréscimo no crescimento das plantas de algodão (altura de plantas e massa seca da parte aérea), mas a população Pb<sub>20</sub>, mesmo em densidades da ordem de 30.000 exemplares, não afetou o crescimento das plantas.

Portanto, os resultados dos experimentos ora apresentados confirmam o restrito efeito adverso de *P. brachyurus* sobre o crescimento do algodoeiro, ou a alta tolerância da cultura ao parasitismo de *P. brachyurus*. Experimentos anteriores, em condições controladas, demonstraram que Pi de 16.000 a 27.000 exemplares de *P. brachyurus*/planta foram necessárias para reduzir o crescimento de algodoeiro (STARR; MATHIESON, 1985; INOMOTO et al., 2001). Apesar de os danos causados por *P. brachyurus* ao algodoeiro em condições de campo não terem sido devidamente estudados, relatos anteriores mostram que a assertiva acima é válida também para essa condição. Machado et al. (2006), em experimentos realizados em três áreas de cultivo de algodoeiro no Estado do Mato Grosso, confirmaram esses resultados, já que não foi observada correlação entre a população de *P. brachyurus* nas raízes e a produção de algodão. Os autores concluíram que, como resultados de casa de vegetação demonstraram que *P. brachyurus* é

patogênico ao algodoeiro, embora seja pouco agressivo, é provável que as populações do nematóide nas três áreas estudadas tenham sido insuficientes para causar danos detectáveis. Tal quadro, entretanto, não deve ser considerado permanente, uma vez que seqüências de culturas suscetíveis a *P. brachyurus* podem no futuro levar a densidades populacionais suficientemente altas para que os danos observados em casa de vegetação sejam reproduzidos no campo.

Os danos causados por *P. brachyurus* em áreas produtoras de algodão podem ser evitados pelo manejo do nematóide através de práticas que reduzam sua população no solo, como a rotação de culturas com plantas resistentes ou não hospedeiras. Esse fato pode explicar os poucos relatos a respeito de danos causados por *P. brachyurus* em algodoeiro sob condições de campo (MARTIN; NEWSON; SCHWEGMANN, 1951; LORDELLO; ARRUDA, 1957; ROBBINS; RIGGS; VON STEEN, 1989).

A população do nematóide aumentou pouco e até decresceu nos quatro experimentos realizados, provavelmente devido às altas densidades populacionais utilizadas (12.000; 30.000 e 75.000), resultando em um número excessivo de nematóides nas raízes (2.165 a 2.494 nematóides por grama de raízes no experimento 1; 901 a 2.282 no experimento 2; 648 a 1.282 no experimento 3; e 1.920 a 3.386 no experimento 4). Essa relação reflete o efeito comumente observado em plantas suscetíveis inoculadas com altas densidades populacionais de nematóides, que é a competição por sítios de alimentação e reservas alimentares, causando diminuição da população (ROBERTS, 2002). Em estudo anterior (INOMOTO et al., 2001), fatores de reprodução de *P. brachyurus* mais elevados, da ordem de 2,54 a 7,89, foram obtidos com densidades populacionais entre 125 e 333 exemplares/planta. Esses resultados evidenciam que o algodoeiro é suscetível a *P. brachyurus* e que experimentos visando comparar dados de reprodução do nematóide em diferentes cultivares devem ser feitos usando-se, preferivelmente, densidades populacionais iniciais mais baixas do nematóide, como 1.000 exemplares/planta.

Os resultados obtidos nos experimentos 3 e 4 indicam que existe variabilidade entre as populações Pb<sub>20</sub>, Pb<sub>21</sub> e Pb<sub>22</sub>, em relação à agressividade ao algodoeiro. Isso pôde ser verificado no experimento 3, em que a população Pb<sub>22</sub> na Pi de 30.000 causou redução no crescimento das plantas quando comparado com a testemunha, mas a população Pb<sub>20</sub> não causou semelhante efeito adverso, embora ambas as populações não tenham diferido uma da outra. Portanto, estudos posteriores que venham a tratar da reação de cultivares de algodão a *P. brachyurus* devem levar em consideração a possível variabilidade existente entre as populações do nematóide.

### 2.3 Conclusões

*P. brachyurus* afeta o crescimento do algodoeiro apenas quando presente em densidades populacionais elevadas, evidenciando a baixa agressividade do nematóide à cultura ou a alta tolerância do algodoeiro a essa espécie. Altas densidades populacionais no campo, portanto, devem ser evitadas pelos produtores através de adequado manejo do parasito na área, implementando medidas, por exemplo, como a rotação com culturas não hospedeiras ou resistentes ao nematóide. Além disso, nos programas de melhoramento genético do algodoeiro, deve-se levar em conta a possibilidade de variação tanto na suscetibilidade das cultivares frente a *P. brachyurus* como entre diferentes populações do nematóide em termos de agressividade.

### Referências

- ASMUS, G.L. Ocorrência de nematóides fitoparasitos em algodoeiro no Estado de Mato Grosso do Sul. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n.1, p. 77-86, 2004.
- BELTRÃO, N.E.M.; CARDOSO, G.D. A safra brasileira. **Revista Cultivar**, Pelotas, v. 5, n.49, p. 19-21, 2003.
- BERGAMIN FILHO, A.; LOPES, D.B.; AMORIN, L.; GODOY, C.V.; BERGER, R.D. Avaliação de danos causados por doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.3, p.133-184, 1995.
- COOLEN, W.A.; D'HERDE, C.J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent, Belgian: State of Nematology and Entomology research Station, 1972, 77 p.
- FERRAZ, C.A.M.; LORDELLO, L.G.E. Interferência de nematódeos em culturas de algodão. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.36, p.131-138, 1961.
- GIELFI, F.S.; SANTOS, J.M.; ATHAYDE, M.L.F. Reconhecimento das espécies de fitonematóides associadas ao algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) no Estado de Goiás. **Anais... CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO**, 4, 2003, Goiânia, GO. Goiânia: Fialgo e Embrapa Algodão, 2003. 1 CD-ROM.
- HANDOO, Z.A.; GOLDEN, A.M. A key and diagnostic compendium to the species of the genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (lesion nematodes). **Journal of Nematology**, Riverside, v.21, p.202-218, 1989.
- HOOPER, D.J. Extraction of free-living stages from soil. In: SOUTHEY, J. F. (Ed.) **Laboratory methods for work with plant and soil nematodes**, 6<sup>th</sup> ed. London: Her Majesty's Stationery Office, 1986, p.5-30.

- INOMOTO, M.M.; GOULART, A.M.C.; MACHADO, A.C.Z.; MONTEIRO, A.R. Effect of population densities of *Pratylenchus brachyurus* on the growth of cotton plants. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 26, n. 2, p.192-196, 2001.
- INOMOTO, M.M.; TOMAZINI, M.D.; KUBO, R.K.; OLIVEIRA, C.M.G.; MAZZAFERA, P. Patogenicidade de um isolado de *Pratylenchus brachyurus* e dois de *P. coffeae* em plântulas de cafeeiro cv. Catuaí Vermelho. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 27, suppl., p. 190, 2002.
- INOMOTO, M.M.; SILVA, R.A.; PIMENTEL, J.P. Patogenicidade de *Pratylenchus brachyurus* e *P. coffeae* em quiabeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.29, p.551-554, 2004.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, Washington, v.48, p.692, 1964.
- KINLOCH, R.A.; SPRENKEL, R.K. Plant-parasitic nematodes associated with cotton in Florida. **Journal of Nematology**, Riverside, v.26, suppl., p.749-752, 1994.
- LORDELLO, L.G.E. Perdas causadas por nematóides. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.51, n.3/4, p.222, 1976.
- LORDELLO, L.G.E. **Nematóides das plantas cultivadas**. São Paulo: Nobel, 1981. 314 p.
- LORDELLO, L.G.E.; ARRUDA, H.V. Nota prévia acerca da ocorrência de nematódeos do gênero *Pratylenchus* em raízes de algodoeiro. **O Solo**, Piracicaba, v.49, p.33-34, 1957.
- MACHADO, A.C.Z. Discreto mas perigoso. **Revista Cultivar – Grandes Culturas**, Pelotas, RS, v. 70, p.16-18, 2005.
- MACHADO, A.C.Z.; SIQUEIRA, K.M.S.; GALBIERI, R.; CIA, E. Levantamento preliminar das espécies de fitonematóides associadas à cultura do algodão no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 5, 2005, Salvador, BA. **Resumos...** Salvador: Abapa e Embrapa Algodão, 2005. Resumo 352.
- MACHADO, A.C.Z.; BELUTI, D.B.; SILVA, R.A.; SERRANO, M.A.S.; INOMOTO, M.M. Avaliação de danos causados por *Pratylenchus brachyurus* em algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.31, n.1, p.11-16, 2006.
- MARTIN, W.J.; NEWSON, L.D.; SCHWEGMANN, J. Nematode root rot of cotton in Louisiana. **Plant Disease Reporter**, Washington, v.35, p.8, 1951.
- RIEDEL, R.M.; FOSTER, J.G.; MAI, W.F. A simplified medium for monoxenic culture of *Pratylenchus penetrans* and *Ditylenchus dipsaci*. **Journal of Nematology**, Riverside, v.5, p.71-72, 1973.
- ROBERTS, P.A. Concepts and consequences of resistance. In: STARR, J. L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (Ed). **Plant Resistance to Parasitic Nematodes**. CAB International, 2002. p. 23-41.

ROBBINS, R.T.; RIGGS, R.D.; VON STEEN, D. Phytoparasitic nematodes surveys of Arkansas cotton fields. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 21, suppl., p.619-623, 1989.

RUANO, O.; CARNEIRO, R.G.; BRITO, J.A.; SILVA, J.F.V. Nematóides na cultura do algodoeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.16, n.172, p.46-48, 1992.

SANTOS, R.F.; SANTOS, J.W. Agronegócio do algodão: crise no mercado brasileiro da matéria-prima agrícola. In: BELTRÃO, N.E.M. (Ed.). **O Agronegócio do Algodão no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 1999. p. 29-54. (Comunicação para Transferência de Tecnologia).

SILVA, R.A.; SERRANO, M.A.S.; GOMES, A.C.; BORGES, D.C.; SOUZA, A.A.; ASMUS, G.L.; INOMOTO, M.M. Ocorrência de *Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne incognita* na cultura do algodoeiro no Estado do Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.29, n.3, p.337, 2004.

STARR, J.L.; MATHIESON, T. Reproduction of *Pratylenchus brachyurus* on cotton and growth response to infection by the nematode. In: BELTWISE COTTON PRODUCTION RESEARCH CONFERENCE, 1985, New Orleans. **Proceedings...** Memphis: National Cotton Council, 1985, p. 25.

STARR, J.L.; PAGE, S.L.J. Nematode parasites of cotton and other tropical fibre crops. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. CAB International, Wallingford, UK, 1990, p.539-556.

### 3 REAÇÃO DE CULTIVARES DE ALGODOEIRO A TRÊS POPULAÇÕES DE *Pratylenchus brachyurus*

#### Resumo

A alta frequência de *Pratylenchus brachyurus* configura novidade e também motivo de preocupação em áreas algodoeiras do Brasil, devido à escassez de informações sobre as relações entre esse nematóide e a cultura. Além disso, outras culturas importantes para os sistemas de produção de grãos, como milho e soja, também são suscetíveis ao nematóide. Até o momento, aparentemente, não há fontes de resistência em nenhuma dessas plantas a *P. brachyurus*. Visando determinar a reação de algumas cultivares de algodão, dentre as mais plantadas atualmente no país, frente a *P. brachyurus*, realizaram-se três experimentos sob condições de casa de vegetação. As cultivares testadas foram: Coodetec 405, FMT Saturno, Delta Opal, BRS Ipê, BRS Cedro, Makina e Fabrika, no experimento 1; Acala 90, Delta Penta, DP4049, BRS Aroeira, IAC 24, ITA 90 e São Miguel, no experimento 2; e Acala 90, Delta Opal, Delta Penta, Fibermax 966, Coodetec 405, BRS Ipê, BRS Cedro, Makina e IAC 24, no experimento 3. A densidade populacional inicial (Pi) utilizada foi de 1.000 exemplares/planta. A população final (Pf) foi estimada através da extração dos nematóides do substrato e das raízes e posterior contagem em lâmina de Peters. O fator de reprodução (Pf/Pi) foi determinado dividindo-se a população final (Pf) pela população inicial (Pi). Todas as cultivares testadas foram suscetíveis a *P. brachyurus*, ocorrendo considerável variação nos fatores de reprodução. Verificou-se variabilidade na agressividade entre as populações de *P. brachyurus* utilizadas no estudo.

#### Abstract

*Pratylenchus brachyurus* is widespread in cotton fields of Brazil and, as well, also presumably a cause of crop losses, even that available information about its relationship with the culture is yet scarce. Besides, some important economic grain-producing crops, such as soybean and maize, are also susceptible to this nematode. To date, apparently, there are no resistance sources in all these plant species to *P. brachyurus*. Therefore, three greenhouse trials were carried out in order to characterize the reaction of some of the most cultivated and economically important cotton cultivars in Brazil to *P. brachyurus*. The cultivars tested were: Coodetec 405, FMT Saturno, Delta Opal, BRS Ipê, BRS Cedro, Makina, and Fabrika, in experiment 1; Acala 90, Delta Penta, DP4049, BRS Aroeira, IAC 24, ITA 90, and São Miguel, in experiment 2; and Acala 90, Delta Opal, Delta Penta, Fibermax 966, Coodetec 405, BRS Ipê, BRS Cedro, Makina, and IAC 24, in experiment 3. Initial population density (Pi) used was 1,000 nematodes/plant. Nematode final population (Pf) values were obtained through extraction of the specimens from the substrate and roots followed by estimation with the aid of a Peters counting slide under microscope. Nematode reproduction factor values were determined by dividing the final population (Pf in substrate + Pf in roots) by initial population (Pi). All tested cultivars were rated as susceptible, but a large variation was noticed regarding the nematode reproduction factor values. In addition, a variability in terms of aggressiveness to cotton was demonstrated to occur between the populations of *P. brachyurus*.

### 3.1 Introdução

Os nematóides constituem importante grupo de patógenos do algodoeiro e as perdas que lhes são atribuídas têm sido causa de crescente preocupação entre os produtores do Brasil. Das três espécies tidas como patógenos do algodoeiro, o chamado nematóide das lesões radiculares, *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev & Sch. Stekhoven, 1941, é o de ocorrência mais comum no Brasil (GIELFI; SANTOS; ATHAYDE, 2003; ASMUS, 2004; SILVA et al., 2004; MACHADO et al., 2005), mas há, ainda, poucos subsídios disponíveis para fundamentar recomendações de controle. Geralmente, predominam baixas densidades populacionais de *P. brachyurus* no campo, com perdas difíceis de serem detectadas, provavelmente chegando a cerca de 10% (MACHADO, 2005). Quando ocorre a associação desse nematóide com *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, 1940 ou *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, as outras duas espécies importantes para a cultura, o controle desses parasitos, seja por resistência varietal ou rotação de culturas, torna-se mais difícil e complexo; isso porque, para *P. brachyurus*, não se conhecem fontes de resistência até o momento, diferentemente das outras duas espécies, e também devido ao fato de várias plantas cultivadas consideradas não hospedeiras ou hospedeiras resistentes a *R. reniformis* e *M. incognita* serem suscetíveis a *P. brachyurus* (MACHADO, 2005).

Observações experimentais a campo mostraram não haver correlação entre baixas populações de *P. brachyurus* e a produção de algodão (MACHADO et al., 2006). No entanto, como resultados obtidos em casa de vegetação evidenciaram que essa espécie é patogênica ao algodoeiro quando presente em altas populações (INOMOTO et al., 2001; MACHADO et al., 2006), tal quadro não deve ser considerado permanente, pois seqüências de culturas suscetíveis ao nematóide podem, no futuro, levar a densidades populacionais suficientemente altas para que os danos observados em casa de vegetação se reproduzam no campo. Provavelmente, esse nematóide deva ser mais temido em culturas irrigadas, onde são freqüentes densidades populacionais mais altas (INOMOTO et al., 2005).

O controle de *P. brachyurus* por meio de rotação de culturas mostra-se difícil, pois a maioria das espécies vegetais cultivadas é boa hospedeira da espécie, incluindo milho e soja, culturas importantes para os sistemas de produção de grãos nos principais Estados produtores de algodão. A opção ficaria a cargo de cultivares de algodão resistentes ou moderadamente resistentes a esse nematóide. Entretanto, não existem informações a respeito da reação das

cultivares mais plantadas no momento no País, como Fibermax 966 e Delta Opal, frente a *P. brachyurus*.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a reação de algumas das principais cultivares de algodoeiro a três populações de *P. brachyurus*, por meio de experimentos de casa de vegetação.

## 3.2 Desenvolvimento

### 3.2.1 Revisão bibliográfica

O nematóide das lesões radiculares, *Pratylenchus brachyurus*, é considerado parasito de importância secundária para a cultura do algodão. Entretanto, estudos recentes têm modificado essa perspectiva, pelo menos para a realidade do Brasil. Está amplamente disseminado nas regiões tropicais, principalmente no Brasil, associado a diversas plantas cultivadas, como abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merr.], amendoim (*Arachys hipogea* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), cafeeiro (*Coffea arabica* L.), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), milho (*Zea mays* L.), quiabeiro (*Abelmoschus esculentum* Moench.), soja [*Glycine max* (L.) Merr.], além do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) (INOMOTO et al., 2005).

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de *P. brachyurus* em algodoeiro foi feito por Lordello e Arruda (1957). Entretanto, nos últimos quarenta anos, o interesse nos estudos de *P. brachyurus* como parasito do algodoeiro diminuiu, porém subsídios ao adequado controle desse nematóide são necessários nos dias de hoje, devida à elevada ocorrência da espécie em algodoeiros do Brasil. Sua importância para a cultura apenas recentemente tem sido avaliada, por meio de experimentos realizados sob condições controladas e trabalhos de campo (INOMOTO et al., 2001; MACHADO et al., 2006). Em casa de vegetação, altas densidades populacionais do nematóide causaram escurecimento de raízes e redução do crescimento da parte aérea das plantas inoculadas (INOMOTO et al., 2001). Perdas no campo ainda não foram devidamente comprovadas e estimadas, havendo indicações de que sejam necessárias densidades populacionais muito elevadas para causá-las (MACHADO et al., 2006).

Com base em informações da literatura, pode-se afirmar que o nematóide das lesões apresenta relevância para a cultura do algodão apenas no Brasil (ROBBINS; RIGGS; VON STEEN, 1989; WRATHER; NIBLACK; MILAM, 1992; KINLOCH; SPRENKEL, 1994; BAIRD et al., 1996; KOENNING et al., 1999; McLEAN; LAWRENCE, 2000; KOENNING et al., 2004). Sua elevada ocorrência no Brasil pode ser explicada por uma série de razões (INOMOTO et al.,

2005). Possivelmente, espalhou-se junto com partículas de solo aderidas a implementos agrícolas ou com mudas de cafeeiro, frutíferas e ornamentais, estabelecendo-se com sucesso em novas áreas graças ao seu caráter polífago; beneficiou-se, também, de certas mudanças ocorridas no sistema de produção, como a adoção do sistema plantio direto e da irrigação. Embora os dados disponíveis nem sempre sejam confiáveis, pelo fato de a maioria dos levantamentos populacionais de fitonematóides privilegiar a contagem de certas espécies, como *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952, *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 e *M. incognita*, parece certo que o sistema de plantio direto e a irrigação foram importantes para o aumento populacional de *P. brachyurus* no Brasil, pois é a espécie endoparasita mais freqüente em áreas sob plantio direto e a mais abundante em áreas de irrigação, especialmente no caso da cultura do algodão (INOMOTO et al., 2005).

O controle de nematóides em algodoeiro, tradicionalmente, tem sido feito por meio de nematicidas não fumigantes (aldicarbe, carbofurano e terbufós), no caso de *R. reniformis*, e, para *M. incognita*, pelo uso de cultivares resistentes, selecionadas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), e/ou rotação com mucuna preta (*Mucuna aterrima* L.) (INOMOTO et al., 2005). Entretanto, para o controle de *P. brachyurus*, são poucas as opções. A escolha de uma cultura resistente a *P. brachyurus* em sucessão ao algodão é a opção natural de controle desse nematóide. Duas espécies de plantas leguminosas possuem essa característica, *Crotalaria spectabilis* Roth. e *C. breviflora* D.C., mas apresentam sérias restrições econômicas (ausência de renda durante um ciclo) e de manejo (controle de ervas daninhas) (INOMOTO et al., 2005). Uma boa solução seria o uso de cultivares de algodoeiro com resistência e/ou tolerância a *P. brachyurus*.

Nesse sentido, Inomoto et al. (2001) afirmaram que a capacidade de *P. brachyurus* causar danos ao algodoeiro varia com a cultivar. Trabalhos em casa de vegetação mostraram que cultivares selecionadas como IAC 20, IAC 22, Delta Opal e Fibermax 966, são suscetíveis a *P. brachyurus*, ou seja, são boas hospedeiras do parasito, mas lhe apresentam tolerância, pois sofrem danos apenas sob elevadas densidades populacionais (TRUDGILL, 1991; INOMOTO et al., 2001; MACHADO; INOMOTO, 2001; MACHADO et al., 2003; MACHADO; FERRAZ; INOMOTO, 2004).

Na presente situação, o controle de *P. brachyurus* torna-se bastante difícil no Brasil. Há a necessidade de maiores esforços para a obtenção de cultivares que aliem resistência a *M.*

*incognita*, *P. brachyurus* e elevadas produtividades. Entretanto, os programas de melhoramento genético do algodoeiro usualmente não contemplam *P. brachyurus*, por ser considerado de interesse secundário para a cultura.

### 3.2.2 Material e Métodos

#### Obtenção do inóculo

Foram utilizadas três populações de *P. brachyurus*, denominadas Pb<sub>20</sub>, Pb<sub>21</sub> e Pb<sub>22</sub>, anteriormente utilizadas em Machado et al. (2006). A população Pb<sub>20</sub> foi obtida a partir de raízes de quiabeiro (*Abelmoschus esculentus* Moench.) coletadas no município de Seropédica, RJ. As outras populações, Pb<sub>21</sub> e Pb<sub>22</sub>, foram coletadas em plantios comerciais de algodão nos municípios de Serra do Ramalho, BA, e Campo Verde, MT, respectivamente.

Os espécimes de *P. brachyurus* utilizados como inóculo nos experimentos foram obtidos de raízes de quiabeiro e milho, pelo método do Funil de Baermann modificado para recipiente raso (HOOPER, 1986). Na suspensão obtida foi estimado o número de *P. brachyurus* por cm<sup>3</sup>, sob microscópio óptico e com auxílio de lâmina de Peters.

#### Preparo e inoculação das plantas

Sementes de algodão das cultivares testadas, obtidas da Embrapa Algodão (Campina Grande, PB) e MDM Ltda (Uberlândia, MG), foram semeadas em recipientes plásticos, com 500 cm<sup>3</sup> de capacidade, contendo cerca de 400 cm<sup>3</sup> de substrato tratado com brometo de metila (150 cm<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>). Imediatamente após a germinação (cerca de 3 a 4 dias após a semeadura), foi feito o desbaste das plântulas, de modo a deixar apenas uma por recipiente. As inoculações foram realizadas aos 22 dias após a germinação, quando os algodoeiros apresentavam dois pares de folhas verdadeiras, mediante pipetagem de volumes pré-ajustados da suspensão contendo os nematóides, em dois orifícios de 2 cm de profundidade, feitos a 2 cm de distância do colo das plantas. A densidade populacional (Pi) nos três experimentos foi de 1.000 exemplares/planta. Antes de serem transferidas para a casa de vegetação, as plantas, recém-inoculadas, foram mantidas por dois dias em uma sala escura sob temperatura ambiente, buscando-se evitar a exposição do nematóide a temperaturas excessivamente elevadas durante esse período.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação dotada de sistema de refrigeração, na ESALQ/USP, em Piracicaba, SP, durante todo o período experimental e receberam uma adubação

por via líquida no solo 15 dias após a inoculação (0,5 g de sulfato de amônio + 0,5 g da fórmula 15N: 15P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 30K<sub>2</sub>O: 0,18Zn: 0,04Mn: 0,005Mo por planta). Duas pulverizações de tiametoxam foram feitas aos 15 e 30 dias após a inoculação, para controle de insetos sugadores, assim que detectados.

### **Reação de cultivares de algodoeiro a três populações de *Pratylenchus brachyurus***

As cultivares testadas foram: Coodetec 405, FMT Saturno, Delta Opal, BRS Ipê, BRS Cedro, Makina e Fabrika (experimento 1); Deltapine Acala 90, Delta Penta, DP 4049, BRS Aroeira, IAC 24, ITA 90 e São Miguel (experimento 2); e Deltapine Acala 90, Delta Opal, Delta Penta, Fibermax 966, Coodetec 405, BRS Ipê, BRS Cedro, Makina e IAC 24 (experimento 3).

No experimento 2, foram utilizadas as populações Pb<sub>20</sub>, Pb<sub>21</sub> e Pb<sub>22</sub>; nos experimentos 1 e 3, apenas Pb<sub>20</sub> e Pb<sub>22</sub>, em função da disponibilidade de inóculo por ocasião do estabelecimento dos mesmos. Os experimentos 2 e 3 tiveram durações maiores em função da baixa reprodução de *P. brachyurus* obtida no experimento 1. Os períodos experimentais foram 28 de outubro a 18 de dezembro de 2003 (experimento 1), de 28 de janeiro a 29 de abril de 2004 (experimento 2) e de 12 de março a 27 de maio de 2004 (experimento 3). A avaliação, portanto, foi realizada aos 51, 75 e 76 dias após a inoculação, respectivamente. Os copos foram imersos em balde de 10 L contendo 4 L de água de torneira, para separação do substrato das raízes. As raízes foram lavadas com água de torneira, enxugadas com papel absorvente e armazenadas em geladeira a 6 °C. O substrato foi processado por peneiramento e centrifugação para extração dos nematóides (JENKINS, 1964). Ao término do processamento do substrato, as raízes foram pesadas e 10 g foram processados pelo método do liquidificador e centrífuga (COOLEN; D'HERDE, 1972). A população final de *P. brachyurus* (Pf) foi obtida através da contagem dos nematóides extraídos e o fator de reprodução do nematóide (FR = Pf/Pi) foi estimado para cada repetição, tomando-se a população final (Pf substrato + Pf raízes) e dividindo-se pela população inicial (Pi).

### **Análise estatística**

O delineamento experimental para os três experimentos foi inteiramente casualizado, na forma de fatoriais (populações do nematóide e cultivares do algodoeiro), com sete (experimento 1) ou cinco (experimentos 2 e 3) repetições. As médias dos valores de número de nematóides por

grama de raízes e do fator de reprodução do nematóide obtidas nos experimentos foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P = 0,05$ ), sem transformação dos dados.

### 3.2.3 Resultados e Discussão

Os dados relativos à reprodução das três populações de *P. brachyurus*, expressos em FR e em número de nematóides por grama de raízes, mostraram grande variação entre as diferentes cultivares estudadas. Apesar disso, nos três experimentos, todas as cultivares foram consideradas suscetíveis às populações do nematóide, com valores de fator de reprodução maiores que 1,0, corroborando, para algumas das cultivares, observações de estudos anteriores (INOMOTO et al., 2001; MACHADO; INOMOTO, 2001; MACHADO et al., 2003; MACHADO, FERRAZ; INOMOTO, 2004). Tais valores foram numericamente menores no experimento 1 (valores mínimo e máximo de 1,07 e 2,82, respectivamente) em comparação aos dos experimentos 2 e 3 (valores mínimo e máximo de 4,5 e 23,2, respectivamente), ao que tudo indica devido ao menor período experimental (51 dias x 75 e 76 dias) e ao menor crescimento das plantas (Tabelas 3.1, 3.2 e 3.3).

Maiores valores de fator de reprodução e de número de nematóides por grama de raízes foram predominantemente obtidos em plantas inoculadas com a população Pb<sub>22</sub> em comparação à população Pb<sub>20</sub> nos três experimentos e Pb<sub>21</sub> no experimento 2. Por sua vez, os valores relativos às populações Pb<sub>20</sub> e Pb<sub>21</sub> ficaram bastante próximos para as sete cultivares testadas no experimento 2 (Tabelas 3.1, 3.2 e 3.3).

Nos experimentos 2 e 3, embora todas as cultivares fossem consideradas suscetíveis com base no valor médio do fator de reprodução determinado para as populações envolvidas, foi possível o reconhecimento de pelo menos dois grupos em termos de grau de suscetibilidade. Assim, no experimento 2 (Tabela 3.2), ‘DP 4049’, ‘São Miguel’ e ‘Delta Penta’ formaram um grupo com valores (variando de 14,04 a 15,7) significativamente maiores que outro constituído por ‘Ita 90’, ‘BRS Aroeira’, ‘Acala 90’ e ‘IAC 24’ (com valores variáveis de 7,56 a 10,32). No experimento 3 (Tabela 3.3), ‘BRS Ipê’ destacou-se pela mais alta suscetibilidade (valor = 15,66), diferindo significativamente de todas as demais cultivares. Mesmo no experimento 1 (Tabela 3.1), em que os valores numéricos dos fatores de reprodução foram mais baixos e a variação entre eles bem menor, um grupo de “maior suscetibilidade” formado por ‘Coodetec 405’ e ‘Delta Opal’ (valores 2,2 e 2,34) diferenciou-se das demais cultivares (valores variáveis de 1,07 a 1,68). A

indisponibilidade de cultivares com alto grau de resistência a *P. brachyurus* ora verificada é, sem dúvida, causa de preocupação por praticamente excluir o emprego do controle varietal como medida isolada de combate ao nematóide. Também, do ponto de vista prático, pode ser dito que os resultados obtidos têm interesse algo restrito porque, se plantadas em local infestado, todas as cultivares estarão concorrendo, em maior ou menor escala, ao crescimento das densidades populacionais do nematóide na área. Todavia, em termos de manejo integrado de nematóides, filosofia pela qual diferentes métodos de controle são associados e técnicas variadas se alternam ao longo do tempo, o conhecimento do potencial de multiplicação de cada cultivar poderá ser bastante útil, senão decisivo, à definição da estratégia a ser usada em certas situações de campo.

Três cultivares foram incluídas tanto no experimento 2 como no 3. Para duas delas, 'Acala 90' e 'IAC 24', os valores médios do fator de reprodução determinados para as populações foram muito próximos ('Acala' - 8,72 e 9,65; 'IAC 24' - 7,56 e 8,73, respectivamente), o que, entretanto, não se repetiu para 'Delta Penta' (14,57 e 5,85, respectivamente).

Tabela 3.1 - Fator de reprodução e número de espécimes por grama de raízes das populações Pb<sub>20</sub> e Pb<sub>22</sub> de *Pratylenchus brachyurus* em cultivares de algodoeiro inoculadas com 1.000 exemplares/planta (Experimento 1)

Cultivar	Fator de reprodução (Pf/Pi)			Número de nematóides/grama de raiz		
	Pb <sub>20</sub>	Pb <sub>22</sub>	Média	Pb <sub>20</sub>	Pb <sub>22</sub>	Média
Coodetec 405	1,87	2,82	2,34 a	805	1.467	1.136 a
Delta Opal	2,17	2,23	2,2 a	1.135	1.149	1.142 a
Makina	1,14	2,22	1,68 b	734	1.254	994 ab
Fabrika	1,41	1,73	1,57 b	750	917	833 abc
BRS Cedro	1,07	1,59	1,33 b	740	718	729 bc
BRS Ipê	1,19	1,78	1,48 b	440	808	624 c
FMT Saturno	1,09	1,64	1,36 b	656	1.342	999 ab
<b>Média</b>	1,42 B	2,0 A	..	751 B	1.093 A	..

Cada valor é a média de sete repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5%, segundo o Teste de Tukey.

Tabela 3.2 - Fator de reprodução e número de espécimes por grama de raízes das populações Pb<sub>20</sub>, Pb<sub>21</sub> e Pb<sub>22</sub> de *Pratylenchus brachyurus* em cultivares de algodoeiro inoculadas com 1.000 exemplares/planta (Experimento 2)

Cultivar	Fator de reprodução (Pf/Pi)				Número de nematóides/grama de raiz			
	Pb <sub>20</sub>	Pb <sub>21</sub>	Pb <sub>22</sub>	Média	Pb <sub>20</sub>	Pb <sub>21</sub>	Pb <sub>22</sub>	Média
DP 4049	14,3	9,6	23,2	15,7 a	1.354	955	2.599	1.636 a
São Miguel	11,2	12,9	18,0	14,04 ab	1.153	1.161	1.828	1.380 ab
Delta Penta	12,8	13,7	20,2	14,57 a	1.464	1.130	2.201	1.598 a
Ita 90	10,4	9,9	10,6	10,32 bc	817	792	794	801 c
BRS Aroeira	6,5	7,6	14,2	9,43 c	650	970	1.394	1.005 bc
Acala 90	9,6	8,1	8,4	8,72 c	938	741	727	802 c
IAC 24	9,3	4,5	8,9	7,56 c	1.240	501	901	880 c
<b>Média</b>	10,6 B	9,5 B	14,8 A	..	1.088 B	893 B	1.492 A	..

Cada valor é a média de cinco repetições; médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3.3 - Fator de reprodução e número de espécimes por grama de raízes das populações Pb<sub>20</sub> e Pb<sub>22</sub> de *Pratylenchus brachyurus* em cultivares de algodoeiro inoculadas com 1.000 exemplares/planta (Experimento 3)

Cultivar	Fator de reprodução (Pf/Pi)			Número de nematóides/grama de raiz		
	Pb <sub>20</sub>	Pb <sub>22</sub>	Média	Pb <sub>20</sub>	Pb <sub>22</sub>	Média
BRS Ipê	16,8 a	14,4 a	15,66 a	417	502	459 d
Delta Opal	9,2 b	5,7 c	7,45 b	969	1.590	1.279 a
Coodetec 405	8,9 b	11,4 a	10,15 b	761	1.363	1.062 ab
Acala 90	8,8 b	10,5 ab	9,65 b	770	1.173	971 abcd
Delta Penta	6,9 b	4,8 c	5,85 b	930	1.353	1.141 ab
BRS Cedro	6,6 b	12,7 a	9,65 b	602	782	692 bcd
IAC 24	6,5 b	10,9 ab	8,73 b	907	1.157	1.032 abc
Fibermax 966	5,6 b	5,9 c	5,75 b	742	850	796 abcd
Makina	4,8 b	6,6 bc	5,70 c	464	585	525 cd
<b>Média</b>	8,23 A	9,21 A	..	729 B	1.039 A	..

Cada valor é a média de cinco repetições; médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ficou evidenciada a existência de variabilidade entre as populações Pb<sub>20</sub>, Pb<sub>21</sub> e Pb<sub>22</sub>, sendo que nos três experimentos os maiores valores de fator de reprodução, bem como de número de nematóides por grama de raízes, estiveram predominantemente associados à população Pb<sub>22</sub> (Tabelas 3.1, 3.2 e 3.3).

Tais resultados encontram concordância nas observações de Siqueira e Inomoto (2006) que, trabalhando com as populações Pb<sub>20</sub>, Pb<sub>21</sub> e Pb<sub>23</sub> de *P. brachyurus* [esta última extraída de raízes de algodão do município de Sapezal, MT] em cultivares de feijão de corda (*Vigna unguiculata* L.), observaram que os fatores de reprodução das populações Pb<sub>21</sub> e Pb<sub>23</sub> foram

maiores que os de Pb<sub>20</sub> (Pf/Pi = 9,34 a 26,23 para Pb<sub>21</sub>, 8,94 a 23,54 para Pb<sub>23</sub>, e 1,70 a 7,30 para Pb<sub>20</sub>), indicando a existência de variação genética entre populações de *P. brachyurus*.

Anteriormente, O'Bannon e Tommerlin (1970) já haviam sugerido a existência de raças em *P. brachyurus*, tendo observado variação no número de exemplares extraídos das raízes de plântulas de *Citrus limon* L. infectadas com populações do nematóide oriundas de diferentes localidades dos Estados Unidos. Observações de campo, também realizadas nos Estados Unidos, indicaram igualmente haver diferenças entre populações de *P. brachyurus* (DICKSON; DUNN, informação verbal, citados por PAYAN; DICKSON, 1988).

No entanto, o estudo de Payan e Dickson (1988), em que se avaliaram a reprodução de quatro populações de *P. brachyurus*, obtidas de diferentes hospedeiros e procedentes de regiões geográficas distintas dos Estados Unidos (milho e amendoim/Flórida; amendoim/Geórgia e soja/Carolina do Norte), sobre sete espécies vegetais cultivadas (alfafa, citros, milho, soja, amendoim, feijoeiro e tomateiro) foi aquele no qual melhor se tratou do assunto até então. Sob condições de casa de vegetação, por meio de dois experimentos desenvolvidos em anos seguidos, esses autores verificaram ser possível a detecção de comportamentos diferenciados entre as populações utilizadas em termos de capacidade reprodutiva nas plantas hospedeiras testadas ("host suitability" ou "host specificity"), avaliada com base no número de espécimes do nematóide por grama de raízes. Por exemplo, as duas populações originárias de amendoim (Flórida e Geórgia) produziram densidades populacionais significativamente maiores nas raízes do feijoeiro que as populações restantes (milho/Flórida e soja/Carolina do Norte); diferenças foram relatadas também em relação aos outros hospedeiros estudados, exceto para o citros (limão rugoso, *Citrus jambhiri* Lush.), que não possibilitou a reprodução de nenhuma das populações. Embora preferindo não postular a existência de "raças" dentro de *P. brachyurus*, tendo em vista o número limitado de populações e hospedeiros incluídos naquele estudo e a escassez de artigos publicados sobre o assunto, os autores concluíram pela alta pertinência e utilidade de tal tipo de pesquisa visando à separação e caracterização de populações do nematóide em anos futuros. Ainda com referência ao trabalho em pauta, é interessante destacar que embora dois experimentos tivessem sido realizados, segundo a mesma metodologia [apenas que em épocas diferentes], os resultados obtidos para número de nematóides por grama de raízes em um deles foram bem menores que o do outro, tal como ocorreu no presente estudo com o experimento 1 em relação aos experimentos 2 e 3.

Payan e Dickson (1990), prosseguindo na linha de pesquisa mencionada no parágrafo anterior, conseguiram evidenciar a ocorrência do que chamaram “grupos fenotípicos” dentro da espécie *P. brachyurus* através da análise dos perfis enzimáticos obtidos por eletroforese para cinco populações oriundas de diferentes regiões dos Estados Unidos. Na verdade, tratavam-se das mesmas quatro populações utilizadas no estudo anterior, de 1988, e de uma adicional, obtida de citros cultivado no estado da Flórida. Três grupos fenotípicos distintos foram obtidos para as populações nos casos das análises baseadas em malato desidrogenase (MDH) e fosfoglucomutase (PGM), mas apenas um a partir de fosfogluose isomerase (PGI).

Os trabalhos alistados e os resultados ora obtidos indicam fortemente a existência de variação genética entre populações distintas de *P. brachyurus* no que tange à agressividade sobre diferentes plantas hospedeiras e mesmo cultivares de uma dada espécie vegetal. Tal fato deve motivar o desenvolvimento de novas investigações no futuro visando a: i) caracterizar melhor as várias populações que vêm sendo utilizadas nos estudos conduzidos até o momento; e ii) comparar as populações consideradas de maior interesse quanto à agressividade em relação às cultivares de algodoeiro disponibilizadas pelos programas de melhoramento genético.

### 3.3 Conclusões

Todas as cultivares testadas foram consideradas suscetíveis a *P. brachyurus*, podendo-se inferir que não há genótipos altamente resistentes entre as cultivares de algodão plantadas atualmente no Brasil, o que inviabiliza o manejo desse nematóide unicamente através do controle varietal. Além disso, na avaliação futura da reação das cultivares disponibilizadas pelos programas de melhoramento genético do algodoeiro frente a *P. brachyurus*, deverá ser levada em conta a possibilidade de variações entre populações do nematóide oriundas de diferentes localidades geográficas e hospedeiros, em relação ao grau de polifagia e, principalmente, à agressividade.

## Referências

- ASMUS, G.L. Ocorrência de nematóides fitoparasitos em algodoeiro no Estado de Mato Grosso do Sul. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n.1, p. 77-86, 2004.
- BAIRD, R.E.; DAVIS, R.F.; ALT, P.J.; MULLINIX, B.G.; PADGETT, G.B. Frequency and geographical distribution of plant-parasitic nematodes on cotton in Georgia. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 28, suppl., p. 661-667, 1996.
- COOLEN, W.A.; D'HERDE, C.J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent, Belgian: State of Nematology and Entomology research Station, 1972.
- GIELFI, F.S.; SANTOS, J.M.; ATHAYDE, M.L.F. Reconhecimento das espécies de fitonematóides associadas ao algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) no Estado de Goiás. **Anais... CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO**, 4, 2003, Goiânia, GO. Goiânia: Fialgo e Embrapa Algodão, 2003. 1 CD-ROM.
- HOOPER, D.J. Extraction of free-living stages from soil. In: SOUTHEY, J. F. (Ed.). **Laboratory methods for work with plant and soil nematodes**, 6<sup>th</sup> ed. London: Her Majesty's Stationery Office, 1986, p.5-30.
- INOMOTO, M.M.; GOULART, A.M.C.; MACHADO, A.C.Z.; MONTEIRO, A.R. Effect of population densities of *Pratylenchus brachyurus* on the growth of cotton plants. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 26, n. 2, p.192-196, 2001.
- INOMOTO, M.M.; ASMUS, G.L.; MACHADO, A.C.Z.; SILVA, R.A. Nematóides do algodoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 25, 2005, Piracicaba, SP. **Minicurso 2...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Nematologia, 2005. 31 p.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, Washington, v.48, p.692, 1964.
- KINLOCK, R.A.; SPRENKEL, R.K. Plant-parasitic nematodes associated with cotton in Florida. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 26, suppl., p. 749-752, 1994.
- KOENNING, S.R.; OVERSTREET, C.; NOLING, J.W.; DONALD, P.A.; BECKER, J.O.; FORTNUM, B.A. Survey of crop losses in response to phytoparasitic nematodes in the United States for 1994. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 31, suppl., p. 587-618, 1999.
- KOENNING, S.R.; KIRKPATRICK, T.L.; STARR, J.L.; WRATHER, J.A.; WLAKER, N.R.; MUELLER, J.D. Plant-parasitic nematodes attacking cotton in the United States: Old and emerging production challenges. **Plant Disease**, Washington, v. 88, n. 2, p. 100-113, 2004.
- LORDELLO, L.G.E.; ARRUDA, H.V. Nota prévia acerca da ocorrência de nematódeos do gênero *Pratylenchus* em raízes de algodoeiro. **O Solo**, Piracicaba, v. 49, n. 1, p. 33-34, 1957.

- MACHADO, A.C.Z. Discreto mas perigoso. **Revista Cultivar – Grandes Culturas**, Pelotas, RS, v. 70, p.16-18, 2005.
- MACHADO, A.C.Z.; INOMOTO, M.M. Efeito de *Pratylenchus brachyurus* no crescimento de algodão cv. IAC 20 e Deltapine Acala 90. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 3, 2001, Campo Grande, MS. **Resumos...** Campo Grande: Embrapa Algodão e Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2001. Resumo 125, p. 873.
- MACHADO, A.C.Z.; FERRAZ, L.C.C.B.; INOMOTO, M.M. Efeito de isolados de *Pratylenchus brachyurus* no crescimento de algodoeiro cvs. Delta Opal e Fibermax 966. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 37, 2004. Gramado, RS. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 29, supl., p. 58, 2004. Resumo 97.
- MACHADO, A.C.Z.; SIQUEIRA, K.M.S.; GALBIERI, R.; CIA, E. Levantamento preliminar das espécies de fitonematóides associadas à cultura do algodão no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 5, 2005, Salvador, BA. **Resumos...** Salvador: Abapa e Embrapa Algodão, 2005. Resumo 352.
- MACHADO, A.C.Z.; BELUTI, D.B.; FERRAZ, L.C.C.B.; INOMOTO, M.M. Efeito de densidades populacionais iniciais de *Pratylenchus brachyurus* no crescimento do algodoeiro cv. Delta Opal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 4, 2003. Goiânia, GO. **Resumos...** Goiânia: Fialgo e Embrapa Algodão, 2003. 1-CD-ROM.
- MACHADO, A.C.Z.; BELUTI, D.B.; SILVA, R.A.; SERRANO, M.A.S.; INOMOTO, M.M. Avaliação de danos causados por *Pratylenchus brachyurus* em algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.31, n.1, p.11-16, 2006.
- McLEAN, K.S.; LAWRENCE, G.W. A survey of plant-parasitic nematodes associated with cotton in Northeastern Louisiana. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 32, suppl., p. 508-512, 2000.
- O'BANNON, J.H.; TOMBERLIN, A.T. *Pratylenchus* sp. as citrus pathogens. **Phytopathology**, Lancaster, v.60, p.1540, 1970.
- PAYAN, L.A.; DICKSON, D.W. Host specificity of four populations of *Pratylenchus brachyurus*. **Annals of Applied Nematology**, Lawrence, v.2, p.140-143, 1988.
- PAYAN, L.A.; DICKSON, D.W. Comparison of populations of *Pratylenchus brachyurus* based on isozyme phenotypes. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 22, n. 4, p. 538-545, 1990.
- ROBBINS, R.T.; RIGGS, R.D.; VON STEEN, D. Phytoparasitic nematode surveys of Arkansas cotton fields, 1986-88. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 21, suppl., p. 619-623, 1989.
- SIQUEIRA, K.M.S.; INOMOTO, M.M. Reação de genótipos de feijão de corda (*Vigna unguiculata*) a isolados de *Pratylenchus brachyurus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

NEMATOLOGIA, 26, 2006. Campos dos Goytacazes, RJ. **Resumos...** Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2006. Resumo 92.

SILVA, R.A.; SERRANO, M.A.S.; GOMES, A.C.; BORGES, D.C.; SOUZA, A.A.; ASMUS, G.L.; INOMOTO, M.M. Ocorrência de *Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne incognita* na cultura do algodoeiro no Estado do Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.29, n.3, p.337, 2004.

TRUDGILL, D.L. Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Califórnia, v. 29, p. 167-192, 1991.

WRATHER, J.A.; NIBLACK, T.L.; MILAM, M.R. Survey of plant-parasitic nematodes in Missouri cotton fields. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 24, suppl., p. 779-782, 1992.

#### 4 REAÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS UTILIZADAS COMO ADUBOS VERDES, COBERTURAS VEGETAIS OU PASTAGENS A *Pratylenchus brachyurus*

##### Resumo

O controle de nematóides em culturas de grande extensão, como a do algodoeiro, tem-se mostrado difícil, complexo, fato que tem contribuído para aumentar o interesse pela busca de métodos alternativos ao químico, a exemplo do uso da adubação verde. Além disso, a adoção em larga escala do sistema plantio direto e/ou cultivo mínimo, e da integração lavoura-pecuária, têm favorecido o aumento dos problemas com nematóides em muitas culturas de interesse econômico, como da soja, do milho, ou mesmo do algodoeiro. Foram realizados seis experimentos, sob condições de casa de vegetação, visando à caracterização da reação de espécies que têm sido utilizadas nesses sistemas de produção frente a *Pratylenchus brachyurus*. As espécies testadas foram: feijão guandu (*Cajanus cajan*) 'Fava Larga', *Crotalaria juncea* IAC-KR-1, *C. spectabilis*, *C. mucronata*, *C. breviflora*, *C. ochroleuca*, *C. paulina*, mucuna anã (*Mucuna pruriens*) 'Comum', mucuna preta (*M. pruriens*) 'Comum' e mucuna cinza (*M. pruriens*) 'Comum', nos estudos com adubos verdes; sorgo duplo propósito – silageiro e forrageiro – (*Sorghum bicolor*) 'IPA 7301011', sorgo forrageiro (*S. bicolor* x *S. sudanense*) 'BRS 800', milheto (*Pennisetum glaucum*) 'BRS 1501' e 'BN2', girassol (*Helianthus annuus*) 'IAC Uruguai', aveia preta (*Avena strigosa*) 'Campeira Mor', amaranto granífero (*Amaranthus cruentus*) 'BRS Alegria', nabo forrageiro (*Raphanus sativus* var. *oleiferus*) 'Comum', aveia branca (*A. sativa*) 'UFRGS 17', aveia amarela (*A. byzantina*) 'São Carlos' e aveia preta (*A. strigosa*) 'Campeira Mor', 'IPFA 99006', 'Comum', 'CPAO 0010' e 'Garoa', nos estudos com coberturas vegetais; e *Brachiaria dictioneura*, *B. humidicola*, *B. ruziziensis*, *B. brizantha*, *B. decumbens*, braquiária híbrida (*B. brizantha* x *B. ruziziensis*) 'Mulato', *Panicum maximum* 'Mombaça' e 'Tanzânia', nos estudos com pastagens. Os resultados mostraram que *C. spectabilis*, *C. breviflora*, amaranto 'BRS Alegria', nabo forrageiro 'Comum' e as cultivares de aveia preta Campeira Mor, IPFA 99006, Comum, CPAO 0010 e Garoa são resistentes a *P. brachyurus*. Por outro lado, todas as espécies de pastagens testadas, as mucunas preta, cinza e anã, sorgo 'BRS 800' e 'IPA 7301011' e as aveias brancas 'São Carlos' e 'UFRGS 17' são suscetíveis ao nematóide.

##### Abstract

Nematode control in most major crops, here included cotton, is difficult, thus making the studies that deal with alternative methods to the use of chemical nematicides, as the use of green manures, increasingly important. Besides, no-tillage system and crop-pasture integration has been intensively used in several large producing areas of Brazil, a condition that may improve damage caused by phytonematodes in crops such as soybean, maize, and cotton. Therefore, six greenhouse experiments were carried out in order to characterize the reaction of different crops used in these systems in relation to *Pratylenchus brachyurus*. Plant species tested were: pigeon pea (*Cajanus cajan*) 'Fava Larga', *Crotalaria juncea* 'IAC-KR-1', *C. spectabilis*, *C. mucronata*, *C. breviflora*, *C. ochroleuca*, *C. paulina*, dwarf velvetbean (*Mucuna pruriens*) 'Comum', black velvetbean (*M. pruriens*) 'Comum', and gray velvetbean (*M. pruriens*) 'Comum', in the study including green manures; dual purpose (forage and silage) sorghum (*Sorghum bicolor*) 'IPA 7301011', forage sorghum (*S. bicolor* x *S. sudanense*) 'BRS 800', pearl millet (*Pennisetum glaucum*) 'BRS 1501' and 'BN2', sunflower (*Helianthus annuus*) 'IAC Uruguai', black oat (*Avena strigosa*) 'Campeira

Mor', grain amaranth (*Amaranthus cruentus*) 'BRS Alegria', oil radish (*Raphanus sativus* var. *oleiferus*) 'Comum', oat (*A. sativa*) 'UFRGS 17', red oat (*A. byzantina*) 'São Carlos', and black oat (*A. strigosa*) 'Campeira Mor', 'IPFA 99006', 'Comum', 'CPAO 0010', and 'Garoa', in the study with the cover crops; and *Brachiaria dictioneura*, *B. humidicola*, *B. ruziziensis*, *B. brizantha*, *B. decumbens*, hybrid *Brachiaria* (*B. brizantha* x *B. ruziziensis*) 'Mulato', *Panicum maximum* 'Mombaça', and 'Tanzânia', in the study with pastures. Results showed that *C. spectabilis*, *C. breviflora*, amaranth 'BRS Alegria', oil radish 'Comum', and black oat 'Campeira Mor', 'IPFA 99006', 'Comum', 'CPAO 0010', and 'Garoa' were resistant to *P. brachyurus*. On the other hand, all pastures tested, black velvetbean, gray velvetbean, dwarf velvetbean, sorghum 'BRS 800' and 'IPA 7301011', and oat 'São Carlos' and 'UFRGS 17' were susceptible to nematode.

#### 4.1 Introdução

Após décadas de exploração baseada no preparo convencional do solo e no monocultivo, os produtores rurais da região Centro Oeste têm buscado ajustar os mais modernos métodos disponíveis de manejo fitotécnico aos sistemas tradicionais, visando à manutenção de alta produtividade nas áreas locais. Por outro lado, o cerrado é um agro-ecossistema que, no geral, se caracteriza por solos com baixa fertilidade natural e baixa capacidade de retenção de água, além de estar sujeito à ocorrência de veranicos. Investimentos com calagem e fosfatagem têm contribuído bastante para a manutenção da boa produtividade das áreas. Mas é fundamental a incorporação de tecnologias que permitam, ao longo dos anos, manter a estabilidade produtiva, mesmo nos anos mais secos; nesse aspecto, destaca-se a rotação de culturas, que permite inclusive melhores resultados em áreas infestadas com nematóides se associada à adubação verde com leguminosas ou gramíneas forrageiras.

Além disso, com o crescente interesse pelo sistema de implantação de culturas agrícolas, como o algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), sob uma palhada, denominado plantio direto (SPD), a adoção da rotação de culturas passa a ter um problema a mais a ser considerado, pois várias culturas utilizadas para a obtenção de palhada podem ser hospedeiras de espécies de nematóides daninhos ao algodoeiro. Informações da Fundação MT dão conta de que em metade da área plantada com algodão na zona do cerrado é feita a rotação com milho (*Zea mays* L.) e soja (*Glycine max* [L.] Merr.). O cultivo mínimo, outro sistema de plantio de utilização mais recente, é favorecido pela topografia plana dos solos do Mato Grosso, consistindo em efetuar o plantio de

algodão sobre a cultura do milheto [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.], previamente dessecada (Inomoto<sup>1</sup>, informação verbal).

O planejamento da rotação de culturas nessas áreas de plantio direto com milho e soja torna-se ainda mais difícil, tendo em vista a suscetibilidade de cultivares de algodão e milheto a nematóides do gênero *Pratylenchus*, e de várias cultivares de soja ao nematóide de galhas *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949. A situação agrava-se ainda mais nas áreas em que o milheto é a única fonte de palhada. Desse modo, caso o rodízio de culturas contemple espécies vegetais suscetíveis, ao longo dos anos o problema vai se agravando.

Além do milheto, várias outras plantas já são utilizadas como coberturas vegetais no SPD no Brasil e há outras sendo avaliadas visando ao emprego no futuro. Atualmente, as principais são o milheto, a aveia preta (*Avena strigosa* Schreb.) e o nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.) (ALVARENGA; CABEZAS; SANTANA, 2001).

Outro sistema que tem se destacado é a chamada Integração Lavoura-Pecuária, que se caracteriza pela utilização de culturas de grãos em seqüência a pastagem e vice-versa, sempre no SPD. Isso significa que se promove a manutenção da cobertura com um mínimo de revolvimento do solo. As espécies de gramíneas mais adequadas para o sistema são as forrageiras perenes, entre elas: *Brachiaria decumbens* Stapf, *B. brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf e *Panicum maximum* Jacq. ‘Tanzânia-1’ e ‘Mombaça’ (BROCH; PITOL; BORGES, 1997).

A ausência de cuidados em relação aos nematóides na escolha das coberturas torna previsível que, em futuro próximo, sérios problemas surgirão em áreas sob SPD. Tal previsão não é baseada em dados experimentais, por serem ainda escassos, mas sabe-se que os fitonematóides são tanto mais prejudiciais quanto mais intensivo o uso agrícola da terra, pois, quanto mais tempo plantas suscetíveis estiverem no campo, de mais alimento disporá o parasito. Ora, se o SPD prevê a ocupação da terra com culturas ou coberturas vegetais durante o maior tempo possível, é mais do que provável que a população dos fitonematóides cresça em áreas cultivadas sob esse sistema, exceto se as plantas utilizadas forem resistentes (GALLAHER et al., 1988). Nesse ponto, retorna-se ao problema inicial, que é a escassez de informações sobre o comportamento das espécies vegetais utilizadas em tais sistemas de plantio, em termos de resistência/suscetibilidade, em relação aos fitonematóides.

O presente trabalho teve por objetivo, portanto, caracterizar a reação de diferentes plantas utilizadas nesses sistemas frente a *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev & S.

---

<sup>1</sup> INOMOTO, M. M. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Stekhoven, 1941, uma das espécies mais disseminadas nas regiões algodoeiras do Brasil e, com isso, oferecer contribuição prática à programação de rotação de culturas ou implantação do sistema plantio direto ou integração lavoura-pastagem em áreas infestadas por esse nematóide.

## 4.2 Desenvolvimento

### 4.2.1 Revisão bibliográfica

#### Reação de adubos verdes a *P. brachyurus*

Adubos verdes são plantas cultivadas com a finalidade de melhorar as características físicas, químicas e biológicas do solo, além de oferecer proteção contra a erosão provocada por chuvas ou vento e evitar o crescimento de ervas daninhas (POWERS; MCSORLEY, 2000; HARTWIG; AMMON, 2002). Além disso, ainda atuam no controle de pragas e doenças, inclusive nematóides (DAVIS et al., 1996; MCSORLEY, 2001; HOOKS; JOHNSON, 2003).

No Brasil, os adubos verdes mais utilizados pertencem à família Fabaceae, como as mucunas [*Mucuna pruriens* (L.) D.C.], feijão guandu [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] e *Crotalaria* spp., daí serem considerados importantes fontes de nitrogênio orgânico. Seu uso, entretanto, decresceu nas últimas décadas, devido ao fato de serem cultivados no verão ou primavera, restringindo o cultivo de uma cultura econômica no mesmo ano agrícola, e da grande disponibilidade de fontes de nitrogênio sintético que são amplamente utilizadas na agricultura moderna. No entanto, a grande disseminação dos fitonematóides nas áreas agrícolas aliada à restrição de uso de alguns produtos nematicidas renovou o interesse nos adubos verdes como alternativa de manejo desses parasitos (CROW et al., 2001), principalmente em sistemas de agricultura sustentável (BARKER; KOENNING, 1998); no entanto, estudos sobre a reação de adubos verdes frente a fitonematóides são escassos.

Algumas pesquisas têm mostrado que espécies de *Crotalaria*, principalmente *C. juncea* L. e *C. spectabilis* Roth, podem ser utilizadas visando à redução da população de nematóides, sendo que a maioria dos resultados diz respeito aos nematóides de galhas, do gênero *Meloidogyne* (ASMUS; FERRAZ, 1988; SILVA; FERRAZ; SANTOS, 1989a, 1990). A eficiência das espécies de *Crotalaria*, de *M. pruriens* e *C. cajan* no controle dos nematóides das lesões radiculares, *Pratylenchus* spp., raramente tem sido estudada em condições controladas de casa de vegetação (WANG; SIPES; SCHIMITT, 2002). Entretanto, esses nematóides, particularmente *P. brachyurus*, são bastante disseminados no Brasil e seu controle é difícil, por possuírem largos

círculos de hospedeiros. Em adição, no momento, cultivares resistentes a *P. brachyurus* não estão disponíveis para a grande maioria das culturas econômicas (KUBO et al., 2004; SILVA et al., 2004).

Além disso, há importantes discordâncias na literatura, principalmente em relação à eficiência das crotalárias no controle de fitonematóides (WANG; SIPES; SCHIMITT, 2002). Provavelmente, grande parte dessas diferenças deva-se ao fato de serem informações obtidas em experimentos de campo, em que vários fatores podem interferir nos resultados finais, como a presença de plantas daninhas, que podem ser hospedeiros alternativos dos nematóides presentes. Além disso, como nos trabalhos de campo é freqüente a incorporação dos adubos verdes, a diminuição populacional dos nematóides ou o aumento da produção da cultura principal podem ser causados pelos efeitos da matéria orgânica incorporada (ASMUS; FERRAZ, 1988).

Monteiro (1993) relatou que espécies de crotalárias são geralmente desfavoráveis ou pouco adequadas à reprodução de *Pratylenchus* spp., mas podem haver raças ou populações desses nematóides que conseguem se multiplicar ou pelo menos subsistir nessas plantas; as reações variam com as espécies e suas populações, tanto das plantas, como dos parasitos. Em experimento de casa de vegetação, 90 dias após a inoculação das plantas com *P. brachyurus*, obteve-se fator de reprodução do nematóide de 0,1 para *C. spectabilis*, cerca de 40 vezes menor que na testemunha suscetível, soja 'UFV 4' (SILVA; FERRAZ; SANTOS, 1989a). Entretanto, após um ciclo de cultivo de verão de adubos verdes em área naturalmente infestada, verificou-se que a população de *P. brachyurus* não sofreu redução pelo cultivo de *C. spectabilis* (BRODIE; GOOD; JAWORSKI, 1970).

Em áreas naturalmente infestadas, nas quais se cultivou milho após um ou dois ciclos de plantio de *Crotalaria* spp., Wang, McSorley e Gallaher (2004) relataram que *P. brachyurus* não conseguiu se multiplicar em *C. juncea*, apesar de penetrar em suas raízes. Em outro estudo (CHARCHAR; HUANG, 1981), *P. brachyurus* foi capaz de sobreviver em solo cultivado com *C. juncea*, mas não de se multiplicar nas raízes da planta.

Desaeder e Rao (2003) verificaram, em experimento de campo, que *C. ochroleuca* G. Don. não diferiu do milho em termos de densidade populacional de *Pratylenchus* spp. (mistura de *P. brachyurus* e *P. zaeae* Graham, 1951) nas raízes aos 180 dias do plantio; entretanto, *C. paulina* Schrank apresentou número significativamente menor de nematóides por grama de raízes que o milho e que *C. ochroleuca*.

De acordo com Endo (1959), *C. mucronata* Desv. 'Striped' e 'Giant Striata' reduziram a população de *P. brachyurus* 60 dias após a inoculação (Pf/Pi = 0,12 e 0,16), em experimento de casa de vegetação. De outra parte, em três experimentos de campo, a população de *P. brachyurus* aumentou após cinco anos de cultivo com *C. mucronata* (MURPHY; BRODIE; GOOD, 1974). Silva, Ferraz e Santos (1989a), em casa de vegetação, após 90 dias da inoculação de plantas de *C. mucronata* (144 exemplares/ planta), não obtiveram quaisquer espécimes de *P. brachyurus* nas raízes ou no solo dos vasos.

Por apresentarem crescimento vigoroso mesmo em solos com baixa fertilidade, as mucunas (*M. pruriens*), nas suas diversas cultivares ou diferentes espécies, sempre foram muito utilizadas como adubos verdes na região tropical (BACHMANN, 2005). McSorley e Gallaher (1992) relataram que mucuna anã causou aumento da população de *Pratylenchus* spp. no solo (mistura de 64% de *P. brachyurus* e de 36% de *P. scribneri* Steiner, 1943) em cinco experimentos de campo e redução em um sexto, após 3-4 meses de cultivo. Apesar de esse estudo de campo não ter sido conclusivo em relação à reação da mucuna anã a *P. brachyurus*, os resultados foram sugestivos de suscetibilidade. Sharma, Pereira e Resck (1982) avaliaram a eficiência de 15 diferentes adubos verdes, cultivados e incorporados ao solo, no controle de várias espécies de nematóides, entre elas *P. brachyurus*, concluindo que mucuna preta e mucuna anã causaram decréscimos bastante significativos nas densidades populacionais dessas espécies e tiveram efeito benéfico sobre a produtividade da soja cultivada em seqüência no local.

Rodríguez-Kábana e Ingram (1978) observaram infecção de raízes de feijão guandu por *P. brachyurus* em campo naturalmente infestado, mas a reação da planta a esse parasito não pode ser bem definida, pois outras espécies de nematóides fitoparasitos também ocorriam no local e eram até mais abundantes. Sharma, Pereira e Resck (1982) relataram que o cultivo de vários adubos verdes (crotalárias, mucunas, feijão guandu, feijão mungo, labe-labe, feijão-de-porco e outros) em área de cerrado naturalmente infestada por *P. brachyurus*, *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 e outros fitonematóides, seguido de incorporação ao solo, no geral causou decréscimos muito significativos nos níveis populacionais dessas espécies, contribuindo às melhores produtividades alcançadas nos plantios subseqüentes de soja.

### Reação de coberturas vegetais a *P. brachyurus*

O sistema plantio direto tem sido muito utilizado em vários países importantes do ponto de vista agrônomico, como Estados Unidos e Brasil. Neste sistema, as culturas são muito próximas umas das outras ao longo do ano agrícola, pois, além da cultura de verão, cultivam-se outras de outono-inverno e/ou inverno-primavera, geralmente milho safrinha ou uma cobertura vegetal. Teoricamente, isso favorece o aumento populacional dos fitonematóides polípagos presentes no solo, e esse é o caso de *P. brachyurus*, ao qual a maioria das plantas cultivadas, incluídas as culturas de verão e as coberturas de inverno, são suscetíveis.

Em muitas áreas sob os sistemas plantio direto ou cultivo mínimo, a palhada é formada basicamente por milho, cultivado no inverno, com a soja como principal cultura de verão. Também são muito utilizadas como coberturas vegetais a aveia preta e o nabo forrageiro (ALVARENGA; CABEZAS; SANTANA, 2001). Outras opções são: sorgo forrageiro [*Sorghum bicolor* (L.) Moench e *S. bicolor* x *S. sudanense* (Piper) Stapf], girassol (*Helianthus annuus* L.), amaranto (*Amaranthus* spp.), quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), quenaf (*Hibiscus cannabinus* L.), pé de galinha [*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.] e tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. No entanto, há poucas informações a respeito do efeito dessas plantas sobre a população de *P. brachyurus*.

À semelhança do que ocorre com as espécies de *Crotalaria*, os resultados encontrados na literatura a respeito da reação de sorgo a *P. brachyurus* são contraditórios. Em casa de vegetação, Sharma e Medeiros (1982) testaram 16 genótipos de sorgo silageiro (chamado no trabalho de sorgo sacarino) e obtiveram, 45 dias após a inoculação de 67 exemplares de *P. brachyurus* por planta, fatores de reprodução entre 7,2 e 26,17. Por outro lado, em trabalho de Endo (1959), desenvolvido em casa de vegetação, ocorreu aumento populacional muito pequeno do nematóide (em *S. sudanense* 'Common') ou mesmo redução (em *S. bicolor* 'Common') após 60 dias. Em experimento semelhante, mas com duração de 90 dias, obteve-se aumento populacional em sorgo 'MS 399' (CHARCHAR; HUANG, 1980). Motalaote et al. (1987) testaram dez genótipos de *S. bicolor* do tipo granífero em casa de vegetação e microparcels obtendo, após 56 a 70 dias, redução populacional em cinco, pequeno aumento em quatro e praticamente nenhuma variação em um deles. Em teste de casa de vegetação, sob quatro diferentes regimes hídricos (regas a cada dois, três, quatro ou seis dias), o fator de reprodução de *P. brachyurus* em sorgo granífero 'NK 304' manteve-se próximo a 1,0 em todos os tratamentos (MCDONALD; VAN DEN BERG,

1993). Em estudo recente, sob condição de casa de vegetação, Figueiredo e Santos (2006) caracterizaram como resistentes (Pf/Pi variáveis de 0,08 a 0,89) todos os 18 genótipos (cultivares + linhagens) de sorgo avaliados, sendo treze do tipo granífero e cinco de sorgo forrageiro. Cada planta foi inoculada com 2000 espécimes e a avaliação final deu-se após 90 dias da inoculação.

Dois híbridos intra-específicos de milho granífero (HGM 100 e TifGrain 102) causaram diminuição na população de *P. brachyurus* em casa de vegetação (TIMPER; HANNA, 2005). Em estudo sobre o círculo de hospedeiros de *P. brachyurus*, desenvolvido em casa de vegetação, Charchar e Huang (1981) obtiveram fator de reprodução do nematóide em cultivar não identificada de girassol da ordem de 2,48, após 90 dias. A resistência do amaranto granífero (*A. cruentus*) foi relatada em casa de vegetação para três genótipos (RODRÍGUEZ-KÁBANA et al., 1988). Há somente um registro de ocorrência do nematóide em quenaf (SHER; ALLEN, 1953). Não foram encontrados relatos na literatura ao alcance a respeito da reação de quinoa, nabo forrageiro, aveia preta e tef frente a *P. brachyurus*.

Dois relatos foram encontrados na literatura em relação à reação da aveia branca (*Avena sativa* L.) a *P. brachyurus*, ambos de casa de vegetação, com resultados discordantes. A cultivar Fulgrain provocou redução na população do nematóide após 60 dias (Pf/Pi = 0,26) (ENDO, 1959) e a Coronado promoveu aumento (Pf/Pi = 3,55) em estudo de 90 dias (CHARCHAR; HUANG, 1980). Em experimento utilizando solo naturalmente infestado com *P. brachyurus*, *A. sativa* foi considerada moderadamente suscetível ao nematóide, tendo por base sua população nas raízes aos 23, 43 e 63 dias após o plantio e pelos sintomas nas raízes (GRAHAM, 1951). No citado trabalho, *A. sativa* diferenciou-se das demais gramíneas testadas [centeio (*Secale cereale* L.), milho, trigo (*Triticum aestivum* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.) e *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.] por ser menos suscetível.

### **Reação de pastagens a *P. brachyurus***

Estima-se em 60 milhões de hectares o total de pastagens na região do cerrado brasileiro (LILIENFEIN, 2003) dos quais 80% (48 milhões de hectares) com algum grau de degradação e 50% (30 milhões de hectares) com acentuada degradação (PIMENTEL, 2004). Além da questão das falhas no manejo, uma das principais causas é a baixa fertilidade. O sistema de Integração Lavoura-Pecuária (ILP) surge como alternativa a esse problema; consiste na recuperação de pastagens degradadas via consórcio de grãos com capins e na produção de forrageira para a

entressafra simultânea ao plantio de culturas anuais, chamados sistema Barreirão e Santa Fé, respectivamente (PIMENTEL, 2004).

As espécies de gramíneas mais adequadas para o sistema são as forrageiras perenes, entre elas: *Brachiaria decumbens*, *B. brizantha* e *Panicum maximum* ‘Tanzânia-1’ e ‘Mombaça’ (BROCH; PITOL; BORGES, 1997).

De maneira geral, as gramíneas são suscetíveis a *P. brachyurus*, ou seja, permitem a sua reprodução; porém, a maioria delas apresenta tolerância aos danos causados, exceto quando sob parasitismo muito intenso (INOMOTO et al., 2005). Isso gera uma situação típica que é a observação de significativas perdas em plantas intolerantes a *P. brachyurus*, como soja e cafeeiro (*Coffea arabica* L.), quando estas são cultivadas em áreas anteriormente ocupadas com milho, sorgo, cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) ou braquiárias.

Charchar e Huang (1980), em trabalho no qual se objetivou determinar o círculo de hospedeiros de *P. brachyurus*, obtiveram fatores de reprodução de 2,35 em *P. maximum* e 1,18 em *B. decumbens*. Stanton, Siddiqi e Lenné (1989), em levantamento realizado na Colômbia em áreas de pastagens, encontraram altas a médias populações de *P. brachyurus* associadas a *Andropogon gayanus* Kunth, *B. decumbens*, *B. humidicola* (Rendle) Schw., *Melinis* sp., *Hyparrhenia rufa* (Nees) Stapf. e *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.. Lordello e Mello Filho (1970) relataram que o crescimento de *Brachiaria mutica* (Forsk.) Stapf. foi severamente afetado por *P. brachyurus*.

Machado, Venzke Filho e Inomoto (2000), em levantamento em área cultivada com soja, implantada através de plantio direto sobre pastagens degradadas de colônio (*P. maximum*) e capim brizantão (*B. brizantha*) no município de Rio Verde, GO, encontraram apenas dois fitonematóides nas amostras coletadas, *Helicotylenchus dihystra* (Cobb 1893) Sher 1961 e *Paratrichodorus minor* (Colbran, 1956) Siddiqi, 1974. Posteriormente, o solo dessa localidade foi utilizado como inóculo em um experimento para determinação da taxa reprodutiva desses nematóides em *B. ruziziensis* Germ. & C. Evrard, *P. maximum* e *Pennisetum glaucum* (L.) R.Br.. Após 80 dias do plantio, avaliou-se a população dos nematóides presentes, notando-se a presença de *P. brachyurus*, que não havia sido detectado por ocasião da estimativa da população inicial no solo, muito provavelmente devido ao seu nível populacional muito baixo. Os autores concluíram que as espécies testadas eram hospedeiras desse nematóide, o que favoreceu o crescimento de sua população.

## 4.2.2 Material e Métodos

### Obtenção do inóculo

Foram utilizadas duas populações de *P. brachyurus*, denominadas Pb<sub>20</sub> e Pb<sub>24</sub>. A população Pb<sub>20</sub> foi obtida a partir de uma única fêmea, extraída de raízes de quiabeiro [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench.] coletadas no município de Seropédica, RJ. A população resultante foi mantida em laboratório em calos de alfafa (*Medicago sativa* L.), segundo o método de Riedel, Foster e Mai (1973), e também em casa de vegetação, em plantas de quiabeiro e milho. A outra população, Pb<sub>24</sub>, foi coletada em plantio comercial de algodão no município de Itiquira, MT. Inicialmente, plantas de milho foram cultivadas em vasos de argila contendo solo dessa localidade e posteriormente os nematóides foram extraídos de suas raízes (COOLEN; D'HERDE, 1972) e coletados um a um sob estereoscópio, para inoculação em plantas de quiabeiro (de 30 a 65 fêmeas por planta) mantidas em casa de vegetação. Três meses após a inoculação, exemplares foram extraídos das raízes para exame ao microscópio óptico e confirmação da espécie, com base em Handoo e Golden (1989).

Os espécimes de *P. brachyurus* utilizados como inóculo nos experimentos foram obtidos de raízes de quiabeiro e milho, pelo método do Funil de Baermann modificado para recipiente raso (HOOPER, 1986). Na suspensão obtida, o número de exemplares por mililitro foi estimado, sob microscópio óptico e com auxílio de lâmina de Peters.

### Experimentos 1 e 2. Reação de adubos verdes a duas populações (Pb<sub>20</sub> e Pb<sub>24</sub>) de *Pratylenchus brachyurus*

Foram feitos dois experimentos em casa de vegetação buscando caracterizar a reação de alguns adubos verdes utilizados atualmente no Brasil a duas populações de *P. brachyurus*, Pb<sub>20</sub> e Pb<sub>24</sub>. As sementes foram gentilmente fornecidas pela Piraí Sementes, Piracicaba, SP. No primeiro experimento, com a população Pb<sub>20</sub>, foram testados: feijão guandu 'Fava Larga', *Crotalaria juncea*, *C. spectabilis*, *C. mucronata*, *C. breviflora*, *C. ochroleuca*, *C. paulina*, mucuna anã (*M. pruriens*) 'Comum', mucuna preta (*M. pruriens*) 'Comum' e mucuna cinza (*M. pruriens*). No segundo, com a população Pb<sub>24</sub>, foram testados: feijão guandu 'Fava Larga', feijão guandu anão 'IAPAR 43', *C. juncea*, *C. spectabilis*, *C. mucronata*, *C. breviflora*, *C. ochroleuca*, mucuna anã 'Comum', mucuna preta 'Comum' e mucuna cinza. Soja 'Pintado' e tagetes (*Tagetes patula* L.) foram incluídos como padrões de suscetibilidade e resistência, respectivamente, permitindo a

avaliação comparativa da reação das espécies testadas, a despeito dos possíveis efeitos de outros fatores, como duração do período experimental e temperatura do solo.

O substrato utilizado nos experimentos foi uma mistura de solo argiloso e areia na proporção 1:1, desinfestado em autoclave à temperatura de 120 °C e pressão de 1 atm, por 2 horas. Tagetes foi semeado em bandejas e, 14 dias após, uma planta foi transferida para cada copo plástico de 500 cm<sup>3</sup> de capacidade, contendo 400 cm<sup>3</sup> de substrato desinfestado. As demais plantas foram semeadas diretamente nos copos plásticos.

As inoculações foram feitas entre 15 e 20 dias após a germinação, dependendo da espécie de adubo verde, mediante pipetagem de volumes pré-ajustados da suspensão contendo os nematóides, em dois orifícios de 2 cm de profundidade, feitos a 2 cm de distância do colo das plantas. A densidade populacional utilizada foi de 270 exemplares/planta, em ambos os experimentos. Antes de serem transferidas para casa de vegetação, as plantas recém-inoculadas foram mantidas por dois dias em uma sala escura sob temperatura ambiente, buscando-se evitar a exposição do nematóide a temperaturas excessivamente elevadas durante esse período. As plantas foram mantidas em casa de vegetação dotada de sistema de refrigeração, na ESALQ/USP, em Piracicaba, SP, durante todo o período experimental.

A avaliação foi realizada aos 69 e 82 dias após a inoculação (d.a.i.) das plantas para os experimentos 1 e 2, respectivamente. O experimento 2 teve um maior período experimental por causa das temperaturas menos favoráveis ao desenvolvimento do nematóide observadas durante sua realização (de 15 de julho a 22 de setembro de 2003), em comparação com o experimento 1 (de 28 de setembro a 17 de dezembro de 2005). Os copos foram imersos em balde de 10 L contendo 4 L de água de torneira, para separação do substrato e das raízes. As raízes foram lavadas com água de torneira, enxugadas com papel e armazenadas em geladeira a 6 °C. O substrato foi processado por peneiramento e centrifugação para extração dos nematóides (JENKINS, 1964). Ao término do processamento do substrato, as raízes foram pesadas e 10 g foram processados pelo método de liquidificador e centrífuga (COOLEN; D'HERDE, 1972). A população final de *P. brachyurus* (Pf) foi obtida através da contagem dos nematóides assim extraídos. O fator de reprodução do nematóide (Pf/Pi) foi estimado para cada repetição, dividindo-se a população final (Pf substrato + Pf raízes) pela inicial (Pi). Determinaram-se também os valores de número de espécimes do nematóide por grama de raízes.

### **Experimentos 3 e 4. Reação de coberturas vegetais à população Pb<sub>20</sub> de *Pratylenchus brachyurus***

No experimento 3, foram testadas oito espécies utilizadas como cobertura vegetal no sistema plantio direto em relação à reação à população Pb<sub>20</sub> de *P. brachyurus*: sorgo duplo propósito – silageiro e forrageiro (*S. bicolor*) ‘IPA 7301011’, sorgo forrageiro (*S. bicolor* x *S. sudanense*) ‘BRS 800’, milho ‘BRS 1501’ e ‘BN2’, girassol ‘IAC Uruguai’, aveia preta ‘Campeira Mor’, amaranto granífero ‘BRS Alegria’ e nabo forrageiro ‘Comum’. As sementes foram fornecidas pela Pirai Sementes, Piracicaba, SP. Milho ‘BRS 206’ foi incluído como padrão de suscetibilidade ao nematóide; como não se obteve germinação satisfatória das sementes de tagetes, o padrão de resistência a *P. brachyurus* utilizado foi o amaranto ‘BRS Alegria’, cuja reação foi igual à do tagetes em experimentos anteriores (INOMOTO et al., no prelo). Uma cultivar de aveia branca (UFRGS 17), uma de aveia amarela, *A. byzantina* K. Koch (São Carlos) e cinco de aveia preta, *A. strigosa* (Campeira Mor, PFA 99006, Comum, CPAO 0010 e Garoa) foram também avaliadas, no experimento 4. Soja ‘Pintado’ e *C. spectabilis* foram utilizadas como padrões de suscetibilidade e resistência, respectivamente.

Foi utilizado o mesmo tipo de substrato dos experimentos 1 e 2. O preparo das plantas deu-se de maneira semelhante ao descrito nos experimentos anteriores. Sementes das aveias foram semeadas em bandejas com substrato autoclavado. Após 17 dias, três plantas foram transplantadas para cada copo plástico de 500 cm<sup>3</sup> de capacidade, contendo cerca de 400 cm<sup>3</sup> de substrato. A densidade populacional utilizada foi de 270 exemplares/planta, em ambos os experimentos. A inoculação foi feita de 15 a 20 dias após a germinação, dependendo da espécie de cobertura vegetal (experimento 3), e 38 dias após o transplante das aveias (experimento 4), mediante pipetagem de volumes pré-ajustados da suspensão contendo os nematóides, em dois orifícios de 2 cm de profundidade, feitos a 2 cm de distância do colo das plantas. A avaliação foi realizada aos 92 e 67 d.a.i., respectivamente, como já descrito anteriormente. Os períodos experimentais, da inoculação à avaliação, foram de 23 de junho a 17 de setembro de 2005 no experimento 3 e de 26 de novembro de 2004 a 01 de fevereiro de 2005 no experimento 4 .

### **Experimentos 5 e 6. Reação de pastagens a duas populações (Pb<sub>20</sub> e Pb<sub>24</sub>) de *Pratylenchus brachyurus***

Foram feitos dois experimentos em casa de vegetação para avaliar a reação de algumas espécies de pastagens às populações Pb<sub>20</sub> e Pb<sub>24</sub> de *P. brachyurus*. As sementes foram fornecidas pela Piraí Sementes, Piracicaba, SP. No experimento 5, com a população Pb<sub>20</sub>, foram testadas oito espécies e/ou cultivares de pastagens: *Brachiaria dictioneura* Stapf., *B. humidicola*, *B. ruziziensis*, *B. brizantha*, *B. decumbens*, braquiária híbrida (*B. brizantha* x *B. ruziziensis*) ‘Mulato’ e *Panicum maximum* (‘Mombaça’ e ‘Tanzânia’). O experimento 6 foi montado nos mesmos moldes do anterior, apenas utilizando-se a população Pb<sub>24</sub> do nematóide. Soja ‘Pintado’ e *C. spectabilis* foram utilizadas como padrões de suscetibilidade e resistência ao nematóide, respectivamente.

Sementes das braquiárias foram semeadas em bandejas contendo substrato autoclavado. O transplante foi realizado aproximadamente 10 dias após a germinação, com a transferência de 3 plantas por copo plástico de 500 cm<sup>3</sup> de capacidade, contendo cerca de 400 cm<sup>3</sup> de substrato. A densidade populacional utilizada foi de 270 exemplares/copo. A inoculação foi feita aos 10 dias após o transplante, como descrito nos itens anteriores. A avaliação foi realizada aos 117 e 132 dias após a inoculação, respectivamente, de maneira idêntica ao já descrito anteriormente. O período experimental, da inoculação à avaliação, foi de 29 de junho a 24 de outubro de 2005 (experimento 5) e de 29 de junho a 08 de novembro de 2005 (experimento 6).

#### **Análise estatística**

Os seis experimentos foram estabelecidos segundo delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições. A unidade experimental foi sempre representada por um recipiente contendo uma planta, exceto no caso das braquiárias (experimentos 5 e 6), quando cada recipiente continha três plantas. Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o software SANEST (Departamento de Matemática e Estatística, ESALQ/USP, Piracicaba, SP). As médias obtidas para o fator de reprodução e número de nematóides por grama de raiz foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P = 0,05$ ).

### 4.2.3 Resultados e Discussão

#### Experimentos 1 e 2. Reação de adubos verdes a *Pratylenchus brachyurus*

De maneira geral, o fatores de reprodução de *P. brachyurus* nos adubos verdes testados apresentaram valores numéricos menores no experimento 1 em comparação ao experimento 2, ao que tudo indica devido ao menor período experimental daquele (69 x 82 dias, respectivamente) e/ou às diferentes populações do nematóide testadas (Pb<sub>20</sub> x Pb<sub>24</sub>, respectivamente). Entretanto, os fatores de reprodução do nematóide em *M. pruriens* (mucunas preta, cinza e anã) e em *C. juncea* foram equivalentes ao do padrão suscetível, a soja 'Pintado', e os de *C. spectabilis* e *C. breviflora* ao do padrão resistente, o tagetes anão (Tabela 4.1), em ambos os experimentos, sugerindo que, para a maioria dos tratamentos, não houve interferência maior da variação ocorrida nas condições experimentais (época, duração) em relação ao tipo de reação evidenciado.

Tabela 4.1 - Fator de reprodução (Pf/Pi) e número de espécimes por grama de raízes de *Pratylenchus brachyurus* (populações Pb<sub>20</sub> e Pb<sub>24</sub>) em espécies vegetais utilizadas como adubo verde. Experimentos 1 e 2

Tratamento	Experimento 1 (Pb <sub>20</sub> )		Experimento 2 (Pb <sub>24</sub> )	
	Pf/Pi	Nem/grama raiz	Pf/Pi	Nem/grama raiz
Soja	1,60 a	96 b	6,15 ab	335 a
Mucuna preta	1,72 a	84 b	7,18 a	299 ab
Mucuna cinza	1,87 a	89 b	6,76 a	290 ab
Mucuna anã	1,24 ab	93 b	5,63 ab	338 a
Feijão guandu	0,78 abc	86 b	4,28 b	518 a
Feijão guandu anão	1,13 abc	106 b	...	...
<i>Crotalaria mucronata</i>	1,61 a	232 a	1,06 c	65 bc
<i>Crotalaria juncea</i>	1,31 ab	70 b	4,27 b	361 a
<i>Crotalaria ochroleuca</i>	1,12 abc	84 b	0,23 c	12 c
<i>Crotalaria paulina</i>	...	...	0,81 c	26 c
<i>Crotalaria breviflora</i>	0,26 bc	20 b	0,23 c	14 c
<i>Crotalaria spectabilis</i>	0,18 bc	13 b	0,18 c	7 c
Tagetes anão	0 c	0 b	0,01 c	4 c

Médias de seis repetições

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P = 0,05$ ).

Para facilitar a apresentação do presente item, serão primeiro feitas considerações sobre as reações das crotalárias, depois do feijão guandu e, por último, das mucunas.

A reação de *C. breviflora* a *P. brachyurus*, ora caracterizada como de resistência (Tabela 4.1), não havia sido relatada previamente na literatura. Verificou-se que houve penetração do nematóide nas raízes, mas que a planta possibilitou taxa bastante baixa de reprodução relativamente às duas populações estudadas (Pf/Pi iguais a 0,26 e 0,23). Nos dois experimentos, *C. breviflora* ficou incluída no grupo dos adubos verdes com menores valores de número de nematóides por grama de raízes, diferenciando-se significativamente dos tratamentos com as médias mais elevadas, no geral tidos como suscetíveis. Trata-se, portanto, de planta hospedeira resistente, desfavorável a *P. brachyurus*, podendo representar mais uma boa opção ao produtor

rural visando ao controle dessa espécie em áreas naturalmente infestadas nos casos em que priorize o manejo através de métodos não químicos.

Em relação a *C. spectabilis*, os presentes resultados mostram concordância com os de trabalhos anteriores, como o de Silva, Ferraz e Santos (1989a), que, em estudo de casa de vegetação, 90 dias após a inoculação com *P. brachyurus*, obtiveram fator de reprodução do nematóide de 0,1, cerca de 40 vezes menor que na testemunha suscetível, a soja 'UFV 4'. Brodie; Good e Jaworski (1970), todavia, verificaram que, após um ciclo de cultivo de verão de adubos verdes em área naturalmente infestada nos Estados Unidos, a população de *P. brachyurus* não sofreu redução pelo cultivo de *C. spectabilis*. Além disso, Brodie e Murphy (1975) e Johnson e Campbell (1980), também nos Estados Unidos, relataram aumentos da população desse nematóide no solo após o cultivo de *C. spectabilis* em campos naturalmente infestados. A explicação mais provável para tais disparidades entre os trabalhos de casa de vegetação e os de campo seria a reprodução de *P. brachyurus* em plantas daninhas. Stradioto, Ferraz e Pitelli (1983) verificaram que diversas plantas daninhas funcionam como hospedeiros alternativos altamente favoráveis a *P. brachyurus* no campo, mesmo na presença de cultura suscetível, como o milho.

Para *C. juncea*, os dados encontrados na literatura são no geral concordantes. Silva, Ferraz e Santos (1989) relataram que, em teste de casa de vegetação com várias espécies de *Crotalaria*, *P. brachyurus* foi encontrado nas raízes de *C. juncea*, embora em proporções mínimas em comparação à testemunha suscetível, a soja 'UFV-4' (16,1 x 521,3 nematóides por sistema radicular, respectivamente). Em áreas naturalmente infestadas, onde se cultivou milho após um ou dois ciclos de plantio de *Crotalaria* spp., Wang, McSorley e Gallaher (2004) relataram que *P. brachyurus* quase não conseguiu se multiplicar em *C. juncea*, apesar de penetrar as suas raízes. Em outro estudo, o cultivo de *C. juncea* em solo infestado por *P. brachyurus* permitiu a sobrevivência do nematóide, mas não a sua multiplicação (CHARCHAR; HUANG, 1981). No presente estudo, diferentemente, ocorreu aumento populacional do nematóide em ambos os experimentos ( $Pf/Pi > 1,0$ ), sendo que, particularmente no caso da população Pb<sub>24</sub> (Experimento 2), os valores obtidos para o fator de reprodução (4,27) e o número de nematóides por grama de raízes (361) mostraram-se próximos e não distintos estatisticamente daqueles determinados para o padrão suscetível (Tabela 4.1). Tal fato ressalta a necessidade de se esclarecer melhor o assunto, mediante a realização de estudo mais aprofundado especificamente a respeito dessa interação, *C. juncea* x *P. brachyurus*, haja vista que se trata de um dos adubos verdes mais recomendados para

cultivo no Brasil. Ainda, serve de alerta para que se evitem recomendações mais amplas de plantio de crotalárias visando ao controle de nematóides fitoparasitos em geral em esquemas de rotação de culturas, uma tendência que vem se acentuando no País há algum tempo.

A reação de *C. mucronata* frente a *P. brachyurus* não foi exatamente a mesma nos dois experimentos. No experimento 1, o fator de reprodução foi praticamente igual ao do padrão suscetível e a média do número de exemplares por grama de raízes a mais elevada, diferenciando-se inclusive estatisticamente das de todos os demais tratamentos; portanto, a reação foi claramente de suscetibilidade. No experimento 2, o fator de reprodução foi pouco maior que 1,0 (= 1,06), mas, em termos numéricos, ficou bem abaixo dos valores determinados para o padrão suscetível (= 6,15) e outros cinco tratamentos (as três mucunas, o feijão guandu 'Fava Larga' e a *C. juncea*). Daí, a reação ter sido considerada como de moderada suscetibilidade. Tal caracterização coaduna-se também com o fato de que o número médio de exemplares por grama de raízes determinado não diferiu estatisticamente e ficou bem mais próximo dos apresentados pelos tratamentos tidos como resistentes, inclusive o padrão, que dos suscetíveis (Tabela 4.1). Com *C. mucronata*, ficou evidente o fato de que houve melhor adaptação de uma das populações do que a outra em relação ao hospedeiro; assim, o número médio de exemplares por raízes foi quase quatro vezes maior com Pb<sub>20</sub> que com Pb<sub>24</sub>. De acordo com Endo (1959), *C. mucronata* 'Striped' e 'Giant Striata' reduziram a população de *P. brachyurus*, 60 dias após a inoculação, em experimento de casa de vegetação. Silva, Ferraz e Santos (1989a), em casa de vegetação, após 90 dias da inoculação de plantas de *C. mucronata* (144 exemplares/planta), não obtiveram quaisquer espécimes de *P. brachyurus* das raízes ou do solo dos vasos. Outros relatos sobre a reação de *C. mucronata* a *P. brachyurus* em condições de casa de vegetação não foram encontrados, apenas um a campo, segundo o qual em três áreas experimentais nos Estados Unidos, a população de *P. brachyurus* aumentou após cinco anos de cultivo de *C. mucronata* (MURPHY; BRODIE; GOOD, 1974). As discrepâncias entre tais pesquisas e em relação ao presente trabalho não encontram uma clara justificativa, podendo estar ligadas às diferentes condições experimentais dos estudos, à possível variabilidade entre as populações utilizadas, em concordância com os resultados ora observados para Pb<sub>20</sub> e Pb<sub>24</sub>, ou a outras causas.

Ainda no que concerne às crotalárias, segundo os dados obtidos, *C. ochroleuca* e *C. paulina* apresentaram reação de resistência à população Pb<sub>24</sub>, sendo que, em função do valor determinado para o fator de reprodução no caso de *C. paulina* (= 0,86), mais adequado seria

defini-la como de moderada resistência; com referência à população Pb<sub>20</sub>, *C. paulina* não foi avaliada e *C. ochroleuca* mostrou moderada suscetibilidade, com fator de reprodução ligeiramente maior que 1,0 (Tabela 4.1). Em experimento de campo, Desaeeder e Rao (2003) relataram que a densidade populacional de *Pratylenchus* spp. (mistura de *P. brachyurus* e *P. zaeae*) nas raízes de *C. ochroleuca* foi semelhante à do milho, cultura sabidamente suscetível, 180 dias após o plantio; para *C. paulina*, a densidade populacional foi menor que as obtidas para o milho e a *C. ochroleuca*. Sendo relativos a uma população mista de *P. brachyurus* e *P. zaeae* no campo, tais resultados dificultam adequada comparação com os dados ora obtidos, mas, mesmo assim, é possível perceber-se certa semelhança nas reações das duas espécies de crotalárias em ambos os trabalhos.

Em relação ao feijão guandu, Rodríguez-Kábana e Ingram (1978) relataram parasitismo de *P. brachyurus* nas raízes desse adubo verde, cultivado em área naturalmente infestada, mas a reação ao nematóide não pode ser devidamente caracterizada porque outras importantes espécies fitoparasitas estavam presentes na área. Sharma, Pereira e Resck (1982) relataram que o cultivo de feijão guandu (cultivar não identificada no trabalho) e de vários outros adubos verdes em área de cerrado naturalmente infestada por *P. brachyurus*, *M. javanica* e outros fitonematóides, seguido de incorporação ao solo, causou decréscimos muito significativos nos níveis populacionais dessas espécies, contribuindo às melhores produtividades alcançadas nos plantios subseqüentes de soja; os autores sugeriram “que o controle pareceu estar mais associado com a produção de substâncias tóxicas pelos adubos verdes do que a produção de massa seca”. Os presentes resultados indicam que o feijão guandu testado, ‘Fava Larga’, mostrou reações diferentes em relação às duas populações (Tabela 4.1). No experimento 1 (Pb<sub>20</sub>), embora o fator de reprodução médio fosse pouco menor que 1,0, não diferiu estatisticamente do padrão suscetível e de outros tratamentos com valores superiores a 1,0; o mesmo ocorreu com o número de nematóides por grama de raízes. Assim, a caracterização da reação como moderadamente resistente afigura-se a mais apropriada nesse caso. Já no experimento 2 (Pb<sub>24</sub>), os valores médios obtidos ( $Pf/Pi = 4,28$ ; nem/grama raiz = 518) sugerem claramente reação de suscetibilidade. Em relação ao estudo de Sharma, Pereira e Resck (1982), os dados ora obtidos indicam aparente discrepância. Contudo, a comparação no caso não se mostra adequada, haja vista que: i) aquele estudo foi desenvolvido no campo e em área infestada por várias espécies de fitonematóides além de *P. brachyurus*, e não em vasos e sob condição controlada de casa de vegetação; ii) naquele trabalho, procedeu-se à incorporação das

plantas ao solo, ao final do ciclo vegetativo, o que não ocorreu aqui, tendo inclusive os autores destacado que o efeito depressivo sobre as populações dos nematóides estaria muito provavelmente ligado à produção e liberação de substâncias tóxicas durante tal etapa; e iii) a cultivar de feijão guandu utilizada naquela pesquisa não foi identificada, podendo não ser a mesma aqui utilizada. Assim sendo, os resultados aqui obtidos, de suscetibilidade ou moderada resistência frente a *P. brachyurus*, são considerados praticamente os únicos disponíveis para a cultivar Fava Larga, uma das mais recomendadas para plantio no País. Tais subsídios deverão ser preferivelmente confirmados em futuros estudos afins e, se possível, validados para condições de campo. Apesar disso, tendo em vista o potencial desse adubo verde para multiplicar o nematóide durante o ciclo vegetativo, de até mais de quatro vezes como observado para a população Pb<sub>24</sub>, deve-se evitar, tanto quanto possível, o seu plantio em áreas infestadas por *P. brachyurus*. Com referência ao feijão guandu anão 'IAPAR 43', também incluído no estudo, mas apenas no Experimento 1, foi considerado moderadamente suscetível, com fator de reprodução pouco superior a 1,0, ou seja, capaz de prover sobrevivência e ligeiro acréscimo populacional à população Pb<sub>20</sub>. Em vista disso, cabem aqui as mesmas considerações restritivas feitas para o feijão guandu 'Fava Larga' em relação ao cultivo em áreas infestadas pelo nematóide e nas quais se objetiva o seu controle.

Por fim, em relação às mucunas, com base nos resultados obtidos foi possível caracterizar a reação de todas como de suscetibilidade às duas populações. Em ambos os experimentos, os valores determinados para os fatores de reprodução e número de exemplares por grama de raízes desses adubos verdes não se diferenciaram do padrão suscetível. McSorley e Gallaher (1992) relataram que o cultivo de mucuna anã causou aumento na população de *Pratylenchus* spp. (mistura de 64% de *P. brachyurus* e 36% de *P. scribneri*) após 3-4 meses, em cinco experimentos de campo, e diminuição em um. Apesar de os resultados desses experimentos não poderem ser considerados conclusivos em relação à reação da mucuna anã a *P. brachyurus*, dada a ocorrência concomitante de *P. scribneri*, foram bastante sugestivos de suscetibilidade, tal como verificado no presente estudo. É oportuno lembrar que a recomendação de uso de mucunas visando ao controle de fitonematóides no País tem sido sempre associada à subsequente incorporação da parte aérea das plantas ao solo para que seja bem sucedida (FERRAZ; FREITAS, s.d.), pois, durante o ciclo vegetativo, a multiplicação de espécies de diferentes gêneros, como *Pratylenchus*, pode ocorrer nas raízes, inclusive ao ponto de causar o subdesenvolvimento das plantas (VIEIRA; NUNES

JÚNIOR; MELLO, 2005); ao que tudo indica, o controle da população de *Pratylenchus* spp. e de outras formas migradoras dá-se no solo após a destruição das plantas e incorporação dos órgãos da parte aérea, de cujos tecidos parecem ser liberadas substâncias tóxicas. Portanto, a menos que já esteja previamente definida a incorporação final ao solo, o plantio das três diferentes formas de mucunas ora caracterizadas como suscetíveis em áreas infestadas por *P. brachyurus* poderá concorrer ao aumento da população dessa espécie e deverá ser considerada uma opção de risco.

### **Experimentos 3 e 4. Reação de coberturas vegetais à população $Pb_{20}$ de *Pratylenchus brachyurus***

Os resultados obtidos nos experimentos 3 e 4, relativos às espécies vegetais utilizadas como coberturas vegetais, estão apresentados nas tabelas 4.2 e 4.3, respectivamente.

As duas cultivares de sorgo avaliadas foram suscetíveis a *P. brachyurus*, com fatores de reprodução de 5,55 e 3,34, respectivamente, não diferindo estatisticamente do padrão de suscetibilidade, milho ‘BRS 206’ (Pf/Pi = 4,57); o mesmo ocorreu com os números médios de exemplares por grama de raízes (Tabela 4.2). Os dados disponíveis na literatura a respeito da reação de genótipos de sorgo a *P. brachyurus* são variáveis e algo contraditórios, revelando-se concordantes ou não com os resultados obtidos no presente trabalho. Com efeito, em casa de vegetação, Sharma e Medeiros (1982) testaram 16 genótipos de sorgo silageiro (= sacarino) e, 45 dias após a inoculação com 67 espécimes de *P. brachyurus* por planta, determinaram fatores de reprodução variáveis de 7,2 e 26,17, sendo todos considerados suscetíveis ou altamente suscetíveis. Em casa de vegetação, Endo (1959) verificou redução populacional de *P. brachyurus* após 60 dias em *S. bicolor* ‘Common’ (Pf/Pi = 0,12), mas crescimento em *S. sudanense* ‘Common’ (Pf/Pi = 2,18). Em experimento semelhante, mas com duração de 90 dias, Charchar e Huang (1980) obtiveram aumento populacional de 1,96 vezes em sorgo ‘MS 399’. Motalaote et al. (1987) testaram dez genótipos de *S. bicolor* do tipo granífero em casa de vegetação e microparcels, verificando, após 56 a 70 dias, redução populacional em cinco (fatores de reprodução variáveis de 0,3 e 0,8) e pequeno aumento em quatro deles (fatores de reprodução variáveis de 1,2 a 2,1); em um, não houve variação populacional significativa (Pf/Pi = 1,0). Em outro estudo desenvolvido em casa de vegetação, sob quatro diferentes regimes hídricos (regas a cada dois, três, quatro ou seis dias), o fator de reprodução de *P. brachyurus* no sorgo granífero ‘NK 304’, indiferente aos tratamentos, manteve-se próximo a 1,0 (MCDONALD; VAN DEN

BERG, 1993). Figueiredo e Santos (2006) consideraram resistentes todos os 18 genótipos de sorgo (13 granífero e 5 forrageiro) testados, em casa de vegetação, após 90 dias de inoculação de 2000 exemplares por planta, com variação dos valores de Pf/Pi de 0,08 a 0,89.

Tabela 4.2 - Fator de reprodução e número de espécimes por grama de raízes de *Pratylenchus brachyurus* (população Pb<sub>20</sub>) em algumas plantas utilizadas como coberturas vegetais. Experimento 3

<b>Tratamento</b>	<b>Fator de reprodução (Pf/Pi)</b>	<b>Número de nematóides/ grama de raízes</b>
Sorgo 'IPA 7301011'	5,55	73 a
Sorgo 'BRS 800'	3,34	17 ab
Milho 'BRS 206'	4,57	32 ab
Milheto 'BRS 1501'	2,10	29 ab
Milheto 'BN 2'	0,43	5 b
Girassol 'IAC Uruguai'	0,60	34 ab
Aveia preta 'Campeira Mor'	0,57	28 ab
Nabo forrageiro 'Comum'	0,03	4 b
Amaranto 'BRS Alegria'	0,01	1 b

Médias de seis repetições

Valores seguidos de letras diferentes na coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P = 0,05$ ).

As diferenças apontadas entre os estudos alistados e em comparação com os obtidos neste trabalho podem ser atribuídas, pelo menos em alguns casos, aos métodos utilizados. Por exemplo, Motalaote et al. (1987) realizaram a extração dos nematóides das raízes por incubação em câmara nebulizada e no presente trabalho isso foi feito pelo método de liquidificador, peneiramento e centrifugação (COOLEN; D'HERDE, 1972). Porém, a maior parte das diferenças provavelmente deveu-se à diversidade genética existente em *S. bicolor*. Os genótipos avaliados por Sharma e Medeiros (1982), que apresentaram elevados fatores de reprodução, eram do tipo silageiro, enquanto os utilizados nos demais trabalhos, em particular no de Figueiredo e Santos (2006), eram predominantemente do tipo granífero. É importante ressaltar que, no presente trabalho, foi utilizado um genótipo de sorgo duplo propósito (silageiro e forrageiro), *Sorghum bicolor* 'IPA 7301011', e um forrageiro, *Sorghum bicolor* x *S. sudanense* 'BRS 800'.

O milho tanto concorreu à redução ( $Pf/Pi = 0,43$  em 'BN 2') como ao aumento ( $Pf/Pi = 2,10$  em 'BRS 1501') da população (Tabela 4.2), sendo as reações nesses casos caracterizadas como de resistência e suscetibilidade, respectivamente. Não há dados anteriores sobre a reação desses genótipos, porém, dois híbridos intra-específicos de *P. glaucum*, HGM 100 e TifGrain 102, reduziram a população de *P. brachyurus* ( $Pf/Pi < 1,0$  após 60 dias) em casa de vegetação (TIMPER; HANNA, 2005). Vale destacar que tais híbridos eram do tipo granífero, diferentemente de 'BN 2' e 'BRS 1501', ora testados e que são utilizados no Brasil exclusivamente como plantas de cobertura ou forrageira. Além disso, o método de extração utilizado no trabalho de Timper e Hanna foi o de incubação em câmara nebulizada, por eles considerado como pouco eficiente; assim, o confronto entre os resultados dos dois estudos não se revela adequado. Muitos autores consideram que as gramíneas em geral, e em particular o milho, constituem hospedeiros muito favoráveis a certas espécies de *Pratylenchus*, como *P. brachyurus* e *P. zaeae*. No caso do milho, como também visto antes para o sorgo neste mesmo experimento, a reação a *P. brachyurus* parece ser bastante dependente do genótipo em questão, devendo-se proceder à caracterização de modo pontual e evitar generalizações.

Amaranto 'BRS Alegria' e nabo forrageiro 'Comum' foram altamente resistentes, com valores extremamente baixos de fator de reprodução (Tabela 4.2); embora esporádicos, espécimes foram encontrados nas raízes, comprovando a ocorrência de penetração. A resistência de amaranto granífero a *P. brachyurus* já havia sido relatada anteriormente em casa de vegetação para três genótipos de *A. cruentus* (RODRÍGUEZ-KÁBANA et al., 1988), sendo ora confirmada. Não foram encontrados relatos anteriores sobre a reação de nabo forrageiro a *P. brachyurus*.

A população de *P. brachyurus* também diminuiu em girassol 'IAC Uruguai' e em aveia preta 'Campeira Mor' ( $Pf/Pi = 0,60$  e  $0,57$ , respectivamente), caracterizando reação de resistência ou moderada resistência (Tabela 4.2). Em trabalho anterior, Charchar e Huang (1981) determinaram, após 90 dias da inoculação, fator de reprodução igual a 2,48 em uma cultivar não identificada de girassol, o que implicaria em reação de suscetibilidade, resultado discordante daquele aqui obtido. Dada a notória escassez de dados a respeito, fica muito difícil o estabelecimento de causas para justificar a divergência observada, mostrando-se mais plausível a sugestão de realização de estudo específico e mais amplo sobre a interação *P. brachyurus* x girassol, incluindo diferentes cultivares da planta e populações do nematóide. Quanto à aveia

preta ‘Campeira Mor’, o resultado será discutido no parágrafo seguinte, referente ao experimento 4.

Tabela 4.3 - Fator de reprodução (Pf/Pi) e número de espécimes por grama de raízes de *Pratylenchus brachyurus* (população Pb<sub>20</sub>) em cultivares de aveia branca (*Avena sativa*), aveia amarela (*A. byzantina*) e aveia preta (*A. strigosa*). Experimento 4

Tratamento	Pf/Pi	Nem./g raiz
Soja ‘Pintado’	6,86 a	81 a
<i>Avena sativa</i> ‘UFRGS 17’	1,93 bc	49 a
<i>Avena byzantina</i> ‘São Carlos’	2,63 b	74 a
<i>Avena strigosa</i> ‘Campeira Mor’	0,09 d	2 b
<i>Avena strigosa</i> ‘IPFA 99006’	0,14 d	2 b
<i>Avena strigosa</i> ‘Comum’	0,13 d	3 b
<i>Avena strigosa</i> ‘CPAO 0010’	1,03 cd	19 b
<i>Avena strigosa</i> ‘Garoa’	0,25 cd	6 b
<i>Crotalaria spectabilis</i>	0 d	0 b

Médias de seis repetições

Valores seguidos de letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P = 0,05$ ).

No experimento 4, dentre as cinco cultivares de aveia preta testadas, quatro (‘Campeira Mor’, ‘IPFA 99006’, ‘Comum’ e ‘Garoa’) foram consideradas resistentes, com fatores de reprodução bem inferiores a 1,0 e números de exemplares por grama de raízes muito baixos, estatisticamente distintos do padrão suscetível e semelhantes ao padrão resistente (Tabela 4.3). No caso de ‘Campeira Mor’, também incluída no experimento 3, houve concordância entre os resultados obtidos. Uma quinta cultivar, CPAO 0010, apresentou reação praticamente de neutralidade, com fator de reprodução (1,03) quase igual a 1,0; rigorosamente, com base no número de exemplares por grama de raízes, cuja média foi estatisticamente semelhante à do padrão resistente e distinta da do padrão suscetível, a indicação preferível seria a de moderada resistência. Já para as duas cultivares de aveia branca e amarela, os fatores de reprodução foram maiores que 1,0 e os números de exemplares por grama de raízes não diferiram do padrão suscetível, sendo, pois, consideradas suscetíveis. Os fatores de reprodução obtidos para essas duas

cultivares (1,93 e 2,63), embora numericamente bem inferiores ao do padrão suscetível (6,86) e estatisticamente diferentes dele, foram claramente indicativos de reação de suscetibilidade, haja vista a possibilidade de se ter a densidade populacional do nematóide duplicada ou quase triplicada numa determinada área mediante o cultivo das mesmas. Os resultados contidos nos raros relatos anteriores pertinentes ao assunto revelaram-se discrepantes, pois, num deles, a cultivar Fulgrain provocou diminuição na população de *P. brachyurus* ( $Pf/Pi = 0,26$ ) após período de 60 dias (ENDO, 1959), enquanto em outro a Coronado causou aumento ( $Pf/Pi = 3,55$ ) após 90 dias (CHARCHAR; HUANG, 1980). Em experimento utilizando solo naturalmente infestado com *P. brachyurus*, a reação da aveia branca (sem identificação da cultivar estudada) foi considerada de moderada suscetibilidade, tendo por base a densidade populacional do nematóide nas raízes aos 23, 43 e 63 dias após o plantio (GRAHAM, 1951).

A julgar pelos presentes resultados, em relação a *P. brachyurus* observa-se uma tendência de suscetibilidade no caso da aveia branca e de resistência no da aveia preta. Tal percepção, no entanto, como já comentado para o girassol, fica algo prejudicada pela escassez de dados relativos não apenas a outras cultivares como a populações do nematóide de outras procedências. Assim, a eventual indicação de uso de aveias como coberturas vegetais em áreas naturalmente infestadas visando ao controle do nematóide deverá recair somente sobre cultivares com reação de resistência já bem estabelecida.

#### **Experimentos 5 e 6. Reação de pastagens à duas populações (Pb<sub>20</sub> e Pb<sub>24</sub>) de *Pratylenchus brachyurus***

Os resultados obtidos para as espécies vegetais utilizadas como pastagens, relativos aos experimentos 5 e 6, estão apresentados na tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Fator de reprodução (Pf/Pi) e número de espécimes por grama de raízes de *Pratylenchus brachyurus* (populações Pb<sub>20</sub> e Pb<sub>24</sub>) em plantas utilizadas como pastagem. Experimentos 5 e 6

Tratamento	Experimento 5 (Pb <sub>20</sub> )		Experimento 6 (Pb <sub>24</sub> )	
	PF/Pi	Nem./g raiz	Pf/Pi	Nem./g raiz
Soja 'Pintado'	10,69	198 a	59,66 a	1434 a
<i>Brachiaria dictioneura</i>	1,01	3 b	1,32 b	4 b
<i>Brachiaria humidicola</i>	2,2	5 b	1,8 b	7 b
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	1,66	11 b	3,8 b	37 b
<i>Brachiaria brizantha</i>	3,5	21 b	9,71 b	82 b
<i>Brachiaria decumbens</i>	1,79	9 b	5,65 b	44 b
Braquiária híbrida 'Mulato'	4,96	31 b	10,89 b	56 b
<i>Panicum maximum</i> 'Mombaça'	7,07	42 b	13,18 b	119 b
<i>Panicum maximum</i> 'Tanzânia'	12,17	80 b	10,38 b	148 b
<i>Crotalaria spectabilis</i>	0	0 b	0 b	0 b

Médias de seis repetições

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si segundo o teste de Tukey ( $P = 0,05$ )

Todas as espécies de pastagens foram consideradas hospedeiros favoráveis à reprodução do nematóide, com reação de suscetibilidade ou moderada suscetibilidade; os valores do fator de reprodução foram sempre superiores a 1,0 em ambos os experimentos e, exceto nos tratamentos *B. dictioneura* e *B. ruziziensis*, mostraram-se bem maiores para a população Pb<sub>24</sub> que para a Pb<sub>20</sub> (Tabela 4.4). Na verdade, no caso da *B. dictioneura* com a população Pb<sub>20</sub>, o fator de reprodução ficou tão próximo de um (= 1,01) que a reação deveria ser considerada de neutralidade, mas, tendo em vista a tendência geral de suscetibilidade das braquiárias ao nematóide, classificá-la como moderadamente suscetível afigura-se procedimento aceitável. Destacaram-se muito, e ainda mais no caso da população Pb<sub>24</sub> (experimento 6), as duas cultivares de *P. maximum*, a braquiária híbrida 'Mulato' e a *B. brizantha*, com fatores de reprodução próximos ou superiores a dez (10,0), o que possibilitaria tratar tais reações como de alta suscetibilidade, não fosse o fato de que no padrão suscetível, a soja 'Pintado', tal valor foi ainda bem maior, aproximando-se de sessenta (60,0). Charchar e Huang (1980) já haviam considerado *B. decumbens* e *P. maximum* (cultivares

não mencionadas) bons hospedeiros de *P. brachyurus*, com fatores de reprodução de 1,18 e 2,35, respectivamente, em estudo de casa de vegetação, resultado concordante com os do presente trabalho. Também Stanton, Siddiqi e Lenné (1989), em levantamento realizado em áreas cultivadas com pastagens na Colômbia, encontraram altas populações de *P. brachyurus* associadas a *B. decumbens* e *B. humidicola*.

Machado, Venzke Filho e Inomoto (2000), em casa de vegetação, registraram a presença de *P. brachyurus* após o cultivo de *B. ruziziensis* e *P. maximum* em vasos contendo solo coletado de área de campo cultivada com soja sob plantio direto; essa espécie de nematóide não havia sido detectada por ocasião da estimativa da população inicial dos fitonematóides presentes no solo, provavelmente devido ao seu nível populacional muito baixo. Os autores concluíram que as duas espécies de pastagem citadas eram hospedeiros favoráveis ao nematóide, o que concorreu ao significativo crescimento de sua população, em acordo com os resultados encontrados no presente trabalho.

#### **4.3 Considerações finais**

Neste item final, após a apresentação dos resultados obtidos nos diversos estudos realizados sob condições controladas de casa de vegetação, considerou-se oportuno destacar também algumas importantes implicações envolvidas na aplicação prática de tais subsídios.

Os estudos ora desenvolvidos em relação a *P. brachyurus* evidenciaram como pode ser variada a reação de diferentes espécies vegetais (adubos verdes, coberturas vegetais, pastagens) candidatas à utilização em esquemas de rotação com grandes culturas frente a essa espécie de nematóide. Aspectos ligados tanto à diversidade genética dessas plantas como das populações do nematóide afiguram-se como as mais prováveis, mas não únicas, causas para tal fato. Ora, se isso ocorre com *P. brachyurus*, não surpreende que também aconteça com outras importantes espécies fitoparasitas, como *M. incognita* e *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, 1940. Estas três espécies estão sendo aqui destacadas intencionalmente, porque são consideradas as de maior interesse para a cultura do algodoeiro no Brasil (SANTOS; SOARES, 2005) e o manejo dos fitonematóides nessa cultura constitui, em última análise, o tema básico desta tese de doutorado.

Se a escolha de cultivos alternativos visando ao controle de uma única espécie de fitonematóide em uma dada área já é tarefa difícil, como visto pelos resultados dos experimentos ora relatados, o que dizer então no caso de se necessitar selecionar uma cultura que, a um só

tempo, precise mostrar-se resistente a duas ou três espécies polífagas (como são *M. incognita*, *P. brachyurus* e *R. reniformis*) ocorrentes no local, ecologicamente sustentável e, ainda, atraente e viável sob o ponto de vista econômico ? Trata-se, sem dúvida, de assunto dos mais complexos e, para tentar ilustrá-lo melhor, algumas breves considerações a respeito, baseadas na situação hoje ocorrente no Brasil, serão apresentadas na seqüência.

Em algodoeiro irrigado, como na região do oeste da Bahia, onde as espécies de nematóides mais daninhas são *M. incognita* e *P. brachyurus* (INOMOTO et al., 2005), uma opção a ser utilizada em rotação para o controle de ambas seria a *C. spectabilis*, mas esta apresenta restrições econômicas (ausência de renda durante um ciclo) e de manejo (no controle das ervas daninhas). Outras possíveis opções de coberturas vegetais para o sistema plantio direto ou cultivo mínimo seriam cultivares de nabo forrageiro e de amaranto definidas como resistentes a ambos os nematóides em estudo anterior (ASMUS et al., 2006) e no presente trabalho. Entretanto, há pesquisas dando conta de que o nabo forrageiro pode ter efeito alelopático sobre o algodoeiro cultivado logo após, tornando-o, assim, inadequado para emprego (ASMUS et al., 2006).

Já no Mato Grosso do Sul, *R. reniformis* tem causado as maiores perdas, no geral ocorrendo associado a *P. brachyurus* (ASMUS, 2004), sendo a rotação com culturas resistentes a principal maneira de controle (INOMOTO et al., 2005). Novamente, *C. spectabilis*, juntamente com *C. breviflora* seriam boas opções, por serem resistentes às duas espécies de nematóides, como verificado por Silva, Ferraz e Santos (1989b) e com base nos dados do presente trabalho, mas as limitações já citadas para a *C. spectabilis* têm restringido o uso de ambas em larga escala. No caso das culturas que atuam como coberturas vegetais no sistema de plantio direto nesse Estado, a maioria é resistente a *R. reniformis*, como milho, sorgo, nabo forrageiro, aveias, centeio, braquiárias, capim pé-de-galinha etc., embora haja algumas suscetíveis, como amaranto granífero e quinoa (ASMUS; CARGNIN, 2005). A limitação ao uso delas em rotação com o algodoeiro para fins de controle está na elevada capacidade de sobrevivência desse nematóide no solo, sendo necessários pelo menos dois anos de cultivo para que ocorra adequada redução de sua densidade populacional, condição que desagrada aos produtores (INOMOTO et al., 2005). Vale lembrar que, em áreas onde ocorram tanto *R. reniformis* quanto *P. brachyurus*, a lista de culturas que poderiam ser utilizadas fica ainda mais restrita, incluindo principalmente o nabo forrageiro, as aveias pretas e certas cultivares de milho, como BN-2, que mostraram reação de resistência no presente estudo. Nem sempre uma cultura resistente a uma determinada espécie de nematóide o é

também a outras; por isso, nas infestações mistas, tão frequentes em lavouras de algodão, o problema do controle fica agravado. Como se constata, atualmente, o conhecimento da gama de plantas hospedeiras de cada uma dessas espécies de nematóide, de preferência ao nível de cultivar, constitui condição relevante, quase um pré-requisito, durante a elaboração dos programas de rotação ou sucessão de culturas nas áreas extensivas de produção de algodão.

Em outros Estados produtores, como Mato Grosso, Goiás, São Paulo e Paraná, são comuns as misturas de *P. brachyurus* com *M. incognita* ou com *R. reniformis*, dependendo da região e do tipo de solo (GIELFI; SANTOS; ATHAYDE, 2003; SILVA et al., 2004; MACHADO et al., 2005). Nessa situação, a seleção de uma cultura resistente aos dois nematóides presentes na área é difícil, caso se pense em retorno econômico. Geralmente, opta-se pelo controle de *M. incognita* ou de *R. reniformis*, por causarem danos mais visíveis e perdas mais acentuadas ao algodoeiro do que *P. brachyurus*; isso é feito plantando-se amendoim ou cultivares de milho ou soja resistentes a esses nematóides. Contudo, essas culturas são sabidamente suscetíveis a *P. brachyurus* e irão causar aumento significativo em seus níveis populacionais em poucos anos, persistindo assim os problemas com nematóides no local.

Em conclusão, sabe-se que o manejo de fitonematóides é complexo, na cotonicultura ou na Agricultura como um todo, principalmente se duas ou mais espécies ocorrerem simultaneamente na área. Muitas vezes, a opção de controle adotada para uma espécie acaba favorecendo o desenvolvimento de outra, também presente na área. Portanto, os resultados disponibilizados neste trabalho, sendo pontuais para *P. brachyurus*, para que se tornem de fato realmente úteis, devem ser inseridos num contexto mais abrangente e aplicados com o maior critério possível.

## Referências

ALVARENGA, R.C.; CABEZAS, J.C.C.; SANTANA, D.P. Plantas de cobertura de solo para sistema plantio direto. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 208, p. 25-36, 2001.

ASMUS, G.L. Ocorrência de nematóides fitoparasitos em algodoeiro no Estado de Mato Grosso do Sul. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n.1, p. 77-86, 2004.

ASMUS, G.L.; FERRAZ, S. Antagonismo de algumas espécies vegetais, principalmente leguminosas, a *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 13, n. 1, p. 20-24, 1988.

ASMUS, G.L.; CARGNIN, R.A. Reação de culturas de cobertura a *Rotylenchulus reniformis*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 136, 2005.

- ASMUS, G.L.; INOMOTO, M.M.; SAZAKI, C.S.S.; FERRAZ, M.A. Reação de coberturas vegetais ao nematóide das galhas (*Meloidogyne incognita*), 2006, Campina Grande, PB, 2006, p. 94-95. **Documentos Embrapa Algodão**, 146.
- BACHMANN, T. *Mucuna pruriens* (L.) D. C. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/GBASE/DATA/PF000416.HTM>> Acesso em: 26 maio 2006.
- BARKER, K.R.; KOENNING, S.R. Developing sustainable systems for nematode management. **Annual Review of Phytopathology**, Califórnia, v. 36, p. 165-205, 1998.
- BROCH, D.L.; PITOL, C.; BORGES, E.P. Integração agricultura-pecuária: plantio da soja sobre pastagem na integração agropecuária. Maracaju: Fundação MS para a pesquisa e difusão de tecnologias agropecuárias, 1997. 24p. **Informativo Técnico, 01/97**
- BRODIE, B.B.; GOOD, J.M.; JAWORSKI, C.A. Population dynamics of plant nematodes in cultivated soil: Effect of summer cover crops in old agricultural land. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 2, p. 147-151, 1970.
- BRODIE, B.B.; MURPHY, W.S. Population dynamics of plant nematodes as affected by combinations of fallow and cropping sequence. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 7, p. 91-92, 1975.
- CHARCHAR, J.M.; HUANG, C.S. Círculo de hospedeiras de *Pratylenchus brachyurus*. I - Gramineae. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 5, p. 351-357, 1980.
- CHARCHAR, J.M.; HUANG, C.S. Círculo de hospedeiras de *Pratylenchus brachyurus*. III – Plantas diversas. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 6, p. 469-473, 1981.
- COOLEN, W.A.; D'HERDE, C.J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent, Belgian: State of Nematology and Entomology Research Station, 1972, 77 p.
- CROW, W.T.; WEINGARTNER, D.P.; DICKSON, D.W.; McSORLEY, R. Effect of sorghum-sudangrass and velvetbean cover crops on plant-parasitic nematodes associated with potato production in Florida. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 33, suppl., p. 285-288, 2001.
- DAVIS, J.R.; HUISMAN, O.C.; WESTERMAN, D.T.; HAFEZ, S.L.; EVERSON, D.O.; SORENSEN, L.H.; SCHNEIDER, A.T. Effects of green manures on Verticillium wilt on potato. **Phytopathology**, Lancaster, n. 86, p. 444-453, 1996.
- DESAEDER, J.; RAO, M.R. Significance of lesion and spiral nematodes in *Crotalaria*-maize rotation in Western Kenya. **Nematropica**, Flórida, v. 33, p. 27-39, 2003.
- ENDO, B.Y. Responses of root-lesion nematodes, *Pratylenchus brachyurus* and *P. zae* to various plants and soil types. **Phytopathology**, Lancaster, v. 49, p. 417-421, 1959.

- FERRAZ, S.; FREITAS, L.G. O controle de fitonematóides por plantas antagonistas e produtos naturais. 17p. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/antagonistas.pdf>> Acesso em: 20 jun. 2006.
- FIGUEIREDO, A.; SANTOS, M.A. Reação de cultivares e linhagens de sorgo (*Sorghum* sp.) granífero e forrageiro a *Pratylenchus brachyurus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 26, 2006, Campos dos Goytacazes, RJ. **Resumos...** Campos dos Goytacazes: Sociedade Brasileira de Nematologia, 2006. Resumo 75, p. 96.
- GALLAHER, R.N.; DICKSON, D.W.; CORELLA, J.F.; HEWLETT, R.E. Tillage and multiple cropping system and population dynamics of phytoparasitic nematodes. **Annals of Applied Nematology**, Lawrence, v. 2, p. 90-94, 1988.
- GIELFI, F.S.; SANTOS, J.M.; ATHAYDE, M.L.F. Reconhecimento das espécies de fitonematóides associadas ao algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) no Estado de Goiás. **Anais...** CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 4, 2003, Goiânia, GO. Goiânia: Fialgo e Embrapa Algodão, 2003. 1 CD-ROM.
- GRAHAM, T.W. **Boletim Técnico**. Nematode root rot of tobacco and other plants. Clemson: South Carolina Agricultural Experimental Station, 1951, p. 1-25.
- HANDOO, Z.A.; GOLDEN, M.A. A key and diagnostic compendium to the species of the genus *Pratylenchus* Filipjev. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 21, p. 202-218, 1989.
- HARTWIG, N.L.; AMMON, H.U. Cover crops and living mulches. **Weed Science**, Illinois, v. 50, p. 688-699, 2002.
- HOOKS, C.R.R.; JOHNSON, M.W. Impact of agricultural diversification on the insect community of cruciferous crops. **Crop Protection**, Guildford, v. 22, p. 223-238, 2003.
- HOOVER, D.J. Extraction of free-living stages from soil. In: SOUTHEY, J. F. (Ed). **Laboratory Methods for work with plant and soil nematodes**. London: Her Majesty's Stationery Office, 1986, p. 5-30.
- INOMOTO, M.M.; ASMUS, G.L.; MACHADO, A.C.Z.; SILVA, R.A. Nematóides do algodoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 25, 2005, Piracicaba, SP. **Minicurso 2...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Nematologia, 2005. 31 p.
- INOMOTO, M.M.; MOTTA, L.C.C.; BELUTI, D.B.; MACHADO, A.C.Z. Reação de seis adubos verdes a *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, 2006. No prelo.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, Washington, v.48, p.692, 1964.

JOHNSON, A.W.; CAMPBELL, G.M. Managing nematode population densities on tomato transplants (*Lycopersicon esculentum*) using crop rotation and a nematicide. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 12, p. 6-19, 1980.

KUBO, R.K.; OLIVEIRA, C.M.G.; ANTEDOMENICO, S.R.; MONTEIRO, A.R.; FERRAZ, L.C.C.B.; INOMOTO, M.M. Ocorrência de nematóides do gênero *Pratylenchus* em cafezais do estado de São Paulo. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 159-165, 2004.

LILIENTFEIN, J.; WILCKE, W.; VILELA, L.; AYARZA, M.A.; LIMA, S.C; ZECH, W. Soil fertility under native cerrado and pasture in the Brazilian savanna. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 67, p. 1195-1205, 2003.

LORDELLO, L.G.E.; MELLO FILHO, T. Mais três capins hospedeiros de nematóides migradores. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 45, p. 78, 1970.

MACHADO, A.C.Z.; VENZKE FILHO, S.P.; INOMOTO, M.M. Reprodução de fitonematóides identificados em uma área de plantio direto em três espécies de gramíneas. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 173-177, 2000.

MACHADO, A.C.Z.; SIQUEIRA, K.M.S.; GALBIERI, R.; CIA, E. Levantamento preliminar das espécies de fitonematóides associadas à cultura do algodão no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 5, 2005, Salvador, BA. **Resumos...** Salvador: Abapa e Embrapa Algodão, 2005. Resumo 352.

McDONALD, A.H.; VAN DEN BERG, E.H. Effect of watering regimen on injury to corn and grain sorghum by *Pratylenchus* species. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 25, p. 654-658, 1993.

McSORLEY, R.; GALLAHER, R.N. Comparison of nematode population densities on six summer crops at seven sites in North Florida. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 24, suppl., p. 699-706, 1992.

McSORLEY, R. Multiple cropping systems for nematode management: A review. In: SOIL AND CROP SCIENCE SOCIETY OF FLORIDA, 2001, Flórida. **Proceedings...** Flórida: 2001. v. 60, p. 132-142,

MONTEIRO, A.R. Controle de nematóides por espécies de adubos verdes. In: WUTKE, E. B.; BULISANI, E.A.; MASCARENHAS, H.A.A. (Ed.). **Documentos IAC**. Campinas: IAC, 1993. CURSO SOBRE ADUBAÇÃO VERDE NO INSTITUTO AGRONÔMICO, 1, p. 109-121.

MOTALAOTE, B.; STARR, J.L.; FREDERIKSEN, R.A.; MILLER, F.R. Host status and susceptibility of sorghum to *Pratylenchus* species. **Revue de Nématologie**, Bondy v. 10, p. 81-86, 1987.

MURPHY, W.S.; BRODIE, B.B.; GOOD, J.M. Population dynamics of plant nematodes in cultivated soil: Effects of combinations of cropping systems and nematicides. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 6, p. 103-107, 1974.

PIMENTEL, M.S. Lavoura-pecuária: Reintegração de produtividade. **Panorama Rural**, São Paulo, n. 70, p. 51-61, 2004.

POWERS, L.E.; McSORLEY, R. **Ecological principles of agriculture**. Albany, NY: Delmar Thomson Learning, 2000, 433 p.

RIEDEL, R.M.; FOSTER, J.G.; MAI, W.F. A simplified medium for monoxenic culture of *Pratylenchus penetrans* and *Ditylenchus dipsaci*. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 5, p. 71-72, 1973.

RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; INGRAM, E.G. Susceptibilidad del gandul a especies de fitonematodos en Alabama. **Nematropica**, Flórida, v. 8, n. 1, p. 32-34, 1978.

RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KING, P.S.; ROBERTSON, D.G.; WEAVER, C.F. Potential of crops uncommon to Alabama for management of root-knot and soybean cyst nematodes. **Annals of Applied Nematology**, Lawrence, v. 2, p. 116-120, 1988.

SANTOS, J.M.; SOARES, P.L.M. Nematóides-chave do algodoeiro no Brasil. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p.140, 2005.

SHARMA, R.D.; MEDEIROS, A.C.S. Reações de alguns genótipos de sorgo sacarino aos nematóides *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Belo Horizonte, v. 17, n. 5, p. 697-701, 1982.

SHARMA, R.D.; PEREIRA, J.; RESCK, D.V.S. Eficiência de adubos verdes no controle de nematóides associados à soja nos cerrados. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1982. 30 p. **Boletim de Pesquisa**, 13.

SHER, S.A.; ALLEN, M.W. Revision of the genus *Pratylenchus* (Nematoda: Tylenchidae). **University of California Publications in Zoology**, Berkeley, v. 57, n. 6, p. 441-470, 1953.

SILVA, G.S.; FERRAZ, S.; SANTOS, J.M. Resistência de espécies de *Crotalaria* a *Pratylenchus brachyurus* e *P. zaeae*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 13, p. 81-92, 1989a.

SILVA, G.S.; FERRAZ, S.; SANTOS, J.M. Resistência de espécies de *Crotalaria* a *Rotylenchulus reniformis*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 13, p. 87-92, 1989b.

SILVA, G.S.; FERRAZ, S.; SANTOS, J.M. Efeito de *Crotalaria* spp. sobre *Meloidogyne javanica*, *M. incognita* raça 3 e *M. exigua*. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 13, p. 81-86, 1990.

SILVA, R.A.; SERRANO, M.A.S.; GOMES, A.C.; BORGES, D.C.; SOUZA, A.A.; ASMUS, G.L.; INOMOTO, M.M. Ocorrência de *Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne incognita* na cultura do algodoeiro no Estado do Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.29, n.3, p.337, 2004.

STANTON, J.M.; SIDDIQI, M.R.; LENNÉ, J.M. Plant-parasitic nematodes associated with tropical pastures in Colombia. **Nematropica**, Flórida, v. 19, n. 2, p. 169-175, 1989.

STRADIOTO, M.F.; FERRAZ, L.C.C.B.; PITELLI, R.A. Dinâmica populacional de *Pratylenchus brachyurus* em cultura de milho (*Zea mays* L.) infestada por plantas daninhas. **Nematologia Brasileira**, Brasília, n. 7, p. 99-115, 1983.

TIMPER, P.; HANNA, W.W. Reproduction of *Belonolaimus longicaudatus*, *Meloidogyne javanica*, *Paratrichodorus minor*, and *Pratylenchus brachyurus* on pearl millet (*Pennisetum glaucum*). **Journal of Nematology**, Riverside, v. 37, n. 2, p. 214-219, 2005.

VIEIRA, M.R.; NUNES JÚNIOR, M.S.; MELLO, L.M.M. Suscetibilidade de mucuna preta a *Pratylenchus zaei*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 25, 2005, Piracicaba, SP. **Resumos...** Piracicaba: ESALQ, Sociedade Brasileira de Nematologia, 2005. Resumo 33, p. 81.

WANG, K.H.; SIPES, B.S.; SCHIMITT, D.P. *Crotalaria* as a cover crop for nematode management: a review. **Nematropica**, Flórida, v. 32, p. 35-57, 2002.

WANG, K.H.; McSORLEY, R.; GALLAHER, R.N. Effect of winter cover crops on nematode population levels in North Florida. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 36, p. 517-523, 2004.

## 5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE *Pratylenchus brachyurus* ATRAVÉS DE PCR-RFLP E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS-1 DO rDNA

### Resumo

A região ITS-1 do rDNA tem sido bastante utilizada para caracterização molecular de nematóides, uma vez que exibe considerável variação entre as espécies e dentro de populações da mesma espécie. Visando caracterizar molecularmente 30 populações de *Pratylenchus brachyurus*, provenientes de diferentes regiões geográficas brasileiras, foram realizadas análises de PCR-RFLP, com base em um único indivíduo adulto de cada população, utilizando-se as enzimas de restrição *TaqI*, *AluI* e *CpoI*. Através da digestão do fragmento gerado pela amplificação da parte final (3') da região 18S e da região ITS-1 do rDNA com as enzimas de restrição utilizadas, as populações puderam ser claramente separadas em pelo menos três padrões distintos (A, B e C). Baseando-se na análise de RFLP, populações representativas de *P. brachyurus* de cada padrão de RFLP foram selecionadas para seqüenciamento direto da região ITS-1. O seqüenciamento das populações foi feito três vezes; no primeiro, utilizando-se *primers* universais para a região ITS-1 do rDNA de nematóides, as seqüências obtidas apresentaram pequena identidade com seqüências de outras espécies de nematóides, apesar de haver homologia entre elas. O segundo seqüenciamento, com outro par de *primers* universais, foi feito visando-se esclarecer o primeiro resultado, mas apenas duas populações forneceram seqüências que apresentaram identidade com outras espécies de *Pratylenchus*, inclusive com uma população de *P. brachyurus* do Japão. O terceiro seqüenciamento, com um *primer* universal e outro específico para *Pratylenchus* spp., produziu seqüências correspondentes ao final (3') da região 18S com grande identidade com *Pratylenchus* spp. e outras populações de *P. brachyurus*, mas na região correspondente à ITS-1, houve mistura de seqüências, não sendo possível a escolha de uma seqüência consenso para *P. brachyurus*. Os resultados obtidos nos seqüenciamentos evidenciaram, além da variabilidade genética existente na região ITS-1 do rDNA de *P. brachyurus*, também a possibilidade da existência de pseudogenes dentro do genoma dessa espécie, o que pôde ser visualizado a partir das seqüências obtidas inicialmente, que não encontraram homologia com outras espécies de nematóides. O trabalho ainda foi útil para mostrar o risco em utilizar-se *primers* universais para determinados nematóides, como *P. brachyurus*, assim como da utilização da técnica de PCR-RFLP para diagnose de espécies de nematóides que apresentem variabilidade genética, como ora demonstrado.

### Abstract

The ITS-1 region rDNA has been used for nematode molecular characterization because it exhibits considerable variation among species and within populations of a species. In order to characterize 30 populations of *Pratylenchus brachyurus*, from different Brazilian geographic regions, PCR-RFLP analysis were used with a single adult specimen of each population by the restriction enzymes *TaqI*, *AluI*, and *CpoI*. Digestion of the final fragment 3' of 18S and part of the ITS-1 PCR products yielded repeatable patterns that clearly separated different populations into three distinct RFLP profiles (A, B, and C). Populations of each profile were chosen for directly sequencing of ITS-1 region. In the first sequencing, with universal primers for nematode ITS-1 region rDNA, sequences obtained showed slight similarity with sequences of other nematode genera, besides that homology between this sequences were recorded. Second sequencing was

done with other universal primers and the results were similar, except for two populations, which provided sequences with high identity to sequences of other *Pratylenchus* species, including one population of *P. brachyurus* from Japan. Third sequencing was done with an universal and a specific primer and showed sequences of 3' final 18S with high identity with *Pratylenchus* spp. and other populations of *P. brachyurus*, but in ITS-1 region it was observed a mixture of sequences that did not allow a sequence consensus for *P. brachyurus* to be provided. Results from sequencing showed genetic variability in ITS-1 region rDNA of *P. brachyurus*, and also the probability of existence of pseudogenes into this species genome, since first sequences did not show homology with other nematode species. This work was important to show the risks in the use of universal primers to identify some nematode species, as *P. brachyurus*, and of PCR-RFLP technique for diagnostic purposes with regard to nematode species that show genetic variability, as demonstrated for *P. brachyurus*.

## 5.1 Introdução

Nematóides do gênero *Pratylenchus* Filipjev, 1936 são endoparasitos comuns de plantas em todo o mundo. São considerados, depois dos nematóides causadores de galhas, como os parasitos que causam maiores perdas econômicas na agricultura mundial (SASSER; FRECKMAN, 1987). *Pratylenchus brachyurus* é um nematóide que ocorre com elevada frequência em culturas importantes do Brasil, como soja [*Glycine max* (L.) Merr.], café (*Coffea arabica* L. e *C. canephora* Pierre), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), entre outras (SILVA et al., 2004; KUBO et al., 2004).

O controle de *P. brachyurus* é bastante difícil e a busca por novas alternativas de manejo desse nematóide é complicada, uma vez que é uma espécie com grande número de plantas hospedeiras, o que inviabiliza o uso da rotação de culturas, e parece não existir fontes de resistência a *P. brachyurus* nas principais espécies vegetais cultivadas atualmente no Brasil. Além disso, o sucesso de programas de manejo de nematóides muitas vezes depende da rápida e segura identificação da espécie presente na área. O gênero *Pratylenchus* apresenta certas dificuldades de identificação devido à baixa quantidade de características diagnósticas para classificar seus indivíduos ao nível de espécie e à variabilidade intraespecífica de muitas dessas características (TARJAN; FREDERICK, 1978; HANDOO; GOLDEN, 1989; MOUNPORT; BAUJARD; MARTINY, 1990). Publicações recentes indicam o número de espécies válidas no gênero como sendo 40 (ROMAN; HIRSCHMANN, 1969), 89 (SIDDIQI, 1986), 60 (LUC, 1987) ou 63 (HANDOO; GOLDEN, 1989). Determinadas características das chaves para identificação são frequentemente difíceis de serem observadas no microscópio óptico (por exemplo, o número de anéis labiais) e, pela variação intraespecífica encontrada em muitas dessas características, é

necessário que se façam medidas em pelo menos 20 exemplares da espécie em estudo, antes que se possa definir sua classificação com segurança (LOOF, 1978; ORUI, 1996). Amostras a campo tornam-se tarefas complicadas quando mais de uma espécie de *Pratylenchus* está presente nas amostras (LOOF, 1991). A identificação dessas espécies pode ser simplificada, através do desenvolvimento de métodos que levem em conta caracteres menos variáveis, com base em um único espécime, como algumas técnicas bioquímicas e moleculares, como RAPD e RFLP.

Técnicas bioquímicas têm auxiliado no esclarecimento das variabilidades intraespecífica e interespecífica dentro do gênero *Pratylenchus* (HUSSEY, 1979; PAYAN; DICKSON, 1990; GOUVÊA; LIMA; OLIVEIRA, 1997). Entretanto, a técnica denominada de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), baseada no padrão de fragmentos produzidos pela digestão enzimática do DNA com uma endonuclease específica, tem sido mais utilizada para detectar a variabilidade intraespecífica existente em fitonematóides (WAEYENBERGE et al., 2000). Antigamente, utilizava-se o RFLP para estudo do genoma todo. Esta técnica era pouco exequível e perigosa, devido ao emprego de substâncias tóxicas. Hoje, existe a possibilidade de empregar o RFLP juntamente com a PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando-se um único nematóide, concentrando-se numa determinada região do DNA (OLIVEIRA et al., 2004). No caso de fitonematóides, a região ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossômico (rDNA) tem recebido especial atenção (VRAIN et al., 1992; FERRIS; FERRIS; FAGHIHI, 1993; WENDT; VRAIN; WEBSTER, 1993; IBRAHIM et al., 1994; JOYCE et al., 1994; ZIJLSTRA et al., 1995; ORUI, 1996; CHERRY et al., 1997; POWERS et al., 1997; SUBBOTIN et al., 1999; WAEYENBERGE et al., 2000). A região ITS, localizada entre os genes 18S e 28S, é um versátil marcador molecular, utilizado para analisar espécies, populações e comunidades ecológicas de nematóides (VRAIN; McNAMARA, 1994).

O objetivo principal do presente trabalho foi caracterizar, através de PCR-RFLP, 30 populações de *P. brachyurus*, coletadas em diferentes regiões do Brasil e de diferentes hospedeiros, buscando-se variabilidade genética intraespecífica, o que trará contribuições para programas de melhoramento genético de espécies hospedeiras desse nematóide. Além disso, foi feito o seqüenciamento da região ITS-1 do rDNA de algumas populações, visando-se investigar o grau de homologia entre as seqüências e avaliar sua natureza.

## 5.2 Desenvolvimento

### 5.2.1 Revisão bibliográfica

Os nematóides das lesões radiculares (*Pratylenchus* spp.) são endoparasitos migratórios comuns em plantas cultivadas em todo o mundo. Esses nematóides invadem o parênquima cortical das raízes, produzindo extensas áreas necróticas e causando sérias perdas econômicas (DE LUCA et al., 2004). A identificação das espécies de *Pratylenchus* é difícil, devido ao fato de muitas características morfométricas e morfológicas serem comuns entre espécies, além da grande variabilidade morfológica dentro das espécies (CORBETT; CLARK, 1983). A taxonomia do gênero *Pratylenchus* é contraditória (ORUI; MIZUKUBO, 1999); publicações indicam o número de espécies válidas no gênero como sendo 40 (ROMAN; HIRSCHMANN, 1969), 89 (SIDDIQI, 1986), 60 (LUC, 1987) ou 63 (HANDOO; GOLDEN, 1989).

Análises baseadas em características morfométricas, bioquímicas e moleculares indicam que existe variabilidade entre indivíduos de algumas espécies de *Pratylenchus*, como relatado para *P. vulnus* (PINOCHET et al., 1994; LAX et al., 2004), *P. coffee* (DUNCAN et al., 1999; WAEYENBERGE et al., 2000; ANDRÉS et al., 2000) e *P. goodeyi* (ANDRÉS et al., 2000).

No caso específico de *P. brachyurus*, Roman e Hirschmann (1969) observaram grande variação em características morfológicas e morfométricas e afirmaram que características como o formato da cauda podem variar entre diferentes populações de *P. brachyurus*, uma vez que na descrição original da espécie foram ilustrados pelo menos cinco tipos de cauda (GODFREY, 1929). Posteriormente, Tarjan e Frederick (1978) também observaram grande variação na cauda e comprimento do corpo das populações de *P. brachyurus* estudadas. Olowe e Corbett (1984a,b), estudando a influência da localização geográfica e de fatores ambientais na variação de características morfométricas de *P. brachyurus*, afirmaram que os dois fatores podem interferir em características lineares e relativas em diferentes populações dessa espécie.

O'Bannon e Tommerlin (1970) já haviam sugerido a existência de raças, tendo observado variação no número de exemplares extraídos das raízes de plântulas de *Citrus limon* L. infectadas com populações do nematóide oriundas de diferentes localidades dos Estados Unidos. Observações de campo, também realizadas nos Estados Unidos, indicaram igualmente haver diferenças entre populações de *P. brachyurus* (DICKSON; DUNN, informação verbal, citados por PAYAN; DICKSON, 1988).

Payan e Dickson (1988), avaliando a reprodução de quatro populações de *P. brachyurus*, obtidas de diferentes hospedeiros e procedentes de regiões geográficas distintas dos Estados Unidos, sob condições de casa de vegetação, verificaram ser possível a detecção de comportamentos diferenciados entre as populações utilizadas em termos de capacidade reprodutiva nas plantas hospedeiras testadas, avaliada com base no número de espécimes do nematóide por grama de raízes. Posteriormente, Payan e Dickson (1990) conseguiram evidenciar a ocorrência do que chamaram “grupos fenotípicos” dentro da espécie *P. brachyurus*, através da análise dos perfis enzimáticos obtidos por eletroforese para cinco populações oriundas de diferentes regiões dos Estados Unidos, permitindo a separação das diferentes populações estudadas. Na verdade, tratavam-se das mesmas quatro populações utilizadas no estudo anterior, de 1988, e de uma adicional, obtida de citros cultivado no estado da Flórida. Três grupos fenotípicos distintos foram obtidos para as cinco populações nos casos das análises baseadas em malato desidrogenase (MDH) e fosfoglucomutase ((PGM), mas apenas um a partir de fosfoglucose isomerase (PGI). Andrés et al. (2000), em estudo cujo objetivo foi o desenvolvimento de marcadores de isozimas para diferenciação entre nove espécies de *Pratylenchus*, também observaram variação intraespecífica no sistema fosfoglucomutase para populações de *P. brachyurus*.

Os resultados das análises de isozimas, entretanto, não devem ser utilizados em estudos de estrutura populacional e estudos intraespecíficos, que requerem níveis razoáveis de variabilidade, pois não se mostram suficientemente variáveis em alguns organismos (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001). Esses padrões, portanto, não são úteis para propósitos de diagnóstico devido ao fato de que é necessário um grande número de nematóides para a realização das análises (PAYAN; DICKSON, 1990; WAEYENBERGE et al., 2000). Também é possível que a proteína estudada não esteja presente em todas as fases do ciclo de vida do nematóide ou que sua expressão seja influenciada por fatores ambientais, gerando dúvidas a respeito da acurácia do método (JONES; PHILLIPS; ARMSTRONG, 1997).

Em função do quadro apresentado, em que a taxonomia tradicional de espécies de *Pratylenchus* é contraditória e as técnicas eletroforéticas não podem ser utilizadas em rotina para diagnóstico desse gênero, a solução fica a cargo de técnicas mais acuradas, como as biomoleculares. A técnica de PCR-RFLP do rDNA tem se mostrado útil para fins de identificação

de espécies e uma importante ferramenta para análises de variação genética (WAEYENBERGE et al., 2000).

Duas regiões do genoma de nematóides têm sido utilizadas para caracterização entre espécies: o DNA ribossômico (rDNA) e o DNA mitocondrial (mtDNA). O rDNA é a região gênica mais estudada em Nematoda, por ser altamente conservada (JONES; PHILLIPS; ARMSTRONG, 1997; POWERS, 2004); consiste de três genes ribossomais, 18S, 5.8S e 28S (26S), que contêm duas regiões espaçadoras (ITS-1 e ITS-2) entre eles, separadas pelo gene 5.8S (HILLIS; DIXON, 1991; DORRIS; DE LEY; BLAXTER, 1999) (Figura 5.1). Análises comparativas dos diferentes genes do rDNA têm sido utilizadas para a construção de árvores filogenéticas e para determinação das relações evolucionárias entre e dentro de espécies de plantas (LASHERMES et al., 1997; MARSHALL et al., 2001), répteis (HEDGES; POLING, 1999), bactérias (SNAIDR et al., 1999), fungos (COOK; DUNCAN, 1997), insetos (MALLOCH; FENTON; GOODRICH, 2001), Platyhelminthes (LITTLEWOOD et al., 1999) e nematóides (POWERS et al., 1997; BLAXTER et al., 1998; BELLOCQ et al., 2001; DE LEY; BLAXTER, 2002; OLIVEIRA et al., 2004).

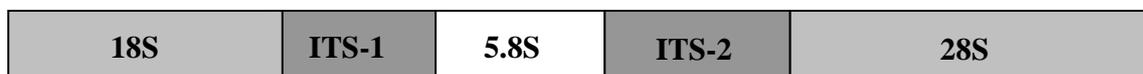


Figura 5.1 – Representação esquemática do DNA ribossômico, evidenciando os três genes ribossômicos, 18S, 5.8S e 28S (26S) e as regiões espaçadoras, ITS-1 e ITS-2

As seqüências de nucleotídeos das regiões ITS têm sido analisadas por RFLP para o estudo das estruturas populacionais e para fins de diagnóstico (VRAIN et al., 1992; ZIJLSTRA et al., 1995; POWERS et al., 1997; FLEMING et al., 1998; HOYER; BURGERMEISTER; BRAASCH, 1998; IWAHORI et al., 1998; KNOETZE; BURGER; MEYER, 2000; WAYENBERGE et al., 2000; NGUYEN; MARUNIAK; ADAMS, 2001). Além disso, as regiões ITS podem ser úteis no desenvolvimento de *primers* específicos (UEHARA et al., 1998; WANG et al., 2003; HÜBSCHEN et al., 2004 a,b; OLIVEIRA et al., 2005) e para estudar as relações filogenéticas entre espécies de nematóides (BECKENBACH; BLAXTER; WEBSTER, 1999; SUBBOTIN et al., 2001; KANZAKI; FUTAI, 2002; SABO et al., 2002). Levantamento realizado por Alvarez e

Wendel (2003) revelou que um terço (34%) das análises filogenéticas publicadas nos últimos cinco anos foram baseadas exclusivamente em seqüências da região ITS.

Entretanto, a região ITS acumula mutações, inserções e deleções ao longo do processo evolutivo da espécie, gerando variabilidade genética, que pode interferir na eficiência de métodos como o RFLP para fins de diagnóstico. Além disso, pelo fato dessa variação poder resultar em alelos funcionais divergentes, alelos não funcionais e pseudogenes (RAZAFIMANDIMBISON; KELLOGG; BREMER, 2004), os resultados obtidos podem ser falsos e levar a conclusões duvidosas. Cópias do rDNA podem se transformar em pseudogenes quando um locus ribossômico torna-se inativo ou quando uma cópia solitária do rDNA é deslocada para outra região genômica (BUCKLER; IPOLLITO; HOLTSTFORD, 1997). Apesar das evidências de ocorrência de pseudogenes em plantas e animais, o polimorfismo da região ITS não é estudado intencionalmente; este tem sido detectado e investigado somente quando a amplificação do DNA produz mais que uma banda ou quando o seqüenciamento direto do produto de PCR de bandas aparentemente uniformes resulta em mistura de seqüências (RAZAFIMANDIMBISON; KELLOGG; BREMER, 2004). Esses pseudogenes são excluídos a priori de análises filogenéticas (YANG et al., 1999), devido ao fato de produzirem os chamados “long-branch”, descaracterizando os resultados (FELSENSTEIN, 1978). No entanto, geralmente, essas falhas são corrigidas durante o processo de homogeneização do rDNA, permitindo que as seqüências de nucleotídeos seja preservada entre indivíduos da mesma espécie e até entre espécies, a despeito do processo evolucionário (DOVER, 1982).

Para fins de diagnóstico, Orui (1996) foi o primeiro a demonstrar o valor prático do uso de padrões de bandas PCR-RFLP da região ITS do rDNA para identificação de espécies de *Pratylenchus*. Nesse sentido, *P. penetrans*, *P. coffeae*, *P. vulnus* e *Pratylenchus* sp. foram separados entre si pelos padrões de digestão dos produtos amplificados de um único exemplar com cinco endonucleases (*AluI*, *DdeI*, *HhaI*, *HinfI* e *TaqI*). Posteriormente, Orui e Mizukubo (1999) amplificaram, por PCR, as regiões ITS-1 e ITS-2 de sete espécies de *Pratylenchus* e obtiveram dois fragmentos para *P. brachyurus*, um fragmento com 700 pb e outro com 750 pb. Os autores sugeriram que esse fenômeno seja dado por seqüências ligeiramente diferentes presentes nas cópias das regiões ITS analisadas para um único indivíduo da espécie. Apesar disso, Orui e Mizukubo mostraram que as sete espécies estudadas foram facilmente diagnosticadas através da

digestão do(s) fragmento(s) amplificado(s) das regiões ITS com as endonucleases *AluI*, *HhaI*, *HinfI* e *TaqI*.

Waeyenberge et al. (2000) utilizaram a técnica de RFLP para diagnosticar 18 espécies de *Pratylenchus*, entre elas *P. brachyurus*. Estes autores aplicaram a técnica da PCR para amplificar as regiões ITS das espécies e populações analisadas, o que revelou grandes diferenças nas seqüências de oligonucleotídeos, que variaram em tamanhos de 900 a 1250 pb., sendo essa diferença já suficiente para separar as diferentes espécies de *Pratylenchus* utilizadas. Através do RFLP, com as enzimas *CfoI*, *DdeI*, *HindIII*, *HpaII* e *PstI*, as espécies estudadas puderam ser separadas através da combinação de pelo menos duas enzimas. Entretanto, tais resultados podem ser considerados preliminares, uma vez que 10 das 18 espécies analisadas foram representadas por apenas uma população, o que limita a extrapolação dos resultados para diferentes populações de uma mesma espécie.

*Primers* específicos também têm sido utilizados para diagnóstico de espécies de *Pratylenchus*. Uehara et al. (1998) desenvolveram *primers* baseados nas seqüências das regiões ITS do rDNA para *P. penetrans*, *P. coffeae* e *P. loosi*. Recentemente, Al-Banna et al. (2004) desenvolveram *primers* específicos para cinco espécies de *Pratylenchus* (*P. neglectus*, *P. penetrans*, *P. scribneri*, *P. thornei* e *P. vulnus*) a partir da região D3 do gene 26S do rDNA. Este método pode ser utilizado como uma ferramenta para diagnóstico rápido e eficiente em estudos de epidemiologia e manejo de nematóides do gênero *Pratylenchus*. Entretanto, *primers* específicos para *P. brachyurus*, uma espécie de grande importância para as condições brasileiras, ainda não foram devidamente caracterizados.

## 5.2.2 Material e Métodos

### Obtenção das populações para a caracterização molecular

Foram utilizadas 30 populações de *Pratylenchus brachyurus* para diferenciação através de PCR-RFLP, obtidas de diferentes hospedeiros e regiões geográficas do Brasil, de acordo com a Tabela 5.1.

A identificação específica foi feita com base no exame microscópico de fêmeas montadas em lâminas e comparação das características morfológicas observadas com aquelas descritas por Handoo e Golden (1989).

Indivíduos adultos (fêmeas) foram coletados no estereoscópio, transferidos para solução salina 1 M NaCl (29,22 g NaCl + 500 ml água destilada) e conservados a -20°C.

Tabela 5.1 - Populações de *Pratylenchus brachyurus* utilizadas nos testes biomoleculares

População	Hospedeiro	Local de coleta
Pb1	Algodão ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	Rio Verde - GO
Pb2	Soja ( <i>Glycine max</i> )	Palmital - SP
Pb3	Milho ( <i>Zea mays</i> )	São Roque de Minas - MG
Pb4	Soja ( <i>G. max</i> ) cultivado em discos de cenoura	Campo Florido – MG
Pb5	Milho ( <i>Z. mays</i> )	Piracicaba – SP
Pb6	Algodão ( <i>G. hirsutum</i> )	Piracicaba – SP
Pb7	Algodão ( <i>G. hirsutum</i> )	Adamantina – SP
Pb8	Algodão ( <i>G. hirsutum</i> )	Birigui – SP
Pb9	Algodão ( <i>G. hirsutum</i> )	Caiabu – SP
Pb10	Café ( <i>Coffea arabica</i> ) cultivado em calos de alfafa	Cafelândia – SP
Pb11	Algodão ( <i>G. hirsutum</i> )	Campinas – SP
Pb12	Soja ( <i>G. max</i> )	Correntina – BA
Pb13	Braquiária ( <i>Brachiaria</i> sp.)	Correntina – BA
Pb14	Fedegoso	Luis Ed. Magalhães - BA
Pb15	Soja ( <i>G. max</i> )	Barreiras – BA
Pb16	Algodão ( <i>G. hirsutum</i> )	Barreiras – BA
Pb17	Amendoim ( <i>Arachis hipogea</i> )	Ribas do Rio Pardo – MS
Pb18	Soja ( <i>G. max</i> )	Ribas do Rio Pardo – MS
Pb19	Soja ( <i>G. max</i> )	Balsas – MA
Pb20	Quiabo ( <i>Abelmoschus esculentus</i> )	Seropédica - RJ
Pb21	Algodão ( <i>G. hirsutum</i> )	Serra do Ramalho - BA
Pb22	Algodão ( <i>G. hirsutum</i> )	Campo Verde – MT
Pb23	Algodão ( <i>G. hirsutum</i> )	Sapezal – MT
Pb24	Algodão ( <i>G. hirsutum</i> )	Itiquira – MT
Pb25	Milho ( <i>Z. mays</i> )	Dom Aquino – MT
Pb26	Soja ( <i>G. max</i> )	Dom Aquino – MT
Pb27	Algodão ( <i>G. hirsutum</i> )	Leme – SP
Pb28	Algodão ( <i>G. hirsutum</i> )	Guará - SP
Pb29	Soja ( <i>G. max</i> )	Ribeiro Gonçalves - PI
Pb30	Araçá ( <i>Psidium</i> sp.)	Pelotas - RS

### Extração do DNA

Um único indivíduo para cada população foi selecionado, seccionado em 3 partes (com auxílio de uma agulha) em uma gota de 20 µl de 0,25 M NaOH e colocado em um tubo de microcentrífuga, sendo incubado a 25 °C por toda a noite. Posteriormente, o tubo foi incubado a

99 °C por 3 min. e adicionou-se 10 µl de 0,25 M HCl, 5 µl de 0,50 M Tris-HCl e 5 µl de 2% Triton X-100. O tubo foi novamente incubado a 99 °C, por 3 min. (STANTON; McNICOL; STEELE, 1998).

### Reação de PCR

Utilizou-se nas reações de PCR o kit “pureTaq” Read-To-Go Bead (Amersham Pharmacia Biotech). Em um tubo de microcentrífuga de 0,5 ml foi adicionada uma esfera do kit de PCR, que contém os reagentes necessários para a reação (2,5 U puReTaq, 200 µM de cada dNTP, 10 µM Tris-HCl, 50 µM KCl e 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), quando dissolvida em 22,5 µl de água mili-Q. Em seguida, foi adicionado 0,5 µl de DNA, 1µl de cada par de *primers* (BL18/ 5818 ou 18S/ Rn58SR; Tabela 4.2), num volume final de 25 µl de reação. Esta mistura foi levada ao termociclador, pré-aquecido a 94° C. As condições de amplificação utilizadas foram realizadas como descrito por Oliveira et al. (2004): 40 ciclos de 1 min. a 94° C, 45 seg. a 57° C e 2 min. a 72° C. Um período de 10 min. a 72° C seguiu o último ciclo. Após a amplificação do DNA, 5 µl do produto da PCR foi utilizado para eletroforese em tampão 1X TBE (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) em gel de agarose a 1% com 0,003% de brometo de etídio (0,02 µg/ml). O resultado da amplificação foi comparado com o marcador molecular VIII (Roche). O gel foi visualizado num transiluminador de luz UV e fotografado.

Tabela 5.2 - *Primers* universais utilizados nas reações de PCR

<i>Primer</i>	Seqüência (5' – 3')	Direção
BL 18	CCC GTC GMT ACT ACC GAT T	F
5818	ACG ARC CGA GTG ATC CAC	R
18S	TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT	F
RN58SR	ACG AGC CGA GTG ATC CAC CG	R

### Análise de RFLP

Foram digeridos 5 µl de cada produto da PCR 5 U das enzimas de restrição *TaqI*, *AluI* e *CpoI* em tampão apropriado, de acordo com as recomendações do fabricante, totalizando um volume de 20,2 µl. A digestão foi conduzida por 3 horas a 65 °C (*TaqI*) e 37 °C (*AluI* e *CpoI*). O

produto da digestão enzimática foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, de acordo com Kumar, Fenton e Jones (1999). Foi utilizado o marcador de peso molecular VIII (Roche). Os géis foram visualizados em luz UV, fotografados e o padrão de bandas analisado.

Os procedimentos para obtenção de produtos amplificados da PCR e para digestão enzimática desses produtos foram repetidos duas vezes, para confirmação dos resultados.

### **Seqüenciamento do DNA**

A etapa que envolve o seqüenciamento das populações de *P. brachyurus* foi realizada parte no laboratório de biologia molecular do setor de Fitopatologia da ESALQ/ USP, sob a supervisão do prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, e parte no Instituto Biológico de São Paulo, sob a supervisão do pesquisador Dr. Ricardo Karakava. Inicialmente, quatro populações de *P. brachyurus* foram selecionadas, com base na variação apresentada no padrão de bandas de RFLP: Pb03, Pb07, Pb20 e Pb21 (Tabela 5.1; Figura 5.2). O seqüenciamento dos fragmentos amplificados da região ITS-1 do rDNA pelos *primers* BL18 e 5818 foi feito por meio de PCR utilizando o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA). Os fragmentos foram purificados por meio do kit Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega). Para cada reação, foi preparada uma mistura contendo 2 µl de TRR mix (terminator ready reaction mix), 3,2 µmol do *primer* BL18 para o sentido anverso ou 3,2 µmol do *primer* 5818 para o sentido reverso, 3,0 µl do produto previamente amplificado contendo aproximadamente 400 ng de DNA e 2,0 µl de água. A amplificação para seqüenciamento foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante (PE Applied Biosystems, Norwalk, CT, EUA). Foi feita nova purificação do produto amplificado por precipitação com isopropanol em microtubos. Após a desnaturação das amostras a 95 °C por 3 min. foi realizada eletroforese em aparelho ABI Prism 377 DNA Sequencer® (PE Applied Biosystem, Norwalk, CT, EUA).

As seqüências assim obtidas foram alinhadas e comparadas com auxílio do software BioEdit Sequence Alignment Editor com a finalidade de identificar polimorfismo nas seqüências nucleotídicas. As seqüências das populações de *P. brachyurus* foram ainda comparadas às seqüências de outras espécies de nematóides depositadas no banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a identificação de homologia.

De acordo com os resultados obtidos para as primeiras quatro seqüências de *P. brachyurus* (Figura 5.4), foram selecionadas mais nove populações: Pb08, Pb09, Pb17, Pb18, Pb19, Pb20,

Pb22, Pb23 e Pb24 (Tabela 5.1). O procedimento para amplificação e seqüenciamento dos fragmentos foi realizado de forma semelhante ao descrito anteriormente, mas agora utilizando-se os primers 18S e RN58SR (Figura 5.3) em alternativa aos primers BL18 e 5818 que não estavam amplificando de forma adequada o fragmento em estudo. Uma terceira reação de seqüenciamento foi feita posteriormente, agora utilizando-se doze populações: [Pb03, Pb07, Pb17, Pb19, Pb20, Pb21, Pb22, Pb27, Pb29 e Pb30 (Tabela 5.1)], e os primers 18S e ACM2R (Figuras 5.3 e 5.7), este último desenvolvido com base nas seqüências obtidas anteriormente para Pb23, Pb24 e uma população de *P. brachyurus* do Japão (PbJp) (UEHARA; KUSHIDA; MOMOTA, 1999).

### **Análises filogenéticas**

Para essa etapa, foi utilizado inicialmente o programa CLUSTAL X v. 1.81 (THOMPSON et al., 1997), para criação dos alinhamentos múltiplos entre as diferentes seqüências das regiões ITS-1 e 18S que foram usadas para as análises filogenéticas. Após o alinhamento, foi feita uma edição manual através do programa GeneDoc (NICHOLAS; NICHOLAS JR.; DEERFIELD II; 1997), onde as colunas filogeneticamente não informativas foram excluídas das análises, em ambos os alinhamentos. *Radopholus similis* (GenBank acesso número GI90968508/ AJ 9665502.1) foi escolhido como *outgroup*.

As análises filogenéticas foram feitas através do programa TREE-PUZZLE (STRIMMER; VON HAESLER, 1996) e dos aplicativos do programa PHYLIP (FELSENSTEIN; CHURCHILL, 1996). O programa TREE-PUZZLE estimou os seguintes parâmetros: taxa esperada de transição/transversão (Ts/Tv) e o parâmetro *alpha* para um modelo de heterogeneidade *F84 plus gamma + invariant rate*. Um arquivo com 100 saídas foi criado para as seqüências em análise através do aplicativo PHYLIP SEQBOOT. Uma árvore (*maximum likelihood*) foi então estimada (utilizando-se valores de Ts/Tv de 2.11 e 1.39 e de *alpha* de 1.15 e 1.04, respectivamente para ITS-1 e 18S), através do aplicativo PHYLIP DNAML. As análises de *bootstrap* foram feitas a partir de 100 repetições, utilizando-se os aplicativos PHYLIP SEQBOOT e CONSENSE.

### **Desenvolvimento de primers específicos para *P. brachyurus* e *Pratylenchus* spp.**

As seqüências obtidas para a região ITS-1 do rDNA das populações selecionadas (Pb23 e Pb24; Figura 5.6) foram alinhadas entre si e com a seqüência de uma população de *P. brachyurus*

do Japão (PbJp) (UEHARA; KUSHIDA; MOMOTA, 1999) para delinear o desenvolvimento dos *primers* nos sentidos anverso e reverso, objetivando-se, além do desenvolvimento de um *primer* específico para *P. brachyurus*, a opção de *primers* que amplifiquem a região ITS-1 do rDNA de *Pratylenchus* spp. Quatro *primers* foram desenvolvidos: ACM1R e ACM2R, no sentido reverso, e ACM3F e ACM4F, no sentido anverso (Figura 5.6). Cada *primer* apresentou um tamanho de cerca de 20 nucleotídeos, selecionados pela análise visual das seqüências alinhadas, levando-se em consideração o grau de homologia entre as seqüências de *P. brachyurus* e *Pratylenchus* spp., no caso dos *primers* específicos para *Pratylenchus* spp., ou a variabilidade existente entre as seqüências de *P. brachyurus* com as demais, para o *primer* específico para *P. brachyurus*.

### **Validação dos primers**

Foram realizados alinhamentos entre as seqüências obtidas para Pb23, Pb24, a população de *P. brachyurus* do Japão (PbJp) (UEHARA; KUSHIDA; MOMOTA, 1999) e as seqüências obtidas para outras três espécies de *Pratylenchus* (UEHARA; KUSHIDA; MOMOTA, 1999): três populações de *P. vulnus*, *P. coffeae* e *P. zae* (Figura 8). A partir desses alinhamentos, apenas um *primer*, entre os quatro que foram desenhados, mostrou-se como possível candidato a *primer* específico de *P. brachyurus*: ACM4F (Figura 5.6), por não apresentar homologia entre as outras espécies de *Pratylenchus* analisadas.

Uma vez escolhido o candidato a *primer* específico de *P. brachyurus*, ACM4F, este foi validado de acordo com os critérios propostos por Hübschen et al. (2004a). Dessa forma, inicialmente, o *primer* ACM4F foi testado contra todas as populações de *P. brachyurus* estudadas no presente trabalho (Tabela 5.1), determinando-se sua robustez. Após essa seleção inicial, a especificidade do *primer* ACM4F foi determinada através do uso de DNA extraído de outras espécies de *Pratylenchus*, como *P. coffeae*, *P. jaehni*, *P. zae* e *P. penetrans*, além de outras duas espécies, *Radopholus similis* e *Rotylenchulus reniformis* (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Populações de *Pratylenchus* spp., *Radopholus similis* e *Rotylenchulus reniformis* utilizadas na validação dos primers

População	Hospedeiro	Local de coleta
<i>P. coffeae</i> M2	<i>Aglaonema</i> sp.	Rio de Janeiro – RJ
<i>P. jaheni</i>	Citros ( <i>Citrus</i> sp.)	Conchal – SP
<i>P. zaeae</i> 1	Cana-de-açúcar ( <i>Saccharum officinarum</i> )	Santa Adélia - SP
<i>P. zaeae</i> 2	Cana-de-açúcar ( <i>Saccharum officinarum</i> )	Piracicaba - SP
<i>P. penetrans</i>	Lírio ( <i>Alstroemeria</i> sp.)	Holanda
<i>Radopholus similis</i>	Banana ( <i>Musa</i> sp.)	Piracicaba - SP
<i>Rotylenchulus reniformis</i>	Algodão ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	Piracicaba - SP

### 5.2.3 Resultados

#### Caracterização molecular de populações de *P. brachyurus*

A Figura 5.2 (A.1, A.2, B.1 e B.2) descreve os padrões de RFLP gerados pelas três enzimas de restrição utilizadas em 26 das 30 populações de *P. brachyurus* estudadas. Através da digestão com as enzimas utilizadas, as populações puderam ser separadas em pelo menos três grupos distintos, a partir da análise do padrão de bandas, indicando que existe variabilidade intraespecífica entre as populações estudadas. Um grupo, denominado “A”, inclui as populações Pb01 (Rio Verde – GO), Pb04 (Campo Florido - MG), Pb20 (Seropédica - RJ), Pb25 (Dom Aquino - MT), Pb26 (Dom Aquino - MT) e Pb06 (Piracicaba - SP); o grupo “B” inclui Pb03 (São Roque de Minas – MG), Pb05 (Piracicaba – SP), Pb08 (Birigui – SP), Pb21 (Serra do Ramalho – BA) e Pb18 (Ribas do Rio Pardo – MS); e o grupo “C”, Pb07 (Adamantina – SP) e Pb09 (Caiabu – SP). Além desses três grupos de padrões de bandas RFLP, também foram encontradas bandas adicionais ou de tamanhos diferentes em outras digestões (por exemplo, a digestão com *TaqI* da população Pb24, como mostra a Figura 5.2 A.1). Esses produtos digeridos apareceram em menor frequência, quando comparados aos grupos “A”, “B” e “C”, mas foram confirmados em uma segunda digestão.

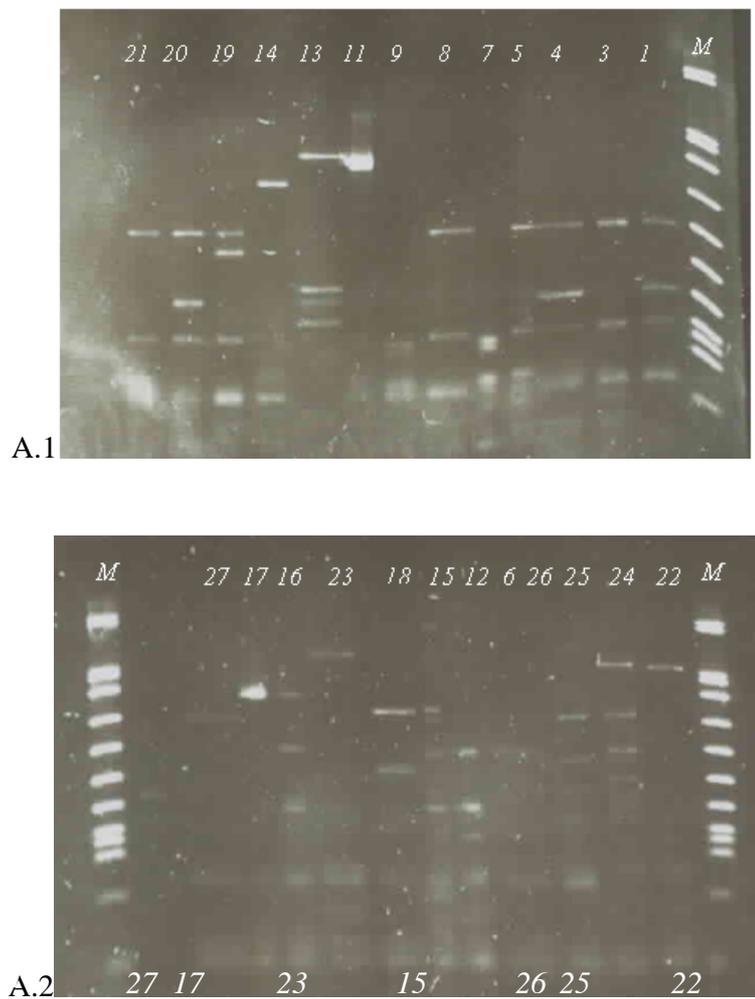


Figura 5.2 - Fragmentos de restrição da região ITS-1 amplificada de *Pratylenchus brachyurus*. A.1 e A.2: *TaqI*; B.1 e B.2: *AluI* (*M*: marcador de peso molecular VIII, Roche; 1-27: ver Tabela 5.1 para identificação do número da população (Pb) correspondente)

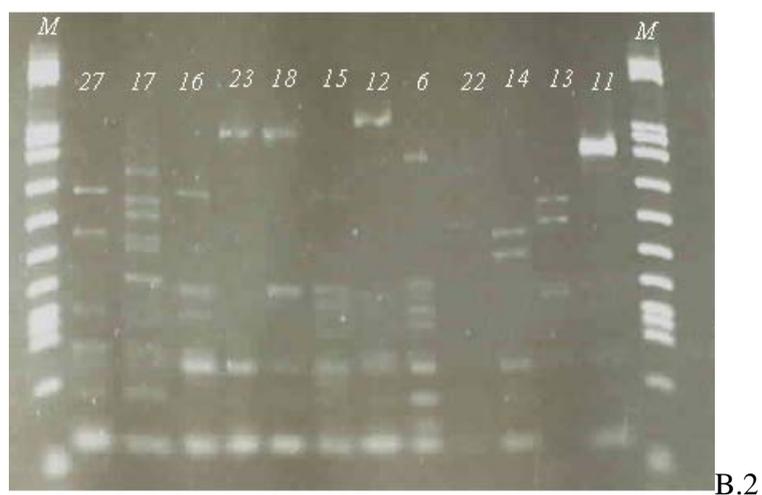
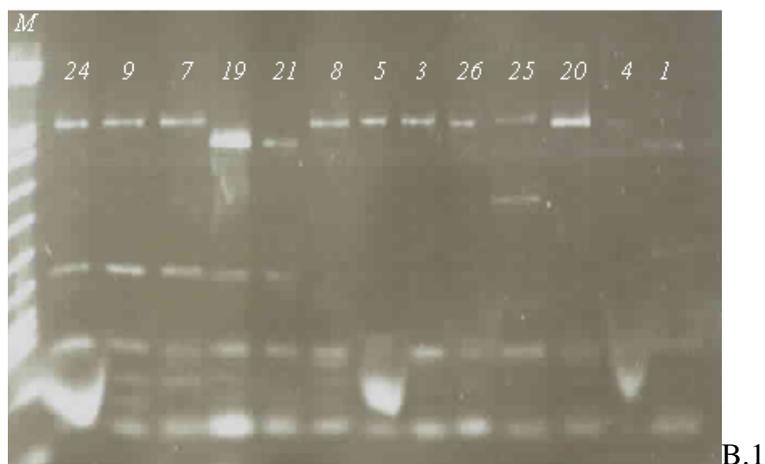


Figura 5.2 - Fragmentos de restrição da região ITS-1 amplificada de *Pratylenchus brachyurus*. A.1 e A.2: *TaqI*; B.1 e B.2: *AluI* (*M*: marcador de peso molecular VIII, Roche; 1-27: ver Tabela 5.1 para identificação do número da população (Pb) correspondente)

A partir dos padrões de bandas obtidos, foram selecionadas quatro populações de *P. brachyurus* para seqüenciamento do fragmento amplificado: Pb03, Pb07, Pb20 e Pb21, representativas de cada um dos três grupos “A”, “B” e “C”. O seqüenciamento dessas quatro populações foi feito com base no produto amplificado pelos *primers* universais BL18 (localizado na região 18S do rDNA) e 5818 (localizado na região 5.8S do rDNA) (Figura 5.3). Foram obtidas duas seqüências para cada uma das quatro populações, uma no sentido anverso e outra no sentido reverso. Após alinhamento das seqüências anversa e reversa para cada população, obteve-se uma seqüência consenso de aproximadamente 500 pb, correspondente à região ITS-1 (Figura 5.4).

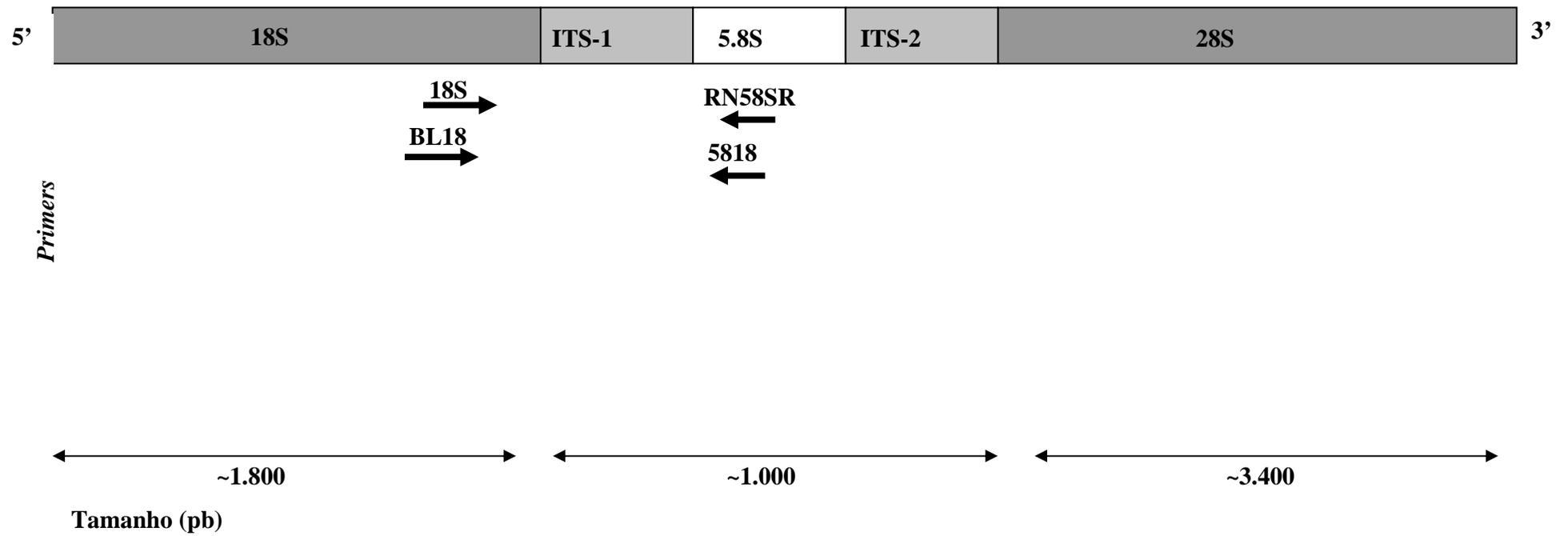


Figura 5.3 - Posição esquemática dos *primers* universais BL18, 5818, 18S e RN58SR, localizados nas regiões 18S e 5.8S do rDNA

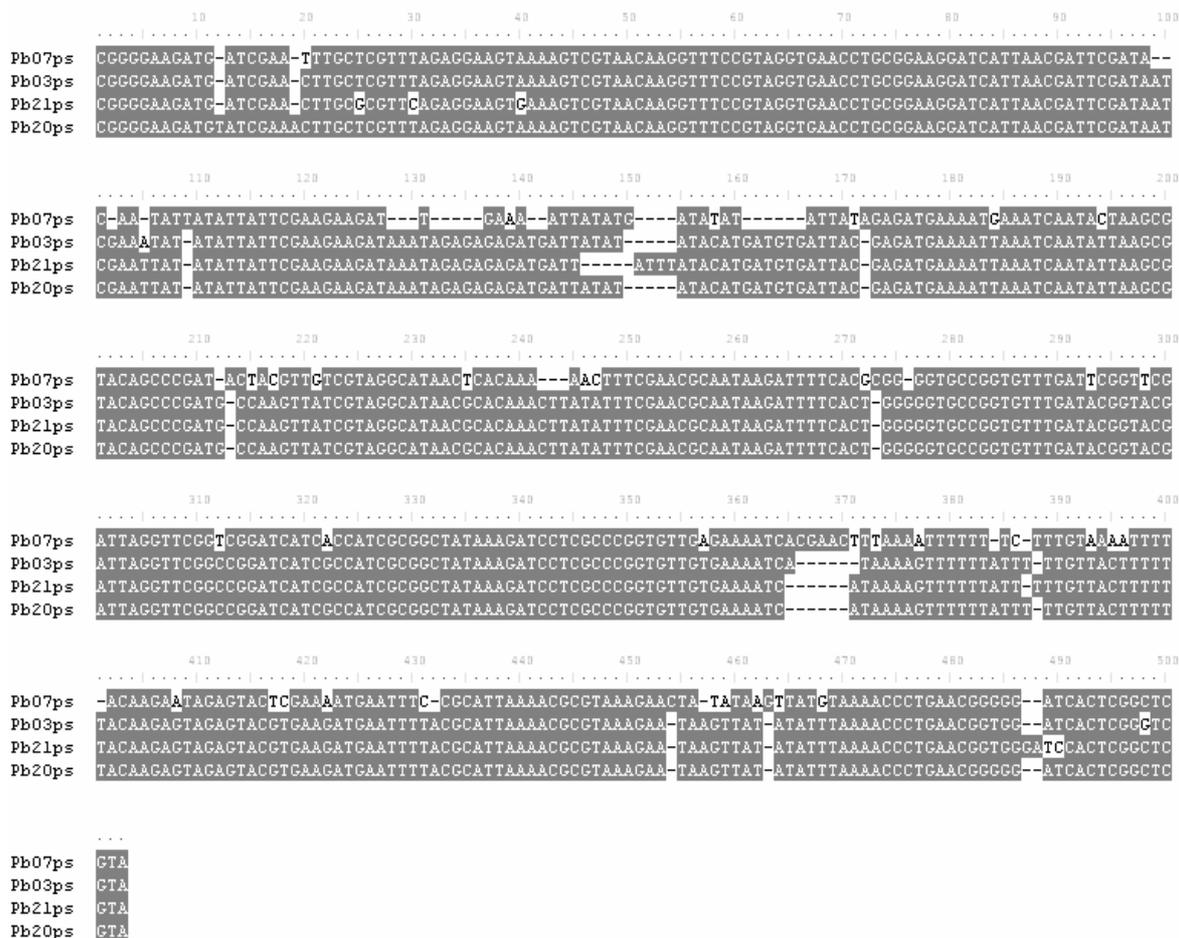


Figura 5.4 - Alinhamento das seqüências da região ITS-1 do rDNA das populações Pb03ps, Pb07ps, Pb20ps e Pb21ps de *Pratylenchus brachyurus*

O alinhamento das seqüências consenso das populações de *P. brachyurus* mostrou homologia dentro do grupo A (Pb03 e Pb20) de 99,7%, entre os grupos A e B (Pb21) de 98,9%, entre A e C (Pb07) de 84,6% e entre B e C de 84,0%. As seqüências desses grupos foram ainda comparadas com a seqüência de uma população de *P. brachyurus* do Japão (PbJp) (UEHARA; KUSHIDA; MOMOTA, 1999), sendo encontrada homologia de 53%. Como a homologia das seqüências obtidas no presente trabalho com a da população de *P. brachyurus* do Japão foi muito baixa, realizou-se novo seqüenciamento das populações. Entretanto, na realização do protocolo para seqüenciamento, verificou-se que os *primers* até então utilizados, BL18 e 5818, não mostraram a mesma eficiência para amplificar os fragmentos em análise, ou seja, não mais se conseguiu amplificação da região ITS-1 de nenhuma das populações estudadas, apesar de as

condições utilizadas para amplificação serem idênticas às anteriores. Em função disso, foram escolhidos novos *primers* universais, localizados em regiões genômicas próximas aos de BL18 e 5818 (Figura 5.3): 18S e RN58SR.

As seqüências correspondentes às populações Pb03, Pb07, Pb20 e Pb21, obtidas nessa primeira etapa, foram denominadas Pb03ps, Pb07ps, Pb20ps e Pb21ps, para diferenciação das seqüências das mesmas populações obtidas posteriormente.

Os *primers* 18S e RN58SR produziram um produto amplificado de cerca de 500 pb (Figura 5.5). Com base nesse produto amplificado, procedeu-se o protocolo para seqüenciamento de maneira semelhante. Além das populações já seqüenciadas anteriormente (Pb03, Pb07, Pb20 e Pb21), foram incluídas ainda as populações Pb08, Pb09, Pb17, Pb18, Pb19, Pb22, Pb23 e Pb24. Novamente, foram obtidas seqüências anversa e reversa para as populações Pb3, Pb7, Pb18, Pb20, Pb21, Pb23 e Pb24 e, após alinhamento, seqüências consenso. O resultado do seqüenciamento das populações Pb08, Pb09, Pb17, Pb19 e Pb22 foi negativo.



Figura 5.5 - Amplificação da região ITS-1 de algumas populações de *Pratylenchus brachyurus* pelos *primers* universais 18S e RN58SR

As seqüências consenso foram alinhadas entre si, resultando em homologia de 80,6% entre os grupos B (Pb21ps) e C (Pb07ps), 82,2% entre A (Pb03ps e Pb20ps) e C, 94,2% entre A e B; entretanto, as populações Pb23 e Pb24 produziram seqüências que, quando alinhadas com o grupo A, por exemplo, resultaram em homologia de 47,0% e 46,4%, respectivamente, mas que, quando

alinhas com a população do Japão (PbJp), resultaram em homologia de 91,9% e 90,8%, respectivamente. Os resultados foram, então, confrontados com seqüências do banco de dados disponível on line (GenBank) e, curiosamente, foi encontrada baixa identidade entre as seqüências de Pb03ps, Pb07ps, Pb20ps e Pb21ps com seqüências de outros nematóides. Diferentemente, as populações Pb23 e Pb24 alinharam-se com significativa homologia com seqüências de outras espécies de nematóides, inclusive *Pratylenchus*.

A partir das seqüências obtidas para as populações Pb23 e Pb24, alinhadas com a população do Japão (PbJp), foram desenvolvidos quatro *primers* (Figura 5.6), objetivando-se, além do desenvolvimento de um *primer* específico para *P. brachyurus*, a opção de *primers* que amplificassem a região ITS-1 do rDNA de *Pratylenchus* spp. Portanto, foram selecionados os *primers* ACM1R (5' – GGCTCATTAAGTCTTAAACC – 3') e ACM2R (5' – CCTCATCACAACCACGGAC – 3'), no sentido reverso, e ACM3F (5' – GATGTTGTGAACGGCTAACG – 3') e ACM4F (5' – TGGCACACGCAACTCGTTG – 3'), no sentido anverso (Figuras 5.6 e 5.7).

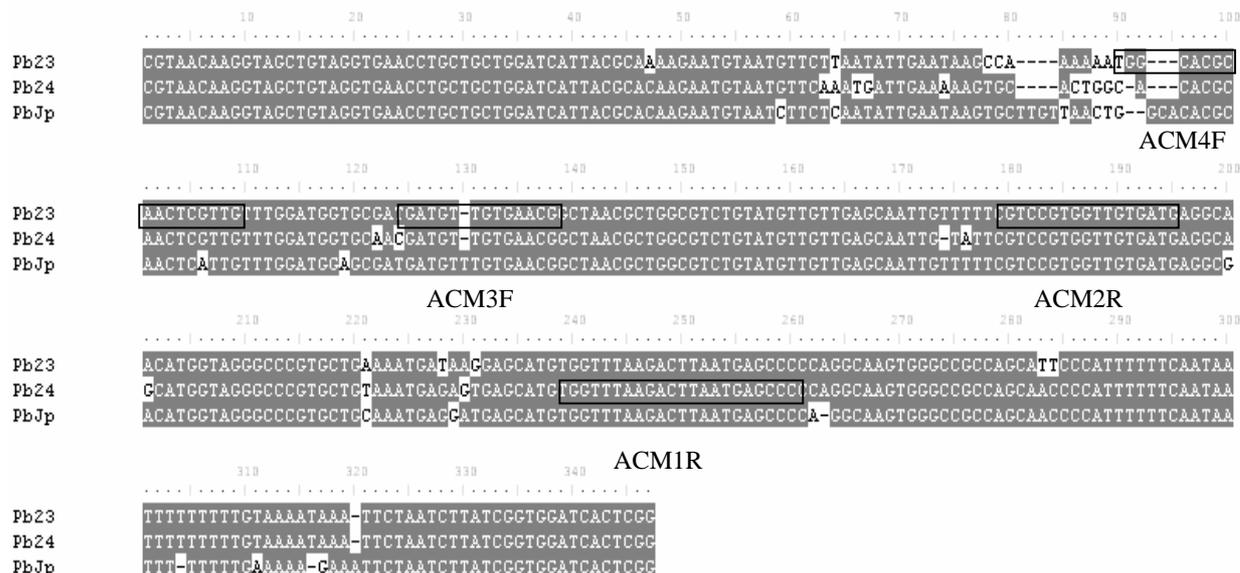


Figura 5.6 - Alinhamento das seqüências de Pb23 e Pb24 com uma população do Japão, mostrando as regiões onde foram desenhados os *primers* ACM1R, ACM2R, ACM3F e ACM4F

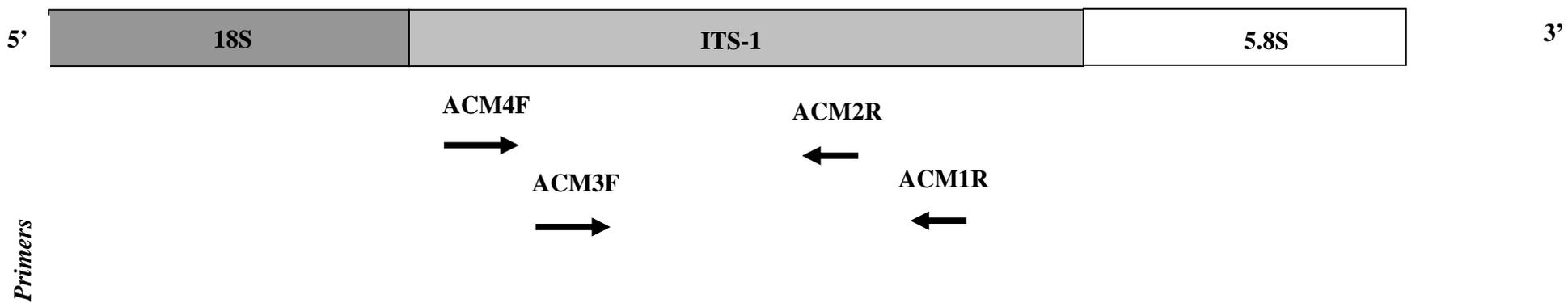


Figura 5.7 - Posição esquemática dos *primers* ACM1R, ACM2R, ACM3F e ACM4F, localizados na região ITS-1 do rDNA

Novo seqüenciamento foi realizado, utilizando-se os *primers* ACM2R e RN58SR. A escolha do *primer* ACM2R foi feita com o objetivo de selecionar somente a região ITS-1 de *P. brachyurus*, em detrimento das seqüências obtidas inicialmente, que provavelmente não correspondiam a essa região. As populações que foram seqüenciadas dessa vez foram: Pb03, Pb07, Pb17, Pb19, Pb20, Pb21, Pb22, Pb27, Pb29 e Pb30. Analisando-se o eletroferograma gerado para a grande maioria das populações, verificou-se que, aproximadamente até a base 200, que corresponde ao final (3') da região 18S, o seqüenciamento gerou apenas uma seqüência, clara e definida. A partir desse ponto, o que corresponde à região ITS-1, três a quatro seqüências misturam-se, não sendo possível a definição de uma que seja consenso para *P. brachyurus*, como exemplificado para a população Pb30 na Figura 5.8, evidenciando heterogeneidade genética dentro do mesmo indivíduo.

Por outro lado, o seqüenciamento da população Pb03 gerou uma seqüência completa, sem mistura, que foi utilizada, juntamente com as seqüências de Pb23 e Pb24, para estudo da filogenia da região ITS-1.



Model 377 File: Pb30-F.dat  
ABI100 BIF  
Version 3.2 Pb30-F  
Lane 2

Signal G:249 A:326 T:321 C:307 Page 1 of 2  
DT {BD Set Any-Primer} 8/27/1956  
BD Matrix -E- 22/06/01 Spacing: 10,27000045776:  
Points 953 to 8262

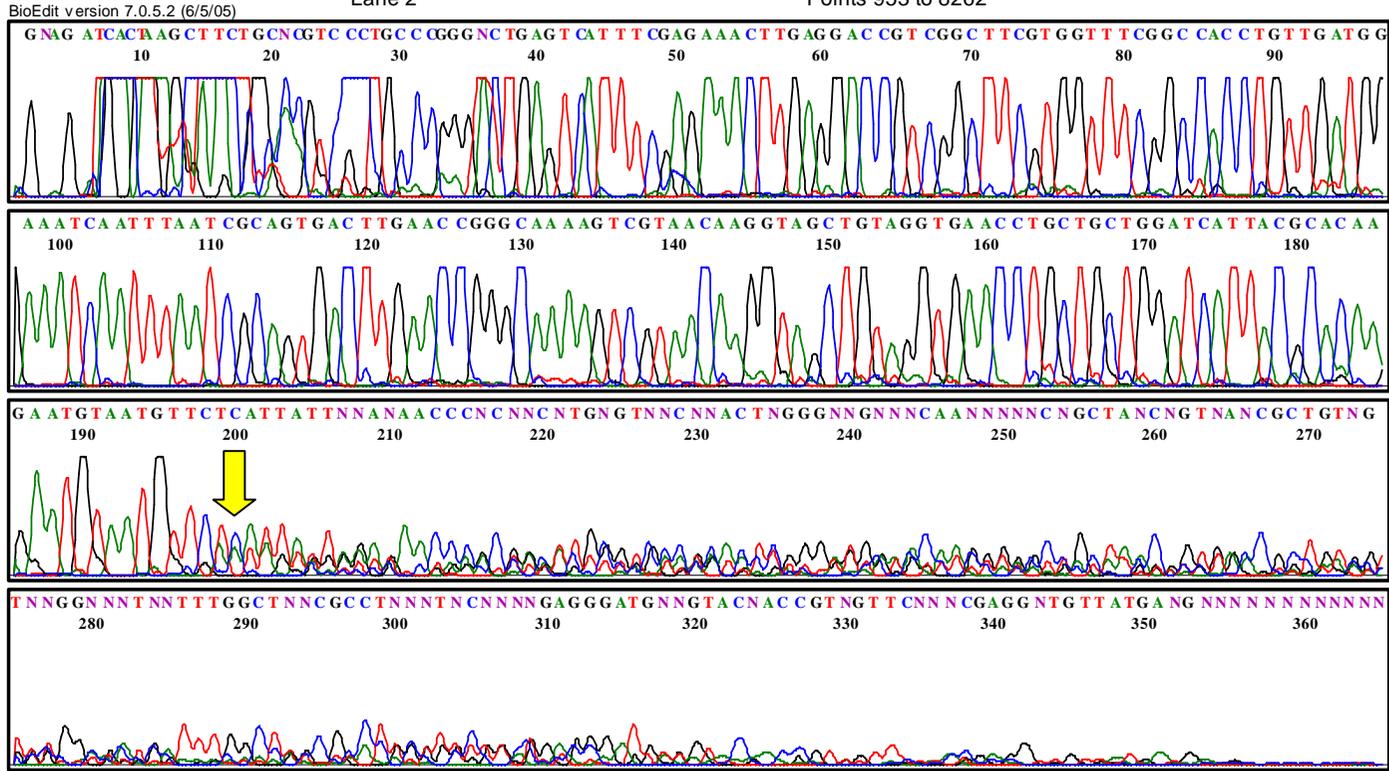


Figura 5.8 - Exemplo de eletroferograma obtido para a população Pb30, mostrando a mistura de seqüências a partir da base 200

Eliminando-se parte das seqüências que apresentavam-se misturadas, foram obtidas seqüências de cerca de 200 pb, correspondentes à parte final (3') da região 18S para as populações Pb03, Pb07, Pb17, Pb20, Pb21, Pb23, Pb24, Pb27, Pb29 e Pb30, que foram utilizadas para estudo da filogenia da região 18S, após alinhamento com outras espécies de *Pratylenchus*, outras populações de *P. brachyurus* (PbJp e PbUSA GenBank acesso número GI30844180/ AY279545) e com as seqüências obtidas inicialmente para as populações Pb03ps, Pb07ps, Pb20ps e Pb21ps (Figura 5.9). *R. similis* (GenBank acesso número GI90968508/ AJ966502.1) foi utilizado como *outgroup*. A tabela 5.4 mostra os valores das identidades entre as seqüências correspondentes à parte final da região 18S das diferentes espécies analisadas.

A árvore filogenética (*maximum likelihood*) (Figura 5.10) indicou que todas as populações de *P. brachyurus* e as demais espécies de *Pratylenchus* foram separadas em grupos distintos, confirmando o status taxonômico das populações estudadas no presente trabalho. Três grupos filogenéticos distintos puderam ser evidenciados, representados por: i) populações de *P. brachyurus* (Pb03, Pb07, Pb17, Pb20, Pb21, Pb23, Pb24, Pb27, Pb29, Pb30, PbJp e PbUSA); ii) populações de *P. vulnus*; e iii) populações de *P. brachyurus* (Pb03ps, Pb20ps e Pb21ps). *P. zae* e *P. coffeae* ficaram próximos filogeneticamente das outras espécies de *Pratylenchus*, mas não formaram grupos distintos. As populações Pb03ps, Pb20ps e Pb21ps foram separadas completamente das demais populações de *P. brachyurus*, indicando que existe grande diferença entre as seqüências desses dois grupos.

Tabela 5.4 – Matriz de identidade (%) calculada pelo programa MatGat – Matrix Global Alignment Tool - entre *Pratylenchus* spp. e *Radopholus similis* baseada nas seqüências da região 18S do rDNA

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
<b>1.PvIaJ</b>	99,3	97,9	88,8	87,4	88,8	88,8	88,8	88,8	88,1	87,4	88,1	88,1	88,8	87,4	90,2	92,3	90,9	76,4	53,8	55,5	49	
<b>2.PvIbJ</b>	-	98,6	89,5	88,1	89,5	89,5	89,5	89,5	88,8	88,1	88,8	88,8	89,5	88,1	90,9	93	91,6	77,1	56,8	56,2	49	
<b>3.PvSJp</b>	-	-	90,2	88,8	90,2	90,2	90,2	90,2	89,5	88,8	89,5	89,5	90,2	88,8	90,9	94,4	93	76,2	58,2	57,5	49,7	
<b>4.Pb30</b>	-	-	-	98,6	100	100	100	100	99,3	98,6	99,3	98,6	99,3	98,6	94,4	90,2	87,4	71,3	56,8	55,5	53,4	
<b>5.PbUSA</b>	-	-	-	-	98,6	98,6	98,6	98,6	97,9	97,2	97,9	97,2	97,9	97,2	93	88,8	86	71,3	57,5	56,2	54,1	
<b>6.Pb29</b>	-	-	-	-	-	100	100	100	99,3	98,6	99,3	98,6	99,3	98,6	94,4	90,2	87,4	71,3	56,8	55,5	53,4	
<b>7.Pb21</b>	-	-	-	-	-	-	100	100	99,3	98,6	99,3	98,6	99,3	98,6	94,4	90,2	87,4	71,3	56,8	55,5	53,4	
<b>8.Pb17</b>	-	-	-	-	-	-	-	100	99,3	98,6	99,3	98,6	99,3	98,6	94,4	90,2	87,4	71,3	56,8	55,5	53,4	
<b>9.Pb07</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	99,3	98,6	99,3	98,6	99,3	98,6	94,4	90,2	87,4	71,3	56,8	55,5	53,4	
<b>10.Pb22</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	97,9	98,6	97,9	98,6	97,9	93,7	89,5	86,7	70,6	56,2	55,5	53,4	
<b>11.Pb20</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	97,9	97,2	97,9	97,2	93	88,8	86	70,6	56,2	55,5	52,7	
<b>12.Pb27</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	97,9	98,6	97,9	93,7	90,2	88,1	71,3	56,8	55,5	53,4	
<b>13.Pb23</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99,3	97,2	93,7	89,5	86,7	70,6	58,1	56,8	54,1	
<b>14.Pb24</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	97,9	94,4	90,2	87,4	71,3	56,8	55,5	53,4	
<b>15.Pb03</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	93	88,8	86	71,3	56,8	55,5	53,4	
<b>16.PbJp</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88,1	88,1	70,6	56,9	55,9	52,4	
<b>17.PcJp</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	91,6	76,9	53,1	52,4	48,3	
<b>18PzJp</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	76,9	56,9	56,6	50,3	
<b>19.Rs</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53,8	52,4	52,4	
<b>20Pb03ps</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	95,8	79
<b>21Pb20ps</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	78,3
<b>22Pb21ps</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

PvIa, PvIb e PvS= *P. vulnus* Japão; Pc= *P. coffeae* Japão; PbJ= *P. brachyurus* Japão; Pz= *P. zeae* Japão; PbUSA= *P. brachyurus* Estados Unidos; Rs= *Radopholus similis* outgroup.

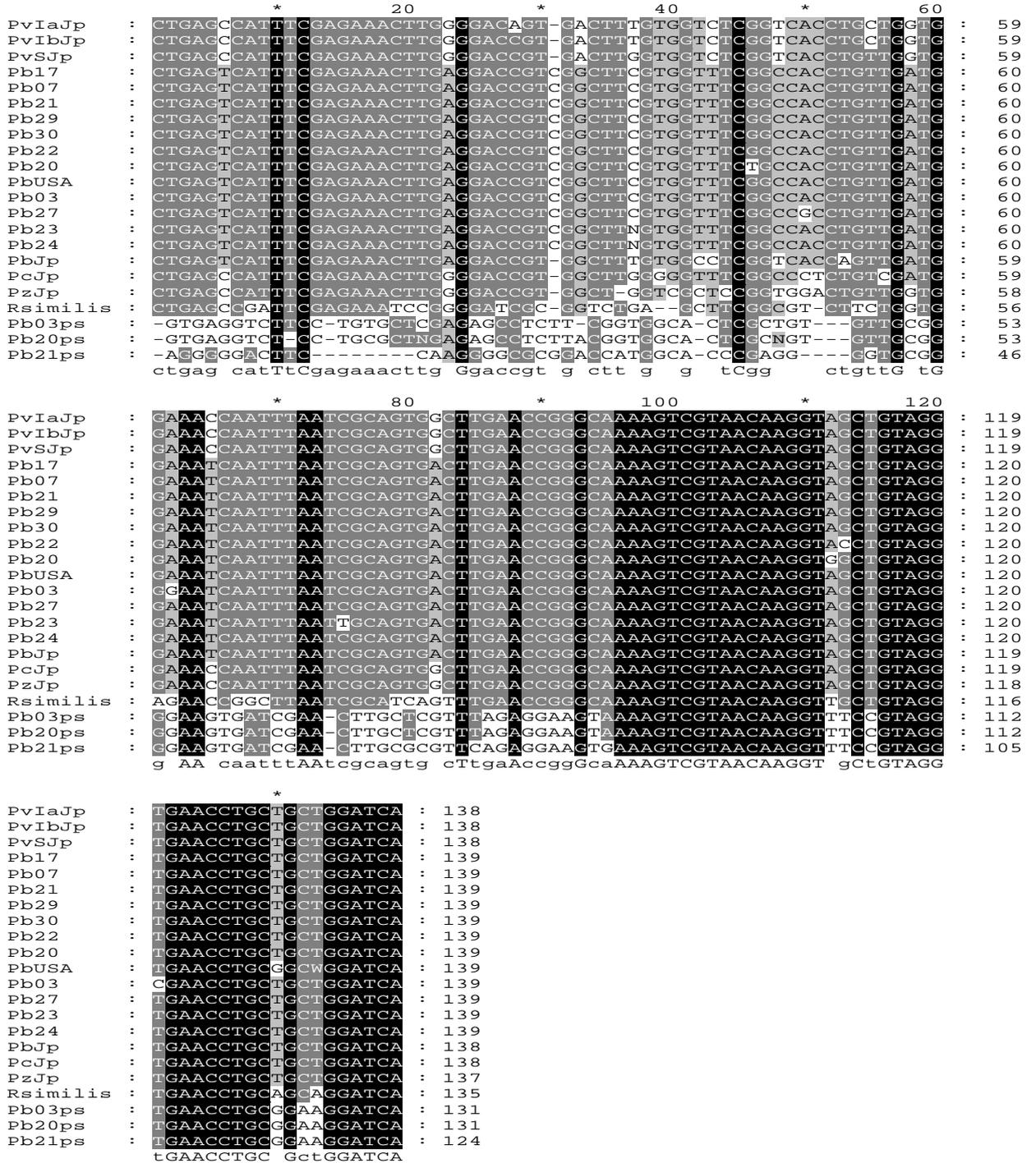


Figura 5.9 - Alinhamento correspondente à região 18S das populações de *Pratylenchus brachyurus* e outras espécies de *Pratylenchus*. (Pv = *P. vulnus* Japão; Pc= *P. coffeae* Japão; Pz = *P. zaeae* Japão; Pb = *P. brachyurus* Japão; Rsimilis = *Radopholus similis* = outgroup; ps = pseudogene) utilizado para a construção da árvore filogenética (*maximum likelihood*) (Figura 5.10). Traços indicam *gaps*

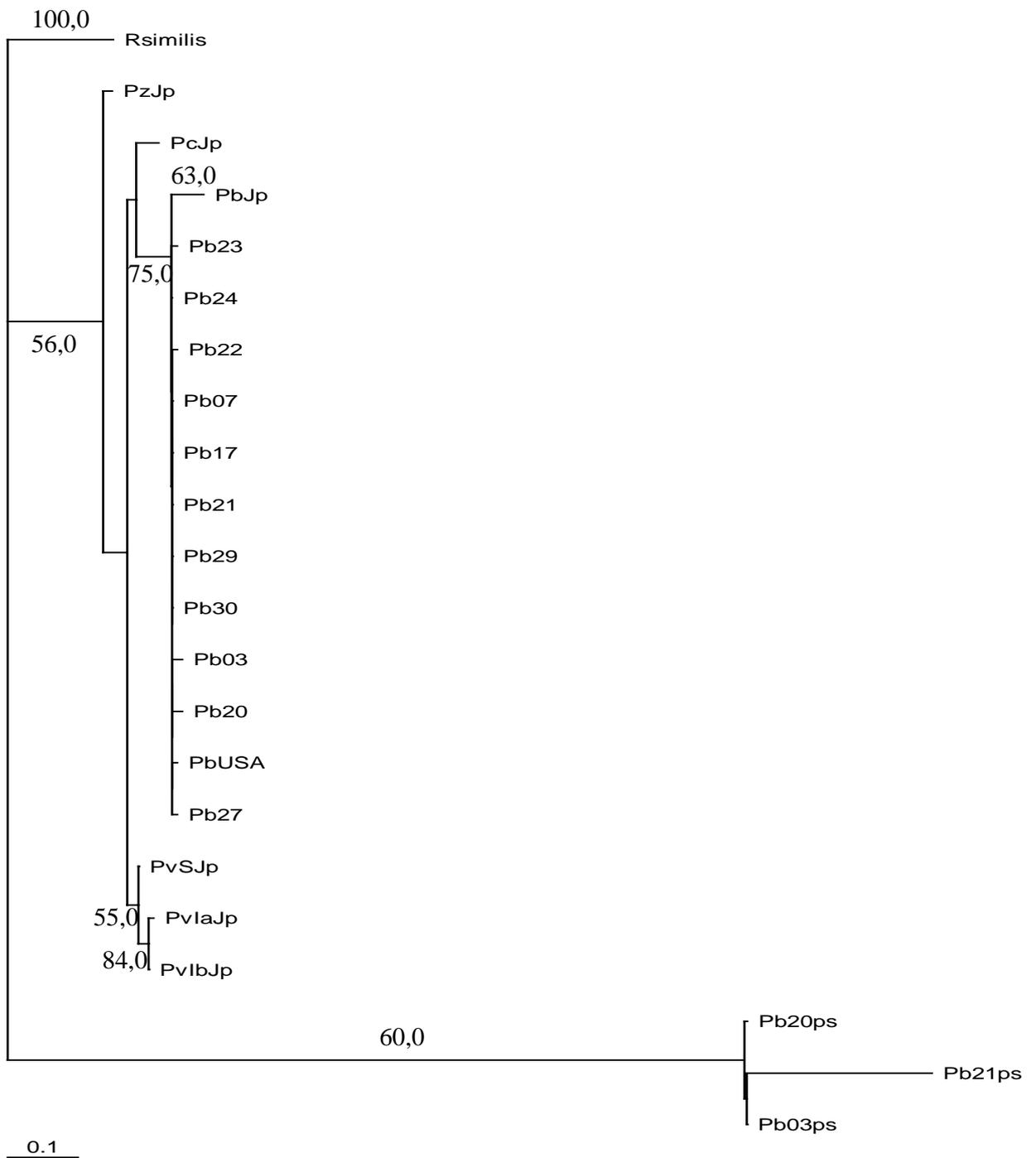


Figura 5.10 - Árvore filogenética (*maximum likelihood*) mostrando as relações entre as populações de *Pratylenchus brachyurus* e outras espécies de *Pratylenchus*, baseada nas seqüências da região 18S. A árvore foi construída utilizando-se DNAML. Os números indicam os valores de *bootstrap* maiores que 50,0

As seqüências das populações Pb03ps, Pb20ps e Pb21ps foram omitidas das análises filogenéticas da região ITS-1, por causa da alta variabilidade genética demonstrada, o que poderia comprometer os resultados. Portanto, a região correspondente à ITS-1 das seqüências das populações Pb03, Pb23 e Pb24, foram utilizadas para análise filogenética da região ITS-1, após alinhamento com a população do Japão e outras espécies de *Pratylenchus* obtidas da literatura (Figura 5.11). A partir desse alinhamento, obtiveram-se os valores correspondentes à identidade entre as seqüências (Tabela 5.5), e uma árvore filogenética foi construída para visualização dos resultados (Figura 5.12). A homologia entre as seqüências das populações de *P. brachyurus* variou de 85,3% (Pb03 x Pb23) a 98% (Pb03 x PbJp). A árvore filogenética da região ITS-1 indicou que existe variabilidade genética em *P. brachyurus*, uma vez que as populações não formaram um grupo único, apesar de estarem bastante próximas filogeneticamente, o que pode ser também visualizado em alinhamento utilizando-se somente as populações de *P. brachyurus* (Figura 5.13). Situação semelhante foi evidenciada para as três populações de *P. vulnus* incluídas na análise. *P. coffeae* foi a espécie utilizada como *outgroup* nessa análise, devido à alta variabilidade demonstrada em relação a *Pratylenchus* spp.

Tabela 5.5 – Matriz de identidade (%) calculada pelo programa MatGat – Matrix Global Alignment Tool - entre *Pratylenchus* spp. baseada nas seqüências da região ITS-1 do rDNA

	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>1.Pb03</b>	98,0	86,7	85,3	61,2	65,4	59,3	61,8	33,5
<b>2.PbJp</b>	-	88,7	87,3	62,5	66,0	60,7	64,3	33,5
<b>3.Pb24</b>	-	-	86,0	67,1	61,2	59,7	61,8	32,9
<b>4.Pb23</b>	-	-	-	62,5	66,9	60,8	63,3	31,8
<b>5.PzJp</b>	-	-	-	-	58,6	58,4	58,4	39,5
<b>6.PvIaJp</b>	-	-	-	-	-	92,0	87,3	36,7
<b>7.PvIbJp</b>	-	-	-	-	-	-	92,0	38,7
<b>8.PvSJp</b>	-	-	-	-	-	-	-	36,0
<b>9.PcJp</b>	-	-	-	-	-	-	-	-

PvIa, PvIb e PvS= *P. vulnus* Japão; Pc= *P. coffeae* Japão; PbJ= *P. brachyurus* Japão; Pz= *P. zae* Japão

```

*           20           *           40           *           60
PvIa : TCAACCAAAATAATGGTCAAATACGAAACTTGGATACTCATTAAAGAGAGAGCCCGCATATTTAC : 64
PvIb : TCAACCAAAATAATGGTCAAATACGAAACATGAAAACTCATTGAAG----AGCCCGTATATCCAC : 60
PvS  : TCAACCAAAATAATGGTCAAATACGAAACGTGAAAACTTGTTGAA----GAGCCCGCACCACCAC : 60
Pz   : GCGA-ACCGTGTCTGGTCAATTATGCAGAACGG---CTTGTGTTGAAA--CAAGCGCGCTTCCAAAG : 58
Pb03 : ACAAGAATGTAATGTTCTAATATTGAATAGGTGCTGTTATGGCACACGCAACTCATTGTTTGGGA : 64
Pb   : ACAAGAATGTAATGTTCTAATATTGAATAAGTGTGCTGTTATGGCACACGCAACTCATTGTTTGGGA : 64
Pb24 : ACAAGAATGTAATGTTCAATGATTGAAAAAGTGC-----TGGCACACGCAACTCGTTGTTTGGGA : 59
Pb23 : AAAAGAATGTAATGTTCTAATATTGAATAAGC----CAAATGGCACGCAACTCGTTGTTTGGGA : 60
Pc   : TT-----GACGATGGTCAACCTTGTTCCTCGACAATTCATTGCTT-----CTTCATGATTGA : 53
      caa a taaTG TC A ta aa G t t g a a C cg

*           80           *           100          *           120
PvIa : TTGATAGTGGTGAATGCGAACGGCTAACGTTGGCGTCTCTATGTTGCTGAGCAGTTTGCTTTCGT : 128
PvIb : TTGATAGTGGTGAATGCGAACGGCTAACGTTGGCGTCTCTATGTTGCTGAGCAGTTTGCTGTCGT : 124
PvS  : TTGATGGTGGTAAATGCGAACGGCTAACGTTGGCGTCTCTATGTTGCTGAGCAGTTTGCTGTCGT : 124
Pz   : CAGCCTGGAA-----GTGAACGGCTAACGCTGGTGTCTGTGTGTCCCTGAGCAGATGTCTTCGT : 117
Pb03 : TGGAGCGATGATGTTGTGACGGCTAACGCTGGCGTCTGNTGTTGTTGAGCAATTGTTTTCGT : 128
Pb   : TGGAGCGATGATGTTGTGACGGCTAACGCTGGCGTCTGATGTTGTTGAGCAATTGTTTTCGT : 128
Pb24 : TGGTGCAACGATGTTGTGACGGCTAACGCTGGCGTCTGATGTTGTTGAGCAATTGTTTTCGT : 123
Pb23 : TGGTGCAACGATGTTGTGACGGCTAACGCTGGCGTCTGATGTTGTTGAGCAATTGTTTTCGT : 124
Pc   : GCAATAAAAGAA-----CCGTGAATTCAAATCCCTTGGCATAAAT : 91
      t g g g tg gaacggctaacg tggcgctct taTGttg tgAgca tTGT TcgT

*           140
PvIa : CCGTGGCTGCAATGAGG : 145
PvIb : CCGTGGCTGCAATGAGG : 141
PvS  : CCGTGGCTGCAATGAGG : 141
Pz   : CCGTGGTTGTGATGAGG : 134
Pb03 : CCGTGGTTGTGATGAGG : 145
Pb   : CCGTGGTTGTGATGAGG : 145
Pb24 : CCGTGGTTGTGATGAGG : 140
Pb23 : CCGTGGTTGTGATGAGG : 141
Pc   : GACTGAATGCCCTGAGG : 108
      ccgTGg TG aTGAGG

```

Figura 5.11 - Alinhamento correspondente à região ITS-1 das populações de *Pratylenchus brachyurus* e outras espécies de *Pratylenchus*. (Pv = *P. vulnus* Japão; Pc= *P. coffeae* Japão; Pz = *P. zeae* Japão; Pb = *P. brachyurus* Japão), utilizado para construção da árvore filogenética (*maximum likelihood*) (Figura 5.12). Traços indicam gaps

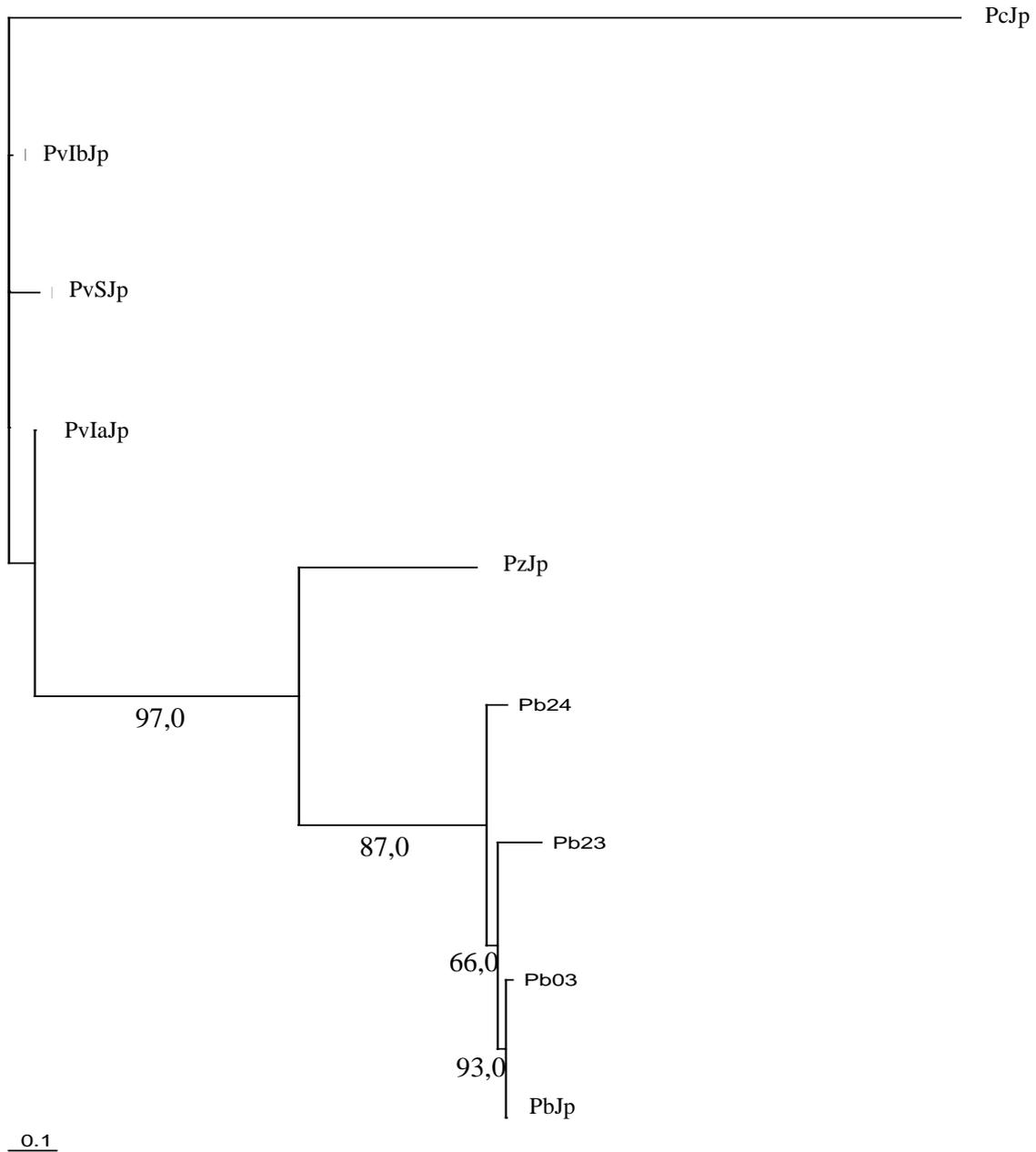


Figura 5.12 - Árvore filogenética (*maximum likelihood*) mostrando as relações entre as populações de *Pratylenchus brachyurus* e outras espécies de *Pratylenchus*, baseada nas seqüências da região ITS-1. A árvore foi construída utilizando-se DNAML. Os números indicam os valores de *bootstrap* maiores que 50,0

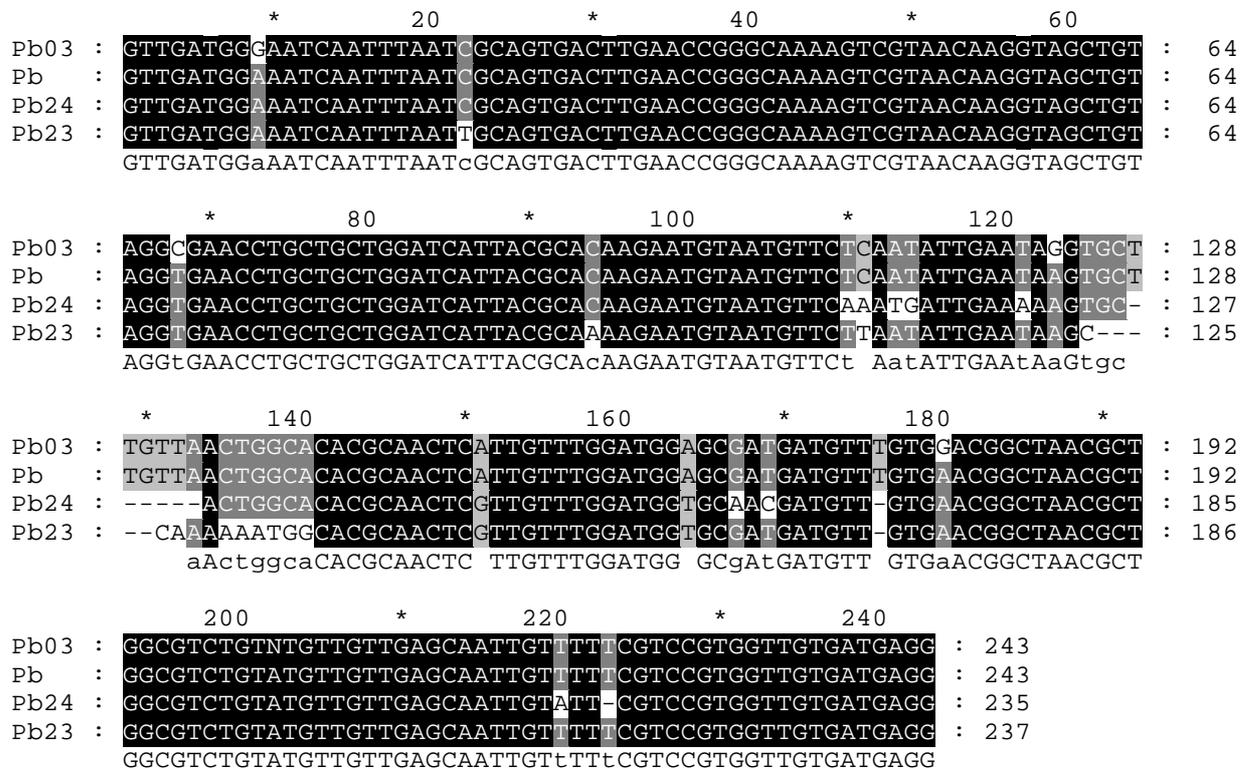


Figura 5.13 – Alinhamento correspondente à região ITS-1 de *P. brachyurus*, evidenciando a variabilidade genética existente as diferentes populações (Pb = *P. brachyurus* do Japão). Traços indicam *gaps*

Em relação ao desenvolvimento de *primers* para *P. brachyurus*, inicialmente, com base apenas no alinhamento das seqüências de Pb23, Pb24 e da população do Japão com seqüências de outras espécies de *Pratylenchus*, por exemplo, *P. vulnus*, *P. coffeae* e *P. zae* (UEHARA; KUSHIDA; MOMOTA, 1999), descartou-se a possibilidade de especificidade para *P. brachyurus* dos *primers* ACM1R, ACM2R e ACM3F; entretanto, o *primer* AMC4F mostrou-se uma possível opção para tal objetivo, por não apresentar homologia com as seqüências de *Pratylenchus* spp. Vale salientar que os três *primers* que foram descartados como específicos de *P. brachyurus*, foram capazes de amplificar a região ITS-1 de várias populações de *P. brachyurus* estudadas no presente trabalho (dados não mostrados).

Uma vez escolhido como candidato a *primer* específico, ACM4F passou pelos critérios de validação propostos por Hübschen et al. (2004a). Dessa forma, ACM4F foi testado contra as 30 populações de *P. brachyurus* (Tabela 5.1), amplificando uma região de tamanho aproximado de 500 pb (dados não mostrados) para todas as populações. Após essa seleção inicial, o *primer*

ACM4F foi testado contra outras espécies de *Pratylenchus*: *P. coffeae* M2, *P. jaehni*, *P. zaeae*, e *P. penetrans*, além de outras duas espécies, *Radopholus similis* e *Rotylenchulus reniformis* (Tabela 5.3). Entretanto, houve amplificação do DNA de *P. jaehni*, *P. zaeae* e *R. reniformis*, mesmo após ajustes no protocolo da reação de PCR, sendo, portanto, o *primer* ACM4F descartado como específico para *P. brachyurus*.

#### 5.2.4 Discussão

As análises de RFLP da região ITS-1 do rDNA revelaram variabilidade genética entre as diferentes populações de *P. brachyurus* estudadas no presente trabalho, uma vez que foram observados mais de três padrões de bandas entre as populações. Esse resultado confirma observações prévias a respeito da variação em termos de agressividade apresentada por algumas dessas populações em cultivares de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) e feijão de corda (*Vigna unguiculata* L.) (MACHADO et al., 2006; SIQUEIRA; INOMOTO, 2006).

Payan e Dickson (1990) já haviam evidenciado a possível variabilidade genética existente em *P. brachyurus*, uma vez que observaram grupos fenotípicos dentro dessa espécie, através da análise dos perfis enzimáticos obtidos por eletroforese para cinco populações oriundas de diferentes regiões dos Estados Unidos. Três grupos fenotípicos distintos foram obtidos para as populações nos casos das análises baseadas em malato desidrogenase (MDH) e fosfoglucomutase (PGM), mas apenas um a partir de fosfoglucoase isomerase (PGI), indicando a existência de variabilidade genética em *P. brachyurus*, de acordo com os resultados ora observados.

Variabilidade intraespecífica também já foi relatada para outros gêneros e espécies, como *Meloidogyne* (HIATT et al., 1995; ZIJLSTRA et al., 1995), *Heterodera* (SUBBOTIN et al., 1999), *Belonolaimus* (CHERRY et al., 1997), *Xiphidorus* (OLIVEIRA et al., 2004), *Nacobbus aberrans* (REID; MANZANILLA-LÓPEZ; HUNT, 2003), *Radopholus similis* (ELBADRI et al., 2002) e outras espécies de *Pratylenchus*, particularmente para *P. coffeae* (ORUI, 1996; UEHARA et al., 1998; DUNCAN et al., 1999; WAEYENBERGE et al., 2000); *P. penetrans* e *P. neglectus* (DE LUCA et al.; 2004) e *P. vulnus* (PINOCHET et al., 1994).

Duncan et al. (1999) realizaram estudos morfométricos e moleculares, através de RAPD, visando caracterizar as espécies de nematóides das lesões que ocorrem em citrus na Flórida e populações de *P. coffeae* de várias localidades, inclusive algumas brasileiras [C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>7</sub> (citrus), M<sub>1</sub> (*Colocasia esculenta* Schott), M<sub>2</sub> (*Aglaonema*) e K<sub>5</sub> (cafeeiro)]. Os resultados mostraram que

as 33 populações avaliadas puderam ser separadas em pelo menos sete grupos distintos morfológica e/ou molecularmente. O seqüenciamento da região D2/D3 de algumas populações brasileiras produziu seqüências distintas das demais populações estudadas; os autores sugeriram que as populações brasileiras, devido ao fato de serem morfológica e molecularmente distintas das outras populações tidas como *P. coffeae* de outras localidades, muito provavelmente são espécies não descritas ou complexos de espécies. Oliveira et al. (2006), estudando populações de *Xiphinema krugi* através de PCR-RFLP, considerado nos últimos 50 anos, por muitos taxonomistas, como uma espécie que exibe considerável variação morfológica e morfológica (FREDERICK; TARJAN, 1974; LAMBERTI; TARJAN, 1974; LUC; HUNT, 1978; FERRAZ, 1980), demonstraram a possibilidade que, de fato, *X. krugi* comporta quatro diferentes genótipos que apresentam uma base morfológica muito semelhante, embora definidos por diferenças morfológicas mínimas. Reid, Manzanilla-Lopez e Hunt (2003) estudaram 12 populações de *N. aberrans* e afirmaram tratar-se de um complexo de espécies, com três grupos distintos, revelados por PCR-RFLP da região ITS. De forma semelhante, Elbadri et al. (2002), através de análises de RFLP da região ITS de 19 populações de *R. similis*, encontraram significativa variabilidade tanto entre as populações, quanto dentro de indivíduos, sugerindo a existência de microheterogeneidade nas cópias da região ITS do mesmo indivíduo.

Essas duas técnicas, RAPD e RFLP, além disso, têm sido muito utilizadas na diagnose de fitonematóides, uma vez que, para muitas espécies, é possível a caracterização da espécie baseada nos padrões de bandas obtidos. Orui (1996) foi o primeiro a demonstrar que os padrões de RFLP das regiões ITS do rDNA poderiam ter valor prático na identificação de espécies de *Pratylenchus*, como *P. penetrans*, *P. coffeae* e *P. vulnus*. Posteriormente, Waeyenberge et al. (2000) conseguiram diagnosticar 18 espécies de *Pratylenchus* com base nos padrões de bandas de RFLP da região ITS, afirmando que essa técnica é uma importante ferramenta para diagnose de espécies de *Pratylenchus* e outros gêneros de nematóides. Entretanto, esse estudo deve ser considerado preliminar, uma vez que 10 espécies foram analisadas com base num único indivíduo, o que poderia ocultar a possibilidade de existência de variabilidade genética entre populações da mesma espécie. Entretanto, com base nos presentes resultados, vale ressaltar que, uma vez que exista variação genética entre diferentes populações da espécie em questão, como observado para *P. brachyurus*, o uso de técnicas como RFLP e RAPD para diagnose pode levar a resultados dúbios, pela não repetição dos resultados.

Uma opção seria o uso de *primers* específicos, que permitiriam a identificação rápida e segura da espécie. Nesse sentido, não foi possível o desenvolvimento de um *primer* específico para *P. brachyurus*, apesar de quatro *primers* terem sido desenhados. Al-Banna et al. (2004) desenvolveram *primers* específicos para cinco espécies de *Pratylenchus*, mas um *primer* específico para *P. brachyurus* não foi obtido, devido à pequena variação na seqüência da região D3 observada pelos autores.

Outra característica importante que pôde ser observada no seqüenciamento das populações estudadas no presente trabalho foi a mistura de seqüências na região ITS-1, exemplificada pelo eletroferograma da população Pb30 (Figura 5.8). Esse resultado sugere a existência de heterogeneidade nas cópias da região ITS dentro de indivíduos da mesma espécie, um fenômeno documentado para outros fitonematóides, como *M. hapla* e *R. similis* (ZIJLSTRA et al., 1995; ELBADRI et al., 2002). Além disso, o alinhamento das populações Pb03, Pb23 e Pb24 com a população do Japão mostrou que, embora a região ITS-1 do rDNA de algumas dessas populações seja bastante semelhante, (por exemplo, Pb03 x PbJp), existe variabilidade significativa entre as seqüências das populações Pb03 e Pb24 ou Pb23 e Pb24.

A análise filogenética realizada com as seqüências obtidas da parte final (3') da região 18S, uma região que, diferentemente da ITS, é conservada, mostrou que, apesar de serem baseadas em apenas cerca de 160 pb, existe grande homologia entre as diferentes populações de *P. brachyurus* utilizadas no presente trabalho com outras duas populações, uma do Japão (PbJp) e outra dos Estados Unidos (PbUSA), confirmando que as seqüências obtidas para essas populações são de *P. brachyurus*. As populações Pb03ps, Pb20ps e Pb21ps formaram um grupo separado de todas as outras populações de *P. brachyurus* e das outras espécies de *Pratylenchus*, sendo esse grupo mais distante geneticamente de *Pratylenchus* spp. do que *R. similis*, incluído como *outgroup* (Figura 5.9). Os mesmos indivíduos (Pb03, Pb20 e Pb21), seqüenciados pela segunda vez, foram incluídos em grupo distinto, junto com as outras duas populações de *P. brachyurus* da literatura, evidenciando que as seqüências obtidas previamente para essas populações constituem um variante dentro do genoma da espécie, sugerindo a provável existência de pseudogenes dentro de *P. brachyurus*, que deverão ser melhor investigados em trabalhos futuros. A existência de pseudogenes tem sido relatada para *Caenorhabditis elegans* (MOUNSEY; BAUER; HOPE, 2002; HARRISON; ECHOLS; GERSTEIN, 2001) e outras espécies de eucariotos e procariotos

(KELLOGG; APPELS, 1995; MÁRQUEZ et al, 2003; SANTOS et al., 2003; RAZAFIMANDIMBISON; KELLOGG; BREMER, 2004).

Já a análise filogenética da região ITS-1 realizada com as populações de *P. brachyurus* e outras espécies de *Pratylenchus* (Figura 5.11), mostrou a formação de um grupo entre as populações Pb03, Pb23 e Pb24 com a população de *P. brachyurus* do Japão (PbJp); além disso, as outras espécies de *Pratylenchus* incluídas na análise formaram grupos separados deste. Vale ressaltar que, mesmo dentro dos grupos formados por populações de *P. brachyurus* ou de *P. vulnus*, foi verificada variabilidade genética na região ITS-1 (Figura 5.11). Trabalhos futuros obrigatoriamente deverão contemplar a clonagem da região ITS-1 de diferentes populações de *P. brachyurus*, visando o esclarecimento da variabilidade genética encontrada nessa espécie.

### 5.3 Conclusões

A partir das análises de RFLP e do seqüenciamento da região ITS-1 do rDNA de *P. brachyurus*, verificou-se que existe variabilidade genética dentro da espécie. Além disso, o seqüenciamento da parte final (3') da região 18S das populações estudadas evidenciou a existência de seqüências distintas dentro do genoma da espécie, sugerindo-se a probabilidade de ocorrência de pseudogenes.

A variabilidade genética evidenciada para as diferentes populações de *P. brachyurus* estudadas mostrou que técnicas biomoleculares, como o RFLP, devem ser utilizadas com cautela para fins de diagnose da espécie, pois essa característica pode levar a resultados falsos.

### Referências

AL-BANNA, L.; PLOEG, A.T.; WILLIAMSON, V.M.; KALOSHIAN, I. Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 36, n. 2, p. 142-146, 2004.

ÁLVAREZ, L.; WENDEL, J.F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 29, p. 417-434, 2003.

ANDRÉS, M.F.; PINOCHET, J.; HERNÁNDEZ-DORREGO, A.; DELIBES, A. Detection and analysis of inter- and intraspecific diversity of *Pratylenchus* spp. using isozyme markers. **Plant Pathology**, Oxford, v. 49, p. 640-649, 2000.

ARIAS, M.C.; INFANTE-MALACHIAS, M.E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: MATIOLI, S.R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. São Paulo: Nobel, 2001. p. 143-152.

BECKENBACH, K.; BLAXTER, M.L.; WEBSTER, J.M. Phylogeny of *Bursaphelenchus* species derived from analysis of ribosomal internal transcribed spacer DNA sequences. **Nematology**, Flórida, v. 1, p. 539-548, 1999.

BELLOCQ, J.G.; FERTE, A.; DEPAQUIT, J.; JUSTINE, J.L.O.; TILLER, A.O.; DURETTE-DRESSET, M.C. Phylogeny of the Trichostrongylina (Nematoda) inferred from 28S rDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 19, p. 430-432, 2001.

BLAXTER, M.L.; De LEY, P.; GAREY, J.R.; LIU, L.X.; SCHELDEMAN, P.; VIERSTRAETE, A.; VANFLETEREN, J.R.; MACKEY, L.Y.; DORIS, M.; FRISSE, L.M.; VIDA, J.T.; THOMAS, W.K. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**, London, v. 392, p. 71-75, 1998.

BUCKLER, E.S.; IPOLLITO, A.; HOLTSFORD, T.P. The evolution of ribosomal DNA: Divergent paralogues and phylogenetic implications. **Genetics**, Austin, v. 145, p. 821-832. 1997.

CHERRY, T.; SZALANSKI, A.L.; TODD, T.C.; POWERS, T.O. The internal transcribed spacer of *Belonolaimus* (Nemata: Belonolaimidae). **Journal of Nematology**, Riverside, v. 29, p. 23-29, 1997.

COOK, D.E.L.; DUNCAN, J.M. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS-1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. **Mycological Research**, Cambridge, v. 101, p. 667-677, 1997.

COURTRIGHT, E.M.; WALL, D.H.; VIRGINIA, R.A.; FRISSE, R.A.; VIDA, J.T.; THOMAS, W.K. Nuclear and mitochondrial DNA sequence diversity in the antarctic nematode *Scottinema lindsayae*. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 32, p. 143-153, 2000.

DE LEY, I.T.; BLAXTER, M.L. Systematic position and phylogeny. In: LEE, D.L. (Ed). **The biology of nematodes**. London: Taylor & Francis, 2002, p. 1-30.

DE LUCA, F.; FANELLI, E.; DI VITO, M.; REYES, A.; DE GIORGI, C. Comparison of the sequences of the D3 expansion of the 26S ribosomal genes reveals different degrees of heterogeneity in different populations and species of *Pratylenchus* from the Mediterranean region. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 949-957, 2004.

DORRIS, M.; DE LEY, P.; BLAXTER, M.L. Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 15, p. 188-193, 1999.

DOVER, G. Molecular drive: A cohesive mode of species evolution. **Nature**, London, v. 299, p. 111-117, 1982.

- DUNCAN, L.W.; INSERRA, R.N.; THOMAS, W.K.; DUNN, D.; MUSTIKA, I.; FRISSE, L.M.; MENDES, M.L.; MORRIS, K.; KAPLAN, T. Molecular and morphological analysis of isolates of *Pratylenchus coffeae* and closely related species. **Nematropica**, Flórida, v. 29, n. 1, p. 61-80, 1999.
- ELBADRI, G.A.A.; DE LEY, P.; WAEYENBERGE, L.; VIERSTRAETE, A.; MOENS, M.; VANFLETEREN, J. Intraspecific variation in *Radopholus similis* isolates assessed with restriction fragment length polymorphism and DNA sequencing of the internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA cistron. **International Journal of Parasitology**, Sydney, v. 32 p. 199-205, 2002.
- FELSENSTEIN, J. Cases in which parsimony and compatibility methods will be positively misleading. **Systematics Zoology**, Göteborg, v. 27 p. 401-410, 1978.
- FELSENSTEIN, J.; CHURCHILL, G. A hidden Markov model approach to variation among sites in rate of evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Orlando, v. 13, p. 93-104, 1996.
- FERRAZ, L.C.C.B. Observations on some *Xiphinema* species found in Brazil. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 8, p. 141-151, 1980.
- FERRIS, V.R.; FERRIS, J.M.; FAGHIHI, J. Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant-parasitic nematodes. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge, v. 16, p. 177-184, 1993.
- FLEMING, C.C.; TURNER, S.J.; POWERS, T.O.; SZALANSKI, A.L. Diagnostics of cyst nematodes: use of the polymerase chain reaction to determine species and estimate population levels. **Aspects of Applied Biology**, Oxford, v. 52, p. 375-382, 1998.
- FREDERICK, J.J.; TARJAN, A.C. Morphological variation in *Xiphinema krugi* Lordello 1955. **Proceedings of the Soil and Crop Science Society of Florida**, Flórida, vol. 34, p. 181-185, 1974.
- GODFREY, G.H. A destructive root disease of pineapples and other plants due to *Tylenchus brachyurus* n. sp. **Phytopathology**, Lancaster, v. 19, n. 7, p. 611-630, 1929.
- GOUVÊA, C.M.C.P.; LIMA, M.M.A.; OLIVEIRA, A.R. Estabelecimento de culturas monoxênicas e análise eletroforética de proteína e DNA de *Pratylenchus zaeae*, *P. penetrans* e *P. brachyurus*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 23, n. 3/4, p. 243-247, 1997.
- HANDOO, Z.A.; GOLDEN, A.M. A key and diagnostic compendium to the species of the genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (lesion nematodes). **Journal of Nematology**, Riverside, v. 21, p. 202-218, 1989.
- HARRISON, P.M.; ECHOLS, N.; GERSTEIN, M.B. Digging for dead genes: an analysis of the characteristics of the pseudogene population in the *Caenorhabditis elegans* genome. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 818-830, 2001.

HEDGES, S.B.; POLING, L.L. A molecular phylogeny of reptiles. **Science**, London, v. 283, p. 998-1001, 1999.

HIATT, E.E.; GEORGI, L.; HUSTON, S.; HARSHMAN, D.C.; LEWIS, S.A.; ABBOTT, A.G. Intra- and interpopulation genome variation in *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 27, n. 2, p. 143-152, 1995.

HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA : molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review of Biology**, New York, v. 66, p. 441-453, 1991.

HOYER, U.; BURGERMEISTER, W.; BRAASCH, H. Identification of *Bursaphelenchus* species (Nematoda, Aphelenchoididae) on the basis of amplified ribosomal DNA (ITS-RFLP). **Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes**, Stuttgart, v. 50, p. 273-277, 1998.

HÜBSCHEN, J.; KLING, L.; IPACH, U.; ZINKERNAGEL, V.; BOSSELUT, N.; ESMENJAUD, D.; BROWN, D.J.F.; NEILSON, R. Validation of the specificity and sensitivity of species-specific primers that provide a reliable molecular diagnostic for *Xiphinema diversicaudatum*, *X. index* and *X. vuittenezi*. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 110, p. 779-788, 2004a.

HÜBSCHEN, J.; KLING, L.; IPACH, U.; ZINKERNAGEL, V.; BROWN, D.J.F.; NEILSON, R. Development and validation of species-specific primers that provide a molecular diagnostic for virus-vector longidorid nematodes and related species in German viticulture. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 110, p. 883-891, 2004b.

HUSSEY, R.S. Biochemical systematics of nematodes – a review. **Helminthological Abstracts, Series B, Plant Nematologie**, Farnham Royal, v. 48, p. 141-148, 1979.

IBRAHIM, S.K.; PERRY, R.N. BURROWS, P.R.; HOOPER, D.J. Differentiation of species and populations of *Aphelenchoides* and of *Ditylenchus angustus* using a fragment of ribosomal DNA. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 26, p. 412-421, 1994.

IWAHORI, H.; TSUDA, K.; KANZAKI, N.; IZUI, K.; FUTAI, K. PCR-RFLP and sequencing analysis of ribosomal DNA of *Bursaphelenchus* nematodes related to pine wilt disease. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge, v. 21, p. 655-666, 1998.

JONES, J.T.; PHILLIPS, M.S.; ARMSTRONG, M.R. Molecular approaches in plant Nematology. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge, v. 20, p. 1-14, 1997.

JOYCE, S.A.; REID, A.P.; DRIVER, S.; CURRAN, J. Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to identification of entomopathogenic nematodes. In: BURNELL, A.M.; EHLERS, R.U.; MASSON, J.P. (Ed). **Genetics of entomopathogenic nematode-bacterium complexes**. Luxembourg, 1994, p. 178-187.

KANZAKI, N.; FUTAI, K. A PCR primer set for determination of phylogenetic relationships of *Bursaphelenchus* species within the *xylophilus* group. **Nematology**, Leiden, v. 4, p. 35-41, 2002.

KELLOG, E.A.; APPLES, R. Intraspecific and interspecific variation in 5S RNA genes and decoupled in diploid wheat relatives. **Genetics**, Austin, v. 140, p. 325-343, 1995.

KNOETZE, R.; BURGER, J.T.; MEYER, A.J. Discrimination of some *Xiphinema* species from South Africa by rDNA-RFLP analysis. **African Plant Protection**, Arcádia, v. 6, p. 25-30, 2000.

KUBO, R.K.; OLIVEIRA, C.M.G.; ANTEDOMENICO, S.R.; MONTEIRO, A.R.; FERRAZ, L.C.C.B.; INOMOTO, M.M. Ocorrência de nematóides do gênero *Pratylenchus* em cafezais do estado de São Paulo. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 159-165, 2004.

KUMAR, P.L.; FENTON, B.; JONES, A.T. Identification of *Cecidophyopsis* mites (Acari: Eriophyidae) based on variable simple sequence repeats of ribosomal DNA internal transcribed spacer-1 sequences via multiplex PCR. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 8, p. 347-357, 1999.

LAMBERTI, F.; TARJAN, A.C. *Xiphinema costaricense* n. sp. (Longidoridae, Nematoda) a new species of dagger nematode from Costa Rica. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 2, p. 1-11, 1974.

LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; TROUSLOT, P.; CHARRIER, A. Phylogenetic relationships of coffee-tree species (*Coffea* L.) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 94, p. 947-955, 1997.

LAX, P.; DOUCET, M.; DI RIENZO, J.A.; PINOCHET, J.; BAUJARD, P. Inter-population variability in *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen, 1951 (Nematoda: Tylenchida). **Nematology**, Leiden, v. 6, n. 2., p. 257-260, 2004.

LITTLEWOOD, D.T.J.; ROHDE, K.; BRAY, R.A.; HERNIOU, E.A. Phylogeny of the Platyhelminthes and the evolution of parasitism. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 68, p. 257-287, 1999.

LOOF, P.A.A. The genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Pratylenchidae): A review of its taxonomy, morphology, distribution, systematics, and identification. Research Information Center. Uppsala, Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences, 1978.

LOOF, P.A.A. The family Pratylenchidae Thorne, 1949. In: NICKLE, W. R. (Ed). **Manual of Agricultural Nematology**. New York: Marcel Dekker, 1991, p. 363-421.

LUC, M. A reappraisal of Tylenchida (nemata). 7. The family Pratylenchidae Thorne, 1949. **Revue de Nématologie**, Bondy, v. 10, p. 203-218, 1987.

LUC, M.; HUNT, D.J. Redescription of *Xiphinema diversicaudatum* Luc, 1961 and observations on *X. krugi* Lordello, 1955 (Nematoda: Longidoridae). **Nematologica**, Leiden, v. 24, p. 1-18, 1978.

- MACHADO, A.C.Z.; BELUTI, D.B.; SILVA, R.A.; SERRANO, M.A.S.; INOMOTO, M.M. Avaliação de danos causados por *Pratylenchus brachyurus* em algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.31, n.1, p.11-16, 2006.
- MALLOCH, G.; FENTON, B.; GOODRICH, M.A. Phylogeny of raspberry beetles and other Byturidae (Coleoptera). **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 10, p. 281-291, 2001.
- MÁRQUEZ, L.M.; MILLER, D.J.; MACKENZIE, J.B.; VAN OPPEN, M.J.H. Pseudogenes contribute to the extreme diversity of nuclear ribosomal DNA in the hard coral *Acropora*. **Molecular Biology and Evolution**, Orlando, v. 20, n. 7, p. 1077-1086, 2003.
- MARSHALL, J. A.; KNAPP, S.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B.; COCKING, E. C.; BENNET, M. D.; COX, A. V. Molecular systematics of *Solanum* section *Lycopersicum* (*Lycopersicon*) using the nuclear ITS rDNA region. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 103, p. 1216-1222, 2001.
- MOUNPORT, D.; BAUJARD, P.; MERTINY, B. Étude ultrastructurale de la cuticule de *Pratylenchus brachyurus*, *P. loosi* and *P. sefaensis* (Nematoda : Pratylenchidae). **Revue de Nématologie**, Bondy, v. 13, n. 3, p. 249-254, 1990.
- MOUNSEY, A.; BAUER, P.; HOPE, I.A. Evidence suggesting that a fifth of annotated *Caenorhabditis elegans* genes may be pseudogenes. Disponível em: <[www.genome.org](http://www.genome.org)> Acesso em 26 jul. 2006.
- NGUYEN, K.B.; MARUNIAK, J.; ADAMS, B.J. Diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of *Steinernema*. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 33, p. 73-82, 2001.
- NICHOLAS, K.B.; NICHOLAS JR., H.B.; DEERFIELD II, D.W. GeneDoc, analysis and visualization of genetic variation. **EMBNEW.NEWS**, Hixton, v. 4, p. 14, 1997.
- O'BANNON, J.H.; TOMMERLIN, A.T. *Pratylenchus* sp. as citrus pathogens. **Phytopathology**, Lancaster, v.60, p.1540, 1970.
- OLIVEIRA, C.M.G.; FENTON, B.; MALLOCH, G.; BROWN, D.J.F.; NEILSON, R.. Development of species-specific primers for the ectoparasitic nematode species *Xiphinema brevicolle*, *X. diffusum*, *X. elongatum*, *X. ifacolum* and *X. longicaudatum* (Nematoda: Longidoridae) based on ribosomal DNA sequences. **Annals of Applied Biology**, Lawrence, v. 146, p. 281-288, 2005.
- OLIVEIRA, C.M.G.; FERRAZ, L.C.C.B.; NEILSON, R. Morphological and molecular variability of *Xiphinema krugi* populations. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 26, 2006. Campos dos Goytacazes, RJ. **Resumos...** Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2006. Resumo 100.

- OLWE, T.; CORBETT, D.C.M. Morphology and morphometrics of *Pratylenchus brachyurus* and *P. zae* II. Influence of environmental factors. **Indian Journal of Nematology**, New Dehli, v. 14, n. 1, p. 6-17, 1984a.
- OLWE, T.; CORBETT, D.C.M. Morphology and morphometrics of *Pratylenchus brachyurus* and *P. zae* III. Influence of geographical location. **Indian Journal of Nematology**, New Dehli, v. 14, n. 1, p. 30-35, 1984b.
- ORUI, Y. Discrimination of the main *Pratylenchus* species (Nematoda: Pratylenchidae) in Japan by PCR-RFLP analysis. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 31, p. 505-514, 1996.
- ORUI, Y.; MIZUKUBO, T. Discrimination of seven *Pratylenchus* species (Nematoda: Pratylenchidae) in Japan by PCR-RFLP analysis. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 34, n. 2, p. 205-211, 1999.
- PAYAN, L.A.; DICKSON, D.W. Host specificity of four populations of *Pratylenchus brachyurus*. **Annals of Applied Nematology**, Lawrence, v.2, p.140-143, 1988.
- PAYAN, L.A.; DICKSON, D.W. Comparison of populations of *Pratylenchus brachyurus* based on isozyme phenotypes. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 22, n. 4, p. 538-545, 1990.
- PINOCHET, P.; CENIS, J. L.; FERNÁNDEZ, C. DOUCET, M.; MARULL, J. Reproductive fitness and random amplified polymorphic DNA variation among isolates of *Pratylenchus vulnus*. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 26, n. 3, p. 271-277, 1994.
- POWERS, T. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. **Annual Review of Phytopathology**, California, v. 42, p. 367-383, 2004.
- POWERS, T.; TODD, T. C.; BURNELL, A.M.; MURRAY, P.C.B.; FLEMING, C.C.; SZALANSKI, A.L.; ADAMS, B.A.; HARRIS, T.S. The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 29, p. 441-450, 1197.
- RAZAFIMANDIMBISON, S.G.; KELLOGG, E.A.; BREMER, B. Recent origin and phylogenetic utility of divergent ITS putative pseudogenes: A case study from Naucleaeae (Rubiaceae). **Systematic Biology**, Washington, v. 53, n. 2, p. 177-192, 2004.
- REID, A.; MANZANILLA-LOPEZ, R.H.; HUNT, D.J. *Nacobus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne and Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): a nascent species complex revealed by RFLP analysis and sequencing of the ITS-rDNA region. **Nematology**, Leiden, v. 5, p. 441-451, 2003.
- ROMÁN, B.; HIRSCHMANN, H. Morphology and morphometrics of six species of *Pratylenchus*. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 1, p. 363-386, 1969.

SABO, A.; REIS, L.G.L.; KRALL, E.; MUNDO-OCAMPO, M.; FERRIS, V.R. Phylogenetic relationships of a distinct species of *Globodera* from Portugal and two *Punctodera* species. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 34, p. 263-266, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Composition of the electrophoresis buffer. In: FORD, N.; NOLAN, C.; FERGUSON, M.; OCKLER, M. (Ed.). **Molecular cloning, a laboratory manual**. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, p. 66-67.

SANTOS, S.R.; KINZIE III, R.A.; SAKAI, K.; COFFROTH, M.A. Molecular characterization of nuclear small subunit (18S) – rDNA pseudogenes in a symbiotic dinoflagellate (*Symbiodinium*, Dynophita). **Journal of Eukariotic Microbiology**, Guelph, v. 50, n. 6, p. 417-421, 2003.

SASSER, J.N.; FRECKMAN, D.W. A world perspective on nematology: The role of the society. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. (Ed). **Vistas on Nematology**: A commemoration of the twenty-fifth anniversary of the Society of Nematologists. Hyattsville, MD: Society of Nematologists, 1987, p. 7-14.

SIDDIQI, M.R.; Tylenchida. Parasites of plants and insects. London, United Kingdom: Published by Commonwealth Institute of Parasitology of the Commonwealth Agricultural Bureau, 1986, 848 p.

SIQUEIRA, K.M.S.; INOMOTO, M.M. Reação de genótipos de feijão de corda (*Vigna unguiculata*) a isolados de *Pratylenchus brachyurus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 26, 2006. Campos dos Goytacazes, RJ. **Resumos...** Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2006. Resumo 92.

SILVA, R.A.; SERRANO, M.A.S.; GOMES, A.C.; BORGES, D.C.; SOUZA, A.A.; ASMUS, G.L.; INOMOTO, M.M. Ocorrência de *Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne incognita* na cultura do algodoeiro no Estado do Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.29, n.3, p.337, 2004.

SNAIDR, J.; FUCHS, B.; WALLNER, G.; WAGNER, M.; SCHLEIFER, K.H.; AMANN, R. Phylogeny and *in situ* identification of a morphologically conspicuous bacterium, *Candidatus Magnospira bakii*, present at a very low frequency in activated sludge. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 125-135, 1999.

STANTON, J.M.; McNICOL, C.D.; STEELE, V. Non-manual lysis of second-stage *Meloidogyne* juveniles for identification of pure and mixed samples based on the polymerase chain reaction. **Australasian Plant Pathology**, Rockhampton, v. 27, p. 112-115, 1998.

STRIMMER, K.; VON HAESLER, A. Quartet puzzling, a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 13, p. 964-969, 1996.

SUBBOTIN, S.A.; WAHEYENBERGE, L.; MALOKANOVA, I.A.; MOENS, M. Identification of *Heterodera avenae* group species by morphometrics and rDNA-RFLPs. **Nematology**, Leiden, v. 1, p. 195-207, 1999.

SUBBOTIN, S.A.; VIERSTRAETE, A.; DE LEY, P.; ROWE, J.; WAEYENBERGE, L.; MOENS, M.; VANFLETEREN, J.R. Phylogenetic relationships within the cyst-forming nematodes (Nematoda, Heteroderidae) based on analysis of sequences from the ITS regions of ribosomal DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 21, p. 1-16, 2001.

TARJAN, A.C.; FREDERICK, J.J. Intraspecific morphological variation among populations of *Pratylenchus brachyurus* and *P. coffeae*. **Journal of Nematology**, Riverside, vol. 10, n. 2, p. 152-160, 1978.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface, flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

UEHARA, T.; MIZUKUBO, T.; KUSHIDA, A.; MOMOTA, Y. Identification of *Pratylenchus coffeae* and *P. loosi* using specific primers for PCR amplification of ribosomal DNA. **Nematologica**, Leiden, v. 44, p. 357-368, 1998.

UEHARA, T.; KUSHIDA, A.; MOMOTA, Y. Rapid and sensitive identification of *Pratylenchus* spp. using reverse dot blot hybridization. **Nematology**, Leiden, v. 1, n. 5, p. 549-555, 1999.

VRAIN, T.C.; WAKARCHUK, D.A.; LÈVESQUE, A.C.; HAMILTON, R.I. Intraspecific rDNA restriction fragment polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge, v. 15, p. 563-573, 1992.

VRAIN, T.C.; McNAMARA, D.G. Potential for identification of quarantine nematodes by PCR. **EPPO Bulletin**, v. 24, p. 453-458, 1994.

WAEYENBERGE, L.; RYSS, A.; MOENS, M.; PINOCHET, J.; VRAIN, T.C. Molecular characterisation of 18 *Pratylenchus* species using rDNA restriction fragment length polymorphism. **Nematology**, Leiden, v. 2, p. 135-142, 2000.

WANG, X.; BOSSELUT, N.; CASTAGNONE, C.; VOISIN, R.; ABAD, P.; ESMENJAUD, D. Multiplex polymerase chain reaction identification of single individuals of the Longidorid nematodes *Xiphinema index*, *X. diversicaudatum*, *X. vuittenezi*, and *X. italiae* using specific primers from ribosomal genes. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93, p. 160-166, 2003.

WENDT, K.R.; VRAIN, T.C.; WEBSTER, J.M. Separation of three species of *Ditylenchus* and some host races of *D. dipsaci* by restriction fragment polymorphism. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 25, p. 555-563, 1993.

YANG, Y.W.; LAI, K.N.; TAI, P.Y.; MA, D.P.; LI, W.H. Molecular phylogenetic studies of Brassica, Rorippa, Arabidopsis, and allied genera based on the internal transcribed region of 18S-26S rDNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 13, p. 455-462, 1999.

ZIJLSTRA, C.; LEVER, A.E.M.; VENK, B.J.; VAN SILFHOUT, C.H. Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 85, p. 1231-1237, 1995.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)