

NEMATOLOGIA BRASILEIRA VOL. 30 (2) – 2006

SUMÁRIO (* Artigo em inglês)

SEÇÃO ESPECIAL

- Utilização de nematóides entomopatogênicos nativos ou exóticos: O Perigo das Introduções. CLAUDIA DOLINSKI & ALCIDES MOINO JR 139

ARTIGOS

- Reação de dez coberturas vegetais a *Pratylenchus brachyurus*. MARIO MASSAYUKI INOMONOTO, LUIS CLÁUDIO CABRAL MOTTA, ANDRESSA CRISTINA ZAMBONI MACHADO & CATIA SUMIE SHIMATAI SAZAKI 151

- Detecção de *Meloidogyne* spp. em *Pfaffia* spp. no Distrito Federal e patogenicidade de *M. javanica* a *Pfaffia glomerata* e *P. paniculata*. REGINA M.D.G CARNEIRO, LUIZ F.G MESQUITA, PEDRO A.S. CIROTO, SARAZETE IZIDIA VAZ PEREIRA, PAULO S. PEREIRA, DJALMA B. SILVA & ROBERTO F. VIEIRA 159

- Manejo do nematóide das galhas da goiabeira em São João da Barra (RJ) e relato de novos hospedeiros. RICARDO M. SOUZA, MACIEL S. NOGUEIRA, INORBERT M. LIMA, MARCELO MELARATO & CLAUDIA M. DOLINSKI 165

- Efeito da adição de diferentes resíduos culturais ao solo sobre a população do nematóide de cisto da soja. FÁBIA SILVA DE OLIVEIRA, MARA RÚBIA DA ROCHA, ROMMEL BERNARDES DA COSTA, VALÉRIA DE OLIVEIRA FALEIRO MACHADO & ÉBER NASCIMENTO NOGUEIRA 171

- Caracterização e identificação de populações de nematóides de galhas provenientes de figueira (*Ficus carica* L.) do Rio Grande do Sul e de São Paulo. ISRAEL LIMA MEDINA, CESAR BAUER GOMES, CARLOS ROSSI & REGINA M.D.G CARNEIRO 179

- Resistência de acessos de *Pfaffia glomerata* a *Meloidogyne incognita* raça 1. ANA CRISTINA M.M. GOMES, JEAN KLEBER MATTOS, PEDRO A.S. CIROTO & REGINA M.D.G CARNEIRO 189

- (*) Nematóides fitoparasitas detectados em tubérculos na Argentina e Bolívia. PAOLA LAX, MARCELO E. DOUCET, CLAUDIA GALLARDO, SUSANA MURUAGA DE L'ARGENTIER & HUGO VILTE 195

- Fitonematóides extraídos dos resíduos das fases do beneficiamento e de sementes de *Brachiaria brizantha*. LUCIANY FAVORETO, JAIME MAIA DOS SANTOS, JOSÉ CARLOS BARBOSA & SÉRGIO ADEMIR CALZAVARA 203

- Degradação de endósporos de *Pasteuria penetrans* por hipoclorito de sódio. ROSANGELA DALLEMOLE-GIARETTA, LEANDRO GRASSI DE FREITAS, WÂNIA DOS SANTOS NEVES, SILAMAR FERRAZ, ROSÂNGELA D'ARC DE LIMA OLIVEIRA & CLÉIA DE FÁTIMA SILVA FABRY 211

COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS

- Samanea saman*, novo hospedeiro de *Meloidogyne javanica*. GILSON SOARES SILVA & FRANCISCO CARNEIRO LIMA 217

- Efeito da incorporação de resíduos foliares de *Piper aduncum* ao solo sobre o parasitismo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro. GILSON S. SILVA, AURENICE L. PEREIRA, CLEBER N. BASTOS & VALDENIA C.M. MENDONÇA 219

- Lista dos revisores para o vol. 30 (2)** 223

- Normas para publicar na Nematologia Brasileira** 224

- Proposta para Sócio** 227

NEMATOLOGIA BRASILEIRA VOL. 30 (2)

CONTENTS (* article in English)

SPECIAL SECTION

- Use of native and exotic entomopathogenic nematodes: the risk of introductions. CLAUDIA DOLINSKI & ALCIDES MOINO JR 139

ARTICLES

- Host status of ten cover crops for *Pratylenchus brachyurus*. MARIO MASSAYUKI INOMONOTO, LUIS CLÁUDIO CABRAL MOTTA, ANDRESSA CRISTINA ZAMBONI MACHADO & CATIA SUMIE SHIMATAI SAZAKI 151

- Detection of *Meloidogyne* spp on *Pfafia* spp in the Federal District, Brazil and pathogenicity of *M. javanica* on *Pfafia glomerata* and *P. paniculata*. REGINA M.D.G CARNEIRO, LUIZ F.G MESQUITA, PEDRO A.S. CIROTO, SARAZETE IZIDIA VAZ PEREIRA, PAULO S. PEREIRA, DJALMA B. SILVA & ROBERTO F. VIEIRA 159

- Management of the guava root-knot nematode in São João da Barra, Brazil, and report of new hosts. RICARDO M. SOUZA, MACIEL S. NOGUEIRA, INORBERT M. LIMA, MARCELO MELARATO & CLAUDIA M. DOLINSKI 165

- Effect of soil amendments on soybean cyst nematode population. FÁBIA SILVA DE OLIVEIRA, MARA RÚBIADA ROCHA, ROMMEL BERNARDES DA COSTA, VALÉRIA DE OLIVEIRAFALEIRO MACHADO & ÉBER NASCIMENTO NOGUEIRA 171

- Characterization and identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from fig (*Ficus carica* L.) trees in Rio Grande do Sul and São Paulo States of Brazil. ISRAEL LIMA MEDINA, CESAR BAUER GOMES, CARLOS ROSSI & REGINA M.D.G CARNEIRO 179

- Resistance of *Pfafia glomerata* accessions to *Meloidogyne incognita* race 1. ANA CRISTINA M. M. GOMES, JEAN KLEBER MATTOS, PEDRO A. S. CIROTO & REGINA M.D.G. CARNEIRO (*) 189

- Plant-parasitic nematodes detected in Andean tubers from Argentina and Bolivia. PAOLA LAX, MARCELO E. DOUCET, CLAUDIA GALLARDO, SUSANA MURUA GADEL, ARGENTIER & HUGO VILIE 195

- Phytonematodes extracted from waste material from seed processing and seeds of *Brachiaria brizantha*. LUCIANY FAVORETO, JAIME MAIA DOS SANTOS, JOSÉ CARLOS BARBOSA & SÉRGIO ADEMIR CALZAVARA 203

- Degrading *Pasteuria penetrans* endospores by sodium hypochlorite. ROSANGELA DALLEMOLGIARETTA, LEANDRO GRASSI DE FREITAS, WÂNIOS SANTOS NEVES, SILAMAR FERRAZ, ROSÂNGELA D'ARC DE LIMA OLIVEIRA & CLEIA DE FÁTIMA SILVA FABRY 211

SHORT COMMUNICATIONS

- Samanea saman*, a new host of *Meloidogyne javanica*. GILSON SOARES SILVA & FRANCISCO CARNEIRO LIMA 217

- Effect of the addition of leaf residues of *Piper aduncum* to soil on parasitism of *Meloidogyne incognita* in tomato. GILSON S. SILVA, AURENICE L. PEREIRA, CLEBER N. BASTOS & VALDENIA C.M. MENDONÇA 219

- List of referees for the volume 30 (2) 223

- Instructions for authors 224

- Application for Membership 227

Utilização de Nematóides Entomopatogênicos Nativos ou Exóticos: O Perigo das Introduções

CLAUDIA DOLINSKI¹ & ALCIDES MOINO JR.²

¹Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro/ CCTA/ LEF. Av. Alberto Lamego, 2000, CEP 28015-620, Campos dos Goytacazes (RJ), e-mail: claudia.dolinski@censanet.com.br.

²Universidade Federal de Lavras, Departamento de Entomologia, C. P. 3037, CEP 37200-000 Lavras (MG), e-mail: alcmoino@ufla.br

Recebido para publicação em 20/10/2005. Aceito em 14/05/2006

Resumo – Dolinski, C. & A. Moino Jr. 2006. Utilização de nematóides entomopatogênicos nátivos ou exóticos: O Perigo das Introduções.

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) vêm se tornando uma ferramenta importante no Manejo Integrado de Pragas. Sua utilização no Brasil vem crescendo ano a ano e O Perigo das Introduções de espécies exóticas é iminente. Neste artigo é dada uma visão geral sobre os NEPs e discute-se sobre os perigos destas introduções. São abordadas também as maneiras corretas de se fazer introduções e qual a legislação existente no Brasil que as rege. Faz-se menção também à legislação referente à utilização dos NEPs no controle biológico de pragas e à necessidade do Registro Especial Temporário (RET) durante os testes em laboratório e campo.

Palavras-chave: controle biológico, pragas agrícolas, deslocamento de espécies, ecologia, legislação, quarentena.

Summary – Dolinski, C. & A. Moino Jr. 2006. Use of native and exotic entomopathogenic nematodes: the risk of introductions.

Entomopathogenic nematodes (EPNs) are becoming an important tool in Integrated Pest Management. Year after year, EPNs are being used more often in Brazil and the risk of exotic introductions is increasing. In this article there is an overview of EPNs and a discussion on the danger of these introductions. The correct way to introduce an exotic organism and the pertinent legislation is also discussed. In addition, the legislation that rules the EPNs usage in the field and the necessity of the Temporary Special Register (TSR) for lab and field tests is commented.

Keywords: biological control, agricultural pests, species relocation, ecology, legislation, quarantine.

Introdução

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) pertencem à ordem Rhabditida (Nematoda: Secernentea), na qual estão localizadas as famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae. A família Steinernematidae possui dois gêneros: *Steinernema* Travassos, 1927 e *Neosteinernema* Nguyen & Smart, 1994, enquanto a família Heterorhabditidae possui o gênero *Heterorhabditis* Poinar, 1976. Atualmente, existem descritas e validadas cerca de 41 espécies do gênero

Steinernema, uma do gênero *Neosteinernema* e 11 do gênero *Heterorhabditis* (Tabela 1), sendo que mais de 70% dessas foram descritas nos últimos 20 anos (Adams *et al.*, 2006; Nguyen, 2005).

Os NEPs são assim conhecidos por serem patogênicos a diferentes espécies de insetos, causando-lhes morte com rapidez (24 a 72 horas) (Dowds & Peters, 2002). Esses nematóides possuem uma particularidade que é a associação simbiótica com bactérias entomopatogênicas dos gêneros *Xenorhabdus* Thomas & Poinar, 1979 e *Photorhabdus* Boemare, Louis & Kuhl, 1983 (associação com espécies dos

Tabela 1. Lista de espécies das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae. Informação obtida de Adams & Nguyen, 2002 e atualizada por Adams *et al.*, 2006.

Família Steinernematidae Chitwood & Chitwood, 1937	Família Heterorhabditidae Poinar, 1976
Gênero: <i>Steinernema</i> Travassos, 1927	Gênero: <i>Heterorhabditis</i> Poinar, 1976
Espécie tipo: <i>S. kraussei</i> (Steiner, 1923) Travassos, 1927	Espécie tipo: <i>H. bacteriophora</i> Poinar, 1976
<i>S. abbasi</i> Elawad, Ahmad & Reid, 1997	<i>H. baujardi</i> Phan, <i>et al.</i> , 2003
<i>S. acarii</i> Qui <i>et al.</i> , 2005	<i>H. brevicaudis</i> Liu, 1994
<i>S. affine</i> (Obvien, 1937) Wouts <i>et al.</i> , 1982	<i>H. dowesi</i> Stock <i>et al.</i> , 2002
<i>S. anatoliense</i> Hazir <i>et al.</i> , 2003	<i>H. indica</i> Poinar <i>et al.</i> , 1992
<i>S. arenarium</i> (Artyukhovsky, 1967) Wouts <i>et al.</i> , 1982	<i>H. marelatus</i> Liu, 1996
<i>S. asiaticum</i> Anis, Shahina, Reid, 2004	<i>H. megidis</i> Poinar <i>et al.</i> , 1987
<i>S. apuliae</i> Trigiani, Mrácek & Reid, 2004	<i>H. mexicana</i> Nguyen <i>et al.</i> , 2004
<i>S. bicornutum</i> Tallosi, Peters & Ehlers, 1995	<i>H. poinari</i> Kakulia & Mikaia 1997
<i>S. carpocapsae</i> (Weiser, 1955) Wouts <i>et al.</i> 1982	<i>H. taysearae</i> Shamseldean <i>et al.</i> , 1996
<i>S. caudatum</i> Xu, Wang & Li, 1991	<i>H. zealandica</i> Poinar, 1990
<i>S. ceratophorum</i> Jian, Reid & Hunt, 1997	
<i>S. cubanum</i> Mracek, Hernandez & Boemare, 1994	
<i>S. diaprepesi</i> Nguyen & Duncan, 2002	
<i>S. feltiae</i> (Filipjev, 1934) Wouts <i>et al.</i> , 1982	
<i>S. glaseri</i> (Steiner, 1929) Wouts <i>et al.</i> 1982	
<i>S. guangdongense</i> Qui, Fang, Zhou, Pang & Nguyen, 2004	
<i>S. intermedium</i> (Poinar, 1985) Mamiya, 1988	
<i>S. jollieti</i> Spiridonov, Krasmil-Osterfeld & Moens, 2004	
<i>S. karii</i> Waturu, Hunt & Reid, 1997	
<i>S. kushidai</i> Mamiya, 1988	
<i>S. loci</i> Phan, Nguyen & Moens, 2001	
<i>S. longicaudum</i> Shen & Wang, 1992	
<i>S. monticolum</i> Stock, Choo & Kaya, 1997	
<i>S. neocurtillae</i> Nguyen & Smart, 1992	
<i>S. oregonense</i> Liu & Berry, 1996	
<i>S. pakistanense</i> Shahina <i>et al.</i> , 2001	
<i>S. puertoricense</i> Román & Figueroa, 1994	
<i>S. rarum</i> (De Doucet, 1986) Mamiya, 1988	
<i>S. riobrave</i> Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994	
<i>S. ritteri</i> Doucet & Doucet, 1990	
<i>S. robustispiculum</i> Phan <i>et al.</i> , 2005	
<i>S. sangi</i> Ohan, Nguyen & Moens, 2001	
<i>S. scapterisci</i> Nguyen & Smart, 1990	
<i>S. scarabei</i> Stock & Koppenhofer, 2003	
<i>S. siamkayai</i> Stock, Somsook & Reid, 1998	
<i>S. tami</i> Van Luc, Nguyen, Reid & Spiridonov, 2000	
<i>S. thanhi</i> Phan, Nguyen & Moens, 2001	
<i>S. thermophilum</i> Gangula & Singh, 2000	
<i>S. websteri</i> Cutler & Stock, 2003	
<i>S. weisleri</i> Mrácek, Sturhan & Reid, 2003	
Gênero: <i>Neosteinernema</i>	
<i>N. longicurvicauda</i> Nguyen & Smart, 1994	

gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, respectivamente). Essas bactérias são as principais responsáveis pela rápida morte do hospedeiro por septicemia. A fase de juvenis infectantes (JIs), desses nematóides, infecta e mata insetos em dezenas de famílias e ordens, e muitas espécies já fazem parte do Manejo Integrado de Pragas (MIP) de várias culturas ao redor do mundo (Wouts, 1991). O MIP objetiva a utilização de métodos mais adequados visando a produtividade, mas levando em conta fatores importantes como a preservação dos inimigos naturais e a prevenção do surgimento de populações resistentes a pragas e doenças.

A faixa de hospedeiros para cada espécie de nematóide é estreita e até específica, não causando portanto mortalidade indiscriminada. Devido a essa estreita faixa de hospedeiros é necessária e recomendada a escolha do NEP mais adequado ao controle de determinada praga (Peters, 1996).

Biologia da família Steinernematidae

A fase juvenil destes nematóides é composta por quatro estádios (J1, J2, J3 ou Juvenil Infectante e J4). O juvenil infectante corresponde ao estádio J3 no inseto, e é o estádio encontrado no solo. Esses juvenis buscam o hospedeiro e os localizam por seus produtos de excreção, níveis de CO₂, gradientes de temperatura e substâncias voláteis liberadas por plantas atacadas por insetos (van Tol *et al.*, 2001; Rasmann *et al.*, 2005). A infecção é iniciada com a penetração dos nematóides no inseto pelas aberturas naturais (boca, ânus e/ou espiráculos). Dentro do inseto migram para a hemolinfa e liberam as bactérias simbiontes do gênero *Xenorhabdus*. Essas bactérias produzem toxinas e matam o hospedeiro por septicemia entre 24 a 48 horas. Depois se multiplicam exponencialmente até atingir um patamar máximo. Os nematóides se alimentam dessas bactérias e dos tecidos dos insetos já decompostos, e passam então ao estádio J4. Desse estádio se originarão fêmeas e machos (fase adulta) da primeira geração; essas fêmeas colocam ovos que darão origem à segunda geração (Forst & Clarke, 2002) (Figura 1).

Os nematóides podem completar duas ou três gerações dentro do inseto-hospedeiro, dependendo da disponibilidade de alimento no inseto-cadáver. Quando não há mais alimento disponível, juvenis no segundo estádio sofrem ecdisse, retêm células da bactéria simbionte em uma vesícula em seu interior e conservam a cutícula como proteção; só então abandonam o cadáver como JIs. Os JIs permanecem no solo à procura de um novo inseto-hospedeiro por meses, dependendo da temperatura, da umidade do solo e da espécie de nematóide envolvida (Patel *et al.*, 1997).

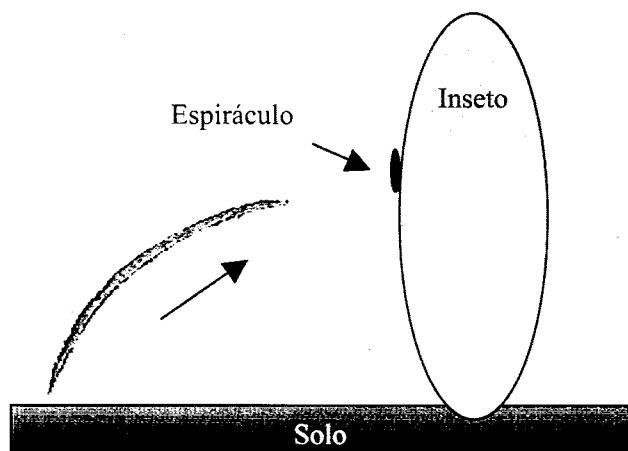


Figura 1. Ciclo de vida esquemático dos nematóides steinernematídeos e heterorhabditídeos. Para mais explicações ver o texto. Estadios juvenis: J1, J2, J3 e J4. Primeira geração em Steinernematidae composta por machos e fêmeas, em Heterorhabditidae por hermafroditas.

A duração do ciclo do nematóide no hospedeiro depende de vários fatores, dentre esses: da espécie do inseto-hospedeiro, do tamanho do JI, da temperatura ambiente, da quantidade de JIs que penetraram no inseto, dentre outros (Boff *et al.*, 2000).

O ciclo dos indivíduos no gênero *Neosteinernema* é similar ao de *Steinernema*, com a diferença de que *Neosteinernema* completa apenas uma geração no inseto-hospedeiro (Nguyen & Smart, 1994). Existe apenas uma espécie nesse gênero, descrita como *N. longicaudata* Nguyen & Smart, 1994. Essa espécie foi encontrada em cupins da casta das operárias, contudo foi perdida por não ter conseguido mantê-la em laboratório, e nunca mais foi encontrada.

Biologia da família Heterorhabditidae

O ciclo dos heterorhabditídeos é muito semelhante ao dos steinernematídeos, com algumas ressalvas. Os JIs dessa família, além de penetrar pelas aberturas naturais do inseto, podem também penetrar através da cutícula do hospedeiro, utilizando-se de um dente quitinoso localizado frontalmente em sua extremidade anterior. Ao chegarem a hemolinfa, liberam as bactérias simbiontes do gênero *Photorhabdus*. Na primeira geração dentro do inseto, ao invés de surgirem fêmeas e machos, ocorrem apenas adultos hermafroditas que produzem os demais estádios (ovos,

J1, J2, J3 e J4). A partir da segunda geração, os adultos se diferenciam em machos e fêmeas como acontece com os steiner nematídeos (Poinar Jr., 1990) (Figura 1).

A duração do ciclo, no hospedeiro, também é dependente dos mesmos fatores citados para *Steinernema*.

Biogeografia

As espécies dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são encontradas em uma grande diversidade de áreas geográficas, solos e ambientes, adaptadas co-evolutivamente a grandes números de insetos hospedeiros (Woodring & Kaya, 1988).

Quanto aos estudos da distribuição e isolamento de nematídeos no mundo, Hominick (2002) compilou uma lista com a distribuição geográfica de diferentes espécies de nematídeos entomopatogênicos. Dentro do gênero *Steinernema*, a distribuição é cosmopolita para algumas espécies, como no caso de *S. glaseri* (Steiner, 1929) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding, 1982 e *S. carpocapsae* (Weiser, 1955) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding, 1982. Algumas são adaptadas a temperaturas mais amenas, como *S. feltiae* (Filipjev, 1934) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding, 1982. Outras espécies possuem distribuição geográfica mais restrita, como por exemplo *S. kushidai* Mamiya, 1988, somente encontrada no Japão. O gênero *Heterorhabditis* encontra-se amplamente distribuído no mundo, como é o caso de *H. bacteriophora* Poinar, 1976, geograficamente distribuída desde as Américas, Europa Meridional e Central, Austrália até a Ásia Oriental (China, Japão e Coréia). Outro heterorhabditídeo, *H. indica* Poinar, Karunakar & David, 1992, também possui ampla distribuição, mas apenas nas regiões tropicais e subtropicais, e zonas temperadas subtropicais e quentes do Japão. Em contraste, *H. zealandica* Poinar, 1990 e *H. marelatus* Liu, 1996 parecem ser espécies com distribuição geográfica mais restrita, sendo encontradas em poucas áreas como Nova Zelândia e Estados Unidos, nas regiões de Oregon e Califórnia. *Heterorhabditis megidis* Poinar, Jackson & Klein, 1987, uma espécie adaptada a temperaturas amenas, até hoje só foi encontrada no hemisfério norte. No Brasil, amostragens de solo e isolamentos de nematídeos entomopatogênicos foram realizado em Rondônia (Machado & Dolinski, 2005), Amazonas (A. Moino Jr., resultados não publicados), Minas Gerais (Acevedo *et al.*, 2005), Rio de Janeiro (C. Dolinski, resultados não publicados) e São Paulo (Fowler, 1988; L. Leite, resultados não publicados); sendo que a maioria dos isolados obtidos foi identificada como pertencente ao gênero *Heterorhabditis*.

É importante ressaltar que essa distribuição geográfica das espécies de NEPs observada até o momento, é fruto do trabalho sistemático de isolamento e identificação desses nas diversas regiões do mundo nas quais existam pesquisadores envolvidos com esses nematídeos. Como em nossas condições esse tipo de prática vem se intensificando nos últimos anos, é de se esperar que o número de espécies identificadas na América do Sul, principalmente no Brasil, aumente à medida que esses estudos venham a se completar, alterando significativamente essa distribuição, em decorrência do maior conhecimento da biodiversidade que caracteriza os diferentes ecossistemas brasileiros.

Desta forma, como nematídeos entomopatogênicos possuem potencial para serem encontrados em solos de diferentes lugares e condições, recomenda-se que antes de qualquer introdução, seja feita uma amostragem local ou de maior amplitude, visando obter a maior variabilidade de nematídeos possível para uma futura aplicação no campo.

Mobilidade

Quanto à movimentação e estratégia de busca, nematídeos entomopatogênicos podem ser classificados como “ambusher” (que fica de tocaia) ou “cruiser” (que busca pelo solo). As espécies “ambusher” promovem movimentação própria chamada de nictação, a qual consiste na suspensão do corpo, ficando apoiado apenas na ponta da cauda. A parte anterior do nematóide fica livre aguardando a passagem de um hospedeiro para então saltar sobre o mesmo. Exemplos de espécies de NEPs que fazem nictação são *S. carpocapsae* e *S. scapterisci* Nguyen & Smart, 1990 (Figura 2) (Lewis *et al.*, 1993). Os nematídeos “cruiser” não aguardam a passagem do hospedeiro, mas buscam-no ativamente no solo, respondendo positivamente a diversos compostos voláteis e CO₂, deslocando-se a uma certa distância até localizá-lo (resposta direcional), como é o caso de espécies como *H. bacteriophora* e *S. glaseri* (Ishibashi & Kondo, 1990). Ainda assim, existem espécies de NEPs que apresentam características tanto de “ambushers” como de “cruisers”, de acordo com a proximidade do hospedeiro, como é o caso de *S. feltiae* (Grewal *et al.*, 1994).

Legislação e Regulamentação

Os pesquisadores norte-americanos sempre lideraram tanto a utilização dos agentes do controle biológico como as atividades de introdução destes agentes. As regras para introdução foram elaboradas pelo Serviço de Inspeção Sanitária Animal e Vegetal (APHIS), do Departamento de Agricul-

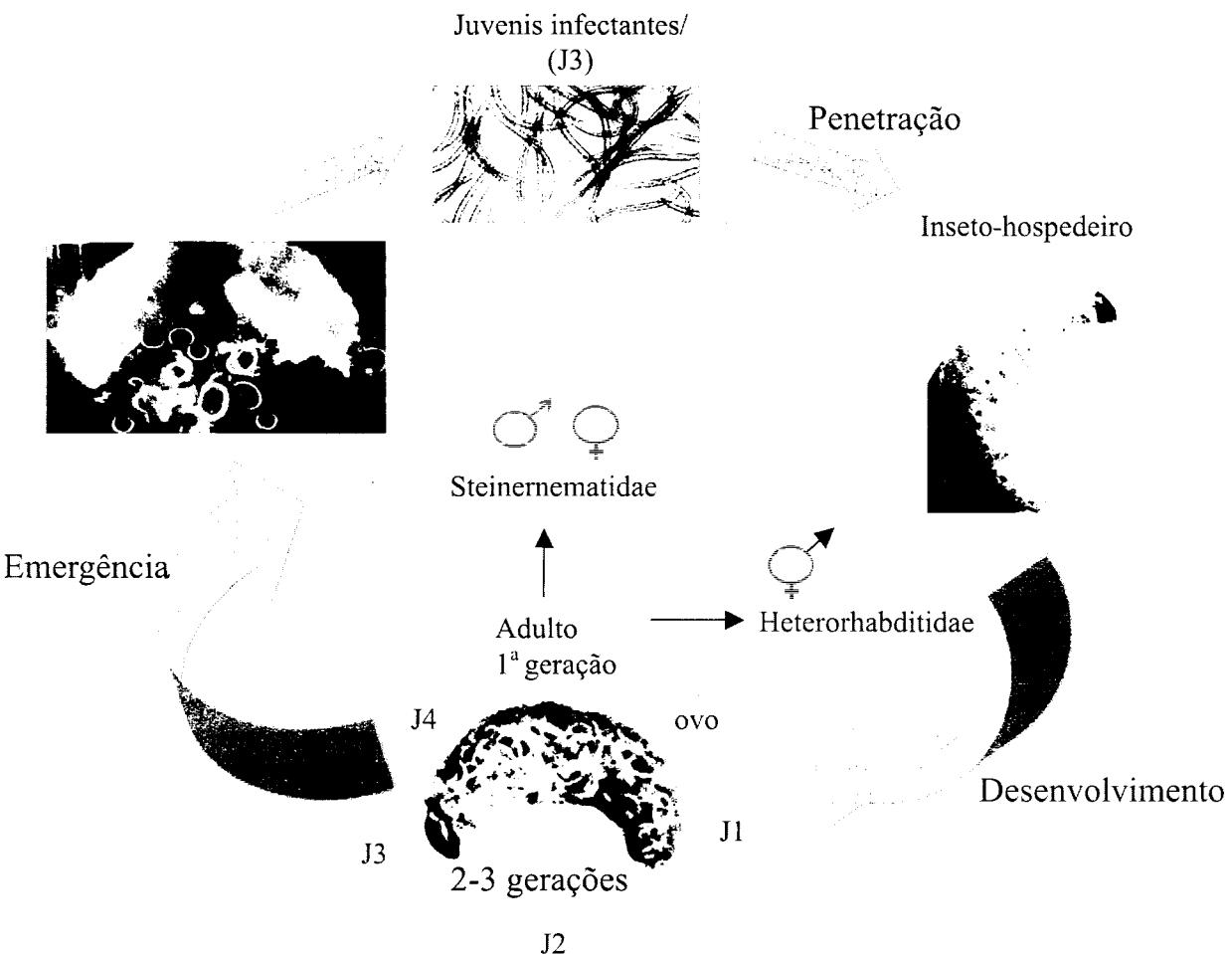


Figura 2. Juvenil infectante de nematóide entomopatogênico do tipo “ambusher”. Após a nictação, o nematóide salta sobre o inseto-hospedeiro. Desenho estilizado.

cultura dos EUA (USDA). Entre as regras está a solicitação da Avaliação de Impacto Ambiental (EIA) ou Declaração de Impacto Ambiental (EIS) para introdução de agentes microbianos de controle. O critério para determinar se um organismo exige EIS ou EIA está descrito em Coulston *et al.* (1991) (*apud* De Nardo *et al.*, 1998). As dificuldades de implementar esse sistema vão desde a quantidade de informações a serem submetidas à análise de impacto, até a definição do tamanho da área experimental (De Nardo *et al.*, 1998).

A grande demanda por nematóides entomopatogênicos, nos Estados Unidos, que surgiu na década de 80, levou muitos grupos de pesquisadores em vários países do mundo a isolar novas espécies e linhagens de NEPs. Essas

amostragens e isolamentos expandiram em muito o germoplasma de nematóides entomopatogênicos disponível para pesquisa, aumentando o risco da introdução de nematóides exóticos. Por exemplo, os nematóides *S. scapterisci* e *S. feltiae* foram introduzidos, multiplicados e comercializados sem critério, visando o controle de pragas nos Estados Unidos (R. Georgis, 2005; comunicação pessoal). Isso resultou em muitas críticas por parte de alguns pesquisadores, e em 1988, Nickle e colaboradores propuseram um guia para introdução de nematóides entomopatogênicos, que originou, mais tarde, da legislação específica sobre introdução de espécies exóticas de NEPs (Rizvi *et al.*, 1996).

No caso específico dos NEPs nos EUA, hoje, todas introduções de nematóides devem ser notificadas e todos os nematóides são analisados, identificados e estudados quanto a diversos fatores, que foram extensivamente discutidos por Jansson (1993) antes da legislação ser estabelecida. Dentre esses fatores, o autor destacou como de maior importância: 1) o impacto dos nematóides exóticos em organismos não-alvo; 2) os efeitos desses nematóides no microcosmos local, principalmente com relação a outros nematóides; e 3) sua capacidade de deslocar ou eliminar nematóides entomopatogênicos existentes no local (nativos).

Após tantas introduções aleatórias, os Estados Unidos se comportam como exemplo, pois promovem levantamentos do microcosmos e testes de patogenicidade com invertebrados locais, antes de fazer qualquer introdução de NEPs exóticos.

Na Europa, a situação foi um pouco diferente (Ehlers, 1996). Enquanto discussões estavam ocorrendo nos Estados Unidos, na Europa, um comitê foi estabelecido para analisar o caso dos NEPs, prevendo problemas associados com a introdução de nematóides exóticos. Os membros desse comitê concluíram que evidências científicas suportavam a premissa de que nematóides entomopatogênicos são inócuos a animais de sangue quente, e poucos riscos ao ambiente foram identificados. Recomendaram também que os nematóides não precisariam de registro, mas que a introdução dos exóticos fosse regulada. Este comitê também concluiu que nematóides entomopatogênicos são organismos benéficos, e que vêm sendo usados há muitos anos sem causar problemas e que são mais específicos e representam menor ameaça ao ambiente do que os pesticidas químicos comumente utilizados (Ehlers & Hokkanen, 1996; Richardson, 1996).

A legislação que vem sendo considerada como das mais eficientes do mundo é a Australiana, que exige inicialmente uma permissão federal para importar um organismo, seguindo os procedimentos da Agência de Proteção Ambiental daquele país (De Nardo *et al.*, 1998).

O impacto causado por NEPs após aplicações em grandes quantidades (inundativas) foi estabelecido por Barbercheck & Millar (2000). Segundo estes autores, NEPs teriam o potencial de infectar espécies não-alvo suscetíveis, com estágios no solo no momento da aplicação dos nematóides. Vale ressaltar que isto não ocorre com a maioria dos parasitóides ou predadores, pois o solo não é o local preferencial desses organismos. Alguns testes com diferentes invertebrados são mostrados na Tabela 2. É importante enfatizar que as minhocas não são suscetíveis a estes nematóides (Akhurst & Smith, 2002).

Com relação aos vertebrados, inúmeros nematóides entomopatogênicos foram testados em diversas espécies, desde peixes até macacos (Tabela 3). Apenas girinos de sapos e rãs se mostraram suscetíveis quando nematóides foram adicionados à água onde estavam. Akhurst & Smith (2002) acreditam que as dosagens usadas em ambos os testes com girinos tenham sido demasiadamente altas e que outras menores deveriam ter sido testadas.

Finalizando, as bactérias entomopatogênicas associadas aos NEPs não são consideradas perigosas ao ambiente, pois nunca foram detectadas fora do nematóide ou do hospedeiro, pois aparentemente sua permanência no solo é mínima, já que não possuem formas de sobrevivência, como algumas bactérias esporulantes (Akhurst & Smith, 2002).

Por outro lado, novas linhas de pesquisas com bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, que visam o isolamento de toxinas dessas bactérias para utilização direta como ingredientes ativos de inseticidas sintéticos, ou mesmo a introdução de seqüências gênicas que codificam essas toxinas em plantas estão sendo desenvolvidas por processos de transformação genética. Nesse caso, como em outros exemplos já existentes, deve-se também primar pela realização de testes de biossegurança e avaliação de impacto ambiental, por se tratar de algo novo e não encontrado na natureza, como dito anteriormente.

Com relação à introdução de agentes do controle biológico no Brasil, a legislação foi fundamentada no Decreto Presidencial 24.114, de 12 de abril de 1934, que regulamentou a Defesa Sanitária Vegetal, seguido de várias outras leis, das quais se destacam a Portaria 106, de 14 de novembro de 1991 e a Portaria 74, de 7 de março de 1994, que se referem ao Laboratório de Quarentena "Costa Lima", localizado na Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna, SP, como o órgão responsável pelas atividades relativas à introdução de agentes de controle biológico (ACB) no país, e por colaborar com instituições nacionais e internacionais na exportação de ACBs para o exterior. Esse laboratório segue o Protocolo de Avaliação de Risco de Introdução de Agentes de Controle Biológico (Moraes *et al.*, 1996; De Nardo *et al.*, 1998; Sá *et al.*, 2002). Vale ressaltar que, atualmente, para exportação de organismos é necessário o Termo de Transferência de Material (TTM) e para os pesquisadores da EMBRAPA, o Acordo de Transferência de Material (ATM).

Além da legislação quanto à introdução e exportação dos agentes de controle biológico, os NEPs são também regidos pela Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, e seu Decreto regulador nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que

Tabela 2. Exemplos de efeitos causados por nematóides entomopatogênicos em invertebrados. Baseado em Akhurst & Smith, 2002.

Organismo não-alvo	Espécie de nematóide testada	Efeito
Parasitóides		
<i>Apanteles militares</i> (Hym.: Braconidae)	<i>Steinernema carpocapsae, Heterorhabditis bacteriophora,</i>	Indireto em laboratório (hospedeiro morto)
<i>Compsilura concinnata</i> (Dip.: Tachinidae)	<i>S. carpocapsae</i>	Indireto em laboratório (hospedeiro morto)
<i>Cephalcia arvensis</i> (Hym.: Ichneumonidae)	<i>S. feltiae</i>	Reduzida emergência no campo
Insetos Predadores		
<i>Harmonia axyridis</i> (Col.: Coccinellidae)	<i>S. carpocapsae</i>	Em placa de Petri algumas joaninhas ficaram temporariamente paralisadas e outras morreram.
<i>Harpalus</i> sp. e <i>Pterostaticus</i> sp. (Col.: Carabidae); <i>Cicindela</i> sp. e <i>Tetracha</i> sp. (Col.: Cicindelidae); <i>Philonthus</i> sp. (Col.: Staphylinidae); <i>Labidura riparia</i> (Derm.: Labiduridae)	<i>S. carpocapsae, H. bacteriophora</i>	Em laboratório formas imaturas foram mortas, mas não adultos; não houve efeito nas populações no campo.
<i>Bembidion proerans, Pterostichus cupreus</i> (Col.: Carabidae)	<i>S. carpocapsae</i>	Em testes no laboratório adultos mortos, larvas não; pequena redução nas populações no campo.
Outros invertebrados		
<i>Onychiurus</i> (Collembola)	<i>S. carpocapsae</i>	Redução nas populações no campo
<i>Scutigerella immaculata</i> (Symphyla)	<i>S. carpocapsae</i>	Mortos em laboratório
<i>Armadillidium vulgare, Porcellio scaber</i> (Crustácea: Isopoda)	<i>S. carpocapsae, H. bacteriophora, S. glaseri</i>	Mortos em laboratório pelos dois primeiros, mas não por <i>S. glaseri</i>
<i>Atya innocous, Macrobrachium acanthurus</i> (Crustacea: Caridae)	<i>S. carpocapsae</i>	Sem efeito no laboratório
Várias espécies de Arachnida	<i>H. bacteriophora</i>	Mortos no laboratório
<i>Aporrectodea</i> sp.	<i>S. carpocapsae</i>	Minhocas intactas não foram afetadas
<i>Aporrectodea caligionosa</i>	<i>Steinernema</i> sp.	Sem efeito nos casulos das minhocas em laboratório
<i>Aporrectodea turgida, Aporrectodea tapezoides, Lumbricus terrestris</i> e <i>Eisenia</i> sp.	<i>S. carpocapsae, S. glaseri</i>	Sem efeito no laboratório
<i>Macrobiotus richtersi</i> (Tardigrada)	<i>S. carpocapsae</i>	Infecções no laboratório
<i>Dericeras agreste, D. reticulatum</i> (Gastropoda)	<i>S. carpocapsae</i>	Mortos no laboratório

legislam sobre agrotóxicos e afins. Nessa lei ficou estabelecida a necessidade do Registro Especial Temporário (RET) para os agentes de controle biológico antes da sua liberação a campo. A Instrução Normativa Conjunta (INC) nº 25, de 14 de setembro de 2005, reduz as exigências

para a aquisição do RET para agentes de controle biológico, em comparação com o que se exige para os agrotóxicos (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006).

Após inúmeras consultas públicas e muita discussão entre os órgãos federais; Ministério da Agricultura, Pecuá-

Tabela 3. Testes dos efeitos de nematóides entomopatogênicos e sua bactérias simbiontes em vertebrados.
Baseado em Akhurst & Smith, 2002.

Animal testado	Espécie de nematóide	Aplicação	Efeito
Porquinho da Índia	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	Oral, nasal, intradermal, subcutânea, intraperitoneal	Sem efeito patogênico
Rato	<i>Steinernema glaseri</i>	Intraperitoneal	Sem efeito patogênico
	<i>S. carpocapsae</i>	Oral, intraperitoneal	Sem efeito patogênico ou efeito no ganho de peso
	<i>X. bovienii</i>	Oral, intradermal, subcutânea, intraperitoneal	Sem efeito patogênico
Camundongo	<i>S. carpocapsae</i>	Oral, subcutânea, intraperitoneal	Úlceras na pele quando administrado subcutaneamente
	<i>S. feltiae, S. glaseri,</i>	Oral, subcutânea, intraperitoneal	Sem efeito patogênico
	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Oral	Sem efeito patogênico
	<i>S. carpocapsae, H. bacteriophora</i>	Subcutânea	Sem efeito patogênico
	<i>X. nematophila, Photorhabdus luminescens</i>	Subcutânea, intracerebral	Sem efeito patogênico
Coelho	<i>X. bovienii</i>	Oral, nasal, intradermal, subcutânea, intraperitoneal	Sem efeito patogênico
	<i>S. glaseri</i>	Oral, abdominal, cavidade orbital	Sem efeito patogênico
	<i>X. bovienii</i>	conjuntiva	Sem efeito patogênico
Macaco	<i>S. glaseri</i>	Oral, abnominal, nasal	Sem efeito patogênico
Galinha	<i>S. carpocapsae</i>	oral	Sem efeito patogênico
	<i>X. nematophila, P. luminescens</i>	subcutânea	Sem efeito patogênico
Sapo	<i>S. carpocapsae</i>	Na água	Girinos mortos
Rã	<i>S. carpocapsae, H. bacteriophora, S. anomali, S. feltiae, Heterorhabditis sp.</i>	Na água	Girinos mortos, adultos não afetados
Peixe	<i>S. carpocapsae</i>	Na água	Sem efeito patogênico
Salamandra	<i>S. carpocapsae, S. glaseri, S. anomali, S. feltiae, Heterorhabditis sp.</i>	oral	Sem efeito patogênico; presença de outras bactérias no figado (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Chromobacterium</i> sp.)

ria e Abastecimento (MAPA), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), foi formulada uma INC que legisla sobre a produção e comercialização de inimigos naturais e nematóides, que foi publicada no Diário Oficial da União como INC nº 2 em 23 de janeiro de 2006. Sendo esse, um importante marco na utilização dos NEPs no Brasil, pois espécies exóticas indevidamente introduzidas e produtos não registrados, serão considerados ilegais (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006).

Considerações finais

Existe um grande potencial para a utilização dos nematóides entomopatogênicos como agentes do controle biológico de pragas e vetores. Contudo, para que realmente haja sucesso, a escolha do nematóide/linhagem deve ser feita com critério e parcimônia.

Nematóides nativos devem ser devidamente identificados em espécies, e ter sua biologia definida antes de serem usados a campo. Com relação à biologia, existem diferentes aspectos que podem ser observados como, por exemplo, a progénie produzida em larvas de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) (espécie utilizada como inseto-padrão nos estudos com NEPs). Outra característica importante seria a temperatura ótima para migração, e reprodução desses nematóides. Testes de patogenicidade e virulência em laboratório devem ser feitos para que se conheça a espécie ou linhagem que causaria maior mortalidade em menor tempo a uma determinada praga ou vetor. Alguns nematóides possuem alta especificidade, outros nem tanto, por isso o ideal é buscar sempre aqueles com menor espectro de hospedeiros.

A utilização de nematóides nativos deve ter prioridade sobre os exóticos, que devem ser aplicados em último caso, respeitando-se as condições impostas pela legislação vigente. Os nativos já estão adaptados às condições climáticas como também à entomofauna local. Como não se conhece o impacto real que estes nematóides exóticos podem causar aos nativos, recomenda-se que, pelo menos, sejam feitos testes em laboratório contra os inimigos naturais encontrados na área a ser aplicada. Esses nematóides exóticos devem ser aplicados localmente e cuidados extras devem ser tomados para não serem dispersos.

Estudos com NEPs como agentes do controle biológico, no Brasil, estão no início, mas existe grande potencial para que avancem e tornem-se populares controladores de pragas e vetores, com o desenvolvimento de produtos co-

merciais eficientes, de qualidade comprovada, e com características que garantam segurança ao ambiente, ao homem e aos organismos não-alvo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Ricardo M. Souza pelas discussões e aos revisores *ah doc* pelas sugestões enriquecedoras.

Literatura Citada

- ACEVEDO, J.P.M.; A. MOINO JR.; R.S. CAVALCANTI; C. DOLINSKI & F.A. CARVALHO. 2005. Amostragem e Avaliação de Técnicas para Isolamento de Nematóides Entomopatogênicos Nativos. *Nematologia Brasileira*, 29(1): 17-23.
- ADAMS, B.J. & K.B. NGUYEN. 2002. Taxonomy and Systematics. In: GAUGLER R. (ed). *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, New York, NY, p. 1-34.
- ADAMS, B.J.; A. FODOR; M.G. KLEIN; H.L. SMITH; E. STACKEBRANDT & S.P. STOCK. 2006. Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. *Biological Control* 37(1): 32-49.
- AKHURST, R. & K. SMITH. 2002. Regulation and safety. In: GAUGLER, R. (ed). *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing New York, NY, p. 311-332.
- BARBERCHECK, M.E. & L.C. MILLAR. 2000. Environmental impacts of entomopathogenic nematodes used for biological control in soil. In: FOLLETT, P.A.; DUAN, J.J. (eds). *Non target effects of Biological Control*. Kluwer Academic Publishers, Boston, p. 287-308.
- BOFF, M.I.C., G.L. WIEGERS, L.J.M. GERRITSEN & P.H. SMITS. 2000. Development of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E87.3 in *Galleria mellonella*. *Nematology* 2: 303-308.
- DE NARDO, E.A.B.; G.J. MORAES & L.A.N. SÁ. 1998. Regulamentação do uso de agentes microbianos de controle. In: ALVES, S.B. (ed). *Controle Microbiano de insetos*. FEALQ, Piracicaba, SP, p. 1119-1142.
- DOWDS, B.C.A. & A. PETERS. 2002. Virulence Mechanisms. In: GAUGLER, R. (ed). *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, New York, NY, p. 79-98.

- EHLERS, R.U. & HOKKANEN, H.M.T. 1996. Insect control with non-endemic entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp.): conclusions and recommendations of a combined OECD and COST workshop on scientific and regulatory policy issues. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 295-302.
- EHLERS, R.U. 1996. Current and future use of nematodes in biocontrol: Practice and commercial aspects with regard to regulatory policy issues. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 303-316.
- FORST, S. & D. CLARKE. 2002. Bacteria-Nematode Symbiosis In: GAUGLER, R. (ed). *Entomopathogenic Nematology*. Boca Raton, FL. CRC Press, p. 57-77.
- FOWLER, H.G. 1988. Occurrence and infectivity of entomogenous nematodes in mole crickets in Brazil. *International Rice Research Newsletter* 113(3): 34-35.
- GREWAL, P.S.; E. LEWIS; R. GAUGLER & J.F. CAMPBELL. 1994. Host finding behavior as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. *Parasitology*, 108(2): 207-215.
- HOMINICK, W.H. 2002. Biogeography. In: GAUGLER, R. (ed.). *Entomopathogenic nematology*. New Jersey: Rutgers University, p. 115-143.
- ISHIBASHI, N. & E. KONDO. 1990. Behaviour of infective juveniles. In: GAUGLER, R. & KAYA, H.K. (eds). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press Inc.; Boca Raton, FL, p. 139-150.
- JANSSON, R.K. 1993. Introduction of exotic entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) for biological control of insects: potential and problems. *Florida Entomologist*, 76 (1): 82-96.
- LEWIS, E.E.; R. GAUGLER & R. HARRISON. 1993. Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. *Canadian Journal of Zoology*, 71(4):765-769.
- MACHADO, I.R., C. DOLINSKI. 2005. Identificação de um isolado de nematóide entomopatogênico proveniente da Floresta Amazônica em Monte Negro, RO: Parte II. In: 10º ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2005, Anais. Campos dos Goytacazes. p. 213.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. <http://www.agricultura.gov.br/>. Acessado em março 2006.
- MORAES, G.J. DE; L.A.N. SÁ & F.J TAMBASCO. 1996. Legislação Brasileira sobre o intercâmbio de agentes de controle biológico. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA. 16p. (EMBRAPA-CNPMA. Documentos, 3).
- NGUYEN, K.B. & G.C. SMART. 1994. *Neosteinernema longicurvicauda* n. gen., n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a parasite of the termite *Reticulitermes flavipes* (Koller). *Journal of Nematology*, 26: 162-174.
- NGUYEN, K.B. <http://kbn.ifas.ufl.edu/gaster/identify.htm>. Acessado em 2005.
- NICKLE, W.R.; J.J. DREA & J.R. COULSON. 1988. Guidelines for introducing beneficial insect-parasitic nematodes into the United States. *Annals Applied Nematology*, 2: 50-56.
- PATEL, M.N.; M. STOLINSKI & D.J. WRIGHT. 1997. Neutral lipids and the assessment of infectivity in entomopathogenic nematodes: observations on four *Steinernema* species. *Parasitology*, 114: 489-496.
- PETERS, A. 1996. The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 389-402.
- POINAR JR, G.O. 1990. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R. & KAYA, H.K. (eds). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press Inc.; Boca Raton, FL, p. 23-58.
- RASMANN, S.; T.G. KÖLLNER; J. DEGENHARDT; I. HILTPOLD; S. TOEPFER; U. KUHLMANN; J. GERSHENZON & T.C.J. TURLINGS. 2005. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, 434:732-737.
- RICHARDSON, P.N. 1996. British and European legislation regulating rhabditid nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 449-463.
- RIZVI, S.A.; R. HENNESSEY & D. KNOTT. 1996. Legislation on the introduction of exotic nematodes in the US. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 477-480.
- SÁ, L.A.N. de; E.A.B de NARDO; F.J. TAMBASCO. 2002. Quarentena de agentes de controle biológico. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-

- FERREIRA, B.S. & BENTO, J.M.S. (eds.). Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. p. 43-70.
- VAN TOL, R.W.H.M.; A.T.C. VAN DER SOMMER; M.I.C. BOFF; J. VAN BEZZOOIJEN; M.W. SABLEÉIS & P.H. SMITS. 2001. Plants protect their roots by alerting the enemies of grubs. *Ecology Letters*, 4(4): 292-294.
- WOODRING, J.L. & H.K. KAYA. 1988. Sternematidae and Heterorhabditidae nematodes: a handbook of techniques. Southern cooperative. Arkansas: Arkansas Agricultural Experimental Station Falletteville, Series Bulletin 331. 88 p.
- WOUTS, W., M.Z. MRACEK, S. GERDIN, R.A. BEDDING. 1982. *Neoplectana* Steiner, 1929 a junior synonym of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda: Rhabditida). *Systematic Parasitology* 4, 147-154.
- WOUTS, W.M. 1991. *Steinernema* and *Heterorhabditis* species. In: NICKLE, W.R. (ed). *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, Inc. New York, p. 855-897.

Reação de Dez Coberturas Vegetais a *Pratylenchus brachyurus*

MÁRIO MASSAYUKI INOMOTO^{1,2}, LUIS CLÁUDIO CABRAL MOTTA^{1,3}, ANDRESSA CRISTINA ZAMBONI MACHADO^{1,4} & CATIA SUMIE SHIMATAI SAZAKI^{1,4}

¹Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias, 11. CEP 13418-900 Piracicaba, SP. E-mail: mminomot@esalq.usp.br; ²Bolsista CNPq, ³Bolsista Fealq, ⁴Bolsista Fapesp.

Recebido para publicação em 06/01/2006. Aceito em 12/08/2006

Resumo – Inomoto, M.M.; L.C.C. Motta; A.C.Z. Machado & C.S.S. Sazaki. 2006. Reação de dez coberturas vegetais a *Pratylenchus brachyurus*.

O sistema plantio direto, em que a semeadura é feita em substrato que não sofreu aração ou gradeação, tem sido muito utilizado em vários países agrícolas importantes, como Estados Unidos e Brasil. Porém, informações sobre o efeito do plantio direto na população de fitonematoides são escassas. Pode-se admitir que o uso de coberturas vegetais no outono ou inverno, prática freqüente em áreas agrícolas sob plantio direto no Brasil, pode afetar a população desses parasitas no solo. Em vista disso, foram feitos três experimentos em casa de vegetação com objetivo de avaliar o efeito de dez espécies ou híbridos utilizados como coberturas vegetais sobre a população do nematóide das lesões *Pratylenchus brachyurus*. As plantas testadas foram amaranto granífero ‘BRS Alegria’ (*Amaranthus cruentus*); aveia preta ‘Comum’ e ‘Campeira Mor’ (*Avena strigosa*); girassol ‘IAC Uruguai’ (*Helianthus annuus*); milheto ‘BRS 1501’ e ‘BN 2’ (*Pennisetum glaucum*); nabo forrageiro ‘Comum’ (*Raphanus sativus* var. *oleiferus*); quenaf (*Hibiscus cannabinus*); quinoa ‘BRS Piabiru’ (*Chenopodium quinoa*); sorgo forrageiro ‘BRS 800’ (*Sorghum bicolor* x *S. sudanense*); sorgo duplo propósito (forrageiro e silageiro) ‘IPA 7301011’ (*S. bicolor*); e tef (*Eragrostis tef*). As coberturas foram cultivadas em copos plásticos de 500 cm³ e o nematóide utilizado como inóculo na proporção de 270 indivíduos por copo nos experimentos I e III, e 700 por copo no experimento II. A reprodução de *P. brachyurus*, nas coberturas vegetais, foi avaliada, 52-67 dias após a inoculação, pela extração de espécimes presentes no solo e raízes e cálculo do fator de reprodução (FR = Pf/Pi). Os sorgos ‘IPA 7301011’ e ‘BRS 800’ foram as coberturas mais suscetíveis a *P. brachyurus* (FR > 3,0), enquanto o amaranto granífero ‘BRS Alegria’ e a quinoa ‘BRS Piabiru’ foram as mais resistentes (FR < 1,0). Portanto, o sorgo deve ser evitado em áreas infestadas por *P. brachyurus*, enquanto o amaranto granífero e a quinoa, não. Os fatores de reprodução em milheto ‘BRS 1501’, aveia preta ‘Comum’ e ‘Campeira Mor’, girassol ‘IAC Uruguai’ e nabo forrageiro ‘Comum’ foram muito próximos a 1,0. Portanto, o uso dessas espécies, como coberturas de outono ou inverno, provavelmente deverá afetar pouco a população de *P. brachyurus* no solo.

Palavras-chave: *Amaranthus cruentus*, *Avena strigosa*, *Chenopodium quinoa*, *Eragrostis tef*, *Helianthus annuus*, *Hibiscus cannabinus*, nematóide das lesões, *Pennisetum glaucum*, plantio direto, *Raphanus sativus* var. *oleiferus*, resistência, *Sorghum bicolor*, *Sorghum sudanense*, suscetibilidade.

Summary – Inomoto, M.M.; L.C.C. Motta; A.C.Z. Machado & C.S.S. Sazaki. 2006. Host status of ten cover crops for *Pratylenchus brachyurus*.

No tillage system, or planting directly into an untilled seedbed, has been extensively used in many important agricultural countries, such as in the United States and Brazil, but there is a lack of information regarding the effect of no tillage on phytonematode populations. The use of autumn or winter cover crops, a very usual practice in cropland under no tillage in Brazil, may affect the soil population of these parasites. Thus, three greenhouse experiments were carried out in order to evaluate the effect of ten species or hybrids used as cover crops in no tillage on the population of the lesion nematode *Pratylenchus brachyurus*: grain amaranth ‘BRS Alegria’ (*Amaranthus cruentus*); black oat ‘Comum’ and ‘Campeira Mor’

(*Avena strigosa*); sunflower 'IAC Uruguai' (*Helianthus annuus*); pearl millet 'BRS 1501' and 'BN 2' (*Pennisetum glaucum*); oil radish 'Comum' (*Raphanus sativus* var. *oleiferus*); kenaf (*Hibiscus cannabinus*); quinoa 'BRS Piabiru' (*Chenopodium quinoa*); forage sorghum 'BRS 800' (*Sorghum bicolor* x *S. sudanense*); dual purpose (forage and silage) sorghum 'IPA 7301011' (*S. bicolor*); and tef (*Eragrostis tef*). The cover crops were cultivated in 500-mL-pots and the nematode was inoculated at the rate of 270 specimens per pot in experiments 1 and 3, and 700 specimens per pot in experiment 2. Reproduction of *P. brachyurus* on the cover crops was evaluated 52-67 days after inoculation, by extracting soil and root nematodes and calculating the reproduction factor (FR). Sorghum 'IPA 7301011' and 'BRS 800' were the most susceptible hosts for *P. brachyurus* (FR > 3.0) and grain amaranth 'BRS Alegria' and quinoa 'BRS Piabiru' were the most resistant ones (FR < 1.0). Thus, sorghum should be avoided in croplands infested with *P. brachyurus*; conversely, grain amaranth and quinoa may be recommended. The reproduction factors on pearl millet 'BRS 1501', black oat 'Comum' and 'Campeira Mor', sunflower 'IAC Uruguai' and oil radish 'Comum' were very close to 1.0. Thereafter, the use of those species as autumn or winter cover crop probably does not affect the soil population of *P. brachyurus*.

Keywords: *Amaranthus cruentus*, *Avena strigosa*, *Chenopodium quinoa*, *Eragrostis tef*, *Helianthus annuus*, *Hibiscus cannabinus*, lesion nematode, no tillage, *Pennisetum glaucum*, *Raphanus sativus* var. *oleiferus*, resistance, *Sorghum bicolor*, *Sorghum sudanense*, susceptibility.

Introdução

O nematóide das lesões *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filipjev & S. Stekhoven ocorre com elevada freqüência em culturas importantes no Brasil, a exemplo do algodão (*Gossypium hirsutum* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), café (*Coffea arabica* L. e *C. canephora* Pierre), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja [*Glycine max* (L.) Merr.] (Lopes & Lordello, 1980; Menten *et al.*, 1980; Silva *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004; Kubo *et al.*, 2004). Entretanto sua importância, muitas vezes, é subestimada devido à ocorrência concomitante de espécies mais daninhas, como *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood e *M. javanica* (Treub) Chitwood. Pode-se antever aumento gradativo da importância de *P. brachyurus*, com o uso cada vez mais freqüente do sistema plantio direto (SPD) no Brasil, que foi de aproximadamente 21.863.000 ha na safra 2003/04 (Federação Brasileira de Plantio Direto na Palha, 2005). No SPD, as culturas são, temporalmente, muito próximas uma das outras, pois além da cultura de verão, cultivam-se outras de outono-inverno ou inverno-primavera, geralmente milho safrinha ou uma cobertura vegetal. Teoricamente, essa característica do SPD favorece o aumento populacional dos fitonematóides polífagos existentes no solo, caso de *P. brachyurus*, ao qual a maioria das plantas cultivadas, tanto as de verão como de inverno, é suscetível, ou seja, causa seu aumento populacional. Dependendo do grau de suscetibilidade das coberturas aos nematóides, as populações desses parasitos podem aumentar até densidades suficientemente altas para prejudicar a cultura de verão (Gallaher *et al.*, 1988).

No Brasil, atualmente o milheto [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Brown] é a cobertura vegetal mais utilizada no SPD, ocupando anualmente 3 a 4 milhões de ha, e a soja, a principal cultura de verão (Alvarenga *et al.*, 2001; Mingardo, 2005). Outras plantas utilizadas como cobertura vegetal são aveia preta (*Avena strigosa* Schreb.) e nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Metzg); opções para o futuro são sorgo forrageiro [*Sorghum bicolor* (L.) Moench e *S. bicolor* x *S. sudanense* (Piper) Stapf], girassol (*Helianthus annuus* L.), os amarantos (*Amaranthus* spp.), quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), quenaf (*Hibiscus cannabinus* L.), pé-de-galinha [*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.] e tef [*Eragrostis tef* (Zuccagni) Trotter], entre outras (Alvarenga *et al.*, 2001). No entanto, há poucas informações a respeito do efeito dessas plantas sobre a população de *P. brachyurus*.

Para pesquisar o assunto, três experimentos foram desenvolvidos em condições de casa de vegetação, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, campus de Piracicaba, com o objetivo de estimar o efeito de algumas coberturas vegetais na densidade populacional de *P. brachyurus* e assim fornecer indicações que possam ser recomendadas para plantio em áreas infestadas com o nematóide.

Material e Métodos

No experimento I, foram testadas oito coberturas vegetais: amaranto granífero (*Amaranthus cruentus* L. 'BRS Alegria'), aveia preta (*Avena strigosa* 'Comum'), girassol

(*Helianthus annuus* 'IAC Uruguai'), milheto (*Pennisetum glaucum* 'BRS 1501'), nabo forrageiro (*Raphanus sativus* var. *oleiferus* 'Comum'), quinoa (*Chenopodium quinoa* 'BRS Piabiru'), sorgo duplo propósito – silageiro e forrageiro (*Sorghum bicolor* 'IPA 7301011') e tef (*Eragrostis tef*). Milho (*Zea mays* L. 'BRS 206') e tagetes anão (*Tagetes patula* L.) foram incluídos como padrões de suscetibilidade e resistência a *P. brachyurus* (Machado & Inomoto, 2001), permitindo a avaliação comparativa da reação das espécies testadas a despeito do efeito de outros fatores, como duração do experimento e temperatura do solo. O experimento seguiu delineamento inteiramente casualizado, com dez tratamentos e cinco repetições.

O substrato utilizado no experimento foi uma mistura de solo argiloso e areia, na proporção de 1:1, desinfestado com brometo de metila (150 mL de CH₃Br por 1.000 L de substrato). Amaranto, quinoa, tef e tagetes anão foram semeados em bandejas e, 30 dias depois, transferidos para copos plásticos de 500 mL, contendo 400 mL de substrato desinfestado. Tendo por base o tamanho das plântulas dessas espécies, uma plântula de amaranto ou quinoa e duas de tef ou tagetes anão foram transplantadas para cada copo. Aveia preta, girassol, milheto, nabo forrageiro, sorgo forrageiro e milho foram semeados diretamente nos copos e, logo após a germinação, as plântulas foram desbastadas, deixando-se duas. Cada copo foi considerado uma parcela experimental.

O isolado de *P. brachyurus* foi obtido de raízes de quiabeiro [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench], do município de Seropédica, RJ, e mantido em laboratório, em calos de alfafa (*Medicago sativa* L.) segundo a técnica de Riedel et al. (1973). 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 & Golden (1989). Para obtenção do inóculo, juvenis e fêmeas do nematóide foram extraídos dos calos por meio do método do funil de Baermann, modificado para recipiente raso (Hooper, 1986). As inoculações foram feitas em 27/10/2000, pela pipetagem de 4 mL da suspensão aquosa, totalizando 270 nematóides por parcela, em dois orifícios de 2 cm de profundidade, distantes 1 cm das plântulas. As plantas foram mantidas, durante o período experimental, em casa de vegetação dotada de sistema de refrigeração e regulada para entrar em funcionamento sempre que a temperatura no seu interior atingisse 31°C.

A avaliação foi feita em 18/12/2000, ou seja, 52 dias após a inoculação (dai). Os copos foram imersos em balde de 10

L contendo 4 L de água de torneira, para separação do substrato das raízes. Depois de lavadas com água de torneira e enxugadas com papel absorvente, as raízes foram armazenadas em geladeira a 6°C. O substrato foi processado por peneiramento [peneiras com malha de 0,85 mm (20 "mesh") e 0,038 mm de abertura (400 "mesh")] e centrifugação em sacarose para extração dos nematóides (Jenkins, 1964). Ao término do processamento do substrato, as raízes foram pesadas e 5 g processados pelo método de liquidificador, peneiramento [malhas com 0,85 (20 "mesh") e 0,025 mm (500 "mesh")] e centrifugação (Coolen & D'Herde, 1972). Os nematóides extraídos foram contados sob microscópio óptico, com auxílio de lâmina de Peters, obtendo-se as estimativas populacionais finais (Pf) nas raízes e no substrato, em cada parcela. As Pf das raízes e do substrato foram somadas para chegar à Pf total; esse valor foi dividido pela Pi (= 270), obtendo-se o fator de reprodução (FR) do nematóide em cada parcela. Os valores de FR foram submetidos à análise de variância com auxílio do programa Sanest (Ciagri e Departamento de Matemática e Estatística, ESALQ/ USP, Piracicaba, SP). Como os dados do experimento apresentavam grande variação, foram transformados para $\ln(x+1)$ antes da análise. Após análise, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de significância ($P = 0,05$). As espécies com FR equivalente ao do milho foram consideradas suscetíveis a *P. brachyurus* e as com fator equivalente ao tagetes anão, resistentes.

Os experimentos II e III foram realizados com metodologia idêntica à descrita acima, exceto pela inclusão ou exclusão de algumas espécies. O objetivo foi confirmar os resultados obtidos no experimento I. No experimento II, nove diferentes coberturas foram testadas, com exclusão da quinoa e inclusão do quenaf (*Hibiscus cannabinus* L. código 'FT84-65709', sementes fornecidas pela Embrapa Cerrados, Planaltina, DF) e da aveia preta 'Campeira Mor' (= 'Embrapa 140'); além disso, o inóculo (Pi = 700) foi maior que o utilizado no experimento I. A inoculação foi feita em 25/5/2001 e a avaliação 59 dai, ou seja, em 23/7/2001.

No experimento III, oito coberturas foram testadas: as mesmas do experimento I, exceto aveia preta 'Comum', quinoa e tef, que não foram testadas, e aveia preta 'Campeira Mor', milheto 'BN 2' e sorgo forrageiro 'BRS 800' [*S. bicolor* x *S. sudanense* (Piper) Stapf], que foram incluídas. Neste experimento, não se obteve germinação satisfatória das sementes de tagetes anão, razão pela qual o padrão de resistência para *P. brachyurus* passou a ser amaranto 'BRS Alegria', que foi equivalente ao tagetes anão nos experi-

mentos anteriores (Tabela 1). A quantidade de inóculo foi a mesma do experimento I (270 nematóides por parcela). A inoculação foi feita em 26/11/2004 e a avaliação em 1/2/2005, 67 dai. A duração dos experimentos II e III foi mais longa que do experimento I, porque neste o FR foi baixo, mesmo na planta padrão de suscetibilidade, demonstrando a necessidade de períodos longos para *P. brachyurus* atingir populações elevadas.

Resultados e Discussão

De maneira geral, o FR de *P. brachyurus* nas coberturas foi menor no experimento II que nos demais, provavelmen-

te porque a reprodução do nematóide foi desfavorecida pela época do experimento (maio a junho, meses que na região de Piracicaba são mais frios que dezembro a janeiro, época em que foram conduzidos os experimentos I e III). A maior população inicial no experimento II, provavelmente, também tenha contribuído para a menor reprodução do nematóide (Tabela 1).

Os resultados mais constantes foram do sorgo 'IPA 7301011', milheto 'BRS 1501' e amaranto 'BRS Alegria', pela repetição das reações nos três experimentos. Sorgo 'IPA 7301011' foi o genótipo mais suscetível a *P. brachyurus* no experimento I e esse resultado confirmou-se nos demais. O sorgo 'BRS 800', testado apenas no experimento III, mostrou-se tão suscetível quanto o sorgo 'IPA 7301011' e o

Tabela 1. Fator de reprodução (FR = Pf/Pi) de *Pratylenchus brachyurus* em plantas utilizadas como cobertura vegetal. Experimento I: inoculação em 27/10/2000, avaliação em 18/12/2000 (52 dai); experimento II: inoculação em 25/05/2001, avaliação em 23/07/2001 (59 dai); experimento III: inoculação em 26/11/2004, avaliação em 01/02/2005 (67 dai).

Culturas de Cobertura	Experimento I (Pi = 270)	Experimento II (Pi = 700)	Experimento III (Pi = 270)
Sorgo 'IPA 7301011'	5,43 a	3,68 a	5,55 a
Sorgo 'BRS 800'	-	-	3,34 abc
Milho 'BRS 206'	4,75 a	2,89 a	4,57 a
Quenaf	-	1,45 b	-
Tef	2,54 ab	0,70 c	-
Milheto 'BRS 1501'	1,02 bc	1,11 bc	2,10 abc
Milheto 'BN 2'	-	-	0,43 cd
Girassol 'IAC Uruguai'	1,28 bc	0,48 c	0,60 cd
Aveia preta 'Comum'	1,04 bc	0,10 d	-
Aveia preta 'Campeira Mor'	-	0,07 d	0,57 cd
Nabo forrageiro 'Comum'	1,02 bc	0,07 d	0,03 d
Quinoa 'Piabiru'	0,55 cd	-	-
Amaranto 'Alegria'	0,12 cd	0,03 d	0,01 d
Tagetes anão	0,00 d	0,01 d	-

Os dados foram transformados para $\ln(x + 1)$ antes da análise, mas os valores apresentados são médias dos dados originais (média de cinco repetições); valores seguidos de letras diferentes na coluna diferem significativamente pelo teste de Duncan ($P = 0,05$).

padrão de suscetibilidade (Tabela 1). Infelizmente, os dados disponíveis na literatura sobre o sorgo são francamente contraditórios. Com efeito, em casa de vegetação, Sharma & Medeiros (1982) testaram 16 genótipos de sorgo silageiro (chamado no trabalho de sacarino: as cultivares 'BR 500', 'BR 501', 'BR 502', 'BR 503', 'BR 601', 'BR 602' e 'SART'; os híbridos intra-específicos 'CMS.x S 516', 'CMS.x S 603', 'CMS.x S 623', 'CMS.x S 717', 'CMS.x S 719', 'CMS.x S 723', 'CMS.x S 733', 'CMS.x S 734' e 'CMS.x S 735') e obtiveram, 45 dias após a inoculação com 67 espécimes de *P. brachyurus* por planta, FR entre 7,2 e 26,17. Por outro lado, outros trabalhos experimentais mostraram aumentos populacionais muitos discretos ou mesmo supressão de *P. brachyurus*, em condições semelhantes ao do presente trabalho (testes de casa de vegetação, com duração de 60 a 90 dias e PI entre 20 e 200 nematóides por planta ou parcela). Em casa de vegetação, Endo (1959) verificou redução populacional de *P. brachyurus* após 60 dias em *S. bicolor* 'Common' (FR = 0,12), mas crescimento em *S. sudanense* 'Common' (FR = 2,18) e em duas cultivares de *Z. mays* (FR = 2,69 e 2,10 em milho 'N.C. 27' e 'Ioana'). Em experimento semelhante, mas com duração de 90 dias, obteve-se aumento populacional de 1,96 vezes em sorgo 'MS 399' e 1,55 em milho 'IAC 155' (Charchar & Huang, 1980).

Matalaote *et al.* (1987) testaram dez genótipos de *S. bicolor* do tipo granífero em casa de vegetação e microparcelas, obtendo, após 56 a 70 dias, supressão de *P. brachyurus* em cinco genótipos, com FR entre 0,3 e 0,8 em 'G 522 DR', 'P 8333', 'Tx 2784', 'Topaz' e 'W 839 DR', e pequeno aumento populacional em quatro, com FR entre 1,2 e 2,1 em 'CS 3541', 'RT x 430' e 'Top Hand'. Não houve variação populacional significativa no sorgo 'Green Leaf' (FR = 1,0) e os resultados podem ser considerados inconsistentes em 'P 8222', com FR entre 0,6 e 2,5 em quatro experimentos. Em outra pesquisa de casa de vegetação, agora sob quatro diferentes regimes hídricos (regas a cada dois, três, quatro ou seis dias), o FR de *P. brachyurus* em sorgo granífero 'NK 304' se manteve próximo a 1,0 (McDonald & Van den Berg, 1993).

As diferenças acima apontadas para sorgo podem ser atribuídas em parte à metodologia de avaliação. Por exemplo, em Matalaote *et al.* (1987), a extração dos nematóides das raízes foi feita por incubação em câmara nebulizada e, no presente trabalho, pelo método de liquidificador, peneiramento e centrifugação. No entanto, a maior parte das diferenças provavelmente se deveu à diversidade genética existente em *S. bicolor*. Os genótipos testados por Sharma & Medeiros (1982), que apresentaram elevados fa-

tores de multiplicação de *P. brachyurus*, eram do tipo silageiro, enquanto os genótipos utilizados nos demais trabalhos eram predominantemente graníferos. 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'.

Amaranto 'BRS Alegria', nos três experimentos, e quinoa 'BRS Piabiru', no experimento I, foram as espécies mais resistentes a *P. brachyurus* (Tabela 1). 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), mas a reação da quinoa a este nematóide não havia sido avaliada anteriormente.

Os resultados obtidos com o girassol, nabo forrageiro, aveia preta e tef variaram entre os experimentos. Houve pequeno aumento populacional de *P. brachyurus* em girassol 'IAC Uruguai,' no experimento I e redução nos demais. Embora haja aparente desacordo nos resultados, é importante observar que o girassol sempre apresentou FR menor que o padrão de suscetibilidade e maior que o padrão de resistência, exceto no experimento 3. Neste, seu FR foi equivalente ao do amaranto granífero (Tabela 1). Portanto, é possível caracterizá-lo como moderadamente resistente ao nematóide. Trabalho anterior de Charchar & Huang (1981) não logrou caracterizar a reação do girassol (cultivar não determinada), devido à reduzida diferença estatística obtida entre as plantas comparadas.

O nabo forrageiro 'Comum' comportou-se como moderadamente suscetível no experimento I e resistente nos demais, diferença que pode ser atribuída à variação genética existente dentro da cobertura em questão. Esse material tem sido multiplicado pelos agricultores e provavelmente é originário do nabo 'Siletina', cultivar trazida da Alemanha para o Brasil no início da década de 1980. Porém, perdeu sua identidade e pureza genética, devido a cruzamentos com outros genótipos de *R. sativus* e mesmo outras espécies de *Raphanus* (José Nivaldo Pola, Pesquisador, Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, PR, informação pessoal). Não há relatos anteriores sobre a reação de nabo forrageiro a *P. brachyurus*.

Os resultados da aveia preta 'Comum' foram discordantes nos experimentos I e II, pois o FR de *P. brachyurus*, nessa planta, foi intermediário em I, menor que o padrão de suscetibilidade e maior que o de resistência, e igual ao do padrão de resistência em II. Tal diferença pode ser atribuída à variação genética existente dentro desse material, que na

verdade é um conjunto de populações heterogêneas de *Avena strigosa* (José Carlos de Oliveira, Pesquisador, Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, PR, informação pessoal). Aveia 'Campeira Mor' comportou-se como resistente nos dois experimentos em que foi testada (Tabela 1). Não existem estudos anteriores sobre a reação de aveia preta a *P. brachyurus*.

O tef apresentou FR equivalente ao do padrão de suscetibilidade no experimento I, mas significativamente menor em II. Atribui-se essa diferença à provável desuniformidade genética do material utilizado. O quenaf foi intermediário entre os dois padrões (Tabela 1). Não há dados na literatura sobre a reação de tef a *P. brachyurus* e há apenas um registro de ocorrência do nematóide em quenaf (Sher & Allen, 1953).

O milheto reduziu ($FR = 0,43$ em 'BN 2') ou aumentou ligeiramente ($FR = 1,02$ a $2,10$ em 'BRS 1501') a população de *P. brachyurus* (Tabela 1), podendo ser caracterizado como moderadamente resistente. Não há dados anteriores sobre a reação desses genótipos de milheto a *P. brachyurus*. Porém, dois híbridos intra-específicos de *P. glaucum*, HGM 100 e TifGrain 102, reduziram a população do nematóide ($FR < 1,0$ após 60-61 dias) em casa de vegetação (Timper & Hanna, 2005). Vale destacar que ambos os híbridos eram graníferos, diferentemente de 'BN 2' e 'BRS 1501', que são utilizados no Brasil exclusivamente como plantas de cobertura ou forrageira. Além disso, o método de extração utilizado foi incubação em câmara nebulizada, considerado pelos próprios autores como pouco eficiente; neste experimento a multiplicação de *P. brachyurus* foi baixa em todas as plantas testadas, inclusive no milho ($FR = 1,5$).

Os resultados ora apresentados podem ser utilizados para a programação de manejo de áreas infestadas por *P. brachyurus*. O milheto, sendo moderadamente resistente a *P. brachyurus*, provavelmente causará pequeno acréscimo populacional ou mesmo redução, dependendo do genótipo da cobertura e da época do ano. O mesmo é válido para girassol 'IAC Uruguai', nabo forrageiro 'Comum' e as aveias pretas ('Comum' e 'Campeira Mor'), que se mostraram iguais ou mais resistentes a *P. brachyurus* que o milheto 'BRS 1501'. Por outro lado, em áreas em que se substitua o milheto pelo sorgo silageiro ou forrageiro, é de se esperar rápido aumento populacional de *P. brachyurus* e das perdas a ele associadas. As coberturas recomendadas para o manejo de *P. brachyurus* são quinoa 'BRS Piabiru' e amaranto 'BRS Alegria'.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Carlos Roberto Spehar (Embrapa Cerrados, Planaltina, DF) e ao Dr. Solismar de Paiva Venzke Filho, pelas sementes de amaranto granífero, quenaf, quinoa e tef, e ao Dr. Claudio Marcelo Gonçalves de Oliveira (Instituto Biológico, Campinas, SP), pela revisão do manuscrito.

Literatura Citada

- ALVARENGA, R.C.; J.C.C. CABEZAS & D.P. SANTANA. 2001. Plantas de cobertura de solo para sistema plantio direto. Informe Agropecuário 208:25-36.
- CHARCHAR, J.M. & C.S. HUANG. 1981. Círculo de hospedeiras de *Pratylenchus brachyurus*. III – Plantas diversas. Fitopatologia Brasileira, 6(3):469-473.
- CHARCHAR, J.M. & C.S. HUANG. 1980. Círculo de hospedeiras de *Pratylenchus brachyurus*. I - Gramineae. Fitopatologia Brasileira, 5(3):351-357.
- COOLEN, W.A. & C.J. D'HERDE. 1972. A Method for the Quantitative Extraction of Nematodes from Plant Tissue. State Nematology and Entomology Research Station, Ghent. (Boletim Técnico)
- ENDO, B. 1959. Responses of root-lesion nematodes, *Pratylenchus brachyurus* and *P. zeae*, to various plants and soil types. Phytopathology, 49(7):417-421.
- FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE PLANTIO DIRETO NA PALHA. 2005. Área de plantio direto no Brasil. In: http://www.febrapdp.org.br/area_PD_Brasil_2002.htm acessado em 20/9/2005.
- GALLAHER, R.N.; D.W. DICKSON; J.F. CORELLA & R.E. HEWLETT. 1988. Tillage and multiple cropping system and population dynamics of phytoparasitic nematodes. Annals of Applied Nematology 2: 90-94.
- HANDOO, Z.A. & M.A. GOLDEN. 1989. A key and diagnostic compedium to the species of the genus *Pratylenchus* Filipjev. Journal of Nematology, 21:202-18, 1989.
- HOOPER, D.J. 1986. Extraction of free-living stages from soil. In: SOUTHEY, J.F. (ed) Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes. Her Majesty's Stationery Office, London. p.5-30.

- JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, 48:692.
- KUBO, R.K.; C.M.G. OLIVEIRA; S.R. ANTEDOMÊNICO; A.R. MONTEIRO; L.C.C.B. FERRAZ & M.M. INOMOTO. 2004. Ocorrência de nematóides do gênero *Pratylenchus* em cafezais do estado de São Paulo. *Nematologia Brasileira*, 28(2):159-165.
- LOPES, E.B. & L.G.E. LORDELLO. 1980. Nematóides associados à batatinha (*Solanum tuberosum* L.) na Paraíba. *Sociedade Brasileira de Nematologia* 4:143-157.
- MACHADO, A.C.Z. & INOMOTO, M.M. 2001. Host status of eighteen vegetable crops for *Pratylenchus brachyurus*. *Nematoropica*, 31(2):257-263.
- McDONALD, A.H. & E.H. VANDEN BERG. 1993. Effect of watering regimen on injury to corn and grain sorghum by *Pratylenchus* species. Supplement to *Journal of Nematology*, 25(4S):654-658.
- MENTEN, J.O.M.; L.G.E. LORDELLO; A. TULMANN NETO & A. ANDO. 1980. Nematóides associados ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no estado de São Paulo: informações preliminares. *Sociedade Brasileira de Nematologia* 4:205-211.
- MINGARDO, M. 2005. Plantio direto: cobertura traz vantagens. In: http://www.revistarural.com.br/Edicoes/2005/artigos/rev89_palhada.htm acessado em 3/6/2006.
- MOTALAOTE, B.; J.L. STARR; R.A. FREDERIKSEN & F.R. MILLER. 1987. Host status and susceptibility of sorghum to *Pratylenchus* species. *Revue de Nématologie*, 10(10):81-86.
- RIEDEL, R.M.; J.G. FOSTER & W.F. MAI. 1973. A simplified medium for monoxenic culture of *Pratylenchus penetrans* and *Ditylenchus dipsaci*. *Journal of Nematology*, 5(1):71-72.
- RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; P.S. KING; D.G. ROBERTSON & C.F. WEAVER. 1988. Potential of crops uncommon to Alabama for management of root-knot and soybean cyst nematodes. *Annals of Applied Nematology* 2:116-120.
- SHARMA, R.D. & A.C.S. MEDEIROS. 1982. Reações de alguns genótipos de sorgo sacarino aos nematóides *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 17(5):697-701.
- SHER, S.A. & M.W. ALLEN. 1953. Revision of the genus *Pratylenchus* (Nematoda: Tylenchidae). *University of California Publications in Zoology* 57(6):441-470.
- SILVA, R.A. & L.C. PEREIRA. 2003. Efeitos de densidades populacionais de *Pratylenchus brachyurus* na produtividade de duas cultivares de soja em condições de campo.
- SILVA, R.A.; M.A.S. SERRANO; A.C. GOMES; D.C. BORGES; A.A. SOUZA; G.L. ASMUS & M.M. INOMOTO. 2004. Ocorrência de *Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne incognita* na cultura do algodoeiro no estado do Mato Grosso. *Fitopatologia Brasileira*, 20(3):337.
- TIMPER, P. & W.W. HANNA. 2005. Reproduction of *Belonolaimus longicaudatus*, *Meloidogyne javanica*, *Paratrichodorus minor*, and *Pratylenchus brachyurus* on pearl millet (*Pennisetum glaucum*). *Journal of Nematology*, 37(2):214-219.

Detecção de *Meloidogyne* spp. em *Pfaffia* spp. no Distrito Federal e Patogenicidade de *M. javanica* a *Pfaffia glomerata* e *P. paniculata*

REGINA M.D.G. CARNEIRO¹, LUIZ.F.G. MESQUITA¹, PEDRO A. S. CIROTTI¹, SARAZETE IZIDIA VAZ PEREIRA², PAULO S. PEREIRA², DIJALMA B. SILVA¹ & ROBERTO F. VIEIRA¹

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 02372, 70849-970 Brasília, DF.

²Unidade de Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto, 14096-900, Ribeirão Preto, SP, Brasil

recar@cenargen.embrapa.br

Recebido para publicação em 18/03/2006. Aceito em 30/10/2006

Resumo – Carneiro, R.M.D.G.; L.F.G. Mesquita; P.A.S. Cirotto; S.I.V.Pereira; P.S. Pereira; D.B. Silva & R.F.Vieira. 2006.. Detecção de *Meloidogyne* spp. em *Pfaffia* spp. no Distrito Federal e patogenicidade de *M. javanica* a *P. glomerata* e *P. paniculata*

Conhecidas como “Ginseng Brasileiro”, *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia paniculata* são plantas medicinais que possuem propriedades tóxicas e anti-cancerígenas, respectivamente. Detectou-se no Distrito Federal, *Meloidogyne javanica*, *M. incognita* e *Meloidogyne* sp., causando sérios danos ao sistema radicular dessas plantas, onde estão armazenados os princípios ativos medicinais. Essas espécies de *Meloidogyne* ocorreram em populações mistas, em condições de campo, com a predominância de *M. javanica*. A identificação das espécies foi feita através da caracterização isoenzimática (esterases) e configuração da região perineal. O objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade de *M. javanica* a *P. glomerata* e *P. paniculata*. Plantas de dois meses de idade (6 repetições/ espécie) receberam aproximadamente 30.000 ovos/planta de *M. javanica*. As plantas não inoculadas serviram como testemunhas para cada espécie de fávia. Após um período de 8 meses em telado, as raízes foram coletadas, avaliadas a massa, a sintomatologia e a reprodução do nematóide. *P. glomerata* e *P. paniculata* apresentaram alta suscetibilidade a *M. javanica*. As duas espécies apresentaram reações diferentes, pois em *P. glomerata* ocorreu grande número de galhas e em *P. paniculata* raízes engrossadas e necrosadas. Diferenças importantes foram observadas na massa fresca das raízes. Em *P. glomerata* infectada, a massa das raízes foi inferior ao da testemunha e, em *P. paniculata*, foi superior ao da planta sadia. Quanto à concentração do princípio ativo (â -ecdisterona) nas raízes, pode-se observar um significativo aumento nas plantas parasitadas pelo nematóide, sobretudo em *P. glomerata*.

Palavras chave: Nematóide das galhas, *Pfaffia* spp, fenótipo de esterase, danos, sintomas, raízes, â -ecdisterona

Summary – Carneiro, R.M.D.G.; L.F.G. Mesquita; P.A.S. Cirotto; S.I.V.Pereira; P.S. Pereira; D.B. Silva & R.F.Vieira. 2006. Detection of *Meloidogyne* spp. on *Pfaffia* spp in the Federal District, Brazil and pathogenicity of *M. javanica* on *Pfaffia glomerata* and *P. paniculata*

Pfaffia glomerata and *P. paniculata*, better known as “Brazilian Ginseng”, are medicinal plants with tonic and anti-cancer properties, respectively. *Meloidogyne javanica*, *M. incognita* and *Meloidogyne* sp. were detected in the Federal District of Brazil, causing serious damage to the roots of these plants, where the active medicinal ingredients are stored. *Meloidogyne* spp. sometimes occurred in mixed populations in field conditions, with predominance of *M. javanica*. The identification of *Meloidogyne* species was made using isozyme characterization (esterases) and perineal patterns. The objective of this paper was to evaluate the pathogenic ability of *M. javanica* in *P. glomerata* and *P. paniculata*. Two-month old plants of each species (replicated 6 times) received approximately 30,000 eggs of *M. javanica* per plant. Non inoculated plants were used as control. After a period of 8 months, in greenhouse conditions, the roots were collected, weighed and evaluated for nematode symptoms

and reproduction. *P. glomerata* and *P. paniculata* showed high susceptibility to *M. javanica*. The two species presented different reactions to the nematode attack: while *P. glomerata* showed a great number of galls, *P. paniculata* presented necrosed and enlarged roots. Important differences were observed in fresh weight of roots. For *P. glomerata* the weight was lower in infected roots when compared with the control. For *P. paniculata*, healthy roots presented lower weight. Considering the concentration of β -ecdisterone in roots, a significant increase was observed in the plants infected by the nematode, especially for *P. glomerata*.

Keywords: root-knot nematodes, *Pfaffia* spp., esterase phenotype, damage, symptoms, roots, β - ecdisterone.

Introdução

As espécies *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Pfaffia paniculata* Kuntze, conhecidas como “Ginseng Brasileiro”, são plantas medicinais nativas pertencentes à família Amaranthaceae. Suas raízes possuem amplo uso popular, sendo empregadas como tóxicas, estimulantes, afrodisíacas, antidiarréicas e ainda possuem propriedades terapêuticas no tratamento de diabetes e hemorróidas (Shiobara, 1993 e Nishimoto, 1992). Considerando a grande demanda do mercado externo e interno, e a forma de exploração por extrativismo, essas espécies são de alta prioridade para conservação de recursos genéticos (Vieira et al. 2002).

Pfaffia glomerata é planta perene de hábito arbustivo e contém diversos hormônios, dos quais se destaca a β -ecdisona predominante em suas raízes. *Pfaffia paniculata* possui hábito trepador, tendo como principal constituinte o ácido pfaffico, e suas raízes possuem propriedades anticancerígenas (Takemoto & Odajima, 1984).

Entre os países que importam essas plantas se destaca o Japão, onde espécies do gênero foram amplamente estudadas tanto do ponto de vista fitoquímico quanto farmacológico. O Brasil é o maior produtor e exportador de *Pfaffia*, entretanto, existem vários fatores fitossanitários limitantes que podem prejudicar o cultivo do “ginseng brasileiro”. Entre os patógenos, se destacam os nematóides do gênero *Meloidogyne*, causando galhas e apodrecimento nas raízes (Araújo et al., 1994), onde estão armazenados os princípios ativos medicinais. O objetivo deste trabalho foi identificar as espécies de nematóides de galhas que ocorrem em *Pfaffia* spp. no Distrito Federal e avaliar os danos causados por *Meloidogyne javanica* a duas espécies de ginseng: *P. glomerata* e *P. paniculata*.

Material e Métodos

Obtenção e propagação das plantas

Em 2001, clones de *Pfaffia glomerata* e de *P. paniculata*, procedentes da Unicamp – CPQBA e mantidas em vasos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Estacas da parte aérea de ambas espécies foram plantadas em bandejas com solo esterilizado. Após o peggamento, as mudas foram transplantadas para vasos de 14 litros de solo esterilizado, corrigido e adubado, totalizando 12 plantas para cada espécie (1planta/vaso).

Identificação de espécies de *Meloidogyne* spp.

Plantas de *P. glomerata* e *P. paniculata* provenientes do Distrito Federal, apresentando sintomas de meloidoginose no sistema radicular, foram analisadas no laboratório de Nematologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As fêmeas dos nematóides individualizadas foram extraídas das galhas, processadas e identificadas através do perfil enzimático, de acordo com metodologia descrita por Carneiro & Almeida (2001). A seguir, a espécie *M. javanica* e *M. incognita* foram purificadas, de acordo com a mesma metodologia. Cortes da região perineal das populações purificadas foram realizados em fêmeas adultas de *Meloidogyne* spp., em 45% de ácido lático e montados em glicerina (Taylor & Netscher, 1974).

Patogenicidade de *M. javanica* ao ginseng brasileiro

Seis plantas de cada espécie de *P. glomerata* e *P. paniculata*, com 2 meses de idade, receberam inóculo de aproximadamente 30.000 ovos/planta de *M. javanica*, em vaso de 16 litros mantidos em casa de vegetação, sendo que outras seis, serviram como testemunhas (não inoculadas). Após 8 meses da inoculação, a altura da parte

aérea das plantas e a massa fresca das raízes foram avaliadas. As raízes das plantas inoculadas com o nematóide foram coradas com floxina B, para visualização e contagem das massas de ovos e galhas e determinação do índice de Hartman & Sasser (1985). Posteriormente, os ovos foram extraídos de cada raiz infectada, pelo método de Hussey & Barker (1973), quantificados em lâminas de Peters, sendo realizado o cálculo do fator de reprodução (FR) do nematóide, que é o cociente entre a população final e inicial.

Dosagem de β -ecdisterona: extração e análises por CLAE

Vinte gramas de raízes frescas de cada planta (24) foram secas em estufa de ar circulante a 38°C. As raízes moídas (200 mg) de cada amostra foram submetidas a extração com 5 ml de metanol em ultrassom por 30 minutos. Quatro mililitros do extrato foram filtrados e o solvente evaporado à temperatura ambiente.

Os extratos obtidos foram ressuspensos em 1 ml de MeOH:H₂O (1:1), submetidos a partição com 1mL de hexano, a fase hidroalcóolica filtrada em filtro de náilon, 0,45 µm (Alltech) e analisadas por CLAE . Cada amostra foi submetida à extração em triplicata.

Na análise por CLAE, foi utilizado cromatógrafo líquido Shimadzu com detector de arranjo de diodo (modelo SPD-M10A vp) e injetor automático (modelo SIL-10AD vp). A coluna utilizada foi Supelcosil™ LC18 (4,6 x 250mm, Supelco). A fase móvel foi MeOH:H₂O (ácido acético, 0,1%), 10:90 a 30:70 gradiente linear por 15 min; 30:70 isocrático por 10 min; 30:70 a 100:0 gradiente linear por 25 min e 100:0 a 10:90 gradiente linear por 5 min, sendo o tempo total de análise de 60 min. O fluxo foi 1,0 ml/min e a detecção a 240 nm. O método utilizado para a análise foi a padronização externa, sendo selecionados 3 pontos para curva.

Resultados e Discussão

Identificação de espécies de *Meloidogyne* spp.

A análise dos perfis de esterase (Est) mostraram, nas quatro amostras analisadas de *P. glomerata* e *P. paniculata* uma mistura de *M. javanica* (Est J3, Rm: 1,0, 1,25, 1,4) e *M. incognita* (Est I1, Rm: 1,0, 1,1), predominando a primeira espécie. Em uma amostra de *P. glomerata*, proveniente do Distrito Federal, foi registrada a presença de um perfil de esterase atípico (Est G3, Rm: 1,1, 1,2, 1,3), sendo a banda do meio (Rm: 1,2), muito mais intensa que as outras duas (Fig. 1). Quanto à posição das bandas, esse perfil se assemelhou muito a *M. arenaria* (Carneiro *et al*, 2000). Mas em *M.*

arenaria, as três bandas apresentam a mesma intensidade. A região perineal dessa população apresentou uma configuração atípica, ora lembrando a *M. incognita* ora a *M. arenaria*. Mais estudos morfológicos são necessários para esclarecer a identidade taxonômica dessa população.

Patogenicidade de *M. javanica* a *P. glomerata* e *P. paniculata*

Os resultados estão apresentados na Tabela 1. Observou-se que não houve influência dos danos causados pelo nematóide na altura das plantas. A parte aérea de ambas as espécies não apresentou sintomas de meloidoginose, ou seja, redução de tamanho, queda das folhas e sintomas de deficiência de minerais, típicos de *Meloidogyne* spp. (Lordello, 1973). De maneira geral, pôde-se observar que a testemunha de *P. paniculata* apresentou massa média de raízes muito inferior ao das plantas parasitadas, não ocorrendo formação de galhas. O contrário ocorreu com *P. glomerata*, com as plantas parasitadas apresentando massas frescas médias de raiz, estatisticamente inferiores às plantas testemunhas. Esse sintoma de redução de sistema radicular é característico da meloidoginose e deve-se sobretudo ao mau desenvolvimento das raízes pimárias e secundárias (Lordello, 1973).

De uma maneira geral, *P. glomerata* e *P. paniculata* responderam de forma diferenciada ao parasitismo do nematóide. *Pfaffia glomerata* apresentou maior índice de galhas (4,8) e sintomas característicos (Figuras 2C e 2D). No caso de *P. paniculata*, não ocorreu a formação de galhas e sim, engrossamentos de raízes, com lesões e necroses nos locais parasitados por *M. javanica* (Figura 2 E e 2F). Os fatores de reprodução do nematóide foram em média de 10,0 em *P. paniculata* e 7,9 em *P. glomerata*, o que caracteriza serem os acessos estudados das duas espécies altamente suscetíveis ao nematóide. Entretanto, as duas espécies de *Pfaffia* não apresentaram redução de porte e nenhum outro sintoma de meloidoginose na parte aérea (Fig. 2 A, B).

Quanto à concentração de α - ecdisterona pôde-se observar significativo aumento nas plantas parasitadas pelo nematóide, sobretudo em *P. glomerata*. O estímulo ao aumento do teor de α - ecdisterona pode estar relacionado a resposta química da planta ao ataque dos nematóides, pois é conhecido que metabólitos secundários possuem importante função ecológica na adaptação de plantas, atuando como protetores na herbivoria e infecção por patógenos (Taiz e Zeiger, 1998). Alguns esteróides são produtos do metabolismo secundário e estão associados à defesa da planta, como os fitoesteróides. Esse aumento foi

Tabela 1. Comportamento de duas espécies de *Pfaffia* quanto ao parasitismo de *Meloidogyne javanica*

Plantas	Altura das plantas (m)	Massa média das raízes frescas (g)	Índice de Galhas e de massas de ovos	Número total de ovos	Fator de reprodução	Concentração média de β ecidsterona mg/g de peso seco das raízes
<i>P. paniculata</i>						
Sadias	1,89 a *	92,72 a	0 e 0	0 e 0	0 e 0	9,48 a
Infestadas	1,81 a	414,50b	1,70 e 4,70	301.666	10,0	11,45 b
<i>P. glomerata</i>						
Sadias	1,86 a	718,71b	0	0	0	20,88 a
Infestadas	1,96 a	460,52a	4,80 e 4,30	239.540	7,96	38,25 b

*Médias (seis repetições/tratamento) seguidas de letras diferentes, duas a duas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

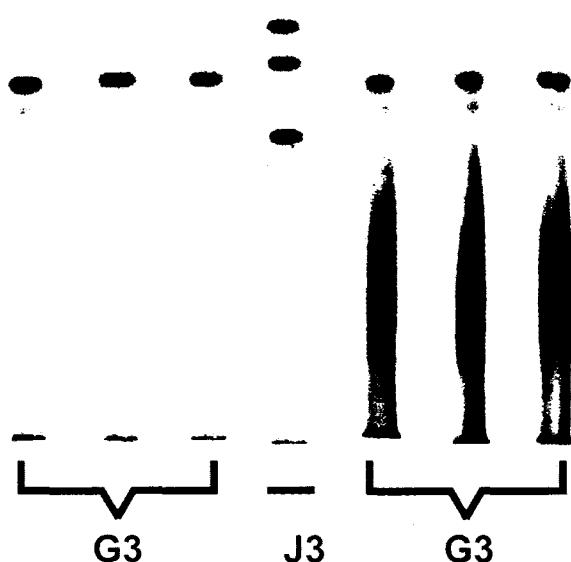


Figura 1. Fenótipo de esterase de *Meloidogyne sp.* (Est G3). *M. javanica* (Est J3) foi usada como referência.

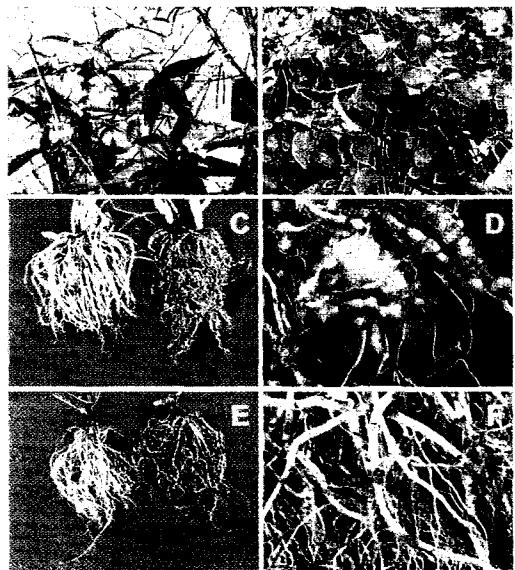


Figura 2. A - Parte aérea de plantas de *P. glomerata*. (A) e de *P. paniculata*.(B). Raiz sadia de *P. glomerata* à esquerda e raiz parasitada por *M. javanica* à direita (C). Galhas em *P. glomerata* (D). Planta sadia de *P. paniculata* à esquerda e raiz parasitada por *M. javanica* à direita (E). Necroses e engrossamentos em *P. paniculata* (F).

relativo, uma vez que o nematóide reduziu significativamente a massa fresca das raízes parasitadas em *P. glomerata* (Tabela 1). Considerando que as *Pfaffia* são plantas perenes, os danos causados pelos nematóides ao longo do tempo podem ser ainda maiores do que os observados neste trabalho, no qual as plantas foram avaliadas com 10 meses de idade. Mais estudos são necessários no sentido de quantificar os constituintes químicos de *Pfaffia* spp. e relacioná-los com os danos causados pelos nematóides no sistema radicular, durante um período de tempo maior.

Literatura Citada

- ALCÂNTARA, M.F.A. 1994 Atividade antimicrobiana de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. XIII Simpósio de plantas medicinais do Brasil. Fortaleza – CE. p. 72.
- ARAÚJO, W.P.; J.K.A. MATTOS & R.M. SOUZA. 1994. Fontes de resistência a *Meloidogyne javanica* entre procedências de *Pfaffia glomerata*. Fitopatologia Brasileira 19 (Suplemento): 322-323.
- CARNEIRO, R.M.D.G & M.R.A ALMEIDA. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. Nematologia Brasileira 25, 35-44.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, A.R.A. & P. QUÉNÉHÉRVÉ. 2000. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. isolates. Nematology 2, 645-654.
- HARTMAN, K.M. & J.N. SASSER. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: Carter, C. C. & Sasser, J. N. eds. An advanced treatise on *Meloidogyne*, vol. I, Methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics. 69–77.
- HUSSEY, R.S. & K.R. BARKER. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. Including a new technique. Plant disease reporter, 57:1025-1028.
- LORDELLO, L.G.E. 1973. Nemátóides da plantas cultivadas. Livraria Nobel, São Paulo, 197p.
- NISHIMOTO, N. 1992. The constituents of Brazilian Ginsengs. Anais do XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil – Univ. do Paraná. Curitiba, PR. p 167.
- SHIOBARA, Y. 1993. Pfaffane-type nortriterpenoids from *P. pulverulenta*. Phytochemistry, 31(3): 953–956.
- TAIZ, L. & E. ZEIGER. 2002. Plant physiology. 3 ed. Sunderland., 690 p.
- TAKEMOTO, T. & T. ODAJIMA. 1984. Antitumor pfaffosides from brazilian carrots. Japanese Kokai Tokkyo Koho JP, 59:184-198.
- TAYLOR, D.P. & C. NETSCHER. 1974. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. Nematologica 20, 268-269.
- VIEIRA, R.F.; S.R. SILVA; R.B. NEVES; D.B. SILVA; T.A.B. DIAS; M.C.F.V. UDRY; M. WETZEL & R.C MARTINS. 2002. Estratégias para Conservação e Manejo de Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e Aromáticas: Resultados da I Reunião Técnica. Brasília, DF: Embrapa / Ibama / CNPq 184p.

Manejo do Nematóide das Galhas da Goiabeira em São João da Barra (RJ) e Relato de Novos Hospedeiros

RICARDO M. SOUZA¹, MACIEL S. NOGUEIRA², INORBERT M. LIMA¹, MARCELO MELARATO³
& CLAUDIA M. DOLINSKI¹

¹Universidade Estadual do Norte Fluminense/CCTA/LEF, Av. Alberto Lamego, 2000, 28015-620, Campos dos Goytacazes (RJ)

²Sítio S^{ta} Raquel, 1º Distrito de São João da Barra, Cep 28200-000 (RJ)

³Rua Dr. Emílio Ribas, 181, apt. 83, 13025-140, Campinas (SP)

Autor para correspondência: ricmsouza@censanet.com.br

Recebido para publicação em 04/04/2006. Aceito em 30/11/2006.

Resumo – Souza, R.M.; M.S. Nogueira; I.M. Lima; M. Melarato & C.M. Dolinski. 2006. Manejo do nematóide das Galhas da goiabeira em São João da Barra (RJ) e relato de novos hospedeiros.

Objetivando-se a viabilidade econômica da goiabicultura em áreas infestadas por *Meloidogyne mayaguensis*, um plantio comercial de goiabeiras naturalmente parasitado pelo nematóide foi conduzido por 17 meses com diferentes combinações de adubações minerais de cobertura e foliar, aplicações de esterco curtido e torta de neem e plantio de menta e mucuna-preta. As aplicações de esterco reduziram a população de juvenis de segundo estádio de *M. mayaguensis* no solo, mantendo-se a produtividade do pomar em 65% daquela obtida em plantios isentos do nematóide. Em outra área naturalmente infestada por *M. mayaguensis*, o pousio sem plantas invasoras e sem irrigação por 14 meses não eliminou o nematóide do solo. A caracterização eletroforética de fêmeas de *Meloidogyne* extraídas de raízes de plantas invasoras e cultivadas em meio a pomares revelou 14 novos hospedeiros naturais de *M. mayaguensis*, distribuídos em 12 famílias botânicas.

Palavras-chave: *Meloidogyne mayaguensis*, nematóide da goiabeira, *Psidium guajava*, controle.

Summary – Souza, R.M.; M.S. Nogueira; I.M. Lima; M. Melarato & C.M. Dolinski. 2006. Management of the guava root-knot nematode in São João da Barra, Brazil, and report of new hosts.

In an effort to sustain profitable guava production in *Meloidogyne mayaguensis*-infested areas, a commercial orchard was conducted for 17 months with different combinations of soil and foliar fertilization, application of cow manure and neem oil-cake, and cultivation of mint and velvetbean under the canopy. Manure applications reduced the soil population of *M. mayaguensis* second-stage juveniles, while sustaining productivity at 65% of that obtained in nematode-free areas. In another nematode-infested area, weed-free, no-irrigation fallowing for 14 months did not eliminate *M. mayaguensis* in the soil. Isozyme esterase phenotyping of *Meloidogyne* females recovered from weeds and cultivated plants in *M. mayaguensis*-infested areas revealed 14 new hosts of *M. mayaguensis*, distributed in 12 botanic families.

Keywords: *Meloidogyne mayaguensis*, guava nematode, *Psidium guajava*, control.

Introdução

O nematóide-das-galhas da goiabeira (NGG), *Meloidogyne mayaguensis* Rammah & Hirschmann, 1988,

apresenta-se como séria ameaça à goiabicultura e a outras culturas do agronegócio nacional. De fato, esse nematóide provocou a destruição de centenas de hectares de pomares no nordeste brasileiro, podendo-se antever problemas maiores caso este parasito se estabeleça em lavouras de cafe-

ciro, tomateiro e soja, dentre outros hospedeiros (Brito *et al.*, 2004; <http://www.doacs.state.fl.us/pi/enpp/nema/mayaguensis.html>, visitado em 05/09/2005). No Estado do Rio de Janeiro, o NGG está presente nos municípios de Cachoeiras de Macacu e São João da Barra. Com a agricultura baseada nas lavouras e agroindústrias da goiaba, São João da Barra sofreu forte impacto pela morte de extensos pomares (Lima *et al.*, 2003).

Desde o relato do NGG no Brasil em 2001 (Carneiro *et al.*, 2001), tem-se buscado genótipos de mirtáceas que lhe sejam resistentes, bem como preconiza-se o controle cultural (Maranhão *et al.*, 2001; 2003; <http://www.ipa.br/RESP/resp23.htm>, visitado em 05/09/2005). Esse trabalho relata iniciativas visando o manejo de pomares afetados pelo NGG em São João da Barra, bem como relata novos hospedeiros naturais de *M. mayaguensis*.

Material e Métodos

Detecção de Novos Hospedeiros

Plantas invasoras e cultivadas foram coletadas em meio a pomares parasitados pelo NGG. Em laboratório, as raízes foram examinadas e, quando fêmeas de *Meloidogyne* em ovoposição foram detectadas, procedeu-se à sua extração e preparo para eletroforese da isoenzima esterase, segundo Carneiro & Almeida (2001). A parte aérea das plantas foi enviada ao Setor de Botânica da Universidade Estadual do Norte Fluminense para identificação taxonômica.

Pousio de Área Infestada

Numa área plana de 1.300 m², de solo com 98% de areia e pH 7,4, 36 goiabeiras mortas pelo NGG foram arrancadas com o auxílio de um trator. A irrigação foi suspensa e o solo foi arado, gradeado e mantido sem ervas daninhas por 14 meses mediante aplicações de herbicidas. O nível populacional de juvenis de segundo-estádio (J2) do NGG no solo foi determinado aos seis, oito e dez meses após o arranque das goiabeiras. Para tal fim, a área foi subdividida em parcelas de 11 m², das quais três amostras simples/parcela foram coletadas até 40 cm de profundidade, com um trado tipo holandês. Em laboratório, as amostras simples de cada parcela foram homogenizadas e processadas por flutuação, peneiramento e centrifugação para extração e contagem de J2/100 cc de solo. Aos 14 meses de pousio, mudas de goiabeira cv. Paluma isentas do NGG foram transplantadas na área e a incidência de galhas radiculares monitorada periodicamente.

Convívio em Área Infestada

O experimento foi instalado em um pomar comercial de goiabeiras cv. Paluma de dois anos e meio de plantio, conduzida no espaçamento de 6 x 6 m, sem podas drásticas, irrigada por aspersão e cultivada nas mesmas condições de solo citadas acima. Das 42 plantas disponibilizadas pelo agricultor, todas parasitadas por *M. mayaguensis*, 35 já apresentavam uma leve queda de folhas, as quais apresentavam uma coloração verde menos intensa. Em uma reboleira central, sete plantas já apresentavam a síndrome irreversível que mata as plantas (mudanças na coloração e acentuada queda de folhas e aodrecimento do sistema radicular). Análises completas de solo e foliar de todo o pomar indicaram carências nutricionais de zinco, manganês, magnésio e cobre, e excessos de cálcio, ferro e boro.

Na instalação do experimento em 06/10/2003, as 42 plantas foram adubadas com 300 g de superfosfato simples e inteiramente casualizadas em dois tratamentos nutricionais, a saber: A: 21 plantas receberam oito aplicações de fertilizante 20-0-20 (formulado com sulfato de amônio) entre 07/10/2003 e 09/12/2004 (média de 56 dias entre aplicações), e B: 21 plantas receberam a adubação em cobertura descrita acima, complementada por sete adubações foliares entre 07/10/2003 e 19/08/2004 (média de 52 dias entre aplicações), com sulfatos de zinco (300 g/L), manganês (150 g/L) e magnésio (500 g/L), cloreto de potássio (300 g/L) e ácido bórico (75 g/L). As aplicações foliares foram sempre realizadas em horário de pouca ventilação para se evitar a deriva do produto entre as plantas.

Visando reduzir a população do NGG, as 42 plantas foram inteiramente casualizadas em três tratamentos, a saber: 1) quatro aplicações de 60 Kg de esterco bovino curtido/planta sob a copa, sem incorporação, entre 08/10/2003 e 25/10/2004 (média de 126 dias entre as aplicações), 2) complementação da adubação orgânica acima com quatro aplicações de 200 g/planta de torta de neen (*Azadirachta indica* A. de Jussieu) entre 19/01 e 3/12/2004 (média de 105 dias entre aplicações), e 3) complementação da adubação orgânica acima com o plantio sob a copa de menta (*Mentha* sp.) e mucuna-preta (*Mucuna aterrina* Holl.). A pedido do agricultor, nenhuma planta foi deixada sem tratamento anti-nematóide (testemunha).

Na instalação do experimento, determinou-se o nível populacional do NGG nos diferentes tratamentos acima (A1 a A3, B1 a B3). Para tal fim, as sete plantas de cada tratamento foram amostradas sob a copa, em ambos os lados, com um trado tipo holandes até à profundidade de 40 cm. Assim,

para cada tratamento, a amostra composta de 14 sub-amostras foi cuidadosamente homogenizada em laboratório e uma alíquota de 100 ml foi processada por flutuação, peneiramento e centrifugação. O nível populacional, expresso em número de J2/100 cc de solo, foi determinado oito vezes entre 6/10/2003 e 28/2/2005 (média de 74 dias entre avaliações).

Ao longo dos 17 meses do período experimental, monitorou-se o aspecto geral das plantas e a produtividade por planta em duas safras.

Resultados e Discussão

A caracterização eletroforética de fêmeas de *Meloidogyne* extraídas de plantas invasoras e cultivadas (Figura 1) revelou 14 novos hospedeiros naturais de *M. mayaguensis* (Tabela 1), conforme caracterização desta espécie por Carneiro *et al.* (2001). O polifagismo dessa espécie, cujo círculo de hospedeiros extende-se por diversas famílias botânicas, evidencia o elevado risco desse nematóide vir a se estabelecer em várias regiões brasileiras.

Na área submetida ao pousio, não foram detectados J2 de *M. mayaguensis* no solo após oito meses. Entretanto, goiabeiras transplantadas para a área, aos 14 meses de pousio, apresentaram infecção (galhas) após seis meses de plantio. Conclui-se que *M. mayaguensis* pode sobreviver no solo, possivelmente na forma de ovos em dormência, em nível populacional indetectável pelos métodos de amostragem e processamento utilizados. Este resultado desaconselha o pousio sem irrigação como estratégia de manejo em áreas infestadas pelo NGG.

Considerou-se satisfatória a convivência com o NGG em área infestada, não obstante a reduzida área experimental disponível e a ausência de testemunha tenham impossibilitado uma análise estatística apurada. Na instalação do experimento, as diferenças populacionais entre os tratamentos (Figura 2) refletiam a distribuição agregada típica dos fitonematóides (Barker, 1985; McSorley, 1987). Onde o nível populacional de J2 de *M. mayaguensis* era elevado, os tratamentos anti-nematóide reduziram de maneira acentuada a população do nematóide no solo, sugerindo-se que a aplicação de torta de neem e o cultivo de menta e mucuna-preta tiveram efeito secundário em relação à aplicação de esterco. Ao longo dos 17 meses do período experimental, não houve expansão da reboleira apresentando a síndrome causada pelo NGG, não obstante quatro plantas portadoras da síndrome tenham morrido.

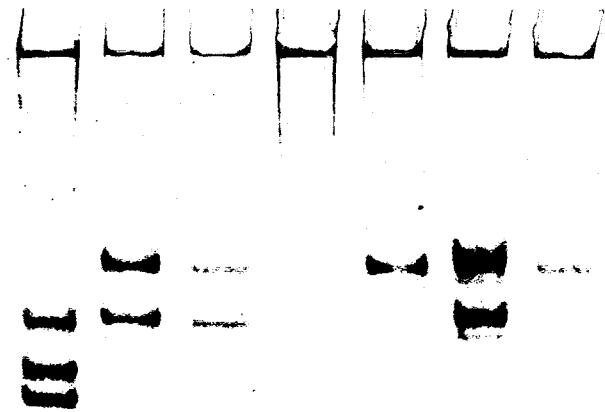


Figura 1. Padrão eletroforético de esterase J3 de *Meloidogyne javanica* (à esquerda) e M2 de populações de *M. mayaguensis* de São João da Barra (RJ).

Tabela 1. Hospedeiros naturais de *Meloidogyne mayaguensis* no município de São João da Barra (RJ).

Nomes comuns e científico, família botânica

Acerola, <i>Malphigia punicifolia</i> L., Malpighiaceae
Beldroega-pequena, <i>Chamaesyce prostata</i> Small, Euphorbiaceae
Cacto, <i>Cereus fernambucensis</i> Lemaire, Cactaceae
Caruru-branco, <i>Amaranthus hybridus</i> L., Amaranthaceae
Fedegoso, <i>Senna occidentalis</i> L., Leguminosae
Gaiolina, <i>Euphorbia tirucalli</i> L., Euphorbiaceae
Mamão, <i>Carica papaya</i> L., Caricaceae
Maracujá-do-mato, <i>Passiflora mucronata</i> Lam., Passifloraceae
Maria-gorda, <i>Talinum triangulare</i> Willd., Portulacaceae
Maria-preta, <i>Solanum americanum</i> P. Mill., Solanaceae
Mata-pasto, <i>Senna alata</i> L., Leguminosae
Para-sol, <i>Hidrocotyle bonariensis</i> Comm., Umbelliferae
Serralha, <i>Emilia sonchifolia</i> L., Compositae
Urtiga, <i>Cnidoscolus urens</i> L., Euphorbiaceae

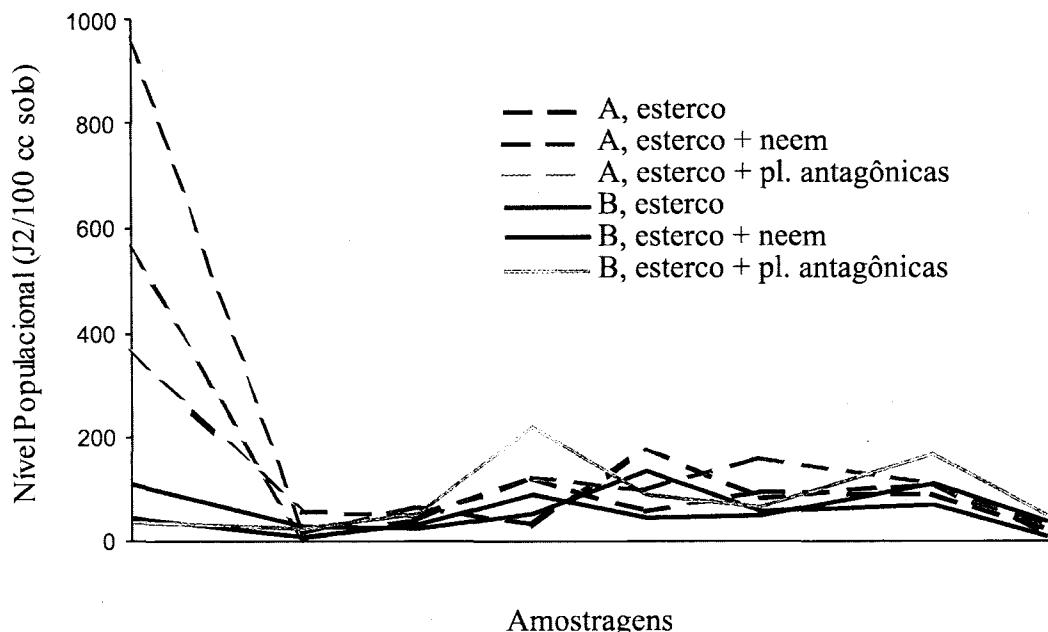


Figura 2. Flutuação populacional de juvenis de segundo-estádio (J2) de *Meloidogyne mayaguensis* em lavoura comercial de goiabeira em função de tratamentos nutricionais (A ou B) e aplicação sob a copa de esterco sozinho ou associado à torta de neem ou ao plantio de plantas antagônicas (menta e mucuna-preta). Setas indicam as épocas de aplicação de esterco.

Com relação à produtividade em duas safras, goiabeiras infectadas pelo NGG e recebendo adubações orgânica e de cobertura produziram em média 107 Kg de frutos/planta/safra. A adubação foliar utilizada não melhorou esta produtividade (102 Kg/planta/safra). Na mesma propriedade agrícola e sob as mesmas condições de cultivo, goiabeiras isentas do NGG produziram em média 150 Kg/planta/safra. Além da perda de 30% da produtividade devido ao nematóide, o agricultor dispenderá cerca de R\$ 23,00 planta/safra com adubação orgânica. Considerando-se o valor pago ao agricultor em 2003 e 2004 (R\$ 8,50/caixa com 20 Kg da fruta), conclui-se que o agricultor teve uma rentabilidade bruta de R\$ 20,00 planta/safra na área infestada pelo NGG, o que poderia ser extrapolado para R\$ 5.500,00/hectare/safra.

Novos experimentos estão em andamento em pomares maiores e testando-se mais estratégias anti-nematóide. Entretanto, a patogenicidade do NGG para com a goiabeira e outras plantas cultivadas recomenda esforços urgentes na busca de genótipos que lhe sejam resistentes e na prospecção de agentes de controle biológico, como sugerido por Gueye *et al.* (1997) e Duponnois *et al.* (1998).

Agradecimentos

Os autores agradecem à empresa Dalquim Indústria e Comércio Ltda pela cessão da torta de neem.

Literatura Citada

- BARKER, K.R. 1985. Sampling nematode communities. In: BARKER, K.R.; C.C. CARTER & J.N. SASSER (ed.). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*, vol. 2. North Carolina State University's Department of Plant Pathology and USAID, Raleigh, p. 3-35.
- BRITO, J.A.; J.D. STANLEY; R. CETINTAS; T.O. POWERS; R.N. INSERRA; E.J. McAVOY; M.L. MENDES; W.T. CROW & D.W. DICKSON. 2004. Identification and host preferences of *Meloidogyne mayaguensis*, and other root-knot nematodes from Florida, and their susceptibility to *Pasteuria penetrans*. In: FORTY-THIRD ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY OF NEMATOLOGISTS, Estes Park, Resumos, p. 58-59.

- CARNEIRO, R.M.D.G. & M.R.A. ALMEIDA. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira* 25: 35-44.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; WELLINGTON A. MOREIRA; M.R.A. ALMEIDA & A.C.M.M. GOMES. 2001. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Brasil. *Nematologia Brasileira*, 25:223-228.
- DUPONNOIS, R.; A.M. BA & T. MATEILLE. 1998. Effects of some rhizosphere bacteria for the biocontrol of nematodes of the genus *Meloidogyne* with *Arthrobotrys oligospora*. *Fundamental and Applied Nematology*, 21: 157-163.
- GUEYE, M.; R. DUPONNOIS; P.I. SAMB & T. MATEILLE. 1997. Study on three strains of *Arthrobotrys oligospora*: biological characterization and effects on *Meloidogyne mayaguensis* parasitic on tomato in Senegal. *Tropicultura*, 15: 109-115.
- LIMA, I.M.; C.M. DOLINSKI & R.M. SOUZA. 2003. Dispersão de *Meloidogyne mayaguensis* em pomares de São João da Barra (RJ) e relato de novos hospedeiros dentre plantas invasoras e cultivadas. In: XXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Petrolina, Resumos, p. 139.
- MARANHÃO, S.R.V.L.; R.M. MOURA & E.M.R. PEDROSA. 2001. Reação de indivíduos segregantes de goiabeira a *Meloidogyne incognita* raça 1 e *M. mayaguensis*. *Nematologia Brasileira*, 25: 191-195.
- MARANHÃO, S.R.V.L.; R.M. MOURA & E.M.R. PEDROSA. 2003. Reação de indivíduos segregantes de araçazeiro a *Meloidogyne incognita* raça 1, *M. javanica* e *M. mayaguensis*. *Nematologia Brasileira*, 27: 173-178.
- McSORLEY, R. 1987. Extraction of nematodes and sampling methods. In: BROWN, R.H. & B.R. KERRY (ed.). *Principles and Practice of Nematode Control in Crops*. Academic Press, Sydney, p. 13-47.

Efeito da Adição de Diferentes Resíduos Culturais ao Solo sobre a População do Nematóide de Cisto da Soja

FÁBIA SILVA DE OLIVEIRA, MARA RÚBIA DA ROCHA, ROMMEL BERNARDES DA COSTA,
VALÉRIA DE OLIVEIRA FALEIRO MACHADO & ÉBER NASCIMENTO NOGUEIRA

Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Caixa Postal 131, CEP 74001-970, Goiânia-GO. E-mail: fabiaagro@yahoo.com.br

Resumo – Oliveira, F. S; M. R. Rocha; R. B. Costa; V.O.F Machado & E.N. Nogueira. 2006. Efeito da adição de diferentes resíduos culturais ao solo sobre a população do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*)

O experimento foi conduzido em Goiânia, GO, sob condições de casa-de vegetação em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos foram constituídos da adição de resíduos culturais ao substrato, na proporção de 30% do volume contido do vaso, sendo: 1) testemunha (sem adição de resíduo cultural); 2) bagaço de cana; 3) palha de crotalária; 4) palha de milheto; 5) palha de milho; 6) torta de filtro de cana. Foram utilizadas duas plantas de soja da cultivar BRSGO Luziânia em cada vaso, que foram inoculadas com 5000 ovos de *H. glycines*. Após a primeira avaliação, realizada aos 40 dias após a inoculação, o substrato (solo + resíduo) foi mantido nos vasos, replantados e reinoculados com a mesma concentração de inóculo. Após 40 dias foi realizada a segunda avaliação. Nas avaliações, foram determinados o número de fêmeas por grama de raiz, cistos por 100 cm³ de solo, ovos por fêmea e ovos por cisto. Os resultados obtidos demonstraram redução no número de fêmeas e de cistos devido à adição dos resíduos culturais ao substrato. Este efeito não se mostrou consistente na segunda avaliação onde, somente a palha de milheto, a torta de filtro e a palha de milho, resultaram em redução da população de *H. glycines*. Destaca-se o efeito da torta de filtro que, apresentando efeito prolongado, reduziu significativamente o número de fêmeas e de cistos em relação aos demais tratamentos, reduzindo também, o número médio de ovos por fêmea.

Palavras-chave: fitonematóides, manejo, matéria orgânica, efeito antagônico.

Summary – Oliveira, F. S; M. R. Rocha; R. B. Costa; V.O.F Machado & E.N. Nogueira. 2006. Effect of soil amendments on soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) population.

The experiment was conducted in Goiania, GO, under greenhouse conditions in a completely randomized design with 6 treatments and 5 replications. The treatments were composed of different soil amendments added at a rate of 30% of the volume of the soil: 1) Control (without residues); 2) Crushed sugar-cane; 3) Crotalaria husk; 4) Millet husk; 5) Corn husk; 6) Sugar-cane filter cake. Each pot was planted with two plants of soybean cultivar BRSGO Luziania and inoculated with 5,000 eggs of *H. glycines*. After the first evaluation, which occurred forty days after inoculation, the soil and amendments were kept in the pots and replanted and re-inoculated with the same inoculum concentration. Forty days later the second evaluation was performed. Evaluation consisted of determining the number of females per gram of roots, number of cysts per 100 cm³ of soil, eggs per female and eggs per cyst. The results showed reduction in number of females and cysts due to soil amendments. This effect was not consistent with the second evaluation, when only millet husk, corn husk and filter cake reduced the *H. glycines* population. A remarkable effect was observed with the use of filter cake, which presented a long-term effect and reduced significantly the number of females and cysts when compared to the other soil amendments, also reducing the mean number of eggs per female.

Keywords: nematodes, management, soil amendments, antagonistic effect.

Introdução

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] é a mais importante oleaginosa cultivada no mundo. Sua produção global está estimada em 200 milhões de toneladas. O Brasil, como segundo produtor mundial, é responsável por 27% da safra mundial (Embrapa, 2005).

Em razão da importância da soja para a economia brasileira, a presença do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe, 1952) nas lavouras tem representado grandes desafios aos produtores. Nos países onde ocorre, constitui-se num dos principais problemas fitossanitários, que limitam a produção da soja devido aos prejuízos causados, podendo provocar perdas de até 100% no rendimento (Silva, 1999).

No Brasil, o nematóide de cisto da soja foi detectado pela primeira vez na safra de 1991/92. Atualmente, encontra-se disseminado em 107 municípios de dez estados brasileiros (MG, MT, MS, GO, SP, RS, PR, BA, TO e MA), infestando uma área superior a 2.500.000 hectares (Embrapa, 2005). Além da importância dessa doença para a soja, a erradicação do nematóide em uma área onde ele já está estabelecido é muito difícil e o seu controle é bastante complexo.

Existem vários métodos que podem ajudar no controle de *H. glycines*, como o uso de cultivares resistentes, a rotação de culturas com plantas não hospedeiras e o emprego de plantas antagônicas. O manejo adequado do solo, mantendo-se níveis mais altos de matéria orgânica, a saturação de bases dentro do recomendado para cada região, o parcelamento do potássio em solos arenosos, a adubação equilibrada e a suplementação de micronutrientes, também ajudam a aumentar a tolerância da soja ao nematóide (Dias *et al.*, 2000).

Atualmente, o emprego de plantas antagonistas tem tido destaque dentre as alternativas recomendadas para o controle de fitonematóides (Ferraz & Valle, 1997; Costa *et al.*, 2001). Diversas plantas possuem substâncias químicas com efeito nematicida em suas constituições (Dias-Arieira *et al.*, 2003). Algumas espécies de leguminosas e gramíneas, quando empregadas na forma de adubação verde ou em esquemas de rotação, liberam no solo, substâncias com efeito nematicida ou nemastático. Outra possibilidade, é de atarem após a penetração do nematóide nas raízes, reduzindo sua reprodução ou impedindo-o de completar o ciclo de vida (Badra *et al.*, 1979; Tenente *et al.*, 1982; Ferraz & Valle, 1997).

A incorporação de matéria orgânica ao solo tem mostrado grande potencial para o controle de nematóides (Rodríguez-Kábana, 1986; Santos, 2000; Wang *et al.*, 2002; Widmer *et al.*, 2002). Geralmente, a decomposição da matéria orgânica incorporada ao solo favorece a proliferação de inimigos naturais, como fungos, bactérias e nematóides predadores. Também pode ocorrer a liberação de substâncias tóxicas aos nematóides (Bird, 2000; Aktar & Malik, 2000).

Várias fontes de matéria orgânica têm sido testadas para o controle de nematóides fitoparasitas (Viaene & Abawi, 1998). Teixeira *et al.* (1997), estudando o efeito da incorporação de casca de café, torta de mamona ou esterco bovino sobre a população de *H. glycines*, verificaram que essas fontes de matéria orgânica afetaram o número médio de fêmeas do nematóide nas raízes. Stechow (1996), utilizando palha de milheto (*Pennisetum glaucum*) como cobertura vegetal do solo, no inverno, conseguiu altos rendimentos de soja em áreas infestadas com *H. glycines*.

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito da incorporação de diferentes resíduos culturais ao solo sobre a população de *H. glycines*, sob condições de casa-de-vegetação.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação, na Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás, em Goiânia, GO, no período de agosto de 2004 a abril de 2005.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos constituíram-se da adição de resíduos culturais ao substrato previamente preparado sendo: 1) teste-munha; 2) bagaço de cana; 3) palhada de crotalária; 4) palhada de milheto; 5) palhada de milho; 6) torta de filtro de cana. Esses compostos foram adicionados na proporção de 30% do volume do substrato, composto por uma mistura de solo e areia na proporção 1:1, previamente esterilizado através da autoclavagem à 120°C. Como recipientes foram utilizados vasos de argila com capacidade para 1,2 L. Esses resíduos adicionados ao solo, em condições de campo, corresponderiam a uma dosagem de aproximadamente 860 m³.ha⁻¹.

Incorporados os resíduos culturais correspondentes a cada tratamento, foram semeadas quatro sementes da cultivar suscetível BRSGO Luziânia. Dez dias após a emergência, foi realizado o desbaste, deixando-se duas plantas por

vaso. Em seguida, fez-se a inoculação, utilizando-se uma suspensão de ovos de *H. glycines*, raça 4, sendo depositados aproximadamente 5000 ovos e J2 por vaso. O inóculo foi obtido da extração de fêmeas multiplicadas em plantas de cultivar suscetível BRSGO Luziânia mantidas em vasos, em casa de vegetação.

Os vasos foram mantidos em bancada, imersos em areia, visando manter a temperatura do substrato no interior dos vasos mais baixa e a umidade mais uniforme. As médias das temperaturas máxima e mínima, durante o período de condução do ensaio, foram, respectivamente, de 37°C e 23°C.

Decorridos quarenta dias da inoculação, ocorreu a primeira avaliação, que consistiu em se determinar o número de fêmeas por grama de raiz, o número de ovos por fêmea, e também o número de cistos por 100 cm³ de solo e o número de ovos por cisto. Retiradas as raízes do vaso, para contagem de fêmeas, e alíquota de solo para a contagem dos cistos, foi semeada novamente, a mesma cultivar de soja. Após a emergência e desbaste, foram deixadas duas plantas por vaso, e feita nova inoculação utilizando 5000 ovos. As plantas foram deixadas vegetar em cada vaso por mais 40 dias, quando foi realizada uma segunda avaliação. Foram avaliadas as mesmas variáveis observadas na primeira avaliação. O objetivo do replantio e reinoculação nos vasos contendo o mesmo substrato, após a primeira avaliação, foi avaliar o efeito da decomposição dos resíduos culturais utilizados sobre a população de *H. glycines*, realizando uma segunda avaliação aos 40 dias após a inoculação da soja replantada nos vasos. A reinoculação se fez necessária pois, com a retirada das plantas para avaliação de fêmeas nas raízes, muitas parcelas (vasos) ficaram com uma quantidade de cistos remanescentes, insuficiente para infecção das plantas.

Para a avaliação do número de fêmeas, as raízes das plantas de soja foram lavadas sob jato forte de água, sobre peneiras de 20 e 60 mesh. O material retido na peneira de 60 mesh foi recolhido, filtrado em papel de filtro sobre calha telada (Andrade *et al.*, 1995) e examinado ao microscópio estereoscópico. De cada amostra foram recolhidas aleatoriamente 10 fêmeas, que foram rompidas sobre um conjunto de peneiras de 100 e 400 mesh para a liberação dos ovos. Os ovos retidos foram recolhidos em becker e quantificados com o auxílio de câmara de Peters e microscópio estereoscópico. Finalmente, foi determinado o número de ovos/fêmea.

Para a determinação da população de cistos, o solo de cada vaso foi homogeneizado e, na seqüência, foi retirada uma alíquota de 100 cm³. Os cistos foram extraídos utilizan-

do-se o método da suspensão e peneiramento (Tihohod, 1993). A contagem do número de cistos e ovos foi realizada de forma idêntica à descrita anteriormente para a avaliação do número de fêmeas.

Para análise estatística, os dados obtidos na primeira avaliação foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Já para a segunda avaliação, além dos 5000 ovos usados como inóculo, os cistos e ovos remanescentes no substrato após a primeira avaliação, também poderiam atuar como inóculo para as plantas. Dessa forma, foi feita uma análise de covariância considerando o total de ovos em cada vaso, corrigindo assim as diferenças na população inicial. O método de comparação múltipla de Tukey foi então aplicado às médias corrigidas.

Resultados e Discussão

Na primeira avaliação, a adição de qualquer um dos resíduos culturais reduziu significativamente os números médios de fêmeas/g de raiz e de cistos/100cm³ de solo (Tabela 1). Entretanto, não foram constatadas diferenças significativas entre os vários tipos de resíduos. Na segunda avaliação, mesmo retirando o efeito do inóculo remanescente nos vasos, através da análise de covariância, verificou-se que, de uma maneira geral, as médias do número de fêmeas/g de raiz e de cistos/100cm³ de solo, aumentaram quando comparadas com as médias da primeira avaliação.

Embora a primeira avaliação não tenha sido suficiente para discriminar o efeito entre os resíduos testados sobre a população de *H. glycines*, a segunda avaliação mostrou efeito diferenciado no número de fêmeas/g de raiz, sendo os tratamentos palha de milheto, torta de filtro e palha de milho, os que promoveram redução nestes valores (Tabela 1). Merece destaque a torta de filtro que, além de resultar no menor número de fêmeas/g de raiz, também reduziu o número médio de ovos produzidos por estas fêmeas (efeito observado na segunda avaliação). Na primeira avaliação não houve efeito dos tratamentos sobre o número de ovos/fêmea.

Em ambas as avaliações o número de cistos/100 cm³ de solo foi baixo, provavelmente devido à retirada das plantas dos vasos para avaliação das fêmeas nas raízes, removendo a maior parte dos nematóides do substrato. Mesmo assim, essa variável foi influenciada pela adição de resíduos culturais ao solo, sendo observado, na primeira avaliação, uma redução do número de cistos por 100 cm³ de solo em

todos os tratamentos, quando comparados com a testemunha (Tabela 1). Já na segunda avaliação, houve um pequeno aumento no número de cistos em relação à primeira avaliação, mesmo eliminando o efeito do inóculo remanescente através da análise de covariância. Nesta segunda avaliação observou-se efeito semelhante ao que foi encontrado para o número de fêmeas nas raízes, sendo a palha de milheto e torta de filtro os tratamentos que resultaram no menor número de cistos, com destaque para a torta de filtro que apresentou o menor número de cistos em relação aos demais tratamentos.

Com relação ao número de ovos/cisto, foram observadas diferenças significativas apenas na segunda avaliação, com destaque novamente para a torta de filtro que induziu à produção de menor número médio de ovos/cisto.

Os resultados, aqui obtidos, estão de acordo com aqueles observados em outros trabalhos descritos na literatura, nos quais algumas gramíneas estudadas apresentaram pro-

dução de compostos químicos com atividade nematicida. Widmer & Abawi (2002) mostraram que a incorporação de palhada de sorgo, como adubo verde, resultou na redução de 54 % da população de *Meloidogyne hapla*, devido a presença de um glicosídeo cianogênico. Hershamn *et al.* (1995), avaliando o efeito dos resíduos da cultura do trigo sobre a população de *H. glycines*, verificaram uma redução significativa da população de cistos. Dias-Arieira *et al.* (2003) observaram haver inibição da eclosão de ovos de *H. glycines* e *M. javanica*, quando estes eram expostos a extratos obtidos dos sistemas radiculares de gramíneas forrageiras por metanol e acetona.

No presente estudo, a adição de resíduos culturais ao substrato também mostrou-se eficiente em reduzir a população de *H. glycines*. A ação dos resíduos, na primeira avaliação, provavelmente ocorreu em função de a maior parte das substâncias nocivas aos nematóides terem sido produzidas nos estágios iniciais da decomposição da matéria or-

Tabela 1. Efeito de diferentes resíduos culturais, adicionados ao substrato, sobre o número médio de fêmeas, cistos e ovos de *Heterodera glycines* em raízes de soja cultivar BRSGO Luziânia.

Tratamentos	Fêmeas/g raízes	Ovos/ Fêmea	Cisto/100 cm ³ de solo	Ovos/ cisto	Peso de raízes (g)
1 ^a . Avaliação					
Testemunha	810,00 a	240,00 a	28,20 a	251,00 ab	1,48 ab
Milheto	48,40 b	194,80 a	5,80 b	249,20 ab	1,59 ab
Torta de filtro	130,40 b	167,20 a	2,00 b	54,85 a	2,76 a
Bagaço de cana	253,00 b	183,60 a	6,40 b	248,20 ab	2,11 ab
Milho	130,00 b	269,20 a	6,40 b	274,00 ab	1,49 ab
<i>Crotalaria juncea</i>	327,00 b	205,20 a	4,60 b	335,00 b	1,19 b
CV%	76,49	186,61	108,89	49,10	38,68
2 ^a . Avaliação					
Testemunha	863,60 c	272,13 ab	20,55 bc	376,97 a	1,61 a
Milheto	438,20 b	391,23 c	10,21 ab	326,40 a	1,55 a
Torta de filtro	190,40 a	245,92 a	4,07 a	304,49 a	3,53 c
Bagaço de cana	1.089,50 d	277,56 ab	44,75 d	348,07 a	1,67 b
Milho	438,60 b	305,16 b	21,65 c	295,82 a	2,16 b
<i>Crotalaria juncea</i>	1.049,20 cd	308,44 b	13,55 b	331,68 a	1,50 b
CV%	55,02	33,70	81,15	42,18	24,40

Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

gânica. Segundo Stirling (1991), após a incorporação da matéria orgânica ao solo ocorre a produção de numerosas substâncias químicas, cuja composição e concentração variam ao longo do tempo. No entanto, os resultados indicam que a torta de filtro teve este efeito prolongado, sendo eficiente na redução da população de *H. glycines* na segunda avaliação que ocorreu aproximadamente cem dias após a adição dos resíduos ao solo.

O pronunciado efeito antagonista do milheto sobre a população de *H. glycines*, observado na primeira avaliação, está em acordo com os resultados de Belair *et al.* (2001), que observaram redução da população de *Pratylenchus penetrans* devido a utilização de restos culturais de milheto incorporado ao solo.

Reduções nas populações de *H. glycines* devido à incorporação da palha de milho ao substrato, também já haviam sido observadas por Riga *et al.* (2000). Em razão desse efeito, sugere-se que essa cultura possa ser utilizada em rotação com a cultura da soja para suprimir a população deste fitonematóide, como tem sido observado em trabalhos conduzidos por Noel & Max (2003).

Nos tratamentos em que se utilizou a palha de *Crotalaria juncea* ou o bagaço de cana não foi verificado efeito antagônico consistente sobre a população do nematóide. Na segunda avaliação, inclusive, o número de fêmeas encontrado nas raízes da soja, nestes tratamentos, foi maior que aquele encontrado na testemunha. Alguns autores afirmam que esta espécie de crotalária, comumente empregada em adubação verde, é hospedeira de *H. glycines* (Wutke, 1993 e Yorinori *et al.*, 1994). No entanto, no presente estudo isso não justifica os resultados pois as plantas não foram deixadas vegetar. Por outro lado, Schawan *et al.* (2003), usando massa verde incorporada ao solo, observaram que, entre as espécies de crotalária testadas, a *C. juncea*, resultou em menores populações de *H. glycines*.

Um fator a ser considerado neste estudo é que a palha de crotalária incorporada durante os experimentos foi proveniente apenas dos ramos secos da planta que, ao contrário da massa verde, pode não ter proporcionado efeito sobre o nematóide. Segundo Fassuolotis & Skucas (1969) e Freire & Ferraz (1997), a concentração do alcalóide monocrotalina, substância nematicida, ocorre apenas em determinadas partes desta planta, como folhas, frutos e raízes, e a liberação da mesma depende da fase de desenvolvimento da planta. A esterilização do substrato utilizado, também pode ter prejudicado a ação da crotalária através da eliminação de possíveis microrganismos antagonistas ao nematóide. De acordo com Quiroga-Madrigal *et al.*

(1999), Rodríguez-Kábana & Kloepper (1998) e Wang *et al.* (2001), a incorporação de *C. juncea* ao solo estimula o crescimento da população de inimigos naturais de nematóides.

O efeito acentuado da torta de filtro sobre a população de *H. glycines*, indica a possível presença nesse resíduo, de certos compostos químicos com ação nematicida ou nematostática. Albuquerque *et al.* (2001) observaram reduções nas taxas de eclosão de juvenis de segundo estádio de *M. incognita* e *M. javanica*, decorrentes da exposição dos ovos a extratos de torta de filtro. O fato da adição de torta de filtro ter resultado em formação de um maior volume de raízes da soja (Tabela 1), pode levar a inferir que a sua ação seja sobre o desenvolvimento das plantas o que, indiretamente levaria a certa tolerância ao ataque de nematóides. No entanto, no presente trabalho, as avaliações da população de *H. glycines* (fêmeas e cistos) foram relativas ao peso de raízes e ao volume de solo, o que eliminaria este efeito. Portanto, acredita-se que o uso da torta de filtro de cana possa ser mais uma medida a ser adotada em um programa de manejo do nematóide de cisto da soja, visando manter as populações desse nematóide em níveis que não causem prejuízo econômico.

Literatura Citada

- ANDRADE, P. J. M.; G. L. ASMUS & J. F. V. SILVA. 1995. Um novo sistema para detecção e contagem de cistos de *Heterodera glycines* recuperados de amostras de solo. Fitopatologia Brasileira, 20(suplemento): 358.
- ALBUQUERQUE, P. H. S.; M. R. PEDROSA & R. M. MOURA. 2001. Efeito de vinhaça e extrato de torta de filtro sobre a eclosão de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *M. javanica*. Nematologia Brasileira, 25(2):175-183.
- AKTAR, M. & A. MALIK. 2000. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. Bioresource Technology, 74:35-47.
- BELAIR, G.; Y. FOURNIER & N. DAUPHINAIS. 2001. Effect of pearl millet and sorghum hybrids on *Pratylenchus penetrans* populations and potato yields in Quebec. Journal of Nematology, 33(4):250.
- BIRD, G. 2000. Nematodes and soil ecology. In: Michigan Field Crop Ecology, Michigan State University Extension, Bull. E-2704, p 84-94.

- BRADA, T.; M. A. SALEH & B. A. ATEIFAR. 1979. Nematicidal activity and composition of some organic fertilizers and amendments. Review Nématologie, 2:29-36.
- COSTA, M. J. N; V. P. CAMPOS & D. F. OLIVEIRA. 2001. Toxicidade de extratos vegetais e de estercos a *M. incognita*. Suma Phytopatologica, 27(2):22-23.
- DIAS, W. P; A. GARCIA & J. F. V. SILVA. 2000. Nematóides associados à cultura da soja no Brasil. In: CONGRESO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, XXII, Uberlândia. Resumos e Palestras, p.59-70.
- DIAS-ARIEIRA C. R.; S. A. J. FERRAZ; L. DEMUNER & G. FREITAS. 2003. Eclosão de juvenis de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines* frente a extratos químicos dos sistemas radiculares de *Brachiaria brizantha* e *Panicum maximum* cv. Guiné. Nematologia Brasileira, 27(1):87-92.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropécuaria. 2005. Tecnologias de produção de soja 2006. Embrapa Soja, Londrina. 220 p.
- FASSUOLOTIS, G. & SKUCAS, 1969. The effects of pyrrolizidina alkaloid ester and plants containing pyrrolizina on *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology, 1(4):287-288.
- HERSHMAN, D. E. & BACHI, P. R. 1995. Effect of wheat residue and tillage on *Heterodera glycines* and yield of doublecrop soybean in Kentucky. Plant Disease, 79:361-633.
- FERRAZ, S. & L. A. C. VALLE. 1997. Controle de fitonematóides por plantas antagônicas. UFV, Viçosa. 73p. (Cadernos didáticos).
- FREIRE, F. C. O. & S. FERRAZ. 1997. Resistência de cultivares de feijoeiro a *M. incognita* e *M. javanica* e influência da temperatura e exsudatos radiculares sobre a eclosão de suas larvas. Revista Ceres, 24:247-260.
- NOEL, G. R. & M. L. WAX. 2003. Population dynamics of *Heterodera glycines* in conventional tillage and no-tillage soybean/corn cropping systems. Journal of Nematology, 35(1):104-109.
- QUIROGA-MADRIGAL, R.; R. RODRÍGUEZ-KÁBANA; D. G. ROBERTSON; C. F. WEAVER & P. S. KING. 1999. Nematode populations and enzymatic activity in rhizospheres of tropical legumes in Auburn, Alabama. Nematropica, 29:129.
- RIGA, E.; T. WELACKY; J. POTTER; T. ANDERSON; L. TOPP & A. TENUTA. 2000. The impact of plant residues on the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. Plant Pathology, 23:169-173.
- RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. 1986. Organic and inorganic amendments to soil as nematode suppressants. Journal of Nematology, 18(2):129-135.
- RODRÍGUES-KÁBANA, R. & J. W. KLOEPFER. 1998. Cropping systems and the enhancement of microbial activities antagonistic to nematodes. Nematropica, 28:177.
- SANTOS, J. M. 2000. Doenças causadas por nematóides. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 33, Belém. Anais, p. 311-317.
- SCHAWAN, A. V.; W. L. GAVASSONI; L. M. A. BACCHI & G. L. ASMUS. 2003. Efeito antagônico de espécies de crotalária sobre *Heterodera glycines*. In: CONGRESO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 24, Petrolina. Resumos, p.87.
- SILVA, J. F. V. 1999. Um histórico. In: SILVA, J.F.V. (ed) O Nematóide de Cisto: a Experiência Brasileira. Sociedade Brasileira de Nematologia, Jaboticabal, p.15-23.
- STECHOW, R. 1996. Plantio direto e o nematóide de cisto da soja. Revista Plantio Direto, 34:23-24.
- STIRLING, G. R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects. Wallingford: CAB International. 282p.
- TEIXEIRA, D. A.; L. ZAMBOLIM; R. D. LIMA & W. P. DIAS. 1997. Época de incorporação de diferentes fontes de matéria orgânica sobre a população do nematóide de cisto da soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 15, Gramado. Resumos e Palestras, p. 62.
- TENENTE, R. C. V.; L. G. R. LORDELLO & J. F. S. DIAS. 1982. Estudo com a excreção radicular de mucuna preta na eclosão de larvas, porcentagens de penetração e crescimento de *Meloidogyne incognita* raça 4. Nematologia Brasileira, 5(1):271-284.
- TIHOHOD, D. Nematologia agrícola aplicada. Jaboticabal: FUNESP, 1993. 281-285p.

- VALLE, A. L.; W. P. DIAS & S. FERRAZ. 1996. Reação de algumas espécies vegetais, principalmente leguminosas ao nematóide de cisto da soja, *Heterodera glycines* Ichinohe. *Nematologia Brasileira*, 20(2):30-40.
- VIAENE, N. M. & G. S. ABAWI. 1998. Manejo of *Meloidogyne hapla* on lettuce in organic soil with sudangrass as cover crop. *Plant Disease*, 82:945-952.
- WANG, K. H.; B. S. SIPES & D. P. SCHMITT. 2001. Supres-
sion of *Rotylenchulus reniformis* by *Crotalaria jun-
cea*, *Brassica napus*, and *Tagetes erecta*. *Nematropi-
ca*, 31:237-251.
- WANG, K. H.; B. S. SIPES & D. P. SCHMITT. 2002. Crotalaria
as a cover crop for nematode management. A review.
Nematropica, 32: 35-57.
- WIDMER, T. L.; N. A. MILKOWSKI & G. S. ABAWI. 2002.
Soil organic matter and management of plant-parasitic
nematodes. *Journal of Nematology*, 34(4):289-295.
- WIDMER, T. L. & ABAWI, G. S. 2002. Relationship between
levels of cyanide in sundangrass hybrids incorporated
into soil and suppression of *Meloidogyne hapla*.
Jounal of Nematology, 34(1):16-22.
- WUTKE, E. B. 1993. Adubação verde: manejo da fitomassa
e espécies utilizadas no Estado de São Paulo. In:
WUTKE, E.B.; E. A. A. BULISANI & H. A. A.
MASCARENHAS (eds). *Curso sobre Adubação Ver-
de no Instituto Agronômico*. Instituto Agronômico,
Campinas, p. 17-29.
- YORINORI, J. T.; P. R. GALERANI & A. GARCIA. 1994.
Manejo da Cultura para Controle de Nematóide de Cis-
to da Soja. Embrapa-Soja, Londrina. 26p.

Caracterização e Identificação de Populações de Nematóides de Galhas Provenientes de Figueiras (*Ficus carica* L.) do Rio Grande do Sul e de São Paulo*

ISRAEL LIMA MEDINA¹, CESAR BAUER GOMES², CARLOS ROSSI³ &
REGINA M. D. GOMES CARNEIRO⁴

*Parte da dissertação de Mestrado do primeiro autor

¹ Universidade Federal de Pelotas, C.P.354, CEP 96001-970, Pelotas, RS, ²Embrapa Clima Temperado, CP.403, 96001-970 Pelotas, RS.

³ Instituto Biológico/Nematologia, C. P. 70, 13001-970 Campinas, SP.. ⁴ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P.02372, CEP 70849-970, Brasília, DF, Brasil.
e-mail: cbauer@cpact.embrapa.br

Recebido para publicação em 12/05/2006. Aceito em .30/11/2006

Resumo: Medina, I.L.; C.B. Gomes; C Rossi & R.M.D.G. Carneiro. 2006. Caracterização e identificação de populações de nematóides de galhas provenientes de figueira (*Ficus carica* L.) do Rio Grande do Sul e de São Paulo .

Trinta e oito populações de *Meloidogyne* spp., provenientes de pomares de figueira dos Estados do Rio Grande do Sul (RS) e de São Paulo (SP), foram caracterizadas e identificadas usando as isoenzimas esterase (Est) e malato desidrogenase (Mdh), hospedeiros diferenciadores e configuração da região perineal de fêmeas. Populações de *Meloidogyne* com os fenótipos Est I1 (Rm: 1,0) e Est I2 (Rm: 1,0, 1,1) foram identificadas como *M. incognita*, sendo o fenótipo I2 o mais freqüente. Essa espécie foi detectada em 80% das amostras, sendo a espécie que ocorreu com maior freqüência em ambos os Estados. Três fenótipos atípicos de *Meloidogyne* spp.: Est S1 (Rm: 0,9), Est F2b (Rm: 0,9, 1,0) e Est F2a (Rm: 1,1, 1,2) foram observados em cerca de 20% das amostras. Todas as populações de nematóides apresentaram bandas monomórficas com o fenótipo Mdh N1. As raças 1, 2 e 3 de *M. incognita*, foram identificadas através do teste com hospedeiros diferenciadores, predominando a raça 1. Não foi possível correlacionar os fenótipos de esterase com as raças encontradas. Espécies mistas de *Meloidogyne* foram detectadas em 17.8% das amostras estudadas. Os padrões perineais das fêmeas de *M. incognita* (Est I1 e I2) mostraram configurações similares e típicas dessa espécie. Entretanto, a análise dos padrões perineais das populações atípicas não permitiram a identificação específica. Mais estudos morfológicos e morfométricos serão necessários para esclarecer a identificação dessas populações.

Palavras-chave: nematóide de galhas, identificação, fenótipo de esterase, raças, padrão perineal, *Ficus carica*.

Summary: Medina, I.L.; C.B. Gomes; C Rossi & R.M.D.G. Carneiro. 2006. Characterization and identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from fig trees in Rio Grande do Sul and São Paulo States of Brazil.

Thirty-eight *Meloidogyne* spp. populations from fig orchards in Rio Grande do Sul and São Paulo States were characterized by esterase (Est) and malato-dehydrogenase (Mdh) isoenzymes, differential host test and female perineal pattern morphology. *Meloidogyne* populations with the phenotypes Est I1 (Rm: 1.0) and I2 (Rm: 1.0, 1.1) were identified as *M. incognita* with the Est I2 being the most frequent. *M. incognita* was detected in about 80% of the samples, and it was the most common species identified on fig plants in both States. Three atypical phenotypes of *Meloidogyne* spp.: Est S1 (Rm: 0.91), Est F2b (Rm: 0.91, 1.0) and Est F2a (Rm: 1.0, 1.2) were observed in about 20% of the samples. All nematode populations showed monomorphic bands with the phenotype Mdh N1. Races 1, 2 and 3 of *M. incognita* were identified by differential host test, with race 1 being the most abundant. No correlation was observed among esterase phenotypes and races. Mixed species of *Meloidogyne* spp.

were detected in 17.8% of the samples. The morphology of perineal patterns of *M. incognita* females (Est. I1 and I2) showed similar and typical patterns of this species for both esterase phenotypes. However, the perineal patterns of atypical esterase phenotype populations did not allow the species identification. Further morphological and morphometrical studies will be necessary to clarify the taxonomic status of these populations.

Keywords: root-knot nematodes, esterase phenotype, identification, races, perineal patterns, *Ficus carica* L.

Introdução

Dentre os problemas fitossanitários que prejudicam a figueira (*Ficus carica* L.), o nematóide das galhas (*Meloidogyne* sp.) é considerado um dos fatores mais limitantes ao seu rendimento e produtividade (Scherb, 1993). Campos (1997) considerou *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, 1949 a espécie mais danosa à cultura no Brasil. Figueiras infectadas com *Meloidogyne* sp. apresentam raízes com grande número de galhas e necroses nos tecidos, o que compromete a sua capacidade de absorver água e nutrientes. Plantas severamente atacadas entram rapidamente em declínio, exibindo sintomas evidentes de enfraquecimento, podendo morrer dependendo do manejo da cultura (Santos & Maia, 1999).

O cultivo da figueira no Brasil está baseado, predominantemente, na cultivar Roxo de Valinhos, material extremamente suscetível ao nematóide das galhas. Medidas de controle, como o uso de porta-enxertos resistentes, não têm sido possíveis devido à inexistência de material disponível no mercado. A utilização de produtos químicos para controle do nematóide em pomares afetados, ou, para erradicação do patógeno em mudas, além de serem medida onerosas e pouco eficientes, têm seu uso restringido pela falta de nematicidas registrados para a cultura. Fertilizações constantes parecem prolongar a vida produtiva das plantas atacadas, entretanto, gradativamente, o pomar entra em declínio (Medeiros, A.C., inf. pessoal). Devido à baixa eficiência e altos custos dos métodos de controle em pomares já implantados, o plantio de mudas sadias em áreas livres do nematóide constitui-se na principal medida preventiva de controle (Campos, 1992).

No Brasil, poucos foram os levantamentos nematológicos realizados para a identificação das espécies de *Meloidogyne* na cultura da figueira (Lordello, 1958 e Moura, 1967). Nesses estudos, os autores concluíram, com base em critérios morfológicos, que *M. incognita* foi a única espécie prejudicial relacionada à cultura.

A identificação das espécies de *Meloidogyne* é baseada nas configurações perineais das fêmeas e nos testes

com hospedeiros diferenciadores (Hartman & Sasser, 1985; Eisenback, 1985). Entretanto, a identificação precisa das espécies, baseada somente nesses critérios, é uma tarefa difícil mesmo para nematologistas com grande experiência (Carneiro et al., 2000). A utilização de métodos bioquímicos usando eletroforese de isoenzimas, tem demonstrado que a maior parte das espécies do nematóide das galhas pode ser identificada pelos fenótipos de esterase. Vários autores reconhecem esse método como excelente e, uma ferramenta indispensável para uso na taxonomia do gênero *Meloidogyne* spp. (Dalmasso & Bergé, 1978; Esbenschade & Triantaphyllou, 1985, 1990; Carneiro et al., 1996, 2000).

Considerando-se a importância do nematóide das galhas na figueira e a necessidade de estudos mais precisos, foi objetivo do presente trabalho caracterizar bioquímica, morfológica e fisiologicamente populações do nematóide das galhas presentes em diferentes pomares de figueira, provenientes do Rio Grande do Sul e de São Paulo.

Material e Métodos

Vinte e oito amostras de raízes de figueira infectadas com o nematóide das galhas e provenientes de diferentes áreas produtoras de figo dos Estados do Rio Grande do Sul e de São Paulo (Tabelas 1 e 2), foram inicialmente identificadas com base nos fenótipos de esterase, utilizando-se 40 fêmeas adultas. Em cada gel foi incluído um extrato protéico de um isolado de *M. javanica*. Posteriormente, foram obtidas populações puras de *Meloidogyne* spp. e multiplicadas em plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) cv. Santa Cruz e mantidas em casa de vegetação a $25 \pm 5^\circ\text{C}$, para posteriores estudos morfológicos, fisiológicos e sobretudo bioquímicos: esterase(Est) e malato desidrogenase (Mdh) conforme Carneiro & Almeida (2001).

A caracterização morfológica dos isolados foi feita com base na região perineal de fêmeas adultas cortadas em ácido lático a 45% e montados em lâminas com glicerina, para posterior observação ao microscópio ótico (Hartmann & Sasser, 1985).

Machos e juvenis do segundo estádio (J2) de *M. incognita* Est I1 e I2 (Tabela 1) foram fixados a 4°C com glutaraldeído 2% diluído em tampão cacodilato por 24 horas. Posteriormente, foram fixados em Tetróxido de Ósmio (2%) durante 2 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, os espécimes foram desidratados duas vezes em acetona nas diluições 30, 50, 70, 90 e 100% com intervalos de 15 minutos. Logo após, os nematóides foram submetidos ao ponto crítico para a completa sublimação da acetona. Os espécimes foram montados em porta-amostras

(stubs) revestidos por fita dupla-face e montados com apoio de um fio de cabo disposto previamente nos stubs. Após a metalização, foram feitas observações ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM-962 (Eisenback, 1985).

Vinte e duas populações de *M. incognita*, previamente identificadas por eletroforese com os fenótipos de esterase, Est I1 e Est I2 e uma população atípica de *Meloidogyne* sp. (Est S1) (Tabelas 1 e 2), provenientes do Rio Grande do Sul, foram submetidas ao teste de hospedeiros diferenciadoras, utilizando algodão cv. Deltapine 61, fumo cv. NC 95, e toma-

Tabela 1. Fenótipos isoenzimáticos de esterase (Est.) e malato desidrogenase (Mdh) e suas respectivas percentagens de ocorrência observados em 25 populações de *Meloidogyne* spp., provenientes de plantas de figueira cv. Roxo Valinhos, coletadas em diferentes locais do Rio Grande do Sul.

Amostra (Populações)	Procedência (Município)	Espécie	Fenótipo	Ocorrência (%)	
			Est	Mdh	
A1a	Frederico	<i>M. incognita</i>	I1	N1	3,57
A1b	Westphallen	<i>M. incognita</i>	I2	N1	26,78
A1c		<i>Meloidogyne</i> sp.1	S1	N1	69,64
A2a	Frederico	<i>Meloidogyne</i> sp.1	S1	N1	25,71
A2b	Westphallen	<i>M. incognita</i>	I2	N1	74,28
A3	Frederico Westphallen	<i>M. incognita</i>	I1	N1	100
A4	Ametista do Sul	<i>M. incognita</i>	I1	N1	100
A5a	Ametista do Sul	<i>M. incognita</i>	I1	N1	67,95
A5b		<i>M. incognita</i>	I2	N1	32,05
A6a	Ametista do Sul	<i>M. incognita</i>	I1	N1	59,70
A6b		<i>M. incognita</i>	I2	N1	40,29
A7a	Planalto	<i>M. incognita</i>	I2	N1	78,05
A7b		<i>Meloidogyne</i> sp.2	F2b	N1	21,04
A8a	Planalto	<i>M. incognita</i>	I1	N1	2,94
A8b		<i>M. incognita</i>	I2	N1	97,05
A9	Planalto	<i>M. incognita</i>	I2	N1	100
A10a	Alpestre	<i>Meloidogyne</i> sp.1	S1	N1	2,94
A10b		<i>M. incognita</i>		N1	97,05
A11	Alpestre	<i>M. incognita</i>	I2	N1	100
A12	Alpestre	<i>M. incognita</i>	I2	N1	100
A13	Santana Boavista	<i>M. incognita</i>	I2	N1	100
A14	Santana Boavista	<i>M. incognita</i>	I2	N1	100
A15	Pelotas	<i>M. incognita</i>	I2	N1	100
A16	Pelotas	<i>M. incognita</i>	I2	N1	100
A17	Encruzillada do Sul	<i>M. incognita</i>	I2	N1	100

Tabela 2. Fenótipos isoenzimáticos de esterase (Est.) e malato desidrogenase (Mdh) e suas respectivas percentagens de ocorrência observados em 13 populações de *Meloidogyne* spp. em plantas de figueira, provenientes de diferentes locais do estado de São Paulo.

Amostra	Procedência Município	Cultivar	Espécie	Fenótipo		% de ocorrência
				Est	Mdh	
A18	Valinhos*	Roxo de Valinhos	<i>M. incognita</i>	I1	N1	100
A19a	Valinhos*	Roxo de Valinhos	<i>M. incognita</i>	I2	N1	83,40
A19b	Valinhos*	Roxo de Valinhos	<i>Meloidogyne</i> sp.2	F2b	N1	16,60
A20	Valinhos*	Roxo de Valinhos	<i>M. incognita</i>	I2	N1	100
A21	Valinhos*	Roxo de Valinhos	<i>M. incognita</i>	I2	N1	100
A22a	Valinhos*	Roxo de Valinhos	<i>M. incognita</i>	I2	N1	66,67
A22b	Valinhos**	Roxo de Valinhos	<i>M. incognita</i>	I1	N1	33,33
A23	Valinhos**	Roxo de Valinhos	<i>M. incognita</i>	I2	N1	100
A24	Valinhos**	Roxo de Valinhos	<i>M. incognita</i>	I2	N1	100
A25	Valinhos**	Palestino	<i>M. incognita</i>	I2	N1	100
A26	Valinhos**	Português	<i>Meloidogyne</i> sp.3	F2a	N1	100
A27	Valinhos**	Roxo de Valinhos	<i>Meloidogyne</i> sp.3	F2a	N1	100
A28	Valinhos**	Roxo de Valinhos	<i>Meloidogyne</i> sp.2	F2b	N1	100

* Bairro Frutal; ** Bairro Pinheiro.

te cv. Rutgers (Hartman & Sasser, 1985). As diferentes plantas diferenciadoras, mantidas em sacos plásticos com 2 kg de solo autoclavado, foram inoculadas com 5000 ovos/planta de cada população testada, em casa de vegetação a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Hussey & Barker, 1973; Bonetti & Ferraz, 1981). Para cada espécie vegetal, foram utilizadas seis repetições distribuídas ao acaso. Decorridos 60 dias da inoculação, as raízes das diferentes espécies foram coloridas com Floxina B (150 mg em um litro de água), durante 15 a 20 minutos, e, avaliadas quanto ao número de galhas e massas de ovos, conforme escala proposta por Taylor & Sasser (1978). Considerou-se como hospedeiro suscetível (+) as plantas que apresentaram nota >2 (mais de 10 galhas), e resistentes (-), aquelas que apresentam índices entre 0 e 2 (0 - 10 galhas).

Resultados

Identificação das espécies através de análises bioquímicas

No Rio Grande do Sul, foram detectadas seis populações de *M. incognita* com o fenótipo de esterase Est I1 (Rm: 1.0) e 15 populações com o fenótipo de esterase Est I2 (Rm: 1.0, 1.1) (Figuras 1 e 2, Tabela 1), correspondendo a 25,0 % e 58,0% das amostras, respectivamente. Também foram en-

contrados os fenótipos Est S1 (Rm: 0,9) em três populações atípicas (A1c, A2a e A10a) e Est F2b (Rm 0,9, 1,0) em uma outra população atípica (A7b), correspondendo a 13,0 e 4,0% das amostras analisadas, respectivamente.

Em amostras provenientes do Estado de São Paulo, foram detectadas sete populações de *M. incognita* com o fenótipo Est I2 (Rm: 1.0, 1.1), e apenas duas com o fenótipo específico Est I1 (Rm: 1.0), correspondendo a 53,84 e 15,38% das populações analisadas, respectivamente. Foram encontradas duas populações atípicas com o fenótipo F2a (Rm: 1.1, 1.2), e outras duas com o fenótipo F2b (Rm: 0,9, 1,0) em 25% das amostras. O polimorfismo das bandas esterásicas do fenótipo F2b revelou a presença de duas bandas fortes (Rm: 1.0, 0,9). Nas populações com fenótipo F2a, observou-se a presença de uma banda mais forte (Rm: 1,1), e outra com intensidade mais fraca (Rm: 1,2), a qual só foi possível de ser visualizada quando mais de cinco fêmeas foram maceradas na mesma amostra.

Nos dois Estados verificou-se a ocorrência de espécies mistas de *Meloidogyne* associadas à figueira (Tabelas 1 e 2) em 17,8% das amostras.

Em todas as amostras onde foram detectadas populações mistas, o fenótipo I2 de *M. incognita*, sempre esteve presente, ocorrendo na maioria das vezes, em predominância. Utilizando-se a enzima esterase, não foi possível identi-

ficar as espécies representadas pelos fenótipos atípicos das populações de *Meloidogyne* sp.1, 2 e 3 (Figuras 1 e 2), pois esses padrões nunca foram previamente identificados em estudos taxonômicos detalhados.

Verificou-se que em todas as populações de *Meloidogyne* spp. os fenótipos de Mdh apresentaram uma única banda, a qual foi designada pela letra N1 que indica “não específico” (Tabelas 1 e 2).

Caracterização morfológica

Constatou-se pela análise da região perineal que as populações Est. I1 e I2 (Tabela 1 e 2) de *M. incognita*, apresentaram características típicas dessa espécie (Figura 3 A, B): arco dorsal alto composto de estrias finas e onduladas ao longo de todo o campo lateral.

Os machos apresentaram características típicas de *M. incognita*: o disco labial largo e redondo, côncavo no centro e com estrias abaixo dos lábios médios (Figura 4 A e B) e os juvenis de segundo estádio (Est. I1 e I2) apresentaram região anterior típica dessa espécie; disco labial pequeno e redondo, levemente levantado abaixo dos lábios médios, apresentando na região anterior, várias estrias bem visíveis (Figura 4 C).

A população atípica de *Meloidogyne* sp. com fenótipo S1N1, apresentou configurações perineais próxima a de *M. incognita* (Figura 3 C), nas quais observou-se a presença de mais ondulações laterais, conforme já relatado por Castro (2001). Os machos dessa população não foram analisados neste trabalho por escassez de material.

As configurações perineais da população Est F2a (Figuras 3D, E) foram muito variáveis entre si e semelhantes àquelas de *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949. A população Est F2b (Figura 3 F) apresentou configurações perineais também bastante variáveis, próximas a *M. incognita*. Não foi possível o estudo dos machos e J2 devido à escassez do material reproduzido em tomateiro.

Caracterização fisiológica

Entre as 22 populações de *Meloidogyne*, provenientes do Rio Grande do Sul, avaliadas através dos testes com plantas hospedeiras diferenciadoras (Hartmann & Sasser, 1985), caracterizou-se a raça 1 de *M. incognita* em quinze populações (inclusive o fenótipo S1), a raça 2 em seis e a raça 3 em apenas uma população (Tabela 3). Verificou-se que a raça 1 foi detectada em 12 populações com o fenótipo Est I2 e em três populações com fenótipo Est I1, e, a raça 2, em quatro populações com o fenótipo Est I1, e, duas, com Est I2.

Rm	<i>Meloidogyne javanica</i>	<i>Meloidogyne incognita</i>	<i>Meloidogyne incognita</i>	<i>Meloidogyne</i> sp1	<i>Meloidogyne</i> sp1	<i>Meloidogyne</i> sp3	
1.6							
1.4	- 6						
1.2	- 5						
1.0							
0.8	- 2	- 2	- 2	3	1	2	
	Est	J3	I1	I2	S1	F2a	F2b

Figura 1. Fenótipos de esterase (Est) e suas respectivas percentagens de ocorrência observados em 38 populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de figueiras nos estados do Rio Grande do Sul e de São Paulo. *M. javanica* (J3) foi usada como padrão.

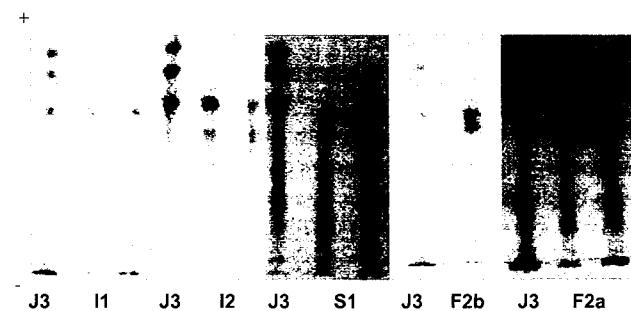


Figura 2. Fenótipos de esterase detectados em 28 populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de figueiras do Rio Grande do Sul e de São Paulo. *M. incognita* (I1 e I2), *Meloidogyne* sp.1 (S1); *Meloidogyne* sp.3 (F2b); e, *Meloidogyne* sp.2 (F2a), e o padrão *M. javanica* (J3).

Discussão

Neste estudo foi feita a caracterização e identificação de populações de *Meloidogyne* coletadas em pomares de figo nos Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, usando

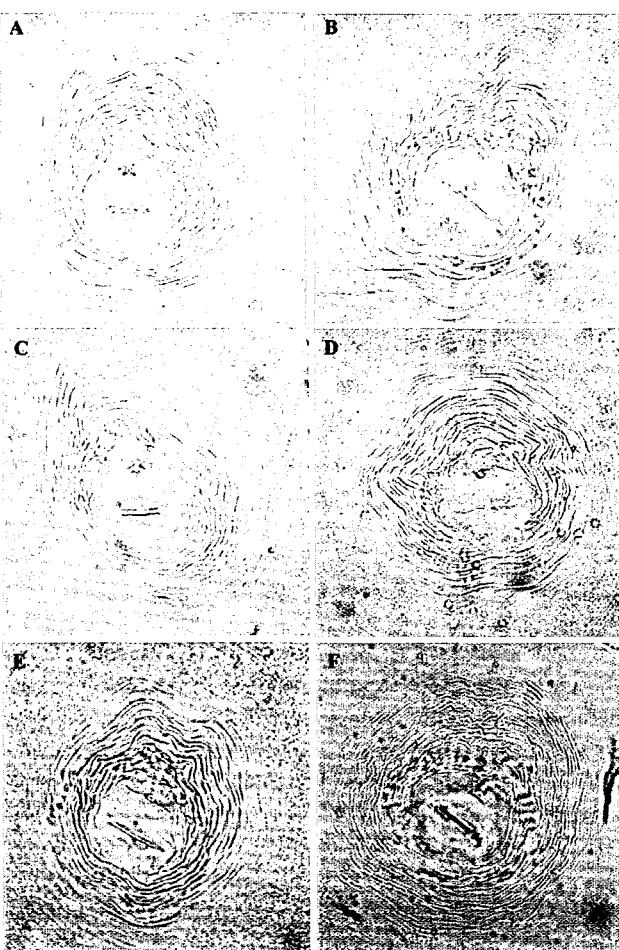


Figura 3. Padrões perineais de diferentes populações de *Meloidogyne* spp. provenientes do Rio Grande do Sul e de São Paulo com os fenótipos de esterase: Est. I1 (A), Est I2 (B), Est S1 (C), Est F2a (D,E) e F2b (F).

o fenótipo enzimático (esterase e malato desidrogenase), caracteres morfológicos e hospedeiros diferenciadores. Embora outros levantamentos tenham sido realizados em pomares de figo, este foi o primeiro estudo usando marcadores enzimáticos. A enzima esterase (Est) foi espécie específica, enquanto a enzima malato desidrogenase (Mdh) não foi polimórfica, sendo o fenótipo N1 o mais frequente em vários estudos realizados (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985 e 1990; (Pais & Abrantes, 1989; Esbenshade & Triantaphyllou, 1985, 1990; Carneiro *et al.*, 1996 e 2000; Cofcewicz *et al.*, 2004; 2005), Carneiro *et al.*, 1996 e 2000, Cofcewicz *et al.*, 2005).

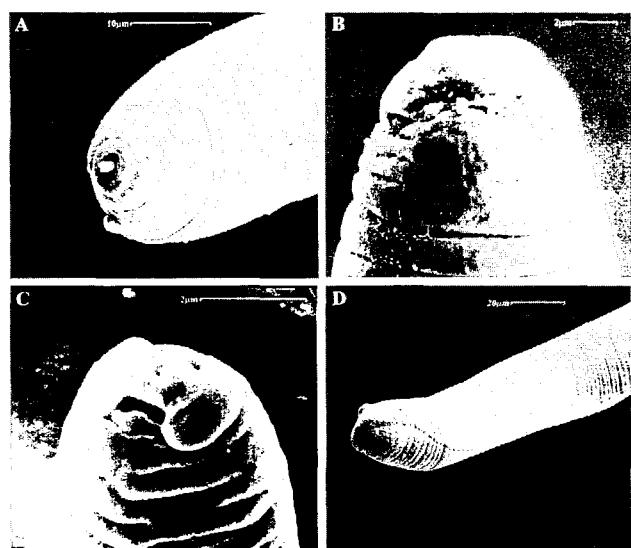


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da região anterior de machos *M. incognita*, com os fenótipos Est. I1 (A) e I2 (B) e de juvenis de segundo estádio da população com o fenótipo Est I2 (C). Cauda de macho mostrando campos laterais da população com o fenótipo Est I2.

A predominância de *M. incognita* em 80% das amostras está de acordo com o que já havia sido relatado por Lordello (1958) e Moura (1967), que detectaram apenas essa espécie em figueiras. A predominância do fenótipo Est I2 em relação ao Est I1 foi observada, mostrando a sua maior ocorrência. Estudos similares realizados em outras culturas também demonstraram a predominância desse fenótipo em algumas culturas (Carneiro *et al.*, 1996, 2000, 2005; Castro, *et al.* 2003; Cofcewicz, *et al.* 2004, 2005). A separação dos fenótipos I1 e I2 de *M. incognita* muitas vezes não é fácil, pois a segunda banda, que caracteriza I2 é tênue e de difícil observação. A intensidade depende do estado de conservação da fêmea macerada, sendo mais nítida em fêmeas mais jovens (Carneiro *et al.*, 1996).

Estudos morfológicos (configuração da região perineal e região labial de machos e J2) confirmaram que esses dois fenótipos (I1 e I2) representam realmente dois variantes de *M. incognita* (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Esses resultados discordam da afirmação feita por Favoreto (2001), que sugere que o fenótipo I2 seja uma nova espécie de *Meloidogyne* do cafeeiro. Estudos moleculares (PCR-RAPD)

Tabela 3. Identificação de raças de *M. incognita*, através do teste de plantas hospedeiras diferenciadoras em 22 populações de *Meloidogyne* spp. provenientes do Rio Grande do Sul e seus respectivos fenótipos de esterase.

Amostras	Espécie vegetal e reação			Raças e Fenótipos de esterase	
	Tomate cv. Rutgers	Algodão cv Deltapine 61	Fumo cv. Nc65		
A1a	+	- ^a	-	Raça 1	(I1)
A1b	+	-	-	Raça 1	(I2)
A1c	+	-	-	Raça 1	(S1)
A2b	+	-	-	Raça 1	(I2)
A3	+	-	-	Raça 1	(I1)
A4	+	-	+	Raça 2	(I1)
A5a	+	-	+	Raça 2	(I1)
A5b	+	-	-	Raça 1	(I2)
A6a	+	-	+	Raça 2	(I1)
A7a	+	-	+	Raça 2	(I2)
A8a	+	-	-	Raça 1	(I1)
A8b	+	-	-	Raça 1	(I2)
A9	+	-	-	Raça 1	(I2)
A10a	+	-	+	Raça 2	(I1)
A10b	+	-	-	Raça 1	(I2)
A11	+	-	-	Raça 1	(I2)
A12	+	-	-	Raça 1	(I2)
A13	+	-	-	Raça 1	(I2)
A14	+	-	-	Raça 1	(I2)
A15	+	-	+	Raça 2	(I2)
A16	+	+	-	Raça 3	(I2)
A17	+	-	-	Raça 1	(I2)

^a (+) indica um hospedeiro suscetível. (-) indica o hospedeiro resistente.

também demonstraram que os fenótipos Est I1 e I2 se referem a diferentes isolados que se agruparam com *M. incognita* com 100% de 'bootstraps' nas análises filogenéticas (Randig *et al.*, 2002). Neste estudo não ocorreu, nenhuma correlação entre os perfis de esterase I1 e I2 e as raças de *M. incognita* detectadas, diferindo do que foi observado por Carneiro *et al.* (2000). Estudos semelhantes realizados por Castro *et al.* (2003), estudando populações de *Meloidogyne* da soja, também demonstraram baixa correlação entre esses fenótipos de esterase e as raças detectadas.

Por outro lado, o uso de hospedeiros diferenciadores não é considerado um critério consistente para identificação de variabilidade intraespecífica do nematóide devido à variabilidade do patógeno, ao longo do tempo. Dessa maneira, as raças parecem ser mais uma adaptação fisiológica do nematóide do que uma característica genética da popu-

lação (Randig *et al.*, 2002). Com base nessas observações, trabalhos adicionais devem ser conduzidos para elucidar essa questão.

Três populações atípicas minoritárias (Est S1, F2a e F2b) foram detectadas em 20 % das amostras e foram observadas pela primeira vez, em raízes de figueira, embora já tenham sido relatadas em outras culturas. O fenótipo S1, que às vezes se revela como S2 (Carneiro *et al.*, 2005) foi inicialmente detectado e considerado por Janati *et al.* (1982), Fargette(1987) e Esbenshade & Triantaphyllou, (1985) como um fenótipo atípico. Esses últimos autores, estudando a variabilidade isoenzimática de 291 populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de vários locais do globo, identificaram os fenótipos Est S1 e Mdh N1 em três diferentes populações. Entretanto, dependendo do polimorfismo de outras enzimas (Superoxido Dismutase e Glutamato-

oxalacetato-transaminase) e do número de cromossomos de cada população, o fenótipo Est S1 foi identificado como *M. incognita* (S1N1), *M. chitwoodi* Golden *et al.*, 1982 (S1N1a) e *M. platani* Hirschmann, 1982 (S1N1a). Em trabalhos de caracterização do nematóide das galhas realizados no Brasil, Cofcewicz *et al.* (2004) detectaram a mesma população atípica com o fenótipo de Est S1 (denominado B1) e Mdh N1, em uma única amostra proveniente de bananeira coletada no Estado de São Paulo. Castro *et al.* (2003) também verificaram a ocorrência desse fenótipo em uma amostra de soja juntamente com uma população de *M. incognita* no Estado de São Paulo. Porém, estudos realizados por Castro (2001), demonstraram que essa população atípica apresentava diferenças morfométricas quando comparada a *M. chitwoodi* Golden *et al.*, (1980) e *M. incognita* podendo tratar-se de uma outra espécie. Neste trabalho, essa população apresentou configuração perineal próxima a *M. incognita* (Castro, 2001). Nos estudos com hospedeiros diferenciadores, essa população se comportou como *M. incognita* raça 1, como tinha sido mesmo foi observado por Fargette (1987).

A população Est F2b foi relacionada com populações atípicas de *M. arenaria* provenientes da Nigéria, Costa do Marfim, Filipinas, Samoa e uma população não identificada dos EUA, sendo denominada S1-M1. O estudo da região perineal mostrou configurações bastante variáveis, podendo essa população ser incluída no grupo 6, que agrupa *M. incognita* e outras espécies com perineais próximas (Jepson, 1987).

O fenótipo Est F2a não foi ainda descrito, mas os padrões perineais dos dois isolados que apresentaram esse fenótipo, foram semelhantes aos do grupo 4 (Jepson, 1987), onde está incluída *M. arenaria* (Neal, 1989) Chitwood, 1949.

Considerando que neste trabalho, foi detectada a presença de três populações atípicas de *Meloidogyne* spp., que infelizmente se reproduziram mal no tomateiro, estudos morfológicos mais detalhados deverão ser efetuados para a caracterização e identificação desses isolados. Além disso, devem ser realizados ensaios para avaliar a virulência dos vários isolados (Est: I1, I2, S1, F2a e F2b) em diferentes cultivares de figueira. É importante salientar, que esta variabilidade até hoje não foi considerada em trabalhos científicos que enfatizam a reação de porta enxertos de figueira ao nematóide das galhas. Essas informações poderiam contribuir no futuro para a adoção de medidas de controle mais racionais.

Literatura Citada

- BONETTI, J.I.S. & S. FERRAZ. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, 6: 553.
- CAMPOS, V.P. 1992. Perspectivas do controle biológico de nematóides. In: Rev. Inf. Agropecuário. Belo Horizonte, 16(172): 26-30.
- CAMPOS, V.P. 1997. Nematóides na cultura da figueira. Informe Agropecuário, 18 (1): 33-38. Belo Horizonte, MG.
- CARNEIRO, R.M.D.G; M.R.A. ALMEIDA & R.G. CARNEIRO. 1996. Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. Fundamental and Applied Nematology, 19(6): 555 – 560.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; M.R.A. ALMEIDA & P. QUÉNEHERVE. 2000. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* sp. populations. Nematology, 2(6): 645 – 654.
- CARNEIRO, R.M.D.G & M.R.A. ALMEIDA. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides das galhas para identificação de espécies. Nematologia Brasileira, 25(1): 35 – 44.
- CARNEIRO, R.M.D.G; O.RANDIG; M.R.A. ALMEIDA & W. GONÇALVES. 2005. Identificação e caracterização de *Meloidogyne* spp. em cafeeiro nos Estados de São Paulo e Minas Gerais através dos fenótipos de esterase e SCAR-Multiplex-PCR . Nematologia Brasileira 29 (2):233-241.
- CASTRO, J.M.C.; R.D. LIMA & R.M.D.G CARNEIRO. 2003. Variabilidade isoenzimática de populações de *Meloidogyne* spp. Provenientes de regiões brasileiras produtoras de soja. Nematologia Brasileira, 27(1): 1- 12..
- CASTRO, J.M.C. 2001. Caracterização de populações de *Meloidogyne* spp. de regiões brasileiras produtoras de Soja. Viçosa: UFV, 82p. (Tese de Doutorado).
- COFCEWICZ, E.T.; R.M.D.G. CARNEIRO.; P. CASTAGNONE-SERENO & P. QUENEHERVE. 2004. Enzyme phenotypes and genetic diversity of root-knot nematodes parasitising *Musa* in Brazil. Nematology, 6(1): 85 - 95.

- COFCEWICZ, E.T.; R.M.D.G. CARNEIRO.; O. RANDING, C. CHABRIER. & P. QUENEHERVE. 2005. Diversity of *Meloidogyne* spp. on *Musa* in Martinique, Guadalupe, and French Guiana. *Journal of Nematology*, 37(3) :313-322.
- EISENBACK, J.D. 1985. Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: SASSER, J.N. & CARTER, C.C. (eds.). An advanced treatise on *Meloidogyne*. v. 1. Biology and control. North Carolina State University Graphics, Raleigh, 95 - 112p.
- EISENBACK, J.D. & H.H. TRIANTAPHYLLOU. 1991. Root-knot nematode: *Meloidogyne* spp. and races. In: Nickle, W.R. (Ed.) Manual of agricultural nematology. New York, NY, USA, Marcel Dekker, Inc., pp. 191-274.
- ESBENSHADE, P.R. & A.C. TRIANTAPHYLLOU. 1985. Use of enzyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 17(1): 6-20.
- ESBENSHADE, P.R. & A.C. TRIANTAPHYLLOU. 1990. Isozyme phenotypes for the identifications of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 22(1): 10-15.
- FARGETTE, M. 1987. Use of esterase phenotype in the taxonomy of the genus *Meloidogyne*. 2 Esterase phenotypes observed in West African populations and their characterization. *Revue de Nématologie*, 10 (1): 45-56.
- FAVORETO, A. J. 2001. Distribuição de *Meloidogyne* spp. Na região Geoeconômica DE Marília , SP. E resistência de genótipos de cafeeiro a uma nova espécie. Jaboticabal, UNESP, 63p. (Tese de Mestrado).
- JANATI, A., J.B. BERGÉ ; A.C TRIANTAPHYLLOU: & A. DALMASSO. 1982. Nouvelles données sur l'utilisation des isostérases pour l'identification des *Meloidogyne*. *Revue de Nématologie*, (5): 147-154.
- HARTMAN, K.M. & J.N. SASSER. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal patterns morphology. In: BARKER, K.R.; CC. CARTER & J.N. SASSER (Eds.). An advanced treatise on *Meloidogyne*. v. 2. Methodology. North Carolina State University Graphics, Raleigh, 69 – 77p.
- HUSSEY, R.S. & K.B. BARKER. 1973. A comparison of methods of collecting inocula for *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57: 1025-1028p.
- JEPSON, S.B. 1987. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Wallingford, UK, CAB International, 265 p.
- LORDELLO, L.G.E. 1958. *Meloidogyne incognita*, a nematode pest of orchard at the Valinhos region (State of São Paulo, Brazil). *Revista Brasileira de Biologia* 18 (4): 375-379.
- MOURA, R.M. 1967. Contribuição ao estudo da *Meloidogynose* da figueira (*Ficus carica*). Piracicaba, ESALQ. Tese de mestrado. 28p.
- PAIS, C.S. & I.M.O. ABRANTES, 1989. Esterase and malate dehydrogenase in Portuguese populations of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 21 : 342-346.
- RANDIG, O; M. BONGIOVANNI; R.M.D.G. CARNEIRO & P. CASTAGNONE-SERENO. 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome*, 45(5):862-870.
- SANTOS, J.M. & A.S. MAIA. 1999. Nematóide da figueira. In: Simpósio Brasileiro sobre a cultura da figueira. Ilha Solteira, 18 a 19 de Novembro de 1999. 250p.
- SCHERB, C.T. 1993. Flutuação populacional de *Meloidogyne incognita* (kofoi & White, 1919) CHITWOOD, 1949 em figueira (*Ficus carica L.*) inoculadas no campo. ESALQ. Lavras MG. Tese Mestrado.
- TAYLOR, A. L.& J.N. SASSER. 1985. Biology, identification and control of root-knot nematodes. International *Meloidogyne* Project. North-Carolina. State University. 111p.

Resistência de Acessos de *Pfaffia glomerata* a *Meloidogyne incognita* Raça 1*

ANA CRISTINA M.M. GOMES¹, JEAN KLEBER MATTOS², PEDRO A.S. CIROTO¹ &
REGINA M.D. GOMES CARNEIRO¹

* Parte da Dissertação do primeiro autor, para o título de Mestre em Agronomia da UNB

¹EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372, 70849-979 Brasília, DF, Brazil, ²Universidade de Brasília, Dep. Agronomia, C.P. 04364, 79919-970 Brasília, DF.

E-mail: anagomes@cenargen.embrapa.br

Recebido para publicação em 12/03/2006. Aceito em 22/08/2006

Resumo – GOMES, A.C.M.M; J.C. MATTOS; P.A.S. CIROTO & R.M.D.G. CARNEIRO. 2006. Resistência de acessos de *Pfaffia glomerata* a *Meloidogyne incognita*. *Resistência de acessos de Pfaffia glomerata a Meloidogyne incognita*.

Pfaffia glomerata, comumente denominada “ginseng brasileiro”, é planta da família Amaranthaceae que ocorre nas Américas e África, sendo que o Brasil é o mais importante centro de coleta dessa espécie para fins medicinais, alimentícios e cosméticos. Os nematóides de galhas, *Meloidogyne* spp., podem causar sérios sintomas de galhas no sistema radicular, onde estão armazenados os princípios ativos fito-químicos. Acessos de *P. glomerata* foram selecionados, a partir de uma coleção de plantas mantidas na Universidade de Brasília (UNB) e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) para serem testados quanto a resistência a *Meloidogyne incognita* raça 1. Plântulas foram obtidas por mini-estaquia a partir da planta mãe e inoculadas com 5000 ovos quando tinham aproximadamente 15 cm de comprimento. Noventa dias após a inoculação foram avaliados os sistemas radiculares quanto aos índices de galhas e de massas de ovos e os fatores de reprodução (FR). Os acessos São Luiz (MA), UFV (MG), Cenargen 1 (DF), Pedra de Guaratiba (RJ), Itabaiana (SE) e Cenargen 2213-6 foram considerados altamente resistentes (FR<1); IAPAR (PR), Cenargen 2216-10 e Cenargen 2216-16, medianamente resistentes (FR= de 1,9 a 2,3); Cenargen 2217-10 e UFC (CE), suscetíveis (FR=10,0) e os demais acessos (Farmacotécnica, DF e Cenargen 2217-9) altamente suscetíveis (FR>80,0). De acordo com esses resultados, a utilização de acessos resistentes é uma medida bastante promissora para o controle de *M. incognita*, em cultivos comerciais de *P. glomerata*.

Palavras-chave: resistência, nematóide de galhas, ginseng brasileiro.

Summary – GOMES, A.C.M.M; J.C. MATTOS; P.A.S. CIROTO & R.M.D.G. CARNEIRO. 2006. Resistance of *Paffia Glomerata* accessions to *Meloidogyne incognita*.

Pfaffia glomerata, commonly denominated “Brazilian ginseng”, is a plant of the Amaranthaceae family that occurs in America and Africa. Brazil is the most important center of assessment of this species for medicinal, nutritional and cosmetic use. Some disease problems can damage this plant, among them, the root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., cause serious gall symptoms on the roots, where the phyto-chemical compounds are stored. Accessions of *P. glomerata* were selected from a collection maintained in the University of Brasília (UNB) and Embrapa Genetic Resources and Biotecnology (Cenargen). Plants were obtained by cuttings from the plant mother and were inoculated with 5000 eggs when they were approximately 15 cm in length. Ninety days after egg inoculation the roots were evaluated using gall index and the reproduction factor (RF). The accessions São Luiz (MA), UFV (MG), Cenargen 1 (DF), Pedra de Guaratiba (RJ), Itabaiana (SE) and Cenargen 2213-6 were considered highly resistant (RF<1); IAPAR (PR), Cenargen 2216-10 and Cenargen 2216-16, moderately resistant (RF= from 1.9 to 2.3); Cenargen 2217-10 and UFC (CE), susceptible (FR=10) and the other accessions (Farmacotécnica, DF and Cenargen 2217-9) altately susceptible (FR>80,0). De acuerdo con estos resultados, la utilización de accesos resistentes es una medida bastante promissora para el control de *M. incognita*, en cultivos comerciales de *P. glomerata*.

2217-9) highly susceptible ($RF > 80$). Considering these results, the use of resistant accessions is a promising control method for commercial crops of *P. glomerata*.

Keywords: resistance, root-knot nematodes, Brazilian ginseng.

Introdução

Pfaffia glomerata (Spreng) Pedersen, 1967 (Amaranthaceae) é uma espécie nativa de amplo uso popular, submetida a uma alta pressão antrópica devido ao extrativismo (Vieira *et al.*, 2002). O gênero possui cerca de 33 espécies distribuídas nas Américas Central e do Sul. No Brasil ocorrem 21 espécies em formações florestais e campestres, mais precisamente em orlas de matas, beira de rios, capoeiras úmidas e campos rupestres (Siqueira, 1988). Utilizada há séculos pelos índios brasileiros na cura e prevenção de doenças, *P. glomerata* teve suas propriedades medicinais comprovadas cientificamente no Japão, apresentando propriedades terapêuticas no tratamento de diabetes, hemorróidas, além de mostrar efeito bioenergético, tônico, afrodisíaco e antidiarréico (Mashio, 1993).

O interesse pela *P. glomerata* teve origem no uso popular de suas raízes, recebendo o nome comum de “Ginseng brasileiro”. Após a identificação de substâncias hormonais (Nishimoto *et al.* 1987 e Shiobara *et al.*, 1992), com características de efeito adaptógeno, verificou-se uma grande demanda mundial pelas raízes desta planta, principalmente pelo Japão, onde a espécie foi bastante estudada sob o ponto de vista fitoquímico e farmacológico (Nishimoto *et al.*, 1987; Nishimoto 1990; Nishimoto, 1992 e Shiobara *et al.*, 1992). O Brasil tem sido o maior fornecedor mundial de raízes dessa planta. Aproximadamente 30 toneladas de raízes de *Pfaffia* sp. são oriundas de extrativismo, e exportadas mensalmente para o Japão. O procedimento extrativista, intensificado a partir da validação científica de suas propriedades terapêuticas, tem reduzido a variabilidade das populações e consequentemente o fornecimento de matéria-prima, além de causar prejuízos ao meio ambiente (Alcântara, 1994). Dessa forma, torna-se imprescindível o desenvolvimento de técnicas de cultivo como alternativa de produção agrícola, para reduzir o processo de extrativismo. Em levantamentos fitossanitários realizados em coleções brasileiras, localizadas em diferentes regiões foi registrada a ocorrência de diversas pragas que limitaram a produção de *Pfaffia*. Entre essas pragas destacam-se os nematóides do gênero *Meloidogyne*, causando galhas e apodrecimento nas raízes

(Araújo *et al.*, 1994). Recentemente, *M. javanica*, *M. incognita* e *Meloidogyne* sp. foram detectadas no Distrito Federal, causando danos a essas plantas (Mesquita *et al.*, 2005).

Tendo em vista que os nematóides parasitam as raízes de *P. glomerata*, que são a sede da extração de substâncias utilizadas na produção de fármacos, há necessidade de serem avaliados acessos dessa planta quanto à resistência ao nematóide de galhas, de forma a embasar uma estratégia de produção sustentável de *P. glomerata*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar 13 acessos de *P. glomerata* quanto à resistência ou suscetibilidade ao nematóide de galhas, *Meloidogyne incognita* raça 1.

Material e Métodos

Foram utilizados, nos experimentos, 13 acessos de *P. glomerata*, oriundos de várias regiões do Brasil (Tabela 1), procedentes da Coleção de Plantas Medicinais da UnB e da Coleção do Cenargen.

A população de *M. incognita* raça 1 foi isolada, identificada e purificada a partir de plantas de *Pfaffia* cultivadas em Brasília - DF. A identificação da espécie foi feita através do perfil de esterase (Carneiro & Almeida, 2001; Carneiro *et al.*, 2000) e teste com hospedeiros diferenciadores (Hartman & Sasser, 1985). Para obtenção do inoculo, essa população foi multiplicada em tomateiros cv Santa Cruz. Os ovos foram extraídos pelo método de Hussey & Barker (1973) e a concentração determinada em lâminas de Peters ao microscópio óptico.

Para multiplicação unidonal de *P. glomerata*, nós, contendo duas gemas, foram selecionados de estacas da parte aérea das plantas mãe, e em condições de telado sombreado, foram postos para brotar em mini estufas construídas em vasos plásticos de 2,5 litros, contendo substrato esterilizado com 50% húmus e 50% argila. Cada vaso foi coberto com um saco plástico transparente de 4 litros, constituindo uma mini estufa. As extremidades do saco plástico foram cortadas para permitir aeração. Os vasos não receberam irrigação por aproximadamente 10 dias. À medida em que

Tabela 1. Descrição dos acessos de *Pfaffia glomerata*, utilizados nos experimentos de seleção, quanto à resistência a *Meloidogyne incognita* raça 1.

Nome do acesso	Local de Depósito	Origem
Cenargen 2217-10	Coleção Cenargen	Ilha Grande, Sto Antônio (PR)
São Luis (MA)	Coleção UnB	São Luis (MA)
Cenargen 2216-10	Coleção Cenargen	Ilha do Estreito (PR)
UFV (MG)	Coleção UnB	Campus da Univ. Fed. de Viçosa-(MG)
Itabaiana (SE)	Coleção UnB	Ribeirópolis (SE)
Cenargen 2213-6	Coleção Cenargen	Ilha do Denzel (PR)
Pedra de Guaratiba (RJ)	Coleção UnB	Horto Florestal da Pedra de Guaratiba-(RJ)
Farmacotécnica (DF)	Coleção UnB	Vargem Bonita (DF) Propriedade da Farmacotécnica
Cenargen 2217-9	Coleção Cenargen	Ilha Grande (PR)
Cenargen 1	Coleção UnB	Brasília (DF)
Cenargen 2216-16	Coleção Cenargen	Ilha Marçal (PR)
IAPAR (PA)	Coleção UnB	IAPAR (PR)
UFC (CE)	Coleção Unb	Campus da Universidade Federal do Ceará (CE)

surgiam brotações, aproximadamente aos 5 dias, os sacos eram retirados, e as mudinhas receberam irrigação. Depois desse período, as plântulas foram removidas para estufas de crescimento individual, em vasos de 5 litros, visando o enraizamento e crescimento para posterior inoculação.

Oito plantas de cada acesso (Tabela 1), cultivadas individualmente em vasos de 5 litros foram inoculada com de *M. incognita* raça 1 com 5000 ovos, cada uma, em 10 ml de suspensão aquosa, quando apresentavam aproximadamente 15 cm de altura. O inóculo foi distribuído na região da rizosfera, a aproximadamente 1 a 2 cm de distância do caule. O ensaio foi conduzido em delineamento experimental, inteiramente casualizado, e mantido em casa de vegetação sob condições controladas de temperatura (25 a 30 °C).

Cento e vinte dias após a inoculação, a parte aérea foi cortada e descartada, as raízes lavadas e coradas com Phloxina-B por 30 minutos numa concentração de 0,015mg por ml. Em seguida, foram estimados os parâmetros: índices de galhas e massa de ovos, segundo a escala de 0 a 5 proposta por Hartman & Sasser (1985): em que 0 = nenhuma galha ou massa de ovos; 1 = 1-2 galhas ou massas de ovos, 2 = 3-10; 3 = 11-30; 4 = 31-100; 5 e" 100 galhas ou massas de ovos. O número total de ovos/planta/repetição foi avaliado como descrito anteriormente por Hussey & Barker (1973)

com NaOCl a 1%. O Fator de Reprodução (FR) foi calculado, dividindo-se o número total de ovos/planta pelo número de ovos inoculados (5000). O número total de ovos foi transformado em $\log(x+1)$ para a análise de variância e os dados analisados pelo teste de Tukey- Kramer..

Resultados e Discussão

Na Tabela 2, encontram-se os resultados da reação dos diferentes acessos à inoculação com *M. incognita* raça 1. Os acessos São Luís (MA), UFV (MG), Cenargen 1 (DF), Pedra de Guaratiba (RJ), Itabaiana (SE) e Cenargen 2213-6 foram considerados altamente resistentes por apresentarem Fator de Reprodução menor que 1 ($FR<1$); IAPAR (PR), Cenargen 2216-10 e Cenargen 2216-16, medianamente resistentes ($FR=1,9$ a $2,3$); Cenargen 2217-10 e UFC (CE), suscetíveis ($FR=10$). Os demais acessos Farmacotécnica (DF) e Cenargen 2217-9 foram altamente suscetíveis ($FR>80,0$). De uma maneira geral, ocorreu grande diferença no FR (variando de 0,007 a 110,0), entre os acessos resistentes e os suscetíveis, mostrando com evidência a presença de genes de resistência altamente efetivos em alguns acessos (Figura 1) (Tabela 2). Isso pode ser explicado devido à grande

Tabela 2. Respostas dos diferentes acessos de *Pfaffia glomerata* ao nematóide das galhas *Meloidogyne incognita* raça 1.

Nome do acesso	Massa fresca das raízes (g)	Índice de Galhas *	Número Total de Ovos	Fator de Reprodução**	Erro Padrão da Média	Reação final ***
Cenargen 2217-10	139,0g	5	554.835	110,967 d	±0,1044	AS
São Luiz (MA)	42,5	3	35	0,007 a	±0,1044	AR
Cenargen 2216-10	114,5	4	10.175	2,035 ab	±0,2993	MR
UFV (MG)	88,0	3	635	0,127 a	±0,1044	AR
Itabaiana (SE)	232,0	3	2.815	0,563 a	±0,2993	AR
Cenargen 2213-6	114,2	3	4.230	0,846 a	±0,2993	AR
Pedra de Guaratiba(RJ)	69,0	3	1.795	0,359 a	±0,1044	AR
Farmacotécnica-DF	176,0g	5	411.395	82,279 d	±0,1205	AS
Cenargen 2217-9	60,0g	5	53.520	10,704 bc	±0,2993	S
Cenargen 1	72,5	3	1.410	0,282 a	±0,1044	AR
Cenaregen 2216-16	118,0g	4	11.390	2,278 b	±0,3457	MR
IAPAR (PA)	131,0g	5	9.305	1,861 ab	±0,2993	MR
UFC (CE)	131,0	5	54.600	10,920 bc	±0,1044	S

(*) Índice de galhas ou massas de ovos: 0 = nenhuma galha ou massa de ovos; 1 = 1-2 galhas ou massas de ovos, 2 = 3-10; 3 = 11-30; 4 = 31-100; 5 e" 100 galhas ou massas de ovos (Hartman&Sasser, 1985).

(**) Os valores foram transformados em log (x+1) e tratamentos com letras diferentes, diferem entre si pelo teste Tukey-Kramer a de 5 % de probabilidade.

(***) S = suscetível, MR = moderadamente resistente, AR = altamente resistente, S= susceptível AS = altamente suscetível

variabilidade existente entre diferentes acessos dessa planta, como foi demonstrado previamente por Corrêa Júnior (2003). Esse mesmo autor descreveu diferenças fenotípicas entre os acessos tanto na cor, tamanho e forma das folhas. Essa variabilidade genética pode ser observada nas folhas

de dois acessos selecionados neste trabalho, como suscetível, Farmacotécnica (folha lanceolada) e, resistente, UFV (folha ovalada).

Pode-se observar através dos índices de galhas (IG) que os acessos altamente resistentes apresentaram valores

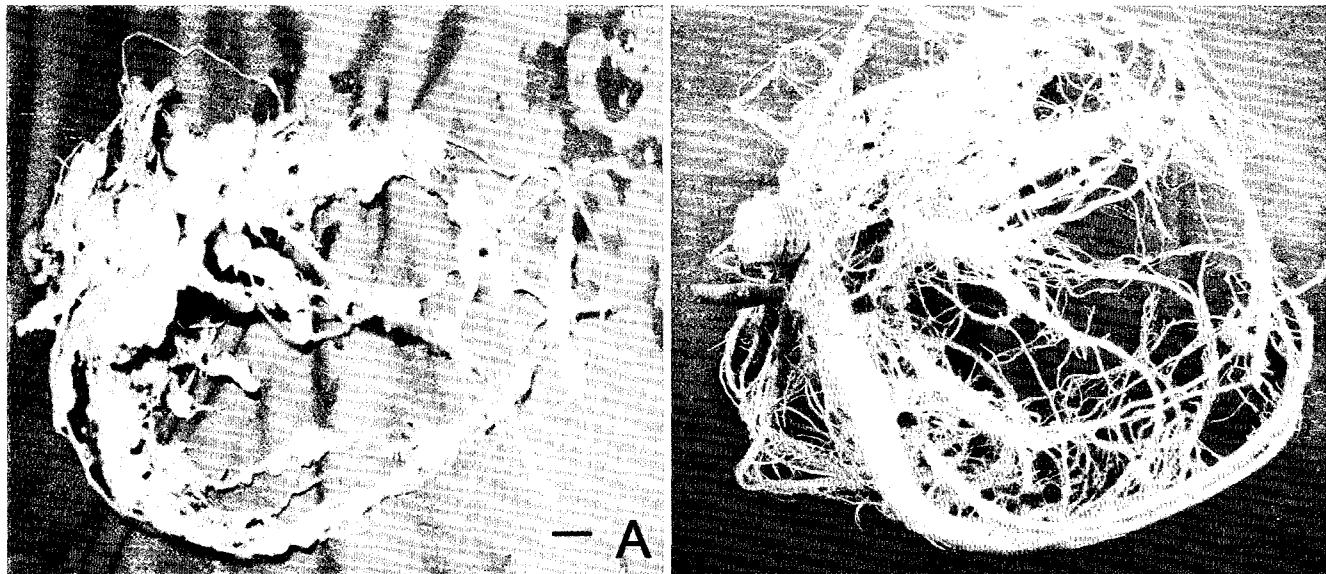


Figura 1. Sintomas das raízes de *Pfaffia glomerata* infestadas com *Meloidogyne incognita* raça 1. A: acesso Farmacotécnica (suscetível); B: acesso UFV (resistente).

em torno de 3, mostrando que ocorreu desenvolvimento de alguns nematóides, embora eles não tenham atingido o estádio adulto, o que fica evidente através do $FR < 1$. Os valores avaliados para o índice de massas de ovos não foram considerados neste trabalho, pois muitas massas de ovos foram internas e difíceis de serem observadas e quantificadas corretamente.

A resistência genética de *P. glomerata* já foi testada para *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 e vários acessos foram descritos como resistentes (Araújo *et al.*, 1994). Dessa maneira, pôde-se verificar que os acessos São Luis, Itabaiana e Pedra de Guaratiba foram altamente resistentes às duas espécies (*M. javanica* e *M. incognita*) e o acesso Farmacotécnica, altamente suscetível a ambas. Ocorreu variabilidade quanto à resistência do acesso IAPAR, que foi altamente resistente a *M. javanica* e moderadamente resistente a *M. incognita*. Apenas o acesso UFC, diferiu acentuadamente quanto a sua resistência genética, sendo suscetível a *M. incognita* e altamente resistente a *M. javanica*, de acordo com o que foi relatado por Araújo *et al* (1994). Os autores desse trabalho utilizaram como parâmetros de resistência, o índice de galhas e de massas de ovos, que de acordo com os resultados do presente estudo, não foram bons índices para medir a resistência genética, uma vez que as massas de ovos foram muitas vezes internas e as galhas, algumas vezes, foram formadas por juvenis (J3/J4),

que não conseguiram completar o ciclo biológico (dados não incluídos). Muitos trabalhos realizados em algodoeiro entre 1900 e 1975 nos EUA utilizaram como método para selecionar resistência a *Meloidogyne incognita* raça 3, o índice de galhas, em experimentos realizados a campo. Shepherd (1979) demonstrou que os resultados desses testes foram muito variáveis e colocou em evidência que o índice de galhas era independente da reprodução do nematóide. Alguns genótipos apresentaram alto índice de galhas e baixo número de ovos, outros, baixo número de galhas e alto número de ovos. Dessa maneira, a quantidade de ovos produzidos foi escolhida como o principal critério de resistência em substituição ao índice de galhas.

Mais estudos são necessários para compreender os mecanismos de resistência de acessos de *P. glomerata* a *Meloidogyne* spp. e a influência do parasitismo do nematóide na redução dos princípios ativos medicinais presentes nas raízes.

Conclusões

Os acessos de *Pfaffia glomerata* demonstraram diferentes níveis quanto à resistência e suscetibilidade ao nematóide de galhas, *Meloidogyne incognita* raça 1, demonstrando haver acentuada variabilidade para a resistência.

Os acessos São Luís (MA), UFV (MG), Cenargen 1 (DF), Pedra de Guaratiba (RJ), Itabaiana (SE) e Cenargen 2213-6 foram considerados altamente resistentes (FR<1), demonstrando alto potencial para uso em programas de melhoramento genético.

Os acessos IAPAR (PR), Cenargen 2216-10 e Cenargen 2216-16 foram medianamente resistentes (FR de 1,9 a 2,3); Cenargen 2217-10 e UFC (CE), suscetíveis (FR=10,0) e os demais acessos, Farmacotécnica, (DF) e Cenargen 2217-9, altamente suscetíveis (FR >80,0).

Literatura Citada

- ALCÂNTARA M. F. A. 1994. Atividade antimicrobiana de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen XIII. Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Fortaleza – CE. p. 072.
- ARAÚJO, W. P.; J. K.A. MATTOS & R. M. SOUZA. 1994. Fontes de resistência a *Meloidogyne javanica* entre procedências de *Pfaffia glomerata*. Fitopatologia Brasileira, 19 (Supl.): 322-323.
- CARNEIRO, R.M.D.G; M.R.A. ALMEIDA & P. QUÉNÉHÉRVÉ. 2000. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. isolates. Nematology (2): 645 – 654.
- CARNEIRO, R.M.D.G & M.R.A ALMEIDA. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. Nematologia Brasileira 25: 35-44.
- CORRÊA JÚNIOR, C. 2003. Estudo agronômico de fávia (*Pfaffia glomerata* Spreng.) Pedersen]: Sazonalidade na produção de raízes e conteúdos de β-Ecdisona em diferentes acessos de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul , Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Tese de Doutorado, 69p.
- HARTMAN, K.M & J.N. SASSER. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. In: BARKER, K.R., C.C. CARTER AND J.N. SASSER (eds). Advanced Treatise on *Meloidogyne*, Vol.II, Methodology. North Carolina State University, Raleigh, p. 69 -77.
- HUSSEY, R.S & K.R. BARKER. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease Reporter (57): 1025 - 1028.
- MARQUES, L.C. 1998. Avaliação da ação adaptógena das raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen - Amaranthaceae. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Tese de Doutorado, 145p.
- MASHIO, J. 1993. Japão provoca corrida da *Pfaffia* no Paraná. Folha de São Paulo. Agrofolha, Caderno 5, 21 de fevereiro de 1993.
- MESQUITA, L.F.G; M.R.A. ALMEIDA; D.B. SILVA; P.A.S. CIROTTI & R.M.D.G. CARNEIRO. 2005. Patogenicidade de *M. javanica* em *Pfaffia glomerata* e *P. paniculata*. Nematologia Brasileira 29 (1): 118.
- NISHIMOTO, N. 1992. The constituents of Brazilian Ginsengs Ann. XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil – Univ. do Paraná. Curitiba – PR. Abril de 1992. p 167.
- NISHIMOTO, N.; Y. SHIOBARA; S. INOUE; T.TAKEMOTO; G. AKISUE; F. OLIVEIRA, M.K. AKISUE; G. HASHIMOTO. 1990. Ecdisteroids de *Pfaffia glomerata*. Anais do XI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Univ. Fed. Paraíba – João Pessoa, PB.
- NISHIMOTO, N.; Y. SHIOBARA; M. FUGINO; S. INOUE; T. TAKEMOTO; F.
- OLIVEIRA; G. AKISUE; F. OLIVEIRA; M.KAKISUE; G. HASHIMOTO; R. TANAKA; H. KASAI; H. MATSUURA. 1987. Ecdsteroids from *Pfaffia iresinoids* and reassignment of some 13C NMR chemical shfts. Phytochemistry (26): 2505 - 2507.
- SHEPHERD, R.L.1979. A quantitative Technique for Evaluating Cotton for Root-Knot Nematode Resistance. Phytopatology 69 (4): 427-430.
- SHIOBARA, Y.; S. INOUE; Y. NISHIGUCHI; T. TAKEMOTO; N. NISHIMOTO; F. OLIVEIRA & G. AKISUE. 1992. Iresinoide, a yellow pigment from *Pfaffia iresinoides*. Phytochemistry (31): 953-956.
- SIQUEIRA, J.C. 1998. Considerações taxonômicas sobre as espécies brasileiras do gênero *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae). Acta Biológica Leopoldinense, São Leopoldo (10): 269 – 278.
- VIEIRA, R. F.; SILVA, S. R.; NEVES R.B.; SILVA; D.B., DIAS, T. A. B.,
- UDRY, M.C.F.V., WETZEL, M., MARTINS, R.C. 2002 I Reunião Técnica sobre Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e Aromáticas: Estratégias para Conservação e Manejo Sustentável. Brasília, DF: Embrapa / Ibama / CNPq., v. 1, 200 p.

Plant-Parasitic Nematodes Detected in Andean Tubers from Argentina and Bolivia

PAOLA LAX^{1*}, MARCELO E. DOUCET¹, CLAUDIA GALLARDO², SUSANA MURUAGA DE L'ARGENTIER² & HUGO VILTE²

¹Laboratorio de Nematología, Centro de Zoología Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, C.C. 122, C.P. 5000, Córdoba, Argentina. E-mail: plax@com.uncor.edu

²Cátedra de Zoología Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Jujuy, Alberdi 47, C.P. 4600, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina

* Postdoctoral Fellow, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Received for publication on 18/04/2006. Accepted in 30/08/2006

Summary – Lax, P., M.E. Doucet, C. Gallardo, S. Muruaga de L'Argentier & H. Vilte. Plant-parasitic nematodes detected in Andean tubers from Argentina and Bolivia.

The presence of nematodes was evaluated in the skin and underlying parenchyma of several varieties of Andean tubers (Andean potato, 'Oca' and 'Papalisa') from Argentina and Bolivia. *Nacobbus aberrans* was widely distributed in the Andean region. Other phytophagous nematodes detected were *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *Globodera* sp. and *Pratylenchus* sp. Two different species of the Family Anguinidae, *Hexatylus* sp. and *Aphelenchus avenae*, were also found. Furthermore, results of two different methods usually used to evaluate tuber sanitation were analyzed: processing of skin and underlying parenchyma and closed bag bioassays, the former appearing as the most efficient.

Keywords: *Globodera*, *Meloidogyne*, *Nacobbus aberrans*, nematode survey, *Oxalis tuberosa*, *Pratylenchus*, *Solanum tuberosum* subsp. *andigenum*, *Ullucus tuberosus*.

Resumo – Lax, P., M.E. Doucet, C. Gallardo, S. Muruaga de L'Argentier & H. Vilte. 2006. Nematóides fitoparasitas detectados em tubérculos na Argentina e Bolívia.

A presença de nematóides foi avaliada na casca e no parênquima adjacente de muitas variedades de tubérculos andinos (batata andina, 'oca' e 'papalisa'), oriundos da Argentina e Bolívia. *Nacobbus aberrans* mostrou-se largamente distribuído na região Andina. Outros nematóides fitoparasitas foram detectados: *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *Globodera* sp. e *Pratylenchus* sp. Duas diferentes espécies da Família Anguinidae, *Hexatylus* sp. e *Aphelenchus avenae* foram também encontradas. Além disso, resultados de dois diferentes métodos, usualmente usados para avaliar tubérculos infestados, foram analisados: processo da casca e parênquima adjacente e bioensaio do saco fechado, sendo o primeiro o mais eficiente.

Palavras-chave: *Globodera*, *Meloidogyne*, *Nacobbus aberrans*, levantamento de nematóides, *Oxalis tuberosa*, *Pratylenchus*, *Solanum tuberosum* subsp. *andigenum*, *Ullucus tuberosus*.

Introduction

Andean tuber crops are a valuable source of genetic resources and constitute the food base of the inhabitants in the Andean region. Tubers also have medicinal properties

and their production contributes to the socioeconomic development of local people (Terrazas *et al.*, 1997). Among the main plants grown are Andean potato (*Solanum tuberosum* subsp. *andigenum*), 'Oca' (*Oxalis tuberosa*), 'Papalisa' or 'Olluco' (*Ullucus tuberosus*), and 'isaño'

(*Tropaeolum tuberosum*). These crops are characterized by their great diversity. Potato is widely heterogeneous; its several varieties have particular morphological, agronomical and qualitative characteristics (IBTA/PROINPA, 1994). The same applies to the numerous native varieties of 'Oca' (Cadima *et al.*, 2004).

In the Andean region, species of plant-parasitic nematodes may produce significant yield losses to potato crops and reduce tuber quality. Among these pathogens are representatives of the genera *Globodera*, *Meloidogyne*, and the species *Nacobbus aberrans* (González & Franco, 1997). The latter has also been noted as a limiting factor to 'Papalisa' production (Cadima *et al.*, 2003; Condori *et al.*, 2003) and as a pathogen of 'Oca' (CIP, 1996; Ramos *et al.*, 1998).

Given their intimate relationship with the host, these endoparasitic nematodes can be easily dispersed. *Meloidogyne* spp. and *N. aberrans* have the ability to infect not only the potato roots but also the tubers, and to develop their cycle inside the parenchyma. Furthermore, cysts of *Globodera* spp. may be spread by transport of the soil attached to the tuber (González & Franco, 1997). The objective of this work was to evaluate the presence of plant-parasitic nematodes on different varieties of Andean tubers from different localities of Argentina and Bolivia.

Materials and Methods

In May, July and September 2005, 65 samples of stored Andean tubers corresponding to the 2004-2005 crop cycle were collected (harvested in February-March 2005). Samples were acquired directly from growers in local markets or their houses. A total of 25 varieties of Andean potato, two of 'Papalisa' and three of 'Oca' were obtained. The variety names were provided by the growers. Table 1 indicates the tubers analyzed and their origin.

Each sample was divided in two parts, which were processed following two methods commonly used to evaluate tuber sanitation. In one, 20 tubers were peeled and the skin and underlying parenchyma were processed using the technique proposed by Costilla (1985). The resulting material was observed under stereoscopic microscope to detect the presence of nematodes. Specimens were identified according to the morphological characteristics defining each taxon detected. In the other part, 10-15 tubers per sample were used for a closed bag bioassay (Ortuño *et al.*, 1996) to detect infections by *Nacobbus*, *Globodera* and

Meloidogyne. A plastic bag was filled with 400 g of sterile soil with soil moisture at field capacity and a tuber was planted. The bags were closed, wrapped in newsprint, and stored in the dark at about 25°C. After 40 days the root surface in each repetition was examined for the presence of white females or cysts belonging to the genus *Globodera*. When galls were detected, tissues were dissected under stereoscopic microscope to confirm if galls were produced by nematodes of the genus *Nacobbus* or *Meloidogyne*.

Results and Discussion

Nematode detection in skin and underlying parenchyma of tubers

Plant-parasitic nematodes (Table 2)

Phytophagous nematodes were detected in 57% of the samples analyzed, *N. aberrans* being the species most frequently found (51%). Third (J3) and fourth stage (J4) juveniles, and immature females of this nematode were observed. In samples obtained a few months after harvest, J3 and J4 were more frequent and immature females were scarce, whereas potatoes that had been stored for longer periods (samplings conducted in July and September) contained a higher number of immature females. Mature females inside the tuber parenchyma were occasionally observed. To confirm this observation, potatoes from some samples analyzed in May were processed in August, and similar results were obtained. This indicates that the nematode does not remain confined to the skin in quiescence, but can continue to develop inside the tuber.

N. aberrans was the most widely distributed species in northwestern Argentina (54% of the total localities considered). Ortuño *et al.*, (2005) reported that *N. aberrans* also exhibits the widest geographic distribution among potato infecting nematodes in Bolivia, and that it is found isolated or associated with *Globodera* sp. and/or *Meloidogyne* spp. as we observed in the samples from Argentina.

Globose females with egg masses of *M. incognita* and *M. javanica* were detected to a lesser degree (8% and 9%, respectively). Both nematode species were detected simultaneously in the potato varieties 'Tuni' and 'Negra' from the locality of Alfarcito (Argentina).

Cysts of the genus *Globodera* were extracted from the eyes of 'Collareja' variety from Colanzuli and Santa Victoria (province of Salta) (Figure 1). Recently, the species *G.*

Table 1. Locality of sample and variety of tuber analyzed.

Origin	Locality	Tuber variety
Argentina		
<u>Prov.</u> : Jujuy		
Dep.: Humahuaca	Aparzo	Azul (1)
	Chaipi Rodeo	Colorada (1), Churqueña (1), Redonda (1), Runa (1)
	Huasadurazno	Azul (1)
	Humahuaca	Collareja (1)
	Ocumazo	Azul (1)
	Palca de Aparzo	Azul (2), Colorada (2)
	Ronque	Collareja (1)
Dep.: Santa Catalina	Casira	Collareja (1), Malcacha (1)
Dep.: Tilcara	Alfarcito	Azul (1), Negra (2), Tuni (1)
	Colonia San José	Ojo de señorita (1)
	San José	Collareja (1)
	Yacoraite	Collareja larga (1)
Dep.: Tumbaya	Patacal	Ojo de señorita (1)
	Purmamarca	Colorada redonda (1), Collareja redonda (1), Chacarera blanca (1)
Dep. Valle Grande	Santa Ana	Cuarentilla (1), Runa (1), Tuni blanca (1)
	Valle Colorado	Colorada (1)
	Valle Grande	Abajeña (1)
Dep.: Yavi	La Quiaca	Waych'a (1)
	Yavi	Collareja (2), Criolla (1)
<u>Prov.</u> : Salta		
Dep.: Iruya	Campo Carreras	Colorada (1), Collareja (1), Ojosa (1), Redonda (1)
	Colanzuli	Collareja (1), Chacarera (2), Oca amarilla (1), Oca colorada (1), Runa (1), Tuni (1)
	Iruya	Colorada (1), Collareja (1), Chacarera redonda (1), Oca amarilla (1), Oca rosada (1), Papalisa (1), Papa verde lisa (1)
	Pueblo Viejo	Ojosa (1), Redonda (1), Rosada (1)
Dep.: Santa Victoria	Santa Victoria	Collareja (1)
Bolivia		
<u>Prov.</u> : Cochabamba		
Dep.: Cochabamba	Cochabamba	Oca colorada (1), Papalisa (1), Negra (1), Sani (1), Waych'a (3)
<u>Prov.</u> : Tarija		
Dep.: Tarija	Villazón	Imilla (1)

Abbreviations: Prov. = Province; Dep. = Department.

The number of samples analyzed of each variety is indicated in parentheses.

Table 2. Plant-parasitic nematodes detected in different varieties of Andean tubers.

Nematode	Locality	Tuber variety
<i>N. aberrans</i>	Campo Carreras	Colorada, Ojosa, Redonda
	Casira	Collareja, Malcacha
	Cochabamba	Sani, Waych'a
	Colanzuli	Chacarera, Tuni
	Chaupi Rodeo	Colorada, Churqueña, Redonda
	Iruya	Colorada, Collareja, Chacarera redonda
	Palca de Aparzo	Azul, Colorada
	Pueblo Viejo	Ojosa, Redonda
	Purmamarca	Collareja redonda
	San José	Collareja
	Santa Ana	Cuarentilla, Runa, Tuni blanca
	Yavi	Collareja
<i>M. javanica</i>	Humahuaca	Collareja
<i>M. javanica + M. incognita</i>	Alfarcito	Negra, Tuni
<i>N. aberrans + Globodera</i> sp.	Colanzuli	Collareja
	Santa Victoria	Collareja
<i>N. aberrans + M. incognita</i>	Colanzuli	Runa
	Chaupi Rodeo	Runa
	Villazón	Imilla
<i>N. aberrans + M. javanica</i>	Campo Carreras	Collareja
	Ronque	Collareja
	Yavi	Collareja
<i>Pratylenchus</i> sp.	Cochabamba	Oca colorada

pallida was first detected in continental Argentina, in a locality of the same province (Lax *et al.*, 2005), attacking roots of 'Colorada' and 'Ojosa' Andean potato (Doucet *et al.*, 2005 a, b). Further studies should be conducted to confirm the species identity of the two new *Globodera* populations found.

'Collareja' variety, one of the most widely used in northwestern Argentina, showed high susceptibility to the attack of *N. aberrans* (90% of samples), *M. javanica* (40%), and *Globodera* sp. (20%) with some samples simultaneously infected by *N. aberrans*-*Globodera* sp. or *N. aberrans*-*M. javanica*.

In this work, females of *Pratylenchus* were extracted from the skin of 'Oca colorada' from Cochabamba (Bolivia). It has been noted that species of this genus may infect

potato tubers (CIP, 1996). However, there are no previous records of the presence of plant-parasitic nematodes nematodes attacking 'Oca' tubers.

Other nematodes (Table 3)

As with 'Oca', there are no reports of plant-parasitic nematodes associated with 'Papalisa' tubers. Representatives of the Family Anguinidae were detected in samples from Cochabamba, whose genus identity has not been determined yet. The Family comprises species of very different feeding habits, including phytophagy and mycophagy (Siddiqi, 2000). With respect to the latter type, female and juvenile *Aphelenchus avenae* were found in 'Colorada' and 'Azul' Andean potato from Campo Carreras and Palca de Aparzo (Argentina), respectively.

Table 3. Other nematodes detected in Andean tubers.

Nematode	Locality	Tuber variety
Family Anguinidae	Cochabamba	Papalisa
<i>Aphelenchus avenae</i>	Campo Carreras	Colorada
	Palca de Aparzo	Azul
<i>Hexatylus</i> sp.	Casira	Collareja

Numerous filiform females and juveniles at different stages, belonging to the genus *Hexatylus*, were found in 'Collareja' variety of the locality of Casira (Argentina). This genus comprises species of complex life cycles, represented by a free-living and micetophagous generation and another entomoparasitic generation. It should be noted that the type species, *H. viviparus*, was found for the first time in a diseased potato tuber (Siddiqi, 2000).

The representatives of Anguinidae, *A. avenae* and *Hexatylus* sp., were observed moving in the extraction solution. These nematodes probably develop while feeding on fungus hyphae present on the tuber surface during storage.

Methodological aspects

The use of the closed bag bioassay to detect *Globodera* spp. and *N. aberrans* is helpful to evaluate the level of sanitation of tubers and soil in seed potato production (Ortuño *et al.*, 1996). The analysis of tuber skins yielded similar results to those obtained with the bioassay (infections by *Globodera* sp. and *N. aberrans* and non-infected tubers). However, in those samples where *Meloidogyne* spp. were detected in the processed skin and underlying parenchyma, no galls were observed in any repetition using the bioassay, which might indicate that the latter method is not suitable to evaluate the presence of these nematodes in tubers. This difference might be caused by the greater depth at which *Meloidogyne* is located inside the tuber parenchyma, whereas *N. aberrans* and *Globodera* spp. are found at a more superficial level, being able to infect new roots faster. Another advantage of the processed skin and underlying parenchyma method is that the presence of other nematodes, such as: *Pratylenchus* sp., *Hexatylus* sp., *A. avenae*, and specimens of the Family Anguinidae, can be detected.

The Andean potato varieties 'Ojosa' and 'Colorada' from Campo Carreras were obtained from a plot where high

numbers of *G. pallida* were previously detected. The closed bag bioassay performed on tubers from this plot did not reveal cysts or white females of the nematode on roots in any repetition. This suggests that the results obtained from the bioassay are not an indicator of the sanitary conditions of the plot of origin (only of the tubers used), unless the experiment is conducted using raw soil of the same plot.

Costilla (1985) and Ortuño *et al.* (2005) suggested washing the tubers with running water before processing, so that attached soil and organic residues are removed, and the surface is clean. The same process is recommended for a molecular diagnostic method for detecting *Nacobbus* in potato tubers (Atkins *et al.*, 2005). In the tubers analyzed, it was observed that J3, J4 and immature females of *N. aberrans* are not always found under the lenticels, but at times may be directly attached to the potato cuticle (Figure 1). Previous experiments showed that when the water used for washing was filtered through a 40-mm sieve, numerous representatives of the species that were on the skin were retained. It was also observed that submerging the skins in water in Petri dishes for 6 h allowed nematode detachment. Therefore, it is clear a deep cleaning of the tuber is not necessary for diagnostic purposes, especially when the aim is to quantify the level of infestation. A similar situation would occur with cysts of the genus *Globodera* that might be located on the tuber surface.

Considerations

Tuber production in the Andean region has great economic importance for rural populations (Ludo *et al.*, 1999). Part of the production is marketed between neighbouring communities through buying, selling, and barter (Ludo *et al.*, 1999). The detection of the phytophagous nematodes *N. aberrans*, *Globodera* sp., *Meloidogyne* spp. and *Pratylenchus* sp. alone or combined in the tubers analyzed reveals a highly serious issue, especially when the tubers are used as seeds. Nematodes are being widely



Figure 1. Nematodes detected in Andean potato: A). *Globodera* sp. cyst in the eye of 'Collareja' tuber. B) *Idem* A, greater magnification. C) Quiescent juvenile of *Nacobbus aberrans* on the tuber skin. (Scale bars: A = 1 cm; B = 250 µm; C = 200 µm).

dispersed to very diverse areas that may or may not be infested. Not only the vector crop but also other hosts will be subsequently damaged, especially in the cases of *Meloidogyne* spp. and *N. aberrans*, which are characterized by their marked polyphagia. This characteristic has been confirmed in *N. aberrans*, since it was found on 17 Andean potato varieties in this work.

The results of this survey indicate the need to: i) control the sanitary conditions of tubers that will be used as seeds by analyzing the skin and underlying parenchyma, since this method ensures fast detection of harmful phytophagous nematodes and other nematode species; ii) accurately identify the species of pathogens found in Andean tubers and determine their biological characteristics; iii) determine areas that are free of or infested by harmful nematodes; iv) evaluate the susceptibility to parasitism of the most commonly grown varieties in a region by the nematode species detected; and v) organize outreach programs aimed at disseminating knowledge among growers and technicians. Accomplishing these objectives will contribute significantly to better management of nematodes that damage tuber crops in the Andean region.

Acknowledgments

The authors thank the Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, the Secretaría de Ciencia y Técnica

(Universidad Nacional de Córdoba), and the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) for financial support.

Literature Cited

- ATKINS, S.D.; R.H. MANZANILLA-LÓPEZ; J. FRANCO; B. PETEIRA & B.R. KERRY. 2005. A molecular diagnostic method for detecting *Nacobbus* in soil and in potato tubers. *Nematology* 7(2):193-202.
- CADIMA, X.; W. GARCÍA & J. RAMOS. 2003. Conservación y producción del cultivo de la papalisa (*Ullucus tuberosus*). Área Temática de Recursos Genéticos (RRGG) - Fundación PROINPA. Cochabamba, Bolivia, 84 p.
- CADIMA, X.; R. GONZALES; J. ALMANZA; W. GARCÍA & F. TERRAZAS. 2004. Catálogo de variedades locales de papa y oca de la zona de Candelaria. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). No. 5. Fundación para la Promoción e Investigación de Productos Andinos (PROINPA), Municipio de Colomi, Centro Internacional de la Papa (CIP), Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE). Cochabamba, Bolivia, 113 p.

- CIP.1996. Principales enfermedades, nematodos a insectos de la papa. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú, 43 p.
- CONDORI, P.; J. ALMANZA & S. GONZÁLES. 2003. Factores limitantes de producción que inciden a los tubérculos andinos. In: GARCÍA, W. & X. CADIMA (eds). Manejo sostenible de la agrobiodiversidad de tubérculos andinos: Síntesis de investigaciones y experiencias en Bolivia. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). No. 1. Fundación para la Fundación para la Promoción e Investigación de Productos Andinos (PROINPA), Alcaldía de Colomi, Centro Internacional de la papa (CIP), Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE). Cochabamba, Bolivia, p. 64-73.
- COSTILLA, M.A. 1985. Un método rápido para la extracción y observación de estados juveniles de *Nacobbus aberrans* en tubérculos de papa. Revista Industrial y Agrícola de Tucumán 62(2):163-170.
- DOUCET, M.E.; P. LAX & E. LORENZO. 2005a. Relación nematodo-hospedador entre *Globodera pallida* y una variedad de papa andina proveniente del norte de Argentina. Libro de resúmenes del XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología, III Taller Argentino de Fitopatología. 19-22 de Abril de 2005. Carlos Paz, Córdoba, Argentina, 504. (Abstract)
- DOUCET, M.E.; P. LAX & E. LORENZO. 2005b. Complejo de nematodos fitófagos atacando dos variedades de papa andina del Norte argentino. Libro de resúmenes del XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología, III Taller Argentino de Fitopatología. 19-22 de Abril de 2005. Carlos Paz, Córdoba, Argentina, 503. (Abstract)
- GONZÁLEZ, A. & J. FRANCO. 1997. Los nematodos en la producción de semilla de papa. En: Producción de tubérculos-semillas de papa, Manual de capacitación. Centro Internacional de la Papa (CIP), Fascículo 3.9:1-13.
- IBTA/PROINPA. 1994. Catálogo Boliviano de cultivares de papa nativa. Instituto Boliviano de Tecnología Agropecuaria (IBTA), Programa de Investigación de la Papa (PROINPA). Cochabamba, Bolivia. N° 2, 31 p.
- LAX, P.; S. MANDURIC; M.E. DOUCET; C. GALLARDO & S.M. DE L'ARGENTIER. 2005. Primera cita del nematodo blanco del quiste de la papa, *Globodera pallida*, en Argentina continental. Libro de resúmenes del XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología, III Taller Argentino de Fitopatología. 19-22 de Abril de 2005. Carlos Paz, Córdoba, Argentina, 500. (Abstract)
- LUDO M.; L. LAZARTE; J. FRANCO & D. FERNÁNDEZ. 1999. El rol del género en la conservación, localización y manejo de la diversidad genética de papa, tarwi y maíz. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, IPGRI, International Plant Genetic Resources Institute. <http://www.ipgri.cgiar.org/publications/HTMLPublications/27/begin.htm#Contents>
- ORTUÑO, N.; R. OROS; G. MAIN & J. FRANCO. 1996. Detección de nematodos por el método de la bolsa cerrada. Serie Ficha Técnica 2/96, 4 p.
- ORTUÑO, N.; J. FRANCO; J. RAMOS; R. OROS; G. MAIN & R. MONTECINOS. 2005. Desarrollo del manejo integrado del nematodo del rosario de la papa *Nacobbus aberrans* en Bolivia. Documento de trabajo N° 26. Fundación PROINPA-Proyecto Papa Andina, Cochabamba, Bolivia, 124 p.
- RAMOS, J.; J. FRANCO; N. ORTUÑO; R. OROS & G. MAIN. 1998. Incidencia y severidad de *Nacobbus aberrans* y *Globodera* spp. en el cultivo de la papa en Bolivia: pérdidas en el valor bruto de su producción. IBTA/PROINPA, Cochabamba, Bolivia. 201 p.
- SIDDIQI, M.R. 2000. Tylenchida: Parasites of Plants and Insects. CABI Bioscience, Egham, UK, 848 p.
- TERRAZAS F.; S. GONZALES; P. CONDORI & I. QUISPE. 1997. Tubérculos Andinos en la Zona de Independencia: diagnóstico multidisciplinario. IBTA/PROINPA, Cochabamba, Bolivia, 32 p.

Fitonematóides Extraídos dos Resíduos das Fases do Beneficiamento e de Sementes de *Brachiaria brizantha*

LUCIANY FAVORETO¹, JAIME MAIA DOS SANTOS², JOSÉ CARLOS BARBOSA³ & SÉRGIO ADEMIR CALZAVARA⁴

¹Doutoranda, e-mail:lucianyfavoreto@hotmail.com, ²Professor Assistente Doutor, e-mail:jmsantos@fcav.unesp.br, Departamento de Fitossanidade, ³Professor titular, e-mail:jcbarbosa@fcav.unesp.br, Departamento de Ciências Exatas, ⁴Doutorando, Departamento de Fitossanidade, e-mail:seradca@bol.com.br. UNESP/FCAV, CEP 14884-900 Jaboticabal-SP, Brasil. Parte da dissertação do primeiro autor.

Recebido para publicação em 01/04/2006. Aceito em 30/08/2006

Resumo – Favoreto, L.; J. M. Santos, dos; J. C. Barbosa & S. A. Calzavara. 2006. Fitonematóides extraídos dos resíduos das fases do beneficiamento e de sementes de *Brachiaria brizantha*.

O presente trabalho foi desenvolvido com objetivo de identificar e quantificar fitonematóides ocorrentes nas sementes beneficiadas e nos subprodutos das fases do beneficiamento de doze lotes de sementes de *Brachiaria brizantha*. Amostras de sementes brutas, dos subprodutos das nove fases do beneficiamento e das sementes beneficiadas de cada um dos lotes foram recolhidas para análise. As análises foram efetuadas em alíquotas de 10 g de cada material, utilizando-se o método da Trituração em liquidificador, combinado com flotação centrífuga em solução de sacarose. *Aphelenchoides* spp. e *Ditylenchus* spp. foram encontrados em todos os materiais examinados. Os maiores números desses nematóides foram recuperados no resíduo da primeira mesa densimétrica e no resíduo aspirado na frente do segundo conjunto de peneiras e os menores dos resíduos da segunda mesa densimétrica. Ademais, foram encontradas percentagens mais altas de *Ditylenchus* spp. que de *Aphelenchoides* spp. nos resíduos vegetais maiores, removidos nas fases iniciais do processo de beneficiamento. Ao final do beneficiamento, encontraram-se maiores números de *Aphelenchoides* spp. nas sementes beneficiadas que de *Ditylenchus* spp. Portanto, o processo de beneficiamento de sementes utilizado remove mais espécies de *Ditylenchus* que *Aphelenchoides*.

Palavras-chave: *Aphelenchoides* spp., *Ditylenchus* spp., gramínea forrageira.

Summary – Favoreto, L.; Santos, J. M. dos; Barbosa, J. C. & Calzavara S. A. 2006. Phytonematodes extracted from waste material from seed processing and seeds of *Brachiaria brizantha*.

The present research was carried out with the objective of identifying and quantifying the phytonematodes in the waste material from seed processing and in twelve seed lots of *Brachiaria brizantha*. Samples of crude seeds from the waste material from each of the nine steps of seed processing and from the processed seeds were collected for analysis. The analyses were performed in subsamples of 10 g of each material. Samples were processed using the trituration in blender method, combined with the centrifugal flotation in sucrose solution. *Aphelenchoides* spp. and *Ditylenchus* spp. were found in all of the examined materials. The highest numbers of those nematodes were recovered in the residue of the first table densimeter and in the residue aspirated from of the second group of sieves, and the lowest from the residue of the second table densimeter. However, higher percentages of *Ditylenchus* spp. than those of *Aphelenchoides* spp. were found in larger plant residues removed at the first step of the seed processing. At the end of seed processing, larger numbers of *Aphelenchoides* spp. were found in the processed seeds than *Ditylenchus* spp. Therefore, the seed processing used removes more *Ditylenchus* than *Aphelenchoides*.

Keywords: *Aphelenchoides* spp., *Ditylenchus* spp., forage grass.

Introdução

Estima-se que, no Brasil, existam 100 milhões de hectares de pastagens cultivadas, predominantemente constituídas por *Brachiaria decumbens* Stapf. e *B. brizantha* (Hochst.) Stapf. (Verzignassi & Fernandes, 2001). No início da década de 90, estimava-se em 45 a 50 milhões de hectares cultivados com essas espécies, sendo que as principais áreas de plantio estavam no Brasil Central, Oeste da Bahia e Norte do Mato Grosso (Merny *et al.*, 1985; Macedo & Zimmer 1993). Foi principalmente no decorrer das últimas três décadas que essas forrageiras ganharam importância econômica no Brasil, viabilizando a atividade pecuária nos solos do Cerrado (Valle *et al.*, 2003).

A ocorrência de nematóides fitoparasitos tem impacto significativo sobre a produção de massa e persistência das forrageiras (Pinheiro *et al.*, 1997). Contudo, em geral, os produtos das pastagens não são colhidos, mas submetidos ao pastoreio dos rebanhos. Por conseguinte, é difícil determinar o valor econômico das pastagens, assim como o impacto que os nematóides têm na produção de massa. Citando Hauge (1980), Pederson & Quesenberry (1998) estimaram que os nematóides causaram perdas de 6% nas pastagens de trevo de 5,4 milhões de hectares, nos EUA, resultando em prejuízos ao redor de 33 milhões de dólares. O efeito de nematóides em gramíneas forrageiras, por outro lado, pode ser muito difícil de se discernir de outros problemas, tais como prolongados períodos de seca, pressão de pastoreio e outras doenças de raízes. Por outro lado, Bernard *et al.* (1998) mencionaram que os nematóides não somente reduzem a produtividade e produção, mas podem, também, afetar a qualidade da forragem. Ainda, os nematóides encontrados em sementes de gramíneas forrageiras podem comprometer a viabilidade das sementes e a regeneração natural das pastagens, além de serem patógenos de outras culturas, com implicações de natureza quarentenária, dificultando o comércio internacional.

Cerca de 180 espécies de *Aphelenchoides* Fisher já foram descritas (Nickle & Hooper, 1991). Em *Ditylenchus*, 81 espécies são reconhecidas como válidas, enquanto 82 foram removidas do gênero por razões de ordem taxionômica (Sturhan & Brzeski, 1991). Essa grande diversidade torna a taxonomia desses nematóides difícil.

Ditylenchus spp. e *Aphelenchoides* spp. são os nematóides que apresentam maior variabilidade de nichos ecológicos. Algumas espécies causam danos severos na parte aérea de plantas cultivadas, apesar de a grande maioria ser encontrada apenas no solo, alimentando-se de fungos (Sturhan & Brzeski, 1991).

No Brasil, até 1981, apenas duas espécies de *Aphelenchoides* haviam sido relatadas (Lordello, 1981). Posteriormente, Costa Manso *et al.* (1994) fizeram menção à ocorrência de 10 espécies do grupo no País.

Aphelenchoides besseyi Christie que não é parasito obrigatório de plantas, pode atuar como ectoparasito ou endoparasito, dependendo do hospedeiro. Na ausência de plantas hospedeiras, cultivadas ou invasoras, pode sobreviver no solo alimentando-se de fungos saprofíticos ou fitopatogênicos (Huang, 1978; Luc *et al.*, 1990; Pederson & Quesenberry, 1998). Fortuner & Williams (1975) incluiram o capim colonião (*Panicum maximum* Jacq.), a tiririca (*Cyperus* spp.) e as gramíneas silvestres *Setaria italica* (L.) Beauv. e *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. na lista de hospedeiros desse nematóide.

O principal meio de disseminação dessas espécies de nematóide são as sementes. Tanto em outras regiões do mundo (Fortuner & Williams, 1975; Merny *et al.*, 1985; Gokte & Mathur, 1993) quanto no Brasil (Tenente *et al.*, 1994; Pinheiro *et al.*, 1997; Tenente *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2000; Garcia & Tenente, 2001; Sharma *et al.*, 2001; Bueno *et al.*, 2002) espécies de *Aphelenchoides*, notadamente *A. besseyi*, têm sido relatadas em sementes de gramíneas forrageiras. Favoreto *et al.* (2003; 2004) e Favoreto & Santos (2004) mencionaram que não só *A. besseyi*, mas também, espécies de *Ditylenchus* ocorrem em sementes de gramíneas forrageiras no Brasil. Sharma *et al.* (2001) constataram *Aphelenchoides subtenuis* (Cobb) Steiner & Buhrer em 96,9% e *Ditylenchus terricolus* Brzeski em 92,2% de 64 amostras coletadas na rizosfera de capim *B. brizantha* cv. Marandu, no Estado do Acre, entre outros fitonematóides. Huang (1978), citando Fukano (1962), menciona que, além dos grãos, as cascas e palhas de arroz também abrigam o nematóide.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar, qualitativa e quantitativamente, a presença de nematóides em sementes de *Brachiaria brizantha* tanto nas sementes beneficiadas quanto nos subprodutos das diferentes fases do beneficiamento, visto não existirem informações a este respeito na literatura.

Material e Métodos

Foram amostrados doze lotes de sementes de *B. brizantha*, processadas na unidade de beneficiamento da empresa Comércio e Indústria Matsuda Imp., Exp. Ltda., no município de Álvares Machado – SP. Amostras de sementes

tes brutas (não beneficiadas), dos subprodutos das fases do beneficiamento e das sementes beneficiadas de cada um deles foram recolhidas para análise que foram efetuadas no Laboratório de Nematologia do Departamento de Fitossanidade da UNESP/FCAV, Campus de Jaboticabal – SP.

Os materiais analisados foram: 1) sementes brutas; 2) resíduo do primeiro conjunto de peneiras; 3) resíduo do segundo conjunto de peneiras; 4) resíduo da última peneira; 5) sementes peneiradas; 6) sementes limpas da primeira mesa densimétrica; 7) resíduo da primeira mesa densimétrica; 8) sementes beneficiadas; 9) resíduo da segunda mesa densimétrica; 10) resíduo aspirado na frente do segundo conjunto de peneiras; 11) resíduo aspirado no fundo do segundo conjunto de peneiras (Figura 1).

Os nematóides foram extraídos de alíquotas de 10 g, pelo método da Trituração em liquidificador, por 20 segundos, combinado com a flotação centrífuga em solução de sacarose com caulin, conforme Coolen & D'Herde (1972). Os fitonematóides foram identificados ao nível de gênero e

quantificados ao microscópio óptico, com auxílio de uma câmara de contagem de Peters, conforme Southey (1970).

As percentagens de ocorrência de *Aphelenchoides* e *Ditylenchus* em cada fase do beneficiamento foram estimadas em relação ao total de nematóides extraídos no experimento. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, sendo a soma das percentagens médias do total de fitonematóides comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Foram encontradas *A.besseyi* e uma outra espécie do gênero, que não pode ser identificada, além de diferentes espécies de *Ditylenchus*. Nematóides de vida-livre, apesar de não terem sido alvo do presente estudo, também foram encontrados em todas amostras das fases do beneficiamento, inclusive nas sementes beneficiadas e prontas para comercialização.

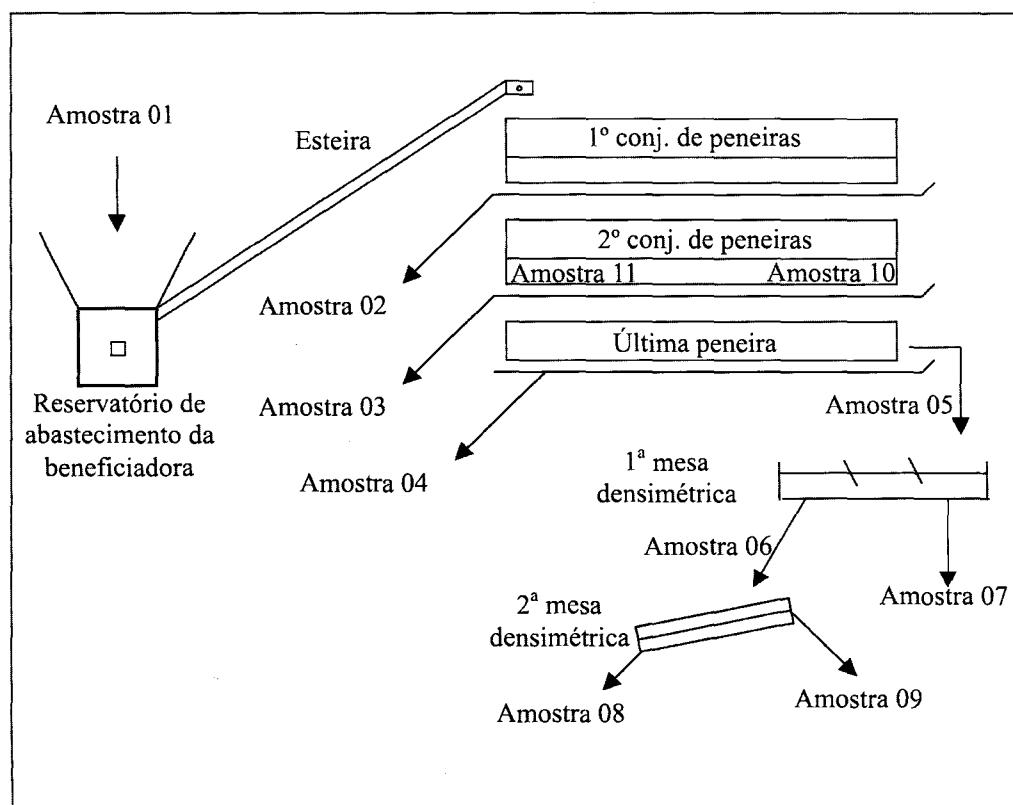


Figura 1. Diagrama do processo de beneficiamento de sementes de gramíneas forrageiras

Nas sementes brutas coletadas no campo (fases 1) contendo impurezas, sementes peneiradas (fase 5), sementes limpas da primeira mesa densimétrica (fase 6), resíduos da segunda mesa densimétrica (fase 9) e resíduos aspirados no fundo do segundo conjunto de peneiras (fase 11), não se observaram diferenças estatísticas significativas entre as percentagens de ambos os nematóides extraídos. Entretanto, as percentagens de nematóides dos dois gêneros, extraídos nas amostras dos resíduos da primeira mesa densimétrica (fases 7) e nos resíduos aspirados na frente do segundo conjunto de peneiras (fase 10), diferiram estatisticamente, a 5% de probabilidade. Nas fases resíduos do primeiro conjunto de peneiras (fase 2), resíduos do segundo conjunto de peneiras (fase 3), resíduos da última peneira (fase 4) e sementes limpas da segunda mesa densimétrica (fase 8), observou-se diferença estatística entre as percentagens dos nematóides a 1% de probabilidade (Tabela 1).

Os materiais analisados nas etapas 2 a 4 do processo de beneficiamento são constituídos de restos vegetais maiores que são coletados junto com as sementes. A análise de

variância dos dados desses materiais revelou diferenças estatísticas significativas entre as percentagens médias de ambos os fitonematóides analisados, sendo que as espécies de *Ditylenchus* foram mais freqüentes que *Aphelenchoides* (Tabela 1). Nas sementes peneiradas (fase 5) e na maior parte das fases subseqüentes do processo de beneficiamento, ocorreu tendência para a prevalência das espécies de *Aphelenchoides*. No produto final do beneficiamento, que corresponde às sementes limpas da segunda mesa densimétrica, a percentagem média de *Aphelenchoides* foi superior a de *Ditylenchus*.

As percentagens médias de *Aphelenchoides* obtidas no resíduo da primeira mesa densimétrica, constituído de pálea e sementes chochas, principalmente, entre outros resíduos vegetais de tamanho e densidades similares (fase 7) e nos resíduos aspirados na frente do segundo conjunto de peneiras, constituído de materiais semelhantes ao anterior (fase 10) foram numericamente maiores que as demais, embora a média relativa às sementes limpas da segunda mesa densimétrica, no final do beneficiamento (fase 8) não

Tabela 1. Análise de variância das percentagens de *Aphelenchoides* spp. e *Ditylenchus* spp. extraídos em alíquotas de 10 g dos materiais resultantes das 11 fases do beneficiamento de 12 lotes de sementes de *Brachiaria brizantha*.

Fases do Beneficiamento	<i>Aphelenchoides</i>	<i>Ditylenchus</i>	F ⁽¹⁾	P
1- Semente bruta	10,08	b c	7,68 a b c d	1,31 ^{NS} 0,2522
2- Resíduo do 1º conjunto de peneiras	5,10	c d e	13,28 a b	15,30** 0,0001
3- Resíduo do 2º conjunto de peneiras	2,64	d e	12,81 a b	23,70** 0,0001
4- Resíduo da última peneira	1,95	e	8,05 a b c d	8,52** 0,0038
5- Semente peneirada	8,92	b c d	6,39 b c d	1,47 ^{NS} 0,2253
6- Semente limpa da 1ª mesa densimétrica	10,26	b c	6,47 b c d	3,28 ^{NS} 0,0710
7- Resíduo da 1ª mesa densimétrica	19,72 a		15,58 a	3,92* 0,0487
8- Semente limpa da 2ª mesa densimétrica	13,82 a b		4,52 c d	19,82** 0,0001
9- Resíduo da 2ª mesa densimétrica	0,32	e	1,05	0,12 ^{NS} 0,7273
10- Resíduo aspirado na frente do 2º conj. de peneiras	18,50 a		14,29 d	4,05* 0,0452
11- Resíduo aspirado no fundo do 2º conj. de peneiras	8,63	b c	9,83 a b	0,32 ^{NS} 0,5670
Teste F ⁽²⁾		18,87**	9,34**	
P		0,0001	0,0001	

Médias nas colunas, seguidas de mesma letra, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

^{NS} Não significativo a 5% de probabilidade.

* Significativo a 5% de probabilidade.

** Significativo a 1% de probabilidade.

⁽¹⁾ Comparação entre espécies dentro de cada fase.

⁽²⁾ Comparação entre fases dentro de cada espécie.

tenha diferido das médias obtidas nessas duas fases. Em arroz, *A. besseyi* também é encontrado nos resíduos, tais como palhas e páleas, conforme Fukano (1962), citado por Huang (1978).

As menores médias das percentagens de *Aphelenchoides* extraídos foram obtidas nos resíduos da segunda mesa densimétrica, constituída de pequenos torrões (fase 9) e da última peneira (fase 4), constituído por fragmentos menores de restos vegetais. Contudo, as médias das percentagens nos resíduos do primeiro e do segundo conjunto de peneiras (fases 2 e 3, respectivamente) não diferiram das médias obtidas nesses materiais.

As médias obtidas nas sementes limpas da primeira mesa densimétrica (fase 6), nas sementes brutas do início do peneiramento (fase 1) e nas sementes peneiradas (fase 5) não diferiram entre si nem dos resíduos aspirados no fundo do segundo conjunto de peneiras (fase 11) e correspondem aos valores intermediários de *Aphelenchoides* spp. extraídos nos diferentes materiais.

A comparação entre as médias porcentuais de *Ditylenchus* spp. extraídos por fases do beneficiamento

evidenciou que as percentagens médias obtidas nos resíduos da primeira mesa densimétrica (fase 7) foram maiores que as demais. Todavia, não houve diferença estatística significativa entre essa média e os valores obtidos para os resíduos aspirados na frente e no fundo do segundo conjunto de peneiras (fases 10 e 11, respectivamente), para os resíduos do primeiro e segundo conjuntos de peneiras (fases 2 e 3), para os resíduos da última peneira (fase 4) nem para as sementes brutas (fase 1). A menor percentagem de *Ditylenchus* spp. extraídos foi obtida nos resíduos da segunda mesa densimétrica (fase 9). Entretanto, essa média não diferiu das percentagens obtidas nos resíduos da última peneira (fase 4), nas sementes limpas da primeira e segunda mesas densimétricas (fases 6 e 8), nas sementes peneiradas (fase 5), e nas sementes brutas do início da peneiramento (fase 1).

A comparação entre as percentagens médias do total de fitonematóides extraídos nos materiais de cada fase foi efetuada (Tabela 2). Os valores obtidos nos resíduos da primeira mesa densimétrica e nos aspirados na frente do segundo conjunto de peneiras (fases 7 e 10, respectivamente)

Tabela 2. Percentagens média do total de *Aphelenchoides* spp. e *Ditylenchus* spp. extraídos em aliquotas de 10 g dos materiais resultantes das 11 fases do beneficiamento de 12 lotes de sementes de *Brachiaria brizantha*.

Fases do Beneficiamento	Percentagens médias do total de fitonematóides
07-Resíduo da 1ª mesa densimétrica	17,65a
10-Resíduo aspirado na frente do 2º conjunto de peneiras	16,40a
11-Resíduo aspirado no fundo do 2º conjunto de peneiras	9,24 b
02-Resíduo do 1º conjunto de peneiras	9,20 b
08-Semente limpa da 2ª mesa densimétrica	9,17 b
01-Semente bruta	8,89 b
06-Semente limpa da 1ª mesa densimétrica	8,37 b
03-Resíduo do 2º conjunto de peneiras	7,73 b
05-Semente peneirada	7,66 b
04-Resíduo da última peneira	5,00 bc
09-Resíduo da 2ª mesa densimétrica	0,69 c
F	20,03**
dms (5%)	4,80
CV	56,28%

**Médias na coluna, seguidas de mesma letra, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

foram estatisticamente maiores que os demais e iguais entre si. A menor média foi obtida nos resíduos da segunda mesa densimétrica (fase 9). Contudo, essa média não diferiu da obtida nos resíduos da última peneira (fase 4). As médias obtidas nas demais fases não diferiram entre si nem dos resíduos aspirados da última peneira (fase 4).

Os dados obtidos evidenciaram que as percentagens de nematóides extraídos diferiram nas diferentes fases do beneficiamento. Tanto as sementes beneficiadas quanto os subprodutos do beneficiamento, incluindo a poeira aspirada, continham nematóides.

Literatura Citada

- BERNARD, E.C.; K.D. GWINN & G.D. GRIFFIN. 1998. Forage grasses. In: BARKER, K.R.; PETERSON, G.A.; WINDHAM, G.L.; BARTELS, J.M.; HATFIELD, J.M.; BAENZIGER, P.S.; BIGHAM, J.M. Plant and nematode interactions. Madison: American Society of Agronomy, p.427-454.
- BUENO, E. R. V.; M. PRATES & R. C. V. TENENTE. 2002. Avaliação de métodos tradicionais de extração de nematóides aplicados às sementes de *Panicum maximum* infestadas por *Aphelenchoides besseyi*. Nematologia Brasileira, Brasília, 26(2):231-217.
- COOLEN, W. A. & C. J. D'HERDE. 1972. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent: State Agricultural Research Center. 77p.
- COSTA MANSO; E.; R. C. V. TENENTE, L. C. B. FERRAZ; R.S. OLIVEIRA & R. MESQUITA. 1994. Catálogo de fitonematóides encontrados associados a diferentes tipos de plantas no Brasil. Brasília: EMBRAPA. 488p.
- FAVORETO, L.; J. M. SANTOS; A. TAKASHI; N.R. RIBEIRO; A.M. TOLEDO & A.S. CAMPOS. 2003. Nematóides em sementes de gramíneas forrageiras do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, XXIV, Petrolina. Resumos, p.143.
- FAVORETO, L.; J.M. SANTOS & A. TAKASHI. 2004. Nematóides detectados em amostras de sementes de gramíneas forrageiras. Summa Phytopathologica, Botucatu, 30(1):88-89.
- FAVORETO, L. & J.M. SANTOS. 2004. Eficácia comparativa de métodos de extração de nematóides de sementes de gramíneas forrageiras. Summa Phytopathologica, Botucatu, 30(1):89.
- FORTUNER, R. & K.J.O. WILLIAMS. 1975. Review of the literature on *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942, the nematode causing "white tip" disease in rice. Helminthological Abstracts B, St. Albans, 44(1):1-40.
- FUKANO, H. 1962. Method for the control of "white tip" disease of rice. Nogyo Oyobi Engei, 37, p. 689-692. (In Japanese)
- GARCIA, J. W.; R.C.V. TENENTE & M.A.S. MENDES. 2000. Termoterapia aplicada às sementes de *Panicum maximum* na erradicação de *Aphelenchoides besseyi* e fungos fitopatogênicos. Nematologia Brasileira, Brasília, 24(1):41-47.
- GARCIA, J.W. & R.C.V. TENENTE. 2001. Controle químico de *Aphelenchoides besseyi* Christie em sementes de *Panicum maximum*. Nematologia Brasileira, Brasília, 25(1):95-98.
- GOKTE, N. & V.K. MATHUR. 1993. Treatment schedule for demetization of seeds of *Setaria itálica* and *Panicum miliaceum* unfested with *Aphelenchoides besseyi*. Nematologica, Leiden, 39:274-276.
- HAUGE, H.G.M. 1980. Nematodes of legume crops. In: SUMMERFIELD, R. J. et al. (ed). Advances in legume science. Kew, England, p. 199-205.
- HUANG, C. S. 1978. O nematóide da "ponta branca" do arroz, *Aphelenchoides besseyi*, um patógeno transmitido pelas sementes. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA, III, Mossoró, Resumos, p.5-18.
- LORDELLO, L. G. E. 1981. Nematóides parasitos de folhas (Gênero: *Aphelenchoides*). In: LORDELLO, L. G. E. (ed). Nematóides das plantas cultivadas. São Paulo: Nobel, p.202-206.
- LUC, M.; R.A. SIKORA & J. BRIDGE. 1990. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Wallingford: CAB International, 629p.
- MACEDO, M. C. M. & A.H. ZIMMER. 1993. Sistema pasto-lavoura e seus efeitos na produtividade agropecuária. In: FAVORETO, V.; RODRIGUES, L. R. de A.; RICARDO, A. R. (ed). Ecossistema de pastagens. Jaboticabal: FUNEP, p.216-245.

- MERNY, G.; G BILLARD & R. PELLETIER. 1985. Technique d'éradication d' *Aphelenchoides besseyi* (Nematoda: Aphelenchina) dans les semences de *Panicum maximum*. Revue Nématologique, Paris, 8(2):155-160.
- NICKLE, W. R. & D.J. HOOPER. 1991. The aphelenchina: bud, leaf, and insect nematodes. In: NICKLE, W. R. (ed). Manual of agricultural nematology. New York: Marcel Dekker, p.465-507.
- PEDERSON, G.A. & K.H. QUESENBERRY. 1998. Clovers and other forage legumes. In: BARKER, K. R.; PETERSON, G A.; WINDHAM, G. L.; BARTELS, J. M.; HATFIELD, J. M.; BAENZIGER, P. S. & BIGHAM, J. M. (ed). Plant and nematode interactions. Madison: American Society of Agronomy, p.399-426.
- PINHEIRO, F.P.; R.P.VIANELLO; F.S. EBEIDALLA & R.C.V. TENENTE. 1997. Uso de tratamentos térmicos na erradicação de *Aphelenchoides besseyi* em sementes de *Brachiaria dictyoneura*. Nematologia Brasileira, Brasília, 21(1):92-97.
- SHARMA, R. D.; J. B. CAVALCANTI & J.F. VALENTIN. 2001. Nematóides associados ao capim *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no Estado do Acre, Brasil. Nematologia Brasileira, Brasilia, 25(2):217-222.
- SOUTHEY, J. F. 1970. Laboratory for work with plant and soil nematodes. 5 ed. London: Ministry of Agriculture Fisheries and Food, 148p.
- STURHAN, D. & M. W.BRZESKI. 1991. Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. In: Nickle, W. R. (ed) Manual of agricultural nematology. New York: Marcel Dekker, p.423-464.
- TENENTE, R. C. V.; E.S.B.G.C. MANSO; M.A.S. MENDES & A.S.A. MARQUES. 1994. Seed health testing for nematodes detection of plant gerplasm by CENARGEN. Seed Science Technology, Zurich, 22(3):415-420.
- TENENTE, R. C. V.; E. C. MANSO & V.GONZAGA. 2000. Nematóides detectados em germoplasma vegetal importado e sua erradicação nos anos de 1995 a 1998. Nematologia Brasileira, Brasília, 24(1):79-81.
- VALLE, C. B.; A. V. PEREIRA & L. JANK. 2003. Melhoramento de forrageiras tropicais. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte. Disponível em: www.cnpgc.embrapa.br em 16/06/2003.
- VERZIGNASSI, J. R. & C.D. FERNANDES. 2001. Doenças em forrageiras. Campo Grande: EMBRAPA - Gado de Corte, 3p. (Circular, 50).

Degradação de Endósporos de *Pasteuria penetrans* por Hipoclorito de Sódio

ROSANGELA DALLEMOLE-GIARETTA, LEANDRO GRASSI DE FREITAS, WÂNIA DOS SANTOS NEVES, SILAMAR FERRAZ, ROSÂNGELA D'ARC DE LIMA OLIVEIRA & CLÉIA DE FÁTIMA SILVA FABRY

¹Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia,
CEP 36571-000, Viçosa-MG.
e-mail: rodallemole@yahoo.com.br

Recebido para publicação em 14/11/2005. Aceito em 30/08/2006.

Resumo – Dallemole-Giarettta, R.; L.G. Freitas; W.S. Neves; S. Ferraz; R.D.L. Oliveira & C.F.S. Fabry. 2006. Degradação de Endósporos de *Pasteuria penetrans* por Hipoclorito de Sódio.

Avaliou-se a ação de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações de cloro ativo sobre os endósporos de *P. penetrans*. O tratamento dos endósporos, em concentrações a partir de 0,125%, afetou drasticamente a sua adesão aos J2 de *M. javanica*. O estudo morfológico dos endósporos mostrou que houve mudanças nas camadas externas dos endósporos degradação do esporângio, exósporo e das fibras parasporiais a 0,125% e completa eliminação dos endósporos a 0,5% de cloro ativo. Quando placas contaminadas artificialmente com *Pasteuria penetrans* foram submersas em uma solução de 0,5% de cloro ativo, houve uma eliminação de 85% dos endósporos a partir de um minuto de contato e a desinfestação total, após 15 minutos.

Palavras-chave: *Meloidogyne javanica*, utensílios laboratoriais, adesão, endósporos, desinfestação, cloro ativo.

Summary – Dallemole-Giarettta, R.; L.G. Freitas; W.S. Neves; S. Ferraz; R.D.L. Oliveira & C.F.S. Fabry. 2006. Degrading *Pasteuria penetrans* endospores by sodium hypochlorite

The action on *P. penetrans* endospores of sodium hypochlorite at different concentrations of active chlorine was evaluated. Treatments at different concentrations of active chlorine drastically affected the attachment to *M. javanica* juveniles, mainly in concentrations above 0.125%. The morphological study showed changes in the structure of the endospores, beginning with the dissolution of the parasporial fibers in sodium hypochlorite at 0.125% of active chlorine and reaching the total destruction of them at 0.5%. One minute of immersion of petri dishes contaminated with *Pasteuria penetrans* in sodium hypochlorite 0.5% of active chlorine was enough to eliminate 85% of the bacterial endospores and 15 minutes for a completely eliminated them.

Keywords: *Meloidogyne javanica*, laboratorial equipment, endospore elimination, active chlorine.

Introdução

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é um dos desinfetantes químicos mais usados pois o cloro (Cl) tem ampla ação antimicrobiana contra vírus, algas, protozoários e bactérias (Hidalgo & Dominguez, 2000). O efeito bactericida e

esporicida do NaOCl, em bactérias produtoras de esporos, como *Bacillus subtilis* Cohn, 1872, já foi observado em baixas concentrações de cloro ativo (Bloomfield & Arthur, 1992), e o efeito letal sobre os esporos é exercido primeiramente pela degradação do córtex, seguido da remoção do material protoplasmático (Gorman *et al.*, 1984). A utilização NaOCl

como agente inativante em endósporos de *Pasteuria penetrans* (ex Thorne) Sayre & Starr, 1985, foi relatada brevemente por Netscher & Duponnois (1998) como um método simples e econômico na inativação dessa bactéria, entretanto sem descrever o tempo necessário para ocorrer a efetiva ação bactericida.

Os endósporos de *Pasteuria* spp. apresentam alta capacidade adesiva e se fixam firmemente à cutícula do nematóide hospedeiro (Mankau, 1975). Esses endósporos também se aderem a vidros, plásticos e metais, o que pode provocar contaminações de utensílios laboratoriais (Hewlett & Serracin 1996) e prejudicar experimentos em casa de vegetação (Giannakou *et al.*, 1997).

A inativação desses endósporos pode ser realizada através da autoclavagem (Hewlett & Serracin 1996). No entanto, esse método não pode ser utilizado em tubos de plástico, peneiras e materiais graduados. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação direta de NaOCl em diferentes concentrações de cloro ativo sobre a adesão e a estrutura dos endósporos de *P. penetrans*, bem como o tempo necessário para desinfestar viderias contaminadas pela bactéria em solução de NaOCl a 0,5% de cloro ativo.

Material e Métodos

Endósporos de *P. penetrans* foram tratados em solução aquosa de NaOCl a 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,0625%, 0,03125% ou 0,015625%. Água destilada foi utilizada no tratamento testemunha. Para cada concentração, três tubos tipo Eppendorf® com capacidade de 1,5 mL receberam 1 mL da suspensão aquosa de endósporos de *P. penetrans* calibrada para $6,42 \times 10^6$ endósporos/mL. A suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 14.000 g e o sobrenadante de cada tubo foi descartado. O pelet de cada tubo foi ressuspensionado com 1 mL de NaOCl em cada uma das concentrações. Os tubos foram deixados em repouso por 30 minutos. A seguir, os endósporos foram lavados em água destilada em dois ciclos de ressuspensão e centrifugação.

O teste de adesão em J2 de *M. javanica* foi realizado em placas de Petri de vidro, previamente autoclavadas, em um delineamento inteiramente casualizado com sete repetições. Cada placa recebeu 6 mL de suspensão aquosa contendo 1.000 J2 de *M. javanica* e 0,52 mL da suspensão de endósporos previamente tratados na concentração de $2,48 \times 10^6$. A suspensão de cada placa foi agitada e deixada em repouso por 45 minutos. O número de endósporos aderidos/J2 foi contado em 20 J2/placa escolhidos ao acaso.

Para avaliar o efeito do NaOCl sobre os endósporos de *P. penetrans*, estes foram incubados na solução do desinfetante, conforme descrito anteriormente, porém nas concentrações de 0,5%, 0,25% e 0,125% de NaOCl. Utilizaram-se quatro tubos por concentração. Após a última lavagem dos endósporos, os pelets de dois tubos de cada tratamento foram ressuspensionados em 0,5 mL de água e os endósporos foram observados em microscópio óptico no aumento de 1000X ou espalhados sobre quatro tiras de papel-filtro Whatman nº 1, de 4 x 7 mm, e o material foi preparado para a observação em microscópio eletrônico de varredura conforme o método descrito por Chen *et al.* (1997).

Para a avaliação do período necessário para desinfestar materiais contaminados com endósporos de *P. penetrans*, placas de vidro, previamente autoclavadas, foram artificialmente contaminadas com 2,5 mL de suspensão de endósporos de *P. penetrans*, contendo 1×10^6 endósporos/mL, e mantidas em temperatura ambiente de laboratório ($26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) até a secagem da suspensão. Após este período, foram colocadas em recipiente de plástico com 500 mL da solução desinfetante de NaOCl a 0,5% de cloro ativo e mantidas por 1, 5, 10 ou 15 minutos, sendo que no tratamento testemunha as placas não foram imersas em hipoclorito de sódio. Posteriormente, as placas foram retiradas da solução desinfetante, enxaguadas individualmente oito vezes com água corrente de torneira inclusivas as da testemunha e colocadas em bandejas com papel toalha. Em seguida, cada placa recebeu 7 mL de uma suspensão aquosa, contendo 800 J2 de até três dias de idade, a qual foi agitada manualmente e deixada em repouso por 45 minutos. Decorrido este tempo, contou-se o número de endósporos aderidos/J2 em 20 J2 escolhidos ao acaso. O experimento foi inteiramente casualizado com sete repetições.

Resultados e Discussão

A exposição dos endósporos a concentrações entre 0,015625 e 0,0625%, de cloro ativo não afetou a adesão dos endósporos aos J2 de *M. javanica*, resultando em médias de adesão semelhantes à observada na testemunha em água (Figura 1), entretanto a adesão dos endósporos foi afetada negativamente a partir da diluição de 0,125%. Quase nenhum endósporo tratado com 0,25 e 0,5% de cloro ativo aderiu aos J2.

Essa redução na adesão dos endósporos de *P. penetrans* tratados com hipoclorito de sódio ocorreu, possivelmente, pela ação do cloro sobre as proteínas presentes na superfí-

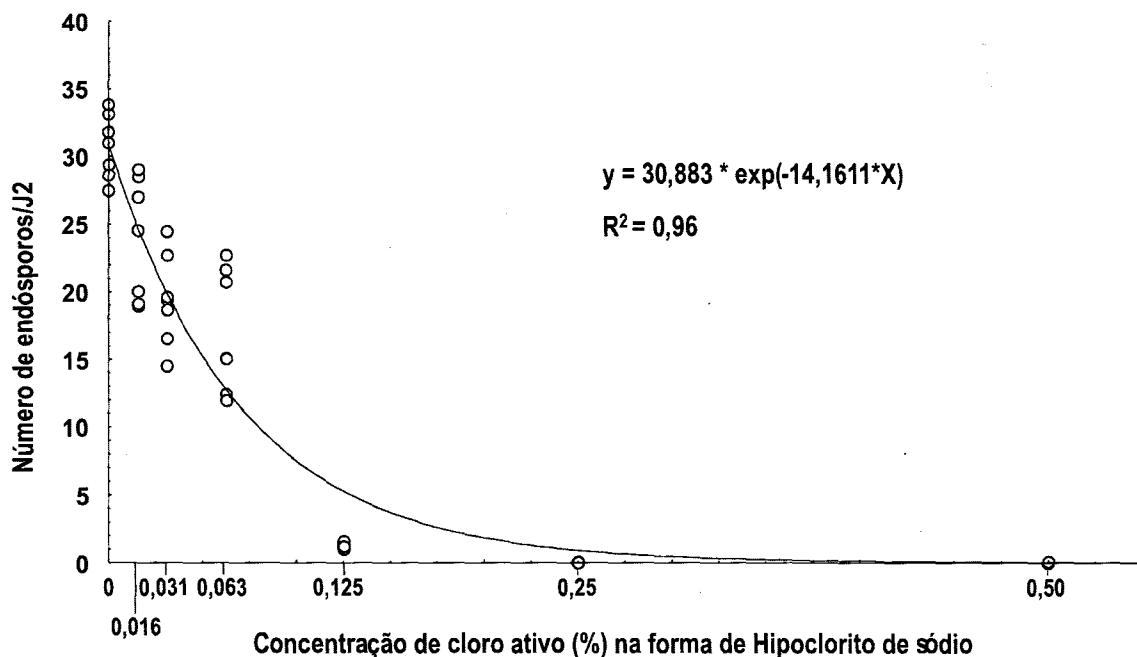


Figura 1. Número de endósporos de *Pasteuria penetrans* aderidos a juvenis de segundo estádio (J2) de *Meloidogyne javanica* após tratamento com hipoclorito de sódio, a diferentes concentrações de cloro ativo, por um período de 30 minutos. (Dados de sete repetições com 20 J2 cada).

cie dos endósporos, envolvidas no mecanismo de adesão à cutícula do nematóide hospedeiro (Davies *et al.*, 1992). A diminuição da adesão de endósporos em função da desnaturação de componentes do endósporo, como glicoproteínas e peptideoglicanos, já foi sugerida por Davies & Danks (1993), quando esses pré-incubaram endósporos em proteinase K, e posteriormente os colocaram em contato com J2 de *Meloidogyne incognita* Kofoid & White) Chitwood, 1949. Bloomfield & Arthur (1992) também relataram a extração de proteínas da camada do esporo de *B. subtilis*, bem como de peptideoglicanos do córtex, pela ação solubilizante do NaOCl.

Micrografias de luz e de varredura, mostraram alterações morfológicas dos endósporos de *P. penetrans* nas concentrações de 0,25 e 0,5% de cloro ativo (Figura 2), com a maioria dos endósporos menores e de coloração mais escura que os endósporos da testemunha, além de se apresentarem em menor número. Na concentração de 0,125%, (Figura 2 C e D), observou-se que o NaOCl afetou ligeiramente os endósporos de *P. penetrans*, principalmente no formato e no tamanho das fibras paraspórais, deixando-as levemente inclinadas e menores, quando comparados aos

endósporos não-tratados. Essas deformidades explicam porque a adesão dos endósporos, no ensaio anterior, a partir dessa concentração, foi reduzida drasticamente. Além, da provável ação do cloro ativo, que desnaturou as proteínas presentes na superfície dos endósporos, envolvidas no mecanismo de adesão (Davies *et al.*, 1992).

Nas concentrações mais elevadas de cloro ativo, entre 0,25 e 0,5%, provavelmente ocorreu a ruptura do esporângio, exósporo e fibras paraspórais, os quais compõem a camada externa do endósporo (Figura 2 E a H). Ao avaliar as amostras de 0,25% de cloro ativo, observou-se que a quantidade de endósporos diminuiu e a maioria apresentava somente a sua parte central (Figura 2 E e F). Nos endósporos que ainda apresentavam as fibras paraspórais, estas estavam retorcidas e menores que as dos endósporos da testemunha. Na concentração 0,5% não se visualizou praticamente nenhum endósporo típico em microscopia eletrônica de varredura. Possivelmente, nessa concentração ocorreu a completa degradação dos endósporos, o que explica a ausência dos mesmos, assim como a adesão aos J2 de *M. javanica* no ensaio anterior.

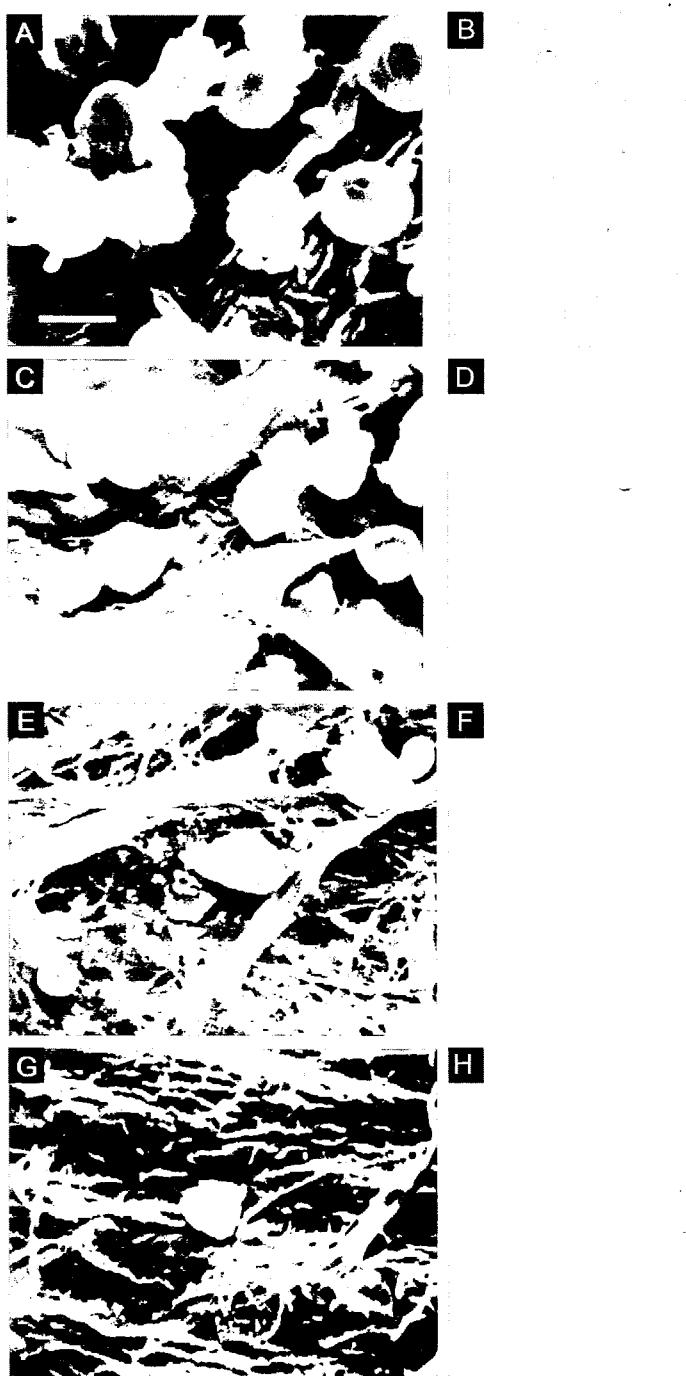


Figura 2. Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura e ao microscópio ótico de endósporos de *Pasteuria penetrans*, após o tratamento por 30 minutos em solução de hipoclorito de sódio com diferentes concentrações de cloro ativo. A,B: endósporos tratados somente em água; C,D; E,F; G,H: endósporos tratados com 0,125%, 0,25% e 0,5% de cloro ativo, respectivamente. Barra 2 μm .

O efeito do NaOCl sobre esporos de outras bactérias, como *Clostridium bifermentans* (Weinberg & Séguin) Bergey, Harrison, Breed, Hammer & Huntoon 1923, *Bacillus subtilis* Cohn, 1872, e *Bacillus cereus* Frankland & Frankland, 1887, já foi relatado por Wyatt & Waites (1975). Gorman *et al.* (1984) avaliaram o efeito do NaOCl sobre todos os componentes do esporo de *B. subtilis* e observaram que esta substância, além de promover a degradação das camadas mais externas do esporo, provocou também a ruptura do córtex, fazendo com que ocorresse a remoção do material protoplasmático, o que inativou a germinação do esporo.

Apesar do NaOCl, nas concentrações 0,25 e 0,5% de cloro ativo, ter apresentado o mesmo efeito na redução da adesão dos endósporos de *P. penetrans*, a concentração 0,5% inativou todos os endósporos em todos os ensaios realizados nessa concentração, promoveu também a total remoção de carcaças de fêmeas secas e retorcidas, que poderão abrigar endósporos no seu interior e, possivelmente, serem fontes de contaminação, o que não ocorreu na concentração a 0,25% de cloro ativo.

Na concentração a 0,5% de cloro ativo apenas 1 minuto de contato das placas contaminadas com a solução desinfetante foi suficiente para que 85% dos endósporos fossem eliminados, reduzindo assim a adesão (Figura 3). A desinfestação total das placas ocorreu aos 15 minutos de contato com a solução desinfetante.

A eficácia do NaOCl em promover a inativação em curto período de tempo foi relatada também por Motta *et al.* (2001), que inativaram os esporos de *Bacillus stearothermophilus* Donk, 1920 após cinco minutos de tratamento. Bloomfield & Arthur (1992) constataram a morte de mais de 99% dos esporos de *B. subtilis* após tratá-los por 5 minutos em NaOCl a 0,002% de cloro ativo. No presente estudo, a inibição total da adesão dos endósporos de *P. penetrans* aos J2 de *M. javanica* ocorreu aos cinco minutos de exposição do hipoclorito de sódio, mas iniciou-se já após o primeiro minuto de tratamento (Figura 3).

Conclui-se, portanto, que o NaOCl é um potente agente inativante de endósporos de *P. penetrans*, afetando a estrutura dos mesmos e, consequentemente, reduzindo a adesão aos J2 de *M. javanica*.

Recomenda-se a imersão de utensílios laboratoriais infestados com *P. penetrans* em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo por pelo menos 5 minutos para sua completa desinfestação.

Literatura Citada

- BLOOMFIELD, S.F. & M. ARTHUR. 1992. Interaction of *Bacillus subtilis* spores with sodium hypochlorite, sodium dichloroisocyanurate and chloramine-T. *Journal of Applied Bacteriology*, 72:166-172.
- CHEN, Z.X.; D.W. DICKSON; L.G. FREITAS & J.F. PRESTON. 1997. Ultrastructure, morphology, and sporogenesis of *Pasteuria penetrans*. *Phytopathology*, 87(3):273-283.
- DAVIES, K.G. & C. DANKS. 1993. Carbohydrate/protein interactions between the cuticle of infective juveniles of *Meloidogyne incognita* and spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. *Nematologica*, 39:53-64.
- DAVIES, K.G.; M.P. ROBINSON & V. LAIRD. 1992. Proteins involved in the attachment of a hyperparasite, *Pasteuria penetrans*, to its plant-parasitic nematode host, *Meloidogyne incognita*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 59: 18-23.
- GIANNAKOU, I.O.; B. PEMBROKE; S.R. GOWEN & K.G. DAVIES. 1997. Effects of long term storage and above normal temperatures on spore adhesion of *Pasteuria penetrans* and infection of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematologica*, 43:185-192.
- GORMAN, S.P.; E.M. SCOTT & E.P. HUTCHINSON. 1984. Hypochlorite effects on spores and spore forms of *Bacillus subtilis* and on a spore lytic enzyme. *Journal of Applied Bacteriology*, 56:295-303.
- HEWLETT, T.E. & M. SERRACIN. 1996. *Pasteuria* spp. agente de control biológico de nemátodos fitoparasitos: Manual de técnicas. Corbana, 21(46):151-161.
- HIDALGO, E. & C. DOMINGUEZ. 2000. Growth-altering effects of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblasts. *Life Sciences*, 67:1331-1344.
- MANKAU, R. 1975. *Bacillus penetrans* n. comb. causing a virulent disease of plant-parasitic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 26:333-339.
- MOTTA, P.G.; C.B. FIGUEIREDO; S.M. MALTOS; J.R. NICOLI; A.P. SOBRINHO RIBEIRO; K.L. MALTOS & H.P. CARVALHAIS. 2001. Efficacy of chemical sterilization and storage conditions of gutta-percha

- cones. International Endodontic Journal, 34(6):435-439. (Abstract).
- NETSCHER, C. & R. DUPONNOIS. 1998. Use of aqueous suspensions for storing and inoculating spores of *Pasteuria penetrans*, parasite of *Meloidogyne* spp.. Nematologica, 44:91-94.
- SAYRE, R.M. & M.P. STARR. 1985. *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. rev., comb. n., sp. n., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant-parasitic nematodes. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 52(2):149-165.
- WYATT, L.R. & W.M. WAITES. 1975. The effect of chlorine on spores of *Clostridium bifermentans*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. Journal of General Microbiology, 89:337-344.

Samanea saman*, Novo Hospedeiro de *Meloidogyne javanica

GILSON SOARES DA SILVA¹ & FRANCISCO CARNEIRO LIMA²

¹Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade; ²Departamento de Zootecnia. Universidade Estadual do Maranhão, CEP 65001-970, São Luis, MA. E-mail:gilson_soares@uol.com.br.

Recebido para publicação em 12/12/2005. Aceito em 14/05/2006

Resumo – Silva,G.S. & F.C.Lima. 2006. *Samanea saman*, novo hospedeiro de *Meloidogyne javanica*

Assinala-se, pela primeira vez no Estado do Maranhão, a ocorrência de *Meloidogyne javanica* em bordão-de-velho (*Samanea saman*), causando sérios danos à mudas enviveiradas.

Palavras-chave: *Samanea saman*; nematóide das galhas; leguminosa.

Summary – Silva, G.S. & F.C. Lima. 2006. *Samanea saman*, a new host of *Meloidogyne javanica*.

The parasitism of *Meloidogyne javanica* on Indian walnut or Indian siris is recorded for the first time in the State of Maranhão, Brazil, causing severe damage in nurseries.

Keywords: Indian walnut, Indian siris, root-knot nematode.

Conteúdo

O bordão-de-velho (*Samanea saman* Jacq.) [= *Albizzia saman* (Jacq.) F.Muell] é leguminosa arbórea, de ampla distribuição geográfica nos trópicos. Suas vagens apresentam de 12 a 18% de proteína e são altamente palatáveis para ruminantes, tanto domésticos como selvagens, tendo, portanto, elevado potencial forrageiro, sendo indicada para sistemas silvopastoris (Poot, 1993; Lima, 2000). Além do aspecto zootécnico, o bordão-de-velho também se presta para a produção de madeira, como ornamental e como melhorador de pastagens em função da sua excelente nodulação. Recentemente, mudas de bordão-de-velho, coletadas em um viveiro na Universidade Estadual do Maranhão, em São Luís, apresentavam-se com desenvolvimento insatisfatório, acentuados sintomas de deficiência

mineral e, em alguns casos, mortas. O exame das plantas revelou a presença de inúmeras galhas no sistema radicular (Figura 1), de cujo interior foram retiradas fêmeas maduras de *Meloidogyne*. Observações ao microscópio ótico da região perineal das fêmeas do nematóide permitiram a identificação da espécie como *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood, de acordo com Eisenback (1985). A ocorrência de *M. javanica* em bordão-de-velho parece não ter sido ainda registrada no Brasil. Manso *et al.*(1994) citam *Albizzia lebbek* (L.) Benth como hospedeira de *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood na Bahia, com base no trabalho de Freire & Ponte (1976). A ocorrência de *M. javanica* em viveiros de bordão-de-velho pode contribuir para rápida disseminação desse parasito. Produção de mudas em solo livre do patógeno é de fundamental importância para que isso não ocorra.

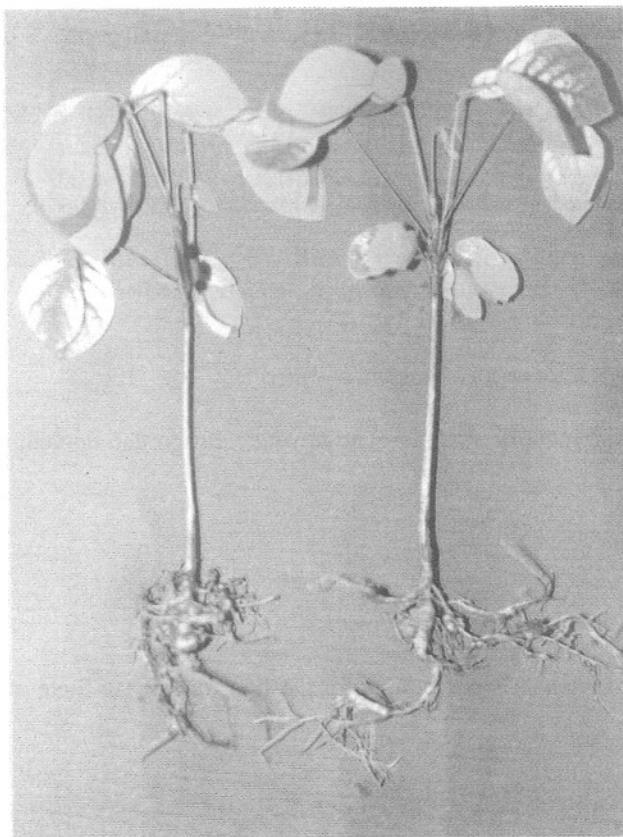


Figura 1. Mudas de bordão- de- velho (*Samanea saman*) com sintomas do ataque de *Meloidogyne javanica*.

Literatura Citada

- BRAGA, R. 1976. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. Fortaleza: Coleção Mossoroense, vol. XLII. 539 p.
- EISENBACK, J.D. 1985. Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: SASSER, J.N. & C.C. CARTER (Eds.) An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Raleigh, NCSU Graphics, p. 95-112.
- LIMA, F.C. 2000. Potencial forrageiro do bordão-de-velho (*Samanea saman* Jacq.) para uso em sistemas silvipastoris. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Maranhão, 81p.
- MANSO, E. C.; R.C.V TENENTE; L.C.C.B. FERRAZ; R.S. OLIVEIRA & R. MESQUITA. 1994. Catálogo de nematóides fitoparasitos encontrados associados a diferentes tipos de plantas no Brasil. Brasília:Embrapa/Cenargen. 488 p.
- POOT, A. 1993. Árvores no sistema pastoril. In: SIMPÓSIO SOBRE OS USOS MÚLTIPLOS DE LEGUMINOSAS ARBUSTIVAS E ARBÓREAS, Nova Odessa. P. 95-127.

Efeito da Incorporação de Resíduos Foliares de *Piper aduncum* ao Solo sobre o Parasitismo de *Meloidogyne incognita* em Tomateiro

GILSON S. SILVA¹, AURENICE L. PEREIRA¹, CLEBER N. BASTOS² & VALDENIA C. M. MENDONÇA¹

¹Universidade Estadual do Maranhão, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, CEP 65001-970, São Luís, MA.
e-mail: gilson_soares@uol.com.br;

²Ceplac/Supor/Erjuh, Cx. Postal 46, CEP 67105-970, Marituba, PA.

Recebido para publicação em 07/10/2005. Aceito em 14/08/2006

Resumo – Silva, G.S.; A.L. Pereira; C.N. Bastos & V.C. M. Mendonça. 2006. Efeito da incorporação de resíduos foliares de *Piper aduncum* ao solo sobre o parasitismo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro.

O trabalho teve como objetivo avaliar o possível efeito da incorporação de resíduos foliares de pimenta de macaco (*Piper aduncum* L.) sobre o parasitismo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro. No experimento realizado em vasos, sob condições de casa de vegetação, utilizaram-se folhas secas trituradas de pimenta de macaco, obtidas antes e após a extração do óleo, nas concentrações de 0 % (testemunha), 1%, 2% e 4%, incorporados ao solo 30 dias antes do transplantio do tomateiro. A avaliação foi feita 45 dias após, adotando-se como parâmetros os índices de galhas e de massas de ovos/sistema radicular. Os dois tipos de resíduo mostraram-se eficientes em reduzir o parasitismo do nematóide, especialmente o resíduo a 2% obtido antes da extração do óleo. O resíduo obtido após a extração do óleo também mostrou-se eficiente, porém na maior concentração. A maior eficiência do resíduo obtido antes da extração do óleo pode ser devido às substâncias químicas presentes no óleo essencial encontrado nas folhas.

Palavras-chave: matéria orgânica, nematóide das galhas, controle.

Summary – Silva, G.S.; A. L. Pereira; C.N. Bastos & V.C. M. Mendonça. 2006. Effect of the addition of leaf residues of *Piper aduncum* to soil on parasitism of *Meloidogyne incognita* in tomato.

The present work describes the effect of addition of the leaf residues of pimenta-de-macaco (*Piper aduncum*) on the parasitism of *Meloidogyne incognita* in tomato. In the experiment conducted under greenhouse conditions, ground leaves obtained before and after extraction of the oil were amended into the soil at concentrations of 0%, 1%, 2% or 4%, 30 days before transplanting the tomato seedlings. The evaluation was made 45 days later by using as parameters the indices of galls and egg-masses/root system. The two types of residues were efficient in reducing the parasitism of the nematode, especially the residue at 2% obtained before the oil extraction. The leaf residue obtained after extraction of the oil was also efficient but only at the highest concentration. The higher efficiency of the residue obtained before extraction of the oil was possibly due to the chemical substances present in the essential oil of the leaves.

Keywords: organic matter, root-knot nematode, control.

Conteúdo

A adição de materiais orgânicos ao solo é uma das práticas mais antigas na agricultura. Inicialmente indicada para promover a melhoria da fertilidade do solo, essa prática vem se tornando um importante segmento dos métodos alternativos de manejo de fitonematóides especialmente nos sistemas agroecológicos.

Há, na literatura especializada, inúmeros trabalhos relatando os efeitos da incorporação de diferentes resíduos ao solo para o controle de patógenos do solo, incluindo fitonematóides (Barbosa *et al.*, 2004; McSorley & Frederick, 1999; McSorley & Gallaher, 1996; Rodríguez-Kábana, 1986; Rodrigues-Kábana *et al.*, 1995; Zambolim *et al.*, 1996; Widmer *et al.*, 2002).

A pimenta de macaco (*Piper aduncum* L.) é uma planta produtora de óleo essencial com alto teor de éter fenílico dilapiol (Maia *et al.*, 1998). Produtos naturais obtidos dessa planta têm mostrado efeito sobre diversos patógenos de plantas (Nair & Burke, 1990; Bastos, 1997). Quanto aos seus possíveis efeitos sobre nematóides não foram encontrados relatos na literatura.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da incorporação de resíduos foliares de pimenta de macaco sobre o parasitismo de *M. incognita* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) como uma alternativa no controle dos nematóides das galhas.

O experimento foi realizado em vasos, sob condições de casa de vegetação, obedecendo a um delineamento experimental inteiramente casualizado com seis repetições. Dois tipos de resíduos foliares de pimenta de macaco foram utilizados: um resíduo, obtido antes da extração do óleo e um outro, obtido após a extração do óleo essencial. As folhas foram secas sobre bancadas em casa de vegetação, ventiladas durante seis a sete dias e trituradas depois de secas. Os materiais foram incorporados ao solo, 30 dias antes do transplantio de uma muda de tomateiro, para cada vaso com capacidade de 1500 mL e o solo infestado com 5000 ovos de *M. incognita*, obtidos de uma população mantida em tomateiro em casa de vegetação, pelo método de Boneti & Ferraz (1981). Quarenta e cinco dias após a instalação do experimento, as plantas foram cuidadosamente retiradas dos vasos, os sistemas radiculares lavados em água corrente e avaliados quanto aos índices de galhas e massas de ovos,

Tabela 1. Efeito da incorporação de resíduos foliares de *Piper aduncum* sobre *Meloidogyne incognita* em tomateiro.

Tratamentos	PPA ¹	PSR ²	IG ³	IMO ⁴
Resíduo 1 – 4%	6,17 a	0,81 a	1,00 b	1,00 b
Resíduo 1 – 2%	4,74 ab	0,65 ab	0,00 a	0,00 a
Resíduo 1 – 1%	6,64 ab	0,74 ab	1,00 b	1,00 b
Resíduo 2 – 4%	3,02 b	0,62 ab	0,50 ab	0,33 ab
Resíduo 2 – 2%	4,34 b	0,49 b	2,17 c	1,00 b
Resíduo 2 – 1%	3,08 b	0,55 ab	2,50 c	2,00 b
Testemunha	0,91 c	0,50 b	4,00 d	3,50 d
CV (%)	7,31	4,30	13,18	14,05

¹PPA - Peso da parte aérea;

²PSR - Peso do sistema radicular;

³IG - Índice de galhas;

⁴IMO - Índice de massa de ovos.

Médias na mesma coluna seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Resíduo 1= obtido antes da extração do óleo.

Resíduo 2= obtido após a extração do óleo.

de acordo com Taylor & Sasser (1978). Para melhor visualização das massas de ovos, as raízes foram coradas com fucsina ácida durante 10 minutos (Silva *et al.*, 1988).

Os resultados obtidos mostram que a adição de resíduos de *P. aduncum* ao solo reduziu a reprodução de *M. incognita*, estimados a partir dos índices de galhas e de massas de ovos, em todas as concentrações avaliadas (Tabela 1). Menores índices de galhas e massas de ovos foram encontrados no tratamento com o resíduo obtido antes da extração do óleo, mesmo em concentração menor que o resíduo obtido após a extração do óleo. No tratamento com o resíduo obtido antes da extração do óleo a 2%, não foram observadas galhas nem massas de ovos, diferindo dos tratamentos com o mesmo resíduo a 1% e 4%. As diferenças entre as notas 0 e 1 atribuídas aos índices de galhas e massa de ovos (Taylor & Sasser, 1978) são mínimas. Muitas vezes, isso leva a erro na avaliação desses índices. Isso poderia explicar essa diferença com o resíduo 1 (antes da extração do óleo). De acordo com Rodríguez-Kábana (1986), o efeito de resíduos orgânicos sobre a redução da população de fitonematóides no solo tem como explicação a liberação de compostos tóxicos formados pela decomposição da matéria orgânica e aumento da população de inimigos naturais. Com efeito, o melhor desempenho do resíduo obtido, antes da extração do óleo essencial da pimenta de macaco, pode ser atribuído à presença dos princípios ativos dos constituintes do óleo presente nos tecidos foliares.

Nos tratamentos com a adição dos resíduos, houve um aumento nos pesos do sistema radicular e da parte aérea das plantas, comparados à testemunha, principalmente com o resíduo obtido antes da extração do óleo. Isso pode ser devido a uma maior concentração dos compostos encontrados no resíduo, uma vez que durante a extração do óleo algumas substâncias ou mesmo a concentração delas seja alterada. Esse melhor desenvolvimento das plantas se deve à melhoria das propriedades físico-químicas do solo (Ritzinger & McSorley, 1998). Do mesmo modo, o aporte de matéria orgânica ao solo pode, por si só, promover benefícios nutricionais às plantas, diminuindo assim, o estresse e levando-as a tolerar a presença dos nematóides sem, contudo, apresentar queda acentuada da sua produção (McSorley & Gallaher, 1995).

Conclui-se, então, que os resíduos foliares de *P. aduncum* poderão constituir-se em um importante método alternativo de controle de nematóides, especialmente na agricultura familiar, em substituição aos produtos químicos com propriedades nematicidas.

Literatura Citada

- BASTOS, C.N. 1997. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos. Fitopatologia Brasileira, 22(3):441-443.
- BARBOSA, G.M.C.; M.L. MENDES; J. TAVARES FILHO; P.B.N. RODRIGUEZ & E. VIZONI. 2004. Effect os sewage sludge compost on *Meloidogyne javanica* on tomato. Nematropica, 34(1):13-21.
- BONETI, J.I.S. & S. FERRAZ. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, 6(Suplemento):553.
- MAIA, J.G.S.; M.G.B. ZOHIBI; E.H.A. ANDRADE; A.S. SANTOS; M.H.L.SILVA; A.I.R. LUZ & C.N. BASTOS. 1998. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. Flavour and Fragance Journal, 13:269-272.
- McSORLEY, R. & J.J. FREDERICK. 1999. Nematode population fluctuations during decomposition of specific organic amendments. Journal of Nematology, 31(1):37-44.
- McSORLEY, R. & R. N. GALLAHER. 1996. Effect of yard waste compost on nematode densities and maize yield. Supplement to Journal of Nematology, 28(4S):655-660.
- McSORLEY, R. & R.N. GALLAHER. 1995. Cultural practices improve crop tolerance to nematodes. Nematropica, 25 (1):53-60.
- NAIR, M.G. & B.A. BURKE. 1990. Antimicrobial *Piper* metabolite and related compounds. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 38:1093-1096.
- RITIZINGER, C.H.S.P. & R. McSORLEY. 1998. Effect of fresh and dry organic amendments on *Meloidogyne arenaria* in greenhouse experiments. Nematropica, 28(2): 173-185.
- RODRÍGUES-KÁBANA, R. 1986. Organic and inorganic nitrogen amendments to soil as nematode suppressants. Journal of Nematology, 18(2):129-135.
- RODRÍGUES-KÁBANA, R.; V. ESTAÚN; J. PINOCHET & O. MARFÁ. 1995. Mixtures of olive pomace with different nitrogen sources for the control of *Meloidogyne* spp. on tomato. Supplement to Journal of Nematology, 27(4S): 575-584.

- SILVA, G.S.; J.M. SANTOS & S. FERRAZ. 1988. Novo método de coloração de ootecas de *Meloidogyne* sp. *Nematologia Brasileira*, 12: 6-7.
- TAYLOR, A.L. & J.N. SASSER. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). NCSU & USAID Coop. Publ., Raleigh, USA, 111 p.
- WIDMER, T.L.; N.A. MITKOWSKI & G.S. ABAWI. 2002. Soil organic matter and management of plant-parasitic nematodes. *Journal of Nematology*, 34(4):289-295.
- ZAMBOLIM, L.; M.A. SANTOS; W.F. BECKER & G.M. CHAVES. 1996. Agro-waste soil amendments for the control of *Meloidogyne javanica* on tomato. *Fitopatologia Brasileira*, 21(2):250-253.