**CARACTERIZAÇÃO DE DOIS ISOLADOS DE *Pratylenchus coffeae*
COLETADOS NO BRASIL**

ROSANGELA APARECIDA DA SILVA
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **MÁRIO MASSAYUKI INOMOTO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro - 2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Silva, Rosângela Aparecida da
Caracterização de dois isolados de *Pratylenchus coffeae* coletados no Brasil /
Rosângela Aparecida da Silva. - - Piracicaba, 2000.
53 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Café 2. Nematóide parasito de planta 3. Planta hospedeira 4. Relação planta-
patógeno I. Título

CDD 633.73

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

A meus pais, Arão e Antonia, e à
minha irmã Rosilene, pelo
apoio, paciência e
compreensão, com amor,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar a minha gratidão a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, agradecendo em especial:

Ao Prof. Dr. Mário Massayuki Inomoto, pela amizade, estímulo, disponibilidade única e ensinamentos recebidos, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Barbosa Ferraz, pelo apoio, estima e sugestões;

Ao Prof. Dr. Ailton Rocha Monteiro, pela amizade e sugestões;

Ao Prof. Dr. Daniel Cassetari Neto (UFMT), pelo constante estímulo, e grande contribuição à minha formação profissional.

À técnica da Clínica de Nematologia do Departamento de Entomologia Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Sonia Regina Antedomênico, pela incansável ajuda e amizade;

Aos Pesquisadores do Instituto Biológico, Marcelo e Roberto pelas sugestões e principalmente pela amizade e auxílio em todos os momentos;

Aos Professores e funcionários do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, pela amizade e contribuição na obtenção deste título;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro concedido;

Às amigas Ágata, Andréia, Cristiane e Luciana pela amizade e apoio.

Aos colegas do Laboratório de Nematologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, Alexandre, Andressa, Guilherme, João Flávio, Melissa e Zacarias pela amizade e incentivo;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho,

Agradeço a toda minha família, e em especial, a Robinson Moresca de Andrade, por toda paciência, incentivo e carinho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Impotência do nematóide <i>Pratylenchus coffeae</i>	3
2.2 Ocorrência de <i>Pratylenchus coffeae</i> no Brasil.....	4
2.3 Controle de <i>Pratylenchus coffeae</i> através de rotação de culturas ou cultura intercalar.....	5
3 CARACTERIZAÇÃO DE DOIS ISOLADOS DE <i>Pratylenchus coffeae</i> DO BRASIL ATRAVÉS DE PLANTAS HOSPEDEIRAS.....	8
Resumo.....	8
Summary.....	9
3.1 Introdução.....	9
3.2 Material e Métodos.....	10
3.2.1 Produção do inóculo.....	10
3.2.2 Experimentos 1, 2 e 3.....	12
3.2.3 Experimentos 4 e 5.....	14
3.2.4 Experimentos 6 e 7.....	15
3.2.5 Estudos morfológicos e <i>voucher specimens</i>	16
3.2.6 Análise dos dados.....	18
3.3 Resultados.....	19
3.3.1 Testes de hospedeiros.....	19
3.3.2 Estudos morfológicos.....	25
3.4 Discussão.....	28
3.5 Conclusões.....	30
4 EFEITO DE DOIS ISOLADOS DE <i>Pratylenchus coffeae</i> NO CRESCIMENTO DO CAFEEIRO MUNDO NOVO.....	31
Resumo.....	31
Summary.....	32
4.1 Introdução.....	32
4.2 Material e Métodos.....	34
4.3 Resultados e Discussão.....	37
4.4 Conclusões.....	39
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	40

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
APÊNDICES.....	48

CARACTERIZAÇÃO DE DOIS ISOLADOS DE *Pratylenchus coffeae* COLETADOS NO BRASIL

Autor: **Rosangela Aparecida da Silva**

Orientador: Prof. Dr. **Mário Massayuki Inomoto**

RESUMO

Variações morfológicas e biológicas são observadas entre os isolados de *Pratylenchus coffeae*, o nematóide das lesões radiculares do cafeeiro, indicando a existência de raças dentro da espécie. Este estudo foi realizado com o objetivo de caracterizar dois isolados de *P. coffeae* coletados do Brasil. Um dos isolados foi coletado de raízes de cafeeiro em Marília, SP e o outro de raízes de *Aglaonema* sp. no Rio de Janeiro, RJ. Ambos isolados foram multiplicados em calos de alfafa no laboratório. Sete experimentos foram conduzidos com o objetivo de caracterizar os isolados através de seus hospedeiros. Os resultados mostraram que esses isolados são muito diferentes do isolado típico de *Pratylenchus coffeae*, uma vez que a taxa reprodutiva foi baixa banana e citros. Além disso, a população do isolado do Rio de Janeiro diminuiu no cafeeiro, o qual é um hospedeiro típico de *Pratylenchus coffeae*, porém aumentou em gergelim, um hospedeiro desfavorável desse nematóide. Baseado nos resultados da caracterização biológica, a qual mostrou que o cafeeiro é um hospedeiro desfavorável para ambos isolados, um experimento foi conduzido como objetivo de definir a importância desses nematóides como patógeno do cafeeiro. Plantas de cafeeiro cv. Mundo Novo receberam 8.000 nematóides de cada isolado, o crescimento das plantas, peso fresco das raízes, e peso fresco da parte aérea, foi avaliado 160 e 261 após a inoculação. A reprodução dos nematóides também foi avaliada. Ambos isolados reduziram o crescimento das plantas de cafeeiro, porém houve uma redução na população do nematóide. O efeito do isolado de Marília foi mais danoso do que o do isolado do Rio de Janeiro, resultando em

necroses nas raízes e morte de algumas plantas. As características morfológicas também podem ser utilizadas para diferenciar os isolados.

Concluiu-se, que ambos isolados são extremamente patogênicos ao cafeeiro e eles podem ser diferenciados de outros isolados de *P. coffeae* através de seus hospedeiros e por características morfológicas.

CHARACTERIZATION OF TWO ISOLATES OF *Pratylenchus coffeae* COLLECTED IN BRAZIL

Author: ROSANGELA APARECIDA DA SILVA

Adviser: Prof Dr. MÁRIO MASSAYUKI INOMOTO

SUMMARY

Morphological and biological variations are observed among the isolates of the coffee lesion nematode (*Pratylenchus coffeae*), suggesting the existence of races within the species. The aim of our experiments was to characterize two isolates of *P. coffeae* from Brazil. One isolate was collected from coffee roots in Marília, São Paulo State; the other from roots of *Aglaonema* sp. in Rio de Janeiro City. Both isolates were raised on alfalfa callus in laboratory. Seven experiments were carried out in order to characterize the isolates by their host range. The results showed that these isolates are very different from the typical isolate of *Pratylenchus coffeae*, since their reproduction rates were low in banana and citrus. Moreover, the populations of the Rio de Janeiro isolate decreased in coffee, which is the typical host of *Pratylenchus coffeae*, but increased a lot in sesame, a poor host of this nematode. Based on the results of the biological characterization, which showed coffee as a poor host of both isolates, an experiment was done in order to define the importance of these isolates as coffee pathogens. Plants of coffee cv. Mundo Novo received 8.000 nematodes of each isolate, and plant height, fresh root weight, and dry shoot weight, were evaluated 160 and 261 days after the inoculation. Reproduction of the nematodes was also assessed. Both isolates reduced the growth of coffee plants, even though their populations decreased. The effect of Marília isolate was stronger than that of Rio de Janeiro isolate, resulting in extensive root necrosis and death of some plants. Morphological characteristics were also utilized to differentiate the isolates. In conclusion, both isolates are highly

pathogenic to coffee, and they may be differentiated from other *Pratylenchus coffeae* isolates by their host range and by morphological characteristics.

1 INTRODUÇÃO

A cafeicultura é uma das principais atividades econômicas do nosso país. Apesar dessa importância econômica e social, o cultivo do café, foi desestimulado entre as décadas de 70 e 90. Na década de 80, o estado de São Paulo perdeu 42% da área cultivada com café, ficando com a terceira maior produção nacional, inferior a dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Diversos fatores têm contribuído para a redução da área cultivada. Além da opção dos produtores por outros produtos agrícolas, que tem proporcionado melhores resultados econômicos, as geadas, as secas e os problemas fitossanitários têm sido fatores desestimulantes à cultura do café. Dentre os últimos, destacam-se os severos ataques de nematóide nas principais regiões produtoras do Estado, principalmente naquelas com solos arenosos: a Alta Paulista, Alta Araraquarense e a Alta Sorocabana (Gonçalves, 1993).

As espécies de nematóides mais comumente encontradas parasitando o cafeeiro são: *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919), *M. coffeicola* Lordello & Zamith, 1960, *M. paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes, Santos & Almeida, 1996, *M. exigua* Goeldi, 1892, *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann, 1898) e *P. brachyurus* (Godfrey, 1929). Os nematóides das galhas (*Meloidogyne* spp.) já foram intensamente estudados, e para eles técnicas eficientes de controle já são conhecidas. Por outro lado, a importância dos nematóides das lesões radiculares (*Pratylenchus* spp.) como patógeno do cafeeiro no Brasil ainda é pouco conhecida. Dentre esses, *P. coffeae* é a mais daninha. É uma espécie ainda pouca comum no Brasil, mas que causa preocupação porque não têm sido tomados cuidados para evitar sua disseminação através de mudas. Aparentemente, duas são as razões pelas quais a importância de *P. coffeae* tem sido subestimada. A primeira é escassez de estudos sobre essa espécie na literatura nacional. A segunda é que estudos recentes demonstraram que *P. coffeae* apresenta uma grande variabilidade, havendo inclusive

indícios de que seja composta por raças, ou ainda que deva ser desdobrada em várias espécies. Se essa suspeita for confirmada, o controle desse nematóide, ou grupo de nematóides, se tornará extremamente difícil. É sabido que, somente estabelecendo-se um sistema de manejo adequado da área de plantio, é possível reduzir os danos causados pelos nematóides, porém para tanto se deve primeiramente conhecer plantas não hospedeiras de *P. coffeae*, que poderiam ser implantadas na área infestada. Assim, esse trabalho teve os seguintes objetivos: a) caracterizar dois isolados de *Pratylenchus coffeae* através de plantas hospedeiras e de caracteres morfológicos; b) estudar a reação das principais culturas anuais para o Brasil em relação a esses isolados, permitindo dessa maneira definir quais poderiam ser utilizadas para rotação em uma área infestada com eles; c) definir a importância desses isolados como patógeno do cafeeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância do nematóide *Pratylenchus coffeae*.

Essa espécie foi observada pela primeira vez na Indonésia, em raízes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.), por Zimmermann (1898). Atualmente, *P. coffeae* está amplamente disseminado em várias áreas produtoras de café, sendo considerado especialmente daninho na Índia e nos países da América Central (Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Jamaica, Martinica, Porto Rico e República Dominicana). Sua ocorrência também foi registrada no Brasil, além de países produtores de café da África e Ásia (Campos et al., 1990; Kumar & Samuel, 1990).

Duas outras culturas perenes são prejudicadas por esse nematóide: banana (*Musa* spp.) e citros (*Citrus* spp.). Em banana, *P. coffeae* causa sintomas semelhantes aos causados pelo nematóide cavernícola, *Radopholus similis* (Cobb), ou seja, lesões necróticas de coloração negra ou purpúrea no córtex das raízes e do rizoma, tombamento do pseudocaule, aumento do ciclo vegetativo, redução da vida produtiva do bananal, enfezamento da planta e redução do tamanho das folhas e do cacho (Gowen & Quénehervé, 1990).

Vários países produtores de citros, como os Estados Unidos, Índia, África do Sul e Taiwan, têm problemas com *P. coffeae*. Nos Estados Unidos, *P. coffeae* causa grande preocupação apesar de ser relativamente pouco disseminado, pois possui uma grande capacidade patogênica sobre as plantas cítricas. Esses endoparasitos, devido ao seu hábito migrador, destroem as células do córtex, resultando na destruição das raízes fibrosas e redução do sistema radicular (Duncan & Cohn, 1990).

Esse nematóide é muito daninho também a algumas plantas anuais, como o cará (*Dioscorea* spp.) e o inhame (*Colocasia esculenta* Schott). No cará, *P. coffeae* provoca um sintoma nas túberas semelhante a uma podridão seca, cuja intensidade é maior quando a temperatura de armazenamento mantém-se entre 24 °C a 31 °C, favorecendo o aumento populacional de *P. coffeae* no interior de túberas (até 939 exemplares por grama de tecido infestado), em túberas conservadas a 12–13 °C, o número de nematóides permanece baixo (¹Thompson et al., 1973, citados por Ferraz, 1995). *Pratylenchus coffeae* é encontrado com freqüência na cultura do inhame na região do Pacífico, mas somente é considerado um patógeno importante dessa cultura no Japão (Jatala & Bridge, 1990).

Outras culturas nas quais *P. coffeae* apresenta certa importância econômica são o antúrio (*Anthurium andreanum* Linden), em Trinidad–Tobago, a batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam.), no Japão, e a juta, na Índia (Bala & Hosein, 1996; Mishra & Sasmal, 1988; Mizukubo, 1995).

2.2. Ocorrência de *Pratylenchus coffeae* no Brasil

Seu primeiro registro no Brasil foi feito provavelmente por Rahm (1928), em raízes de cafeeiro provenientes de Lins, Palmital e São Paulo/SP. Embora os desenhos feitos pelo autor sobre o material examinado não permitam afirmar que se trate realmente de *P. coffeae*. Posteriormente, foi registrado em Marília/SP, por Monteiro & Lordello (1974). No Brasil, os danos causados por esse nematóide à cultura do cafeeiro parecem estar restritos a poucas áreas produtoras, sendo *P. brachyurus* muito mais freqüente (Gonçalves et al., 1978; Kubo²). Entretanto, o café é provavelmente a cultura mais prejudicada pelo nematóide no Brasil.

Além do cafeeiro, *Pratylenchus coffeae* foi registrado em associação à bananeira no Ceará, Paraíba e São Paulo; à batata, (*Solanum tuberosum* L.) em São

¹THOMPSON, A.K.; BEEN, B.O.; PERKINS, C. Nematodes in store yams. **Experimental Agriculture**, London, v.9, p.281-286, 1973

²KUBO, R.K. (Centro Experimental do Instituto Biológico, Campinas, SP.). Comunicação pessoal, 2000.

Paulo; ao cará na Paraíba; a *Cassia* sp.; ao crisântemo em São Paulo; a *Citrus* sp. em São Paulo; ao palmito (*Euterpe edulis* Mart.) em São Paulo;

[(Almeida et al., 1978; Café Filho & Huang, 1988; Costa-Manso et al., 1994; Curi et al., 1990; Lordello, 1956; Lordello, 1988; Moura & Monteiro, 1995; Prates & Lordello, 1980; Rossi et al., 1995)].

2.3. Controle de *Pratylenchus coffeae* através de rotação de cultura ou cultura intercalar

Dois possíveis métodos de controle de *P. coffeae* são a rotação de culturas e a cultura intercalar com plantas não hospedeiras do nematóide. No entanto, não têm sido utilizados, pela ausência de trabalhos a respeito, principalmente em relação à reprodução do nematóide em possíveis plantas a serem utilizadas com essas finalidades.

²Esser (1969), citado por Pinochet & Duarte (1986), elaborou a primeira lista conhecida de hospedeiros de *P. coffeae*.

Edwards & Wehunt (1973) produziram mais tarde outra lista, a partir da compilação dos dados conhecidos até então. No total, mais de 130 espécies e variedades de plantas foram listadas como hospedeiras desse nematóide. Além disso, foi feito um trabalho experimental estudando a reação de 47 plantas, entre culturas de importância econômica que poderiam ser utilizadas em rotação nas áreas produtoras de bananas da América Central, e ervas daninhas frequentes nessas mesmas áreas. Foram identificadas 21 plantas não hospedeiras e 26 hospedeiras, dentre as quais 18 ainda não registradas previamente como tais. Como hospedeiras foram consideradas aquelas nas quais todos os estádios do ciclo de vida do nematóide foram encontrados nas raízes.

Outro estudo desse tipo foi feito na Índia, e mostrou que das 63 plantas testadas, duas plantas [banana (triplóide de *Musa acuminata* Colla) cv. Nanica e café cv. Robusta] comportaram-se como excelentes hospedeiras de *P. coffeae* (taxa de multiplicação após 90 dias igual a 15,0), cinco como boas hospedeiras (taxa de multiplicação entre 6 e 10),

² ESSER, R. P. 1969. Data summary. *Pratylenchus coffeae* (Mimeo) Florida Dept. Agric. Cons. Serv., Div. Plant Ind. Gainesville. 32 pp

28 como hospedeiras favoráveis (taxa entre 2 e 5), 11 como más hospedeiras (taxa menor que 2) e 15 como não hospedeiras (taxa igual a zero) Das & Das (1986).

Preocupados com possíveis danos causados por *P. coffeae* em plantas ornamentais, Pinochet & Duarte (1986) classificaram 44 ornamentais de valor econômico para a América Central e Caribe quanto à capacidade de multiplicar esse nematóide. Estabelecendo categorias arbitrárias baseadas nas taxas reprodutivas estimadas de *P. coffeae* nas plantas e nos sintomas causados pelo nematóide nas raízes, os autores classificaram as plantas testadas em boas hospedeiras (cinco plantas), hospedeiras ruins (dez plantas) e não hospedeiras (29 plantas).

Os trabalhos acima citados contribuíram de maneira significativa nos estudos sobre *P. coffeae*, mas pecam pelo fato de classificar de forma extremamente arbitrária as plantas testadas quanto à capacidade de multiplicar esse nematóide. Edwards & Wehunt (1973) estabeleceram apenas duas classes: plantas hospedeiras, quando todas as fases do ciclo do nematóide foram encontradas no interior das raízes, e não hospedeiras em caso contrário. Das & Das (1986) utilizaram um critério quantitativo interessante baseado na taxa de reprodução estimada do nematóide, mas as classes foram definidas sem embasamento estatístico. Pinochet & Duarte (1986) utilizaram um critério quantitativo, considerando também sintomas causados pelo nematóide nas plantas. Infelizmente a classificação parece não ser muito precisa, uma vez que o número de plantas analisadas foi muito grande, e o critério de classificar todas as plantas que apresentaram taxa de reprodução menor que 0,5 como não hospedeiras não parece correto, pois não leva em conta que muitos nematóides morrem durante a inoculação, e que o baixo número de exemplares extraídos pode ser atribuído à eficiência dos métodos de extração de nematóides, sabidamente baixos.

Além disso, há outra dificuldade na escolha de plantas para um programa de rotação de cultura, que é a possível existência de raças dentro da espécie *P. coffeae*. Isso limita a validade de resultados obtidos em uma localidade, onde existe determinada população de *P. coffeae*, a um outro local, que possivelmente tenha outra população desse nematóide. Essa hipótese surgiu a partir da análise dos resultados de Edwart & Wehunt (1973), que utilizaram duas diferentes populações de *P. coffeae*, uma de

Honduras e outra do Panamá, e verificaram que o milho (*Zea mays* L.) foi hospedeiro da população do Panamá e não hospedeiro da de Honduras, e dez outras [*Sesbania* sp., *Tephrosia candida* D.C., *Tephrosia vogelli* Hook., caupi, calopogônio (*Calopogonium mucunoides* Desv.) *Crotalaria juncea* L., *Crotalaria striata* Schrank, *Flemingia congesta* (Roxb.), *Mimosa invisa* Mart., *Stylosanthes gracilis* HBK.] tiveram comportamento inverso. No Japão, a existência de diferentes raças de *P. coffeae* foi evidenciada a partir da comparação das taxas de reprodução de cinco populações em 13 diferentes espécies de plantas (rabanete, feijão, tomate, berinjela, crisântemo, batata-doce, pepino, tabaco, feijão-de-lima, caupi, cenoura, espinafre e “okura”) e três cultivares de batata-doce (Mizukubo, 1995).

3 CARACTERIZAÇÃO DE DOIS ISOLADOS DE *Pratylenchus coffeae* DO BRASIL ATRAVÉS DE PLANTAS HOSPEDEIRAS

Resumo

Com o objetivo de conhecer as populações de *P. coffeae* do Brasil em relação aos seus hospedeiros, dois isolados foram coletados de raízes de cafeeiro (em Marília/SP.) e da ornamental *Aglaonema* sp. (no Rio de Janeiro/RJ.), multiplicados em calos de alfafa e utilizados em experimentos em casa-de-vegetação. Vinte e quatro plantas foram testadas quanto à reprodução dos dois isolados. Esses isolados diferiram acentuadamente entre si nesses testes. Além disso, chamou à atenção que o cafeeiro, a bananeira e o limoeiro cravo não figuraram entre os hospedeiros favoráveis de nenhum dos isolados. As plantas hospedeiras mais favoráveis ao isolado de Marília foram sorgo, milho, arroz, milheto, quiabo, melão, berinjela e alface, e as mais desfavoráveis foram cravo-de-defunto, limão cravo, banana, gergelim, amendoim, girassol, algodão, feijão, cebola e cebolinha. E as plantas mais favoráveis ao isolado do Rio de Janeiro foram gergelim, sorgo, soja, mamona, melancia, abóbora, berinjela e melão, e as mais desfavoráveis foram cravo-de-defunto, café, limão cravo, banana, girassol, amendoim, milho, milheto, feijão, algodão, cebola, pimentão, alface, quiabo, e cebolinha. Estudos realizados por outros autores já haviam demonstrado que esses isolados podem ser diferenciados entre si pelas suas características moleculares e mesmo morfológicas, e o presente estudo indica que esses isolados também podem ser diferenciados pelas suas plantas hospedeiras.

Summary

Two isolates of *Pratylenchus coffeae* were collected from coffee roots (in Marília, São Paulo State, Brazil) and *Aglaonema* roots (in Rio de Janeiro City, Rio de Janeiro State, Brazil), and maintained in laboratory on alfalfa callus. Twenty-four plants were tested in greenhouse conditions in order to study the host preference of these isolates. Their host ranges were very different from each other, and it is remarkable that coffee, banana and citrus were not among the best hosts of theirs. The best hosts of the Marília isolate were sorghum, maize, rice, millet, okra, melon, eggplant, and lettuce, and the poorest ones were French marigold, Rangpur lime, banana, sesame, peanut, sunflower, cotton, French bean, onion, and small onion. The best hosts of the Rio de Janeiro isolate were sesame, soybean, sorghum, castor oil plant, watermelon, squash, eggplant, and melon, and the poorest ones were French marigold, coffee, Rangpur lime, banana, sunflower, peanut, maize, millet, French bean, cotton, onion, sweet pepper, lettuce, okra, and small onion. As declared by other authors, these isolates have important molecular and morphological differences, suggesting that their host preference is linked with these characteristics.

3.1 Introdução

Os nematóides das lesões radiculares (gênero *Pratylenchus* Filipjev) são parasitos de alta nocividade a um grande número de plantas cultivadas. São nematóides migradores, ou seja, os indivíduos em qualquer estágio penetram e saem livremente das raízes, e são endoparasitos, vivendo no interior das raízes e de lá saindo em direção ao solo quando as condições tornam-se desfavoráveis. O caminhar dentro dos tecidos das raízes pode ocorrer intercelularmente ou intracelularmente, e essa atividade leva à exaustão do conteúdo citoplasmático das células das quais se alimentam, resultando na formação das lesões, inicialmente pequenas, mas depois aumentadas pela coalescência das lesões produzidas por outros indivíduos e pela colonização de fungos e bactérias oportunistas presentes no solo. O resultado final da ação de *Pratylenchus* nas raízes é a destruição parcial ou total do sistema radicular, que se reflete na parte aérea através da desfolha e da redução do crescimento (Lordello, 1988).

As espécies de *Pratylenchus* mais importantes no Brasil são *P. brachyurus* (Godfrey, 1929), *P. coffeae* (Zimmermann, 1898) e *P. zaei* Graham, 1951. Dentre elas, a segunda espécie é a menos estudada. Os trabalhos relativos a *P. coffeae* são poucos, se considerados os danos causados por essa espécie nas diversas plantas hospedeiras. Sabe-se que essa espécie apresenta populações nas quais existem importantes diferenças morfológicas e moleculares (Duncan et al., 1999). Se tais diferenças corresponderem a diferenças biológicas, serão indicativos de que alguns dos métodos de controle desse nematóide, como a rotação de cultura, deverão ser revistos. Dentre os resultados já obtidos nesse sentido, pode-se citar a baixa reprodução de um isolado *P. coffeae* de inhame (*Colocasia esculenta* Schott) em bananeira, embora se saiba que essa planta é uma das principais hospedeiras de *P. coffeae* (Gowen & Quénehervé, 1990).

O objetivo deste trabalho foi definir o círculo de hospedeiros de *Pratylenchus coffeae*, resultando dessa maneira em uma contribuição prática para trabalhos de rotação de culturas ou culturas intercalares em áreas infestadas com esse nematóide, e ainda verificar se as diferenças morfológicas e moleculares já conhecidas (Duncan et al., 1999) tinham correspondência com respostas biológicas importantes, como a reação de plantas.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Produção do inóculo

Dois isolados de *Pratylenchus coffeae* foram coletados de diferentes hospedeiros em dois Estados do Brasil. Um isolado foi coletado de raízes de caféiro (*Coffea arabica* L.) em uma propriedade denominada fazenda Santa Terezinha, no município de Marília/SP. Essa propriedade foi escolhida em função do seu histórico de ocorrência do nematóide *P. coffeae* (Monteiro & Lordello, 1974). O segundo isolado foi coletado de raízes de uma planta ornamental, *Aglaonema* sp. em uma propriedade denominada sítio Morrinhos, no bairro Recreio dos Bandeirantes, município do Rio de Janeiro/RJ. As raízes apresentavam sintomas típicos de infecção por *Pratylenchus*, isto é, lesões escuras nas raízes corticais.

Os nematóides foram extraídos de 5 g de raízes, desintegradas por 1 minuto em liquidificador, e posteriormente processadas em centrífuga, segundo o método de Coolen

& D'Herde (1972). Os nematóides mortos foram separados dos vivos através do método de Baermann, modificado para recipiente raso (Southey, 1986), em B.O.D. a 24 °C por 24 horas. Parte dos nematóides extraídos foram mortos pelo calor (55 °C), para efetuar as montagens de lâminas permanentes em glicerina e temporárias em formalina 2%. As características das espécies de *Pratylenchus* relatadas na literatura (Handoo & Golden, 1989; Loof, 1978; Román & Hirschmann, 1969) foram observadas e medições foram feitas, com o auxílio de microscópio óptico, com o objetivo de confirmar se ambas os isolados coletados eram realmente *P. coffeae*.

Após a identificação, os nematóides foram esterilizados superficialmente com ampicilina a 0,1 % e transferidos para recipientes de vidro contendo calos de alfafa, produzido segundo método proposto por Riedel et al. (1973). Em cada recipiente foi colocada uma fêmea grávida. Caso essa fêmea sobrevivesse ao processo e começasse a reproduzir, iniciava-se uma cultura pura, perpetuada em laboratório através de sucessivas repicagens, a cada 45-120 dias. O isolado de Marília, utilizado nos experimentos descritos a seguir, foi constituído das culturas puras de 30 fêmeas axenizadas dessa maneira, e o isolado do Rio de Janeiro, de 15 fêmeas. Parte desse material foi enviado ao Dr. Larry Duncan (Universidade da Flórida), para ser usado em um estudo sobre relações filogenéticas entre vários isolados de *P. coffeae*, coletados de muitos países. Nesse estudo, os isolados aqui utilizados foram nomeados como K₅ (de Marília) e M₂ (do Rio de Janeiro), classificados em dois grupos distintos a partir de parâmetros morfológicos e moleculares (Duncan et al., 1999).

Para obtenção dos inóculos, os nematóides eram extraídos de culturas com 45–90 dias de idade, pelo método de Baermann modificado para recipiente raso (Southey, 1986). O material resultante era uma suspensão aquosa, contendo adultos e juvenis de *P. coffeae*, que foi utilizado como inóculo para os experimentos descritos a seguir.

3.2.2 Experimentos 1, 2 e 3.

Esses experimentos foram feitos para selecionar tanto plantas boas como más hospedeiras de *P. coffeae*. Essas foram utilizadas como padrões de comparação para as plantas a serem testadas nos demais experimentos.

Baseado na literatura, café (*C. arabica* cv. Catuaí Vermelho) e banana (*Musa acuminata* Colla AAA cv. Nanicão) foram escolhidos para serem testados como possíveis hospedeiros favoráveis, e o gergelim (*Sesamum indicum* L.) e cravo-de-defunto (*Tagetes patula* L.) como hospedeiros desfavoráveis (Almeida et al. 1978; Das & Das, 1986; Edwards & Wehunt, 1973; Gowen & Quénehervé, 1990), no primeiro experimento. As sementes de café foram semeadas em caixa contendo areia. Quando as plântulas de café estavam no estágio de orelha-de-onça [quando os dois cotilédones estavam expandidos (Wellman, 1961)], elas foram transplantadas para recipientes plásticos (uma plântula por recipiente) contendo 450 ml de solo esterilizado com brometo de metila (150 ml de CH₄Br por 1.000 litros de solo). Plântulas de banana, obtidas por cultura de tecido, foram transplantadas após a fase de aclimação, para recipientes de plástico (uma por recipiente). As plantas de gergelim e cravo-de-defunto foram obtidas por semeadura direta nos recipientes de plástico, e três dias após a emergência, foram desbastadas deixando-se apenas duas plantas.

As plantas foram preparadas de tal maneira que estivessem com bom desenvolvimento vegetativo por ocasião da inoculação, que foi feita na mesma data para todas as plantas. Assim, a inoculação foi feita 16 e 14 semanas após o transplante das plantas de café e banana, respectivamente, e uma semana após a emergência das plântulas de gergelim e cravo-de-defunto.

Somente o isolado de *Pratylenchus coffeae* de Marília (PcM) foi utilizado no primeiro experimento, pois as culturas do Rio de Janeiro (PcR) produziram uma quantidade de inóculo extremamente baixa. Esse experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (café, banana, gergelim e cravo-de-defunto) e cinco repetições (sendo cada recipiente uma repetição). O inóculo foi ajustado para 120 nematóides por ml, e cada repetição recebeu 120 PcM, por pipetagem de 1 ml do inóculo em dois furos, com 2,5 cm de profundidade no solo, a cerca de 1 cm do colo

da planta. A inoculação foi feita em ambiente abrigado, à sombra, e as plantas permaneceram nesse ambiente por mais 12 horas, a fim de evitar danos aos nematóides no período pós-inoculação, e posteriormente foram transferidas para casa-de-vegetação, onde permaneceram durante o período experimental. Soluções nutritivas (N15:P15:K20:Ca1,1:Mg4:S0,4 + micronutrientes), inseticidas e acaricidas foram usadas conforme as necessidades das plantas.

Ao final do período experimental (63 dias após a inoculação), os nematóides foram extraídos do sistema radicular e do solo pelos métodos de Coolen & D'Herde (1972) e Jenkins (1964), respectivamente. A reprodução de *P. coffeae* nas plantas testadas foi estimada pelo cálculo da relação Pf/Pi, ou seja, relação entre a população inicial (Pi), no caso 120, e a população final (Pf). A Pf foi estimada pela soma dos nematóides que foram extraídos do sistema radicular e do solo, e posteriormente quantificados sob microscópio óptico, com auxílio de lâmina de Peters.

Os experimentos 2 e 3 foram conduzidos ao mesmo tempo, utilizando ambos os isolados, PcM (experimento 2) e PcR (experimento 3). Devido à impossibilidade de uso do isolado do Rio de Janeiro e ao reduzido inóculo do isolado de Marília no experimento 1, houve necessidade de repeti-lo. As plantas testadas foram as mesmas utilizadas no experimento anterior, com exceção do limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck), incluso devido ao intenso uso desse porta-enxerto nos pomares cítricos do São Paulo. As plantas de limão-cravo utilizadas tinham cerca de 16 meses, obtidas por semeadura em vasos contendo areia lavada e mantidas sob telado de sombrite. Essas plantas foram transplantadas para vasos contendo 450 ml de solo esterilizado com brometo de metila. Devido à dificuldade de obter, em tempo hábil, novas plantas de café e banana, utilizaram-se as que restaram do experimento 1, sendo o gergelim e o cravo-de-defunto, obtidos por semeadura direta em vasos de plástico.

Experimentos 2 e 3 seguiram um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos (café, banana, limão-cravo, gergelim e cravo-de-defunto) e seis repetições (cada vaso representava uma repetição). Esse experimento não foi designado fatorial devido às possíveis diferenças nas taxas reprodutivas entre os isolados, podendo causar dificuldade na interpretação dos resultados. (Tarté et al., 1981).

O inóculo foi ajustado para 500 nematóides por ml, e cada planta recebeu 1.000 nematóides através pipetagem de 1 ml em dois furos com 2,5 cm de profundidade, a 1 cm do colo da planta. As plantas inoculadas foram mantidas em ambiente protegido por 12 horas, e após esse período, foram transferidas para casa-de-vegetação, onde permaneceram por 70 dias. As práticas culturais utilizadas foram as mesmas já citadas no experimento 1.

3.2.3. Experimentos 4 e 5

O experimento 4 foi efetuado concomitante ao experimento 5, com o objetivo de avaliar a reação de dez culturas extensivas para os isolados de Marília (experimento 4) e do Rio de Janeiro (experimento 5) de *P. coffeae*. Foram testadas as seguintes culturas: soja (*Glycines max* Merrill cv. Pintado), algodão (*Gossypium hirsutum* L. cv. Antares), milho (*Pennisetum americanus*), feijão (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Safira), sorgo (*Sorghum vulgare* Pers. cv. IPA-7301011), arroz (*Oryza sativa* L. cv. Primavera), milho (*Zea mays* L. cv. Br-106), amendoim (*Arachis hypogea* L. cv. IAC Tatu), girassol (*Helianthus annuus* L. cv. Morgal-734), mamona (*Ricinus communis* L. cv. Guarani). As plantas padrões utilizadas para comparação foram definidas com base nos resultados dos experimentos 1,2 e 3: café como planta hospedeira favorável e cravo-de-defunto como hospedeira desfavorável para o isolado de Marília, gergelim como hospedeira favorável e o cravo-de-defunto como hospedeira desfavorável para o isolado do Rio de Janeiro. Todavia, o café continuou sendo testado, devido ao baixo número de nematóides obtidos no experimento 3. O limão-cravo foi também incluso, porque as plantas utilizadas nos experimentos 2 e 3 eram velhas, o que pode ter influenciado nos resultados obtidos.

Todas as plântulas, com exceção do café e do limão-cravo foram obtidas por semeadura direta em copo plástico de 500 ml contendo 450 ml de solo esterilizado por brometo de metila (150 ml de CH₄Br/1.000 litros de solo). As plântulas foram desbastadas após a germinação, deixando-se apenas duas por vaso. O limão-cravo e o café foram semeados 13 semanas antes da inoculação, devido ao lento crescimento apresentado por essas plantas. A inoculação foi efetuada conforme mencionado nos experimentos 2 e 3. As plantas foram mantidas durante 70 dias em casa-de-vegetação.

As práticas culturais e avaliações dos experimentos 4 e 5 foram iguais às utilizadas no experimento 1.

No experimento 4, o delineamento foi inteiramente casualizado, com 12 tratamentos (café, cravo-de-defunto, limão-cravo, milho, milheto, arroz, girassol, mamona, algodão, soja, sorgo e amendoim) e quatro repetições (cada vaso representava uma repetição). O delineamento utilizado no experimento 5 foi similar ao 4, com exceção do gergelim, incluso ao mesmo.

3.2.4 Experimentos 6 e 7

Os experimentos 6 e 7 foram conduzidos ao mesmo tempo, de forma similar, com a finalidade de avaliar a reação de dez hortaliças: abóbora (*Curcubita moschata* Duchesne cv. Menina Brasileira), alface (*Lactuca sativa* L. cv. Grandes Lagos), berinjela (*Solanum melongena* L. cv. Embu), cebola (*Allium cepa* L. cv. Baia Piriforme), cebolinha (*Allium fistulosum* L. cv. Todo Ano), cenoura (*Daucus carota* L. cv. Brasília), pimentão (*Capsicum annuum* L. cv. Cascadura Ikeda), quiabo (*Abelmoschus esculentus* Moench cv. Santa Cruz IAC-47), melancia (*Citrullus lanatus* Schrad. cv. Rajada), e melão (*Cucumis melon* L. cv. Valenciano). Além dessas plantas, foram acrescentadas as hospedeiras-padrões: café e cravo-de-defunto, como hospedeiras favoráveis e desfavoráveis, respectivamente, à população de Marília; gergelim e cravo-de-defunto como hospedeiras favoráveis e desfavoráveis, respectivamente, à população do Rio de Janeiro. As plantas de café foram testadas novamente, em relação à população do Rio de Janeiro, para confirmar os resultados anteriores.

As hortaliças usadas no experimento 6 e 7, bem como as plantas padrões, requerem diferentes períodos de germinação e para cada planta existe um período apropriado de inoculação. Nove plantas foram semeadas em caixa: cebola, cebolinha, sete semanas antes da inoculação; alface, berinjela, cenoura e pimentão, cinco semanas antes da inoculação; cravo-de-defunto, gergelim e quiabo, quatro semanas antes da germinação. Essas plantas foram transplantadas para copo plástico, contendo 450 ml de solo esterilizado (duas plantas por copo) duas semanas após a germinação. A melancia, melão e abóbora foram semeadas diretamente nos vasos plásticos uma semana antes da

inoculação, e desbastadas quatro dias antes da inoculação, mantendo-se apenas duas plântulas por vaso. As plantas de café foram transplantadas cinco dias antes da inoculação.

A inoculação foi feita como no experimento 4 e 5, e o período experimental foi de 75 dias. As práticas culturais e avaliações foram semelhantes às efetuadas no experimento 1.

O experimento 6 foi inteiramente casualizado com 12 tratamentos (abóbora, alface, berinjela, cebola, cebolinha, pimentão, quiabo, melancia, café, limão-cravo e cravo-de-defunto) e cinco repetições (cada vaso constituiu uma repetição). O delineamento experimental 6 foi similar ao experimento 7, com exceção do tratamento contendo o gergelim, que não entrou no experimento 6.

3.2.5. Estudos morfológicos e *voucher specimens*

Características da região labial foram visualizadas pela observação de exemplares de cada um dos isolados sob microscópio eletrônico de varredura. Para tanto, decorridos de 45-90 dias após a axenização, os nematóides foram extraídos dos calos pelo método de Baermann modificado para recipiente raso (Southey, 1986), resultando numa suspensão aquosa contendo formas adultas e juvenis de *Pratylenchus coffeae*. Alguns exemplares foram separados em recipientes do tipo BPI (Bureau of Plant Industry) em dez gotas de água esterilizada e fixados com uma solução de glutaraldeído (4 %) em tampão de cacodilato de sódio (0,2 M). O fixativo foi adicionado na razão de uma gota a cada 15 minutos, num total de 10 gotas, de forma que a concentração final fosse de glutaraldeído (2 %) em tampão cacodilato de sódio (0,1 M), evitando-se assim que houvesse choque osmótico e a conseqüente deformação dos nematóides (Eisenback, 1985).

Após a fixação, os nematóides foram transferidos para micropeneiras (Baujard & Pariselle, 1987), onde foram lavados três vezes durante dez minutos com tampão de cacodilato de sódio (0,05 M), e submetidos por uma hora a uma solução de tetróxido de ósmio (1 %) em tampão de cacodilato de sódio (0,05 M). O excesso de ósmio foi

retirado pela lavagem rápida dos espécimes, por três vezes consecutivas, com água destilada.

Concluída a lavagem, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30 %, 50 %, 70 %, 90 % e 100 %), onde permaneceram por dez minutos em cada uma. Na concentração de 100 %, as amostras passaram três vezes consecutivas. Cumprida a desidratação, as amostras foram secas ao ponto crítico, utilizando-se o aparelho CPD 050 (Balzers).

Os nematóides desidratados foram posteriormente transferidos para porta-espécimes de latão (“stub”), e posteriormente metalizados com ouro durante 120 a 180 segundos em metalizador MSD 010 (Balzers). Depois de montados e metalizados, os nematóides foram visualizados em microscópio eletrônico de varredura Zeiss DMS 940A, na tensão de 5 KV, do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA/ESALQ/USP), e as imagens produzidas foram armazenadas em cinco disquetes identificados como PcM/PcR/ESALQ/1999.

Após a avaliação do experimento 2, montaram-se lâminas permanentes, em meio de glicerina, com parte dos nematóides utilizados nas avaliações. Foram utilizados os exemplares obtidos das plantas que permitiram maiores taxa de reprodução para cada um dos isolados (cafeeiro para PcM e gergelim para PcR). Os exemplares foram submetidos à infiltração em glicerina de acordo com o método descrito por Lordello (1965), mantendo-se em estufa 45 °C. As lâminas assim preparadas foram identificadas como PcM/ESALQ/1999 e PcR/ESALQ/1999, para os isolados de Marília e do Rio de Janeiro, respectivamente, e estão depositadas na coleção de Nematologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP, Piracicaba, SP. Os exemplares contidos nessas lâminas, além de servir como *voucher specimens*, foram examinados com o auxílio de microscópio óptico (Leitz), para observação das características de *Pratylenchus* relatadas na literatura (Handoo & Golden, 1989; Loof, 1978; Román & Hirschmann, 1969), com o objetivo de confirmar novamente se ambas as espécies de *Pratylenchus* eram *P. coffeae*. Além disso, tomaram-se as relações utilizadas por Duncan et al. (1999) para separar os isolados de *P. coffeae* e espécies correlatas. Assim, os isolados PcM e PcR foram caracterizados

morfologicamente através das seguintes medidas: 1) comprimento do corpo; 2) posição relativa (em porcentagem) da vulva em relação ao comprimento do corpo (V%); 3) comprimento do estilete (St); 4) comprimento do saco pós-uterino; 5) raiz quadrada de $St \times V\%$.

3.2.6. Análise dos dados

Os resultados de reprodução obtidos (Pf/Pi) foram transformados em $\log(x + 1)$, e esses valores foram submetidos à análise de variância, usando o software SANEST (desenvolvido pelo Departamento de Matemática e Estatística, ESALQ/USP, Piracicaba, SP). As médias Pf/Pi de cada planta foram comparadas entre si pelo teste de Tukey. Essa análise permite comparação entre planta do experimento, e não entre isolados. Todavia, o objetivo desse trabalho foi caracterizar e comparar dois isolados de *Pratylenchus coffeae* através de seus hospedeiros, o que foi possível comparando-se as melhores e piores plantas hospedeiras de cada isolado em cada par de experimentos com a mesma planta, ou seja, experimento 2 e 3, 4 e 5, e 6 e 7.

Os valores morfométricos foram submetidos à análise de variância, sem transformação prévia, e as médias desses valores de um isolado foram comparadas com as médias do outro.

3.3 Resultados

3.3.1. Testes de hospedeiros

A taxa reprodutiva (Pf/Pi) do isolado de Marília foi significativamente maior em cafeeiro que em bananeira e em cravo-de-defunto, e a reprodução em gergelim não diferiu dessas plantas no experimento 1 (Figura 1).

Figura 1. Taxa reprodutiva (Pf/Pi) do isolado de Marília de *Pratylenchus coffeae* em cafeeiro, gergelim, banana e cravo-de-defunto, 63 dias após a inoculação (experimento 1). As colunas representam a média de cinco repetições. Diferentes letras indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Resultados similares foram obtidos no experimento 2 em relação ao isolado de Marília, exceto para o limão-cravo, que não foi testado no experimento 1. Essa planta mostrou-se uma hospedeira desfavorável tanto do isolado de Marília como do Rio de Janeiro, não diferindo da banana e do cravo-de-defunto (Figura 2).

Figura 2. Taxa reprodutiva (P_f/P_i) do isolado de Marília (experimento 2) e do isolado do Rio de Janeiro (experimento 3) de *Pratylenchus coffeae* em café, gergelim, limão-cravo, banana e cravo-de-defunto, 70 dias após a inoculação. As colunas representam as médias de cinco repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A bananeira é considerada uma planta hospedeira muito favorável de *P. coffeae* (Almeida et al., 1978; Das & Das, 1986; Duncan & Cohn, 1990; Gowen & Quénehervé, 1990; Prates & Lordello, 1980) e era esperado que, estatisticamente, estivesse mais próxima do cafeeiro de que do cravo-de-defunto, uma planta praticamente imune a esse nematóide. A baixa taxa reprodutiva de PcM nessa cultura e no limão-cravo, outra planta considerada favorável a *P. coffeae*, mostra que os isolados do nematóide em questão apresentam comportamento muito diferente do esperado em relação às plantas hospedeiras. A reprodução de PcM foi mais alta no café do que no gergelim no experimento 2, mas não no experimento 1. Assim, o café foi escolhido como planta padrão favorável para a população de Marília, apesar das baixas taxas reprodutivas ($Pf/Pi = 2,34$ e $1,64$). O isolado de Marília não reproduziu na planta de cravo-de-defunto, que foi escolhida como planta padrão desfavorável, para fins comparativos nos demais experimentos.

O gergelim é considerado uma planta hospedeira desfavorável à *P. coffeae* (Das & Das, 1986), mas permitiu aumento populacional de PcR quatro vezes acima do valor inoculado, no experimento 3. O café, a banana e o limão-cravo são consideradas, segundo a literatura, boas hospedeiras de *P. coffeae*, mas reduziram a população do isolado do Rio de Janeiro. Portanto, o gergelim foi escolhido como planta padrão favorável para PcR para os demais experimentos. O café, banana e limão-cravo não diferiram do cravo-de-defunto, que é uma planta imune a esse nematóide, segundo a literatura. Devido à facilidade de obtenção de plantas de cravo-de-defunto, esse foi escolhido como planta padrão desfavorável para ambos os isolados, nos demais experimentos.

A reprodução de PcM foi baixa em café no experimento 4 ($Pf/Pi = 1,1$), confirmando os resultados dos experimentos 1 e 2 (Figura 3). Tal resultado é bastante interessante, uma vez que esse isolado foi obtido de raízes de cafeeiro. As gramíneas testadas (sorgo, milho, arroz e milheto) foram excelentes hospedeiras de PcM no experimento 4, aumentando de 3,5 a 6,3 a população inicial (Pi) do nematóide, permitindo uma reprodução significativamente mais alta que no café. Amendoim, cravo-

Figura 3. Taxa reprodutiva (Pf/Pi) do isolado de Marília (experimento 4) e do isolado do Rio de Janeiro (experimento 5) de *Pratylenchus coffeae* em dez culturas extensivas e nas plantas padrões, 70 dias após a inoculação. As colunas representam as médias de quatro repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

-de-defunto, girassol, limão-cravo, algodão e feijoeiro foram aquelas que apresentaram menor taxa de reprodução para PcM, e não diferiram entre si. A reprodução de PcM em soja e mamona não diferiu do café.

As maiores taxas de reprodução de PcR foram verificadas em gergelim, soja, sorgo e mamona, no experimento 5 (Figura 3). Cravo-de-defunto, girassol, limão-cravo, algodão, feijão e milheto comportaram-se como hospedeiras desfavoráveis de PcR, não

apresentando diferença significativa entre si. O arroz apresentou reação intermediária, apresentando menor taxa reprodutiva que o gergelim, porém mais alta que a verificada em cravo-de-defunto. A taxa reprodutiva de PcR nas gramíneas, com exceção do sorgo, foi baixa, diferentemente do observado para PcM. Portanto algumas gramíneas podem ser utilizadas para diferenciar esses isolados através de teste de hospedeiros, destacando-se o milho e o milheto, que são boas hospedeiras de PcM e más hospedeiras de PcR. É ainda importante destacar a importância prática desses resultados, pois milho e milheto podem ser utilizados para controle de PcR através de rotação, mas em uma área com PcM elevariam a sua população. Algodão, girassol e amendoim, além do cravo-de-defunto, causariam redução populacional de ambos os isolados.

As plantas que apresentaram maiores fatores reprodutivos para PcM entre as hortaliças foram alface, berinjela, melão e quiabo, aumentando 3,5 a 6,3 vezes a população inicial do nematóide, sendo esses valores significativamente maiores que os do cafeeiro (Figura 4). Como nos experimentos anteriores, a taxa reprodutiva nas plantas de café foi baixa ($P_i/P_f = 1,0$). A abóbora e o pimentão não diferiram estatisticamente do quiabo e do café, porém a reprodução foi bem mais alta que a verificada no cravo-de-defunto. Não houve diferença significativa entre as taxas reprodutivas de PcM em cravo-de-defunto, cebola, cebolinha, café e melancia.

Figura 4. Taxa reprodutiva (Pf/Pi) do isolado de Marília (experimento 6) e do isolado do Rio de Janeiro (experimento 7) de *Pratylenchus coffeae* em nove hortaliças e nas plantas padrões, 75 dias após a inoculação. As colunas representam as médias de cinco repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A melancia foi a única planta testada no presente trabalho que permitiu uma reprodução de PcR maior que o gergelim (Figura 4). Outras plantas que podem ser consideradas boas hospedeiras de PcR são abóbora, berinjela e melão, não diferindo do gergelim, planta padrão favorável. Cravo-de-defunto, cebola, pimentão, café, alface, cebolinha e quiabo apresentaram baixas taxas reprodutivas, não se verificando diferenças significativas entre elas. Comparando os resultados obtidos nos experimentos

6 e 7, verificam-se diferenças conspícuas entre os dois isolados, as quais podem ser evidenciadas principalmente no quiabo, alface e pimentão. Essas plantas são boas hospedeiras de PcM e más hospedeiras de PcR. Dentre as hortaliças testadas, melancia é a melhor hospedeira de PcR, mas é a pior de PcM. Isso demonstra que *P. coffeae* é composto de populações muito distintas, dificultando a adoção de medidas de controle através da rotação de culturas, a menos que se conheçam as características da população presente em determinada área.

3.3.2 Estudos morfológicos

Machos foram abundantes tanto no isolado PcM como no PcR. Os resultados das medições realizadas estão nas Tabelas 1 e 2, e demonstram que os isolados podem ser diferenciados tendo por base as medidas tomadas para as fêmeas [comprimento do corpo (L), posição relativa da vulva em relação ao comprimento do corpo (V%), comprimento do estilete (St), comprimento do saco pós-uterino (PUB) e raiz quadrada do produto entre St e V% ($\sqrt{St \times V}$)] e para os machos [comprimento do corpo (L) e comprimento do estilete (St)]. As medidas obtidas concordam com aquelas feitas por Duncan et al. (1999) para os mesmos isolados.

As características da região labial das fêmeas observada ao microscópio de varredura estão na Figura 1.

Figura 1. Região labial das fêmeas dos dois isolados de *P. coffeae*: isolado de Marília (direita) e do Rio de Janeiro (esquerda). As micrografias foram obtidas utilizando microscópio de varredura, nos aumentos de 10.000 e 3.000 vezes, respectivamente.

Ambos os isolados apresentaram o primeiro anel labial indiviso, conforme já havia sido verificado por Duncan et al. (1999). Convém destacar que a quase totalidade dos isolados coletados pelos citados autores também apresenta o primeiro anel labial indiviso, mas que o neótipo de *P. coffeae* designado por Sher & Allen (1953), segundo Duncan et al. (1999), apresenta o primeiro anel labial segmentado.

Tabela 1- Medidas de fêmeas dos isolados de Marília (PcM) e do Rio de Janeiro (PcR) *Pratylenchus coffeae*: comprimento do corpo (L), posição relativa da vulva em relação ao comprimento do corpo (V%), comprimento do estilete (St), comprimento do saco pós-uterino (PUB) e raiz quadrada do produto entre St e V% ($\sqrt{[St \times V]}$).

Isolado	L	V%	St	PUB	$\sqrt{(St \times V)}$
PcM	448 a (n = 23)	77,8 a (n = 20)	14,5 a (n = 17)	22,5 a (n = 20)	33,66 a (n = 15)
PcR	575 b (n = 27)	79,2 b (n = 23)	16,3 b (n = 25)	35,9 b (n = 23)	35,90 b (n = 22)

Diferentes letras entre os isolados indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 2- Medidas de machos dos isolados de Marília (PcM) e do Rio de Janeiro (PcR) *Pratylenchus coffeae*: comprimento do corpo (L) e comprimento do estilete (St).

Isolado	L	St
PcM	429 a (n = 27)	14,2 a (n = 23)
PcR	510 b (n = 27)	15,5 b (n = 23)

Diferentes letras entre os isolados indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.4 Discussão

Os resultados demonstraram que o isolado de Marília de *P. coffeae* pode ser diferenciado do isolado do Rio de Janeiro através de seus hospedeiros. Milho, arroz, milheto, quiabo, alface e pimentão são bons hospedeiros do isolado de Marília, porém maus hospedeiros do isolado do Rio de Janeiro. Em contraste, o gergelim é uma planta boa hospedeira para PcR, porém má hospedeira para PcM. Além dessas diferenças, os isolados diferem em alguns caracteres morfológicos. Portanto, apesar de ambos os isolados testados serem considerados *P. coffeae* segundo os conceitos atualmente vigentes, que são baseados em características morfológicas, há importantes diferenças biológicas (plantas hospedeiras) e mesmo morfológicas entre eles. As diferenças morfológicas já haviam sido apontadas por Duncan et al. (1999). Nesse mesmo trabalho, dois isolados coletados de raízes de citros em São Paulo (C₁ e C₂) são considerados semelhantes a PcM (K₅ nesse trabalho) com base em caracteres morfológicos, e significativamente diferentes da maioria dos isolados de *P. coffeae* coletados em outras partes do mundo, e talvez constituam uma espécie diferente ainda não descrita. Os presentes resultados mostram que essa semelhança morfológica entre os isolados de citros e PcM não têm correspondência em termos biológicos, pois PcM teve sua população reduzida a quase zero todas as vezes que foi inoculada em limoeiro-cravo. Além disso, segundo Duncan (comunicação pessoal), tanto C₁ como C₂ reproduzem-se abundantemente em plantas cítricas, em testes em casa-de-vegetação.

Ainda tendo em vista os resultados obtidos com limoeiro-cravo, pode-se dizer que tanto PcM como PcR diferem significativamente da maioria das populações de *P. coffeae*, pois as plantas cítricas são consideradas boas hospedeiras desse nematóide. Tal conclusão é reforçada pelos resultados obtidos com bananeira, outra planta considerada boa hospedeira de *P. coffeae*, mas que se mostrou imune aos isolados de Marília e do Rio de Janeiro. Em suma, PcM e PcR constituem grupos biológicos diferentes entre si, sendo também diferentes da maioria das populações de *P. coffeae*. Evidentemente isso não é suficiente para caracterizar esses isolados como pertencentes a espécies ainda não descritas, mas deixa claro que em vários aspectos práticos, principalmente em relação aos métodos de controle, devem ser tratados de maneira particular. Nesse sentido, os

resultados aqui obtidos também fornecem opções de plantas para o controle desses isolados através de rotação de culturas.

A reprodução de *P. coffeae* foi baixa em café. Mesmo o isolado PcM, obtido de raízes de café e associado a sintomas de escurecimento de tecidos, não se reproduziu bem nessa planta (Pf/Pi variou de 1,0 a 2,3 em quatro experimentos). Apenas no experimento 1 a taxa reprodutiva de PcM atingiu em valor acima de 2, provavelmente porque apenas 120 nematóides foram inoculados por planta, havendo assim mais tecido disponível para cada nematóide. A baixa taxa reprodutiva de PcM em café nos experimentos 4 e 6 não pode ser atribuída à baixa infectividade do inóculo usado, pois em várias plantas o nematóide atingiu níveis populacionais muito mais elevados: sorgo (Pf/Pi = 6,3), milho (4,1), quiabo (6,2) e melão (4,6). Em experimentos anteriores, outro isolado de *P. coffeae* coletado no estado de São Paulo, em raízes de inhame (*Colocasia esculenta* Schott), e denominado M₁ por Duncan et al. (1999), reduziu significativamente o crescimento de plântulas de café cv. Catuaí. Entretanto, a taxa reprodutiva foi relativamente baixa na fase inicial do experimento (Pf/Pi = 0,3 após 70 dias da inoculação), havendo um considerável aumento posteriormente (Pf/Pi = 14,0 após 140 dias da inoculação) (Inomoto et al. 1998). Portanto, é provável que, da mesma maneira que no caso do isolado do inhame, PcM reproduza-se muito lentamente em café, mas depois de alguns anos atinja um nível populacional capaz de causar danos à cultura.

3.5 Conclusões

Duncan et al. (1999) propuseram uma mudança no padrão taxonômico adotado para *P. coffeae*, considerando as características morfológicas e moleculares. Estudos de compatibilidade reprodutiva entre os isolados de *P. coffeae* e outros estudos biológicos (testes de hospedeiros) parecem ser necessários para concluir esse trabalho. O presente trabalho demonstrou que há conspícuas diferenças biológicas (em relação aos hospedeiros) e mesmo morfológicas entre dois isolados de *P. coffeae* coletados no Brasil. Em relação aos hospedeiros, além de diferentes entre si, esses isolados (PcM e PcR) apresentam importantes diferenças em relação à maioria das populações de *P. coffeae* conhecidas.

4 EFEITO DE DOIS ISOLADOS DE *Pratylenchus coffeae* NO CRESCIMENTO DE CAFEEIRO CV. MUNDO NOVO

Resumo

O nematóide das lesões radiculares, *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann, 1898), é um importante patógeno do cafeeiro e outras culturas, como bananeira, citros, cará, graviola e batata. Estudos anteriores mostraram que dois isolados de *P. coffeae* coletados no Brasil, um de cafeeiro (de Marília/SP) e outro da ornamental *Aglaonema* sp. (do Rio de Janeiro/RJ), podem ser diferenciadas pelos seus hospedeiros. Nenhum dos dois isolados multiplicaram em abundância em cafeeiro. Com o objetivo de verificar a patogenicidade dos nematóides do isolado de Marília e Rio de Janeiro, foi feito um experimento utilizando plântulas de cafeeiro cv. Mundo Novo (com dois pares de folhas verdadeiras) que receberam 8.000 nematóides. A avaliação foi efetuada em duas etapas, sendo a primeira aos 160 dias após a inoculação, e a segunda 261 dias após a inoculação. Os dois isolados causaram escurecimento das raízes e reduziram o peso fresco destas e peso seco da parte aérea. O isolado de Marília foi mais agressivo que o isolado do Rio de Janeiro. Clorose foliar e menor desenvolvimento da parte aérea também foram mais evidentes nos cafeeiros infestados com o isolado de Marília. A reprodução de ambos os isolados foi baixa, mostrando que o cafeeiro não é um bom hospedeiro, devido à alta sensibilidade das raízes, que foram intensa e imediatamente danificadas por ambos.

Summary

The coffee lesion nematode, *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann, 1898), is highly injurious to coffee and other crops, such as banana, citrus, yam, sour sop and potato. Previous studies shown that two isolates of *P. coffeae*, collected from coffee roots (in Marília, São Paulo) and *Aglaonema* roots (in Rio de Janeiro City) can be characterized from their host ranges. No one of the isolates seems to reproduce a lot on coffee. The aim of this study was test the pathogenicity of Marília and Rio de Janeiro isolates to coffee. Seedlings of coffee cv. Mundo Novo with two pairs of leaves were each infected with 8,000 nematodes and maintained in a greenhouse. The evaluations were conducted 160 and 261 days after the inoculation. The two isolates of caused browning and reduced growth of coffee roots, but the Marília isolate was more destructive than Rio de Janeiro isolate. Foliar chlorose and shoot growth reduction was also more evident in coffee plants inoculated with the some isolate. The reproduction of both isolates on coffee was very low, indicating that it is a poor host for both isolates, because of the exceeding sensitivity of the roots, which were drastically and quickly damaged.

4.1 Introdução

O nematóide das lesões radiculares, *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann, 1898), foi descrito pela primeira vez na Indonésia em raízes de *Coffea arabica* L., e atualmente é um dos principais patógenos do cafeeiro em Barbados, Congo, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Índia, Jamaica, República Malgaxe, Malásia, Martinica e Filipinas (Campos et al. 1990; Schieber & Grullon, 1969; Whitehead, 1968). Esse nematóide é também altamente patogênico à bananeira, principalmente na África, e às planta cítricas, nos E.U.A., Índia, África do Sul e Taiwan (Duncan & Cohn, 1990; Gowen & Quénehervé, 1990). Seu primeiro registro no Brasil foi feito provavelmente por Rahm (1928), em raízes de cafeeiro provenientes de Lins, Palmital e São Paulo, SP. Embora os desenhos feitos pelo autor sobre o material examinado não permitam afirmar que se tratava realmente de *P. coffeae*. Posteriormente, foi registrado em Marília/SP, por Monteiro & Lordello (1974). No Brasil, os danos causados por esse nematóide à cultura do cafeeiro parecem estar restritos a

poucas áreas produtoras, sendo *P. brachyurus* muito mais freqüente (Gonçalves et al., 1978; Kubo¹). Essa situação deveria ser mantida, utilizando substrato desinfestado para produção de mudas de café. Porém quase nada tem sido feito no Brasil para evitar a disseminação desse nematóide, porque os esforços técnicos têm se concentrado exclusivamente em outros nematóides parasitos do cafeeiro.

Estudos recentes mostraram que há importantes diferenças entre os isolados de *P. coffeae* de diferentes partes do mundo, e estudos mais minuciosos poderiam levar à descrição de novas espécies a partir desses isolados (Duncan et al., 1999). Seis desses isolados foram coletados no Brasil. Dois deles, um de raízes de cafeeiro em Marília/SP e outro de raízes de *Aglaonema* sp. (ornamental da família Araceae), no Rio de Janeiro/RJ, foram multiplicados em laboratório e utilizados em testes de hospedeiros (Silva & Inomoto, 2000). Esses estudos mostraram que citros (limoeiro-cravo) e bananeira são hospedeiros desfavoráveis a ambos os isolados, e o cafeeiro é desfavorável ao isolado do Rio de Janeiro. Apesar de sua origem, o isolado de Marília reproduziu-se mais intensamente em sorgo, milho, arroz, milheto, quiabo, melão, berinjela e alface que em cafeeiro. Considerando esses resultados, julgou-se necessário definir a importância desses isolados de *P. coffeae* como patógenos do cafeeiro. Assim, o seguinte experimento foi realizado com o objetivo de estudar o efeito desses isolados de *P. coffeae* no crescimento de cafeeiro cv. Mundo Novo.

¹KUBO, R.K. (Centro Experimental do Instituto Biológico, Campinas, SP.). Comunicação pessoal, 2000.

4.2 Material e Métodos

Os isolados de *P. coffeae* utilizados neste estudo foram coletados raízes de cafeeiro em Marília/SP e de *Aglaonema* sp. no Rio de Janeiro/RJ. O local escolhido para coleta do primeiro isolado foi o mesmo onde *P. coffeae* foi relatado pela primeira vez no Brasil (Monteiro & Lordello, 1974). As raízes de ambas as plantas mostravam sintomas típicos de pratilencoses, ou seja, necroses nos tecidos corticais.

Os nematóides foram extraídos das raízes e do solo pelos métodos de Coolen & D'Herde (1972) e Jenkins (1964), respectivamente. Os nematóides vivos foram separados dos mortos através do funil de Baermann modificado para recipiente raso (Southey, 1986). Foram feitas as observações sob microscópio estereoscópio. Parte dos nematóides foram mortos pelo calor (55°C) para efetuar a montagem de lâminas temporárias em formalina a 2%. As características morfológicas de *Pratylenchus* apontadas na literatura (Handoo & Golden, 1989; Loof, 1978; Román & Hirschmann, 1969) foram observadas com o objetivo de confirmar a identidade da espécie. Além disso, alguns exemplares foram enviados ao Dr. Larry Duncan (Universidade da Flórida), para ser usado em um estudo sobre relações filogenéticas entre vários isolados de *P. coffeae* de muitos países. Os isolados foram nomeados K₅ (isolado de Marília) e M₂ (isolado do Rio de Janeiro), colocando-os em dois grupos distintos (Duncan et al., 1999).

Para a multiplicação desses isolados em laboratório, fêmeas grávidas foram esterilizadas superficialmente em ampicilina a 1% e transferidas para recipientes de vidros contendo calos de alfafa, produzidos segundo método proposto por Riedel et al. (1973). Em cada recipiente foi colocada uma fêmea grávida. No total, 30 fêmeas do isolado de Marília e 15 do isolado do Rio de Janeiro foram utilizadas para formar culturas puras desses isolados.

Os isolados de *P. coffeae* foram mantidos em calos de alfafa por repicagens periódicas. Para obtenção do inóculo, os nematóides foram extraídos de calos com 45–90 dias pelo método de Baermann modificados para recipiente raso (Southey, 1986). Esse material resultou em uma suspensão aquosa contendo adultos e juvenis de *Pratylenchus coffeae*.

Plântulas de café (*C. arabica* cv. Mundo Novo), no estágio orelha-de-onça [quando estavam com os dois cotilédones expandidos (Wellman, 1961)], obtidas a partir de sementes germinadas em caixas de plástico contendo areia, foram transplantadas para copos de plástico (uma planta por vaso) contendo 450 ml de solo esterilizado com brometo de metila (150 ml de CH_3Br / 1.000 litros de solo). As plântulas foram mantidas em casa-de-vegetação, e quando apresentavam dois pares de folhas verdadeiras (49 dias após o transplante), efetuou-se a inoculação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos: plantas sem nematóides, plantas inoculadas com nematóides do isolado de Marília (PcM) e plantas inoculadas com nematóides do isolado do Rio de Janeiro (PcR). Cada tratamento era composto por 28 repetições. O inóculo foi ajustado para 4.000 nematóides por ml. Cada repetição recebeu 8.000 nematóides contidos em dois ml da suspensão, em dois orifícios no solo, próximo das plantas. As plantas testemunhas receberam água destilada. Essas plantas foram mantidas na sombra 12 horas após a inoculação, para evitar que a insolação causasse danos aos nematóides. Após esse período, elas foram transferidas para casa-de-vegetação, onde permaneceram até o final do experimento. Solução nutritiva (N15:P15:K20:Ca1,1:Mg4:S0,4 + micronutrientes), inseticidas e acaricidas foram utilizados, conforme as necessidades das plantas.

Aos 160 dias após a inoculação, efetuou-se a primeira avaliação, verificou-se o efeito dos isolados de *P. coffeae* no crescimento das planta de café. Três variáveis foram utilizadas: altura das plantas (todas as repetições), peso fresco das raízes (metade das repetições) e peso seco da parte aérea (metade das repetições). Não foi possível fazer a avaliação de todas as parcelas experimentais, pois oito plantas inoculadas com nematóides do isolado de Marília e uma inoculada com nematóides do isolado do Rio de Janeiro haviam morrido antes do final do período experimental, provavelmente devido ao dano causado pelos nematóides às raízes. A reprodução dos isolados foi avaliada com base na taxa reprodutiva ($\text{TR} = \text{Pf}/\text{Pi}$), onde Pf é o número final de nematóides, ou seja, o total de nematóides extraídos das raízes e do solo no final do período experimental. Pi é o número total de nematóides inoculados (8.000 nematóides). Os nematóides foram

extraídos do sistema radicular e do solo pelo método de Coolen & D'Herde (1972) e Jenkins (1964), respectivamente.

Onze plantas testemunhas, doze plantas com PcR e dez plantas com PcM não foram incluídas na primeira avaliação. Elas foram transferidas para recipientes plásticos maiores, contendo 1.250 ml de solo esterilizado, para que fosse feita mais tarde outra avaliação do efeito dos isolados nas plantas de café. Estas foram mantidas em casa-de-vegetação por mais 101 dias, ou seja, 261 dias após a inoculação, quando foi feita a segunda avaliação. Efetuada da mesma forma já citada anteriormente. Uma planta de café que recebeu nematóides do isolado de Marília havia morrido ao final desse período.

Os dados de crescimento obtidos, altura das plantas, peso fresco de raiz e peso seco da parte aérea, foram analisados sem transformação, usando o software SANEST, desenvolvido pelo Departamento de Matemática e estatística da ESALQ/USP, Piracicaba/SP. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey. Os dados da reprodução de PcM e PcR foram comparados pelo teste de Wilcoxon (Campos, 1983).

4.3 Resultados e Discussão

Ambos os isolados de *P. coffeae* causaram intensa destruição às raízes de cafeeiro cv. Mundo Novo. As raízes das plantas que receberam nematóide do isolado de PcR apresentavam escurecimento das raízes secundárias, principalmente próximo à raiz principal. Essas plantas apresentaram menor quantidade de raízes secundárias que as plantas testemunha (sem nematóides). O efeito de PcM foi mais drástico ainda. A raiz principal das plantas, com PcM foi quase totalmente destruída, restando apenas a parte proximal, onde originaram as poucas raízes secundárias ainda vivas. Várias plantas morreram (oito que receberam PcM e uma que recebeu PcR durante o primeiro período experimental, e uma que recebeu PcM no segundo), provavelmente devido aos danos causados pelos nematóides às raízes. As plantas que não morreram eram visivelmente menores que as testemunhas, e freqüentemente apresentavam folhas cloróticas. Apesar desses danos, as populações dos isolados diminuíram durante o experimento (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Efeito do isolado de Marília (PcM) e do isolado do Rio de Janeiro (PcR) de *Pratylenchus coffeae* sobre o crescimento de cafeeiro cv. Mundo Novo, e taxa reprodutiva (Pf/Pi) desses isolados (primeira avaliação, 160 dias após a inoculação).

Tratamento	Altura das plantas (cm) ^{1,4}	Peso fresco das raízes (g) ^{2,4}	Peso seco da parte aérea (g) ^{2,4}	Pf/Pi ^{3,5}
PcM	8,4 a	0,6 a	0,2 a	0,37 b
PcR	9,9 b	1,7 b	0,5 b	0,11 a
Testemunha	17,9 c	3,8 b	1,6 c	-

¹Médias de 20 plantas inoculadas com PcM, 27 plantas inoculadas com PcR e 28 plantas testemunhas. ²Médias de 10 plantas inoculadas com PcM, 15 inoculadas com PcR e 17 plantas testemunhas. ³Médias de 8 plantas. ⁴Letras diferentes nas colunas indica diferença significativa através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ⁴Diferentes letras indicam diferença significativa pelo teste de Wilcoxon ($p \leq 0,05$).

Tabela 2 – Efeito do isolado de Marília (PcM) e do isolado do Rio de Janeiro (PcR) de *Pratylenchus coffeae* sobre crescimento de cafeeiro cv. Mundo Novo, e taxa reprodutiva (Pf/Pi) desses isolados (avaliação final, 261 dias após a inoculação).

Tratamento	Altura das plantas (cm) ¹	Peso fresco das raízes (g) ¹	Peso seco da parte aérea (g) ¹	Pf/Pi ²
PcM	11,1 a	2,1 a	0,7 a	0,43 b
PcR	22,9 b	9,0 b	2,9 b	0,06 a
Testemunha	40,9 c	27,4 c	10,5 c	-

¹Médias de 9 plantas inoculadas com PcM, 12 inoculadas com PcR e 11 plantas testemunhas; letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ²Médias de 6 repetições; letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Wilcoxon ($p \leq 0,042$).

Silva & Inomoto (2000) concluíram que o cafeeiro não é um bom hospedeiro de PcM e PcR, tendo em vista a baixa reprodução desses isolados nesta planta, em relação a outras. No entanto, não era esperada redução populacional dos isolados de *P. coffeae* em cafeeiro cv. Mundo Novo, pelo menos no caso de PcM, pois esse isolado foi coletado de raízes de cafeeiro e multiplicou-se ligeiramente dois meses após a inoculação, segundo Silva & Inomoto (2000). Isso aconteceu provavelmente porque os isolados utilizados, principalmente o PcM, são extremamente patogênicos a essa planta. Além disso, provavelmente a população inicial utilizada tenha sido muita elevada, tendo em vista o estágio de desenvolvimento das plantas resultando em rápida diminuição dos sítios de alimentação para um número excessivo de nematóides.

A extensa necrose causada por de *P. coffeae*, principalmente PcM, também não era um resultado esperado, pois em dois trabalhos anteriores, necrose radicular não foi observada em raízes de cafeeiros inoculados com esse nematóide. No primeiro deles, realizado na Costa Rica, o crescimento das raízes e da parte aérea de plântulas de

cafeeiro cv. Bourbon foi reduzido por um isolado local de *P. coffeae*, mas necrose radicular não foi observada (Salas & Echandi, 1961). No outro, realizado no Brasil, um isolado de *P. coffeae* de inhame (*Colocasia esculenta* Schott, nomeado M₁ por Duncan et al., 1999), causou redução do sistema radicular e diminuição do tamanho das plantas de café cv. Mundo Novo, porém necroses radiculares não foram verificadas (Inomoto et al 1998). Nesse último, a hipótese levantada para a ausência de necroses nas raízes foi que esse sintoma, característico em condições de campo, deve ser causado pela associação entre *P. coffeae* e fungos ou bactérias oportunistas do solo. Os presentes resultados indicam que PcM e PcR são mais patogênicos ao cafeeiro que os isolados utilizados nos trabalhos acima citados, embora o efeito de altas densidades populacionais como as utilizadas neste trabalho deva ser levado também em conta. Em suma, pode-se concluir que altas densidades populacionais de certos isolados de *P. coffeae* podem, sozinhos, causar extensas e visíveis necroses em raízes de cafeeiro.

Uma importante consideração de ordem prática é que, em condições de campo, dificilmente encontramos uma população tão alta quanto à utilizada no presente experimento, porém como o cafeeiro é uma planta perene, após alguns meses ou anos mesmo a baixa população de PcM ou PcR poderá aumentar e causar danos semelhantes aos descritos neste trabalho.

4.4 Conclusões

A intensidade do dano causado por *P. coffeae* depende do isolado e provavelmente também da população inicial do nematóide. Apesar de reproduzirem-se a taxas baixas, alguns isolados desse nematóide são extremamente patogênicos ao cafeeiro, causando extensas necroses radiculares em curto espaço de tempo. Os sintomas na parte aérea são clorose foliar e diminuição do crescimento.

5 CONCLUSÕES GERAIS

No Brasil, existem populações de *Pratylenchus coffeae* que apresentam importantes diferenças entre si e em relação à maioria das populações desse nematóide. Os dois isolados de *P. coffeae* testados no presente trabalho podem ser caracterizados como pertencentes a populações diferentes entre si, devido a diferenças em sua morfologia e em seus hospedeiros. Além disso, a reação de algumas plantas hospedeiras, como banana e citros, permite caracteriza-los como muito diferentes da maioria das populações de *P. coffeae* que ocorrem no mundo e mesmo no Brasil.

Apesar de reproduzirem pouco em cafeeiro, esses dois isolados são extremamente patogênicos a essa planta, principalmente o isolado de Marília.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, R.T.; LANDIM, C.M.U.; CARATELLI, A. Ocorrência de *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann, 1898) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 em *Musa cavendishii* Lamb. no Estado do Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 3, n. 3, p. 295-299, 1978.
- BALA, G.; HOSEIN, F. Plant-parasitic nematode associated with anthurium and other tropical ornamentals. **Nematropica**, v. 26, n. 1, p. 9-14, 1996.
- BAULARD, P; PARISELLE, A. Fabrication de microtamis et préparation des nématodes pour l'observation au microscope électronique à balayage. **Revue de Nématologie**, v.10, n.10, p.477-481, 1987.
- CAFÉ FILHO, A.C.; HUANG, C.S. Nematóides do gênero *Pratylenchus* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 13, n. 3, p. 232-235, 1988.
- CAMPOS, H. de. **Estatística experimental não-paramétrica**. Piracicaba: ESALQ, 1983. 349p.
- CAMPOS, V.P.; SIVAPALAN, P.; GNANAPRAGASAM, N.C. Nematode parasite of coffee, cocoa and tea. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Ed.) **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CAB International, 1990, p. 387-430.

- COOLEN, W.A.; D'HERDE, C.J. **A method for the quantitative extraction of plant nematodes from plant tissue**. Ghent: State Nematology and Entomology Research Station, 1972. p. 77p.
- COSTA-MANSO, E.S.B.G.; TENENTE, R.C.V.; FERRAZ, L.C.C.B.; OLIVEIRA, R.S.; MESQUITA, R. **Catálogo de nematóides fitoparasitos encontrados associados a diferentes tipos de plantas no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, SPI, CENARGEM, 1994. 488 p.
- CURI, S.M.; SILVEIRA, S.G.P.; MIRANDA, H.; VIVARELLI, J.B. *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann, 1898) Filipjev e Schuurmans Stekhoven, 1941 em batata no estado de São Paulo. **Nematologia Brasileira**, v. 14, p. 143-145, 1990.
- DAS, S.; DAS, S.N. Host-range of *Pratylenchus coffeae*. **Indian Journal of Nematology**, v. 16, n. 2, p. 180-184, 1986.
- DUNCAN, L.W.; COHN, E. Nematode parasites of citrus. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Ed.) **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CAB International, 1990. p. 321-346.
- DUNCAN, L. W.; INSERRA, R. N.; THOMAS, W. K.; DUNN, D. MUSTIKA, I. FRISSE, L. M.; MENDES, M. L.; MORRIS, K.; KAPLAN, D. T. Molecular and morphological analyses of isolates of *Pratylenchus coffeae* and closely related species **Nematropica**, v. 29, n. 1, p.61-80, 1999
- EDWARDS, D.I.; WEHUNT, E.J. Hosts of *Pratylenchus coffeae* with additions from Central American banana-producing areas. **Plant Disease Reporter**, v. 57, n. 1, p. 47-50, 1973.

- EISENBACK, J.D. Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. In: BARKER, K.R.; CARTER, C.C.; SASSER, J.N. (Ed.) **An advanced treatise on *Meloidogyne***: Methodology. Raleigh, NC, USA: IPM, 1985. cap.6, p.79-105.
- FERRAZ, L.C.C.B. Doenças causadas por nematóides em batata-doce, beterraba, gengibre e inhame, **Informe Agropecuário**, v. 17, n. 182, p. 31-38, 1995.
- GONÇALVES, W., TOMAZIELLO, R.A., MORAES, M.V., FERNANDES, J.A.R., COSTA, A. M., CORSI, T., JUNQUEIRA, C.A., & LACERDA, L.A.O. Estimativas de danos ocasionados pelos nematóides do cafeeiro. VI Congresso de Pesquisa Cafeeira, Ribeirão Preto, SP, 1978. pp. 182-186.
- GONÇALVES, W. Reações de cafeeiros (*Coffea* spp.) a *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887 e a diferentes populações de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949. Piracicaba, 1993. 110p. Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- GOWEN, S.; QUÉNÉHERVÉ, P. Nematode parasites of root and abaca. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Ed) **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CAB International, 1990. p. 431-460.
- HANDOO, Z. A.; GOLDEN, M. A. A key and diagnostic compendium to the species of the genus *Pratylenchus* Filipjev. **Journal of Nematology**, v. 21, n. 2, p. 202-218, 1989.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ. **Cultura do café no Brasil**: manual de recomendações. 5.ed. Rio de Janeiro:IBC,GERCA,1985. 580p.

- INOMOTO, M.M.; OLIVEIRA, C.M.G.; MAZZAFERA, P.; GONÇALVES, W. Effects of *Pratylenchus brachyurus* and *P. coffeae* in seedlings of *Coffea arabica*. **Journal of Nematology**, v.30, p.362-367, 1998.
- JATALA, P.; BRIDGE, J. Nematode parasites of root and tuber crops. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Ed) **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CAB International, 1990. p. 137-180.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v. 48, n. 9, p. 692, 1964
- KUMAR, A.C.; SAMUEL, S.D. Nematodes attacking coffee and their management a review. **Journal of Coffee Research**, v. 20, n. 1, p. 1-27, 1990.
- LOOF, P.A.A. **The genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Pratylenchida): a review its anatomy, morphology, distribution, systematic and identification**. Uppsala: Univ. Agric. Sci. Res. Information Centre, 1978. 50p
- LORDELLO, L.G.E. Sobre um nematóide do gênero *Pratylenchus*, parasito das raízes de *Allium cepa*. **Revista de Agricultura**, v. 31, n. 3, p. 181-188, 1956.
- LORDELLO, L.G.E. Contribuição para o conhecimento dos nematóides brasileiros da família Dorylaimidae. Piracicaba, 1965. 68p. Tese (Livre-docência)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- LORDELLO, L.G.E. *Pratylenchus coffeae* em novo hospedeiro **Revista de Agricultura**, v 56, n. 1-2, p. 164, 1974.
- LORDELLO, L.G.E. **Nematóide das plantas cultivadas**. São Paulo: Nobel, 1988. 314 p.

- MISHRA, C.; SASMAL, B.C. Pathogenicity of *Pratylenchus coffeae* on jute. **Nematologia Mediterranea**, v. 16, n. 1, p. 133, 1988.
- MIZUKUBO, T. Evidence for *Pratylenchus coffeae* races in differential reproduction on fifteen cultivars (Nematoda: Pratylenchidae). **Japanese Journal of Nematology**, v.25, n.2, p. 85-93, 1995./ Resumo em **CAB abstract on CD-ROM** 1994-95/
- MONTEIRO, A.R.; LORDELLO, L.G.E. *Pratylenchus coffeae* atacando cafeeiro em São Paulo. **Revista de Agricultura**, v. 49, n. 4, p. 164, 1974.
- MOURA, R.M.; MONTEIRO, A.R. *Pratylenchus coffeae* em cará no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 256, 1995.
- PINOCHET, J; DUARTE, O. Additional list of ornamental foliage plants host of the lesion nematode *Pratylenchus coffeae*. **Nematropica**, v. 16, n. 1, p.11-19, 1986.
- PRATES, H.S.; LORDELLO, L.G.E. Mais um nematóide nocivo a citricultura. **Nematologia Brasileira**, v. 4, p. 177-178, 1980.
- RAHM, G. Nematóides parasitas e semiparasitas de diversas plantas cultivadas no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 2, p. 67-136, 1928.
- RIEDEL, R.M.; FOSTER, J.G.; MAI, W.F. A simplified medium for monoxenic culture of *Pratylenchus penetrans* and *Ditylenchus dipsaci*. **Journal of Nematology**, v. 5, n. 1, p. 71-72, 1973.
- ROMÁN, B.; HIRSCHMANN, H, Morphology and morphometrics of six species of *Pratylenchus*. **Journal of Nematology**, v. 1, p. 363-386, 1969.

- ROSSI, C.E.; ZORZENON, F.J.; INOMOTO, .M.M. Ocorrência de *Pratylenchus coffeae* em palmito cultivado no Vale do Ribeira-SP. **Ecossistema**, v. 20, p. 209-211, 1995.
- SALAS, L. A.; ECHANDI, E. Nematodos parasitos en plantaciones de café de Costa Rica. **Café**, v.3: 21-24. 1961.
- SCHIEBER, E.; GRULLON, L. El problema de nemátodos que atacan al café (*Coffea arabica*) en República Dominicana. **Turrialba**, v. 19, n. 4, p. 513-517, 1969.
- SHER, S.A.; ALLEN, M.W. Revision of the genus *Pratylenchus* (Nematoda: Tylenchidae). University of California Publications in Zoology, v. 57. p. 441-470, 1953.
- SILVA, R.A.; INOMOTO, M.M. Caracterização de dois isolados de *Pratylenchus coffeae* do Brasil através de plantas hospedeiras. **Fitopatologia Brasileira**, 25(S): 340. 2000 (Resumo).
- SOUTHEY, J.F. **Laboratory methods for work with plant and soil nematodes**. London: Her Majesty's Stationery Office, 1986. 202 p. (Technical Bulletin, 2).
- TARTÉ, R.; PINOCHET, J.; GABRIELLI, C.; VENTURA, O. Difference in population increase, host preferences and frequency of morphological variants among isolates of the banana race of *Radopholus similis*. **Nematropica**, v.1, p.43-52, 1981.
- WELLMAN, F. L. **Coffee**: botany, cultivation, and utilization. London: Leonard Hill, 1961.

WHITEHEAD, A. G. Nematodea. In: R. H. Le Pelley, R.H. (Ed.) **Pest of Coffee**.
London. Longmans. pp. 407-422, 1968.

Apêndice 1- Taxa reprodutiva (Pf/Pi) do isolado de *Pratylenchus coffeae* (experimento 1) em café, gergelim, banana, e cravo-de-defunto, 63 dias após a inoculação.

Planta	Isolado de Marília
Café	2,346 a
Gergelim	1,660 b
Banana	0,650 b
Cravo-de-defunto	0,00 b

Os dados são médias de seis repetições. Diferentes letras entre as plantas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Apêndice 2 - Taxa reprodutiva (Pf/Pi) do isolados Marília (experimento 2) e do Rio de Janeiro (experimento 3) de *Pratylenchus coffeae* em café, gergelim, limão, banana, e cravo-de-defunto, 70 dias após a inoculação.

Planta	Isolado de Marília	Isolado do Rio de Janeiro
Café	1,64 a	0,8 b
Gergelim	0,16 b	4,33 a
Limão	0,15 b	0,02 b
Banana	0,01 b	0,13 b
Cravo-de-defunto	0,00 b	0,00 b

Os dados são médias de seis repetições. Diferentes letras entre as plantas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Apêndice 3 - Taxa reprodutiva (Pf/Pi) do isolado de Marília (experimento 4) e do Rio de Janeiro (experimento 5) de *Pratylenchus coffeae* em dez culturas extensivas, mais café, limão e cravo-de-defunto, 70 dias após a inoculação.

Planta	Isolado de Marília	Isolado do Rio de Janeiro
Sorgo	6,274 a	1,757 ab
Milho	4,054 ab	0,162 cd
Arroz	3,518 abc	0,789bc
Milheto	3,500 abc	0,311 cd
Soja	2,822 bcd	2,059 a
Mamona	1,603 cde	1,464 ab
Café	1,065 def	0,054 d
Feijão	0,614 efg	0,249 cd
Algodão	0,415 efg	0,301 cd
Limão	0,346 fg	0,010 d
Girassol	0,155 fg	0,063 d
Cravo-de-defunto	0,130 fg	0,000 d
Amendoim	0,115 g	0,184 cd
Gergelim	-	2,842 a

Os dados são médias de quatro repetições. Diferentes letras entre as plantas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Apêndice 4 - Taxa reprodutiva (Pf/Pi) do isolado de Marília (experimento 6) e do Rio de Janeiro (experimento 7) de *Pratylenchus coffeae* em nove hortaliças, mais café, cravo-de-defunto e gergelim, 75 dias após a inoculação.

Planta	Isolado de Marília	Isolado do Rio de Janeiro
Quiabo	6,158 a	0,638 c
Melão	4,637 ab	2,050 ab
Berinjela	3,718 ab	2,450 ab
Alface	3,469 ab	0,178 c
Pimentão	2,209 abc	0,045 c
Abóbora	2,120 abc	2,905 ab
Melancia	2,000 bcd	3,866 a
Café	1,021 cd	0,083 c
Cebolinha	0,066 cd	0,513 c
Cebola	0,200 cd	0,279 c
Cravo-de-defunto	0,000 d	0,023 c
Gergelim	-	1,712 b

Os dados são médias de cinco repetições. Diferentes letras entre as plantas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Apêndice 5 - Medidas do comprimento do corpo (L), posição relativa da vulva em relação ao comprimento do corpo (V%), comprimento do estilete (St), comprimento do saco pós-uterino (PUB) e raiz quadrada do produto entre St e V% ($\sqrt{[St \times V]}$) de fêmeas do isolado de Marília.

Medidas	n	Média	Intervalo	Desvio-padrão
L	23	448,96	370-527	34,30
V%	20	77,77	70,91-80,79	2,14
St	17	14,47	13,33-15,23	0,46
PUB	20	22,46	15,23-28,56	3,68
$\sqrt{(St \times V)}$	15	33,66	31,94-34,92	0,74

Apêndice 6 - Medidas do comprimento do corpo (L), posição relativa da vulva em relação ao comprimento do corpo (V%), comprimento do estilete (St), comprimento do saco pós-uterino (PUB) e raiz quadrada do produto entre St e V% ($\sqrt{[St \times V]}$) de fêmeas do isolado do Rio de Janeiro.

Medidas	n	Média	Intervalo	Desvio-padrão
L	27	575,50	486-668	43,90
V%	23	79,19	76,14-81,97	1,13
St	25	16,31	15,23-17,18	0,46
PUB	23	35,90	19,99-44,74	5,83
$\sqrt{(St \times V)}$	22	35,90	34,72-36,99	0,59

Apêndice 7 - Medidas do comprimento do corpo (L) e de comprimento do estilete (St) dos machos do isolado de Marília.

Medidas	n	Média	Intervalo	Desvio-padrão
L	27	428,66	378-577	46,66
St	23	14,25	12,37-15,23	0,60

Apêndice 8 - Medidas do comprimento do corpo (L) e de comprimento do estilete (St), dos machos do isolado do Rio de Janeiro.

Medidas	n	Média	Intervalo	Desvio-padrão
L	27	509,73	444,44-571	32,72
St	23	15,55	13,32-17,13	1,07