



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE - PPGSHMA

Vanessa Lopes Lira

**CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA E
MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE *Pratylenchus
coffea* E REAÇÕES DE LEGUMINOSAS E
GRAMÍNEAS AO PARASITISMO**

Vitória de Santo Antão

2013

Vanessa Lopes Lira

**CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA E
MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE *Pratylenchus
coffea* E REAÇÕES DE LEGUMINOSAS E
GRAMÍNEAS AO PARASITISMO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Saúde e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Romero Marinho de Moura

Coorientador: Profa. Dra. Idjane Santana de Oliveira

Vitória de Santo Antão

2013

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Roseane Souza de Mendonça, CRB4: 1148

L768c Lira, Vanessa Lopes.

Caracterização morfométrica e molecular de populações de *Pratylenchus coffeae* e reações de leguminosas e gramíneas ao parasitismo / Vanessa Lopes Lira. Vitória de Santo Antão: O Autor, 2013.
59 folhas: il.; fig.

Orientador: Romero Marinho de Moura.

Co-Orientador: Idjane Santana de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Nematóide. 2. Inhame - Nematóide. 3. *Pratylenchus coffeae* - Morfologia.
4. Fitonematóides. I. Moura, Romero Marinho de (Orientador). II. Oliveira, Idjane Santana de (Co-Orientador). III. Título.

632.3 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-020/2013



Dissertação de Mestrado apresentada por **Vanessa Lopes Lira** à Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título "CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA E MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE *PRATYLENCHUS COFFEA* E REAÇÕES DE LEGUMINOSAS E GRAMÍNEAS AO PARASITISMO", orientada pelo Prof. Dr. Romero Marinho de Moura, aprovada no dia 30 de julho de 2013 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Dra. Christine Lamenha Luna Finkler
Núcleo de Nutrição - CAV/UFPE

Dr. Gustavo Rubens de Castro Torres
Departamento de Ciências Biológicas - FUNESO

Dr. Romero Marinho de Moura
Programa de Pós-Graduação - CAV/UFPE

Autora

Vanessa Lopes Lira

A minha mãe Lourdes, por sempre ter acreditado em mim,
ao meu esposo Fábio pelo incentivo e apoio
e ao meu filho Brenno, com muito amor,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder coragem e força para enfrentar e superar obstáculos.

Ao Centro Acadêmico de Vitória – (UFPE/CAV) onde cursei a graduação e o mestrado e que me deu a oportunidade de aprendizado e de conquistar parte dos meus sonhos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA pela concessão das sementes utilizadas neste trabalho.

Ao professor Dr. Romero Marinho de Moura pela orientação, repasse de conhecimentos resultantes de sua grande experiência profissional e por sua paciência e dedicação.

A co-orientadora e amiga Dra. Idjane Santana de Oliveira pela confiança, ensinamentos e pelo apoio em todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao pesquisador científico Dr. Cláudio Marcelo Gonçalves de Oliveira, pelas sugestões e inestimável apoio para a realização desta dissertação. Agradeço também aos pesquisadores Juliana Magrinelli Osório Rosa e Samara Azevedo Oliveira pela colaboração na condução e avaliação dos experimentos.

A todas as pessoas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia que disponibilizaram todo aporte necessário à realização desta pesquisa, agradeço em especial a Natália Vasconcelos e Charlylston Dougllas pela colaboração na realização de todas as etapas experimentais.

Finalmente agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE SÍMBOLOS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO 1	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo Geral	4
1.2.2. Objetivos Específicos	4
1.3 Revisão da Literatura	
1.3.1 O gênero <i>Pratylenchus</i> Filipjev, 1936	5
1.3.2 Diversidade morfológica de <i>P. coffeae</i>	6
1.3.3 Importância econômica de <i>P. coffeae</i> para a agricultura com ênfase na sua ocorrência no Brasil	8
1.3.4 Identificação genética de populações de <i>P. coffeae</i>	9
1.3.5 Diversidade parasitária de populações de <i>P. coffeae</i>	12
1.3.6 Controle populacional <i>P. coffeae</i> por meio de rotação de cultura	13
CAPÍTULO 2	
Análise morfométrica e molecular de isolados de <i>Pratylenchus coffeae</i> população inhome ocorrentes no Estado de Pernambuco	15
2.1. Resumo	16
2.2 Introdução	17
2.3 Material e Métodos	18
2.4 Resultados	20
2.5 Discussão	22
2.6 Agradecimentos	24
2.7 Referências Bibliográficas	24
2.8 Tabelas e Figuras	28

CAPÍTULO 3	
Reação de genótipos de gramíneas e leguminosas em relação à <i>Pratylenchus coffeae</i> população inhome	33
3.1. Resumo	34
3.2 Introdução	35
3.3 Material e Métodos	36
3.4 Resultados	38
3.5 Discussão	39
3.6 Agradecimentos	40
3.7 Referências Bibliográficas	40
3.8 Tabelas e Figuras	43
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	50
ANEXOS	xiv

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Ilustração da espécie <i>Pratylenchus coffeae</i>	7
Figura 1.2	Representação esquemática do DNA ribossômico de nematoides, evidenciando os três genes ribossômicos, 18S, 5.8S, 28S com a região D2/D3 e as regiões espaçadoras ITS-1 e ITS-2.	10
Figura 2.1	Fotomicrografia dos caracteres morfológicos utilizados para identificação de <i>Pratylenchus coffeae</i> . A) Bulbos do estilete exibindo uma forma arredondada (seta). B) Espermateca funcional ovalada (seta). C) Ovário (seta). D) <i>P. coffeae</i> fêmea, indicando a posição da vulva, cauda hemisférica e ânus (seta). E) Poro excretor e glândula esofagiana (seta).	28 29
Figura 2.2	Alinhamento da região D2/D3 da sequência do gene 28S DNAr da espécie <i>Pratylenchus coffeae</i> , população de Pernambuco.	
Figura 2.3	Relação filogenética de <i>Pratylenchus coffeae</i> , população inhome e sua similaridade com populações obtidas do GenBank baseados no alinhamento da sequência da região D2/D3 28S DNAr.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Medidas morfométricas de variáveis obtidas de espécimes fêmeas de populações de <i>Pratylenchus coffeae</i> . Estatística incluindo média, desvio padrão e amplitude.	32
Tabela 3.1	Leguminosas e Gramíneas utilizadas para os testes de parasitismo coma espécie <i>Pratylenchus coffeae</i> .	43
Tabela 3.2	Fator de reprodução (FR) de <i>Pratylenchus coffeae</i> (Y2) em plantas leguminosas, população inicial (Pi de raízes) e população final (Pf de raízes) aos 32 dias após a inoculação	43
Tabela 3.3	Fator de reprodução (FR) de <i>Pratylenchus coffeae</i> (Y2) em plantas gramíneas, população inicial (Pi de raízes) e população final (Pf de raízes) aos 32 dias após a inoculação	44
Tabela 3.4	Peso das raízes plantas leguminosas inoculadas com <i>Pratylenchus coffeae</i> (PRCN) e sem nematoides (PRSN), peso da parte aérea com nematoide (PPACN) e sem nematoide (PPASN) aos 32 dias após a inoculação	44
Tabela 3.5	Peso das raízes de plantas gramíneas inoculadas com <i>Pratylenchus coffeae</i> com nematoides (PRCN) e sem nematoides (PRSN), peso da parte aérea com nematoide (PPACN) e sem nematoide (PPASN) aos 32 dias após a inoculação	45

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau C
cm ³	Centímetro cúbico
µL	Microlitro
ng	Nanograma
mL	Mililitro
mmol	Milimolar
min	Minuto
µg	Micrograma
±	Mais ou menos

LISTA DE ABREVIATURAS

EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
PCR	Polymerase Chain Reaction
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PE	Pernambuco
CAV	Centro Acadêmico de Vitória
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DPM	Densidade Populacional Média
ICM	Intervalo de Confiança da Média
M	Média
DP	Desvio Padrão
HLB	Holterman Lysis Buffer
Rpm	Rotação por minuto
TBE	Tris Borato EDTA
UV	Ultra Violeta
Pf	População final
Pi	População inicial
FR	Fator de Reprodução
NFW	Nuclease Free Water
RAPD	<i>Random amplification of polymorphic</i>

RESUMO

Pratylenchus coffeae, conhecida popularmente no Nordeste por nematoide das lesões do inhame-da-costa, apresenta diversidade morfológica e de virulência entre populações de diferentes localidades. Como consequência, têm sido descritas novas espécies, a exemplo de *P. pseudocoffeae* e *P. jaehni*, anteriormente consideradas *P. coffeae*. Outra questão de relevo é o difícil controle populacional do nematoide no campo. O objetivo da pesquisa foi inicialmente caracterizar taxonomicamente dez populações do nematoide das lesões do inhame da costa, coletadas em diferentes regiões produtoras do Estado de Pernambuco. Para tal, foram utilizadas análises morfométricas e moleculares. Os resultados mostraram que as dez populações eram similares entre si e que possuíam mais de 70% de similaridade com os dados da literatura referentes à *P. coffeae*. Quanto a análise molecular, todos os espécimes analisados apresentaram 100% de homologia para *P. coffeae*, considerando-se as sequências do GenBank. Com isto, confirmou-se a identidade do nematoide das lesões do inhame-da-costa no Nordeste como sendo *P. coffeae*. O segundo objetivo foi identificar reações de hospedabilidade, resistência, tolerância, intolerância e de susceptibilidade em três leguminosas e em cinco gramíneas, todas de valor comercial, em relação ao parasitismo de *P. coffeae*. Os resultados mostraram que as variedades leguminosas feijão macassar IPA- 206 e IPA-207 e as gramíneas milho São José e o milho doce como maus-hospedeiros-resistentes e o sorgo granífero como não-hospedeiro. Todos os genótipos podem ser utilizados em planos de rotação de culturas para controle de *P. coffeae*.

Palavras-Chave: expansão D2/D3, fitonematoides, morfologia, rotação de cultura

ABSTRACT

Pratylenchus coffeae popularly known in the Northeast of Brazil by the yam lesion nematode, has high morphological diversity and virulence among populations from different location. As consequence, new species have been described, such as *P. pseudocoffeae* and *P. jaehni*, previously considered as *P. coffeae*. Another issue of importance is the difficulties to control this nematode populations under field conditions. The objectives of this research were initially to characterize taxonomically ten populations of the yam lesion nematode, collected in different yam producing areas of the State of Pernambuco. For this, it was used morphometric and molecular methods. The results showed that the ten populations were morphologically similar to each other, having more than 70% similarity to the literature data for *P. coffeae*. Through the molecular analysis it was concluded that all specimens have 100% homology to *P. coffeae*, considering the sequences presented by the GenBank. With these results it was confirmed the taxonomical identity of the yam lesion nematode occurring in the Northeast of Brazil as *P. coffeae*. The second objective was to identify reactions of hospitability, resistance, tolerance, intolerance and susceptibility in three legumes and five grasses genotypes, all considered as cash crops, in relation to *P. coffeae* parasitism to be used in crop rotations to control the yam lesion nematode. The results pointed out that the legumes cowpea IPA-206 and IPA-207 and the grasses St. Joseph grass and sweet corn as poor-host-resistants and the sorghum graminifera as non-host. All these genotypes may be used in crop rotation programs for controlling *P. coffeae*.

Keywords: D2/D3 expansion, morphology, nematodes, crop rotation.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Os nematoides das lesões radiculares, representados pelas espécies do gênero *Pratylenchus* Filipjev, é reconhecido como um dos principais agentes causadores de perdas agrícolas em culturas de importância econômica no Brasil, a exemplo da soja (*Glycine max* L.), citros (*Citrus sinensis* L.), milho (*Zea Mays* L.), café (*Coffea arábica* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e diversas ornamentais (TENENTE et al., 2002).

O nematoide das lesões ocupa o segundo lugar em importância entre os demais nematoides parasitos de plantas, sendo superado apenas pelo nematoide das galhas (*Meloidogyne Goeldi*), segundo Tihohod (2000). Conforme revisão de Gonzaga (2006), no Brasil, apenas seis espécies do referido gênero são encontradas associadas a diferentes culturas agrícolas, sendo estas: *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann) Filipjev & Schuurmans Stekhoven; *P. brachyurus* (Godfrey) Filipjev & Schuurmans Stekhoven; *P. jaehni* Inserra et al.; *P. penetrans* (Cobb) Chitwood & Oteif; *P. vulnus* Allen & Jensen e *P. zaeae* Grahnan. *Pratylenchus coffeae* é uma espécie de alta virulência, encontrada sempre associada a perdas econômicas significativas (INOMOTO et al., 1998; MOURA et al., 2002).

No Nordeste, esta espécie foi assinalada em diversas culturas agrícolas, entre as quais o inhame da costa (*Dioscorea cayennensis* Lam.), causando a doença denominada de casca-preta, em gravioleira (*Annona muricata* L.), causando a morte súbita, e as pratilencoses do milho doce (*Zea mays* L.) e do cafeeiro. (MOURA, 1999; MOURA et al., 2002; 2004). Mesmo sendo considerado um patógeno de alta relevância, *P. coffeae* vem

sendo pouco estudado no Brasil. Do ponto de vista agrônomo, para a obtenção de resultados positivos de controle populacional dos nematoides das lesões em campos de produção é fundamental o conhecimento preciso da espécie patogênica presente no solo, pois a principal técnica empregada é a rotação de culturas, onde se substitui uma planta boa-hospedeira por uma não-hospedeira, por tempo variável, a depender de fatores locais. Portanto, tal prática exige o conhecimento da interação “nome do nematoide - nome da hospedeira.”

Por outro lado, no que concerne a taxonomia de *P. coffeae*, nota-se que os estudos mais recentes demonstraram que a espécie não é fácil de ser identificada, pois apresenta alta variabilidade morfológica entre populações de diferentes localidades, conforme afirmaram Duncan et al. (1999). Do mesmo modo, apresentam comportamento parasitário diversificado entre algumas populações, especialmente quanto à virulência (populações diferentes podem atacar diferentemente uma mesma espécie de planta) (KUBO et al., 2003). O desconhecimento dessa diversidade entre populações, associado a estudos mal conduzidos, podem levar pesquisadores à descrição indevida de novas espécies do nematoide das lesões.

Uma segunda questão relacionada ao parasitismo de *P. coffeae* é o controle populacional no campo. Sabe-se que restos de cultura, a exemplo de raízes, túberas, entre outros, que permanecem no campo após as colheitas, mantêm protegidas internamente as formas infectantes do nematoide (ovos e juvenis), impedindo a ação dos agrotóxicos nematicidas aplicados no solo. Devido a isto, o mais recomendado, especialmente em situações onde ocorrem altas densidades populacionais do nematoide (número de espécimes por 300 cm³ de solo) é a rotação de culturas com plantas antagônicas, que são geralmente leguminosas a exemplo da *Crotalaria juncea* L. e mucuna-preta (*Mucuna aterrima* Piper & Tracy) por um a dois anos. A rotação com estas plantas não comerciais não traz lucro financeiro algum para o agricultor durante a aplicação e por isso procuram-se plantas de importância econômica que não sejam hospedeiras do parasito para uso em rotações. Portanto, está explícito que, para se ter um sistema adequado de controle por rotação de cultura em áreas infestadas por *P. coffeae*, torna-se necessária a identificação das espécies presentes na área, para então poder ser selecionada a cultura não hospedeira ao nematoide.

A identificação de *P. coffeae* é feita com base nas características morfológicas (formato de estruturas), micrométricas (dimensões de estruturas e relações corpóreas lineares) e testes moleculares. O processo de diagnose é facilitado com o uso de técnicas moleculares, levando em conta caracteres menos variáveis (sequência de DNAr), com base em um único

espécime. Assim, este trabalho teve por objetivo, caracterizar dez populações de *P. coffeae*, encontradas parasitando o inhame da costa, procurando-se determinar em que categoria morfológica e genética essas tais populações se enquadram nos critérios estabelecidos por Duncan et al. (1999), considerada a revisão taxonômica básica da espécie. Com relação ao controle, foi proposto estudar reações de hospedabilidade de cinco gramíneas e de três leguminosas comerciais, na tentativa de ser identificado um ou alguns genótipos não hospedeiros à referida espécie de nematoide, para utilização em futuros programas de rotação de cultura.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

- Caracterizar de forma morfométrica e molecular, populações de *Pratylenchus coffeae*;
- Identificar reações de genótipos de gramíneas e leguminosas ao parasitismo;

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar em que categoria morfológica e genética dez populações de *P. coffeae*, encontradas parasitando o inhame da costa em diferentes municípios produtores do estado de Pernambuco, se enquadram nos critérios classificatórios da literatura.
- Identificar genótipos resistentes à *P. coffeae* de cinco gramíneas e três leguminosas comerciais, para utilização em programas de rotação de cultura.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 O gênero *Pratylenchus* Filipjev, 1936

As espécies do gênero *Pratylenchus* são parasitos obrigatórios, vivendo internamente em órgãos vegetais subterrâneos a exemplo de raízes, rizomas e túberas, quase sempre com uma passagem no solo, na qualidade de migrantes. Popularmente, todas as espécies do gênero *Pratylenchus* são referidas pela denominação de “nematoides das lesões radiculares” ou, simplesmente, “nematóide das lesões”, devido ao tipo de sintoma que as plantas parasitadas expressam nos locais mais afetados pela doença, denominada de pratilencose. Tais lesões “quebram” a resistência dos órgãos afetados, tornando-os mais susceptíveis à ação de organismos oportunistas, principalmente fungos e bactérias, agravando a síndrome. Do mesmo modo, as lesões interferem na seletividade de absorção das raízes, que passam a ser invadidas por substâncias diversas do solo, inclusive pelos metabólitos dos organismos da comunidade biótica do solo. Sistemas radiculares parasitados pelos nematoides das lesões são pouco eficientes em termos de absorção de água e nutrientes do solo. Na parte aérea, os sintomas são inespecíficos e podem ser facilmente despercebidos ou confundidos com sintomas causados por outros patógenos, deficiências nutricionais ou estresse hídrico (GOULART, 2008).

O gênero *Pratylenchus* compreende atualmente 97 espécies consideradas válidas pela maioria dos autores estando distribuídas mundialmente, parasitando ampla gama de espécies e variedades de plantas cultivadas e não cultivadas (HANDOO et al., 2008). Até agora, 139 descrições originais de novas formas taxonômicas foram feitas, entre as quais quatro subespécies (URIBE, 2008). Entretanto, o número de espécies consideradas válidas é variável, de acordo com diferentes autores (HANDOO et al., 2008). Algumas espécies do gênero *Pratylenchus* já se tornaram sinônimas. (URIBE, 2008). A taxonomia do referido gênero tem sido tema de muitas publicações (CASTILLO; VOVLAS, 2007; MIZUKUBO et al., 2007; SUBOTTIN et al., 2008; TROCCOLI et al., 2008; PALOMARES-RIUS et al., 2010). A separação taxonômica das espécies válidas é dificultada pelo pequeno número de caracteres-diagnósticos e por causa da variabilidade intraespecífica de alguns dos citados caracteres (LUC, 1987), principalmente quando se confrontam dados de populações de diferentes regiões geográficas. No entanto, por meio de vários desses estudos foi

demonstrado que algumas medições, tais como comprimento do estilete e valor “V” (%) (distância entre a cabeça e a vulta, expressa em números percentuais do comprimento do corpo), eram as variáveis taxonômicas menos afetadas por fatores bióticos ou abióticos e provaram ser confiáveis como características-diagnósticas do gênero *Pratylenchus* (CASTILLLO; VOVLAS, 2007).

1.3.2 Diversidade morfológica de *P. coffeae*

Conforme já mencionado, a espécie *P. coffeae* quando descrita pela primeira vez, foi denominada de *Tylenchus coffeae* por Zimmermann (1898), mas, em 1941, Filipjev e Schuurmans Stekhoven transferiram *T. coffeae* para o gênero *Pratylenchus*, criando-se o binômio *P. coffeae*. O gênero *Tylenchus* permaneceu válido, com as outras demais espécies. Siddiqi (2000) apresentou a seguinte classificação taxonômica para *P. coffeae*:

Filo: Nematoda

Classe: Secernentea

Subclasse: Tylenchia

Ordem: Tylenchida

Subordem: Tylenchina

Superfamília: Hoplolaimoidea

Família: Pratylenchidae

Subfamília: Pratylenchinae

Gênero: *Pratylenchus*

Espécie: *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann, 1898)

Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941.

A taxonomia de *P. coffeae* tem sido pesquisada por muitos autores (INSERRA et al., 2001; MIZUKUBO, 1992; DUNCAN et al., 1999; RYSS, 2002a; VAN DEN BERG et al., 2005). Devido às discussões conflitantes que algumas publicações apresentaram quanto à manutenção do atual *status* de *P. coffeae*, novas pesquisas foram desenvolvidas e trouxeram mais discussões sobre o tema, pois, por meio de análises morfométricas de caracteres taxonômicos básicos, ficou demonstrado que existe acentuada diversidade também em dimensões e que em certos casos, as médias encontradas afastavam-se significativamente das consideradas típicas para *P. coffeae* (DUNCAN et al., 1999).

Os nematoides das lesões possuem corpo fusiforme, cujo comprimento dos adultos varia de 0,3 a 0,9mm (LOOF, 1991), (Figura 1.1). Entretanto, diversos autores ao longo das

últimas décadas, passaram a constatar diferentes medidas para os elementos taxonômicos morfológicos de *P. coffeae*.



Fig. 1.1 Ilustração da espécie *Pratylenchus coffeae* (foto do autor)

Em consequência da citada diversidade morfológica e das micromensurações, gerou-se o estabelecimento de novas espécies ou a descrição de subespécies e raças para o que já é referido por complexo *P. coffeae*, caso, por exemplo, de *P. loosi*, *P. pseudocoffeae* e *P. jaehni*, anteriormente consideradas populações de *P. coffeae* (INSERRA et al., 1996; 1998; 2001).

A taxonomia das espécies do gênero *Pratylenchus* é fundamentada na morfologia das fêmeas adultas, por possuírem mais características-diagnósticas do que os machos. Os caracteres normalmente utilizados para a diagnose específica do gênero *Pratylenchus* é a ausência ou a presença de machos, número de anéis pós-labiais, comprimento do corpo, comprimento do estilete, formas dos bulbos do estilete, comprimento do esôfago, distância da região cefálica à vulva, expressa em termos percentuais do comprimento do corpo e comprimento da cauda. Nas descrições são utilizadas também relações métricas corporais do tipo: valor "a"= comprimento do corpo dividido pela maior largura do corpo; "b"= comprimento do corpo dividido pelo comprimento do esôfago e valor "c"= comprimento do corpo dividido pelo comprimento da cauda.

1.3.3 Importância econômica de *P. coffeae* para a agricultura com ênfase na sua ocorrência no Brasil

Pratylenchus coffeae foi observado pela primeira vez na Indonésia em raízes de cafeeiro por Zimmermann (1898) e, desde então, passou a ser relatado como fitopatógeno de alta virulência para a rosácea em questão, em vários países produtores, principalmente em Barbados, Congo, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Índia, Jamaica, Madagascar, Malásia, Martinica e Filipinas (VILLAIN et al., 2000).

O nematoide é provavelmente um organismo nativo dos países banhados pelo Pacífico, especialmente do litoral, do qual pode ter sido disseminado por meio de materiais oriundos de plantações infectadas (NGUYEN, 2010). Hoje *P. coffeae* tem distribuição pantrópica (CABI/EPPO, 2007). Embora seja uma espécie comumente encontrada no Brasil e descrita pela primeira vez em cafeeiro, a ocorrência nesta espécie botânica, que é o hospedeiro tipo, é pequena. Há registro, por exemplo, em apenas uma amostra infectada dentre 218 amostras coletadas em cafezais do estado de São Paulo (GONÇALVES et al., 1978). Kubo et al. em 2004, também avaliaram a ocorrência de nematoides do gênero *Pratylenchus* em cafeeiros em diversos municípios do estado de São Paulo e concluíram que *P. brachyurus* encontra-se mais disseminada, tendo constatado 13,2% de ocorrência no solo e 18,3% em amostras de raízes. Entretanto, a ocorrência de *P. brachyurus* nas amostras geralmente era em baixas densidades populacionais, no entanto, *P. coffeae* que ocorreu em apenas 5,1% das amostras, geralmente estava presente em altas densidades populacionais e causando danos mais pronunciados que a primeira espécie.

No Nordeste *P. coffeae* foi reportado pela primeira vez por Moura e Monteiro, (1995), no inhame da costa (*Dioscorea cayennensis* Lam) provocando sintomas semelhantes aos da doença “casca-preta”, originalmente causada pelo endoparasito migrador *Scutellonema bradys* (Steiner & Le Hew) Andrassy. A doença é caracterizada por uma camada de tecidos necrosados, de coloração negra, cuja intensidade torna-se maior quando a temperatura de armazenamento das túberas mantém-se entre 24 a 31 °C, que favorece o aumento populacional do nematoide no interior do citado órgão, favorecendo, também, a incidência de organismos oportunistas. Quando conservadas a 12-13 °C, o número de nematoides permanece baixo, pois, na referida faixa de temperatura, ocorre a inibição da reprodução e das demais funções fisiológicas do patógeno (THOMPSON et al., 1973). Uma população de apenas 600 espécimes de *P. coffeae* por planta infectada pode causar danos significativos (necroses graves e rachaduras profundas na túbera), enquanto 1.000 espécimes por planta

podem causar deterioração completa e redução na qualidade das túberas (ACOSTA e AYALA, 1975).

O Nordeste é o maior produtor de inhame da costa concentrando, aproximadamente, 90% de toda a produção no país, com destaque para os estados da Paraíba, principal produtor, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Maranhão (GARRIDO, 2005; OLIVEIRA, 2005).

Moura et al. (1999) reportaram uma nova doença da gravioleira que passou a se denominar de “morte súbita”, cujo agente etiológico era *P. coffeae*. Posteriormente, Moura et al. (2002) reportaram *P. coffeae* causando altas perdas no cafeeiro, no estado de Pernambuco. O problema induzia severos danos e perdas. Em 2004, Moura et al. assinalaram *P. coffeae* induzindo uma “pratilecose atípica” em milho doce para exportação, no estado do Rio Grande do Norte, em síndrome de alta severidade.

1.3.4 Identificação genética em populações de *P. coffeae*

O Filo Nematoda é diversificado em termos de táxons, principalmente de espécies, sendo o grupo dos metazoários mais rico em espécimes, estimando-se que tais organismos compreendam cerca de 90% de todos os organismos multicelulares existentes na biosfera (OLIVEIRA et al., 2011). No entanto, os nematoides são considerados um dos organismos mais difíceis de serem identificados, devido à dimensão microscópica, similaridade morfológica e pequeno número de caracteres morfológicos e anatômicos que possam ser utilizados na taxonomia do Filo.

Devido às variações morfológicas e morfométricas entre populações distintas de *P. coffeae*, torna-se necessário considerável conhecimento em taxonomia para a segura identificação de espécies. Infelizmente, existem, atualmente, poucos taxonomistas bem treinados no mercado de trabalho, pois, aparentemente, ocorre falta de interesse entre os estudantes para se aprofundar na citada área de conhecimento, especialmente na taxonomia de invertebrados. Embora exista um declínio contínuo na perícia taxonômica de muitos táxons incluindo-se o Filo Nematoda (COOMANS, 2002), novas oportunidades tecnológicas fundamentadas em técnicas bioquímicas e análises moleculares têm se tornado cada vez mais importantes para a sistemática de nematoides, tornando mais práticos e confiáveis os processos de identificação (LUCA et al., 2004). Entretanto, o uso de critérios morfológicos vem sendo mantido e deve continuar, sendo considerado o primeiro passo para a identificação dos nematoides em geral (MOTA; EISENBACK, 1993).

O desenvolvimento das técnicas para os estudos em biologia molecular possibilitou a separação de espécies de nematoides morfológicamente semelhantes, mas geneticamente

diferentes, por possuírem diferentes origens filogenéticas. A análise de DNA, por exemplo, apresenta alto grau de polimorfismo, não sendo influenciado pelo ambiente, pelo fenótipo ou estágio de desenvolvimento do nematoide (CURRAN, 1991). Sendo assim, verificou-se que as técnicas moleculares representam grande potencial e traz facilidades nas identificações rotineiras de nematoides (AL-BANNA et al., 2004).

Entre as técnicas moleculares utilizadas para a identificação de fitonematoides encontra-se a técnica do Código de Barras (DNA *barcoding*). Em 2003, pesquisadores da Universidade de Guelph, em Ontário, Canadá, propuseram o código de barras do DNA (DNA barcode) como forma de identificar as espécies. O uso de um código de barras do DNA para identificação de organismos foi proposto em duas conferências realizadas no laboratório de *Cold Spring Harbor*, Estados Unidos (EUA), em 2003 (POWERS, 2004). Esta foi uma iniciativa internacional dedicada a desenvolver um padrão global para a identificação de espécies biológicas. Os principais objetivos da técnica são a identificação e descoberta de espécies visando facilitar a taxonomia para o benefício da ciência e da sociedade (GRÄUTLEIN et al., 2011). Código de barras DNA é um novo sistema projetado para proporcionar uma rápida e precisa identificação de espécies usando-se regiões de genes curtos e padronizados.

O princípio do uso de um código de barras genético seria o de que, em um pequeno trecho do genoma do organismo, onde existe sequência específica para cada espécie, geralmente o DNA mitocondrial (mtDNA) ou DNA ribossômico (DNAr), existe variação suficiente para separar as espécies que habitam o planeta atualmente, inclusive os nematoides parasitos de plantas (POWERS, 2004). O DNAr é a região gênica mais estudada em Nematoda, por ser altamente conservada (JONES; PHILLIPS; ARMSTRONG, 1997; POWERS, 2004). A região consiste de três genes ribossomais: 18S, 5.8S e 28S, contendo duas regiões espaçadoras (ITS-1 e ITS-2), separadas pelo gene 5.8S (DORRIS; DE LEY; BLAXTER, 1999), (Figura 1.2). A região D2/D3 do segmento 28S do DNAr tem sido normalmente usada para resolução de relacionamentos filogenéticos e também como úteis marcadores de diagnósticos para identificação de espécies (AL-BANNA et al., 2004).

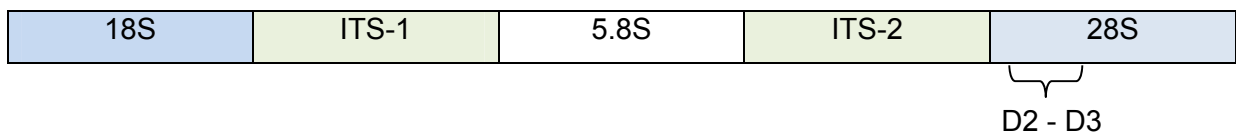


Fig. 1.2 Representação esquemática do DNA ribossômico de nematoides, evidenciando os três genes ribossômicos, 18S, 5.8S, 28S com a região D2/D3 e as regiões espaçadoras ITS-1 e ITS-2.

A coexistência de variabilidade e conservação no interior do gene 28S torna a referida região mais apropriada para estimar relacionamentos filogenéticos, porque a variação da sequência fornece caracteres filogeneticamente informativos, enquanto a região conservada torna fácil para identificar as posições de homologia e, assim, facilitar o alinhamento de múltiplas sequências com confiança (GILLESPIE et al., 2004). Ainda, de acordo com Subbotin et al. (2008), para nematoides do gênero *Pratylenchus*, a região genômica mais estudada é a expansão D2 / D3, situada no 28S DNA ribossômico (DNAr), por possuir uma baixa taxa de mutação.

Filogenias moleculares de nematoides parasitos de plantas tem sido estudada recentemente por vários autores, baseados na região D2/D3 do gene 28S do DNAr. Dentre esses estudos, Al-Banna et al. (1997) examinou as relações filogenéticas entre dez espécies do gênero *Pratylenchus*, usando a sequência de nucleotídeos da expansão D3 da região 26S DNAr, ficando evidente que espécies do gênero *Pratylenchus* formam um conjunto parafilético.

Duncan et al. (1999) realizaram um estudo com 33 populações identificadas como *P. coffeae*, *P. pseudocoffeae*, *P. loosi* e *P. gutierrezii*, buscando estimar as relações filogenéticas entre as mesmas, por meio da expansão D2/D3 do gene 28S e dividindo as populações em sete grupos, de acordo com as características morfológicas-taxonômicas e atribuindo a cada população os respectivos códigos. Entre as populações encontrava-se uma coletada no estado de Pernambuco, encontrada parasitando o inhame da costa. Após as análises do autor a população recebeu o código Y2.

Muitos outros estudos na área podem ser citados a exemplo de Handoo et al. (2005), que conseguiram distinguir por meio da expansão D2-D3 do DNAr 28S uma nova espécie do fitonematoide do gênero *Longidorus* (Micoletzky) Filipjev, que passou a ser denominada *L. americanum* Handoo. Esta nova espécie era morfológicamente muito semelhante a outras espécies do gênero *Longidorus*. Também, pode ser citado He et al. (2005), que estudaram a relação evolutiva da família *Longidoridae* por meio da reconstrução da filogenia. Mekete (2011) utilizou sequências do fragmento da região D2/D3 da expansão 28S do DNAr, para a identificação de várias espécies do gênero *Pratylenchus*, por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex, obtendo igualmente sucesso.

Primers específicos também tem sido utilizado para identificação de espécies de *Pratylenchus*. Uehara (1998) desenvolveu *primers* específicos baseados na sequência das regiões ITS do DNAr para diferenciar *P. coffeae* de *Pratylenchus loosi*. Al-Banna et al. (2004) desenvolveram *primers* específicos para cinco espécies de *Pratylenchus* a partir da expansão D3 da região 26S DNAr. Hoje se verifica que a técnica proporciona um meio

simples, rápido e eficiente no diagnóstico de espécies e estudo de epidemiologia de nematoides do gênero *Pratylenchus*.

1.3.5 Diversidade parasitária de populações de *P. coffeae*

A partir do trabalho de Filipjev e Shuurman Stakehoven em 1941, *P. coffeae* passou a ser assinalado em muitos países, em quadros fitopatológicos quase sempre com altos danos às culturas e consequentes perdas econômicas para os agricultores.

No Brasil, o primeiro assinalamento de *P. coffeae* deu-se em cafeeiro, por Monteiro e Lordello (1974), em cafeeiro coletado no município de Marília, São Paulo, Brasil. A partir daí, novos assinalamentos foram feitos no Brasil, quase sempre relacionados ao complexo *Pratylenchus coffeae* x cafeeiro, a exemplo de Inomoto et al. (1998), Moura et al. (2002) e Kubo et al. (2004).

Silva e Inomoto (2002) compararam o efeito parasitário de uma população classificada como K5 (classificação de DUNCAN et al., 1999) coletada em raízes de cafeeiros do município de Marília, São Paulo, com outra classificada como M2 (também segundo DUNCAN et al., 1999), coletada de raízes de uma planta ornamental *Aglaonema* sp. (família Araceae), originária da cidade do Rio de Janeiro, Brasil, e sugeriram que a preferência do nematoide pelo hospedeiro está relacionada a diferenças moleculares e morfológicas entre as populações estudadas.

Wilcken et al. (2008) ao analisarem as relações entre *P. jaehni* (C1) e seis populações anfimíticas de *Pratylenchus* do Brasil, três de bananeira (*Musa paradisiaca* L.) uma de *Aglaonema* sp. (M2); uma de cafeeiro (K5); e uma de citros (C2) e observaram por meio de teste de patogenicidade que a população K5 reproduziu-se e causou extensas necroses nas raízes do cafeeiro, mas C2 não. A população C2 reproduziu-se em limoeiro cravo, que, entretanto, apresentou-se como mau hospedeiro a K5.

Kubo et al. (2003) demonstraram a possibilidade da existência de raças em *P. coffeae*, quando compararam o efeito parasitário da população K5, com outra identificada como M2. Pelo critério utilizado pelos autores na avaliação, a população K5 mostrou-se mais virulenta (causava mais danos) no cafeeiro Novo Mundo, do que a M2

Normalmente, as lesões radiculares produzidas por *P. coffeae* evoluem para longas podridões e necroses do sistema radicular evoluindo, muitas vezes, para o colo das plantas hospedeiras. Os sintomas são agravados por outros organismos patogênicos, a exemplo de bactérias e fungos, que penetram pelos locais lesionados (ALVES, 2008). Campos et al. (1990) indicaram a possibilidade de variação parasitária em *P. coffeae*. Pela sua importância

como causador de danos a importantes culturas, nota-se que mais estudos nesta área são necessários para melhor discernimento do processo de variação fisiológica ou parasitária, com objetivo de haver uma seleção de hospedeiras que possam proporcionar reações diferenciadoras de raças.

1.3.6 Controle populacional *P. coffeae* por meio de rotação de cultura

Nos últimos anos, diversas medidas de controle têm sido adotadas visando minimizar os prejuízos causados pelos fitonematoides (CAMPOS, 2009). A introdução de *P. coffeae* em uma área de cultivo é sempre feita por meio de material de propagação vegetal contaminado, a exemplo de túberas-sementes de inhame da costa, mudas de cafeeiro, bananeira, citros e gravioleira, igualmente contaminadas.

É sabido também que após a introdução dos fitonematoides em um campo de cultivo a erradicação é praticamente impossível, embora seja possível reduzir as densidades populacionais médias (DPMs) do nematoide e mantê-las em níveis baixos, por meio de uma integração de algumas medidas de controle (GONÇALVES et al., 2004). Os métodos mais usados para controlar fitonematoides tem sido o uso de rotação de culturas e nematicidas sistêmicos, que são produtos agrotóxicos. Os nematicidas têm sido evitados por pertencerem à classe toxicológica um (tarja vermelha) identificados como “extremamente tóxicos”, grupo que reúne os mais tóxicos agroquímicos. O controle químico exige equipamentos motorizados, que são caros, e trabalhadores de campo bem treinados, pois os acidentes por ocasião das aplicações resultam, quase sempre, em intoxicações humanas agudas, e fortes impactos ambientais.

Aplicados no solo, os nematicidas interferem negativamente na microflora terrestre, destruindo organismos benéficos. Além do mais, os nematicidas são caros e exigem, antes da aplicação, a prévia e segura análise da relação custo-benefício (MOURA, 2010). Já a rotação de culturas, pode ser usada efetivamente, resultando em maiores produtividades e uma renda adicional para o agricultor, sem agredir o meio ambiente. A alternância de culturas de espécies vegetais com características distintas em um campo de produção agrícola contribui para o aumento da melhoria das características físicas, químicas e biológicas dos solos (BARROS; CALADO, 2011).

A prática da rotação de culturas traz sempre benefícios para a qualidade química e biológica do solo. A utilização da técnica contribui também para a redução de infestação de ervas daninhas nas áreas de plantio. Outro benefício importante da rotação é a diminuição de outros tipos de patógenos do solo e de pragas nos cultivos subsequentes. No entanto, a

prática ainda é pouco difundida, pela ausência de trabalhos na literatura e ineficiência dos serviços de extensão rural.

A rotação de culturas com objetivos fitossanitários, no caso nematológico, é feita incluindo-se o uso de plantas comerciais não-hospedeiras ou más-hospedeiras do nematoide-alvo ou leguminosas antagônicas a fitonematoides (MOURA; OLIVEIRA, 2009). São exemplos dessas plantas antagônicas *Crotalaria juncea* L. e mucuna-preta, ambas leguminosas (AMBROSIANO et al., 1997). Tais espécies botânicas que também funcionam como adubo verde, melhoram as características físicas, químicas e biológicas do solo, evitando o crescimento de plantas daninhas e erosões. Entretanto, são tóxicas a muitos animais, especialmente ruminantes, e devem ser utilizadas com cuidados especiais.

As plantas antagônicas atraem os juvenis dos fitonematoides, que são as formas jovens e migrantes, presentes no solo, para penetrarem suas raízes, por meio de um mecanismo de atração química. Uma vez no interior das raízes, os juvenis morrem devido à presença de um glicosídeo tóxico. No Nordeste brasileiro, a mucuna preta mucuna anã (*M. deeringiana* (Bort.) Merr.), feijão guandu (*Cajanus cajan* L. Millsp.), labe-labe (*Dolichos lab-lab* L.), feijão de porco (*Canavalia ensiformes* (L.) D.C.) e crotalária (*C. spectabilis* Roth), têm sido as mais indicadas, por apresentarem alta produtividade de fitomassa, precocidade fenológica e não favorecerem a incidência de pragas e doenças (GARRIDO, 2005). As citadas leguminosas devem ser incorporadas ao solo por ocasião da floração para o favorecimento do solo e para evitar que a mesma se torne uma invasora no campo de cultivo.

A espécie *Pratylenchus coffeae* é uma espécie polífaga, com uma ampla gama de hospedeiras (NGUYEN, 2010). Uma lista de plantas hospedeiras de *P. coffeae*, incluindo 128 espécies de plantas e variedades, foi publicado por Esser (1969) das quais aproximadamente 30 eram ornamentais. Recentemente, Jackson et al. (2003) relatam que a lista de hospedeiras de *P. coffeae* inclui mais de 250 espécies vegetais.

CAPÍTULO 2

Análise morfométrica e molecular de isolados de *Pratylenchus coffeae*, população inhame, ocorrentes no estado de Pernambuco

Vanessa Lopes Lira^{a,b}, Juliana Magrinelli Osório Rosa^c, Cláudio Marcelo Gonçalves de Oliveira^c, Idjane Santana de Oliveira^{a,b}, Romero Marinho de Moura^{a,b}

^a Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória. Alto do Reservatório, s/n. Vitória de Santo Antão – PE – CEP. 55.608-680, Brasil.

^b Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória. Alto do Reservatório, s/n. Vitória de Santo Antão – PE – CEP. 55.608-680, Brasil.

^c Instituto Biológico de Campinas. Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, 1.252, Campinas – SP – CEP 04014-002, Brasil.

Autor para correspondência

Prof. Romero Marinho de Moura
Email: romeromoura@yahoo.com.br
Universidade Federal de Pernambuco
Centro Acadêmico de Vitória – CAV
Rua Alto do Reservatório, s/n
Vitória de Santo Antão – PE CEP. 55.608-680

Artigo a ser submetido à revista Nematology
ISSN: 1388-5545

2.1 RESUMO

A taxonomia de *Pratylenchus coffeae* tem sido objeto de numerosos estudos por apresentar alta variabilidade morfológica intraespecífica e o que diversidade tem levado ao estabelecimento de novas espécies a exemplo, de *P. pseudocoffeae* e *P. jaehni* anteriormente consideradas *P. coffeae*. O objetivo do presente estudo foi caracterizar dez populações, de localidades diferentes, de *P. coffeae* ocorrentes no estado de Pernambuco, por meio de análises morfométricas e moleculares, procurando-se determinar em que categoria morfológica se enquadra tais populações e verificando se essas realmente pertencem à *P. coffeae*. A obtenção das populações foi realizada por meio de túberas de inhame da costa. A extração dos nematoides dos tecidos foi procedida pela flotação centrífuga, seguido das mensurações morfológicas, com auxílio de um microscópio fotônico, os caracteres usados para a diagnose foram o comprimento do corpo, largura, estilete, esôfago, cauda, valor “V”, “a”, “b” e “c”. Para análise estatística foram considerados os intervalos de confiança da média. Para identificação genética da espécie foi utilizada a técnica do código de barras com análise da região D2 e D3 do gene 28S do DNAr. A partir dos resultados morfométricos concluiu-se que as dez populações apresentaram mais de 70% de similaridade ao comparado com os dados descritos na literatura e na análise molecular todos os nematoides sequenciados apresentaram 100% de homologia para a espécie *P. coffeae* com as sequências do GenBank, confirmando assim a identificação positiva para a referida espécie. As variações morfométricas encontradas entre as dez populações de *P. coffeae* podem ter sido influenciadas pelo isolamento geográfico, plantas hospedeiras e também pela temperatura.

Palavras chaves: código de barras, micrometria, morfologia, nematoide das lesões

2.2 INTRODUÇÃO

Os nematoides das lesões radiculares pertencem ao gênero *Pratylenchus* e são reconhecidos como um dos maiores problemas em culturas de relevante importância econômica. Considerando os impactos econômicos mundiais, para diferentes culturas agrícolas, o gênero ocupa o segundo lugar entre todos os nematoides parasitas de plantas. Atualmente o gênero *Pratylenchus* é composto por 97 espécies válidas de distribuição mundial (HANDOO et al., 2008), agregando nematoides polívoros, que podem parasitar um amplo número de espécies vegetais (GOULART, 2008).

Os nematoides estão entre os organismos mais difíceis de serem identificados, por apresentarem tamanho diminuto ou dificuldade de observação de características-chaves para o diagnóstico em microscopia óptica convencional (OLIVEIRA et al., 2009). Em outros casos, a dificuldade ocorre pela semelhança entre as espécies e variabilidade morfológica intraespecífica (HANDOO, 2008).

Nas últimas décadas, técnicas moleculares têm sido desenvolvidas com intuito de facilitar a identificação de fitonemátodes, incluindo a reação de polimerização em cadeia (Polymerase Chain Reaction - PCR) para amplificar, detectar e comparar fragmentos de DNA. Recentemente, pesquisadores propuseram a técnica do Código de Barras de DNA que vem se tornando cada vez mais atraente para identificação de espécies em termos de custo, rapidez e objetividade. O princípio do uso de um código de barras genético seria o de que, em um pequeno trecho do genoma do organismo, específico para cada espécie, geralmente o DNA mitocondrial ou DNA ribossômico, existiria variação suficiente para separar as espécies que habitam o planeta atualmente, inclusive os nematoides parasitas de plantas (POWERS, 2004). O código de barras acelerará o ritmo da descoberta da espécie, permitindo que os taxonomistas possam rapidamente classificar amostras, destacando os táxons divergentes que podem representar novas espécies (HEBERT; GREGORY, 2005). Para nematoides do gênero *Pratylenchus*, a região genômica mais estudada é a D2/D3, situada no DNA ribossômico (SUBBOTIN et al., 2008).

Pratylenchus coffeae tem sido alvo de muitos estudos, principalmente no que diz respeito ao status taxonômico, devido populações da espécie apresentarem alta variabilidade morfológica e genética (DUNCAN et al., 1999). Em consequência, outras

espécies foram descritas a exemplo de *Pratylenchus pseudocoffeae* Mizukubo, *Pratylenchus loosi* Loof e *Pratylenchus jaehni* Inserra, Duncan, Troccoli, Dunn, Santos, Kaplan & Vovlas, anteriormente consideradas *P. coffeae* (INSERRA et al., 1996; 1998; 2001). Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi caracterizar morfológicamente e geneticamente dez populações de *Pratylenchus*, encontradas parasitando o inhame da costa em diferentes municípios produtores do Estado de Pernambuco, realizando assim a identificação da espécie.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Obtenção das populações de *Pratylenchus*

Para a obtenção das populações *Pratylenchus*, túberas comerciais de inhame da costa (*Dioscorea cayennensis* Lam.), infestadas pelo “nematóide das lesões”, foram coletada em dez diferentes cidades, a saber: Aliança (AL), Carpina 1 (CP1), Carpina 2 (CP2), Camaragibe (CM), Condado (CD), Feira-Nova (FN), Goiânia (GN), Lagoa de Itaenga 1 (LI1), Lagoa de Itaenga 2 (LI2), Paudalho (PA). Em seguida foram submetidas à extração de nematoides por meio da técnica de Jenkins (1964), obtendo, assim, a suspensão de nematoides, utilizados para a montagem temporária de lâminas de vidro, seguida das identificações morfológicas. Foram realizadas com base nas características morfológicas e micrométricas comparando-as com as descritas por Handoo e Golden (1989), e Duncan et al. (1999), como informação padrão. Foram feitas mensurações de nove variáveis morfológicas, apenas das fêmeas, utilizando-se dez espécimes por população.

2.3.2 Análise morfométrica

As variáveis morfológicas utilizadas foram: comprimento do corpo, maior largura do corpo, comprimento do estilete, comprimento do esôfago, comprimento da cauda, valor “a” (comprimento do corpo dividido pela maior largura), “b” (comprimento do corpo dividido pelo comprimento do esôfago), “c” (comprimento do corpo dividido pela cauda) e “V%” (distância da extremidade anterior à vulva, como porcentagem do comprimento total do corpo).

Para cada variável, foram calculadas as médias aritméticas (M), desvio padrão (DP) e intervalo de confiança da média (ICM). Como critério de comparação estatística das variáveis morfológicas obtidas foram considerados os intervalos de confiança das médias obtidas. A média que se enquadrasse no (ICM) da literatura descrita por Duncan et al.

(1999) para *P. coffeae* teria a variável a que se referia considerada comum às duas populações, portanto, sendo consideradas da mesma espécie e grupo. As lâminas das populações foram identificadas e as espécimes foram examinadas e documentadas em um sistema de aquisição de imagens digitais constituído por uma câmara digital LEICA, modelo ICC50 HD, montada sobre um microscópio LEICA, modelo DM 500, e acoplada a um microcomputador e o programa utilizado foi LAS EZ (Leica Application Suite).

2.3.3 Análise Molecular

2.3.3.1 Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico foi utilizado o método da Proteinase-K (HLB: *Holterman Lysis Buffer*), segundo Holterman et al. (2006). Separadamente um espécime de cada população de *Pratylenchus* foi selecionado e cortado ao meio (com auxílio de uma agulha) em uma gota de 25 µL HLB, centrifugados a 14.000 rpm e colocados em tubos de microcentrífuga, sendo incubados a 65 °C por 2 horas e 99 °C por 5 min. O lisado foi utilizado imediatamente ou armazenado a -20 C°.

2.3.3.2 Reação de PCR

Para a reação de PCR foi utilizado o *kit* de PCR tipo *Go Taq® Hot Start green Master Mix*, fabricante Promega Corporatin – São Paulo/SP. Em um tubo de microcentrífuga de 0,2 mL foi adicionado 12,5 µL *do Master Mix*, 10 µL de NFW (Nuclease Free Water), 1 µL do *primer* D2 (5'- ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3'), 1 µL do *primer* D3 (5'- TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'), 0,5 µL de DNA genômico, totalizando em um volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram utilizadas como descrito em Al-Banna et al. (2004): 95 °C por 3 minutos (1 ciclo), 35 ciclos a 95 °C por 1 minuto, 68 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto, seguido por extensão final a 72 °C por 7 minutos. Após a amplificação do DNA 5 µL do produto da PCR foram utilizados para eletroforese em tampão 1X TBE (SAMBROOK et al., 1989) em gel de agarose a 1% com 0,003 % de brometo de etídio (0,02 µg / mL) e visualizado em um transluminador de luz UV e fotografado. Os primers D2/D3 amplificaram sequência do gene do DNAr 28S em aproximadamente 740pb.

2.3.3.3 Sequenciamento e Identificação

Os sequenciamentos obtidos no presente trabalho foram realizados no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, SP. O sequenciamento dos fragmentos amplificados das regiões D2 / D3 foi feito utilizando o *kit* Big Dye Terminator, fabricante Applied Biosystems - São Paulo/SP. Para cada reação, foi preparada uma mistura contendo 2µL de reagente Big Dye, 3,2 mmol do *primer* D3, 3,0 µl do produto previamente amplificado contendo aproximadamente 400 ng de DNA e 2,0 mL de água. A reação para sequenciamento foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante (Applied Biosystems). Foi realizada nova purificação do produto amplificado por precipitação com isopropanol em microtubos. Após a desnaturação das amostras a 95 °C por 3 minutos foi realizada eletroforese em aparelho ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystem)¹

As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com auxílio do software BioEdit Sequence Alignment Editor. As sequência de *Pratylenchus* foram comparadas às sequências de outras espécies de nematoides depositadas no banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para a identificação de similaridade utilizando-se o programa BLASTN 2.2.19+ (ZHANG et al. 2000).

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Caracterização morfológica de *Pratylenchus coffeae*

As dez populações de *Pratylenchus sp.* oriundas de diferentes cidades de Pernambuco mostraram-se como anfimíticas, apresentando abundante presença de machos. Nas populações estudadas, os bulbos do estilete eram redondos (figura 2.1 A), as glândulas esofagianas sobrepostas à extremidade anterior do intestino, em posição ligeiramente lateral (figura 2.1 E). O poro excretor ficava próximo à junção esôfago-intestino (figura 2.1 E) e a caudas foram predominantemente hemisféricas (figura 2.1 D). A espermateca tinha a forma ligeiramente oval a redonda, normalmente contendo espermatozoides (figura 2.1 B). A vulva exibe contornos definidos, muitas vezes salientes (figura 2.1 D), e os ovários nos espécimes adultos ocupavam mais da metade do comprimento do corpo (figura 2.1 C). Todos os dados morfológicos estão de acordo com a descrição para a espécie *P. coffeae* apresentada por Siddiqi (2000).

2.4.2 Análise morfométrica de dez populações de *Pratylenchus coffeae*

Após a análise morfológica, a morfometria das fêmeas de dez populações de *Pratylenchus sp.*, obtidas de túberas comerciais de inhame da costa e coletadas em diferentes municípios do estado de Pernambuco, é apresentada na tabela 2.1 O comprimento do corpo das fêmeas, considerando todas as dez populações analisadas, variou de 550 a 900 μm (CV: 7,9). A maior largura do corpo apresentou amplitude de 20 a 50 μm (CV: 14,7), o estilete variou de 15 a 20 μm (CV: 8,0) de comprimento, incluindo os nódulos. Quanto ao esôfago, verificou-se uma amplitude de 70 a 130 μm (CV: 11,4). O comprimento da cauda variou de 30 a 47,5 μm (CV: 9,7). No que concerne às relações corporais, o valor “a” esteve entre 15 a 37,5 μm (CV: 15,5), o “b” entre 4,4 a 11,7 μm (CV: 14,5), o valor “c” entre 15,5 a 27,2 μm (CV: 9,9) e o valor “V” % variou de 71,7 a 90,0 μm (CV: 3,9).

Ao analisar a morfometria, todas as populações estudadas apresentaram diferenças para uma ou algumas variáveis morfométricas ao confrontá-las com os dados da literatura descrito por Duncan et al. (1999), a saber: a população de Paudalho (PA) das nove variáveis morfológicas observadas, três não se enquadraram sendo elas: a maior largura do corpo 36 μm , o comprimento do estilete 17,5 μm e o valor “V” 83,1 μm . Na população de Carpina 1 (CP1), foi diferente a maior largura corpo 41 μm , o comprimento do estilete 18 μm e o valor de “a” 19,3 μm . Para a população de Carpina 2 (CP2), não se enquadraram as seguintes variáveis: a maior largura do corpo 38 μm e o estilete 19,2 μm . A população de Lagoa de Itaenga 1 (LI1), apenas o estilete com 17,7 μm de comprimento não se enquadraram. Para a população de Lagoa de Itaenga 2 (LI2) apresentaram os respectivos valores, comprimento do estilete 19,5 μm , o comprimento da cauda 39,5 μm e o valor de V% 83,3 μm . Para a população da cidade de Camaragibe (CM), três variáveis não se enquadraram, sendo eles: o comprimento da largura 36 μm , o comprimento do estilete 17,5 μm e o valor de V% 83,1 μm . Na população de Goiânia foi apenas uma variável, a maior largura do corpo não se enquadraram apresentando 38 μm . A população de Feira Nova apenas o comprimento do estilete 17,5 μm . A população da cidade de Aliança foi diferente apenas para as variáveis: largura do corpo com 37 μm e o comprimento do estilete 18 μm e por último a população de Condado que variou apenas o estilete com 18 μm , conforme a tabela 2.

2.4.3 Análise Molecular das populações de *Pratylenchus*

As técnicas de biologia molecular utilizadas atualmente tem demonstrado ser uma ferramenta de relevante potencial em diversas áreas da Nematologia, inclusive na segura e correta identificação de nematoides parasitos de plantas. Nos estudos moleculares realizados no presente trabalho, a amplificação da região D2/D3 do gene do DNAr 28S das dez populações de *Pratylenchus* sp. dos diferentes municípios do estado de Pernambuco, produziu fragmentos de DNA de 747 pb. Em seguida, foi realizado o sequenciamento da referida região e alinhamento das sequências resultantes e já editadas com 404 pb usando o programa Blastn (Basic local alignment search tool nucleotide) do NCBI (National Center for Biotechnology Information). O alinhamento das sequências de DNA de cada população de *Pratylenchus* encontra-se apresentado na figura 2.2. Baseando-se na comparação a partir da expansão D2/D3 do gene 28S do DNAr das populações de *Pratylenchus* de Pernambuco, foi idêntica com as populações referente a espécie *P. coffeae* obtidas do GenBank, considerando e-value 0,0 e similaridade 100% para as dez populações usadas no presente estudo, concluiu-se que o nematoide em estudo se trata da espécie *P. coffeae*.

Em função do maior número de trabalhos que utilizaram a região D2/D3 de diferentes espécies de *Pratylenchus*, foi possível criar uma árvore filogenética (Figura 2.3) relacionando-se as populações de *P. coffeae* do presente estudo com aquelas depositadas no GenBank, no qual todas as populações permaneceram no mesmo grupo que a espécie *P. coffeae* (Y2), assim nomeada por Duncan et al. (1999), pertencendo a população inhome, confirmando assim a identificação da espécie.

2.5 DISCUSSÃO

Devido ao baixo número de caracteres morfológicos que podem ser observados à microscopia e a alta variabilidade intra-específica de alguns dos caracteres, é muito difícil identificar e separar espécies do gênero *Pratylenchus*, bem como caracterizar populações dentro de uma mesma espécie com base apenas em aspectos morfológicos.

A posição taxonômica de *P. coffeae* tem sido objeto de muitos estudos (INSERRA et al., 2001; MIZUKUBO, 1992; DUNCAN et al., 1999; RYSS, 2002a e VAN DEN BERG et al., 2005) devido a alta variabilidade genética e morfológica. No presente estudo, mais de 50% de todas as populações no geral apresentaram diferenças quanto ao comprimento da largura do corpo e 90% das populações estudadas apresentaram diferenças quanto ao comprimento do estilete. No entanto, 70% das demais variáveis do restante das populações,

enquadraram-se no respectivo sistema de Duncan, sendo consideradas, portanto, da mesma espécie e grupo, confirmando morfologicamente a espécie *P. coffeae* (Y2), demonstrando que os mesmos apresentaram alto grau de semelhança com os descritos na literatura (DUNCAN et al., 1999; GONZAGA, 2006 e INSERRA, et al., 2001). As diferenças morfológicas existentes podem ser consideradas variações normais ocorrentes em indivíduos de uma mesma população de *P. coffeae*.

A forma da espermateca das fêmeas, de acordo com Ryss (2002) é a melhor característica utilizada para distinguir espécies do gênero *Pratylenchus*, devido à redução da espermateca, ocorrido em cinco etapas transitórias, de espécies anfimíticas para partenogênicas. A partir da espermateca foi possível a separação da espécie *P. coffeae* de *P. loosi*, como mostra estudo feito por Pourjame et al. (1997 a).

O comprimento e a forma da cauda da espécie *P. coffeae*, de acordo com a literatura (NGUYEN, 2010) pode ter alta variabilidade. No presente estudo tal fato não ocorreu, apresentando apenas a forma hemisférica.

O comprimento do estilete e o valor “V”, foram utilizados para distinção de *P. jaehni* das espécies *P. coffeae* e *P. loosi*, como mostrado por Inserra et al. (2001). Para as populações de Pernambuco o coeficiente de variação do estilete foi 8%. No entanto, o menor coeficiente de variação das populações ora estudadas foi para o valor “V” (3,7%), semelhante ao estudo feito por Nguyen (2010) que ao analisar a morfometria de dez populações de *P. coffeae* do Vietnã, constatou um coeficiente de variação também baixo para o valor “V” (3,1%). Para todas as variáveis morfológicas taxonômicas analisadas nas populações de Pernambuco, o coeficiente de variação foi alto.

Doucet et al. (1996; 2001), apresentaram explicações para tais variabilidades morfológicas, indicando que podem ocorrer por influências do isolamento geográfico da espécie, interação com plantas hospedeiras e também pela temperatura do solo na biologia do nematoide.

Os resultados obtidos a partir da aplicação da técnica do código de barras utilizando-se a região D2/D3 do gene do DNAr 28S mostrou-se como uma ferramenta segura para a identificação das espécies em estudo, identificando-as todas como *P. coffeae* e estando todas intimamente relacionadas com as sequências das populações de *P. coffeae* obtidas a partir do GenBank, conforme valores de e-value e alta taxa de homologia entre as sequências – 100% de similaridade.

Nguyen (2010) estudou 10 populações de *P. coffeae* do Vietnã usando a mesma região D2/D3 do gene DNAr 28S e obteve produtos de sequenciamento com 759pb usando os primers D2 e D3. O autor encontrou entre as populações estudadas similaridade de mais

de 99%, com exceção de uma de população do Gana, que apresentou diferenças em 18 dos 23 sítios distintos diferenciadores entre as populações do Genbank e as populações do Vietnã.

A técnica, mesmo ainda não estando em uso rotineiro em laboratórios, pois foi recentemente introduzida na comunidade científica, apresenta-se muito eficiente e de grande préstimo para a diagnose de fitonematoides, além de também ser uma poderosa ferramenta para a taxonomia e pesquisa da biodiversidade (HAJIBABAEI et al., 2007) já que se baseia em sequenciar um pequeno trecho do genoma do organismo específico pra cada espécie, mantendo segura a identificação até mesmo de espécies danificadas, com a morfologia alterada devido a anidrobiose (OLIVEIRA et al., 2009).

O ideal para uma segura identificação de nematoides é necessária a complementação dos dados moleculares aos morfológicos, de acordo com o conceito proposto pela taxonomia polifásica e integrativa (PIRES; MARINOMI, 2010). A exemplo de Duncan et al. (1999), que ao realizar um estudo morfométrico e molecular por meio do sequenciamento da região D2/D3 do DNA ribossômico e RAPD, tendo por objetivo estimar as relações filogenéticas entre 33 populações originalmente caracterizadas como *Pratylenchus coffeae*, *P. loosi*, *P. pseudocoffeae* e *P. gutierrezii*, observaram que as populações apresentavam alta diferença, tanto morfológica como molecular, podendo ser separadas em pelo menos sete grupos. Isto sugeriu que devido ao fato de algumas espécies serem muito distintas de outras de diferentes localidades, provavelmente eram espécies não descritas ou complexos de espécies, algo que mais tarde foi comprovado por Inserra et al. (2001), descrevendo a espécie *P. jaehni*, anteriormente considerada *P. coffeae*. No entanto, Subbotin et al., (2008) considerou a espécie *P. coffeae* sendo monofilética.

2.6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo auxílio financeiro.

2.7 REFERÊNCIAS

DOUCET, M.; PINOCHET, J.; DI RIENZO, J. A. Comparative analysis of morphological and morphometrical characters in six isolates of *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen, 1951 (Nemata: Tylenchida). **Fundamental Applied Nematology**, Paris, v. 19, n. 1, p. 79-84, 1996.

DOUCET, M. et al. Temperature induced morphometrical variability in an isolate of *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen, 1951 (Nematoda: Tylenchida). **Nematology**, Leiden, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2001.

DUNCAN, L. W. et al. Molecular and morphological analysis of isolates of *Pratylenchus coffeae* and closely related species. **Nematropica**, Florida, v. 29, p. 61-80, 1999.

GONZAGA, V. **Caracterização morfológica, morfométrica e multiplicação in vitro das seis espécies mais comuns de *pratylenchus filipjev*, 1936 que ocorrem no Brasil**. 79 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

GOULART, A. M. C. Aspectos gerais sobre nematoides-das-lesões-radiculares (gênero *Pratylenchus*). Embrapa Cerrados, Planaltina. (Documentos 219), 30p., 2008.

HAJIBABAEI, M. et al. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **Trends Genet**, v. 23, p. 167-172, 2007.

HANDOO, Z. A.; GOLDEN, A. M. A key and diagnostic compendium to the species of the genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (lesion nematodes). **Journal of Nematology**, Lawrence, v. 21, n. 2, p. 202-218, 1989.

HANDOO, Z. A.; CARTA, L. K.; SKANTAR, A. M. Taxonomy, Morphology and Phylogenetics of Coffee-Associated Root-Lesion Nematodes, *Pratylenchus* spp. **Plant-Parasitic Nematodes of Coffee**, p. 29-50, 2008.

HEBERT, P. D. N.; GREGORY, T. R. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. **Systematic Biology**, v. 54, n. 2, p. 852-859, 2005.

HOLTERMAN, M. et al. Phylum-wide analysis of SSU DNAr reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 9, p. 406-416, 2006.

INSERRA, R. N. et al. *Pratylenchus loosi* from pasture grasses in Central Florida. **Nematologica**, v. 42, n. p. 159-172, 1996.

INSERRA, R.N. et al. *Pratylenchus pseudocoffeae* from Florida and its relationship with *P. gutierrezii* and *P. coffeae*. **Nematologica**, v. 42, n., p. 683-712, 1998.

INSERRA, R. N. et al. *Pratylenchus jaehni* sp. n. from citrus in Brazil and its relationship with *P. coffeae* and *P. loosi* (Nematoda: Pratylenchidae). **Nematology**, Leiden, v. 3, n. 7, p. 653-665, 2001.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from Soil. **Plant Disease Report**, v. 48, p. 692, 1964.

MIZUKUBO, T. Morphological and statistical differentiation of *Pratylenchus coffeae* complex in Japan (Nematoda: Pratylenchidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 27, p. 213-224, 1992.

NGUYEN, T. T. A **comparative polyphasic study of 10 pratylenchus coffeae populations from vietnam**. 163 f. Tese (Doutorado) - Ghent University, Ghent, 2010.

OLIVEIRA, C. M. G. et al. Diagnose de *Aphelenchoides fragariae* e *Pratylenchus* spp. pela Aplicação da Tecnologia do Código de Barras do DNA. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 33, n. 3, p. 218-225, 2009.

PIRES, A. C.; MARINONI, L. DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. **Biota Neotropica**, v.10, p. 339-346, 2010.

POURJAME, E.; KHEIRI, A.; GERAERT, E. The genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (Tylenchida: Pratylenchidae) from North of Iran. **Journal Mededelingen** - Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent, v. 62 , n., 3a p. 741-756, 1997a.

POWERS, T. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42: p. 367-383, 2004.

RYSS, A. Y. Genus *Pratylenchus* Filipjev: multientry and monoentry keys and diagnostic relationships (Nematoda:Tylenchida:Pratylenchidae). **Zoosystemat Ross**, v. 10, p. 241-255, 2002a.

RYSS, A. Y. Phylogeny and evolution of the genus *Pratylenchus* according to morphological data (Nematoda: Tylenchida). **Zoosystematica Rossica**, v. 10, p. 257- 273, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Composition of the electrophoresis buffer. In: FORD, N.; NOLAN, C.; FERGUSON, M.; OCKLER, M. (ed). **Molecular Cloning, a Laboratory Manual**. Cold Sprig Harbor Laboratory Press, New York - EUA, p. 66-67, 1989.

SIDDIQI, M. R. **Tylenchida parasites of plants and insects**. 2.ed. Wallingford: Cab International, 2000.

SUBBOTIN, S. A. et al. A phylogenetic framework for root lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda): Evidence from 18S and D2-D3 expansion segments of 28S ribosomal RNA genes and morphological characters. **Mol. Phylogenet. Evol**, v. 48, n., p. 491-505, 2008

VAN DEN BERG, E.; QUENEHERVE, P.; TIEDI, L. R. Six known plant-feeding nematodes from Guadeloupe. Martinique and French Guiana (Nemata: Tylenchina). **Journal Nematode Morphol Systemat**, v. 7, p. 109-129, 2005.

ZHANG, Z. et al. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7, n. 1-2, p. 203-214, 2000.

2.8 TABELAS E FIGURAS

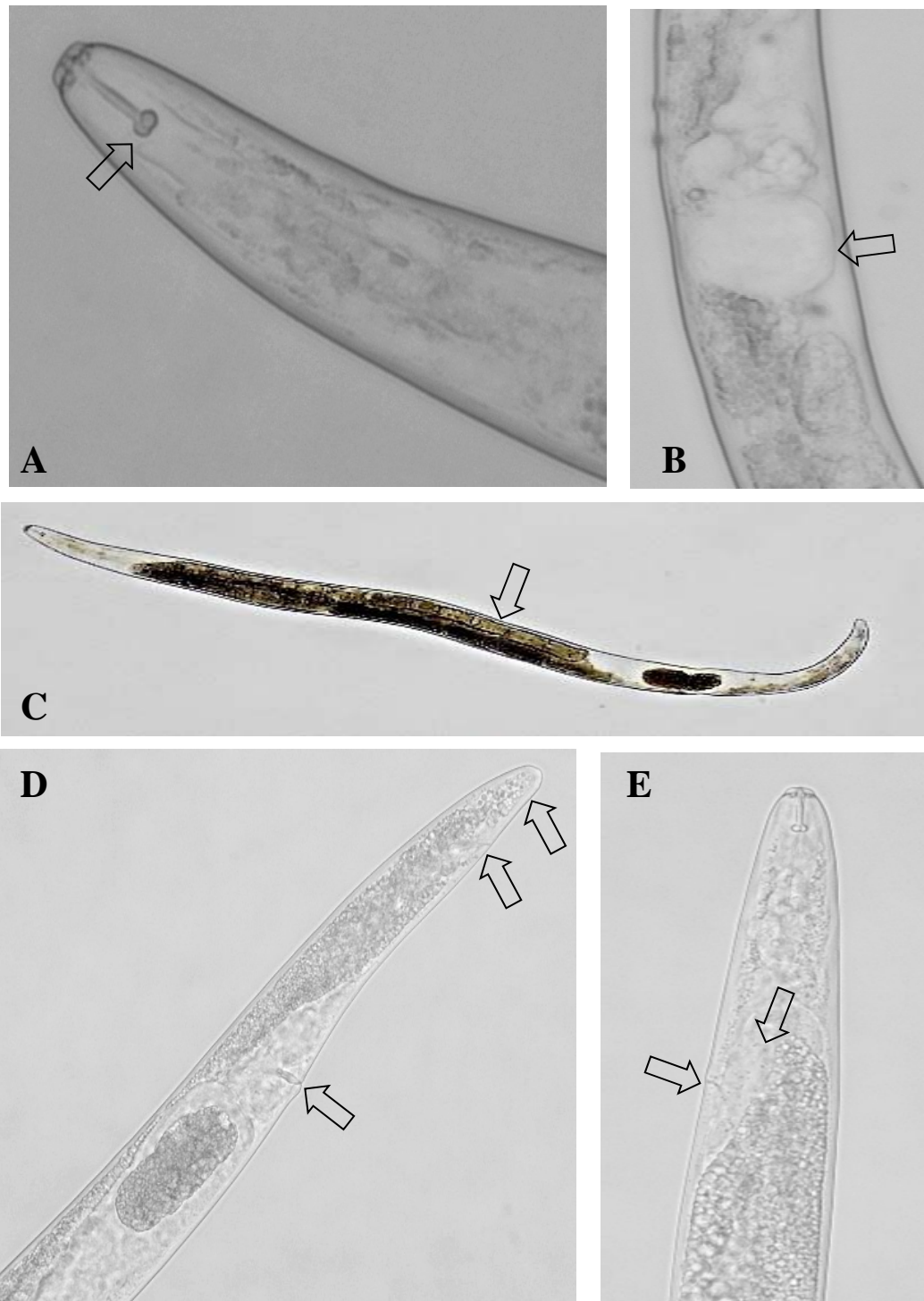


Fig. 2.1 Fotomicrografia dos caracteres morfológicos utilizados para identificação de *Pratylenchus coffeae*. A) Bulbos do estilete exibindo uma forma arredondada (seta). B) Espermateca funcional ovalada (seta). C) Ovário (seta). D) *P. coffeae* fêmea, indicando a posição da vulva, cauda hemisférica e ânus (seta). E) Poro excretor e glândula esofagiana (seta).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
CMB-D3  GCACTTTGAAGAGAGAGTTAAA GAGGAC GTGAAACC GATGAGAT GGAAACGGAC AGAGCTAGC GTAICTGG CCTGCAT 78
ALA-D3  GCACTTTGAAGAGAGAGTTAAA GAGGAC GTGAAACC GATGAGAT GGAAACGGAC AGAGCTAGC GTAICTGG CCTGCAT 78
CF1A-D3 GCACTTTGAAGAGAGAGTTAAA GAGGAC GTGAAACC GATGAGAT GGAAACGGAC AGAGCTAGC GTAICTGG CCTGCAT 78
CF1B-D3 GCACTTTGAAGAGAGAGTTAAA GAGGAC GTGAAACC GATGAGAT GGAAACGGAC AGAGCTAGC GTAICTGG CCTGCAT 78
CF2A-D3 GCACTTTGAAGAGAGAGTTAAA GAGGAC GTGAAACC GATGAGAT GGAAACGGAC AGAGCTAGC GTAICTGG CCTGCAT 78
CF2B-D3 GCACTTTGAAGAGAGAGTTAAA GAGGAC GTGAAACC GATGAGAT GGAAACGGAC AGAGCTAGC GTAICTGG CCTGCAT 78
FNA-D3  GCACTTTGAAGAGAGAGTTAAA GAGGAC GTGAAACC GATGAGAT GGAAACGGAC AGAGCTAGC GTAICTGG CCTGCAT 78
GNA-D3  GCACTTTGAAGAGAGAGTTAAA GAGGAC GTGAAACC GATGAGAT GGAAACGGAC AGAGCTAGC GTAICTGG CCTGCAT 78
GNB-D3  GCACTTTGAAGAGAGAGTTAAA GAGGAC GTGAAACC GATGAGAT GGAAACGGAC AGAGCTAGC GTAICTGG CCTGCAT 78
LI1A-D3 GCACTTTGAAGAGAGAGTTAAA GAGGAC GTGAAACC GATGAGAT GGAAACGGAC AGAGCTAGC GTAICTGG CCTGCAT 78
LI1B-D3 GCACTTTGAAGAGAGAGTTAAA GAGGAC GTGAAACC GATGAGAT GGAAACGGAC AGAGCTAGC GTAICTGG CCTGCAT 78
LI2A-D3 GCACTTTGAAGAGAGAGTTAAA GAGGAC GTGAAACC GATGAGAT GGAAACGGAC AGAGCTAGC GTAICTGG CCTGCAT 78
FA1A-D3 GCACTTTGAAGAGAGAGTTAAA GAGGAC GTGAAACC GATGAGAT GGAAACGGAC AGAGCTAGC GTAICTGG CCTGCAT 78
FA1B-D3 GCACTTTGAAGAGAGAGTTAAA GAGGAC GTGAAACC GATGAGAT GGAAACGGAC AGAGCTAGC GTAICTGG CCTGCAT 78
FA2A-D3 GCACTTTGAAGAGAGAGTTAAA GAGGAC GTGAAACC GATGAGAT GGAAACGGAC AGAGCTAGC GTAICTGG CCTGCAT 78

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
CMB-D3  TCAGCT-TGTGCGGTCGCTACCGATGAAT C6CTGATCTCCAGATTGGGACTG ITGACTAGTCGGT-CGGTGGCTGTATAG 156
ALA-D3  TCAGCT-TGTGCGGTCGCTACCGATGAAT C6CTGATCTCCAGATTGGGACTG ITGACTAGTCGGT-CGGTGGCTGTATAG 156
CF1A-D3 TCAGCT-TGTGCGGTCGCTACCGATGAAT C6CTGATCTCCAGATTGGGACTG ITGACTAGTCGGT-CGGTGGCTGTATAG 156
CF1B-D3 TCAGCT-TGTGCGGTCGCTACCGATGAAT C6CTGATCTCCAGATTGGGACTG ITGACTAGTCGGT-CGGTGGCTGTATAG 156
CF2A-D3 TCAGCT-TGTGCGGTCGCTACCGATGAAT C6CTGATCTCCAGATTGGGACTG ITGACTAGTCGGT-CGGTGGCTGTATAG 156
CF2B-D3 TCAGCT-TGTGCGGTCGCTACCGATGAAT C6CTGATCTCCAGATTGGGACTG ITGACTAGTCGGT-CGGTGGCTGTATAG 156
FNA-D3  TCAGCT-TGTGCGGTCGCTACCGATGAAT C6CTGATCTCCAGATTGGGACTG ITGACTAGTCGGT-CGGTGGCTGTATAG 156
GNA-D3  TCAGCT-TGTGCGGTCGCTACCGATGAAT C6CTGATCTCCAGATTGGGACTG ITGACTAGTCGGT-CGGTGGCTGTATAG 156
GNB-D3  TCAGCT-TGTGCGGTCGCTACCGATGAAT C6CTGATCTCCAGATTGGGACTG ITGACTAGTCGGT-CGGTGGCTGTATAG 156
LI1A-D3 TCAGCT-TGTGCGGTCGCTACCGATGAAT C6CTGATCTCCAGATTGGGACTG ITGACTAGTCGGT-CGGTGGCTGTATAG 156
LI1B-D3 TCAGCT-TGTGCGGTCGCTACCGATGAAT C6CTGATCTCCAGATTGGGACTG ITGACTAGTCGGT-CGGTGGCTGTATAG 156
LI2A-D3 TCAGCT-TGTGCGGTCGCTACCGATGAAT C6CTGATCTCCAGATTGGGACTG ITGACTAGTCGGT-CGGTGGCTGTATAG 156
FA1A-D3 TCAGCT-TGTGCGGTCGCTACCGATGAAT C6CTGATCTCCAGATTGGGACTG ITGACTAGTCGGT-CGGTGGCTGTATAG 156
FA1B-D3 TCAGCT-TGTGCGGTCGCTACCGATGAAT C6CTGATCTCCAGATTGGGACTG ITGACTAGTCGGT-CGGTGGCTGTATAG 156
FA2A-D3 TCAGCT-TGTGCGGTCGCTACCGATGAAT C6CTGATCTCCAGATTGGGACTG ITGACTAGTCGGT-CGGTGGCTGTATAG 156

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
CMB-D3  TGCAT-TTGCAGG-TGGAGTG CGTCGAGG CATCCGGGATGGCGGCAT GAACTCAG-CTTTGAGGCCAGCTTGC 226
ALA-D3  TGCAT-TTGCAGG-TGGAGTG CGTCGAGG CATCCGGGATGGCGGCAT GAACTCAG-CTTTGAGGCCAGCTTGC 226
CF1A-D3 TGCAT-TTGCAGG-TGGAGTG CGTCGAGG CATCCGGGATGGCGGCAT GAACTCAG-CTTTGAGGCCAGCTTGC 226
CF1B-D3 TGCAT-TTGCAGG-TGGAGTG CGTCGAGG CATCCGGGATGGCGGCAT GAACTCAG-CTTTGAGGCCAGCTTGC 226
CF2A-D3 TGCAT-TTGCAGG-TGGAGTG CGTCGAGG CATCCGGGATGGCGGCAT GAACTCAG-CTTTGAGGCCAGCTTGC 226
CF2B-D3 TGCAT-TTGCAGG-TGGAGTG CGTCGAGG CATCCGGGATGGCGGCAT GAACTCAG-CTTTGAGGCCAGCTTGC 226
FNA-D3  TGCAT-TTGCAGG-TGGAGTG CGTCGAGG CATCCGGGATGGCGGCAT GAACTCAG-CTTTGAGGCCAGCTTGC 226
GNA-D3  TGCAT-TTGCAGG-TGGAGTG CGTCGAGG CATCCGGGATGGCGGCAT GAACTCAG-CTTTGAGGCCAGCTTGC 226
GNB-D3  TGCAT-TTGCAGG-TGGAGTG CGTCGAGG CATCCGGGATGGCGGCAT GAACTCAG-CTTTGAGGCCAGCTTGC 226
LI1A-D3 TGCAT-TTGCAGG-TGGAGTG CGTCGAGG CATCCGGGATGGCGGCAT GAACTCAG-CTTTGAGGCCAGCTTGC 226
LI1B-D3 TGCAT-TTGCAGG-TGGAGTG CGTCGAGG CATCCGGGATGGCGGCAT GAACTCAG-CTTTGAGGCCAGCTTGC 226
LI2A-D3 TGCAT-TTGCAGG-TGGAGTG CGTCGAGG CATCCGGGATGGCGGCAT GAACTCAG-CTTTGAGGCCAGCTTGC 226
FA1A-D3 TGCAT-TTGCAGG-TGGAGTG CGTCGAGG CATCCGGGATGGCGGCAT GAACTCAG-CTTTGAGGCCAGCTTGC 226
FA1B-D3 TGCAT-TTGCAGG-TGGAGTG CGTCGAGG CATCCGGGATGGCGGCAT GAACTCAG-CTTTGAGGCCAGCTTGC 226
FA2A-D3 TGCAT-TTGCAGG-TGGAGTG CGTCGAGG CATCCGGGATGGCGGCAT GAACTCAG-CTTTGAGGCCAGCTTGC 226

```

Fig. 2.2 Alinhamento da região D2/D3 da sequência do gene 28S DNAr da espécie *Pratylenchus coffeae* população de Pernambuco.

```

      280      290      300      310      320      330      340      350      360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CME-D3  -TGGT-----ACCCGGGC-TGGGGGACTTTGTGCTGTTTCGT-TCIGGGTGT-----TCACACA-CAATTGAAGGGGGCCTTTGG 295
ALA-D3  -TGGT-----AeCCGGGC-TGGGGGACTTTGTGCTGTTTCGT-TCIGGGTGT-----TCACACA-CAATTGAAGGGGGCCTTTGG 295
CP1A-D3 -TGGT-----AeCCGGGC-TGGGGGACTTTGTGCTGTTTCGT-TCIGGGTGT-----TCACACA-CAATTGAAGGGGGCCTTTGG 295
CP1B-D3 -TGGT-----ACCCGGGC-TGGGGGACTTTGTGCTGTTTCGT-TCIGGGTGT-----TCACACA-CAATTGAAGGGGGCCTTTGG 295
CP2A-D3 -TGGT-----ACCCGGGC-TGGGGGACTTTGTGCTGTTTCGT-TCIGGGTGT-----TCACACA-CAATTGAAGGGGGCCTTTGG 295
CP2B-D3 -TGGT-----ACCCGGGC-TGGGGGACTTTGTGCTGTTTCGT-TCIGGGTGT-----TCACACA-CAATTGAAGGGGGCCTTTGG 295
FNA-D3  -TGGT-----ACCCGGGC-TGGGGGACTTTGTGCTGTTTCGT-TCIGGGTGT-----TCACACA-CAATTGAAGGGGGCCTTTGG 295
GNA-D3  -TGGT-----ACCCGGGC-TGGGGGACTTTGTGCTGTTTCGT-TCIGGGTGT-----TCACACA-CAATTGAAGGGGGCCTTTGG 295
GNB-D3  -TGGT-----ACCCGGGC-TGGGGGACTTTGTGCTGTTTCGT-TCIGGGTGT-----TCACACA-CAATTGAAGGGGGCCTTTGG 295
LI1A-D3 -TGGT-----ACCCGGGC-TGGGGGACTTTGTGCTGTTTCGT-TCIGGGTGT-----TCACACA-CAATTGAAGGGGGCCTTTGG 295
LI1B-D3 -TGGT-----ACCCGGGC-TGGGGGACTTTGTGCTGTTTCGT-TCIGGGTGT-----TCACACA-CAATTGAAGGGGGCCTTTGG 295
LI2A-D3 -TGGT-----ACCCGGGC-TGGGGGACTTTGTGCTGTTTCGT-TCIGGGTGT-----TCACACA-CAATTGAAGGGGGCCTTTGG 295
PA1A-D3 -TGGT-----ACCCGGGC-TGGGGGACTTTGTGCTGTTTCGT-TCIGGGTGT-----TCACACA-CAATTGAAGGGGGCCTTTGG 295
PA1B-D3 -TGGT-----ACCCGGGC-TGGGGGACTTTGTGCTGTTTCGT-TCIGGGTGT-----TCACACA-CAATTGAAGGGGGCCTTTGG 295
PA2A-D3 -TGGT-----ACCCGGGC-TGGGGGACTTTGTGCTGTTTCGT-TCIGGGTGT-----TCACACA-CAATTGAAGGGGGCCTTTGG 295

      370      380      390      400      410      420      430      440      450
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CME-D3  TAGGGTGCCGAGCTGGGTGTCGGTGGCCGGT-CGCTTGCACACGTACTGTGCA-CACAGTTCGGTCCCT-TGCC--GAGCTCACTC-C-- 376
ALA-D3  TAGGGTGCCGAGCTGGGTGTCGGTGGCCGGT-CGCTTGCACACGTACTGTGCA-CACAGTTCGGTCCCT-TGcC--GAGCTCACTc-e-C-- 376
CP1A-D3 TAGGGTGCCGAGCTGGGTGTCGGTGGCCGGT-CGCTTGCACACGTACTGTGCA-CACAGTTCGGTCCCT-TGCC--GAGCTCACTC-C-- 376
CP1B-D3 TAGGGTGCCGAGCTGGGTGTCGGTGGCCGGT-CGCTTGCACACGTACTGTGCA-CACAGTTCGGTCCCT-TGCC--GAGCTCACTC-C-- 376
CP2A-D3 TAGGGTGCCGAGCTGGGTGTCGGTGGCCGGT-CGCTTGCACACGTACTGTGCA-CACAGTTCGGTCCCT-TGCC--GAGCTCACTC-C-- 376
CP2B-D3 TAGGGTGCCGAGCTGGGTGTCGGTGGCCGGT-CGCTTGCACACGTACTGTGCA-CACAGTTCGGTCCCT-TGCC--GAGCTCACTC-C-- 376
FNA-D3  TAGGGTGCCGAGCTGGGTGTCGGTGGCCGGT-CGCTTGCACACGTACTGTGCA-CACAGTTCGGTCCCT-TGCC--GAGCTCACTC-C-- 376
GNA-D3  TAGGGTGCCGAGCTGGGTGTCGGTGGCCGGT-CGCTTGCACACGTACTGTGCA-CACAGTTCGGTCCCT-TGCC--GAGCTCACTC-C-- 376
GNB-D3  TAGGGTGCCGAGCTGGGTGTCGGTGGCCGGT-CGCTTGCACACGTACTGTGCA-CACAGTTCGGTCCCT-TGCC--GAGCTCACTC-C-- 376
LI1A-D3 TAGGGTGCCGAGCTGGGTGTCGGTGGCCGGT-CGCTTGCACACGTACTGTGCA-CACAGTTCGGTCCCT-TGCC--GAGCTCACTC-C-- 376
LI1B-D3 TAGGGTGCCGAGCTGGGTGTCGGTGGCCGGT-CGCTTGCACACGTACTGTGCA-CACAGTTCGGTCCCT-TGCC--GAGCTCACTC-C-- 376
LI2A-D3 TAGGGTGCCGAGCTGGGTGTCGGTGGCCGGT-CGCTTGCACACGTACTGTGCA-CACAGTTCGGTCCCT-TGCC--GAGCTCACTC-C-- 376
PA1A-D3 TAGGGTGCCGAGCTGGGTGTCGGTGGCCGGT-CGCTTGCACACGTACTGTGCA-CACAGTTCGGTCCCT-TGCC--GAGCTCACTc-e-C-- 376
PA1B-D3 TAGGGTGCCGAGCTGGGTGTCGGTGGCCGGT-CGCTTGCACACGTACTGTGCA-CACAGTTCGGTCCCT-TGCC--GAGCTCACTC-C-- 376
PA2A-D3 TAGGGTGCCGAGCTGGGTGTCGGTGGCCGGT-CGCTTGCACACGTACTGTGCA-CACAGTTCGGTCCCT-TGCC--GAGCTCACTC-C-- 376

      460      470      480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CME-D3  ATCTATC-TCGGCGTAAAAGCT-G---GTCATC 404
ALA-D3  AeTATC-TCGgCGTAAAagCT-g---gCaTC 404
CP1A-D3 ATCTATC-TCGGCGTAAAAGCT-G---GTCATC 404
CP1B-D3 ATCTATC-TCGGCGTAAAAGCT-G---GTCATC 404
CP2A-D3 ATCTATC-TCGGCGTAAAAGCT-G---GTCATC 404
CP2B-D3 ATCTATC-TCGGCGTAAAAGCT-G---GTCATC 404
FNA-D3  ATCTATC-TCGGCGTAAAAGCT-G---GTCATC 404
GNA-D3  ATCTATC-TCGGCGTAAAAGCT-G---GTCATC 404
GNB-D3  ATCTATC-TCGGCGTAAAAGCT-G---GTCATC 404
LI1A-D3 ATCTATC-TCGGCGTAAAAGCT-G---GTCATC 404

```

Fig. 2.2 Continuação.



Fig. 2.3 Relação filogenética de *Pratylenchus coffeae* população inhome e sua similaridade com populações obtidas do GenBank baseados no alinhamento da sequência da região D2/D3 28S DNAr.

Tabela 2.1 Medidas em μm e variáveis derivadas de fêmeas de populações de *Pratylenchus coffeae* coletada em túberas de inhame-da-costa (*Dioscorea cayennensis*), em diferentes Municípios do Estado de Pernambuco. Estatística incluindo média ($n=10$) \pm desvio padrão e intervalo de confiança da média.

Populações <i>P. coffeae</i>	Comprimento do corpo	Comprimento da largura	Comprimento do estilete	Comprimento do esfôfago	Comprimento da cauda	a	b	c	V%
PA	770,0 \pm 65,4 732,8-807,1	36,0 \pm 5,1 32,30-39,6	17,5 \pm 1,6 16,3-18,6	104,0 \pm 11,7 95,6-112,3	37,5 \pm 2,3 35,8-39,1	21,7 \pm 3,0 19,5-23,8	7,3 \pm 1,0 6,5-8,0	20,5 \pm 1,5 19,4-21,5	83,1 \pm 5,3 79,3-86,8
CP1	790,0 \pm 64,7 743,7-836,2	41,0 \pm 3,1 38,7-43,2	18,0 \pm 1,9 16,6-19,3	98,0 \pm 18,1 85,0-110,9	35,7 \pm 6,2 31,2-40,1	19,3 \pm 1,5 18,2-20,3	8,3 \pm 2,0 6,8-9,7	22,4 \pm 2,6 20,5-24,2	82,8 \pm 1,9 79,0-86,5
CP2	760,0 \pm 89,9 695,6-824,3	36 \pm 4,2 34,9-41,0	19,2 \pm 1,2 18,3-20,0	96 \pm 14,2 85,8-106,1	35,2 \pm 1,8 33,9-36,4	20,2 \pm 3,5 17,6-22,7	8,0 \pm 1,6 6,8-9,1	21,5 \pm 2,5 19,7-23,2	80,8 \pm 2,4 79,0-82,5
LI1	690,0 \pm 69,9 639,9-740,0	30 \pm 4,7 26,6-33,3	17,7 \pm 0,7 17,1-18,2	109,0 \pm 11,0 101,1-116,8	33,5 \pm 3,1 31,2-35,7	23,2 \pm 2,5 21,4-24,9	6,3 \pm 0,8 5,7-6,8	20,6 \pm 2,0 19,1-22,0	82,0 \pm 3,3 79,3-84,3
LI2	712,0 \pm 42,8 681,3-742,6	35,0 \pm 5,2 31,2-38,7	19,5 \pm 1,0 18,7-20,2	96,0 \pm 11,7 87,6-104,3	39,5 \pm 5,1 35,8-43,1	20,8 \pm 3,8 18,0-23,5	7,5 \pm 0,9 6,8-8,1	18,2 \pm 1,7 16,9-19,4	83,3 \pm 3,6 80,7-85,8
CM	770,0 \pm 65,4 703,2-816,7	36,0 \pm 5,1 32,3-39,6	17,5 \pm 1,6 16,3-18,6	104,0 \pm 11,7 95,6-112,3	37,5 \pm 2,3 35,8-39,1	21,7 \pm 3,0 19,5-23,8	7,3 \pm 1,0 6,5-8,0	20,5 \pm 1,5 19,4-21,5	83,1 \pm 5,3 79,3-86,8
GN	750,0 \pm 42,4 716,6-780,3	38,0 \pm 4,2 34,9-41,0	16,7 \pm 1,2 15,8-17,5	100,0 \pm 10,5 92,4-107,5	36,2 \pm 2,9 34,1-38,2	19,9 \pm 2,2 18,3-21,4	7,5 \pm 0,8 6,9-8,0	20,8 \pm 2,0 19,3-22,2	81,2 \pm 2,9 79,1-83,2
FN	742,5 \pm 65,6 695,5-789,4	29 \pm 5,6 24,9-33,0	17,5 \pm 1,4 16,4-18,5	105,0 \pm 10,8 97,2-112,7	33,2 \pm 3,5 30,6-35,7	26,5 \pm 6,0 22,2-30,7	7,1 \pm 1,0 6,3-7,8	22,5 \pm 2,7 20,5-24,4	81,3 \pm 3,6 78,7-83,8
AL	737,5 \pm 63,7 691,9-783,0	37,0 \pm 9,4 30,2-43,7	18,0 \pm 1,0 17,2-18,7	105,0 \pm 7,0 99,9-110,0	36,5 \pm 2,4 34,7-38,2	20,9 \pm 5,1 17,2-24,5	7,0 \pm 0,8 6,4-7,5	20,2 \pm 1,1 19,4-20,9	80,2 \pm 3,1 77,9-82,4
CD	757,5 \pm 37,3 730,8-784,1	34,0 \pm 5,1 30,3-37,6	16,0 \pm 1,5 16,9-19,0	102,0 \pm 9,1 95,4-108,5	36,7 \pm 3,3 34,3-39,0	22,1 \pm 2,5 20,3-23,8	7,4 \pm 0,6 6,9-7,8	20,7 \pm 2,0 19,2-22,1	80,0 \pm 2,0 78,5-81,4
Coefficiente de variação	7,9	14,7	8,0	11,4	9,7	15,5	14,5	9,9	3,7
DUNCAN et al., 1999	725 \pm 13,8 588,5-821,0	30,1 \pm 0,49 27,0-35,0	16,5 \pm 0,09 15,5-17,0	97,9 \pm 1,7 87,0-116,5	35,4 \pm 0,6 30,0-39,0	24,2 \pm 0,36 19,6-27,0	7,4 \pm 0,16 6,1-8,9	20,6 \pm 0,5 17,3-24,8	81,3 \pm 0,29 79,0-83,0

a = comprimento do corpo dividido pelo maior comprimento da largura; b= comprimento do corpo dividido pelo comprimento do esfôfago; c= Comprimento do corpo dividido pelo comprimento da cauda; V= comprimento da região cefálica à vulva em relação ao comprimento do corpo expresso em porcentagem.

CAPÍTULO 3

Reação de genótipos de gramíneas e leguminosas em relação à *Pratylenchus coffeae* população inhame

Vanessa Lopes Lira^{a,b}, Idjane Santana de Oliveira^{a,b} Romero Marinho de Moura^{a,b}

^a Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória. Alto do Reservatório, s/n. Vitória de Santo Antão – PE – CEP. 55.608-680, Brasil.

^b Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória. Alto do Reservatório, s/n. Vitória de Santo Antão – PE – CEP. 55.608-680, Brasil.

Autor para correspondência

Prof. Romero Marinho de Moura
Email: romeromoura@yahoo.com.br
Universidade Federal de Pernambuco
Centro Acadêmico de Vitória – CAV
Rua Alto do Reservatório, s/n
Vitória de Santo Antão – PE CEP. 55.608-680

Artigo a ser submetido à revista Nematology

ISSN: 1388-5545

3.1 RESUMO

O objetivo do presente estudo foi identificar reações do tipo não-hospedeira-resistente em relação ao parasitismo do fitonematoide *Pratylenchus coffeae*, em genótipos distintos de três leguminosas e cinco gramíneas, todas de valor comercial. Os genótipos encontrados com o tipo de reação serão indicados para programas de rotação de culturas, visando o controle populacional do parasito em condições de campo. Os experimentos foram conduzidos em ambiente com temperatura média de 28 °C e as plantas utilizadas foram obtidas em sementeiras plásticas, contendo solo esterilizado por autoclavagem. No início do estudo, plântulas das duas famílias botânicas, com dez dias de idade, foram transferidas individualmente da sementeira para vasos plásticos novos, de dois litros de capacidade, contendo o substrato constituído por solo e areia, na proporção de 2:1, previamente autoclavado. Em seguida, plantas foram inoculadas com 1.000 espécimes de *P. coffeae*, que incluíam machos, fêmeas e juvenis. O inóculo foi considerado a população inicial (P_i) do experimento. O delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado, com plantas inoculadas e não inoculadas, com cinco repetições. Trinta e dois dias após as inoculações, os genótipos foram avaliados, analisando-se, separadamente, o peso da biomassa fresca das raízes e peso da biomassa fresca da parte aérea de cada planta. Em seguida, foram obtidas as médias aritméticas dos valores numéricos das populações finais (P_f) do nematoide nas plantas inoculadas e obtidas as respectivas médias aritméticas das repetições por genótipo. Finalmente, foi calculado o fator de reprodução de *P. coffeae* em cada genótipo, obtido pela relação P_f / P_i . De acordo com os resultados obtidos com o fator de reprodução e o peso fresco das raízes e peso fresco da parte aérea, os genótipos foram classificados em boa-hospedeira-susceptível, boa-hospedeira-tolerante, má-hospedeira-resistente, má-hospedeira-intolerante e não-hospedeira. Apenas os genótipos maus hospedeiros-resistentes e os não hospedeiros foram selecionados para utilização em planos de rotação de cultura visando o controle de *P. coffeae* em condições de campo. Nestas categorias foram identificados os seguintes genótipos: gramíneas: Milho variedade São José e Milho doce (maus-hospedeiros-resistentes). Sorgo Granífero (não-hospedeiro); leguminosas: feijões IPA-206 e MIRANDA IPA-207 (maus-hospedeiros-resistentes).

Palavras chaves: fitonematoide, parasitismo, rotação de culturas

3.2 INTRODUÇÃO

Pratylenchus coffeae pertence ao grupo de espécies de fitonematoides conhecidas popularmente por nematoides das lesões, todas pertencentes ao gênero *Pratylenchus* Filipjev. A denominação é devido ao sintoma primário e típico, necroses, apresentado pelas partes vegetais afetadas pelo parasitismo. O grupo dos nematoides das lesões congrega espécies que se comportam como endoparasitos migradores, incidindo sobre órgãos vegetais subterrâneos, principalmente raízes, tubérculos, túberas e rizomas, provocando muitos danos no hospedeiro. Todas as espécies descritas pertencentes ao grupo são referidas como responsáveis por elevadas perdas agrícolas, em todo o mundo onde se pratica agricultura racional (LUC et al., 1990) .

A espécie *P. coffeae* foi originalmente descrita a partir de uma população encontrada parasitando o cafeeiro (*Coffea arábica* L.) (ZIMMERMANN, 1898), mas, a partir do primeiro registro, foram feitos outros assinalamentos de novos patossistemas envolvendo a espécie e outras plantas hospedeiras (LUC et al., 1990). Do ponto de vista fitossanitário, *P. coffeae* é uma das mais importantes espécies de patógeno vegetal, podendo ser encontrado em parasitismo sobre diversas plantas hospedeiras de alta importância comercial. No Nordeste do Brasil, *P. coffeae* foi assinalado associado a altas perdas agrícolas em culturas de inhame da costa (*Dioscorea cayennensis* Lam.), bananeira, (*Musa spp.*) gravioleira, (*Annona muricata* L.) (MOURA, 1999), cafeeiro (MOURA et al., 2002) e milho doce (Moura et al., 2004).

No que concerne ao controle populacional do referido parasito nos campos de produção agrícola, diferentes métodos têm sido pesquisados e postos em prática para tornar o processo mais eficiente, econômico e menos impactante em relação ao meio ambiente, entre os quais a rotação de culturas. Esta técnica é importante em todos os sistemas de agricultura, por fornecer expressivos volumes de matéria orgânica ao solo, aumentando a atividade de fungos e outros microrganismos antagônicos aos nematoides em geral, e melhorando consideravelmente as características físicas também do solo, tornando-o mais adequado para o desenvolvimento dos sistemas radiculares e uma rizosfera mais rica em atividade biológica (FERRAZ; FREITAS, 2004).

Na busca por melhores culturas para programas de rotação, algumas espécies de gramíneas de família *Poaceae* foram pesquisadas e mostraram que algumas têm efeito antagonista aos fitonematoides (FERRAZ; FREITAS, 2004). Há comprovações que os exsudatos radiculares de algumas gramíneas podem afetar fungos fitopatogênicos do solo,

a exemplo de espécies dos gêneros *Fusarium*, *Verticillium* e outros (FERRAZ; FREITAS, 2004; SANTOS et al., 2011). As leguminosas também têm sido pesquisadas com sucesso para uso em rotações (FERRAZ; FREITAS, 2004). Leguminosas consideradas antagônicas aos fitonematoides possuem substâncias nematicidas nos exsudados ou dentro dos tecidos e por isso são utilizadas em planos de rotação de culturas, a exemplo da espécie *Crotalaria juncea* L. e mucuna preta (*Mucuna aterrima* Piper & Tracy) citada na literatura como *M. aterrima* ou *M. pruriens* e espécies do gênero *Tagetes* (família Asteraceae), conhecido com o cravo-de-defunto. O cultivo das citadas plantas em solos infestados por fitonematoides promove expressiva redução populacional dos referidos organismos em períodos variáveis de um a dois anos.

Por se tratar de leguminosas, as plantas antagônicas são consideradas adubos verdes, pois possuem alto poder de fixação de nitrogênio, fertilizando o solo que se torna mais favorável ao cultivo de gramíneas, que requerem altos teores de nitrogênio no solo, para o seu melhor desenvolvimento. Entretanto, por não serem culturas comerciais, essas leguminosas não proporcionam ganhos econômicos ao agricultor durante o período de rotação. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi analisar possíveis reações de resistência em três leguminosas e em cinco gramíneas, todas de valor comercial, na tentativa de ser identificado um ou alguns genótipos não ou maus hospedeiros de *P. coffeae*, para utilização em programas de rotação de culturas, em práticas que permitam ao agricultor ganhos econômicos durante o período de rotação. Os períodos têm a duração média de um a dois anos, dependendo da biologia do parasito e de algumas condições do solo, especialmente presença de matéria orgânica.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Obtenção dos isolados de *Pratylenchus coffeae* e preparo dos inóculos

Túberas comerciais de inhame da costa infestadas pelo nematoide das lesões identificado como sendo *P. coffeae*, foram coletadas no município de Lagoa de Itaenga, Pernambuco. Em seguida procedeu-se a extração do nematoide nos tecidos infectados pela técnica da maceração em liquidificador em baixa rotação por 20 segundos, seguindo-se o peneiramento em 60 mesh sobre outra peneira de 400 mesh, transferindo-se a suspensão obtida para um becker de 100 ml de capacidade. A suspensão aquosa foi transferida para tubos de 50 ml de centrífuga, para o processamento da extração de espécimes do nematoide pelo método de Jenkins (1964) que se fundamenta na técnica de separação por

flotação-centrífuga, usando-se uma solução de sacarose a 1 M. Com tal procedimento, foi obtido uma suspensão de espécimes de *P. coffeae*, constituída por machos, fêmeas e juvenis.

Finalmente, a suspensão foi diluída convenientemente, para ser obtida a concentração adequada visando a deposição de 1.000 espécimes por planta. As plantas leguminosas e gramíneas utilizadas no experimento encontra-se listadas na tabela 3.1. Para a obtenção das plântulas para as inoculações, foram utilizadas sementeiras plásticas, colocando-se uma semente por cela, contendo uma mistura de solo e areia, na proporção de 2:1. esterilizadas por autoclavagem, a 0,5 atm, por 5 minutos. Dez dias após a germinação, as plantas foram transferidas para vasos plásticos com dois litros de capacidade com solo também esterilizado na mesma proporção apresentada anteriormente e sendo inoculadas, com a suspensão de espécimes de *P. coffeae*, incluindo machos, fêmeas e juvenis, tendo sido vertida a suspensão em torno do colo da plântula, com um afastamento de 5 cm, aproximadamente.

Como inóculo foi considerada a população inicial (P_i). Para cada espécie vegetal, utilizou-se dois tratamentos: com e sem nematoides. O delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado, com cinco repetições. Trinta e dois dias após as inoculações, foram colhidas e pesadas separadamente a parte aéreas das plantas e os sistemas radiculares. Em seguida, procedeu-se a extração dos nematoides nas plantas inoculadas utilizando-se novamente o mesmo método utilizado na preparação do inóculo. Seguiram-se as contagens dos espécimes por sistema radicular, utilizando-se caixas de acrílico calibradas, contadores múltiplo de células, com auxílio de um microscópio de fotônico. Por meio das contagens, determinou-se a população final (P_f) e em seguida o fator de reprodução, obtido pela relação P_f/P_i (população final : população inicial).

3.3.2 Terminologias

Do ponto de vista parasitológico, (hospedabilidade), plantas com fator de reprodução médio maior do que 1 ($FR > 1$) eram consideradas boas hospedeiras, igual a zero ($FR = 0$) não hospedeiras e fator de reprodução menor do que 1 ($FR < 1$), má hospedeira. Avaliou-se também a interação nematoide-genótipo, no que concerne aos danos causados às plantas. Foram considerados, para tal, os conceitos de susceptibilidade e resistência, de acordo com Trudgill (1991). De acordo com o autor, plantas suscetíveis são aquelas em que os nematoides conseguem se desenvolver e multiplicar-se bem ($FR > 1$) nas raízes, afetando o crescimento da planta. Nas resistentes, o nematoide não se multiplica bem no hospedeiro

($FR < 1$) e o hospedeiro não tem o desenvolvimento afetado. Plantas com o $FR = 0$ são plantas não hospedeiras e são consideradas resistentes, não há penetração das formas infestantes. A categoria seguinte enquadra as plantas tolerantes; caso em que o $FR > 1$, mas as plantas suportam o parasitismo do nematoide, sem ter o seu desenvolvimento afetado. Finalmente, têm-se as plantas intolerantes, que são aquelas em que o $FR < 1$, mas o hospedeiro tem o desenvolvimento afetado; planta e nematoide não toleram a associação.

No presente trabalho, foram considerados genótipos adequados para planos de rotação de culturas visando o controle de *P. coffeae*, apenas aqueles com reação de resistência. Os dados obtidos, quando necessário, foram submetidos à análise de variância, com auxílio do software ASSISTAT Versão 7.6 beta (2013). As médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey ($p = 0,05$).

3.4 RESULTADOS

Foram observados reduzidos fatores de reprodução em todos os genótipos vegetais estudados ($FR < 1$), com poucos juvenis e adultos, em praticamente todas as amostras de raízes das plantas processadas, como mostram as tabelas 3.2 e 3.3. Todos os genótipos comportaram-se como maus-hospedeiros ($FR < 1$), exceto o sorgo granífero, que se mostrou não-hospedeiro ($FR = 0$). Ao ser promovida a sistematização entre os fatores de reprodução e as respectivas reações fitopatológicas (alterações nos pesos das raízes e das partes aéreas), foi possível observar que, com exceção do sorgo granífero, que se comportou como não-hospedeiro-resistente, todos os demais genótipos foram maus-hospedeiros-resistentes, sem diferenças significativas entre os pesos das partes aéreas e das raízes, entre as respectivas plantas inoculadas e não inoculadas.

Ainda em relação à sistematização, ao serem examinadas as tabelas 3.3 e 3.5, constata-se que o milho híbrido e o sorgo forrageiro comportaram-se como maus-hospedeiros-intolerantes, haja vista a diferença significativa entre os pesos frescos das biomassas das partes aéreas de plantas com e sem nematoides. Neste caso, plantas e nematoide foram afetados pelo parasitismo. O mesmo pode ser dito para a leguminosa Fava Mossoró. As duas outras leguminosas, feijões Vigna cultivares IPA 206 ($FR = 0,364$) e Miranda IPA 207 ($FR 0,140$) (tabela 3.2) foram classificadas como maus-hospedeiros-resistentes, já que a multiplicação do nematoide foi ruim e o desenvolvimento das plantas, considerando-se que tanto os pesos das raízes quanto os das partes aéreas não foram afetados significativamente ao serem comparados com os das respectivas testemunhas não inoculadas (tabela 3.4).

Nas gramíneas, os cultivares Milho São José (FR= 0,028), Milho Doce (FR= 0,084) e o Sorgo Granífero (FR=0), foram classificados como más-hospedeiras-resistentes, já que o nematoide não conseguiu se desenvolver (FR<1) e multiplicar-se nas plantas, que não foram afetadas quanto ao desenvolvimento, ao confrontar os valores de crescimento com os das testemunhas (tabela 3.3 e 3.5). O milho híbrido (FR= 0,308) e o sorgo forrageiro (FR= 0,168) se caracterizaram como más-hospedeiras-intolerantes ao parasitismo, pois o desenvolvimento das plantas foi significativamente afetado (tabela 3.3 e 3.5).

3.5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na presente pesquisa são de importância para o controle de *P. coffeae* em campos infestados, especialmente campos de inhame da costa. O cultivo da dioscoreaceae no nordeste do Brasil é geralmente feito em áreas de, no máximo, quatro hectares, já sendo prática rotineira a transferência do local da área de plantio, a cada dois anos, devido as altas densidades populacionais médias (DPMs) de *P. coffeae* que se formam na sequência dos plantios.

Com os resultados obtidos, já é possível a indicação de um dos genótipos selecionados, especialmente o sorgo granífero, que se portou como não-hospedeiro-resistente para plantio em áreas infestadas. Neste caso, trata-se de uma opção que poderá favorecer economicamente o agricultor durante a rotação. A cultura também tem importância em regiões com precipitação pluviométrica baixa, pois pode ser utilizada em substituição à cultura do milho (GONTIJO et al., 2008).

Por serem os genótipos selecionados culturas de ciclo curto (três meses), uma sequência alternada envolvendo uma leguminosa, seguida por uma gramínea, no caso o sorgo granífero, estendendo-se a rotação por um período de dois anos, é uma indicação altamente recomendável para plantadores de inhame da costa. Após os dois anos de rotação, o agricultor poderá voltar para a área agora desinfestada e plantar comercialmente o inhame da costa. O período de dois anos de rotação tem sido o recomendado para endoparasitos migradores (BARROS; MOURA; PEDROSA, 2000). Resistência envolvendo reduzida suscetibilidade do hospedeiro já foi proposta para viroses de plantas (TRUDGILL, 1991), como foi o caso do sorgo forrageiro, fava Mossoró e o milho híbrido apresentados no presente trabalho como intolerantes ao nematoide. A resistência a nematoides baseada em reduzida suscetibilidade ao que tudo indica envolve genes de resistência ativa, sendo sensíveis a fatores ambientais e sendo a expressão atenuada sob condições muito favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (TRUDGILL, 1991). O feijão massacar também

conhecido como feijão-de-corda ou caupi, constitui em uma das principais leguminosas cultivadas no Brasil, predominantemente nas Regiões Nordeste e Norte (CARDOSO; FILHO; SOBRINHO, 1999) onde é usado para fins alimentares, mostrou-se como resistente no presente estudo, podendo assim, beneficiar ao agricultor não só ao controle populacional de *P. coffeae*, mas também contribuir para a sua alimentação.

O milho é uma cultura de importância econômica relevante para o Brasil, também sendo uma opção altamente atrativa para planos de rotação de culturas visando o controle populacional de alguns fitonematoides (RAYMUNDO, 1985). Uma observação de importância epidemiológica constatada na presente pesquisa foi a condição de mau-hospedeiro-resistente do milho doce, contrastando com a alta susceptibilidade de um cultivar do referido tipo de milho, reportado por Moura et al. (2004) no Rio Grande do Norte. Tal constatação pode estar associado ao fato de terem sido diferentes cultivares de milho doce ou variação parasitária da população de *P. coffeae*, conforme relato de Kubo et al. (2003), sendo um indicio da ocorrência de um complexo de espécies dentro do mesmo grupo. A observação merece maiores atenções da pesquisa. A não utilização de agrotóxicos nematicidas do solo, que são da classe toxicológica um (extremamente tóxico) faz da prática ora preconizada, uma atividade agronomicamente rentável, de fácil execução e ecologicamente limpa.

3.6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo auxílio financeiro.

3.7 REFERÊNCIAS

BARROS, A. C. B.; MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R. Aplicação de terbufós no controle de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *Pratylenchus zae* em cinco variedades de cana-de-açúcar no Nordeste. Parte 1 - Efeitos na cana planta. **Nematologia Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 73-78, 2000.

CARDOSO, M. J.; FILHO, F. R. F.; SOBRINHO, C. A. **Cultura do feijão massacar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) no Piauí: aspectos técnicos**. 2. ed. Terezina/ Pi: Embrapa Meio Norte, 1999. 43 p.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. **O controle de fitonematoides por plantas antagonistas e produtos naturais**. Universidade Federal de Viçosa, 2004.

GONTIJO, M. H. R. et al. Potencial forrageiro de seis híbridos de sorgo com capim sudão. **Revista Brasileira Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 7, n. 1, p. 33-43, 2008.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from Soil. **Plant Disease Report**, v. 48, p. 692, 1964.

KUBO, R. K. et al. Pathogenicity of *Pratylenchus coffeae* on seedlings of coffee cv. Mundo Novo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 41-48, 2003.

LUC, M., HUNT, D. J.; MACHON, J. E. Morphology, anatomy and biology of plant parasitic. In: Luc, M.; SIKORA, A. R.; BRIDGE, J. **Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture**. Wallingford: Cab International, 1990. p. 1-44.

MOURA, R. M. Estudos sobre a origem da morte súbita da gravioleira. **Nematologia Brasileira**, v. 23, p. 62-68, 1999.

MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R.; PRADO, M. D. C. Incidência de *Pratylenchus coffeae* causando severa nematose em cafeeiro no nordeste. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 6, p. 649-649, 2002.

MOURA, R. M. et al. Pratilencose atípica assinalada no Estado do Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 692, 2004.

RAYMUNDO, S. A. Cropping systems research and root - knot nematode control. In: SASSER, J. N; CARTER, C. C. **An Advanced Treatise on Meloidogyne. vol. 1: Biology and control**. Raleigh, 1985. p. 227-281.

SANTOS, T. F. S. et al. Controle de *Pratylenchus brachyurus* em esquema de rotação/sucessão com braquiária e estilosantes. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 7, n. 13, p.248-254, 2011.

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

ZIMMERMANN, A. De nematoden der koffiewortels. Deel I. Mededeel.'s Lands Plantentuin
(Buitenzorg), v. 27, 1898. 64 p.

3.8 FIGURAS E TABELAS

Tabela 3.1 Leguminosas e Gramíneas utilizadas para os testes de parasitismo à espécie *Pratylenchus coffeae*.

Leguminosas e gramíneas	Nome científico
Feijão macassa IPA 206	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.
Feijão macassa Miranda IPA 207	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.
Fava mossoró	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Milho híbrido 1051	<i>Zea mays</i> L.
Milho São José	<i>Zea mays</i> L.
Milho doce	<i>Zea mays</i> L.
Sorgo Granífero	<i>Sorghum vulgare</i> Pers.
Sorgo Forrageiro	<i>Sorghum bicolor</i> L. Moench

Tabela 3.2 Fator de reprodução (FR) de *Pratylenchus coffeae* (Y2) em plantas leguminosas, população inicial (Pi de raízes) e população final (Pf de raízes) aos 32 dias após a inoculação

Tratamentos	Pi	Pf	FR	Reação
Fava mossoró	1000	448	0,448	Intolerante
IPA - 206	1000	364	0,364	Resistente
Miranda IPA 207	1000	140	0,140	Resistente

Média de cinco repetições; Desvio Padrão de FR: 0,13.

Tabela 3.3 Fator de reprodução (FR) de *Pratylenchus coffeae* (Y2) em plantas gramíneas, população inicial (Pi de raízes) e população final (Pf de raízes) aos 32 dias após a inoculação

Tratamentos	Pi	Pf	FR	Reação
Milho híbrido	1000	308	0,308	Intolerante
Milho São José	1000	28	0,028	Resistente
Milho doce	1000	84	0,084	Resistente
Sorgo Granífero	1000	0	0	Resistente
Sorgo Forrageiro	1000	168	0,168	Intolerante

Média de cinco repetições; Desvio Padrão de FR: 0,11.

Tabela 3.4 Peso das raízes plantas leguminosas inoculadas com *Pratylenchus coffeae* com nematóides (PRCN) e sem nematóides (PRSN), peso da parte aérea com nematóide (PPACN) e peso da parte aérea sem nematóide (PPASN) aos 32 dias após a inoculação

Tratamentos	PRCN	PRSN	PPACN	PPASN
Fava moissoró	2,43 a	2,94 a	5,49 B	7,11 A
IPA - 206	3,19 a	4,61 a	9,03 A	8,17 A
Miranda IPA 207	2,87 a	2,27 a	10,41 A	11,59 A

Média de cinco repetições; Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem significamente pelo teste de Tukey (p= 0,05)

Tabela 3.5 Peso das raízes plantas gramíneas inoculadas com *Pratylenchus coffeae* com nematoides (PPRCN) e sem nematóides (PPRSN), peso da parte aérea com nematóide (PPACN) e peso da parte aérea sem nematóide (PPASN) aos 32 dias após a inoculação

Tratamentos	PPRCN	PPRSN	PPACN	PPASN
--------------------	--------------	--------------	--------------	--------------

Milho híbrido	3.17 a	4.38 a	3.17 A	5.52 B
Milho São José	3.11 a	4.02 a	4.54 A	4.87 A
Milho doce	3.17 a	3.92 a	5.55 A	4.34 A
Sorgo Granífero	1.39 a	2.10 a	2.40 A	3.00 A
Sorgo Forrageiro	0.90 a	1.63 b	1.39 A	2.39 B

Média de cinco repetições; Média de cinco repetições; médias seguidas de letras diferentes na linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p= 0,05$)

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Os fitonematoídeos são parasitos que provocam significativas perdas na agricultura em todo o mundo. O controle dos referidos organismos em condições de campo tem sido feito ao longo das décadas passadas por meio do uso de nematicidas do solo, que são agrotóxicos da classe toxicológica um (extremamente tóxico), trazendo consequências maléficas aos aplicadores, aos consumidores e ao meio ambiente (MOURA, 2010). Devido a tais problemas, de relevante importância para a Sociedade, técnicas menos poluentes vêm sendo utilizadas com sucesso no controle dos organismos, entre as quais a rotação de culturas. A técnica se fundamenta na manipulação de questões relativas à biologia do fitonematoídeo-alvo, especialmente no fato de serem parasitos obrigatórios, quase, com gama de plantas hospedeiras definidas. Assim sendo, retira-se do campo agrícola a cultura hospedeira-susceptível, substituindo-a por outra resistente ao fitonematoídeo. Não encontrando raízes para se alimentar, o fitonematoídeo-alvo tem a reprodução impossibilitada e a densidade populacional no solo reduzida significativamente, após um a dois anos de rotação, dependendo dos mecanismos de sobrevivência do parasito. *Pratylenchus coffeae* no nordeste do Brasil, é um fitonematoídeo que causa elevados prejuízos ao agricultor, especialmente aos plantadores de inhame da costa.

A considerar as características biológicas de *P. coffeae*, verifica-se que a rotação de culturas é uma técnica que se aplica com sucesso no controle desse nematoídeo das lesões. A exemplo do que ocorre em todos os casos, para que esta técnica possa ser aplicada com segurança no patossistema *P. coffeae*-inhame da costa, torna-se necessário o conhecimento da espécie do nematoídeo, para que se possa selecionar as culturas ou a cultura a ser utilizada na rotação. O primeiro registro de *P. coffeae* no nordeste do Brasil foi feito por Moura e Monteiro (1995) em túberas comerciais de inhame da costa, causando sintomas severos da doença casca-preta. Após o assinalamento, (MOURA, 1999; MOURA

et al., 2002) fizeram novos registros deste patógeno, sempre registrando-o associado a altas perdas econômicas.

O *status* taxonômico de *P. coffeae* passou a ser questionado nos últimos anos, devido a alta variabilidade morfológica e genética, observada entre populações, como mostraram Duncan et al. (1999) e Wilcken et al. (2008). Este fato, conforme, proporcionou a descrição de novas espécies muito próximas a *P. coffeae*, a exemplo de *P. pseudocoffeae*, *P. loosi* e *P. jaehni*, anteriormente consideradas *P. coffeae* (INSERRA et al., 1996, 1998, 2001).

No presente trabalho, ao serem analisadas de modo morfológico e micrométrico espécimes de dez populações do referido nematoide, coletadas em diferentes municípios produtores de inhame da costa do estado de Pernambuco, todas se mostraram similares entre si e compatíveis com os apresentados pela literatura específica referente a *P. coffeae* (DUNCAN et al., 1999; GONZAGA, 2006 e INSERRA, et al., 2001). Constatou-se, por exemplo, que a espermateca apresentava sempre o formato ligeiramente oval, exatamente conforme descrito por Loof (2001), normalmente contendo espermatozoides. A cauda era de formato terminal arredondado e liso, confirmando registros anteriores constantes da literatura (LOOF, 1991; GONZAGA, 2006; NGUYEN, 2010).

Em todas as populações, o comprimento e formato do estilete, exceto a população do município de Goiânia, se enquadraram nos dados também apresentados por Duncan et al. (1999). A diferença constatada na população de Goiânia foi considerada como variabilidade natural da espécie. O comprimento do esôfago teve como coeficiente de variação 11,4 %, mostrando-se, portanto bem uniforme. A referida variável é fundamental para separar as espécies *P. pseudocoffeae* das espécies *P. coffeae* e *P. gutierrezii*. (INSERRA et al., 1998). O valor “V” apresentou CV= 3,7, (baixo), entre as populações estudadas e as médias compatíveis com as da literatura. Estas observações também foram feitas por Gonzaga, 2006 e Nguyen; 2010.

Doucet et al. (1996, 2001) sugeriram que tais variações morfológicas devam ser consequências do efeito da temperatura, isolamento geográfico ou mesmo do genótipo da planta hospedeira, tornando-a mais ou menos favoráveis ao parasitismo. Em resumo, pode-se considerar a análise descritiva e a comparativa em relação à bibliografia especializada, que a morfologia das 10 populações estudadas foi compatível com o que se apresenta para *P. coffeae*.

A complementação da análise morfológica com a análise molecular das populações formalizou o diagnóstico das mesmas. Por exemplo, ao ser feita a análise molecular da região D2/D3 do gene 28S do DNA ribossômico, foi possível observar que todas as dez

populações encontravam-se intimamente relacionadas com os padrões apresentados para *P. coffeae* do GenBank, mostrando 100% de homologia. Também, ao se criar uma árvore filogenética, pode-se verificar que todas as populações estudadas ficaram no mesmo grupo da população *P. coffeae* (Y2), utilizada por Duncan et al. (1999), em nos estudos de filogenia. Com a obtenção dos dados, ficou evidente a identidade do nematoide das lesões do inhame da costa no estado de Pernambuco como sendo *P. coffeae*, tendo sido constatada diversidade de alguns elementos morfológicos entre as populações, o que está de acordo com a literatura relativa à *P. coffeae*.

Diferentes medidas de controle têm sido adotadas almejando minimizar os prejuízos causados por fitonematoides na agricultura inclusive os causados pela espécie *P. coffeae* (CAMPOS, 2009). No presente trabalho caso, a aplicação das técnicas tem sido dificultada por se tratar de uma espécie polífaga (SILVA e INOMOTO, 2002) que pode apresentar diferentes reações parasitárias em relação a uma determinada planta hospedeira, como mostrou Kubo et al., 2003. Neste trabalho, foi possível encontrar cinco genótipos resistentes a *P. coffeae*; duas leguminosas e três gramíneas. Pelo tipo de reação observada, é possível indicar os genótipos para programas de rotação de culturas para o inhame da costa. Por outro lado, a constatação de resistência do milho doce na presença pesquisa (FR=0,084), contrastando com o que relatou Moura et al. (2004) é uma evidência da variação fisiológica parasitária entre populações, conforme assinalou Kubo et al. (2003). Portanto, pela existência de populações de *P. coffeae* reconhecidamente parasitárias do referido genótipo de gramínea (MOURA, 2004), a indicação do milho doce para rotação de culturas visando o controle do parasito deve em questão ser evitada. Os demais genótipos selecionados representam opções favoráveis para os agricultores, pois poderão ter uma renda adicional ao longo da rotação.

As duas variedades de feijão macassar, o milho São José e o sorgo granífero, por terem se comportado como maus-hospedeiros-resistentes prestam-se efetivamente para sistemas de rotação visando o controle apenas de *P. coffeae*. O processo não se aplica, por exemplo, na presença de outras espécies do gênero *Pratylenchus*, a exemplo de *P. zaeae* e *P. brachyurus*, amplamente disseminadas no Nordeste, porém não associadas ao inhame-da-costa. O cultivo do feijão massacar é distribuído nos Estados da região Norte e Nordeste, sendo uma leguminosa integrada na alimentação da população brasileira. Por ser uma cultura exigente em altos níveis de nitrogênio, é proposto que o plantio de uma das leguminosas inicie o plano de rotação e que seja incorporada ao solo, após a colheita. Um mês passado à incorporação, planta-se uma das gramíneas selecionadas. O processo deve

ser efetuado por dois anos, mantendo-se o solo limpo de ervas daninhas nas entressafras e restos de culturas de inhame que podem preservar espécimes *P. coffeae*.

O sorgo, no presente estudo identificado como imune-resistente (FR= 0), mostra-se também uma cultura que pode ser utilizada para controle deste fitonematoide. A rotação de culturas feita com plantas não suscetíveis ao nematoide apresenta-se como uma técnica barata de fácil execução e que proporciona ao agricultor uma renda extra. A prática também melhora as características físicas, químicas e biológicas do solo, evitando o crescimento de plantas daninhas e erosões, além de ser limpa do ponto de vista ecológico.

Conclusões

- 1- A análise dos dados obtidos com as dez populações de inhame da costa estudadas estavam de acordo com os dados de literatura, tanto para morfologia quanto para morfometria.
- 2- Ao comparar os padrões moleculares de todas as dez populações do nematoide das lesões, coletadas em diferentes localidade do estado de Pernambuco com o padrão referente à *P. coffeae* do GenBank, houve homologia de 100%.
- 3- Ao sistematizar os dados morfológicos, micrométricos e moleculares obtidos neste estudo, ficou estabelecido o diagnóstico das dez populações do nematoide das lesões do inhame do estado de Pernambuco como sendo *P. coffeae*.
- 4- O diagnóstico ora definido para as populações do nematoide das lesões do inhame da costa no estado de Pernambuco está de acordo com os antigos diagnósticos feitos na região por Moura e colaboradores.
- 5- Foram identificados cinco genótipos não-hospedeiros resistentes à *P. coffeae* sendo: feijão massacar variedade IPA-206, feijão massacar variedade MIRANDA IPA-207, milho São José, milho doce e o sorgo granífero.
- 6- Os genótipos identificados poderão ser utilizados em programas de rotação de culturas em campos de produção de inhame da costa, sob a orientação de um especialista.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, N. A.; AYALA, A. Pathogenicity of *Pratylenchus coffeae*, *Scutellonema bradys*, *Meloidogyne incognita* e *Rotylenchulus reniformis* on *Dioscorea rotundata*. **Journal of Nematology**, v. 7, p. 1-15, 1975.

AL-BANNA, L.; WILLIAMSON, V. M.; GARDNER, S. L. Phylogenetic Analysis of Nematodes of the Genus *Pratylenchus* Using Nuclear 26S DNA. **Molecular Phylogenetics And Evolution**, v. 7, n. 1, p.94-102, 1997.

AL-BANNA, L. et al. Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species specific. **Journal of Nematology**, v. 36, n., p. 142-146, 2004.

ALVES, T. C. U. **Reação de cultivares de soja ao nematóide das lesões radiculares *Pratylenchus brachyurus***. 2008. 41f. (Monografia) Pós-graduação em Agricultura Tropical- Universidade Federal de Mato Grosso - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

AMBROSIANO, E. J. et al. Leguminosas para adubação verde: Uso Adequado em Rotações de Culturas. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, Campinas, SP, p. 24, 1997.

BARROS, J. F. C; CALADO, J. G. **Descompactação do Solo, Preparação da Cama da Semente e Enterramento de Resíduos**. Évora: Universidade de Évora, 2011. 18 p.

BARROS, A. C. B.; MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R. Aplicação de terbufós no controle de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *Pratylenchus zeae* em cinco variedades de cana-de-açúcar no Nordeste. Parte 1 - Efeitos na cana planta. **Nematologia Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 73-78, 2000.

CABI/EPPO, *Pratylenchus coffeae*. Distribution Maps of Plant Diseases, Map, n. 816, CAB International, Wallingford, UK, 2007.

CAMPOS, V. P. et al. 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, UK. CAB International., p. 387-430, 1990.

CAMPOS, V.P. Doenças causadas por fitonematóides. In: COSTA, M. J. N; CAMPOS, V. P.; OLIVEIRA, D. F. **Toxicidade de extratos vegetais e de esterco a *Meloidogyne incognita***, v. 2, p. 22-23. 2009.

CARDOSO, M. J.; FILHO, F. R. F.; SOBRINHO, C. A. **Cultura do feijão massacar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) no Piauí: aspectos técnicos**. 2. ed. Terezina/ Pi: Embrapa Meio Norte, 1999. 43 p.

CASTILLO, P.; VOVLAS N. *Pratylenchus* (Nematoda, Pratylenchidae): diagnosis, biology, pathogenicity and management. **Nematology Monographs and Perspectives**, v. 6, 529 p. 2007.

COOMANS, A. Present status and future of nematode systematics. **Nematology**, v. 4, p. 573-582, 2002.

CURRAN, J. Application of DNA analysis to nematode taxonomy. In NICKLE, W. R. ed. **Manual of agricultural Nematology**. New York: Marcel Dekker Inc., p. 125-43, 1991.

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

DOUCET, M.; PINOCHET, J.; DI RIENZO, J. A. Comparative analysis of morphological and morphometrical characters in six isolates of *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen, 1951 (Nematoda: Tylenchida). **Fundamental Applied Nematology**, Paris, v. 19, n. 1, p. 79-84, 1996.

DOUCET, M.; LAX, P.; DI RIENZO, J. A.; PINOCHET, J.; BAUJARD, P. Temperature induced morphometrical variability in an isolate of *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen, 1951 (Nematoda: Tylenchida). **Nematology**, Leiden, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2001.

DUNCAN, L. W. et al. Molecular and morphological analysis of isolates of *Pratylenchus coffeae* and closely related species. **Nematropica**, Florida, v. 29, p. 61-80, 1999.

ESSER R. P. Data summary. *Pratylenchus coffeae* (Mimeo). Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Gainesville, 1969. 32 p.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. **O controle de fitonematoides por plantas antagonistas e produtos naturais**. Universidade Federal de Viçosa, 2004.

GARRIDO, M. D. S. **Manejo Agroecológico da cultura do inhame: produtividade, qualidade, controle de nematoide e manchas foliares**. 2005. 73 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz Das Almas, Bahia, 2005.

GILLESPIE, J. et al. A secondary structural model of the 28S rRNA expansion segments D2 and D3 from rootworms and related leaf beetles. **Insect Molecular Biology**, v. 13, p. 495–518, 2004.

GRÄUTLEIN, M. V. et al. DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity. **Biodiversity and Conservation**, v. 20, p. 373–389, 2011.

GONÇALVES, W. et al. Estimativas de danos ocasionados pelos nematóides do cafeeiro. VI Congresso de Pesquisa Cafeeira, Ribeirão Preto, SP, 1978. p. 182-186.

GONÇALVES, W. et al. Manejo de nematóides na cultura do cafeeiro. In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO – CAFÉ, 10. Mococa. São Paulo: Instituto Biológico, p. 48-66, 2004.

GONTIJO, M. H. R. et al. Potencial forrageiro de seis híbridos de sorgo com capim sudão. **Revista Brasileira Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 7, n. 1, p. 33-43, 2008.

GONZAGA, V. **Caracterização morfológica, morfométrica e multiplicação in vitro das seis espécies mais comuns de *pratylenchus filipjev*, 1936 que ocorrem no Brasil**. 2006. 79 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

GOULART, A.M.C. Aspectos gerais sobre nematoides-das-lesões-radiculares (gênero

Pratylenchus). Embrapa Cerrados, Planaltina. (Documentos 219), 30p. 2008.

HANDOO, Z. A.; GOLDEN, A. M. A key and diagnostic compendium to the species of the genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (lesion nematodes). **Journal of Nematology**, Lawrence, v. 21, n. 2, p. 202-218, 1989.

HANDOO, Z. A. et al. Morphological and Molecular Characterization of *Longidorus americanum* n. sp. (Nematoda: Longidoridae), a Needle Nematode Parasitizing Pine in Georgia. **Journal of Nematology**, v. 37, n. 1, p. 94-104, 2005.

HANDOO, Z. A.; CARTA, L. K.; SKANTAR, A. M. Taxonomy, Morphology and Phylogenetics of Coffee-Associated Root-Lesion Nematodes, *Pratylenchus* spp. **Plant-Parasitic Nematodes of Coffee**, p. 29-50, 2008.

HE, Y. A molecular phylogenetic approach to Longidoridae (Nematoda: Dorylaimida). **Nematology**, v. 7, p. 11-124, 2005.

HEBERT, P. D. N.; GREGORY, T. R. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. **Systematic Biology**, v. 54, n. 2, p. 852-859, 2005.

HOLTERMAN, M. et al. Phylum-wide analysis of SSU DNAr reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 9, p. 406-416, 2006.

INOMOTO, M. M. et al. Effects of *Pratylenchus brachyurus* and *P. coffeae* in seedlings of *Coffea arabica*. **Journal of Nematology**, v. 30, p. 362-367, 1998.

INSERRA, R. N. et al. *Pratylenchus loosi* from pasture grasses in Central Florida. **Nematologica**, v. 42, n. p. 159-172, 1996.

INSERRA, R. N. et al. *Pratylenchus pseudocoffeae* from Florida and its relationship with *P. gutierrezi* and *P. coffeae*. **Nematologica**, v. 42, n., p. 683-712, 1998.

INSERRA, R. N. et al. *Pratylenchus jaehni* sp. n. from citrus in Brazil and its relationship with *P. coffeae* and *P. loosi* (Nematoda: Pratylenchidae). **Nematology**, Leiden, v. 3, n. 7, p. 653-665, 2001.

JACKSON, G. V. H.; RUABETE, T. K.; WRIGHT, J. G. Burrowing and lesion nematodes of banana. In: Pest advisory leaflet n. 5, Secretariat of the Pacific Community. 2003. 4 p.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from Soil. **Plant Disease Report**, v. 48, p. 692, 1964.

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

KUBO, R. K. et al. Pathogenicity of *Pratylenchus coffeae* on seedlings of coffee cv. Mundo Novo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 41-48, 2003.

KUBO, R. K. et al. Ocorrência de nematóides do gênero *Pratylenchus* em cafezais do estado de São Paulo. **Nematologia Brasileira**, v. 28, p. 159-166, 2004.

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

LUC, M. A reappraisal of Tylenchina (Nemata): 7. The family Pratylenchidae Thorne, 1949. **Revue de Nématologie**, Paris, v. 10, n. 2, p. 203-218, 1987.

LUC, M., HUNT, D. J.; MACHON, J. E. Morphology, anatomy and biology of plant parasitic. In: Luc, M.; SIKORA, A. R.; BRIDGE, J. **Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture**. Wallingford: Cab International, 1990. p. 1-44.

LUCA, F. et al. Comparison of the sequences of the D3 expansion of the 26S ribosomal genes reveals different degrees of heterogeneity in different populations and species of *Pratylenchus* from the Mediterranean region. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 949-957, 2004.

- MEKETE, T. Distribution and diversity of root-lesion nematode (*Pratylenchus spp.*) associated with *Miscanthus x giganteus* and *Panicum virgatum* used for biofuels, and species identification in a multiplex polymerase chain reaction. **Nematology**, Sss, v. 13, n. 6, p.673-686, 2011.
- MIZUKUBO, T. Morphological and statistical differentiation of *Pratylenchus coffeae* complex in Japan (Nematoda: Pratylenchidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 27, p. 213-224, 1992.
- MIZUKUBO, T.; SUGIMURA, K.; UESUGI, K. A new species of the genus *Pratylenchus* from chrysanthemum in Kyushu, western Japan (Nematoda: Pratylenchidae). **Japanese Journal of Nematology**, v. 37, p. 63-74, 2007.
- MONTEIRO, A. R.; LORDELLO, L. G. E. Encontro do nematoide *Pratylenchus coffeae* atacando cafeeiro em São Paulo. **Revista de Agricultura**, v. 49, n. 1, p. 164, 1974.
- MOTA, M. M.; EISENBACK, J. D. Morphometrics of *Globodera tabacum tabacum*, G. t. *virginiae* and G.t. *solanacearum* (Nemata: Heteroderinae). **Journal of Nematology**, v. 25, p.148-160, 1993.
- MOURA, R. M.; MONTEIRO, A. R. *Pratylenchus coffeae* on yams in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 256, 1995.
- MOURA, R. M. Estudos sobre a origem da morte súbita da gravioleira. **Nematologia Brasileira**, v. 23, p. 62-68, 1999.
- MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R.; PRADO, M. D. C. Incidência de *Pratylenchus coffeae* causando severa nematose em cafeeiro no nordeste. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 6, p. 649-649, 2002.
- MOURA, R. M. et al. Pratilencose atípica assinalada no Estado do Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 692, 2004.

MOURA, R. M. Um sistema integrado de controle de fitonematóides da cana-de-açúcar para o nordeste. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, Recife, v. 7, p. 50-61, 2010.

MOURA, R. M.; OLIVEIRA, I. S.. Controle Populacional de *Pratylenchus zea* em Cana-de-açúcar em Dois Ambientes Edáficos no Nordeste do Brasil. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 33, n. 1, p.67-73, 2009.

NGUYEN, T. T. A comparative polyphasic study of 10 *Pratylenchus coffeae* populations from Vietnam. 2010. 163 f. Tese (Doutorado) - Ghent University, Ghent, 2010.

OLIVEIRA, C. M. G. et al. Diagnose de *Aphelenchoides fragariae* e *Pratylenchus* spp. pela Aplicação da Tecnologia do Código de Barras do DNA. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 33, n. 3, p. 218-225, 2009.

OLIVEIRA, C. M. G.; MONTEIRO, A. R.; BLOK, V. C. Morphological and molecular diagnostics for plant-parasitic nematodes: working together to get the identification done. **Tropical Plant Pathology**, Campinas, v. 36, n. 2, p. 65-73, 2011.

OLIVEIRA, I. S.; MOURA, R. M.; MAIA, L. C. Considerações sobre a cultura do inhame da ayala e podridão-verde, principal causa de perdas durante o armazenamento. **Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agrônomicas**, Recife, v. 2, n., p. 90-106, 2005.

PALOMARES-RIUS, J. E. et al. Description of *Pratylenchus hispaniensis* n. sp. from Spain and considerations on the phylogenetic relationship among selected genera in the family Pratylenchidae. **Nematology**, v.12, p. 429-451, 2010.

PIRES, A. C.; MARINONI, L. DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. **Biota Neotropica**, v.10, p. 339-346, 2010.

POURJAME, E.; KHEIRI, A.; GERAERT, E. The genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (Tylenchida: Pratylenchidae) from North of Iran. **Journal Mededelingen - Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent**, v. 62, n., 3a p. 741-756, 1997a.

POWERS, T. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 367-383, 2004.

RAYMUNDO, S. A. Cropping systems research and root - knot nematode control. In: SASSER, J. N; CARTER, C. C. **An Advanced Treatise on Meloidogyne. vol. 1: Biology and control**. Raleigh, 1985. p. 227-281.

RYSS, A. Y. Genus *Pratylenchus* Filipjev: multientry and monoentry keys and diagnostic relationships (Nematoda:Tylenchida:Pratylenchidae). **Zoosystemat Ross**, v. 10, p. 241-255, 2002a.

RYSS, A. Y. Phylogeny and evolution of the genus *Pratylenchus* according to morphological data (Nematoda: Tylenchida). **Zoosystematica Rossica**, v. 10, p. 257- 273, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Composition of the electrophoresis buffer. In: FORD, N.; NOLAN, C.; FERGUSON, M.; OCKLER, M. (ed). **Molecular Cloning, a Laboratory Manual**. Cold Sprig Harbor Laboratory Press, New York - EUA, p. 66-67, 1989.

SANTOS, T. F. S. et al. Controle de *Pratylenchus brachyurus* em esquema de rotação/sucessão com braquiária e estilosantes. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 7, n. 13, p.248-254, 2011.

SIDDIQI, M. R. **Tylenchida parasites of plants and insects**. 2. ed. Wallingford: Cab International, 2000.

SILVA, R. A.; INOMOTO, M. M.. Host-range Characterization of Two *Pratylenchus coffeae* Isolates. **Journal of Nematology**, v. 34, n. 2, p. 135-139. 2002.

SUBBOTIN, S. A. et al. A phylogenetic framework for root lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda): Evidence from 18S and D2-D3 expansion segments of 28S ribosomal RNA genes and morphological characters. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, n., p. 491-505, 2008.

TENENTE, R.C.V.; GONZAGA, V.; MELO, L.A.M.P.; TENENTE, M.S.M. Bibliografia Brasileira de Nematoides. Brasília: EMBRAPA-CERNAGEN, p.386 (Documentos,76). 2002.

THOMPSON, A. K.; BEEM, B. O.; PERKINS, C. Nematodes in stored yams. **Experimental Agriculture**, v. 9, p. 281-286, 1973,

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 473 p.

TROCCOLI, A. et al. Morphological and molecular characterization of *Pratylenchus lentis* n. sp. (Nematoda: Pratylenchidae) from Sicily. **Journal of Nematology**, v. 40, p.190-196, 2008.

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

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

URIBE, G. E. M. **Biodiversidad de nematodos fitoparásitos asociados con Musaceae y cultivos frutales en Colombia**. 2008. 209 f. Tese (Doutorado), 2008.

VAN DEN BERG, E.; QUENEHERVE, P.; TIEDI, L. R. Six known plant-feeding nematodes from Guadeloupe. Martinique and French Guiana (Nemata: Tylenchina). **Journal Nematode Morphology Systematic**, v. 7, p. 109-129, 2005.

VILLAIN, L. et al. Effect of grafting and nematicide treatments on damage by root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) to *Coffea arabica* L. in Guatemala. **Nematropica**, v. 30, p. 87-100. 2000.

WILCKEN, S. R. S. et al. Relationships among *Pratylenchus jaehni* and *P. coffeae* populations from Brazil. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 32, p.194-199, 2008.

ZHANG, Z. et al. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7, n. 1-2, p. 203-214, 2000.

ZIMMERMANN, A. De nematoden der koffiewortels. Deel I. Mededeel.'s Lands Plantentuin (Buitenzorg), v. 27, 1898. 64 p.

ANEXOS

Nematology

International Journal of Fundamental and Applied Nematological Research
brill.nl/nemy



BRILL

Instructions for Authors

Scope

Nematology (NEMY) is an international journal for the publication of all aspects of nematological research, from molecular biology to field studies. Papers on nematode parasites of arthropods, and on soil free-living nematodes, and on interactions of these and other organisms, are particularly welcome. Research on fresh water and marine nematodes is also considered when the observations are of more general interest.

Ethical and Legal Conditions

Submission of an article for publication in any of Brills' journals implies the following:

1. All authors are in agreement about the content of the manuscript and its submission to the journal.
2. The contents of the manuscript have been tacitly or explicitly approved by the responsible authorities where the research was carried out.
3. The manuscript has not been published previously, in part or in whole, in English or any other language, except as an abstract, part of a published lecture or academic thesis.
4. The manuscript has not and will not be submitted to any other journal while still under consideration for this journal.
5. If accepted, the author agrees to transfer copyright to BRILL and the manuscript will not be published elsewhere in any form, in English or any other language, without prior written consent of the Publisher.
6. If the submission includes figures, tables, or large sections of text that have been published previously, the author has obtained written permission from the original copyright owner(s) to reproduce these items in the current manuscript in both the online and print publications of the journal. All copyrighted material has been properly credited in the manuscript. For more information on the reuse of figures, please go to brill.nl/downloads/Rights-in-Images.pdf.

Online Submission

Authors are required to submit their manuscript online via the Editorial Manager (EM) online submission system at: editorialmanager.com/nem.

First-time users of EM need to register first. Go to the website and click on the "Register Now" link in the login menu. Enter the information requested.

When you register, select e-mail as your preferred method of contact. Upon successful registration, you will receive an e-mail message containing your Username and Password. If you should forget your Username and Password, click on the "Send Username/Password" link in the login section, and enter your first name, last name and email address exactly as you had entered it when you registered. Your access codes will then be e-mailed to you.

Nematology

International Journal of Fundamental and Applied Nematological Research

brill.nl/nemy



BRILL

Instructions for Authors

Prior to submission, authors are encouraged to read the 'Instructions to Authors'. When submitting via the website, you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files.

A revised document is uploaded the same way as the initial submission. The system automatically generates an electronic (PDF) proof, which is then used for reviewing purposes. All correspondence, including the editor's request for revision and final decision, is sent by e-mail. Authors also have the opportunity to suggest and oppose reviewers by submitting the names and (e-mail) addresses.

Contact Address

For any questions or problems relating to your manuscript please contact: nematology@brill.nl. For eventual questions about Editorial Manager, authors can also contact the Brill EM Support Department at: em@brill.nl.

File Formats

The manuscript text should be a Rich Text Format (.rtf) file. Illustrations should be uploaded as separate files: high quality JPEG (minimum resolution 300 dpi) or TIF with LZW compression. Line figures should be at 600 dpi and can be bitmap, JPEG or TIF. Avoid assembling images in PowerPoint or Word as the quality is usually not good enough for publication.

Submission Requirements

Peer Review

Receipt of manuscripts will be acknowledged. Each manuscript will be reviewed by two members of the Editorial Board or other recognised authorities in the field.

Types of Contributions

Nematology publishes full research papers, short communications, Forum articles, perspectives on nematology, and reviews of books and other media.

Short communications are published occasionally. They are not intended as a method of publishing unreplicated experiments or pilot studies. Short communications are not divided into sections and do not have a summary. Usually, only one table or figure is permitted.

Forum articles are occasional invited contributions enabling an author to express a view or discuss a specific topic on current or fundamental subjects relevant to the remit of the journal. There is no prescribed length for Forum articles but they are not intended as exhaustive literature reviews. Forum articles will be reviewed in the usual way.

Language

Papers must be written in English. Spelling should be consistent throughout.

Nematology

International Journal of Fundamental and Applied Nematological Research
brill.nl/nemy



BRILL

Instructions for Authors

Manuscript Structure

Well-presented scripts, which conform to the journal format and which are internally consistent in style, are much easier to review and edit and therefore likely to be published more readily. Observations and data may be presented in the text, in tables, or in figures, but should not be repeated; details of statistical procedures must be included. Text should be double spaced and all pages numbered consecutively.

First Page

The first page of the manuscript should contain the title, complete name(s) of the author(s) and their professional postal addresses. Please indicate clearly the name and e-mail address of the corresponding author.

Summary and Keywords

The second page will contain a short summary and keywords, not including any used in the title.

Headings

Papers should be clearly structured with headings. The text of the manuscript will begin at the third page and consist of an introduction, without heading, and then Materials and methods, Results or Descriptions, Discussion, Acknowledgements, References, Tables and Figures.

Taxonomic Papers

Taxonomic papers must include full citations of all works relevant to nematode descriptions, except those that are not the principal subject of the paper. This is not usually necessary in general research papers, although the principal organisms should be given taxonomic authorities in the text. In taxonomic papers, slides with specimens must be sent if requested by referees, and type specimens must be deposited in at least one well-recognised international nematode collection. Accession numbers (*e.g.*, GenBank) must be given for new molecular sequences.

References

References follow the Harvard System: begin with authors' names (small capitals) and initials, year of publication, full title of periodical, volume and page numbers; *e.g.*:

JONES, J.T., FURLANETTO, C. & KIKUCHI, T. (2005). Horizontal gene transfer from bacteria and fungi as a driving force in the evolution of plant parasitism in nematodes. *Nematology* 7, 641-646.

Give book titles in full, with place of publication then name of publisher and number of pages, *e.g.*:

BIRD, A.F. & BIRD, J. (1991). *The structure of nematodes*. New York & London, Academic Press, xviii + 316 pp.

Nematology

International Journal of Fundamental and Applied Nematological Research

brill.nl/nemy



BRILL

Instructions for Authors

Theses are cited in the same way as books.

For articles in books, give authors and article title, followed by In: editors' names, book title, place of publication then publisher, and page numbers of article; *e.g.*:

DECREAEMER, W. & HUNT, D.J. (2006). Structure and classification. In: Perry, R.N. & Moens, M. (Eds). *Plant nematology*. Wallingford, UK, CABI Publishing, pp. 3-32.

References to abstracts should end with [Abstr.]

References to translations should list the title of the article between square brackets [...]

Tables and Figures

Tables

Each table should be presented separately, numbered as Table 1 (lower case, Arabic numbers) *et seq.* Tables constructed using the MS Word Table tool are preferred.

Figures

Figures should be submitted as separate source files in .eps, .tif, or .jpg format, in a size suitable for the typesetting area of the journal which is 170 × 210 mm. The resolution of these files should be at least 300 dpi for half-tone figures, and 600 dpi for line drawings. Number the files.

The text in a figure must be legible, and should not be smaller than 7 pt. The size of this lettering for any text in a figure should be the same for all figures in the manuscript.

There should be a separate page giving the full list of figure legends, which should include any necessary keys to symbols. Scale bars on each figure or photograph should be included to indicate magnification/reduction. Colour plates can be printed if authors are willing to pay the additional per page printing costs: authors should discuss this with the Editors. Colour plates will be included on the on-line version free of charge.

Copyright

The use of general descriptive names, trademarks, etc. in this publication, even if the former are not specifically identified, is not to be taken as a sign that such names are exempt from the relevant protective Instructions to Authors' laws and regulations and may accordingly be used freely by anyone.

Publication

Proofs

Upon acceptance, a PDF of the article proofs will be sent to each author by e-mail to check carefully for factual and typographic errors. Authors are responsible for checking these proofs and are strongly urged to make use of the Comment & Markup toolbar to note their corrections directly on the proofs. At this stage in the production process only minor corrections are allowed. Alterations to the original manuscript at this stage will result in considerable delay in publication and, therefore, are not accepted unless charged to the author. Proofs should be corrected and returned to the Editor as quickly as possible.

Nematology

International Journal of Fundamental and Applied Nematological Research
brill.nl/nemy



BRILL

Instructions for Authors

The Editors reserve the right to adjust the style to achieve a certain degree of uniformity.

E-Offprints

A PDF file of the article will be supplied free of charge by the publisher to authors for personal use. Brill is a RoMEO green publisher. Authors are allowed to post the pdf post-print version of their articles on their own personal websites free of charge. This means they can show the article exactly as it appears in print. The institute employing the author is allowed to post the post-refereed, but pre-print version of articles free of charge on its repository. The post-refereed, pre-print version means the final accepted version of the manuscript before typesetting.

Consent to Publish

Transfer of Copyright

By submitting a manuscript, the author agrees that the copyright for the article is transferred to the publisher if and when the article is accepted for publication. For that purpose the author needs to sign the **Consent to Publish** which will be sent with the first proofs of the manuscript.

Open Access

In case the author wishes to publish the article in **Open Access** he/she can choose the **Brill Open** option, which allows for a non-exclusive Open Access publication in exchange for an Article Publishing Fee, and sign a special **Brill Open Consent to Publish**. More information on Brill's policy on Open Access can be found on brill.nl/open-access-policy. The Brill Open Consent to Publish can be downloaded from brill.nl/downloads/BrillOpen-Consent-to-Publish.pdf.