



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO**

Pró-Reitoria de pesquisa e pós-graduação



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA E MOLECULAR DE
Pratylenchus zae EM CANA-DE-AÇÚCAR NA REGIÃO
NORDESTE E CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATOIDES
EM MILHO**

Carmem Lúcia Pereira Abade

Recife – PE

2020

CARMEM LÚCIA PEREIRA ABADE

**CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA E MOLECULAR DE *Pratylenchus zae* EM
CANA-DE-AÇÚCAR NA REGIÃO NORDESTE E CONTROLE BIOLÓGICO DE
NEMATOIDES EM MILHO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lilian Margarete Paes Guimarães

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Andressa Cristina Zamboni Machado

Recife-PE

Julho-2020

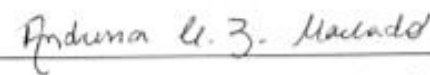
**CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA E MOLECULAR DE *Pratylenchus zeae* EM
CANA-DE-AÇÚCAR NA REGIÃO NORDESTE E CONTROLE BIOLÓGICO DE
NEMATOIDES EM MILHO**

CARMEM LÚCIA PEREIRA ABADE


Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 31/07/2020.


ORIENTADORAS:


Prof.^a. Dr.^a. Lillian Margarete Paes Guimarães (PPGF/UFRPE)

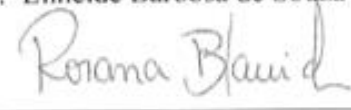

Prof.^a. Dr.^a. Andressa Cristina Zamboni Machado (IAPAR-EMATER)

EXAMINADORES:


Prof.^a Dr.^a Claudia Regina Dias Aricira (UEM/Umuarama)


Prof. Dr. Fernando Godinho de Araújo (IF Goiano/Urutai)

Elineide Barbosa de Souza
Prof.^a Dr.^a Elineide Barbosa de Souza (PPGF/UFRPE)


Prof.^a Dr.^a Rosana Blawid (PPGF/UFRPE)

Recife-PE

Julho-2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A116c Abade, Carmem Lúcia Pereira
CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA E MOLECULAR DE *Pratylenchus zeae* EM CANA-DE-AÇÚCAR NA REGIÃO NORDESTE E CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATOIDES EM MILHO: Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia / Carmem Lúcia Pereira Abade. - 2020.
126 f. : il.
- Orientadora: Profa Dra Lilian Margarete Paes Guimaraes.
Coorientadora: Profa Dra Andressa Cristina Zamboni Machado.
Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, , Recife, 2020.
1. Fitonematoide. 2. Filogenia. 3. Variabilidade. 4. Saccharum spp.. 5. Controle. I. Guimaraes, Profa Dra Lilian Margarete Paes, orient. II. Machado, Profa Dra Andressa Cristina Zamboni, coorient. III. Título

CDD

*Ora, a fé é a certeza de que haveremos de receber o que esperamos,
e a prova daquilo que não podemos ver (Hebreus 11:1)
A minha fé está fundamentada no poder de Deus.*

*Ao meu Sol, minha Solis, minha amada mãezoca **Solimar dos Reis Pereira Abade**, por me inspirar, me apoiar em meus sonhos, pelo seu incondicional amor e dedicação para comigo, pelo colo, infinitas orações e cuidado, por me fazer acreditar e a nunca desistir de mim durante toda essa jornada nos momentos mais difíceis em que eu estive sem esperança para continuar. Eu te amo!*

*A toda a minha família, em especial minha vizinha **Hilda** e minhas irmãs e irmãos **Rejane, Regina, Francisca, Mercês, Luiz, Agnaldo, Ronaldo e Reginaldo**, pelos cuidados, amor, incentivo e apoio nos momentos mais difíceis durante toda essa jornada. Por me ajudarem a prosseguir na realização desse grande sonho quando eu me encontrava com depressão e crises de ansiedade. Sem vocês essa minha conquista não seria possível! À minha mãe e a todos vocês*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A **Jesus Cristo**, autor e consumidor da minha fé, minha esperança, minha paz na tribulação, minha alegria, e meu Guia que me ajuda alcançar meus objetivos e sonhos.

À **Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE**, campus Recife, onde cursei meu mestrado e doutorado.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia-UFRPE**, pela formação, pelos conhecimentos adquiridos por um corpo docente capacitado.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico-CNPq**, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao **Instituto Agrônomo do Paraná-IAPAR**, sede Londrina, pela oportunidade em desenvolver minha pesquisa no Laboratório de Nematologia.

A minha **família** por tanto carinho, amor, dedicação e alegria nos momentos mais difíceis durante essa jornada.

À minha **mãe** pelo seu amor e por me ajudar a tornar esse sonho possível.

À minha orientadora **Dra. Lilian Guimarães** pela amizade, paciência, conselhos, cuidado, carinho e orientação durante minha trajetória no PPGF. És uma grande amiga. Te admiro muito!

À **Dra. Elvira Pedrosa** pela amizade, carinho, conselhos e incentivos para que eu pudesse prosseguir. És um grande exemplo para mim.

À **Dra. Andréa Chaves** por me ajudar com todos os contatos das usinas que eu precisei para realizar esse trabalho.

À minha Coorientadora **Dra. Andressa Machado** pela amizade, apoio, excelente coorientação, apoio e toda dedicação para que eu pudesse fazer um bom trabalho. De todas as amigas que fiz em Londrina, você é a melhor por me influenciar tanto no meu profissional, como no meu pessoal.

Ao **Santino**, pela amizade, ensinamentos, análises, paciência e profissionalismo para comigo. És um excelente profissional meu caro amigo.

Aos secretários do PPGF, **Romildo** e **Darcy** pela amizade e disponibilidade sempre para resolver meus assuntos do Doutorado.

Aos meus amigos da família Lafnema do PPGF **Emerson, Diego, Karina, Juliana, Maurício, Thaís** e **Rezanio** pela amizade e momentos de descontração. Em especial às minhas amigas **Mari David** (Mana), **Mari Lunardi** (Ruiva) e **Carolina França** (Mana) pela amizade incondicional, incentivo e incansável ajuda nos momentos mais difíceis.

Aos meus “filhinhos” estagiários **Thayná** e **Daniel**, meus “bracinhos direito”, meus orgulhos preferidos muito obrigada pela amizade, carinho e todo auxílio e incansável ajuda durante todas as viagens para coletar as amostras que deram origem a esse trabalho.

Aos meus amigos e amigas que ganhei durante a trajetória no PPGF-UFRPE, **Leandro Victor**, **Alba**, **Karol**, **Dulce**, **Pedro**, **Caio**, **Emanuel**, **Barbara**, **Adelson**, **Maya**, **Sophia**, **Grazi**, **Jeferson**, **Marcelo**, **Leandro Shibutani** e **Beatriz**, por cuidarem de mim quando eu mais precisei, e por me alegrar com a vossa amizade e amor. Em especial a **Alba** (Albita), **Dulce** e **Mari Lunardi** que além da amizade, todos os dias quando eu estive com depressão e ansiedade, me visitavam fazendo comida pra mim até que eu pudesse me recuperar e voltar para as análises no laboratório, e **Leandro Victor** (Leozinho) que além de me acompanhar nas coletas para tese, me acompanhou em todas as minhas consultas, cuidando de mim e me dando forças para continuar. Somente Deus sabe como foi árduo o caminho para que esse sonho se tornasse possível. Graças a Ele que eu tenho vocês. Eu os amo.

Aos todos os meus amigos e amigas da IEADPE, em especial à **Thayná**, **Adrielly**, **Wedja**, **Adrienne**, **Camila**, **Edson**, **Caio**, **Gel**, **Matheus André**, **Matheus**, tia **Edna**, **Eline** e **Israel** pela amizade, cuidado e incentivo para que eu pudesse prosseguir.

Ao meu namorado **Anderson**, pelo companheirismo, amor, cuidado e paciência em todos os momentos que estive escrevendo e ele pacientemente me incentivando e me esperando terminar para que pudéssemos conversar um pouco e rirmos juntos. Te amo.

Ao meu Pastor de Bom Jesus-PI, **Wallace** e sua esposa **Iracema** pelo enorme cuidado comigo, atenção e incansáveis orações.

Aos meus amigos **Tamiris** e **Guilherme** pela amizade e apoio.

Aos meus amigos e amigas do IAPAR em Londrina, **Carol**, **Rosa**, **Luriam**, **Mayara**, **Camila**, **Dani**, **Nayra**, **Silas**, **Alison** e **Fernanda** pela amizade, ajuda, ensinamentos e momentos de descontração. E aos colegas **Mônica**, **Mariana** e **Luiz** pela ajuda na condução e avaliações.

A todos e todas que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse trabalho, minha gratidão. Somente Deus pode recompensá-los.

SUMÁRIO

PÁGINA

RESUMO GERAL

GENERAL ABSTRACT

CAPÍTULO 1	12
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1. 1 A cultura da cana-de-açúcar	13
1. 2 A cultura do milho.....	15
1. 3 Fitonematoides	17
1. 4 <i>Pratylenchus</i> Filipjev (1936).....	19
1. 5 <i>Meloidogyne</i> Goeldi (1887)	25
1. 6 Manejo de <i>Pratylenchus</i> e <i>Meloidogyne</i>	27
CAPÍTULO 2	39
Caracterização morfológica e molecular de populações de <i>Pratylenchus zae</i> em cana-de-açúcar na região Nordeste do Brasil	39
CAPÍTULO 3	92
Controle Biológico de <i>Pratylenchus zae</i> e <i>Meloidogyne incognita</i> na cultura do milho ..	92
CAPÍTULO 4	125
Conclusões Gerais	126

RESUMO GERAL

A cana-de-açúcar (*Sacharum spp L.*) e o milho (*Zea mays L.*) possuem grande importância socioeconômica, no entanto, muitos são os problemas fitossanitários que afetam essas culturas, dentre os quais estão as doenças ocasionadas pelos fitonematoides dos gêneros *Pratylenchus*. e *Meloidogyne*. A tipificação das espécies de forma precisa e identificação de métodos de manejo que auxiliem no controle desses fitopatógenos, são de extrema importância, pois esses estudos fornecem novos conhecimentos, tanto sobre a diversidade e identificação de espécies desse gênero em locais onde ainda não foram caracterizadas, como também formas de manejo adequadas. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi caracterizar populações de *P. zae* coletadas em áreas cultivadas com cana-de-açúcar na região Nordeste do Brasil através de estudos morfométricos e moleculares, além de avaliar a eficiência de nematicidas biológicos aplicados via tratamento de sementes de milho no controle de *P. zae* e *M. incognita*. Para a caracterização morfométrica e molecular, foram utilizadas 30 populações de *Pratylenchus* coletadas nas áreas de cana-de-açúcar das usinas Miriri e Japungu no estado da Paraíba, Olho d'água e São José no estado de Pernambuco e Baía formosa e usina Estivas no estado do Rio Grande do Norte. Foram realizadas a caracterização morfométrica, ensaios de PCR e análise filogenética utilizando a região D2/D3 do gene 28S rDNA para a identificação das espécies. Com base nessas análises, verificou-se que *P. zae* é a espécie de *Pratylenchus* presente nas usinas de cana-de-açúcar na região Nordeste, e que as análises aliadas foram úteis para identificar e provar que existe grande variabilidade dentro e entre as populações estudadas. Os ensaios de controle biológico para *P. zae* e *M. incognita* na cultura do milho foram realizados em condições *in vitro* e em casa de vegetação, onde os nematicidas biológicos utilizados foram *Bacillus firmus* (Votivo Prime®), *Pochonia chlamydosporia* (Rizotec®) e *Purpureocillium lilacinum* (Nemat®), e as densidades populacionais de nematoides por planta utilizadas foram: 0 (testemunha), 2.000 e 6.000. No teste *in vitro*, utilizaram-se os mesmos nematicidas e a densidade populacional de 50 nematoides por repetição. As avaliações foram feitas 24 e 48 horas, para os testes *in vitro*, e aos 7 e 60 dias após inoculação (DAI), para avaliar a penetração e a multiplicação dos nematoides, respectivamente. Os resultados dos experimentos com controle biológicos mostraram que *P. lilacinum* e *P. chlamydosporia* causaram maior mortalidade de *P. zae* e *M. incognita*, tanto 24 quanto 48 horas nos testes *in vitro*. O tratamento com *P. chlamydosporia* proporcionou menor penetração de *P. zae* na densidade de 6.000 nematoides por planta, aos 7 DAI, enquanto para *M. incognita*, menor penetração foi observada nos tratamentos com *P. lilacinum* e *P. chlamydosporia*. Aos 60 DAI, todos os nematicidas biológicos reduziram a população de *M. incognita* nas densidades de 667 e 6.000 nematoides por planta, sendo que o tratamento com *B. firmus* apresentou o menor FR na densidade de 2.000. O tratamento à base de *P. chlamydosporia* apresentou menor valor de massa fresca de raiz, e a utilização dos diferentes nematicidas com as densidades de inóculo reduziram a massa seca de parte aérea em relação a testemunha absoluta. *B. firmus* foi o que apresentou melhor eficiência em reduzir a multiplicação de *M. incognita* aos 60 DAI.

Palavras-chave: Fitonematoide, Filogenia, variabilidade, *Saccharum spp.* *Zea mays*. Controle.

GENERAL ABSTRACT

Sugarcane (*Sacharum* spp L.) and corn (*Zea mays* L.) have great socioeconomic importance, however, many are the phytosanitary problems that affect these crops, among which are the diseases caused by the phytonematodes of the genera *Pratylenchus* spp. and *Meloidogyne* spp. Specifying species accurately and identifying management methods that help control these phytopathogens are extremely important, as these studies provide new knowledge, both on the diversity and identification of species of this genus in places where they have not yet been characterized, as well as appropriate forms of management. Therefore, the objective of this work was to characterize populations of *P. zae* collected in areas cultivated with sugarcane in the Northeast of Brazil through morphometric and molecular studies, in addition to evaluating the efficiency of biological nematicides applied via seed treatment. corn in the control of *P. zae* and *M. incognita*. For morphometric and molecular characterization, 30 populations of *Pratylenchus* collected in the sugarcane areas of the Miriri and Japungu plants in the state of Paraíba, Olho d' água and São José in the state of Pernambuco and Baia Formosa and plant Estivas in the state of Rio Grande do Norte. Where realized morphometric characterization, PCR assays and phylogenetic analysis were performed using the D2/D3 region of the 28S rDNA gene to identify species. Based on these analyzes, it was found that *P. zae* is the species of *Pratylenchus* present in sugarcane plants in the Northeast region, and that the allied analyzes were useful to identify and prove that there is great variability within and between populations studied. The biological control assays for *P. zae* and *M. incognita* in corn were carried out in vitro and under greenhouse conditions where the biological nematicides used were *Bacillus firmus* (Votivo Prime®), *Pochonia chlamydosporia* (Rizotec®) and *Purpureocillium lilacinum* (Nemat®) and the population densities of nematodes per plant used were: 0 (control), 2,000 and 6,000. In the in vitro test, the same nematicides and the population density of 50 nematodes were used per repetition. The evaluations were made 24 and 48 hours, for *in vitro* tests, and at 7 and 60 days after inoculation (DAI), to evaluate the penetration and multiplication of the nematodes, respectively. The results of biological control experiments showed that *P. lilacinum* and *P. chlamydosporia* caused higher mortality of *P. zae* and *M. incognita*, both in 24 and 48 hours in in vitro tests. The treatment with *P. chlamydosporia* provided less penetration of *P. zae* at the density of 6000 nematodes per plant, at 7 DAI, while for *M. incognita*, less penetration was observed in the treatments with *P. lilacinum* and *P. chlamydosporia*. At 60 DAI, all biological nematicides reduced the population of *M. incognita* at densities of 667 and 6,000 nematodes per plant, and treatment with *B. firmus* showed the lowest RF at a density of 2,000. The treatment based on *P. chlamydosporia* showed lower value of fresh root mass, and the use of different nematicides with inoculum densities reduced the dry mass of the aerial part in relation to the absolute control. *B. firmus* was the one that showed the best efficiency in reducing the multiplication of *M. incognita* at 60 DAI.

Keywords: Phytonematodes, Phylogeny, variability, *Sacharum* spp. *Zea mays*. Control.

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA E MOLECULAR DE *Pratylenchus zae* EM CANA-DE-AÇÚCAR NA REGIÃO NORDESTE E CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATOIDES EM MILHO

1. INTRODUÇÃO GERAL

1. 1 A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Sacharum* spp L.) é uma planta da família Poaceae e pertencente à classe das monocotiledôneas. As principais espécies surgiram na Oceania, em Nova Guiné, e na Ásia incluindo a Índia e a China. As variedades cultivadas no Brasil e no mundo são híbridos multiespecíficos (DIOLA; SANTOS, 2012). Típicas de climas tropicais e subtropicais, a cultura se desenvolve em forma de touceira, com a formação de perfilhos. É uma gramínea que possui desenvolvimento em dois ciclos, sendo o primeiro chamado de cana-planta, em que a cultura ainda não teve o primeiro corte, variando de 12 a 18 meses. O outro ciclo se dá após o primeiro corte, encerrando o ciclo da cana-planta e iniciando o ciclo da cana soca, em que o período de cultivo é de 12 meses para todas as variedades. É considerada uma cultura semiperene, pois permite vários cortes sem que haja um novo replantio, no entanto, a cada safra, é de grande importância a aplicação de insumos agrícolas para que a cultura continue a expressar uma boa produtividade. Porém, com o passar dos anos, a resposta da cultura à aplicação dos insumos é reduzida, sendo necessária a renovação do canavial (AUDE, 1993; SILVA; SILVA, 2012).

A cana-de-açúcar é uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo tropical. Gera milhares de empregos e é considerada importante fonte de renda e desenvolvimento, sendo a principal matéria prima para a fabricação de açúcar, álcool e aguardente, além de ser utilizada como forrageira na forma *in natura* (DIOLA; SANTOS, 2012).

O Brasil não é só o maior produtor de cana-de-açúcar, como também o maior produtor de açúcar e etanol. O maior produtor nacional é o estado de São Paulo, seguido por Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Alagoas e Pernambuco. A produção de açúcar nacional deverá atingir 39,3 milhões de toneladas na safra 2020/21. Apesar de mais de 50% da produção estar concentrada em São Paulo, a cultura é cultivada em todas as regiões do país, possuindo dois calendários de colheita, um para a Região Nordeste, que vai de setembro a abril, e outro para o restante do país, que vai de maio a janeiro (CONAB, 2020). A Região Centro-Sul será responsável nessa safra por 90,6% do total de açúcar produzido, e a Norte/Nordeste pelos restantes (CONAB, 2020).

A estimativa de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar é de 27,9 bilhões de litros (CONAB, 2020). A indústria canavieira é uma das principais atividades socioeconômicas do

Nordeste e o açúcar é o produto que lidera as exportações da região, gerando empregos e renda. O rendimento econômico da cana-de-açúcar é dado principalmente pela produção do açúcar e do álcool (TOPPA *et al.*, 2010). O conjunto de fatores que ampliam os ganhos de produtividade permite ao país a posição de destaque na liderança mundial nos campos da agricultura alimentar e energética, sendo a cana-de-açúcar uma das protagonistas deste quadro de sucesso (CHICONE, 2012).

Na região Nordeste houve aumento de 1,6 % na área, atingindo 857,6 mil hectares. Em produtividade houve um aumento de 2,5 % na safra 2020/21. No estado de Alagoas, o setor vem experimentando melhora na eficiência em área menor, estima-se que a área em produção seja de 333,3 mil hectares. O estado de Pernambuco perdeu muita área cultivada nos últimos anos. No entanto, para esta safra, são estimados 251,1 mil hectares. No estado da Paraíba a estimativa é de 133,9 mil hectares e, no Rio Grande do Norte, de 67,6 mil hectares, onde houve um aumento de 2,2% em relação à produtividade com projeção de mais de 2,9 milhões de toneladas de cana-de-açúcar colhidas. (CONAB, 2020).

Essa importância econômica da cultura para o Brasil pode ser afetada por alguns fatores, dentre os quais se destacam as pragas e doenças. Grandes áreas de produção em monocultivo podem favorecer o surgimento de pragas e doenças, levando a níveis de danos consideráveis para a economia (GASSEN, 2010).

Entre as principais pragas da cana-de-açúcar se destacam a broca da cana-de-açúcar (*Diatraea sacharalis* Fabricius, 1794 e *D. flavipennella* Box, 1931), a broca gigante (*Telchin licus* Drury, 1773) os cupins, as cigarrinhas da folha e da raiz (*Mahanarva fimbriolata* Stal, 1854 e *M. posticata* Stal, 1855) e as saúvas (ARRIGONI, 2018). Entre as principais doenças se destacam o mosaico (SCMV), o raquitismo da soqueira (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli* Evetushenko et al., 2000), o carvão (*Sporisorium scitamineum* Piepenbring et al., 2002), a ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala* Syd e Syd (Cummins, 1971), a ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehnii* (Krüger) Butler, 1914) (MATSUOKA; MACCHERONI, 2012). E nematoides, em que cerca de 300 espécies ectoparasitas ou endoparasitas, pertencentes a 48 gêneros, já foram encontradas na rizosfera ou infectando diretamente a cultura no mundo todo (MATSUOKA; MACCHERONI, 2012). Dentre as espécies de nematoides que são economicamente importantes em função das altas populações e consequentes danos que causam para a cultura da cana-de-açúcar se destacam as espécies *Meloidogyne javanica* Chitwood, 1949, *M. incognita* Chitwood, 1949 e *Pratylenchus zaeae* Graham, 1951 (DINARDO-MIRANDA, 2005). As perdas causadas pelos nematoides na cultura da cana-de-açúcar, variam de 20 a 50% da produção (OLIVEIRA; KUBO, 2007).

A utilização de medidas de manejo, como o controle alternativo, que visem à redução da intensidade de doenças causadas pelos nematoides, aumento da produção e da produtividade agrícola pelo emprego de métodos culturais, mecânicos, físicos, legislativos, biológicos, indutores de resistência, entre outros, são de extrema importância para a cultura (PAULA JÚNIOR *et al.*, 2005). O manejo de nematoides na cultura da cana-de-açúcar é baseado principalmente no uso de produtos químicos, controle preventivo evitando a entrada do patógeno na área, evitar locais com infestação realizando análise nematológica em amostras da área, rotação de culturas, variedades resistentes e realização de tratamentos culturais (OLIVEIRA; KUBO, 2007).

Medidas que reduzam as populações dos nematoides nas áreas, antes do estabelecimento do canavial, são um ponto crucial para o sucesso no manejo. Os métodos mais comuns são os controles biológico, cultural, químico e varietal. A identificação correta das espécies de nematoides presentes nas áreas cultivadas é importante para a escolha de métodos de manejo adequados contra esses patógenos. Assim, a caracterização morfológica e morfométrica aliada à identificação molecular é muito importante para a correta identificação de espécies de nematoides.

1. 2 A cultura do milho

O milho, *Zea mays* L., é uma gramínea da Família Poaceae, originado do México e possui grande importância socioeconômica (MAGALHÃES *et al.*, 2002; LIMA, 2018). A cultura possui crescimento e desenvolvimento divididos em estádios vegetativo e reprodutivo. O estágio vegetativo vai desde a emergência (VE) até o pendoamento (VT). O estágio reprodutivo é dividido em seis estádios, que envolvem o desenvolvimento completo da espiga (MAGALHÃES; DURÃES, 2006). Sua utilização vai desde a alimentação, uso industrial e energético. Porém, seu principal destino é para produção de ração animal. Pode ser utilizado na produção de fubás, farinhas, canjicas e óleos, além de ser empregado em produtos mais elaborados, como xarope de glicose, que é utilizado na produção de balas, gomas de mascar, doces em pasta etc.; maltodextrinas destinadas à produção de aromas e essências, sopas desidratadas e produtos achocolatados; e corantes caramelo utilizados na produção de refrigerantes, cervejas e molho. O etanol produzido a partir do milho é a principal fonte de bioenergia nos Estados Unidos. No Brasil, o milho é amplamente utilizado, principalmente para a produção de ração (SOLOGUREN, 2015).

Os principais produtores nacionais são Mato Grosso, Paraná, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (CONAB, 2020). Os principais consumidores são Estados Unidos, China, União Europeia e Brasil, que juntos respondem por 65,15% da demanda

global. Dentre os principais consumidores, Estados Unidos, China e Brasil são os principais produtores mundiais (347,8; 260,8 e 101,0 milhões de toneladas, respectivamente) e Estados Unidos, Brasil e Argentina, os maiores exportadores mundiais (USDA, 2020).

A safra brasileira de milho 2019/2020 atingiu uma produção recorde, com produção final, ainda estimada, de 99,3 milhões de toneladas. O consumo doméstico, por sua vez, também teve um significativo incremento, chegando a 63,9 milhões de toneladas (CONAB, 2019). A estimativa brasileira de área de milho primeira safra, na temporada 2019/20, é de 4.147,9 mil hectares. Considerando a primeira, segunda e terceira safras, a estimativa nacional do plantio do milho na temporada 2019/20 é de uma área plantada totalizando 17.536,9 mil hectares (CONAB, 2020).

Apesar da grande importância econômica da cultura do milho, existem diversos fatores que afetam sua produtividade, dentre os quais se destacam as pragas e doenças causadas por nematoides. Dentre as principais pragas de importância para a cultura estão a lagarta elasmó (*Elasmopalpus lignosellus* Zeller, 1848), a vaquinha (*Diabrotica speciosa* Germar, 1824), o percevejo-castanho (*Scaptocoris castanea* Perty, 1830), e a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda* Smith, 1797) (VALICENTE, 2015). Com relação as doenças causadas pelos nematoides, mais de 60 espécies foram relatadas na cultura em todo o mundo (NICOL, 2011). As espécies encontradas no Brasil com relevância econômica são *Pratylenchus brachyurus*, *P. zaeae*, *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* (INOMOTO, 2015; GALBIERI; ASMUS, 2016).

Estima-se que perdas em produtividade, ocasionadas pelos nematoides, cheguem a 12,3% (\$157 bilhões de dólares) em todo o mundo (SINGH *et al.*, 2013). Para milho, as perdas podem variar de 5 a 20%, em função da ocorrência de diversos gêneros, incluindo *Pratylenchus* spp. e *Meloidogyne* spp. (KOENNING *et al.*, 1999). Entretanto, há relatos de produtores que atestam perdas de 30% em lavouras de milho infestadas por *Pratylenchus* (DINARDO-MIRANDA; DINARDO MIRANDA, 2018). O manejo é feito basicamente utilizando material resistentes, pois a utilização de híbridos resistentes é uma alternativa economicamente viável, rotação de culturas com plantas não hospedeiras de fitonematoide, controle químico e o controle biológico que vem ganhando destaque (CASELA *et al.*, 2006; SANTOS, 2020). É importante ressaltar a importância de manter as áreas livres de soqueiras e plantas invasoras com potencial para serem hospedeiras de várias espécies de nematoides, durante os períodos de entressafras, pois o possível sucesso no manejo é dependente da adoção do sistema produtivo completo, desde a escolha do híbrido mais adequado a ser plantado na safrinha, como da utilização de vários métodos de controle adequados (SANTOS, 2020).

Além disso, em função do sistema produtivo adotado pela maioria dos produtores no Brasil, baseado no cultivo de soja e milho safrinha, espera-se incremento populacional para a cultura da soja, uma vez que a maioria dos híbridos de milho são suscetíveis aos nematoides e causam aumento populacional.

Para *Pratylenchus* spp., a falta de cultivares resistentes, além de poucas opções de plantas para rotação e aumento de cultivo em áreas arenosas, aumentaram a dispersão e o impacto desse nematoide nas culturas agrícolas, entre elas o milho (INOMOTO, 2015; FERRAZ; BROW, 2016). Em relação ao gênero *Meloidogyne*, cerca de 20-30% dos híbridos comercializados no Brasil são resistentes a *M. javanica*; no caso de *M. incognita*, não se conhece até o momento híbrido de milho que seja resistente a este nematoide.

1. 3 Fitonematoides

Os nematoides são considerados como os mais abundantes entre os animais multicelulares e constituem um grupo muito diversificado, incluindo formas, com diversos hábitos alimentares e diferentes papéis ecológicos no solo (GOULART, 2010). Possuem estrutura interna formada pelo sistema digestório, excretor, nervoso, reprodutor e órgãos sensoriais. O sistema digestório compreende um tubo que se estende desde a abertura oral ao ânus. É importante ressaltar que os órgãos sensoriais dos nematoides são receptores químicos que estão divididos em papilas e anfídeos, que se encontram na região anterior, e fasmídios, que se localizam na cauda ou próximo dela. Esses são órgãos primordiais, pois através dos mesmos os nematoides conseguem alcançar e assimilar exsudatos emitido pelas plantas e iniciar o processo parasitário (FERRAZ, 2018).

O sistema reprodutor masculino é formado pelo testículo, vaso deferente e canal ejaculador que se abre ventralmente no reto formando a cloaca. O sistema reprodutor feminino constitui-se de dois ramos genitais que são formados pelo ovário, oviduto e útero. Esses ramos se conectam a uma vagina de origem ectodérmica, que se abre para o exterior pela vulva, em formato de fenda na linha mediana ventral (FERRAZ, 2018).

O tamanho dos nematoides pode variar entre 0,2 a 8 m, porém a grande maioria é microscópica, como é o caso dos fitonematoides que possuem entre 0,15 mm a 3 mm de comprimento e 20 a 50 μm de diâmetro. Possuem mecanismos de sobrevivência denominados de anidrobiose, anoxibiose e criobiose, que estão relacionados à sobrevivência na ausência de água, oxigênio e em baixas temperaturas, respectivamente. O ciclo de vida possui quatro fases que vão desde o estágio de ovo até o quarto estágio com a diferenciação de macho e fêmea (FERRAZ, 2018).

Os nematoides são classificados conforme o hábito alimentar em microbívoros, que se alimentam de fungos e bactérias respectivamente, predadores, que se alimentam de outros nematoides, onívoros, que podem se alimentar de diversas fontes e os fitonematoides, que se alimentam das plantas (NOE; BERNARD 2016)

Os fitonematoides são vermes microscópicos habitantes do solo que parasitam as plantas, e ocasionam danos às culturas agrícolas e consequente prejuízos econômicos (GOULART, 2010). São parasitas obrigatórios que possuem o estilete como órgão principal para que ocorra a penetração, alimentação e consequente relação parasitaria com a planta. Quanto a classificação taxonômica dos fitoparasitos, de acordo com De Ley e Blaxter (2002), a classificação do filo engloba as classes Chromadorea e Enoplea.

Os danos causados pelos fitonematoides são de natureza mecânica, devido à penetração e migração do nematoide no córtex do sistema radicular, tóxica, pela secreção de substâncias liberadas pelas glândulas esofagianas dentro do citoplasma da célula vegetal, e espoliativa, devido à alimentação no conteúdo citoplasmático das células atacadas (FERRAZ, 2018).

Quanto ao modo de parasitismo, os fitonematoides podem ser classificados em ectoparasitas, endoparasitas (migradores ou sedentários) e semiendoparasitas. Os ectoparasitas se alimentam em diferentes locais, porém nunca entram no tecido da planta, apenas penetram o estilete profundamente no córtex ou, quando o estilete não é tão forte, se alimentam nas células epidérmicas e pelos radiculares. Os endoparasitas migradores penetram e migram nos tecidos vegetais, se alimentando do conteúdo das células. Os endoparasitas sedentários penetram e, após estabelecer o sítio de alimentação, ocorre o dimorfismo sexual tornando as fêmeas obesas. Os semiendoparasitas penetram o corpo parcialmente nos tecidos das plantas, enquanto o resto do corpo é exposto ao ambiente externo (SHAH; MAHAMOOD, 2017).

Para exercer o parasitismo, os fitonematoides utilizam o estilete para perfurar, invadir e injetar moléculas efetoras nas células do seu hospedeiro, produzidas pelas glândulas esofagianas, que liberam tais substâncias através de válvulas complexas que controlam a liberação de secreção excitotóxica (HUSSEY 1989; HUSSEY; MIMS, 1990). As glândulas esofagianas são vitais para a produção de compostos relacionados à penetração, migração, estabelecimento e manutenção dos sítios de alimentação.

Os nematoides apresentam distribuição bastante irregular, ocorrendo em agregados e manifestando sintomas em reboleiras no campo, por isso a amostragem em áreas infestadas deve ser realizada em ziguezague e ou, de maneira mais localizada, próximo das reboleiras, reduzindo, assim, erros que possam comprometer a diagnose (MACHADO; SILVA, 2019), na profundidade de 0 a 20 cm (CARES; HUANG, 2008).

Os sintomas ocasionados pelos fitonematoides incluem comprometimento das raízes e redução na captação de nitrogênio acarretando atrofia. Os sintomas radiculares são diversos e incluem galhas, lesões, nanismo, além de escurecimento ou apodrecimento generalizado dos tecidos radiculares. Em campo a distribuição geralmente não é uniforme e os sintomas visíveis na parte aérea das plantas refletem essa distribuição desigual. Há também sintomas de deficiências nutricionais, como amarelecimento, murcha excessiva em clima quente ou seco, distorção de folhas e caules e desenvolvimento anormal das partes florais, levando a redução de rendimentos e baixa qualidade dos produtos (NOE; BERNARD, 2016). Além dos danos diretos, eles têm a capacidade de atuar como vetores de vírus ou causar doenças complexas quando associados a outros fitopatógenos em culturas agrícolas economicamente importantes (ASKARY; MARTINELLI, 2015).

As perdas devido ao ataque dos fitonematoides têm tipicamente um intervalo de 10% a 60% da produção total, dependendo da espécie, status do hospedeiro e condições ambientais. As perdas nos países mais desenvolvidos variam de 5% a 10% a cada ano, enquanto as perdas nos países menos desenvolvidos podem ser de 30% a 60%, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (NOE; BERNARD, 2016). As perdas anuais ocasionadas pelos fitonematoides correspondem de 8,8 a 14,6% da produção total de uma cultura, podendo ser ainda maiores, por exemplo, quando há a formação de complexos de doenças com fungos e bactérias (PESSOA, 2019).

As perdas anuais mundiais causadas pelos fitonematoides em grãos, leguminosas, banana, mandioca, coco, batata, cana-de-açúcar, batata-doce, inhame e outras culturas economicamente importantes gira em torno de 14%, totalizando mais de 80 US\$ bilhões anualmente (AGRIOS, 2005). Em gramíneas, como nas culturas do arroz e da cana-de-açúcar, as perdas giram em torno de 3 a 30 % (COSTA *et al.*, 2019; GABIA, 2019). No entanto, como muitos países ainda não fazem levantamentos sistemáticos da ocorrência de fitonematoides ou das perdas causadas por esses organismos, esses dados acabam sendo incompletos.

A disseminação dos fitonematoides a longas distâncias ocorre por meio de materiais contaminados, mudas, solo, maquinaria agrícola e fertilizantes orgânicos. As técnicas de manejo para os nematoides parasitas de plantas se baseiam principalmente na aplicação de nematicidas químicos ou biológicos no solo, na utilização de cultivares resistentes e na rotação de culturas.

1. 4 *Pratylenchus* Filipjev, 1936

O gênero *Pratylenchus* Filipjev 1936 é o segundo mais importante para as plantas cultivadas em todo o mundo, tendo sido descrito pela primeira vez na Inglaterra por De Man,

em 1880, como *Tylenchus pratensis*. Após ter sido originalmente descrito como *T. pratensis*, Filipjev (1934) designou a espécie como o novo gênero *Pratylenchus*, derivando a palavra das três primeiras letras do tipo de espécie (*Pratensis*) e *Tylenchus*. Assim, a espécie passou a ser denominada de *P. pratensis* (DE MAN, 1880) Filipjev, 1936. A espécie *Pratylenchus brachyurus* (GODFREY, 1929) Filipjev e Schuurmans Stekhoven, 1941 foi a primeira encontrada no Brasil, por Lordello e Arruda (1957), na cultura da banana (CASTILLO; VOVLAS, 2007).

Conhecido como nematoídes das lesões radiculares, *Pratylenchus* spp. podem ocasionar redução do rendimento de muitas culturas em várias partes do mundo, pois possuem ampla gama de hospedeiros e distribuição generalizada nas regiões tropicais, subtropicais e também em regiões de clima temperado (CASTILLO; VOVLAS, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2013). As espécies de *Pratylenchus* mais frequentes no Brasil são *P. brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev e S. Stekhoven, 1941, *P. coffeae* (Zimmermann, 1898) Goodey, 1959, *P. jaehni* Inserra *et al.* (2001), *P. penetrans* (Cobb, 1917) Chitwood e Oteifa, 1952, *P. vulnus* Allen e Jensen, 1951 e *P. zae* Graham, 1951 (GONZAGA, 2006). De acordo com Decraemer e Hunt (2006), o gênero *Pratylenchus* possui a seguinte classificação taxonômica:

Reino: Animalia.

Filo: Nematoda Potts (1932)

Classe: Chromadorea Inglis (1983)

Subclasse: Chromadoria Pearce (1942)

Ordem: Tylenchida Thorne (1949)

Subordem: Tylenchina Thorne (1949)

Superfamília: Tylenchoidea Thorne (1949)

Família: Pratylenchidae Thorne (1949)

Subfamília: Pratylenchinae Thorne (1949)

Gênero: *Pratylenchus* Filipjev (1936)

Espécie: *Pratylenchus zae* Graham (1951)

O tamanho do estilete de *Pratylenchus* é variável entre 11,5 a 23 μm dependendo da espécie. O estilete é curto e robusto com nódulos basais bem desenvolvidos. O esôfago é dividido em procorpo, metacorpo ou bulbo mediano, ístmo e bulbo basal que é a porção terminal glandular (CASTILLO; VOVLAS, 2007). De uma maneira geral, as espécies do gênero apresentam região labial baixa, sobreposição ventral das glândulas esofagianas sobre o intestino, são vermiformes e as fêmeas monodelfas prodelfas com a vulva situada no terço posterior do corpo (MAI; MULLIN, 1996). As fêmeas e os machos do gênero possuem tamanho

de 0,4 a 0,7 mm de comprimento e 20 a 25 μm de diâmetro, porém, pode ocorrer variação no tamanho entre espécimes extraídos de diferentes espécies vegetais (AGRIOS, 2005; LOOF, 1991). Indivíduos de uma mesma espécie extraídos do solo são menores e menos vigorosos que espécimes extraídos das raízes da planta hospedeira (GONZAGA, 2006).

A reprodução de *Pratylenchus* spp. se dá por anfimixia, quando os machos são abundantes na espécie, partenogênese mitótica ou partenogênese meiótica, quando os machos são raros (FERRAZ, 2018). O ciclo de vida é variável entre 3 a 8 semanas, dependendo das condições ambientais, podendo até ser concluído em 28 dias se houver temperaturas entre 30 a 35 °C (PINHEIRO *et al.*, 2015; SOUZA, 2009). As fases do ciclo de vida constam basicamente de ovo, onde o juvenil de primeiro estágio sofre a primeira ecdise, formando o juvenil de segundo estágio que, após eclodir, sofre uma segunda ecdise formando o juvenil de terceiro estágio, que passa por uma terceira ecdise formando o juvenil de quarto estágio, sofrendo uma quarta ecdise e formando o adulto, com diferenciação entre macho e fêmea. As fêmeas produzem, em média, de 80 a 150 ovos durante toda a vida (PINHEIRO, 2017). As fêmeas adultas depositam os ovos individualmente no tecido da raiz ou no solo e todos os estágios juvenis fora do ovo e adultos podem infectar as raízes do hospedeiro (NOE; BERNARD, 2016).

O teor de água no solo na faixa de 70 a 80% da capacidade de campo representa uma faixa ótima para o desenvolvimento da maioria dos nematoides. Para *Pratylenchus*, a textura e a umidade do solo estão entre os fatores mais importantes que influenciam a distribuição de suas populações. Solos arenosos ou de textura média favorecem a maioria das espécies do gênero (AGRIOS, 2005; GOULART, 2008).

Os nematoides das lesões radiculares são endoparasitas migradores que causam severos danos nas raízes das culturas parasitadas, devido à alimentação, movimentação ativa, liberação de enzimas e toxinas no córtex radicular. A penetração e migração na planta hospedeira são facilitadas pela combinação de ação mecânica, com auxílio do estilete, e tóxica pela degradação enzimática das paredes celulares (GOULART, 2008). Eles penetram nas raízes e, migrando pelo córtex, matam frequentemente as células nas quais se alimentam. À medida que migram, se alimentam brevemente das células próximas e continuam se movendo, ocasionando a morte das células devido às suas atividades de alimentação, resultando em lesões alongadas e espalhadas nas raízes (NOE; BERNARD, 2016). Os sintomas nas plantas normalmente se manifestam em reboleiras na lavoura, com crescimento reduzido e amarelecimento. Fungos e bactérias potencializam os danos nas raízes, causando apodrecimento (PINHEIRO, 2017).

Existem mais de trezentas espécies botânicas que já foram aludidas como hospedeiras de *Pratylenchus* spp. (PINHEIRO, 2017). *Pratylenchus brachyurus* e *P. zae* possuem alto

poder de polifagia atacando espécies de plantas economicamente importantes como arroz (*Oryza sativa* L.), soja (*Glycine max* L.), milho (*Zea mays* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L), banana (*Musa* spp.) e cana-de-açúcar (*Sacharum* spp.) (ALMEIDA, 2016; ASMUS, 2015; BURIN, 2016; COSTA *et al.*, 2019; MAINARDI; NORONHA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2015).

Na cultura da cana-de-açúcar no Brasil, as principais espécies de nematoides das lesões radiculares economicamente importantes são *P. zaeae* e *P. brachyurus*, sendo *P. zaeae* a mais importante devido à sua ampla distribuição geográfica, frequência de ocorrência, patogenicidade comprovada e perdas provocadas (OLIVEIRA; KUBO, 2007). *Pratylenchus zaeae* causa perdas de 20 a 30% de produtividade na cultura, podendo chegar até 50% (GABIA, 2019; DINARDO-MIRANDA, 2005). Perdas semelhantes por essa espécie de nematoide também são relatadas na cultura em outros países, como por exemplo na Austrália em que as perdas foram de 5 a 10% em 2016/2017 (PERRINE-WALKER *et al.*, 2019).

Em condições de campo, é observada a formação de reboleiras caracterizadas por plantas pouco desenvolvidas e pouco vigorosas. As raízes mais novas de cana-de-açúcar parasitadas apresentam lesões escuras, contrastando com as raízes sadias, de coloração normal. No entanto, esse sintoma é difícil de ser visualizado em raízes mais velhas, já que a coloração normal de uma raiz sadia é também escura, impedindo a distinção visual entre raízes parasitadas daquelas não parasitadas. Por isso, é importante enfatizar que nem sempre é possível reconhecer e diagnosticar a presença de *Pratylenchus* spp. e outros fitonematoides apenas pela observação dos sintomas, por isso é imprescindível a realização de análise laboratorial (OLIVEIRA; KUBO, 2007).

Quanto a caracterização molecular e morfométrica, existem aproximadamente 75 espécies descritas de *Pratylenchus*, com uma ampla de hospedeiros, mas o diagnóstico é difícil por causa da semelhança morfológica entre as espécies (ARAYA *et al.*, 2016). A identificação de espécies é geralmente baseada nos caracteres morfológicos das fêmeas, pois elas possuem mais caracteres diagnósticos que os machos (LOOF, 1991).

A taxonomia para distinguir as várias espécies do gênero é muito difícil, devido ao número reduzido de caracteres diagnósticos e à variabilidade intraespecífica de alguns desses caracteres (GOULART, 2008). Esse fato evidencia a importância da caracterização das espécies de forma precisa, por isso, o uso de ferramentas moleculares e análises filogenéticas, além do uso de técnicas morfométricas, integração de metodologias denominada “taxonomia integrativa” (OLIVEIRA *et al.*, 2011), que já tem sido utilizada para esse fim. Por exemplo, populações de *P. coffeae* Filipjev e Schuurmans Stekhoven, (1941) coletadas em túberas de

inhame (*Dioscorea cayennensis* L.) no Estado de Pernambuco, Brasil, foram estudadas e caracterizadas morfológicamente e morfometricamente utilizando-se técnicas de microscopia de luz e geneticamente por meio de sequenciamento da expansão D2/D3 da região 28S rDNA e aplicação da tecnologia do código de barras do DNA e primers específicos (LIRA *et al.*, 2014).

Constantemente, a distinção entre espécies é baseada em medições médias de uma população de indivíduos e isso é bastante complicado quando as populações apresentam misturas de espécies estreitamente relacionadas. Diante disso, a reação em cadeia da polimerase (PCR) fornece informações de dados genéticos para a identificação confiável de nematoides. Isso nos permite criar uma estrutura sólida para estudos futuros da biodiversidade de nematoides (POWERS, 2004).

Além disso, estudos de diversidade e filogenia são importantes no desenvolvimento dos chamados códigos de barras, que são incorporados a uma estrutura filogenética com poder preditivo da história evolutiva. Duas regiões gênicas têm sido caracterizadas entre os *taxa* de nematoides, a matriz de DNA ribossômico (rDNA) e o genoma mitocondrial, por serem altamente conservadas (POWERS, 2004). A matriz do DNA ribossomal consiste em três genes, 18S, 5.8S e 28S, contendo duas regiões espaçadoras (ITS-1 e ITS-2), separadas pelo gene 5.8S (DORRIS; DE LEY; BLAXTER, 1999). O gene 28S possui uma coexistência de variabilidade e conservação, o que torna essa região mais adequada para estimar relações filogenéticas, possibilitando melhor identificação das posições de homologia e facilitando o alinhamento de múltiplas sequências com confiança (GILLESPIE *et al.*, 2004).

A região genômica mais estudada para nematoides do gênero *Pratylenchus* é a expansão D2/D3, que se situa no gene 28S do rDNA, por possuir uma baixa taxa de mutação (SUBBOTIN *et al.*, 2008). Como exemplo, podemos citar Luca *et al.* (2012), que identificaram um novo nematoide das lesões radiculares patogênico para *Musa* spp. causando importantes perdas na produção de banana em Ghana, descrito e nomeado de *P. speijeri* n. sp. Os autores utilizaram para isso comparações das características morfológicas e moleculares com as de *P. coffeae* e outras espécies relacionadas, baseadas nas sequências e análises filogenéticas dos segmentos de expansão D2/D3 rRNA (28S), mostrando a aplicação prática do uso de *primers* específicos como importante ferramenta em programas de melhoramento da cultura na África Ocidental.

Por meio de análise de PCR seis espécies de *Pratylenchus* comuns na Califórnia foram identificados usando cinco *primers* espécie-específicos, com base em uma única fêmea, atestando que a análise molecular funciona como uma ferramenta de diagnóstico rápido em estudos epidemiológicos (AL-BANNA *et al.*, 2004). A utilização do código de barras genético

aliado a características morfológicas para diagnose de *Pratylenchus* spp. foi relatada por Oliveira *et al.* (2009). Neste trabalho, através do uso de PCR seguida de sequenciamento da região D2/D3 de espécimes de *Pratylenchus* sp. extraídos de batata semente ou raízes de lírio provenientes da Holanda, os autores comprovaram, após comparação dessas sequências com outras depositadas no banco de dados GenBank, que se tratava das espécies *P. penetrans* Cobb (1917) e Chitwood e Oteifa (1952), e *P. crenatus* Loof (1960), respectivamente presentes nos tubérculos de batata semente e nas raízes de lírio, consideradas quarentenárias para o Brasil na época. Os autores provaram que a utilização de caracteres morfológicos aliado aos estudos moleculares foram importantes para o serviço de quarentena do Brasil, na medida em que a detecção e correta diagnose impediu a infestação de áreas indenizadas pela utilização de material de propagação infestado importado.

Populações de *Pratylenchus* spp. em diferentes campos de soja na região central do Brasil, foram identificadas com base na análise de sequências da região ITS-5.8S rDNA e comparação delas com outras depositadas em banco de dados (GenBank) (RIBEIRO *et al.*, 2013). Uma nova espécie de nematoide das lesões radiculares (*P. parazeae* n. sp.) foi descrita também em cana-de-açúcar (*S. sinensis* Roxb) na Região Autônoma de Guangxi Zhuang, na China, com base na morfologia e nas análises moleculares da subunidade pequena de rRNA (SSU), nos domínios de expansão D2/D3 da subunidade grande (LSU) e no espaçador transcrito interno (ITS) (WANG *et al.*, 2015). Treze populações de nematoides de oito diferentes hospedeiros da Carolina do Norte foram caracterizadas molecularmente e as relações filogenéticas estudadas com base em sequências de 18S, onde 65 populações de nematoides foram agrupadas de forma correspondente em posições apropriadas de 13 famílias, incluindo Pratylenchidae e Paratylenchidae (ZENG *et al.*, 2015).

Em um estudo de caracterização morfológica e molecular de populações brasileiras de *P. brachyurus*, foi possível distinguir por meio de análise filogenética utilizando sequências da região ITS-rDNA, grupos de sequências estatisticamente suportadas que correspondiam aos de outras populações de *P. brachyurus* (GODFREY, 1929) Filipjev e Schuurmans Stekhoven, (1941) depositadas no GenBank, confirmando assim a identidade das populações estudadas, além de identificar diversidade intraespecífica de sequências entre as populações (MACHADO *et al.*, 2015). Os fitonematoides *P. crenatus* Loof (1960) e *P. neglectus* Filipjev e Schuurmans Stekhoven (1941) foram identificados associados à cultura de trigo na República Checa, com base em morfologia e morfometria e em sequências da região D2/D3 e do gene 18S (KUMARI, 2015).

O nematoide *P. hippeastri* Inserra *et al.*, (2006) foi identificado em macieira na China utilizando o segmento LSU D2/D3, região ITS-rDNA, análises morfométricas e microscopia eletrônica de varredura (WANG *et al.*, 2016). *P. crenatus* foi reportado no Brasil por meio de estudos morfométricos e moleculares (BONFIM JUNIOR *et al.*, 2016). Espécies de *Pratylenchus* foram identificadas pela primeira vez presentes na Costa Rica, utilizando métodos morfológicos e moleculares (ARAYA *et al.*, 2016).

Através de PCR convencional e PCR em tempo real, *P. scribneri* Steiner (1943) foi identificado e distinguindo de *P. penetrans* e *P. neglectus* isolados de amostras de campo coletadas de vários locais em Dakota do Norte e Minnesota, na primeira publicação da identificação de *P. scribneri* usando PCR em tempo real (HUANG; YAN, 2017). Por meio de um estudo de caracterização molecular de *P. rwandae* utilizando análises filogenéticas baseadas em sequências das regiões D2/D3, 18S parciais e ITS, foi observado que *P. rwandae* n. sp. pertence ao grupo *penetrans* e aparece como uma espécie irmã de um grupo que compreende *P. convallariae* Seinhorst (1959), *P. dunensis* Pena *et al.*, 2006, *P. fallax* Seinhorst (1968), *P. oleae* n. sp., *P. penetrans* Cobb (1917) e Chitwood e Oteifa (1952), *P. pinguicaudatus* Corbett (1969) e três outras espécies não identificadas (SINGH *et al.*, 2018).

Os estudos citados acima somente fortalecem a hipótese de que, aliadas aos estudos morfológicos, as técnicas moleculares envolvendo análises filogenéticas poderão fornecer novos conhecimentos sobre a diversidade e a identificação de espécies desse gênero de nematoide, pois muitas espécies ainda não foram caracterizadas molecularmente em diversos locais, como por exemplo no Nordeste do Brasil. A necessidade de taxonomia integrativa na identificação e caracterização de *Pratylenchus* spp. é de extrema importância para o planejamento de estratégias de manejo que visem evitar perdas significativas em culturas de importância econômica.

1. 5 *Meloidogyne Goeldi*, 1887

O gênero *Meloidogyne* Goeldi 1887, também conhecido como nematoides das galhas, é o mais importante entre os fitonematoides, pela sua ampla distribuição geográfica e gama de hospedeiros. São dominantes em regiões tropicais quentes e temperadas (MATTOS, 2017). No século XIX Göldi (1887) foi quem fez o assinalamento e descrição do nematoide-das-galhas na cultura do café no Brasil, criando o nome genérico *Meloidogyne* derivado de melon = melão; gyne = fêmea, pois as fêmeas do nematoide tinham formato de melão. Além da criação do nome do gênero, ele apresentou *Meloidogyne exigua* Göldi como a espécie-tipo, sendo esta conhecida como o nematoide-do-cafeeiro (MOURA, 2018). A espécie *M. incognita* foi descrita logo após

os trabalhos Göldi (1887), por Chitwood (1949) que descreveu mais cinco espécies utilizando seu método de observação do padrão perineal de fêmeas do gênero (MOURA, 2018).

Conforme De Ley e Blaxter (2002) os nematoides das galhas possuem a seguinte classificação taxonômica:

Reino Animal

Filo Nematoda Potts (1932)

Classe Chromadorea Inglis (1983)

Subclasse Chromadoria Pearse (1942)

Ordem Rhabditida Chitwood (1933)

Subordem Tylenchina Thorne (1949)

Superfamília Tylenchoidea Örley (1880)

Família Meloidogynidae Skarbilovich (1959)

Subfamília Meloidogyninae Skarbilovich (1959)

Gênero *Meloidogyne* Goeldi (1892)

Meloidogyne incognita Kofoid e White (1919) e Chitwood (1949)

Os nematoides pertencentes ao gênero *Meloidogyne* são parasitos obrigatórios distribuídos em todo o mundo e parasitam quase todas as espécies de plantas superiores. Se reproduzem e se alimentam de células vegetais vivas modificadas nas raízes das plantas, onde induzem galhas pequenas a grandes. Os sintomas são diversos, e incluem deficiências nutricionais, atrofia, falta de vigor, necrose radicular, galhas radiculares com tamanho e formato variados, amarelecimento, ramificação anormal das raízes, murcha e clorose, além de afetar a captação de água e nutrientes e a translocação ascendente pelo sistema radicular, afetando não apenas a produção, mas também a qualidade do produto (MARINO *et al.*, 2012; MOENS *et al.*, 2009).

No ciclo de vida de *Meloidogyne* as fêmeas depositam os ovos em massas gelatinosas compostas por uma matriz de glicoproteínas com propriedades antimicrobianas, produzida pelas glândulas retais da fêmea, mantendo os ovos protegidos contra extremos ambientais e predação (ORION; KRITZMAN, 1991; SHARON; SPIEGEL, 1993). O ciclo de vida é composto por quatro fases, ovo, J1, J2, J3 e J4 (JONES; NORTHCOTE, 1972). Os estádios J3 e J4 não possuem um estilete funcional e por tanto não se alimentam. Os machos, quando presentes, são vermiformes e não há evidências de que se alimentem. As células gigantes são células de transferência funcionais, baseadas na morfologia. Os fotossintatos passam pelas células gigantes antes de serem ingeridos pelos nematóides. Cada célula gigante formada por *Meloidogyne* se desenvolve a partir de uma única célula inicial e não pela coalescência de várias

células adjacentes. Elas são multinucleadas, contendo até 80 núcleos cada, onde os núcleos individuais dentro de cada célula gigante são poliploides, alguns com aumento de oito vezes no número de cromossomos, fazendo com que cada célula gigante tenha até 600 vezes no número de cópias de cada gene da planta (BIRD; LOVEYS, 1975; HUANG; MAGGENTI, 1969; JONES; NORTHCOTE, 1972).

Dentre a espécies mais importantes de fitonematoides do gênero *Meloidogyne* se destacam *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* Neal (1889) e Chitwood (1949), *M. hapla* Chitwood (1949) *M. enterolobii* Yang e Eisenback (1983), *M. chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo e Finley (1980), *M. fallax* Karssen (1996), *M. minor* Karssen, Bolk, Van Aelst, Van den Beld, Kox, Korthals, Molendijk, Zijlstra, Van Hoof e Cook (2004), *M. paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes, Santos e Almeida (1996) (MOENS *et al.*, 2009) e *M. incognita* Kofoid e White (1919) e Chitwood (1949) que é considerada uma das espécies mais importantes devido à ampla distribuição geográfica e importância econômica (MONTEIRO, 2016). A espécie é comumente encontrada em regiões quentes e um pouco restrita em regiões de clima temperado, e seu ciclo biológico dura em média quatro semanas, variando de acordo com a temperatura, umidade e planta hospedeira (KARSSSEN; MOENS, 2006).

Assim como as outras espécies do gênero *Meloidogyne*, *M. incognita* é uma espécie polífaga que ataca plantas de grande importância econômica como as culturas da soja, algodoeiro, milho, cana-de-açúcar e inúmeras outras culturas anuais e perenes, além de plantas daninhas também (GALBIERI *et al.*, 2012; TAYLOR; SASSER, 1978). Para a cultura do milho, *M. incognita* é a principal espécie dos nematoide das galhas, sendo maioria dos híbridos de milhos disponíveis suscetíveis ao seu parasitismo (LEVY *et al.*, 2009).

1. 6 Manejo de *Pratylenchus* e *Meloidogyne*

Atualmente, no Brasil, o manejo de nematoide em culturas de grande extensão, como a cana-de-açúcar e o milho, é feito basicamente da utilização de nematicidas, via tratamento de sementes ou via aplicação no sulco de plantio ou soqueira, integrada a outra técnica, como a utilização de cultivares resistentes ou rotação de culturas.

A rotação de culturas é uma técnica que deveria ser priorizada pelos produtores, uma vez que é sustentável e eficiente, principalmente para o controle do nematoide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe, 1952) e do nematoide reniforme (*Rotylenchulus reniformis* Linford e Oliveira, 1940). Porém, seu uso em áreas infestadas pelo nematoide das lesões (*Pratylenchus brachyurus*) e das galhas radiculares (*Meloidogyne incognita* e *M. javanica*) é mais limitado, porque quase todas as plantas cultivadas são suscetíveis a eles

(MACHADO et al., 2016). Para *P. zaeae*, a respeito de espécies de plantas para serem utilizadas em rotação de culturas em áreas infestadas, tem destaque para as espécies de crotalária, notadamente *C. mucronata* Desv. (1814), *C. paulina* Schrank, *C. striata* DC. (1825), *C. lanceolata* E. Mey. Meyer (1836), *C. virgulata grantiana* Harv e Sond (1862), *C. juncea* L. e *C. retusa* L., enquanto *C. spectabilis* (Roth) Windler e McLaughlin (1980) e *C. breviflora* DC., parecem aumentar sua população (ENDO, 1959; SILVA et al., 1989). Em um estudo de efeitos de culturas consorciadas de *Canavalia ensiformis* L. e sobre os danos de *P. zaeae* e a produtividade do milho na agricultura de subsistência, foi observado que *C. ensiformis* se mostrou eficaz na redução dos danos de *P. zaeae* no milho (ARIM et al., 2006). Em uma pesquisa mais recente, as crotalárias *C. juncea* e *C. spectabilis* e também mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum* L.) são indicadas como opções de plantas antagonistas para sistemas de rotação para o controle de *P. zaeae* (SANTANA-GOMES et al., 2019).

Além da rotação de culturas, outra ferramenta importante é o uso de cultivares resistentes, que poderia ser considerado um método ideal de manejo, uma vez que é eficiente na redução populacional de nematoides e não acarreta incrementos no custo de produção, já que a própria semente ou muda é a ferramenta de manejo e não há a necessidade de adaptação de maquinário agrícola dentro da lavoura. Entretanto, poucas opções estão disponíveis para os produtores com níveis elevados de resistência a *P. zaeae* e alta produtividade, principalmente em relação à cultura da cana-de-açúcar (OLIVEIRA; KUBO, 2007); para a cultura do milho, não estão disponíveis híbridos ou cultivares com resistência a *P. zaeae*. Além disso, a necessidade da correta identificação da espécie de nematoide presente na área é imprescindível para o sucesso desta prática.

Em relação ao uso de nematicidas químicos e biológicos no Brasil, as principais formas de utilização são via tratamento de sementes e aplicação no sulco de plantio ou soqueira (MACHADO et al., 2016). O tratamento de sementes assegura a proteção inicial das raízes contra a penetração de nematoides presentes no solo, garantindo melhor desenvolvimento inicial da cultura. Essa proteção ao desenvolvimento de raízes nos primeiros dias ou semanas após a germinação constitui ponto crítico ao estabelecimento de um potencial produtivo ótimo (STARR et al., 2007). A aplicação de nematicidas em sulco de plantio ou soqueira pode ser uma alternativa, uma vez que permite melhor distribuição do produto no solo, não apenas nas proximidades das sementes, sendo a única opção disponível para a cultura da cana-de-açúcar (OLIVEIRA; KUBO, 2007).

Entretanto, a eficiência de nematicidas químicos é variável, provavelmente em função dos diferentes tipos de solo, bem como diferentes regimes de chuva e clima, densidades

populacionais iniciais variáveis de acordo com a espécie estudada e pela própria espécie de nematoide (MACHADO *et al.*, 2016). Além disso, em função da proteção do sistema radicular pelo produto químico contra o ataque de nematoides, o que permite maior volume radicular e, conseqüentemente, maior reprodução do nematoide no final da estação de crescimento, lavouras tratadas com nematicidas podem até ter um número maior de nematoides no final da estação de crescimento, em comparação com as áreas não tratadas (NOE; BERNARD, 2016).

Em contrapartida, vários estudos têm demonstrado o potencial do controle biológico de nematoides em diversas culturas agrícolas. Entende-se por controle biológico de fitopatógenos a total ou parcial redução de sua população por outros organismos (AGRIOS, 2005). O controle biológico de nematoides apresenta vantagens em relação ao controle químico, entre elas não ser prejudicial ao meio ambiente, não deixar resíduos nos produtos colhidos, não favorecer a seleção de populações resistentes dos nematoides, não causar desequilíbrio na biota do solo, apresentar menor custo e ser de fácil aplicação (SOARES, 2006).

O primeiro fungo nematófago isolado e descrito foi *Arthrobotrys oligospora* Fresen 1852, (GRAY, 1988). No Brasil, Alcântara e Azevedo (1981) foram os primeiros a registrar informações acerca do controle biológico de nematoides. Atualmente, dentre os fungos nematófagos, os ovidas ou oportunistas estão entre os mais promissores, tanto pela capacidade saprofítica, quanto pelo fácil crescimento *in vitro*, o que facilita seu cultivo em grandes quantidades para a formulação de produtos comerciais à base de estruturas fúngicas (MACHADO *et al.*, 2016). Apesar do grande número de fungos parasitas de ovos conhecidos, apenas *Pochonia chlamydosporia* Gams (1971, 1988) e *Purpureocillium lilacinum* Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones e Samson, 2011 (= *Paecilomyces lilacinus*) têm sido melhor estudados, devido aos resultados promissores apresentados (ATKINS *et al.*, 2003; JATALA *et al.*, 1980), com disponibilidade de nematicidas microbiológicos no mercado à base dessas espécies.

Em relação às bactérias, os gêneros *Pasteuria* Metchnikoff 1888, *Pseudomonas* (Migula 1894) Yang *et al.*, 2013 e *Bacillus* Cohn 1872, têm mostrado grande potencial para o biocontrole de nematoides, possuindo diversos modos de ação, como parasitismo direto, produção de toxinas, antibióticos ou enzimas, interferência no reconhecimento do hospedeiro pelo nematoide, competição por nutrientes, indução de resistência sistêmica na planta e promoção da sanidade da planta (MACHADO *et al.*, 2016). O Brasil é até o presente momento, o quarto país com melhor performance na produção de produtos biológicos, em que o setor é liderado por Estados Unidos, Espanha e Itália. A produção de produtos biológicos no Brasil cresceu mais de 70%, superando o crescimento do mercado global, que foi 17% (MAPA, 2020).

Mais de 200 diferentes organismos são considerados inimigos naturais dos nematoides. Entre esses, os fungos estão como agentes potenciais para controle biológico (DIJKSTERHUIS *et al.*, 1994), seguidos das bactérias. Normalmente tais organismos parasitam ovos, predam juvenis, adultos ou cistos, ou ainda produzem substâncias tóxicas aos nematoides (JATALA, 1986; STIRLING, 1991). No total, 80% dos produtos registrados para fitonematoídeos são à base de bactérias, e o restante são fungos existindo até o momento dois produtos registrados à base de *P. chlamydosporia* e dois à base de *P. lilacinum* (CARNEIRO *et al.*, 2020).

Como alguns exemplos de produtos comerciais registrados no Brasil para o controle de espécies de importância econômica de nematoides dos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus* para todas as culturas conforme dados da Agrofit podemos citar: o Andril Prime® *Bacillus firmus* Bredemann e Werner (1933) registrado para *M. javanica* e *P. Brachyurus*; o Votivo Prime® *B. firmus* Bredemann e Werner (1933) para *M. javanica* e *P. brachyurus*; Quartzo *B. subtilis* Cohn (1872) + *B. licheniformis* Chester (1901) para *P. zaeae* e *M. incognita*; Presence® *B. subtilis* Cohn (1872) + *B. licheniformis* Chester (1901) para *P. brachyurus* e *M. incognita*; No-Nema® *B. amylolichefaciens* Fukumoto (1943) para *M. incognita*; Biobaci® *B. subtilis* Cohn (1872) para *M. incognita*; o Nemat® *Purpureocillium Lilacinum* Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones e Samson (2011) para *M. incognita*, *M. javanica* e *P. brachyurus*; Unique® *P. lilacinum* Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones e Samson (2011) para o fitonematoídeo *M. incognita*; Trichodermil SC 1306® *Trichoderma harzianum* Rifai (1969) para *P. zaeae*; e Rizotec® *Pochonia chlamydosporia* Sung, Sung, Hywel-Jones e Spatafora (2007) para *M. javanica* (MAPA, 2020).

Diversas pesquisas têm demonstrado a eficiência de produtos biológicos no controle de fitonematoídeos, como por exemplo, o potencial de diferentes espécies dos fungos *Beauveria bassiana* Vuill (1912), *Trichoderma harzianum* Rifai (1969), *Metarhizium anisopliae* Sorokin (1883) e *Paecilomyces lilacinus* Thom e Samson (1974), foram avaliados com quatro formas de aplicação, na semente, no sulco, semente + sulco e cobertura, e duas testemunhas adicionais, água e nematicida, no manejo de *P. brachyurus* na soja, e todos se comportaram de maneira protetora inviabilizando ou retardando o parasitismo dos nematoides sobre as raízes das plantas (SANTOS *et al.*, 2019).

A eficiência do controle de *P. brachyurus* na cultura de milho doce em casa de vegetação, com 7 agentes de controle biológico (*Bacillus methilotrophicus* Madhaiyan *et al.*, (2010); *B. subtilis* Cohn (1872); *B. firmus* Bredemann e Werner (1933); *Bacillus* spp. Cohn (1872); *B. amyloliquefaciens* Fukumoto (1943) e *Trichoderma koningiopsis* Samuels, Suarez e Evans (2006), foi avaliada e como resultado, os agentes biológicos proporcionaram maior

desenvolvimento vegetativo da planta, além de reduzir a reprodução do nematoide. Foi observado ainda, que o isolado GF 314 de *Bacillus* spp. Cohn (1872), utilizado em seu estudo, reduziu o número de juvenis e adultos de *P. brachyurus* (CARVALHO, 2018). A eficácia de *Pasteuria thornei* como agente de controle biológico de *Pratylenchus brachyurus* na cultura da soja e *Pratylenchus zaeae* na cultura do milho, foi testada e observou-se potencial de controle de *P. thornei* sobre os patógenos (CONFORT, 2017).

Em um estudo utilizando estratégias de manejo de *M. incognita* raça 1 em cafeeiro conilon, utilizando os fungos *P. chlamydosporia* Sung, Sung, Hywel-Jones e Spatafora (2007) e *T. harzianum* Rifai (1969), aplicados isolados e em associação, comparando-os a um nematicida químico, foi observado que *P. chlamydosporia* Sung, Sung, Hywel-Jones e Spatafora (2007) e *T. harzianum* Rifai (1969) apresentou-se como o produto biológico mais eficaz no manejo de *M. incognita* na cultura, reduzindo a população do patógeno nas raízes e no solo, e consequente aumento da produtividade de café (ZINGER, 2015). Em uma pesquisa em que foi testado a ação individual dos produtos biológicos Rizotec® (*P. chlamydosporia*), Onix® (*B. methylotrophicus*), Quality® (*Trichoderma asperellum*) e indutor de resistência Bion® (Acibenzolar-S-metil) no controle biológico e alternativo de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* na cultura do tomateiro, foi observado que o tratamento com maior redução populacional de nematoide foi o tratamento que envolveu o Rizotec® (CARVALHO, 2017).

Entretanto, apesar dos resultados de pesquisa promissores, nenhum nematicida químico ou biológico, utilizado de maneira isolada ou sem o devido planejamento, atingirá elevados níveis de eficiência no controle de nematoides. Somente com a adoção de técnicas como a rotação de culturas com não hospedeiros dos nematoides, ou mesmo a utilização de plantas de cobertura vegetal, além da escolha de cultivares com maiores níveis de resistência, o sucesso no manejo será maior.

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi identificar e caracterizar populações de *P. zaeae* coletadas em áreas cultivadas com cana-de-açúcar na região Nordeste do Brasil, através de estudos morfológicos, morfométricos e moleculares, além de avaliar a eficiência de nematicidas biológicos aplicados via tratamento de sementes de milho no controle de *P. zaeae* e *M. incognita*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, N. G. **Plant Pathology**. 5th ed. Elsevier Academic Press, Burlington - MA, 2005. 948 p.
- AL-BANNA, L.; PLOEG, A. T. V.; WILLIAMSON, M.; KALOSHIAN, I. Discrimination of Six *Pratylenchus* Species Using PCR and Species-Specific Primers. **Journal of Nematology**, College Park, v. 36, p. 142–146, 2004.

ALCÂNTARA, V. S. B.; AZEVEDO, J. L. Isolamento e seleção de fungos predadores de nematoide. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 56, p. 132-146, 1981.

ALMEIDA, N. O. **Ocorrência de nematoides na cultura da banana no estado de Goiás e sua correlação com o mal do panamá e com fatores edáficos**. 2016. 57 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia (EA), Goiânia, 2016.

ARAYA, T. Z.; PADILLA, W. P.; YUSTE, A. A.; NAVARRETE, C. C.; LIÉBANAS, G.; RIUS, J. E. P.; CASTILLO, P. Root-lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae) from Costa Rica with molecular identification of *P. gutierrezii* and *P. panamaensis* topotypes. **European Journal Plant Pathology**, London, v. 145, p. 973-998, 2016.

ARIM, O. J.; WACEKE, J. W.; WAUDO, S. W.; KIMENJU, J. W. Effects of *Canavalia ensiformis* and *Mucuna pruriens* intercrops on *Pratylenchus zeae* damage and yield of maize in subsistence agriculture. **Plant Soil**, Austrália, v. 284, pg. 243-251, 2006.

ARRIGONI, E. D. B. **Integração da pesquisa pública com a cana-de-açúcar no Brasil: A Fitossanidade e novos desafios**. São Paulo, 2018. p. 1-13. (Documentos Embrapa).

ASKARY, T. H.; MARTINELLI, P. R. P. **Biocontrol Agents of Phytonematodes**. (ed). London: CAB International, 2015. 469 p.

ATKINS, S.D.; HIDALGO-DIAZ, L.; KALISZ, H.; MAUCLINE, T. H.; HIRSCH, P. R.; KERRY, B. R. Development of a new management strategy for the control of root-knot 50 nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. **Pest Management Science**, Brighton, v. 59, p. 183-189, 2003.

AUDE, M. I. S. Estádios de desenvolvimento da cana-de-açúcar e suas relações com a produtividade. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 23, pg. 241-248, 1993.

BIRD, A. F.; LOVEYS, B. R. The incorporation of photosynthates by *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 7, pg. 111-113, 1975.

BONFIM JUNIOR, M. F.; CONSOLI, E. A.; INOMOTO, M. M.; DE OLIVEIRA, C. M. G. First report of *Pratylenchus crenatus* in Brazil. **New Disease Reports**, London, v. 34, p. 7, 2016. <http://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2016.034.007>.

BURIN, P.C. Manejo de *Pratylenchus* sp. em áreas de integração lavoura-pecuária- Management *Pratylenchus* sp. in farming integration areas livestock. **Revista eletrônica de Veterinária**, Garça, v. 17, p. 1-18, 2016.

CARNEIRO, R. M. D. G.; MONTEIRO, T. S. A.; ECKSTEIN, B.; FREITAS, L. G. **Controle de nematoides fitoparasitas**. In: Fontes, E. M. G.; Valadares, M. C. (Ed). Controle biológico de pragas da agricultura. Brasília, DF: Embrapa, 2020. pg. 371-413.

CARVALHO, S. L. **LEVANTAMENTO E CONTROLE BIOLÓGICO DE *Pratylenchus brachyurus* NA CULTURA DO MILHO DOCE**. 2018. 80 f. Dissertação de Mestrado - Pós-Graduação em Olericultura do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Morrinhos, Morrinhos - GO, 2018.

CARVALHO, P. H. **Controle biológico e alternativo de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em tomateiro**. 2017. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2017.

CARES, J. E.; HUANG, S. P. **Soil nematodes**. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNALL, D. E. (Ed). A handbook of tropical soil biology: sampling and characterization of below-ground biodiversity. London: Earthscan, 2008. p. 97-106.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho**. Embrapa Milho e Sorgo Endereço. Sete Lagoas-MG, 2006, pg. 1-14 (Circular Técnica, 83).

CASTILLO, P.; VOVLAS, N. ***Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae): diagnosis, biology, pathogenicity and management**. In: HUNT, J. D.; PERRY, R. N. (Ed). Nematology monographs and perspectives. Leiden-Boston: Brill Academic Publishers, v. 6, 2007, 529 p.

CONAB- **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Segundo levantamento-Safra 2020/2021. Brasília-DF, v. 7, p. 1-64, 2020.

CONAB- **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Quarto levantamento-Safra 2019/20. Brasília-DF, v. 7, p. 1-104, 2020.

CONFORT, P. M. S. ***Pasteuria thornei*, a novel biological seed treatment for root lesion nematode control in soybean and maize**. 2017. Dissertação de Mestrado - USP/Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba – SP, 2017.

COSTA, D. DA C.; LOBO, V. L. DA S.; MATTOS, V. DA S.; MALAQUIAS, J. V.; DE SOUSA, R. L.; DA COSTA, A. C.; BARBOSA, A. DA S.; DOS SANTOS, B. C. M.; MOREIRA, R. DE J. Levantamento de espécies de nematoides-das-lesões-radulares (*Pratylenchus* spp.) no Cerrado brasileiro e avaliação de danos à cultura do arroz. Brasília-DF: **Embrapa**, 2019. 40 p.

CHICONE, L. C. G. **Qualidade da matéria-prima de cana-de-açúcar (SP81-3250) submetida à aplicação de maturadores em dois ciclos sucessivos**. 2012. 70 f. (Tese de Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. UNESP. Jaboticabal - SP, 2012.

DECREAMER, W.; HUNT, D. J. **Structure and classification**. In: PERRY, R. N.; MOENS, M. (Ed). Plant Nematology. Wallingford, CABI, 2006, pg. 1-30.

DE LEY, P.; BLAXTER, M. L. **Systematic position and phylogeny**. In: LEE, D. L. (Ed). The Biology of nematodes. London, Taylor e Francis, 2002, pg. 1-30.

DE MAN, J. G. Die Einheimischen, frei in der reinen Erde unde im süßen wasser lebenden Nematoden. **Tijdschrift der Nederlandsche Dierkundige Vereeninging**, Leiden, v. 5, p. 1-104, 1880.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Nematoides e pragas de solo em cana-de-açúcar. Encarte. **Informações Agrônomicas**, Ribeirão Preto, SP. n. 110, 2005.

DINARDO-MIRANDA, L. L. **Manejo de nematóides em cana-de-açúcar**. Jornal Cana. Instituto Agrônomico de Campinas, 2005. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/5Ctecnologiaagricola_000fxg3tc4b02wyiv80soht9h8ex6by1.pdf>. Acesso em 31/08/2020. Acesso em: 31 ago. 2020.

DINARDO-MIRANDA, L. L., DINARDO MIRANDA, I. 2018. **Nematoides. Milho**. 40 pg. [Online]. Disponível em: <<http://www.nematoides.com.br/Content/Fotos/3JUL-CartilhaNemat%C3%B3ides-atualizada.compressed.pdf>>. Acesso em 31 ago. 2020.

DIOLA, V.; SANTOS, F. **Fisiologia**. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. (Ed). Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool: tecnologias e perspectivas. Viçosa-MG. ed. 2. p. 25-49, 2012.

DIJKSTERHUIS, J.; VEENHUIS, M.; HARDER, W.; NORDBRING-HERTZ, B. Nematophagous fungi: physiological aspects and structure-function relationships. **Advances in Microbial Physiology**, San Diego, v. 36, p. 111-143, 1994.

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.

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

FERRAZ, L. C. C. B. **Nematoides**. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed). Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. 5. ed. Ouro Fino-MG: Agrônômica Ceres, 2018. v. 1, cap. 13, pg. 195-211.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D.J. F. **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. Manaus: Norma Editora, 2016. 251p.

- GABIA, A. A. **Nematoides na cultura da cana-de-açúcar**. 2019. Disponível em: <<https://promip.agr.br/nematoides-na-cultura-da-cana-de-acucar/>>. Acesso em: 11 fev. 2020.
- GALBIERI, R.; INOMOTO, M. M.; SILVA, R. A.; ASMUS, G. L. **Os nematoides na cultura do algodoeiro em Mato Grosso**. In: BELOT, J. L. (Ed). Manual de boas práticas de manejo do algodoeiro em Mato Grosso. Cuiabá: IMAmt: AMPA, 2012. p. 150-161.
- GASSEN, M. H. **Produção e eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) sorok, no controle da cigarrinha-das-raízes da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae)**. 2010. 78 f. (Tese de Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrônomicas. UNESP. Botucatu-SP, 2010.
- GILLESPIE, J.; CANNONE, J.; GUTELL, R.; COGNATO, A. A secondary structural model of the 28S rRNA expansion segments D2 and D3 from rootworms and related leaf beetles (*Coleoptera*: Chrysomelidae; Galerucinae). **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 13, p. 495–518, 2004.
- GODFREY, G.H. A destructive root disease of pineapple and other plants due to *Tylenchus brachyurus*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 19, p. 611-629, 1929.
- GONZAGA, V. **Caracterização morfológica, morfométrica e multiplicação in vitro das seis espécies mais comuns de *Pratylenchus* Filipjev, 1936 que ocorrem no Brasil**. 2006. 94 f. (Tese de doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2006.
- GOULART, A. M. C. Aspectos gerais sobre nematoides-das-lesões-radiculares (gênero *Pratylenchus*). **Embrapa Cerrados**. Planaltina, DF, p. 1-30, 2008.
- GOULART, A. M. C. Análise nematológica: importância e princípios gerais. **Embrapa Cerrados**. Planaltina, DF, 45 p, 2010.
- GRAY, N. F. **Fungi attacking vermiform nematodes**. In: POINAIR J.; G. O.; JASON, H. B. (eds.). Diseases of nematodes, v. 2, Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 3-38.
- HUANG, D.; YAN, G. Specific Detection of the Root-Lesion Nematode *Pratylenchus scribneri* Using Conventional and Real-Time PCR. **Plant Disease**, St. Paul, v. 101, p. 359-365, 2017.
- HUANG, C. S.; MAGGENTI, A. R. Mitotic aberration and nuclear changes of developing giant cells in *Vicia faba* caused by *Meloidogyne javanica*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, pg. 447–455, 1969.
- HUSSEY, R. S. Disease-inducing secretions of plant parasitic nematodes. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 27, p. 123-141, 1989.
- HUSSEY, R. S.; MIMS C. W. Ultrastructure of esophageal glands and their secretory granules in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Protoplasma**, New York, v. 156, p. 9–18, 1990.
- INOMOTO, M. **Perdas acarretadas por nematoides podem, com precaução, ser evitadas**. Proteção de Plantas. Visão Agrícola, n. 13, pg. 116-119, 2015. Disponível em: <https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/VA_13_Protecao_plantas-artigo5.pdf>. Acesso em 31 ago. 2020.
- INSERRA, R. N.; DUNCAN, L. W.; TROCCOLI, A.; DUNN, D.; SANTOS, J. M. dos; VOVLAS, N. *Pratylenchus jaehni* sp. n. from citrus in Brazil and its relationship with *P. coffeae* and *P. loosi* (Nematoda: Pratylenchidae). **Nematology**, Leiden, v. 3, p. 653-665, 2001.
- JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 453-489, 1986.
- JATALA, P.; KAELTENBACH, M.; BOCANGEL, D. A. J. Field application of *Paecilomyces lilacinus* for controlling *Meloidogyne incognita* on potatoes. **Journal of Nematology**, College Park, v. 12, p. 226-227, 1980.
- JONES, M. G. K.; NORTHCOTE, D. H. Multinucleate transfer cells induced in *Coleus* roots by the root knot nematode *Meloidogyne arenaria*. **Protoplasma**, New York, v.75, pg. 381–395, 1972.

- KARSEN, G.; MOENS, M. **Root-knot Nematodes**. In: PERRY, R. N.; MOENS, M. (Ed) Plant Nematology, Cambridge, USA, CABI North American, p.60-88, 2006.
- KOENNING, S. R.; OVERSTREET, C.; NOLING, J. W.; DONALD, P. A, BECKER, J. O.; FORTNUM, B. A. Survey of crop losses in response to phytoparasitic nematodes in the United States for 1994. **Journal of Nematology**, College Park, v. 31, pg. 587–618, 1999.
- KUMARI, S. Characterization of *Pratylenchus crenatus* and *P. neglectus* (Nematoda: Pratylenchidae) associated with wheat crop. **Helminthologia**, Slovakia, v. 52, pg. 280-286, 2015.
- LEVY, R.M.; HOMECHIN, M.; SANTIAGO, D.C.; CADIOLI, M.C.; BAIDA, F.C. Reação de genótipos de milho ao parasitismo de *Meloidogyne incognita* raça 1 e a *M. paranaensis*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, p.575-578, 2009.
- LIMA, Y.; M.; O. **Atividade de inseticidas em tratamento de sementes sobre o manejo da cigarrinha *Dalbulus maidis* (Delong e Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) e do pulgão *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) (Hemiptera: Aphididae) em milho**. 2018. 29 f. (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.
- LIRA, V. L.; ROSA, J. M. O.; OLIVEIRA, S. A.; OLIVEIRA, C. M. G.; MOURA, R. M. Análises morfológica e molecular de isolados de *Pratylenchus coffeae* ocorrentes no estado de Pernambuco, Brasil, em inhame. **Nematropica**, Bradenton, v. 44, p. 152-165, 2014.
- LOOF, P. A. A. **The family Pratylenchidae Thorne, 1949**. In: NICKLE, W.R. (Ed.). Manual of agricultural nematology. New York, NY, USA: Marcel Dekker, 1991, p. 363-421.
- LUCA, F. D.; TROCCOLI, A.; DUNCAN, L. W.; SUBBOTIN, S. A.; WAEYENBERGE, L.; COYNE, D. L.; BRENTU, F. C.; INSERRA, R. N. *Pratylenchus speijeri* n. sp. (Nematoda: Pratylenchidae), a new root-lesion nematode pest of plantain in West Africa. **Nematology**, Leiden, v. 14, p. 987-1004, 2012.
- MACHADO, A. C. Z.; SILVA, S. A. **Amostragem**. In: MACHADO, A. C. Z.; SILVA, S. A.; FERAZ, L. C. C. B. (Ed). Métodos em Nematologia Agrícola. ed. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Nematologia, 2019. cap. 1, p. 1-8.
- MACHADO, A. C. Z.; SIQUEIRA, K. M. S.; FERAZ, L. C. C. B.; INOMOTO, M. M.; BESSI, R.; HARAKAVA, R.; OLIVEIRA, C. M. G. Characterization of Brazilian populations of *Pratylenchus brachyurus* using morphological and molecular analyses. **Tropical Plant Pathology**, Lavras- MG, v. 40, p. 102–110, 2015.
- MACHADO, A.C.Z.; KANEKO, L.; PINTO, S.V. **Controle Biológico**. In: Instituto Mato-grossense do Algodão – IMAm. Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle. Cuiabá, p. 287-312, 2016.
- MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Fisiologia da Produção de Milho**: Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG, 2006. pg. 1-10 (Circular técnica, 76).
- MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. **Fisiologia do Milho**: Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG, 2002. pg. 1-23 (Circular técnica, 22).
- MAI, W. F.; MULLIN, P. G. **Plant parasitic nematodes: a pictorial key to genera**. Ithaca: Cornell University Press, 1996, p. 277.
- MAINARDI, J. T.; ASMUS, G.L. Danos e potencial reprodutivo de *Pratylenchus brachyurus* em cinco espécies vegetais. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia, v. 2, p. 38-47, 2015.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: **Agrofit**. 2020. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 31/08/2020.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Mercado de biodefensivos cresce mais de 70% no Brasil em um ano. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil>. Acesso em 31/08/2020.

MARINO, R. H.; GOMES, L. A. A.; OLIVEIRA CRUZ, E. M.; SILVA, A. D. C.; BIANCHINI, F. G.; MENESES, T. N.; BLANK, A. F. Controle de *Meloidogyne incognita* raça 1 com óleo essencial de *Lippia alba*. **Scientia Plena**, Sergipe, v. 8, p.1-8, 2012.

MATSUOKA, S.; MACCHERONI, W. **Manejo de doenças**. In: SANTOS, F.; BOREM, A.; CALDAS, C. (Ed). Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool: tecnologias e perspectivas. Viçosa-MG. ed. 2. p. 161-180, 2012.

MATTOS, V. S. **Caracterização e identificação de populações de *Meloidogyne* spp. do arroz, estabelecimento de marcadores SCAR e seleção de novas fontes de resistência em *Oryza* spp. a *M. graminicola***. 2017. 84 f. (Tese de Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2017.

MOENS, M.; PERRY, R. N.; STARR, J. L. 2009. ***Meloidogyne* species** - a diverse group of novel and important plant parasites. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (eds.). Root-Knot Nematodes. CAB International, Wallingford, Oxford shire. p.1-17.

MONTEIRO, J. M. S. **Caracterização morfológica, enzimática e molecular de populações brasileiras de *Meloidogyne* spp.: identificação e sinonimização de espécies**. 2016. 167 f. (Tese de Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2016.

MOURA, R. M. O GÊNERO *MELOIDOGYNE* E A MELOIDOGINOSE – PARTE III Resenha Histórica (séculos: XIX e XX). In: CONGRESSO BARSILEIRO DE NEMATOLOGIA, 34., 2018, Bento Gonçalves. **Anais** [...]. Bento Gonçalves: CBN, 2018. Disponível em: < <http://www.infobibos.com/anais/cbn/35/Palestras/Extra.pdf>>. Acesso em 06 set. 2020.

NICOL, J. M.; TURNER, S. J.; COYNE, D. L.; NIJS, L. D.; HOCKLAND, S.; TAHNA MAAFI, Z. **Current nematode threats to world agriculture**. In: JONES, J.; CHEYSEN, G, FENOLL, C. (eds), Genomics and molecular genetics of Plant-Nematode Interactions. Berlin: Springer, 2011. p. 21-43.

NOE, J. P.; BERNARD, E. C. **Plant- Parasitic Nematodes**. In: OWNLEY, B. H.; TRIGIANO, R. N. (Ed). Plant pathology concepts and laboratory exercises. 3 ed. Boca Raton, 2016. pg. 103-118.

NORONHA, M. A.; MUNIZ, M. F. S.; CRUZ, M. M.; ASSUNÇÃO, M. C.; CASTRO, J. M. C.; OLIVEIRA, E. R. L.; MIRANDA, C. G. S.; MACHADO, A. C. Z. *Meloidogyne* and *Pratylenchus* species in sugarcane fields in the state of Alagoas, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, pg. 1-3, 2017

OLIVEIRA, C. M. G.; KUBO, R. K. **Reconhecimento, danos e controle dos nematóides parasitos da cana-de-açúcar**: nematóides parasitos da cana-de-açúcar. Instituto Biológico, Curso a distância, 24-30 de setembro. p. 1-19, 2007.

OLIVEIRA, C. M. G.; MACHADO, A. C. Z.; KUBO, R. K.; HARAKAVA, R. Diagnose de *Aphelenchoides fragariae* e *Pratylenchus* spp. pela aplicação da tecnologia do código de barras do DNA. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 33, p. 218-225, 2009.

OLIVEIRA, K. C. L.; DE ARAÚJO, D. V.; DE MENESES, A. C.; TAVARES, R. L. C. Biological management of *Pratylenchus brachyurus* in soybean crops. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 32, p. 41-51, 2019.

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**, Lavras-MG, v. 36, p. 065-073, 2011.

ORION, D.; KRITZMAN, G. Antimicrobial activity of *Meloidogyne javanica* gelatinous matrix. **Nematologica**, Leiden, v. 14, pg. 481–483, 1991.

PAULA JÚNIOR, T. J.; MORANDI, M. A. B.; ZAMBOLIM, L.; SILVA, M. B. **Controle Alternativo de Doenças de Plantas - Histórico**. In: VENEZON, M; PAULA JÚNIOR, T. J. de; PALLINI, A. (Ed). Controle alternativo de pragas e doenças. Viçosa: EPAMIG/CTZM. p. 135-162, 2005.

PEREIRA, A. C.; TOSCANO, L. C.; ABREU, A. B.; VIEIRA, N. S.; DIAS, P. M. Ocorrência de nematóides fitoparasitos em solo cultivado com algodão e soja. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 2, p. 14–19, 2015.

PERRINE-WALKER, F.; STIRLING, G.; GUEST, D. *Pratylenchus zae* (Graham, 1951). Pathogen of the month – Jan 2019. Disponível em: <<https://www.appsnet.org/Publications/potm/pdf/Jan19.pdf>>. Acesso em 06 set. 2020.

PINHEIRO, J. B. Nematoides em Hortaliças. Nematóide-das-lesões-radulares-*Pratylenchus* spp. Brasília, DF: **Embrapa**, 2017. 194 p.

PINHEIRO, J. B.; DA SILVA, G. O.; PEREIRA, R. B. Nematoides na cultura da batata. Brasília, DF: **Embrapa**, 2015. 12 p.

PESSOA, M. M. **Levantamento populacional de fitonematóide na cultura da soja no município de Montividiu** – GO. 2019. Monografia 27 f. (Graduação em Agronomia) - Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2019.

POWERS, T. Nematode Molecular Diagnostics: From Bands to Barcodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 367–382, 2004.

RIBEIRO, L. M.; CAMPOS, H. D.; TESSMANN, D. J.; DIAS-ARIEIRA, C. R.; DAS NEVES, D. L.; DA SILVA, C. N. Identification of *Pratylenchus* spp. in soybean in Central region of Brazil using the ITS-5.8S rDNA region. **African Journal of Agricultural Research**, Academic Journals, Lagos, v. 8, p. 5699-5702, 2013.

SANTANA-GOMES, S. M.; DIAS-ARIEIRA, C. R.; FERREIRA, J. C. A.; SCHWENGBER, R. P.; BALDISERA, S. S. REPRODUCTION OF *Pratylenchus zae* AND *P. brachyurus* IN COVER CROPS. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 32, p. 295 – 301, 2019.

SANTOS, A. R. B.; ALMEIDA, F. A.; LEITE, M. L. T.; FONSECA, L. W.; NETO, F. A.; PEREIRA, F. F.; CARVALHO, R. M.; BARRETO, A. F.; SANTOS, T. S. Biocontrole no manejo de *Pratylenchus brachyurus* na soja Biocontrol in the management of *Pratylenchus brachyurus* in soybean. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa – Portugal, v. 42, pg. 776-785, 2019.

SANTOS, A. P. **Manejo de nematoides em milho tendo em vista a cultura subsequente**. Manejo, Mercado, Safrinha, Agronegócio. 2020. Disponível em: <<http://www.pioneersementes.com.br/blog/89/manejo-de-nematoides-em-milho-tendo-em-vista-a-cultura-subsequente>> Acesso em: 31 ago 2020.

SILVA, G. S.; FERRAZ, S.; SANTOS, J. M. Resistência de espécies de crotalárias a *Pratylenchus brachyurus* e *P. zae*. **Nematologia Brasileira**, v. 13, pg. 81-92, 1989.

SILVA, J. P. N.; SILVA, M. R. N. **Noções da cultura da cana-de-açúcar**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás e a Universidade Federal de Santa Maria, 2012. 105 p. (Caderno Didático).

SINGH, P. R.; NYIRAGATARE, A.; JANSSEN, T.; COUVREUR, M.; DECRAEMER, W.; WIM BERT. Morphological and molecular characterisation of *Pratylenchus rwandae* n. sp. (Tylenchida: Pratylenchidae) associated with *maize* in Rwanda, **Nematology**, Leiden, v. 20, p. 781-794, 2018.

SOARES, P. L. M. **Estudo do controle biológico de fitonematóides com fungos nematófagos**. 2006. 2017 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2006.

SOLOGUREN, L. **Importância: demanda mundial cresce e Brasil tem espaço para expandir produção**. In: CAIXETA FILHO, J. V.; NUSSIO, L. G. Visão agrícola Milho. USP-ESALQ. v. 13, ano. 9, 2015. Cap. 1, pg. 8.

SOUZA, R. A. **Quantificação de *Pratylenchus brachyurus* em genótipos de soja (*Glycine max* L.) Merrill, em Tupirama-TO**. 2009. 62 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Uberlândia. UFU. Uberlândia-MG, 2009.

SINGH, S. K.; HODDA, M.; ASH, G. J. Plant-parasitic nematodes of potencial phytosanitary importance, their main host and reported yield losses. **OEPP/EPPO Bulletin**, v. 43, pg. 334-374, 2013.

SUBBOTIN, S. A.; RAGSDALE, E. J.; MULLENS, T.; ROBERTS, P. A.; MUNDO-OCAMPO, M.; BALDWIN, J. G. 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**, Washington, v. 48, p. 491–505, 2008.

SHAH, M. M.; MAHAMOOD, M. **Introductory Chapter: Nematodes - A Lesser Known Group of Organisms**. In: SHAH, M. M.; MAHAMOOD, M. (Ed). *Nematology concepts, diagnosis and control*. ed. Croácia: Biblioteca Nacional e Universitária de Zagreb, 2017. cap. 1, pg. 3-18.

SHARON, E.; SPIEGEL, Y. Glycoprotein characterization of the gelatinous matrix in the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 25, pg. 585–589, 1993.

STARR, J. L.; KOENNING, S. R.; KIRKPATRICK, T. L.; ROBINSON, A. F.; ROBERTS, P. A.; NICHOLS, R. L. The future of nematode management in cotton. **Journal of Nematology**, College Park, v. 39, pg. 283-294, 2007.

STIRLING, G.R. **Biological control of plant parasitic nematodes: Progress, problems and prospects**. Wallingford: CAB International, 1991. 282p.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J.; JULIANETTI, A.; HULSHO, T.; ONO, E. O.; RODRIGUES, D. Aspectos da fisiologia de produção da cana-de-açúcar (*Saccharum Offcinarum* L.). **Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia**. Guarapuava, PR, v. 3, p. 215-221, 2010.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes**. Raleigh: North Carolina State University: USAID, 1978. 111 p.

USDA- **Departamento de Agricultura dos Estados Unidos**. 12º levantamento USDA da safra 2019/20 - abril/20. Informativo abril de 2020. FIESP, 2020. Disponível em: file-20200312195652-boletimsojamarco2020.pdf

VALICENTE, F. H. **Manejo Integrado de Pragas na Cultura do Milho**. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG, 2015. 13 p. (Circular Técnica 208).

WANG, H.; ZHUO, K.; YE, W.; LIÃO, J. Morphological and molecular characterization of *Pratylenchus parazeae* n. sp. (Nematoda: Pratylenchidae) parasitizing sugarcane in China. **European Journal Plant Pathology**, London, v. 143, p. 173–191, 2015.

WANG, H; ZHUO, K; LIAO, J. Morphological and Molecular Characterization of *Pratylenchus hippeastri*, A New Record of Root-Lesion Nematode Associated with Apple in China. **Pakistan Journal of Zoology**, Burnley, v. 48, p. 665-671, 2016.

ZENG, Y.; YE, W.; KERNS, J.; TREDWAY, L.; MARTIN, S.; MARTIN, M. Molecular characterization and phylogenetic relationships of plant-parasitic nematodes associated with turfgrasses in North Carolina and South Carolina, United States. **Plant Disease**, St. Paul, v. 99, p. 982-993, 2015.

ZINGER, F. D. **Estratégias de manejo de *Meloidogyne incognita* raça 1 em cafeeiro conilon**. 2015. 66 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, Espírito Santo, 2015.

CAPÍTULO 2

Caracterização morfométrica e molecular de populações de *Pratylenchus zae* em cana-de-açúcar na região Nordeste do Brasil

1 **Caracterização morfológica e molecular de populações de *Pratylenchus zae* em cana-**
2 **de-açúcar na região Nordeste do Brasil**

3

4 **Carmem Lúcia Pereira Abade**, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE,
5 Brazil, **Lilian Margarete Paes Guimarães**, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
6 Recife, PE, Brazil, **Andressa Cristina Zamboni Machado**, Instituto de Desenvolvimento
7 Rural do Paraná, IDR/IAPAR-EMATER, Londrina, PR, Brazil

8

9 Autor para correspondência: **Andressa C. Z. Machado**

10 E-mail: andressaczmachado@hotmail.com

11 **RESUMO**

12 Abade, C.L.P., Guimarães, L.M.P., Machado, A.C.Z. Caracterização morfológica e molecular
13 de populações de *Pratylenchus zae* em cana-de-açúcar na região Nordeste do Brasil. Plant Dis.

14 A cana-de-açúcar (*Sacharum* spp.) possui importância econômica para a região
15 Nordeste do Brasil, porém, é afetada por nematoides do gênero *Pratylenchus*. A taxonomia para
16 distinguir as espécies existentes desse gênero é muito difícil, devido ao número reduzido de
17 caracteres diagnósticos e da existência de variabilidade intraespecífica. O objetivo desse
18 trabalho foi determinar a identidade, características morfológicas, moleculares e filogenéticas
19 de populações de *Pratylenchus* em áreas agrícolas de cana-de-açúcar na região Nordeste, Brasil.
20 Foram realizadas caracterização morfológica e análises de PCR e filogenia, utilizando a região
21 D2/D3 do gene 28S rDNA para a identificação das espécies de 30 populações de *Pratylenchus*,
22 coletadas nas áreas de cana-de-açúcar das usinas Miriri e Japungu no estado da Paraíba, Olho
23 D'água e São José no estado de Pernambuco e Baía Formosa e usina Estivas no estado do Rio
24 Grande do Norte. As fêmeas apresentaram corpo esbelto, sobreposição ventral das glândulas
25 esofagianas, V% variando entre 63,59 a 77,80, região labial não separada do corpo, e cauda
26 com formato pontiagudo, arredado e subagudo. A comparação das sequências de nucleotídeos
27 das populações estudadas, com sequências do GenBank, revelou identidade de 90% para *P.*
28 *zae*. As análises de PCA e filogenéticas mostrou a formação de diferentes grupos das
29 populações de *Pratylenchus*. Concluímos que somente com a taxonomia integrativa foi possível
30 caracterizar as populações de *Pratylenchus* estudadas e afirmar a presença de *P. zae*. As
31 análises morfológicas aliadas a ferramentas biomoleculares foram úteis para o diagnóstico da
32 espécie e para identificar a variabilidade dentro e entre populações de *P. zae*.

33 **Palavras-chave:** Nematóide das lesões radiculares, Filogenia, PCR, variabilidade, *Saccharum*
34 spp.

35

36 **ABSTRACT**

37 Abade, C.L.P., Guimarães, L.M.P., Machado, A.C.Z. Morphometrical and molecular
38 characterization of *Pratylenchus zae* populations in sugarcane in the Brazilian Northeast
39 region. Plant Dis.

40 Sugarcane (*Sacharum* spp.) has economic importance for the Northeast region of Brazil,
41 however, it is affected by nematodes of the genus *Pratylenchus*. Taxonomy to distinguish
42 existing species of this genus is very difficult, due to the reduced number of diagnostic
43 characters and the existence of intraspecific variability. The objective of this work was to
44 determine the identity, morphometric, molecular and phylogenetic characteristics of
45 populations of *Pratylenchus* in agricultural areas of sugarcane in the Northeast region, Brazil.
46 Morphometric characterization and PCR and phylogeny analyzes were performed, using the
47 D2 / D3 region of the 28S rDNA gene to identify the species of 30 populations of *Pratylenchus*,
48 collected in the sugarcane areas of the Miriri and Japungu plants in the state of Paraíba , Olho
49 D'água and São José in the state of Pernambuco and Baía Formosa and Estivas plant in the state
50 of Rio Grande do Norte. The females presented a slender body, ventral overlap of the
51 esophageal glands, V% ranging from 63.59 to 77.80, labial region not separated from the body,
52 and tail with a pointed, leased and subacute shape. The comparison of the nucleotide sequences
53 of the populations studied, with GenBank sequences, revealed 90% identity for *P. zae*. PCA
54 and phylogenetic analyzes showed the formation of different groups of *Pratylenchus*
55 populations. We conclude that it was only with the integrative taxonomy that it was possible to
56 characterize the studied populations of *Pratylenchus* and affirm the presence of *P. zae*.
57 Morphometric analyzes combined with biomolecular tools were useful for the diagnosis of the
58 species and to identify the variability within and between populations of *P. zae*.

59 **Keywords:** Root lesion nematode, Phylogeny, PCR, variability, *Saccharum* spp.

60

61

62

63 O Brasil se destaca como maior produtor de cana-de-açúcar, seguido por China e Índia,
64 assim como também é o maior produtor de açúcar e etanol (Conab 2020). A cultura da cana-
65 de-açúcar é uma cultura com importância para a região Nordeste do Brasil, sendo considerada
66 uma importante fonte de renda e desenvolvimento. É uma cultura de importância econômica
67 afetada por alguns fatores, dentre os quais se destacam as doenças causadas pelos nematoides.
68 Das espécies de nematoides mais importantes em função das altas populações e consequentes
69 danos que causam para a cultura se destaca o nematoide das lesões radiculares, *Pratylenchus*
70 *zoeae* (Dinardo-Miranda 2005). Essa espécie causa perdas de 20 a 30% de produtividade na
71 cultura, podendo chegar até 50% (Gabia 2019; Dinardo-Miranda 2005). A identificação correta
72 das espécies de fitonematoides presentes nas áreas cultivadas é importante para a escolha de
73 métodos de manejo adequados contra esses patógenos. Assim, a caracterização morfológica e
74 morfométrica, aliada à identificação molecular, é muito importante para a correta identificação.

75 A identificação de nematoides é geralmente realizada utilizando os métodos tradicionais
76 baseada nos caracteres morfológicos das fêmeas, pois estas possuem mais caracteres
77 diagnósticos que os machos (Loof 1991). No entanto, o diagnóstico de espécies do gênero
78 *Pratylenchus* é difícil, por causa da semelhança morfológica entre as espécies, número reduzido
79 de caracteres diagnósticos e variabilidade intraespecífica de alguns desses caracteres (Araya et
80 al. 2016; Goulart 2008). Por isso, o uso taxonomia integrativa é importante (Oliveira et al.
81 2011). Os estudos de diversidade e filogenia são importantes no desenvolvimento dos chamados
82 códigos de barras, que são incorporados a uma estrutura filogenética com poder preditivo da
83 história evolutiva. Duas regiões gênicas têm sido caracterizadas entre os *taxa* de nematoides, a
84 matriz de DNA ribossômico (rDNA) e o genoma mitocondrial, por serem altamente
85 conservadas (Powers 2004).

86 Pesquisas têm sido realizadas utilizando-se a taxonomia integrativa, como por exemplo,
87 em estudos morfométricos e moleculares, foi reportado a presença de *P. crenatus* no Brasil
88 (Bonfim Junior et al. 2016). Espécies de *Pratylenchus* foram identificadas presentes pela

89 primeira vez na Costa Rica, por meio de métodos morfológicos e moleculares (Araya et al.
90 2016). Uma nova espécie de nematoide das lesões radiculares (*P. parazeae* n. sp.) em cana-de-
91 açúcar (*S. sinensis* Roxb) foi descrita na Região Autônoma de Guangxi Zhuang, na China, com
92 base na morfologia e nas análises moleculares da subunidade pequena de rRNA (SSU), nos
93 domínios de expansão D2/D3 da subunidade grande (LSU) e no espaçador transcrito interno
94 (ITS) (Wang et al. 2015). Os fitonematoides *P. crenatus* e *P. neglectus* associados à cultura de
95 trigo na República Checa, foram caracterizados com base em morfologia e morfometria e em
96 sequências da região D2/D3 e do gene 18S (Kumari 2015).

97 Estes estudos citados somente testifica que aliadas aos estudos morfológicos, as técnicas
98 moleculares envolvendo análises filogenéticas poderão fornecer novos conhecimentos sobre a
99 diversidade e a identificação de espécies do gênero *Pratylenchus*, pois muitas espécies ainda
100 não foram caracterizadas por taxonomia integrativa em diversos locais, como por exemplo no
101 Nordeste do Brasil. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi determinar a identidade,
102 características morfométricas, moleculares e filogenéticas de populações de *Pratylenchus* spp.
103 em áreas cultivadas com cana-de-açúcar na região Nordeste do Brasil.

104

105 **MATERIAIS E MÉTODOS**

106 **Local do estudo.** O estudo foi conduzido no laboratório de Fitonematologia do
107 Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco e no Instituto
108 Agrônômico do Paraná (IAPAR), onde foram realizadas as análises morfométricas e
109 moleculares.

110

111 **Obtenção dos espécimes dos nematoides.** Amostras de solo e raízes de cana-de-açúcar foram
112 coletadas em áreas com histórico da presença de *Pratylenchus* sp. nos estados de Pernambuco,
113 Paraíba e Rio Grande do Norte, conforme visualizado na Figura 1. As coletas foram realizadas
114 nas usinas Miriri (MR) e Japungu (JP) no estado da Paraíba, Olho d'água (OD) e São José (SJ)

115 no estado de Pernambuco, e Baía Formosa (BF) e Estivas (ES) no estado do Rio Grande do
116 Norte. Foram amostradas cinco áreas por usina, com seis amostras compostas de cada área,
117 sendo utilizada uma planta como referencial para anotação das coordenadas do local conforme
118 apresentado na Tabela 1. No laboratório de solos e tecido vegetal do IAPAR, foi realizada
119 também a análise química e física de solo das amostras coletadas nas trinta áreas referentes a
120 cada usina.

121

122 **Processamento das amostras.** Os nematoides foram extraídos de 50 cm³ de solo pelo método
123 do funil de Baermann otimizado, segundo descrito em Machado e Silva (2019b). As amostras
124 de solo foram distribuídas nos funis e, após 48 horas, a suspensão de cada amostra retida nos
125 tubos de ensaio acoplado aos funis foi coletada. Exemplares de *Pratylenchus* foram mortos em
126 banho-maria a 60 °C por cinco minutos e fixados em solução de TAF (Courtney et al. 1955)
127 diluída a 1% (7 partes de formalina a 40%, 2 partes de trietanolamina, 91 partes de água
128 destilada), utilizando-se 1 ml da solução 2X em cada amostra. Para montagem das lâminas,
129 fêmeas foram transferidas, individualmente, das suspensões previamente obtidas, para lâmina
130 de vidro contendo uma gota de TAF. Foram examinadas as características morfológicas e
131 morfométricas de 10 fêmeas por área de cada usina, de acordo com o descrito por Castillo e
132 Vovlas (2007). As mensurações foram realizadas nos aumentos de 20, 40 e 100x (ocular
133 micrométrica), sendo todas as medidas expressas em micrômetros.

134 As variáveis morfométricas mensuradas foram: comprimento do estilete (St); diâmetro dos
135 bulbos do estilete (\emptyset BSt); altura dos bulbos do estilete (ABSt); comprimento do corpo (L);
136 maior diâmetro do corpo (\emptyset C); diâmetro do corpo na altura da vulva (\emptyset V); distância entre a
137 vulva e a cauda (v-a); comprimento da cauda (T); diâmetro do corpo na altura do ânus (\emptyset A);
138 distância da extremidade anterior do corpo à junção esôfago-intestino (Po); comprimento do
139 esôfago (F); comprimento do saco pós-uterino (PUB) e distância entre a abertura da glândula
140 esofagiana dorsal e a base do estilete (DGO). Com base nas mensurações, calcularam-se os

141 índices de De Man: V% (relação percentual entre a distância da extremidade anterior até a vulva
142 em relação ao comprimento do corpo da fêmea); a (relação entre comprimento do corpo e maior
143 largura do corpo); b (relação entre comprimento do corpo e distância entre a extremidade
144 anterior e a junção esôfago-intestino); b' (relação entre comprimento do corpo e distância entre
145 a extremidade anterior e o final do esôfago); c (relação entre comprimento do corpo e
146 comprimento da cauda) e c' (relação entre comprimento da cauda e diâmetro da cauda na altura
147 do ânus).

148 Os dados foram submetidos à análise de variância, verificando-se a normalidade dos
149 resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (1965) e a homogeneidade de variâncias pelo teste de
150 Bartlett (1937). Quando não atendidos os pressupostos do modelo, as médias foram
151 transformadas conforme indicado pelo procedimento de Box-Cox (1964) e, após, foi realizada
152 a análise de agrupamento de médias pelo método de Scott-Knott (1974). Utilizando-se a média
153 das variáveis analisadas, foi realizada a análise de componentes principais (ACP); após
154 verificada a matriz cofenética em referência aos métodos de agrupamento, definiu-se o método
155 mais indicado para a geração do dendograma. Foi realizada também a análise multivariada de
156 correlação canônica afim de observar correlações entre as variáveis mensuradas morfométricas
157 e as características físico-químicas do solo. As análises foram realizadas utilizando-se o
158 software R (R Core Team 2015), pacotes ExpDes (Ferreira et al. 2014) e vegan (Oksanen et al.
159 2017).

160

161 **Caracterização molecular de *Pratylenchus zae*.** Fêmeas de *P. zae* de cada amostra extraída
162 foram coletadas sob microscópio estereoscópico, transferidos para solução salina a 1 M NaCl
163 (29,22 g NaCl + 500 ml água destilada) e conservados a -20 °C para as análises moleculares.
164 Um único exemplar de cada amostra foi selecionado, seccionado ao meio com auxílio de uma
165 agulha fina e transferido para um tubo de microcentrífuga de 0,2 mL contendo 25 µL de WLB
166 (Worm Lysis Buffer) (Williams et al. 1992). Na sequência, os tubos contendo os nematoides

167 foram submetidos à incubação em termociclador para a extração do DNA genômico, com a
168 seguinte configuração: 4 °C por 3 horas, 60 °C por 1 hora, 95 °C por 15 minutos.

169 Para a PCR, foi utilizado o kit *Platinum Supermix* (Invitrogen). Em um tubo de
170 microcentrífuga de 0,2 mL, foram adicionados 21 µL do Kit, 2 µL do DNA genômico e 1 µL
171 dos *primers* universais da expansão D2/D3 da região 28S rDNA (Al-Banna et al. 2004) (D2A
172 – 3’ TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA 5’; D2B – 3’ ACA AGT ACC GTG AGG GAA
173 AGT TG 5’), totalizando um volume final de 25 µL na reação. As condições de amplificação
174 utilizadas foram: 94 °C por 5 minutos, 40 ciclos a 94 °C por 30 s, 55 °C por 1 minuto e 72 °C
175 por 2 minutos, seguido por extensão final a 72 °C por 7 minutos. Após a amplificação do DNA,
176 8 µL do produto da PCR foram utilizados para eletroforese, em tampão 1X TBE (Sambrook et
177 al. 1989), em gel de agarose a 1%, utilizando-se o marcador molecular 1kb DNA Ladder RTU
178 e, em seguida, o gel foi visualizado em transiluminador de luz UV e fotografado. Após a
179 amplificação do DNA, foi realizada a purificação utilizando-se o kit *Wizard SV Gel and PCR*
180 *Clean Up System* (Promega).

181 O sequenciamento dos fragmentos amplificados da expansão D2/D3 foi realizado pela
182 empresa Myleus Biotechnology, por meio de eletroforese capilar em aparelho ABI3130,
183 utilizando-se o polímero POP7 e BigDye v3.1.

184 As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com auxílio do software *BioEdit*
185 *Sequence Alignment Editor* (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), com a finalidade
186 de identificar polimorfismo nas sequências nucleotídicas. As sequências de *P. zaeae* foram
187 comparadas às sequências de outras espécies de nematoides já depositadas no banco de dados
188 (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a identificação de similaridade, utilizando-se o
189 programa BLASTN 2.2.19+ (Zhang et al. 2000). O fitonematoide *Bursaphelenchus xylophilus*
190 foi utilizado como *outgroup*. As sequências foram alinhadas pelo método de *ClustalW Multiple*
191 *Alignment*, gaps e bases não informativos ou fora do alinhamento principal foram removidas,
192 ficando as sequências com 610 pb. Após o alinhamento e ajuste das sequências, essas foram

193 submetidas à análise de reconstrução filogenética, utilizando-se o programa MEGA 6 pelo
194 método estatístico *Neighbor-joining* (Nei et al. 2013; Saitou e Nei 1987) e teste filogenético
195 pelo método de *Bootstrap* com 1000 replicagens (Felsenstein 1985), obtendo-se assim o
196 filograma do conjunto de sequências.

197

198 **RESULTADOS**

199 Com base nos resultados das análises morfológicas, morfométricas e moleculares das
200 populações de *Pratylenchus* estudadas, constatou-se que *P. zae* é a espécie presente nas usinas
201 de cana-de-açúcar dos estados de Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte da região
202 Nordeste do Brasil. Em todas as populações de *P. zae* oriundas das usinas de cana-de-açúcar
203 analisadas, os machos foram ausentes. As fêmeas apresentaram corpo esbelto, quase reto
204 quando mortas, com região labial não separada do corpo (Figura 2). O comprimento do corpo
205 (L) variou de 355 a 555 μm . As populações BF5, JP3, MR2, MR5, OD2 e SJ2 apresentaram os
206 maiores valores de L, enquanto as populações ES3 e ES4, os menores valores, diferindo
207 significativamente das demais, que apresentaram valores intermediários (Tabela 2).

208

209 Os diâmetros do corpo medidos ao nível do ânus e da vulva ($\emptyset A$, $\emptyset V$), bem como na
210 porção média do corpo ($\emptyset C$), variaram de 7,58 a 15,15; 12,62 a 22,72 e 10,10 a 22,72 μm
211 respectivamente (Tabela 2), evidenciando que o diâmetro ao nível da vulva foi o maior entre as
212 mensurações realizadas. O comprimento do estilete (St) variou de 12,12 a 16,16 μm (Tabela 2),
213 cujos valores estão compreendidos no intervalo citado por Fortuner (1976) para *P. zae*, sendo
214 robusto e com os bulbos basais bem desenvolvidos e achatados (Figura 2), característica
215 evidenciada pelas mensurações do diâmetro e altura dos bulbos ($\emptyset \text{bst}$, Abst) que variaram de
216 2,02 a 5,05 μm e de 2,02 a 3,03 μm , respectivamente.

217

218 Na Tabela 3 encontra-se o resultado da análise de variância (ANOVA) das
219 características morfométricas de *P. zae* estudadas, evidenciando que, para todas as variáveis
220 morfométricas analisadas houve significância estatística ($P < 0,0001$ e $P < 0,01$), com exceção
221 da variável comprimento do estilete ($P < 0,3289$).

222

223 As fêmeas apresentaram sobreposição ventral das glândulas esofagianas sobre o
224 intestino (Figura 3a), vulva com posição mais anterior, com V% variando de 63,59 a 77,80
225 (Figura 3b), e variação no comprimento do saco pós-uterino (6,06 a 50,50 μm) (Tabelas 2 e 4).
226 As populações que apresentaram a vulva em posição mais anterior foram BF3, BF4, BF5, ES2,
227 ES5, JP1, JP2, JP3, JP4, MR2, OD2, OD3, OD4, SJ4 e SJ5, cujos valores de V% foram
228 significativamente menores que das demais populações (Tabela 4). Em relação ao saco pós-
229 uterino (PUB), as populações com os menores comprimentos foram ES2, ES3, ES5, MR4,
230 OD5, SJ2, SJ4 e SJ5, enquanto os maiores comprimentos de PUB foram observados em BF1,
231 BF2, BF5, JP3 e JP5 (Tabela 2).

232

233 Observou-se variação no formato da cauda entre as populações de *P. zae* analisadas
234 (Figura 4), que apresentaram desde o formato pontiagudo característico da espécie (Figura 4a),
235 até um pouco mais arredondado e subagudo (Figura 4b, c). O comprimento da cauda (T) variou
236 de 15,15 a 40,40 μm (Tabela 2), sendo que as populações BF2, BF5, JP1, JP2 e JP3
237 apresentaram valores de T significativamente maiores em comparação às demais populações
238 (Tabela 2).

239

240 Os dados relativos às mensurações das populações de *P. zae* e aos índices demanianos
241 foram ainda submetidos a análises multivariadas, correlacionando também as mensurações das
242 populações com as características físicas e químicas dos solos de cada área amostrada (Tabelas
243 5 e 6), numa tentativa de correlacionar as diferenças morfométricas observadas com as

244 condições edáficas da origem de cada uma das populações. Essa análise de componentes
245 principais permite reunir os espécimes ou populações em grupos, de tal forma a existir máxima
246 homogeneidade dentro deles e máxima heterogeneidade entre eles (Mora-Aguilera e Campbell
247 1996). A análise de agrupamento realizada a partir da análise de componentes principais
248 permitiu a separação das populações em três grupos distintos: I) ES3, ES4; II) MR5, MR2,
249 OD2, BF5 e JP3; e III) todas as demais populações (Figura 5).

250

251 A análise de componentes principais, realizada apenas com as médias das variáveis
252 morfométricas das populações de *P. zae*, mostrou que 33,97% da variação total é associada ao
253 primeiro componente e 20,22%, ao segundo (dados não mostrados). Pelo agrupamento, não foi
254 possível estabelecer correspondências entre as diferentes populações estudadas em função de
255 suas características morfométricas, ou seja, não é possível afirmar que populações coletadas em
256 uma mesma usina, portanto com condições edafoclimáticas semelhantes em sua origem, são
257 agrupadas por uma ou outras características morfométricas, já que populações de uma mesma
258 usina foram agrupadas em grupos distintos, a exemplo das populações ES1-5 coletadas na usina
259 Estivas, RN. Talvez a única correspondência possível de ser obtida é em relação ao grupo
260 formado pelas populações ES3 e ES4, cujos valores de V são menores e, portanto, representam
261 populações com característica de vulva mais anterior que as demais populações estudadas.

262

263 A análise de correlação, realizada com as médias das variáveis morfométricas das
264 populações de *P. zae* e a análise física do solo, mostrou que 77,30% da variação total é
265 associada ao primeiro componente e 22,70%, ao segundo (dados não mostrados). A análise de
266 agrupamento realizada permitiu a separação das populações em quatro grupos distintos: I) BF2;
267 II) SJ3, SJ4, BF1 e SJ5; III) OD3, OD1, OD2, OD4, MR5, MR4, OD5, MR1, SJ1 e SJ2; e IV)
268 as demais populações (Figura 6).

269

270 Ao contrário do observado no agrupamento das populações utilizando-se apenas os
271 caracteres morfológicos, quando se acrescentou as características físicas dos solos de cada
272 usina, ou área amostrada, foi possível melhor correspondência entre o agrupamento das
273 populações e as características do solo em que foram obtidas por meio de análise de correlação
274 canônica. Dessa forma, as populações coletadas nas usinas Japungu, PB (JP) e Olho d'Água,
275 PE (OD), agruparam-se juntas no mesmo cluster, apesar de haver variações em relação às
276 populações coletadas em outras usinas. Isso indica que os fatores ligados à física de solo podem
277 ter influência nos caracteres morfológicos das populações de *P. zae* estudadas.

278

279 Por exemplo, todas as populações oriundas da usina Olho d'Água formaram um grupo
280 com SJ1, SJ2, MR1, MR4 e MR5, sendo o fator preponderante para a formação desse grupo a
281 maior porcentagem de argila (< 59%) presente no solo em que todas essas populações foram
282 coletadas (Tabela 5). A porcentagem de argila foi tão determinante para o agrupamento das
283 populações que houve a formação de um grupo isolado, formado pela população BF2, cujo
284 percentual de argila no solo foi o mais elevado de todas as amostras (74%). Isso pode ter
285 refletido em suas características morfométricas, notadamente no maior valor do índice
286 demariano 'a' dessa população (a = comprimento do corpo / diâmetro do corpo) (Tabela 3),
287 indicando que o diâmetro do corpo foi reduzido nessa população em função do alto percentual
288 de argila presente no solo em que foi coletada.

289

290 Para o agrupamento formado por BF1, BF2, SJ3, SJ4 e SJ5, a maior porcentagem de
291 silte presente nas amostras de solo dessas localidades parece ter sido o fator determinante para
292 a formação desse grupo (Tabela 5). De fato, no solo de todas as amostras em que tais populações
293 foram obtidas, percentuais acima de 20% de silte estavam presentes. Já para o grupo formado
294 por todas as outras populações, maiores porcentagens de areia (> 35%) foram observadas nas
295 amostras de solo (Tabela 5).

296

297 Já em relação à análise de correlação, realizada com a média das variáveis
298 morfométricas das populações de *P. zae* e a análise química do solo, verificou-se que 62,27%
299 da variação total é associada ao primeiro componente e 23,70%, ao segundo (dados não
300 mostrados). A análise de agrupamento realizada permitiu a separação das populações em três
301 grupos distintos: I) SJ3, ES4, ES3 e ES5; II) JP2, OD2, OD5, ES1, MR3, MR1, ES2, OD3 e
302 SJ2; e III) todas as demais populações (Figura 7).

303

304 É possível especular a partir desses agrupamentos quais os fatores ligados à análise
305 química das amostras de solo que podem ter interferido na formação dos grupos. Por exemplo,
306 para o grupo formado por SJ3, ES3, ES4 e ES5, de maneira geral a análise química do solo
307 evidenciou maiores soma de bases (acima de 4,96%), V% (acima de 65,96%) e pHs mais
308 elevados (acima de 5,8). Para o grupo formado por JP2, OD2, OD5, ES1, MR3, MR1, ES2,
309 OD3 e SJ2, maior concentração de cálcio foi observada nas amostras de solo, bem como valores
310 de soma de bases entre 3,02 e 4,68. Já para o último grupo, ao contrário do primeiro, os valores
311 de V% foram menores, ultrapassando a faixa de 49% apenas em uma amostra (MR2 = 61,05).

312

313 Comparando-se os três dendogramas (Figuras 5 a 7), observa-se que há variação entre
314 as populações estudadas e apenas as populações ES3 e ES4 da usina Estivas, RN,
315 permaneceram agrupadas em todas as análises realizadas.

316

317 No presente estudo, o método de fixação escolhido (TAF), apresentou bons resultados
318 e é recomendado para os trabalhos de caracterização morfológica e morfométrica de nematoides
319 (Ferraz e Machado 2019). Além disso, todos os exemplares observados e mensurados neste
320 trabalho foram mortos por calor a 60 °C e fixados com o mesmo fixador, o que sugere que as
321 variações encontradas provavelmente se devam a diferenças nas condições geográficas e/ou
322 disponibilidade de alimentos. No entanto, pode-se também sugerir que tais variações possam

322 estar relacionadas à variabilidade entre e dentro da espécie *P. zaeae*, a exemplo do observado
323 para várias espécies do gênero *Pratylenchus*.

324

325 **Caracterização molecular das populações de *P. zaeae*.** A partir do DNA extraído de fêmeas
326 individuais de cada população de *P. zaeae* estudada e da PCR com os *primers* da região D2/D3
327 do gene 28S rDNA, verificou-se que para todos os exemplares houve amplificação de
328 fragmentos de DNA com 750 pb, como pode ser visualizado na Figura 8, para dois exemplares
329 de cada usina, apenas a título de exemplificação.

330

331 A partir do sequenciamento dos fragmentos de 750 pb de cada uma das fêmeas coletadas
332 nas diferentes usinas amostradas, confirmou-se os resultados da morfometria, ou seja, a espécie
333 estudada é *P. zaeae*. Para tanto, a comparação das sequências das populações de *P. zaeae*
334 estudadas nesse trabalho com sequências de *P. zaeae* de populações também de cana-de-açúcar
335 coletadas no Japão e depositadas no GenBank sob códigos de acesso AB933457-82 (Kawanobe
336 et al. 2014) confirmou a homologia das mesmas, com identidade de 90 %.

337

338 A árvore obtida a partir da análise filogenética das populações de *P. zaeae* do presente
339 trabalho, utilizando-se *Bursaphelenchus xylophilus* (código de acesso: EU295503.1) como
340 *outgroup* encontra-se na Figura 9. A análise filogenética (Figura 9), considerando-se valores
341 de *bootstrap* acima de 87, confirmou a existência de variabilidade entre as populações de *P.*
342 *zaeae* estudadas no presente trabalho, evidenciando-se a formação de cinco grupos distintos: i)
343 populações BF-1, BF-3, ES-1 e ES-4; ii) JP-5 e JP-1; iii) BF-2, JP-4 e *B. xylophilus*; iv) BF-4,
344 JP-3, JP-2, ES-2, BF-5 e MR-5; e v) MR-4, ES-3, MR-3, OD-5, OD-2, OD-4, ES-5, OD-1, OD-
345 3, SJ-1. A única população em que todas as amostras agruparam-se juntas foi a da usina Olho
346 d'Água, Pernambuco, evidenciando pouca variação molecular entre os exemplares dessa
347 localidade. Para todas as outras usinas amostradas, as populações agruparam-se em *clusters*

348 distintos, o que sugere que a região de coleta não seja determinante para a existência de variação
349 e separação das populações pelo local. Outras causas de variação podem estar presentes nas
350 populações de *P. zaeae* estudadas no presente trabalho, como por exemplo tipo de solo e
351 hospedeiro.

352

353 A partir da Figura 10, pode-se confirmar que, mesmo existindo variação entre as
354 populações de *P. zaeae* do presente estudo, quando a análise inclui populações de *P. zaeae* de
355 regiões distintas do mundo, de diferentes hospedeiros, a grande maioria agrupa-se no mesmo
356 *cluster*, ou seja, há a formação de apenas três grupos, um com as populações coletadas em
357 cenoura e milho, no Vietnã e EUA, respectivamente, outro com as populações de arroz e de
358 hospedeiro desconhecido coletadas no Quênia e na China, respectivamente, e o último grupo
359 formado por todas as demais populações de *P. zaeae*, incluindo as do presente estudo e as de
360 cana-de-açúcar do Japão e de Pernambuco e de hospedeiros desconhecidos da África do Sul e
361 da China. Aparentemente, pela árvore obtida pelo alinhamento dessas sequências, é possível
362 sugerir que o hospedeiro possa ser responsável pela variação mais evidente em *P. zaeae*,
363 enquanto a localidade possa ter papel menos relevante nessa variação.

364

365 **DISCUSSÃO**

366 No presente trabalho os machos foram ausentes, corroborando com a literatura que
367 aponta os machos em *P. zaeae* como extremamente raros, tendo sido observados somente uma
368 vez na Costa do Marfim (Merny 1970). Em um estudo de caracterização morfológica e
369 morfométrica de espécies de *Pratylenchus* em áreas de cultivo de cana-de-açúcar do estado de
370 Pernambuco, machos de *P. zaeae* não foram encontrados na população estudada (Jesus et al.,
371 2020).

372

373 O comprimento do corpo (L) variou de 355 a 555 μm ficando dentro do intervalo
374 descrito por Graham (1951) como de *P. zae*. Os diâmetros ao nível da vulva foi o maior entre
375 as mensurações realizadas (Tabela 2). Esses resultados confirmam a afirmativa de que, no caso
376 de mensurações realizadas em fêmeas, o maior diâmetro do corpo deve ser medido ao nível da
377 vulva, e não ao meio do corpo (Ferraz e Machado 2019). As características de bulbos basais
378 bem desenvolvidos e achatados também foram observadas em *P. zae* de áreas de cana-de-
379 açúcar no estado de Pernambuco, Brasil (Jesus et al., (2020). O achatamento dos bulbos basais
380 do estilete é uma característica importante de *P. zae* (Loof 1991). Variação no comprimento
381 do estilete, também observada entre isolados de *P. zae* por Troccoli et al. (1996).

382

383 A dificuldade de visualização da extremidade apical do estilete pode estar associada a
384 possíveis erros inerentes à mensuração de estruturas de tamanho reduzido, o que pode levar às
385 variações de comprimento dessa estrutura, aceitas pela literatura (Ferraz 1999). Por isso, é
386 importante que o estilete tenha pouco valor diagnóstico em estudos inter-populacionais de *P.*
387 *brachyurus*, o que pode ocorrer também para *P. zae* (Siqueira 2007). Tal variação pode se dar,
388 além disso, por questões inerentes à população estudada, como a exposição a ambientes
389 diversos, pois fatores ambientais podem afetar por exemplo, o comprimento do corpo de *P.*
390 *brachyurus*, o que refletiria diretamente no comprimento do estilete, sugerindo que estas
391 variáveis não devem ser utilizadas isoladamente para a identificação específica de *Pratylenchus*
392 (Olowe e Corbett 1984). Apesar da variação observada para St no presente estudo, não houve
393 diferença significativa entre os valores dessa variável entre as populações estudadas.

394

395 No presente estudo, as fêmeas de *P. zae* apresentaram sobreposição ventral das
396 glândulas esofagianas sobre o intestino (Figura 3a), vulva com posição mais anterior, com V%
397 variando de 63,59 a 77,80 (Figura 3b), e variação no comprimento do saco pós-uterino (6,06 a
398 50,50 μm) (Tabelas 2 e 4). Posição da vulva mais anterior também foi observada em trabalho

399 realizado por Jesus et. al (2020). No estudo de levantamento das espécies de *Pratylenchus*
400 associadas à cultura do arroz, soja, milho e feijão em plantios na região central do Brasil em
401 que *P. zaeae* e *P. brachyurus* foram identificados e caracterizados morfometricamente, *P. zaeae*
402 apresentou grande variabilidade na posição da vulva (Costa et al. 2019).

403

404 Em uma pesquisa de caracterização morfológica, morfométrica e multiplicação *in vitro*
405 das seis espécies mais comuns de *Pratylenchus* que ocorrem no Brasil, foi observado para *P.*
406 *zaeae* a posição mais anterior da vulva, comparada às demais espécies estudadas, sendo essa, a
407 característica morfométrica mais marcante, pois o valor de V% para *P. zaeae* foi o menor entre
408 as outras cinco espécies de *Pratylenchus* estudadas, indicando a importância desse caráter para
409 a identificação da espécie, apesar das variações observadas. Foi observado ainda que o
410 comprimento do saco pós-uterino foi curto, porém apresentou variação, como observado no
411 presente estudo e em estudo anterior realizado por Troccoli et al. (1996) (Gonzaga 2006).
412 Houve variação no formato da cauda entre as populações de *P. zaeae* analisadas (Figura 4), que
413 apresentaram formato pontiagudo característico da espécie (Figura 4a), até um pouco mais
414 arredondado e subagudo (Figura 4b, c), como descrito por Gonzaga (2006), porém sempre lisa,
415 sem estriações.

416

417 Variação no formato da cauda já foi relatada para o gênero *Pratylenchus*. No trabalho
418 de descrição da espécie *P. brachyurus*, verificou a existência de cinco tipos diferentes de cauda
419 (Godfrey 1929). O formato terminal da cauda desse nematoide pode variar entre diferentes
420 populações e mesmo dentro de uma única população, situação verificada no presente trabalho
421 também para *P. zaeae* (Román e Hirschmann 1969; Tarjan e Frederick 1978). Variação na cauda
422 de *P. zaeae* de populações oriundas de áreas de cana-de-açúcar no estado de Pernambuco, Brasil,
423 também foi observada por Jesus et al., (2020). Devido à inexistência de terminação de cauda
424 que seja considerada padrão em *P. brachyurus* e que possa ser utilizada como característica

425 morfológica chave para a espécie, esta característica não deve ser utilizada de maneira isolada
426 para o diagnóstico da espécie (Siqueira, 2007). O ambiente por exemplo, pode influenciar no
427 tipo de término da cauda de *P. penetrans* (Tarte e Mai 1976; Townshend 1991).

428

429 Comparando alguns valores morfométricos obtidos para as populações estudadas no
430 presente trabalho com aqueles descritos por Graham (1951), citado por Castillo e Vovlas (2007)
431 para fêmeas de *P. zaeae*, verificou-se que algumas variáveis ultrapassaram os valores máximos
432 e mínimos indicados nessa referência, mostrando a diversidade morfológica existente intra e
433 inter-populacionalmente nas populações de *P. zaeae* coletadas em áreas de cana-de-açúcar na
434 região Nordeste brasileira. Entretanto, os valores médios para as populações estão em
435 conformidade com a faixa de variação aceita para *P. zaeae* em Graham (1951).

436

437 Solos com bons níveis de nutrição, com pHs mais adequados à cultura e com
438 consequente V% mais elevado podem influenciar diretamente na nutrição e bom
439 desenvolvimento do hospedeiro, que pode, por sua vez, refletir em variação em características
440 morfométricas de nematoides que estão parasitando o sistema radicular desse hospedeiro. A
441 exemplo, a nutrição do hospedeiro teve influência no comprimento do corpo de *P. brachyurus*
442 e *P. zaeae*, uma vez que foram encontrados espécimes de *P. zaeae* menores em plântulas de alfafa,
443 espécie que os autores da pesquisa indicaram como de baixa qualidade para a nutrição do
444 nematoide. Ao contrário, no mesmo hospedeiro, espécimes de *P. brachyurus* apresentaram
445 maior comprimento do corpo, situação que os autores atribuíram a alterações metabólicas
446 causadas pela baixa qualidade da nutrição, especialmente o prolongamento da fase de
447 crescimento até o estágio adulto, causando lento desenvolvimento do nematoide (Olowe e
448 Corbett 1984).

449 Para *P. coffeae* por exemplo, já foi observada grande variação no comprimento do corpo
450 de fêmeas coletadas em plantas de citros com diferentes teores de amido, comprovando que a

451 nutrição do hospedeiro tem relevante papel em características morfométricas para esse grupo
452 de nematoides (Duncan et al. 1998). Além disso, a diferença de nutrição do hospedeiro ou fonte
453 nutritiva também foram responsáveis por variações no comprimento do corpo de outros grupos
454 de nematoides, como em *Meloidogyne incognita* (McClure e Viglierchio 1966), *Aphelenchus*
455 *avenae* (Monson 1971) e *Aphelenchoides fragariae* (Fu et al. 2012).

456

457 Os resultados das análises de agrupamento realizada a partir da análise de componentes
458 principais com as médias das variáveis morfométricas das populações de *P. zae* permitiu a
459 separação das populações em três grupos distintos (Figura 5), assim como a análise de
460 agrupamento realizada com as médias das variáveis morfométricas das populações de *P. zae*
461 e a análise física do solo (Figura 6), e a análise de correlação, realizada com a média das
462 variáveis morfométricas das populações de *P. zae* e a análise química do solo (Figura 7). A
463 formação de diferentes grupos dentro de uma mesma espécie, evidenciando variação entre suas
464 características morfométricas, também foi observada em outras espécies de *Pratylenchus*, como
465 em um trabalho realizado por Siqueira (2007), em que, por meio de análises multivariadas das
466 variáveis morfométricas L, St, a, b, c e V%, foi observada a formação de cinco grupos distintos
467 de *P. brachyurus*, correspondentes às 11 populações estudadas, oriundas de diferentes
468 localidades do Brasil e diferentes hospedeiros.

469

470 As variações nas características morfológicas são comuns no gênero *Pratylenchus*, visto
471 que existe uma grande variabilidade dentro e entre as espécies. Diferenças morfométricas entre
472 populações de uma mesma espécie de nematoide podem ser resultantes da influência de fatores
473 ambientais, conforme vários autores já relataram, sendo o isolamento geográfico o mais
474 importante (Doucet et al. 1996).

475

476 Em trabalho de análise morfométrica e molecular de isolados de *P. coffeae* oriundos de
477 túberas de inhame em áreas do estado de Pernambuco, foi ressaltado que as variações
478 morfométricas encontradas entre as dez populações estudadas podem ter sido influenciadas pelo
479 isolamento geográfico, plantas hospedeiras e temperatura. Os autores do trabalho observaram
480 que mais de 50% das populações apresentaram diferenças no comprimento e largura do corpo
481 e 90% delas apresentaram diferenças no comprimento do estilete (Lira et al. 2014).

482

483 Em uma pesquisa em que foi estudada a importância de *P. brachyurus* na cultura do
484 feijão caupi através de estudos morfológicos e morfométricos de populações brasileiras, foi
485 observada variação morfométrica entre as 15 populações analisadas, por meio de análises de
486 componentes principais, utilizando-se as características L, St, a, b, c e V% . O autor avaliou
487 ainda, os efeitos dos métodos de fixação de formol e formol-glicerina sobre as características
488 morfométricas de *P. brachyurus*, evidenciando-se que a maioria das características foram
489 afetadas em diferentes intensidades pelos métodos de fixação (Siqueira 2007). Variações em
490 características morfométricas causadas por diferentes fixadores também foram observadas em
491 *P. brachyurus* e *P. zae* (Olowe e Corbett 1983).

492

493 Diante disso, conclusões incorretas podem ser tomadas em análises morfométricas, se a
494 comparação é realizada em espécimes fixados de maneira diferente. Além disso, vale salientar
495 que substâncias utilizadas na fixação podem promover redução significativa em características
496 morfométricas, principalmente no comprimento do corpo, distância da ponta da cauda à vulva
497 e diâmetro do corpo ao nível do ânus (Siqueira 2007).

498

499 Por meio das análises filogenéticas (Figura 9 e 10), confirmou a existência de
500 variabilidade entre as populações de *P. zae* estudadas no presente trabalho, evidenciando-se a
501 formação de grupos distintos, inclusive quando a análise inclui populações de *P. zae* de regiões

502 distintas do mundo, de diferentes hospedeiros, a maioria agruparam-se no mesmo *cluster*,
503 havendo a formação de apenas três grupos. A variabilidade dentro e entre populações de
504 espécies de *P. brachyurus* já foi observada por Machado et al. (2015), que realizaram um estudo
505 de caracterização morfológica e molecular de populações brasileiras desse nematoide e, por
506 meio de análise filogenética, utilizando-se sequências da região ITS-rDNA, confirmaram a
507 identidade das populações estudadas e, ainda, identificaram diversidade intraespecífica de
508 sequências entre as populações que apresentaram grupos distintos.

509

510 Evidenciou-se que a variabilidade morfológica e molecular existente entre as
511 populações de *P. brachyurus* estava correlacionada às diferenças de agressividade que as
512 populações apresentaram em diferentes hospedeiros, citadas nos trabalhos anteriores de
513 Machado et al. (2007) e Siqueira e Inomoto (2008). No presente trabalho, a análise molecular
514 mostrou que realmente o hospedeiro pode ter papel fundamental para a existência de
515 variabilidade entre as populações de *P. zaeae*, mas também que características de solo, como a
516 porcentagem de argila, areia ou silte, bem como parâmetros relacionados à química de solo,
517 que influenciam a nutrição do hospedeiro, podem interferir em características morfológicas
518 dessa espécie.

519

520 Em populações de *Pratylenchus* spp. coletadas em cafeeiros na Guatemala, foi
521 constatado grande variação morfológica entre três populações, que também diferiram em
522 agressividade, medida pela capacidade reprodutiva em diferentes hospedeiros, e apresentaram
523 incompatibilidade reprodutiva entre elas (Villain et al. 1998). Foram observadas também
524 diferenças entre características morfométricas em subpopulações de *P. coffeae* oriundas de
525 plantas de café, citros, banana e *Aglaonema* sp. (Wilcken et al. 2002).

526

527 A taxonomia para distinguir as várias espécies de *Pratylenchus* é muito difícil
528 (Hernández et al., 2001) devido à variabilidade intraespecífica de alguns caracteres
529 diagnósticos, muitas vezes causada por variações entre hospedeiros, tipos de solo, clima e até
530 mesmo o processo de fixação dos espécimes. Nesse sentido, a integração de outras ferramentas
531 para a correta diagnose desse grupo de nematoides, como as técnicas biomoleculares, é de suma
532 importância.

533

534 Entretanto, vários estudos mostraram que, apesar de haver diferenças entre populações
535 e mesmo dentro de uma mesma população de *Pratylenchus* sp., as ferramentas moleculares,
536 especialmente o sequenciamento de determinadas regiões do rDNA, são úteis para confirmar a
537 identidade dessas populações, como demonstrado por Machado et al. (2015) para *P.*
538 *brachyurus*.

539

540 Por meio de análises filogenéticas baseadas em sequências da região D2/D3 28S rDNA,
541 entre um grande número de isolados geográficos diversos dos nematoides das lesões
542 radiculares, foi evidenciado que a maioria é monofilético, separando as espécies em seis
543 grandes grupos distintos, congruentes com aqueles definidos por caracteres derivados de
544 padrões da região labial e espermateca. Dentro desses grupos, *P. zae* se enquadrou em um
545 grupo distinto das demais espécies no trabalho de Subbotin et al. (2008).

546

547 Em estudo utilizando PCR seguida de sequenciamento da região D2/D3 de espécimes
548 de *Pratylenchus* sp. extraídos de batata semente ou raízes de lírio provenientes da Holanda,
549 comprovaram, após comparação das sequências com outras depositadas no banco de dados
550 GenBank, foi constatado que se tratava das espécies *P. penetrans* e *P. crenatus*,
551 respectivamente presentes nos tubérculos de batata semente e nas raízes de lírio, consideradas
552 quarentenárias para o Brasil na época (Oliveira et al. 2009). Os autores provaram que a

553 utilização de caracteres morfológicos aliada aos estudos moleculares foram importantes para o
554 serviço de quarentena do Brasil, na medida em que a detecção e correta diagnose impediu a
555 infestação de áreas indenes pela utilização de material de propagação infestado importado.

556

557 No presente estudo, foi possível observar que características de solo e nutrição do
558 hospedeiro, influenciou a morfologia e conseqüentemente morfometria das populações de
559 *Pratylenchus* estudadas, pois estas, apresentaram alguns parâmetros fora das médias apontadas
560 pela literatura, formando grupos distintos mesmo quando analisadas filogeneticamente.
561 Somente com a utilização da taxonomia integrativa foi possível caracterizar as populações de
562 *Pratylenchus* coletadas em usinas de cana-de-açúcar na região Nordeste do Brasil, afirmar que
563 *P. zaeae* é a espécie presente, e que as análises morfométricas aliadas a ferramentas
564 biomoleculares foi útil para o diagnóstico da espécie e para identificar a variabilidade dentro e
565 entre populações de *P. zaeae*.

566

567 **LITERATURA CITADA**

568 Al-banna, L., Ploeg, A. T. V., Williamson, M., Kaloshian, I. 2004. Discrimination of Six
569 *Pratylenchus* Species Using PCR and Species-Specific Primers. Journal of Nematology 36:
570 142–146.

571 Araya, T. Z., Padilla, W. P., Yuste, A. A., Navarrete, C. C., Liébanas, G., Rius, J. E. P., Castillo,
572 P. 2016. Root-lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae) from
573 Costa Rica with molecular identification of *P. gutierrezii* and *P. panamaensis* topotypes.
574 European Journal Plant Pathology 145: 973–998.

575 Bartlett, M. S. 1937. Properties of sufficiency and statistical tests. Proceedings of the Royal
576 Statistical Society 160: 268–282.

577 Bonfim Junior, M. F., Consoli, E. A., Inomoto, M. M., Oliveira, C. M. G. 2016. First report of
578 *Pratylenchus crenatus* in Brazil. New Disease Reports 34: 7.

- 579 Box, G. E. P., Cox, D. R. 1964. An analysis of transformations. Journal of the Royal Statistical
580 Society 26: 211-252.
- 581 Castillo, P., Vovlas, N. 2007. *Pratylenchus* (Nematoda: *Pratylenchidae*): diagnosis, biology,
582 pathogenicity and management. Nematology monographs and perspectives. Leiden- Boston:
583 Brill Academic Publishers 6, 529 pp.
- 584 Conab- Companhia Nacional de Abastecimento. 2020. Acompanhamento da safra brasileira de
585 grãos 7: 1-104.
- 586 Costa, D. C., Lobo, V. L. S., Mattos, V. S., Malaquias, J. V., Sousa, R. L., Costa, A. C., Barbosa,
587 A. S., Santos, B. C. M., Moreira, R. J. 2019. Levantamento de espécies de nematoides-das-
588 lesões-radiculares (*Pratylenchus* spp.) no Cerrado brasileiro e avaliação de danos à cultura do
589 arroz. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento – Embrapa 345, 40 pp. Available from:<
590 <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/201669/1/BPD345-ed-01-20192.pdf>>.
591 [07 May 2019].
- 592 Courtney, W. D., Polley, D., Miller, V. L. 1955. TAF, an improved fixative in nematode
593 technique. Plant Disease Reporter 39: 570-571.
- 594 Dinardo-Miranda, L. L. 2005. Manejo de nematóides em cana-de-açúcar. Jornal Cana. Instituto
595 Agrônômico de Campinas. Available from:
596 <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/5Ctecnologiaagricola_000fxg3tc4b02w
597 [yiv80soht9h8ex6by1.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/5Ctecnologiaagricola_000fxg3tc4b02w)>. [12 May 2019].
- 598 Dinardo-Miranda, L. L. D. 2005. Nematoides e pragas de solo em cana-de-açúcar. Encarte
599 Informações Agrônômicas 110. Available from: < [http://www.ipni.net/publication/ia-](http://www.ipni.net/publication/ia-brasil.nsf/0/B1FA44831820884083257AA1006BC838/$FILE/Enc25-32-110.pdf)
600 [brasil.nsf/0/B1FA44831820884083257AA1006BC838/\\$FILE/Enc25-32-110.pdf](http://www.ipni.net/publication/ia-brasil.nsf/0/B1FA44831820884083257AA1006BC838/$FILE/Enc25-32-110.pdf)>. [10 May
601 2019].
- 602 Diola, V., Santos, F. 2012. Fisiologia. Pages 25-49 in: Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e
603 álcool: tecnologias e perspectivas, ed. 2. F. Santos, A. Borém, C. Caldas, eds. Viçosa, MG.

- 604 Doucet, M., Pinochet, J., Di Rienzo, J. A. 1996. Comparative analysis of morphological and
605 morphometrical characters in six isolates of *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen, 1951
606 (Nemata: Tylenchida). *Fundamental Applied Nematology* 19: 79-84.
- 607 Duncan, L. W., Inserra, R. N., Dunn, D. 1998. Seasonal changes in citrus fibrous root starch
608 concentration and body length of female *Pratylenchus coffeae*. *Nematropica* 28: 263-266.
- 609 Ferraz, L. C. C. B. 1999. Gênero *Pratylenchus*: os nematoides das lesões radiculares. *Revisão*
610 *Anual de Patologia de Plantas* 7: 157-195.
- 611 Ferraz, L. C. B., Machado, A. C. Z. 2019. Estudos morfológicos e morfométricos. Pages 59-67
612 in: *Métodos em Nematologia Agrícola*. A. C. Z. Machado, S. A. Silva, L. C. C. B. Ferraz, eds.
613 Gráfica e Editora Filipel, Piracicaba, SP.
- 614 Ferreira, E. B., Cavalcanti, P. P., Nogueira, D. A. 2014. ExpDes: An R package for ANOVA
615 and experimental designs. *Applied Mathematics* 5: 2952-2958.
- 616 Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the
617 bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- 618 Fortuner, R. 1976. *Pratylenchus zae*. C. I. H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes.
619 Commonwealth Institute of Helminthology 77, 3 pp.
- 620 Fu, Z., Agudelo, P., Wells, C. E. 2012. Differential expression of a β - 1,4-endoglucanase
621 induced by diet change in the foliar nematode *Aphelenchoides fragariae*. *Phytopathology* 102:
622 804-811.
- 623 Gabia, A. A. 2019. Nematoides na cultura da cana-de-açúcar. Available from:
624 <<https://promip.agr.br/nematoides-na-cultura-da-cana-de-acucar/>>. [11 Feb 2020].
- 625 Goulart, A. M. C. 2008. Aspectos gerais sobre nematoides-das-lesões-radiculares (gênero
626 *Pratylenchus*). Embrapa Documentos 2019, 30 pp. Available from: <
627 <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/571924/1/doc219.pdf>> [10 Feb 2019].
- 628 Godfrey, G.H. 1929. A destructive root disease of pineapple and other plants due to *Tylenchus*
629 *brachyurus*. *Phytopathology* 19: 611-629.

- 630 Gonzaga, V. 2006. Caracterização morfológica, morfométrica e multiplicação in vitro das seis
631 espécies mais comuns de *Pratylenchus* Filipjev, 1936 que ocorrem no Brasil. Available from:
632 <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/105288/gonzaga_v_dr_jabo.pdf?sequenc
633 e=1>. [20 Feb 2019].
- 634 Hernández, M., Jordana, R., Goldaracena, A., Pinochet, J. 2001. SEM observations of nine
635 species of the genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Pratylenchidae). Journal of
636 Nematode Morphology and Systematics 3: 165-174.
- 637 Jesus, A. M., Pedrosa, E. M. R., Reis, J. B. R. S., Porto, A. C. F. 2020. Morphological and
638 morphometric characterization of *Pratylenchus* species in sugarcane cropping areas of
639 Pernambuco state. Revista Caatinga 33: 599-607.
- 640 Kawanobe, M., Miyamaru, N., Yoshida, K., Kawanaka, T., Toyota, K. 2014. Plant-parasitic
641 nematodes in sugarcane fields in Kitadaito Island (Okinawa), Japan, as a potential sugarcane
642 growth inhibitor. Nematology 16: 807-820.
- 643 Kumari, S. 2015. Characterization of *Pratylenchus crenatus* and *P. neglectus* (Nematoda:
644 Pratylenchidae) associated with wheat crop. Helminthologia 52: 280-286.
- 645 Lira, V. L., Rosa, J. M. O., Oliveira, S. A., Oliveira, C. M. G., Moura, R. M. 2014.
646 Morphometric and molecular analysis of *Pratylenchus coffeae* populations from yam tubers,
647 Pernambuco State, Brazil. Nematropica 44: 152-165.
- 648 Loof, P. A. A. 1991. The family Pratylenchidae Thorne, 1949. Pages 363-421 in: Manual of
649 agricultural nematology. W.R. Nickle ed. New York, NY, USA: Marcel Dekker.
- 650 Machado, A. C. Z.; Silva, S. A. Extração de nematoides. In: Machado, A. C. Z.; Silva, S. A.;
651 Ferraz, L. C. C. B. (Ed). Métodos em Nematologia Agrícola. ed. Piracicaba: Sociedade
652 Brasileira de Nematologia, 2019. cap. 2, p. 9-12.
- 653 Machado, A. C. Z., Siqueira, K. M. S., Ferraz, L. C. C. B., Inomoto, M. M., Bessi, R., Harakava,
654 R., Oliveira, C. M. G. 2015. Characterization of Brazilian populations of *Pratylenchus*

- 655 *brachyurus* using morphological and molecular analyses. *Tropical Plant Pathology* 40: 102–
656 110.
- 657 Machado, A. C. Z., Ferraz, L. C. C. B., Oliveira, C. M. G. 2007. Development of a species-
658 specific reverse primer for the molecular diagnostic of *Pratylenchus brachyurus*. *Nematropica*
659 37: 249-257.
- 660 McClure, M. A., Viglierchio, D. R. 1966. The influence of host nutrition and intensity of
661 infection on the sex ratio and development of *Meloidogyne incognita* in sterile agar culture of
662 excised cucumber. *Nematologica* 12: 237-247.
- 663 Merny, G. 1970. Les nematodes phytoparasites des rizieres inondées em Côte d'Ivoire. I. Les
664 espèces observées. *Cahiers de l'ORSTOM. Serie Biologie* 11: 3-43.
- 665 Monson, H.K. 1971. Effect of nematode trapping fungi, media and temperature on the
666 morphometrics of *Aphelenchus avenae*. *Nematologica* 17: 219-224.
- 667 Mora-Aguilera, G., Campbell, C. L. 1996. Multivariate techniques for selection of
668 epidemiological variables. Pages 51-57 in: *Exercises in plant disease epidemiology*. L. Frank,
669 L., D.A. Neher eds. Manhattan: American Phytopathological Society.
- 670 Nei, M., Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6:
671 Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:
672 2725–2729.
- 673 Noronha, M. A., Muniz, M. F. S., Cruz, M. M., Assunção, M. C., Castro, J. M. C, Oliveira, E.
674 R. L., Miranda, C. G. S., Machado, A. C. Z. 2017. *Meloidogyne* and *Pratylenchus* species in
675 sugarcane fields in the state of Alagoas, Brazil. *Ciência Rural* 47: 1-3.
- 676 Oksanen, F. J., Blanchet, G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., Peter R.
677 Minchin, P. R., O'hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E.,
678 Wagner, H. 2017. *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.4-3. Available
679 from: <[https://CRAN.R- project.org/package=vegan](https://CRAN.R-project.org/package=vegan)>. [20 Feb 2019].

- 680 Olowe, T., Corbett, D. C. M. 1983. Morphology and morphometrics of *Pratylenchus*
681 *brachyurus* and *P. zae* I. Effect of fixative and processing. Indian Journal of Nematology 13:
682 141-154.
- 683 Olowe, T., Corbett, D. C. M. 1984. Morphology and morphometrics of *Pratylenchus*
684 *brachyurus* and *P. zae* II. Influence of environmental factors. Indian Journal of Nematology
685 14: 30-35.
- 686 Oliveira, C. M. G., Kubo, R. K. 2007. Reconhecimento, danos e controle dos nematóides
687 parasitos da cana-de-açúcar: nematóides parasitos da cana-de-açúcar. Instituto Biológico 24: 1-
688 19.
- 689 Oliveira, C. M. G., Machado, A. C. Z., Kubo, R. K., Harakava, R. 2009. Diagnose de
690 *Aphelenchoides fragariae* e *Pratylenchus* spp. pela aplicação da tecnologia do código de barras
691 do DNA. Nematologia Brasileira 33: 218-225.
- 692 Powers, T. 2004. Nematode Molecular Diagnostics: From Bands to Barcodes. Annual Review
693 of Phytopathology 42: 367–382.
- 694 R Core Team. 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation
695 for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from: <URL [https://www.R-](https://www.R-project.org/)
696 [project.org/](https://www.R-project.org/)>. [20 Feb 2019].
- 697 Román, J., Hirschmann, H. 1969. Morphology and morphometrics of six species of
698 *Pratylenchus*. Journal of Nematology 1: 363-386.
- 699 Saitou, N., Nei, M. 1987. The Neighbor-Joining method: A new method for reconstructing
700 phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406-425.
- 701 Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed.
702 New York - USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1886 pp.
- 703 Siqueira, K. M. S. 2007. Importância de *Pratylenchus brachyurus* na cultura do caupi e estudos
704 morfológicos e morfométricos sobre populações de *P. brachyurus* do Brasil. Available from: <

- 705 <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde-09052007->
706 [171333/publico/KercyaSiqueira.pdf](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde-09052007-171333/publico/KercyaSiqueira.pdf) > [15 Oct 2018].
- 707 Siqueira, K. M. S., Inomoto, M. M. 2008. Pathogenicity and reproductive fitness of
708 *Pratylenchus brachyurus* on cowpea. *Nematology* 10: 495-500.
- 709 Scott, A. J., Knott, M. A. 1974. A cluster analysis method for grouping means in the analysis
710 of variance. *Biometrics* 30: 507-512.
- 711 Shapiro, S. S., Wilk, M. B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples).
712 *Biometrika* 52: 591–611.
- 713 Subbotin, S. A., Ragsdale, E. J., Mullens, T., Roberts, P. A., Mundo-Ocampo, M., Baldwin, J.
714 G. 2008. A phylogenetic framework for root lesion nematodes of the genus *Pratylenchus*
715 (Nematoda): Evidence from 18S and D2–D3 expansion segments of 28S ribosomal RNA genes
716 and morphological characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 491–505.
- 717 Tarjan, A. C., Frederick, J. J. 1978. Intraspecific morphological variation among populations
718 of *Pratylenchus brachyurus* and *P. penetrans*, *Journal of Nematology* 10: 152–160.
- 719 Tarte, R., Mai, W. F. 1976. Sex expression and tail morphology of female progenies of smooth-
720 tail and crenate-tail females of *Pratylenchus penetrans*. *Journal of Nematology* 8: 196-200.
- 721 Townshend, J. L. 1991. Morphological observations of *Pratylenchus penetrans* from celery and
722 strawberry in southern Ontario. *Journal of Nematology* 23: 205-209.
- 723 Troccoli, A., Lamberti, F., Costilla, M. A. 1996. Note morfo-biometriche su *Pratylenchus zaeae*
724 Graham, 1951. *Nematologia Mediterrânea* 24: 43- 47.
- 725 Villain, L., Baujard, P., Molina, A., Pignolet, L., Sarah, J. L. 1998. Morphological and
726 biological characterization of three *Pratylenchus* sp. populations parasitising coffee trees in
727 Guatemala. *Nematologica* 44: 600-601.
- 728 Wang, H., Zhuo, K., Ye, W., Lião, J. Morphological and molecular characterization of
729 *Pratylenchus parazeae* n. sp. (Nematoda: Pratylenchidae) parasitizing sugarcane in China.
730 2015. *European Journal Plant Pathology* 143: 173–191.

- 731 Williams, B. D., Schrank, B., Huynh, C., Shownkeen, R., Waterston, R. H. 1992. A genetic
732 mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites.
733 *Genetics* 131: 609-624.
- 734 Wilcken, S. R. S., Inomoto, M. M., Ferraz, L. C. C. B., Oliveira, C. M. G. 2002. Morphometry
735 of *Pratylenchus* populations from coffee, banana, ornamental plant and citrus in Brazil.
736 *Nematology* 4: 248-248.
- 737 Zhang, L., Foxman, B., Manning, S. D., Tallman, P., Marrs, C. F. 2000. Molecular
738 epidemiologic approaches to urinary tract infection gene discovery in uropathogenic
739 *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 68: 2009- 2015.
- 740 Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA
741 sequences. *Journal of Computational Biology* 7: 203-14.
- 742

743 **Legenda das figuras**

744 **Figura 1.** Locais onde foram coletadas as populações de *Pratylenchus zeae* estudadas. Fonte:
745 Google Maps.

746

747 **Figura 2.** Região anterior de fêmeas de *Pratylenchus zeae*. Setas contínuas evidenciam a região
748 labial não separada do corpo e as setas descontínuas, os bulbos basais do estilete bem
749 desenvolvidos e achatados. Barras correspondem a 5 μm .

750

751 **Figura 3:** Fêmeas de *Pratylenchus zeae* evidenciando a sobreposição ventral das glândulas
752 esofagianas sobre o intestino (a) e a posição anterior da vulva (b). Barras correspondem a 50
753 μm .

754

755 **Figura 4:** Morfologia da cauda de *Pratylenchus zeae*, evidenciando a variação do término da
756 cauda de fêmeas. Barras correspondem a 5 μm .

757

758 **Figura 5:** Dendograma ilustrativo da dissimilaridade entre as populações de *Pratylenchus zeae*
759 coletadas em cinco áreas de cada usina de cana-de-açúcar amostrada na região Nordeste, Brasil:
760 Usina Baía Formosa, RN (BF 1-5), Usina Estivas, RN (ES 1-5), Usina Japungu, PB (JP 1-5),
761 Usina Miriri, PB (MR 1-5), Usina Olho D'Água, PE (OD 1-5) e Usina São José, PE (SJ 1-5),
762 baseado em distância Euclidiana, calculado a partir da média das variáveis morfométricas
763 mensuradas.

764

765 **Figura 6:** Dendograma ilustrativo da dissimilaridade entre as populações de *Pratylenchus zeae*
766 coletadas em cinco áreas de cada usina de cana-de-açúcar amostrada na região Nordeste, Brasil:
767 Usina Baía Formosa, RN (BF 1-5), Usina Estivas, RN (ES 1-5), Usina Japungu, PB (JP 1-5),
768 Usina Miriri, PB (MR 1-5), Usina Olho D'Água, PE (OD 1-5) e Usina São José, PE (SJ 1-5),

769 baseado em distância Euclidiana, calculado a partir da média das variáveis morfométricas
770 mensuradas e da análise física do solo (argila, silte e areia).

771

772 **Figura 7:** Dendograma ilustrativo da dissimilaridade entre as populações de *Pratylenchus zae*
773 coletadas em cinco áreas de cada usina de cana-de-açúcar amostrada na região Nordeste: Usina
774 Baía Formosa, RN (BF 1-5), Usina Estivas, RN (ES 1-5), Usina Japungu, PB (JP 1-5), Usina
775 Miriri, PB (MR 1-5), Usina Olho D'Água, PE (OD 1-5) e Usina São José, PE (SJ 1-5), baseado
776 em distância Euclidiana, calculado a partir da média das variáveis morfométricas mensuradas
777 e da análise química do solo (P, C, pH, H+AL, Ca, Mg, K, SB, T e V%).

778

779 **Figura 8:** Amplificação do fragmento de DNA (750 pb) de fêmeas de *Pratylenchus zae*
780 coletadas em usinas de cana-de-açúcar da região Nordeste: Usina Miriri, PB (MR), Usina
781 Japungu, PB (JP), Usina Baía Formosa, RN (BF), Usina Estivas, RN (ES), Usina Olho D'Água,
782 PE (OD) e Usina São José, PE (SJ), utilizando o conjunto de *primers* D2/D3 do gene 28S rDNA.
783 1kb é o marcador molecular.

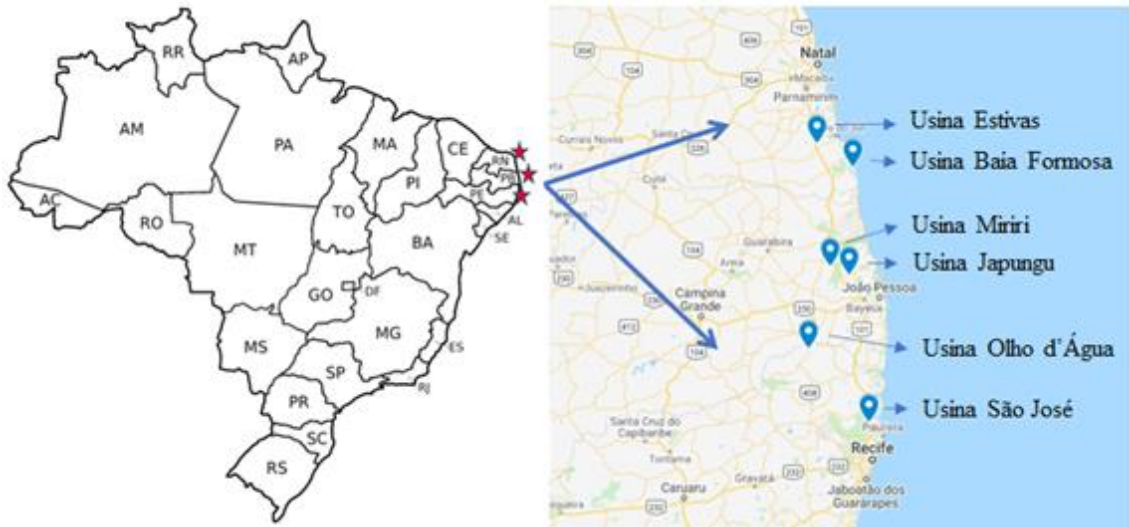
784

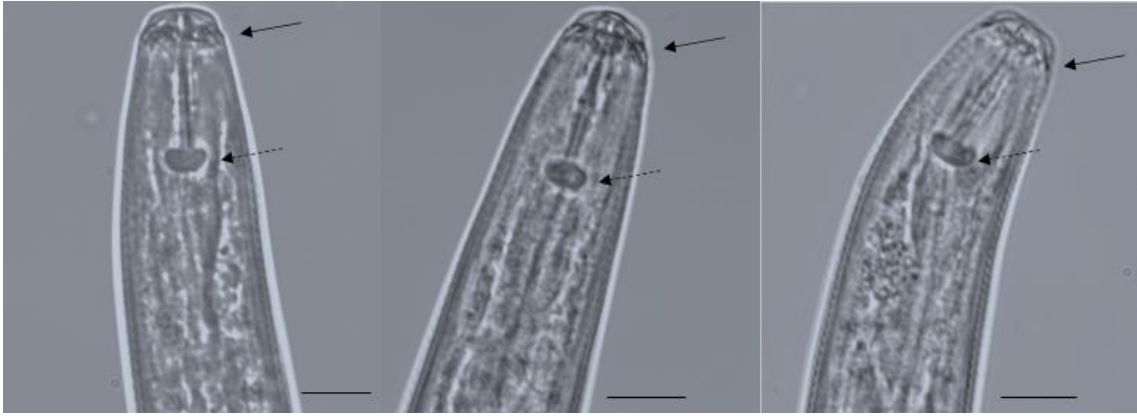
785 **Figura 9:** Árvore filogenética obtida pelo método de *Neighbor-Joining* resultante do
786 alinhamento das sequências da região D2/D3 do rDNA das 30 populações de *Pratylenchus zae*
787 coletadas em usinas de cana-de-açúcar da região Nordeste, Brasil: Usina Baía Formosa, RN
788 (BF), Usina Estivas, RN (ES), Usina Japungu, PB (JP), Usina Miriri, PB (MR), Usina Olho
789 D'Água, PE (OD) e Usina São José, PE (SJ). *Bursaphelenchus xylophilus* foi utilizado como
790 *outgroup*. Os valores de *bootstrap* estão indicados próximos aos ramos da árvore.

791

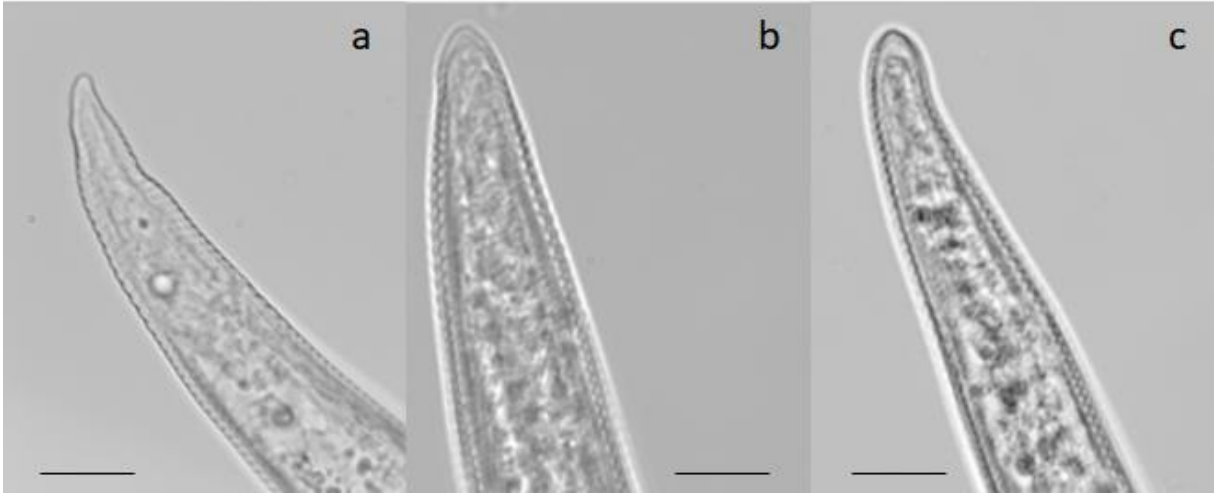
792 **Figura 10:** Árvore filogenética obtida pelo método de *Neighbor-Joining* resultante do
793 alinhamento das sequências da região D2/D3 do rDNA das 30 populações de *Pratylenchus zae*
794 coletadas em usinas de cana-de-açúcar da região Nordeste, Brasil: Usina Baía Formosa, RN

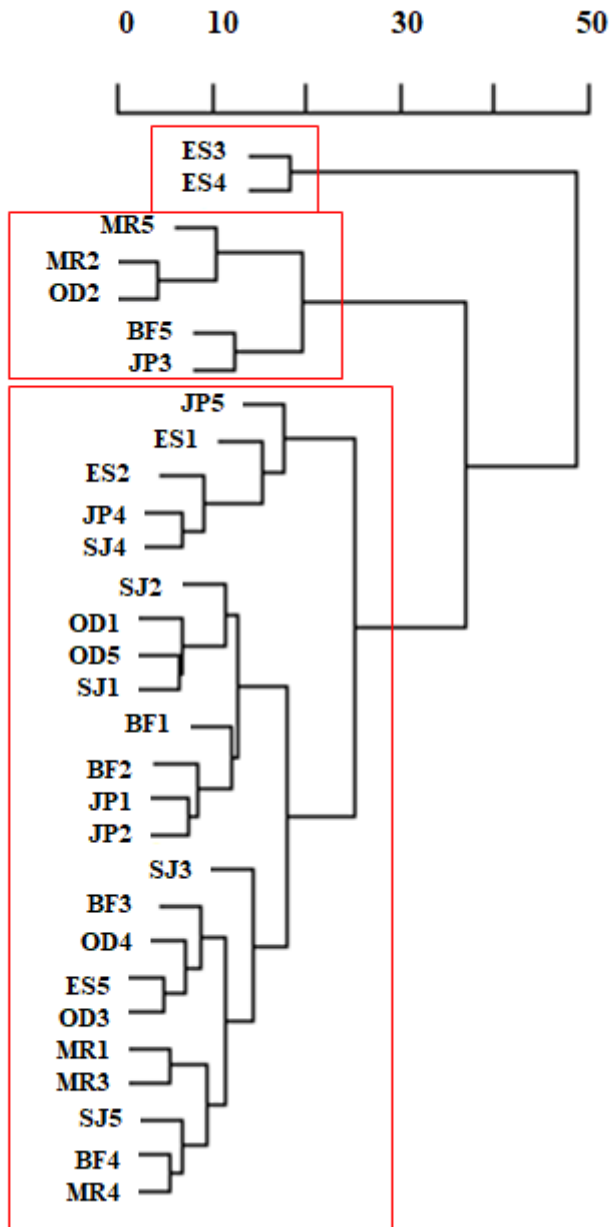
795 (BF), Usina Estivas, RN (ES), Usina Japungu, PB (JP), Usina Miriri, PB (MR), Usina Olho
796 D'Água, PE (OD) e Usina São José, PE (SJ), com sequências de *P. zea* depositadas no
797 GeneBank. Os valores de *bootstrap* estão indicados próximos aos ramos da árvore.

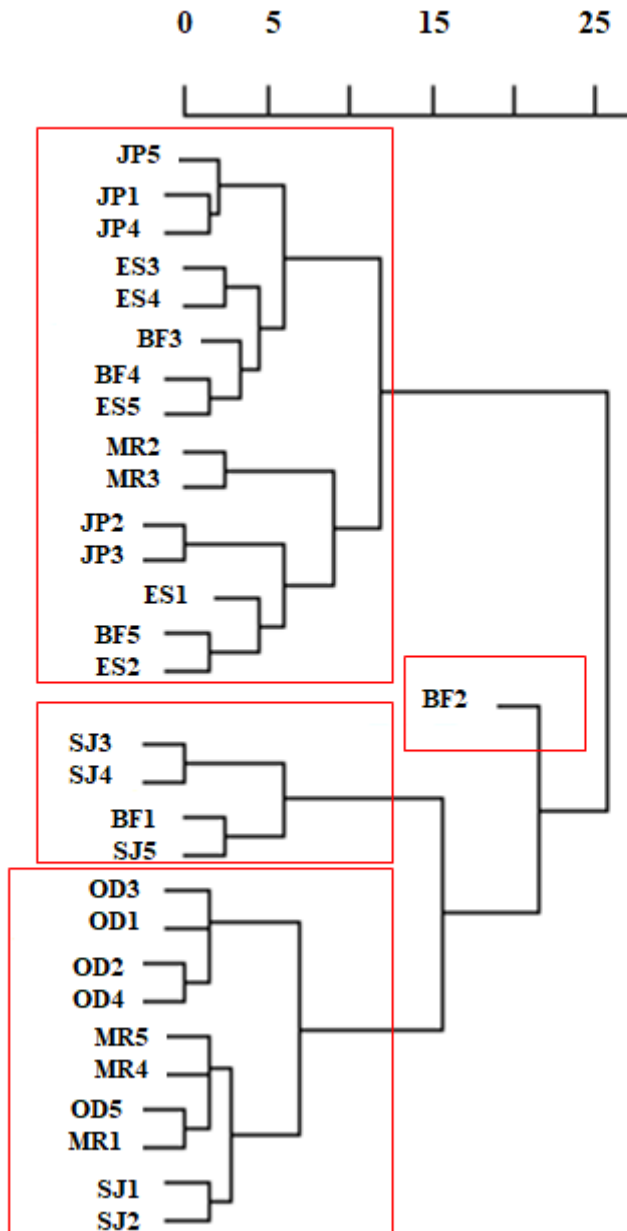


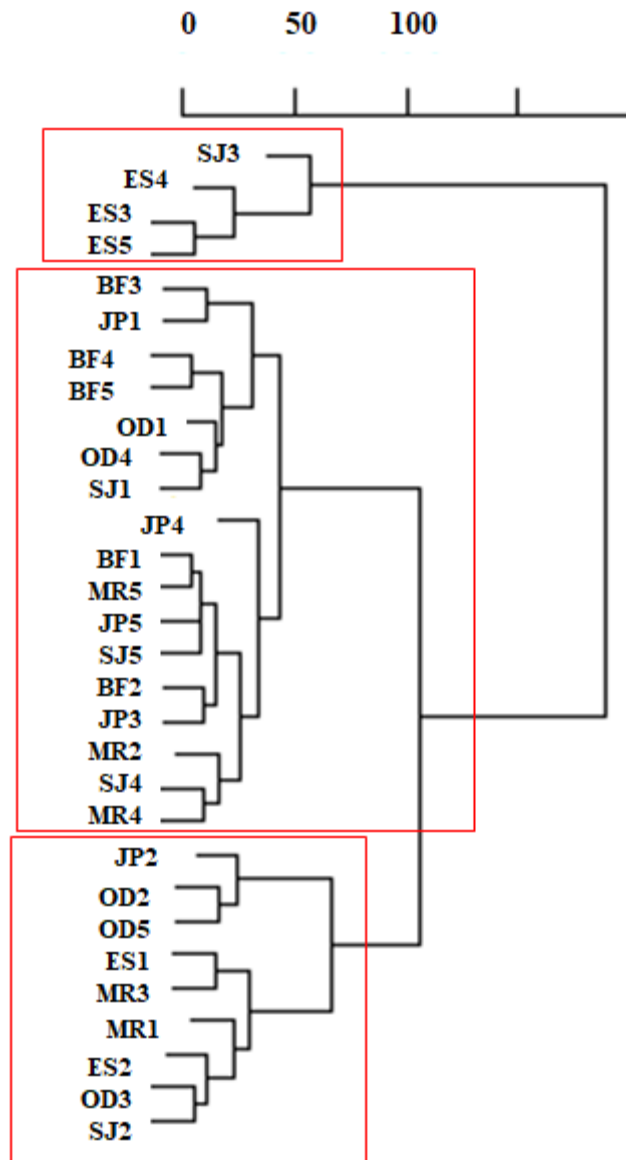


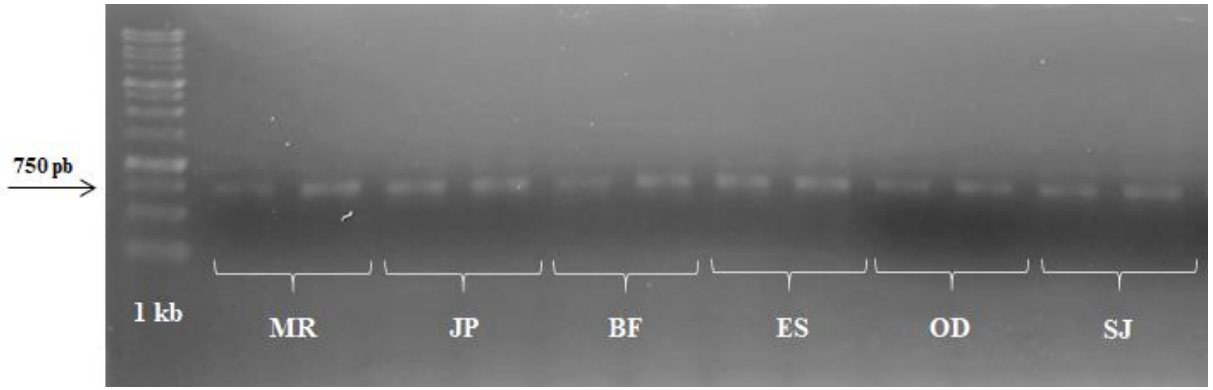


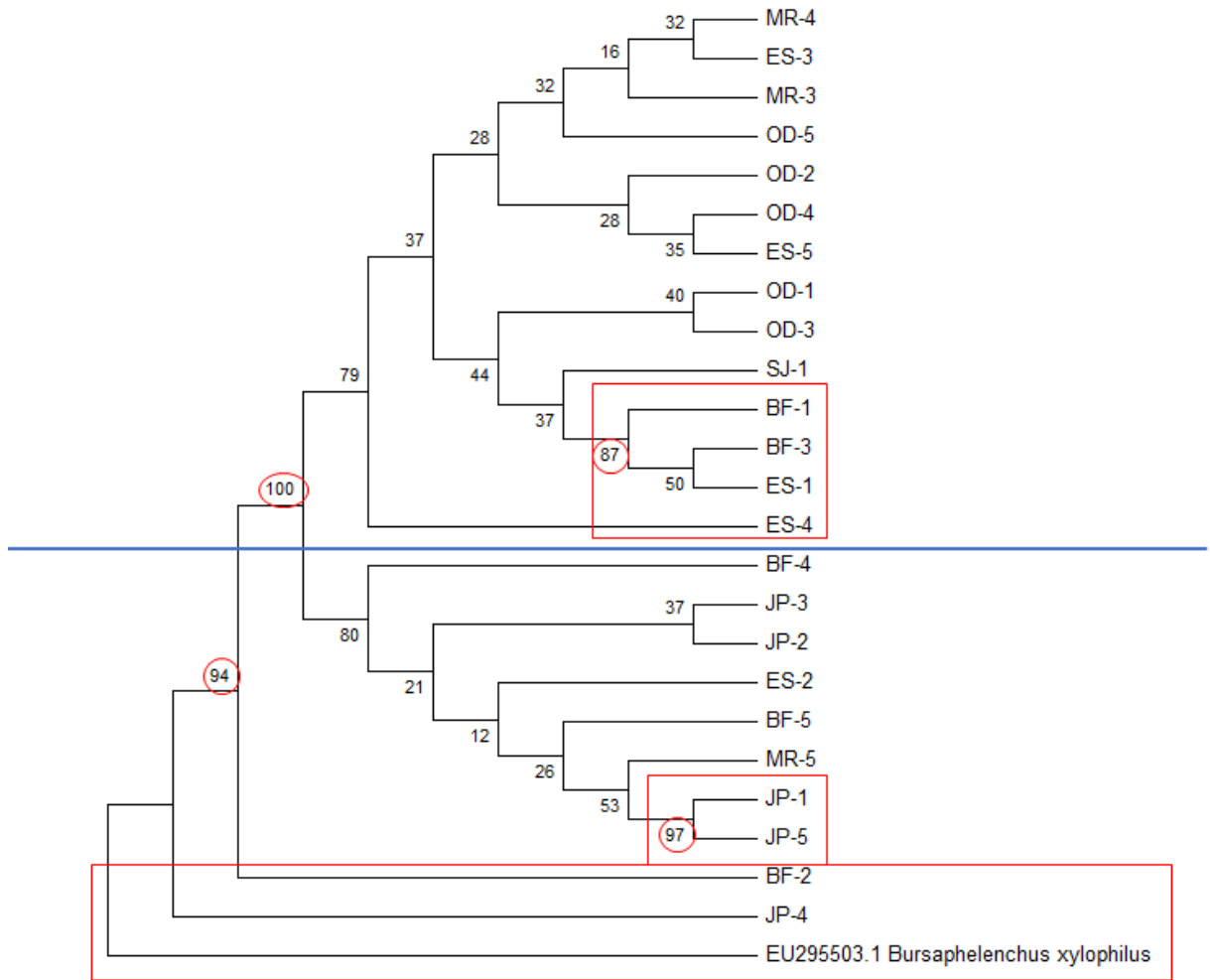


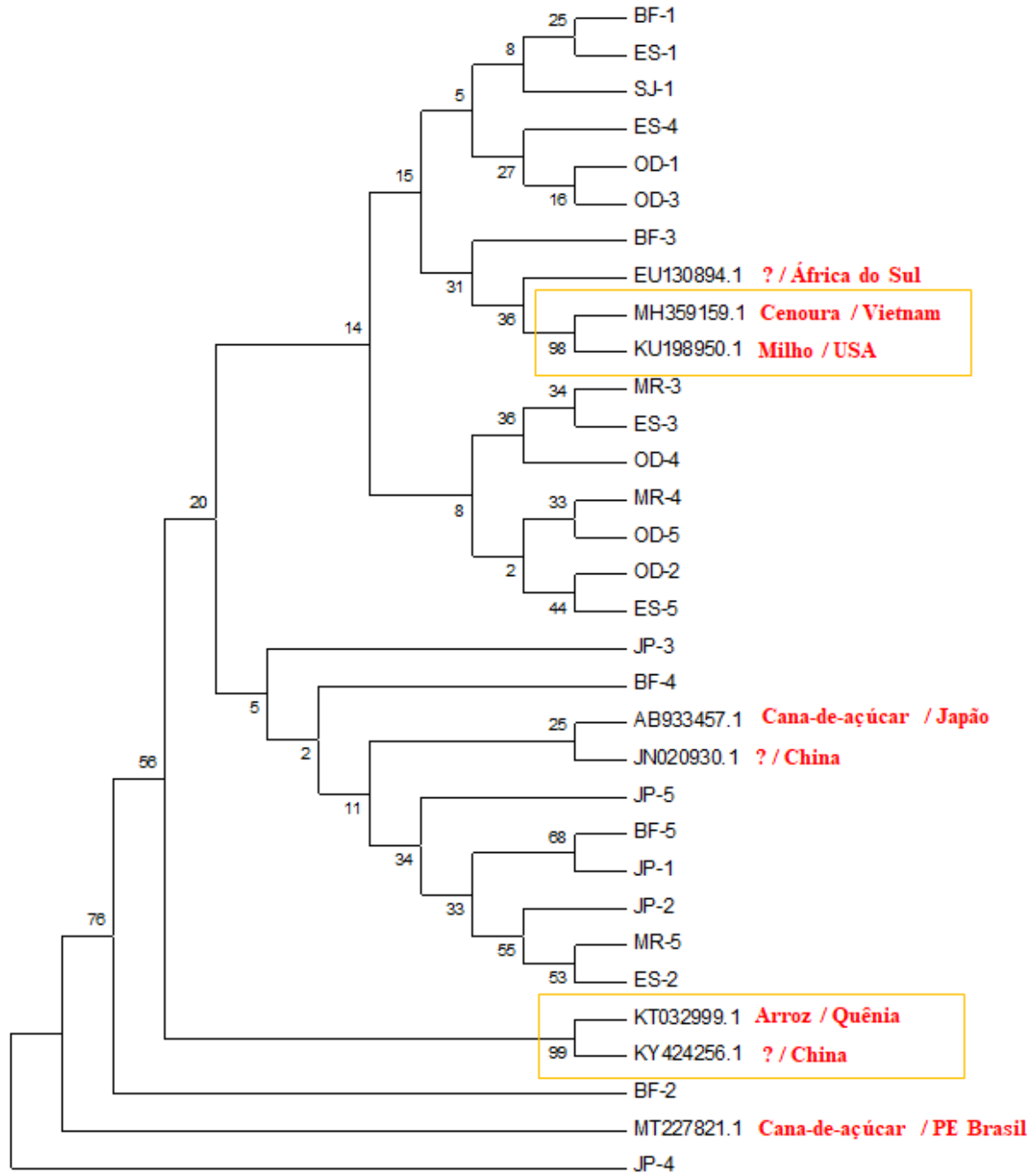












Lista de tabelas

Tabela 1. Identificação e coordenadas geográficas das populações de *Pratylenchus zeae* obtidos de solo e raízes de cana-de-açúcar.

Usina/Estado	Área/Identificação das Populações	Coordenadas
Baia Formosa-RN	BF1	6° 28' 22" S / 35° 2' 7" W
	BF2	6° 29' 23" S / 35° 8' 44" W
	BF3	6° 29' 0" S / 35° 1' 59" W
	BF4	6° 27' 6" S / 35° 4' 21" W
	BF5	6° 24' 54" S / 35° 2' 29" W
Estivas-RN	ES1	6° 13' 37" S / 35° 12' 55" W
	ES2	6° 13' 37" S / 35° 12' 55" W
	ES3	6° 13' 37" S / 35° 12' 55" W
	ES4	6° 12' 56" S / 35° 12' 47" W
	ES5	6° 12' 56" S / 35° 12' 43" W
Japungu- PB	JP1	6° 52' 20" S / 34° 59' 57" W
	JP2	6° 52' 17" S / 35° 0' 4" W
	JP3	6° 51' 18" S / 35° 0' 33" W
	JP4	6° 52' 57" S / 35° 5' 21" W
	JP5	6° 52' 56" S / 35° 5' 25" W
Miriri- PB	MR1	6° 52' 24" S / 34° 58' 11" W
	MR2	6° 51' 25" S / 34° 58' 13" W
	MR3	6° 51' 24" S / 34° 58' 27" W
	MR4	6° 51' 24" S / 34° 58' 26" W
	MR5	6° 51' 5" S / 34° 58' 37" W
Olho D'água- PE	OD1	7° 15' 27" S / 35° 6' 43" W
	OD2	7° 15' 26" S / 35° 6' 50" W
	OD3	7° 15' 27" S / 35° 6' 47" W
	OD4	7° 15' 25" S / 35° 7' 9" W
	OD5	7° 15' 26" S / 35° 7' 7" W
São José- PE	SJ1	7° 47' 55" S / 35° 0' 48" W
	SJ2	7° 45' 54" S / 34° 59' 32" W
	SJ3	7° 44' 35" S / 35° 1' 18" W
	SJ4	7° 49' 31" S / 34° 59' 40" W
	SJ5	7° 52' 21" S / 35° 1' 54" W

Tabela 2: Caracteres morfométricos de populações de *Pratylenchus zeae* coletadas em cinco áreas de cada usina de cana-de-açúcar amostrada na região Nordeste, Brasil: Usina Baía Formosa, RN (BF 1-5), Usina Estivas, RN (ES 1-5), Usina Japungu, PB (JP 1-5), Usina Miriri, PB (MR 1-5), Usina Olho D'Água, PE (OD 1-5) e Usina São José, PE (SJ 1-5). As mensurações estão representadas pela média, em micrômetros, e desvio padrão (entre parêntesis).

População	L	OC	OV	OA	v	St	øbst	Abst	DGO	Po	F	v-a	T	PUB
BF1	463,50 b	17,42 a	17,42 a	11,36 a	133,08 b	13,23 a	3,73 b	2,12 b	2,82 b	72,92 b	114,93 b	121,71 b	26,76 b	28,38 a
	± 36,14	± 1,86	± 2,51	± 1,33	± 16,23	± 0,74	±0,83	±0,32	±0,64	±4,70	±12,45	±15,78	±4,47	±11,89
BF2	466,00 b	16,16 b	16,66 b	10,86 b	132,82 b	13,73 a	3,93 b	2,32 a	2,22 b	75,14 a	114,93 b	121,97 b	29,18 a	20,30 a
	±37,47	±2,12	±2,12	±1,70	±14,54	±0,52	±0,32	±0,49	±0,42	±7,36	±12,97	±14,08	±5,37	±5,70
BF3	438,50 c	16,41 b	16,41 b	10,35 b	131,31 b	13,02 a	4,04 b	2,02 b	2,12 b	72,21 b	116,35 b	120,96 b	25,85 b	20,40 b
	±37,71	±1,33	±1,78	±0,79	±17,85	±1,38	±0,47	±0,00	±0,32	±3,66	±8,32	±17,91	±4,15	±8,31
BF4	453,50 b	16,66 b	16,66 b	10,60 b	132,06 b	13,33 a	3,93 b	2,72 a	2,82 b	73,12 b	118,17 b	121,46 b	25,95 b	17,06 b
	±25,71	±1,76	±1,76	±1,06	±6,41	±0,42	±0,31	±0,48	±0,79	±3,60	±13,14	±5,76	±7,49	±6,14
BF5	492,00 a	18,18 a	17,93 a	11,61 a	146,71 a	13,73 a	4,54 a	2,32 a	2,82 a	75,75 a	123,52 a	135,10 a	29,99 a	29,49 a
	±31,46	±1,99	±2,21	±1,30	±10,34	±0,52	±0,53	±0,48	±0,63	±5,77	±4,59	±9,46	±4,44	±8,48
ES1	431,00 c	16,66 b	16,16 b	11,11 b	122,72 c	13,53 a	4,04 b	2,22 b	3,03 a	67,46 b	112,11 b	111,61 c	24,84 b	17,77 b
	±33,61	±1,38	±1,38	±1,38	±4,58	±0,55	±0,00	±0,45	±0,00	±6,03	±8,26	±4,51	±4,98	±5,83
ES2	437,00 c	15,65 b	15,40 b	10,35 b	127,77 b	13,33 a	4,04 b	2,32 a	3,03 a	76,55 a	118,17 b	117,42 b	24,84 b	11,61 c
	±27,20	±1,59	±0,79	±0,79	±5,73	±0,42	±0,00	±0,48	±4,68	±3,52	±6,02	±5,61	±3,33	±1,28
ES3	419,30 d	15,15 b	15,15 b	10,82 b	121,57 c	13,13 a	4,32 a	2,16 b	2,88 b	74,45 a	109,08 b	110,75 c	24,09 b	14,71 c
	±35,52	±2,06	±2,06	±1,23	±10,45	±1,92	±0,49	±0,38	±0,38	±3,62	±7,37	±9,60	±2,76	±4,97
ES4	408,50 d	15,40 b	14,89 b	10,35 b	115,15 c	13,43 a	4,14 b	2,02 b	3,03 a	74,53 a	120,89 a	104,80 c	24,03 b	16,05 b
	±33,08	±1,43	±1,43	±0,79	±10,79	±0,48	±0,31	±0,00	±4,68	±4,89	±4,92	±10,59	±2,37	±4,13
ES5	446,50 c	15,65 b	15,65 b	10,60 b	131,31 b	13,23 a	4,34 a	2,02 b	3,03 a	73,93 a	115,84 b	120,70 b	25,95 b	13,73 c
	±29,25	±1,06	±1,06	±1,06	±11,10	±0,31	±0,48	±0,00	±0,68	±4,53	±5,87	±11,40	±4,59	±5,04
JP1	461,00 b	16,92 b	16,66 b	11,87 a	135,35 a	13,33 a	4,34 a	2,32 a	2,92 b	72,82 b	116,75 b	123,48 b	30,50 a	17,47 b
	±29,98	±1,70	±1,76	±1,21	±12,72	±1,04	±0,48	±0,48	±0,74	±5,15	±12,90	±12,62	±3,83	±5,08
JP2	465,00 b	17,67 a	17,42 a	11,11 b	137,62 a	13,23 a	4,04 b	2,52 a	2,62 b	75,75 a	119,88 a	126,51 a	31,00 a	19,19 b
	±26,56	±1,68	±1,86	±1,76	±8,27	±0,74	±0,47	±0,53	±0,70	±3,62	±6,91	±7,47	±4,54	±7,88
JP3	488,00 a	17,93 a	17,42 a	11,36 a	144,44 a	13,53 a	4,34 a	2,32 a	2,12 b	69,89 b	116,45 b	133,08 a	32,42 a	23,43 a
	±28,00	±1,86	±0,79	±1,33	±14,27	±0,52	±0,48	±0,48	±0,31	±3,80	±5,92	±13,67	±3,93	±6,86

JP4	435,00 c ±25,49	16,66 b ±1,38	16,16 b ±1,38	11,61 a ±1,38	130,30 b ±6,58	13,33 a ±0,45	3,33 b ±0,45	2,22 b ±0,45	2,22 b ±0,45	72,11 b ±7,23	122,21 a ±13,81	118,68 b ±5,92	23,63 b ±3,24	17,77 b ±2,82
JP5	435,00 c ±19,92	15,90 b ±2,67	15,65 b ±1,06	10,10 b ±0,00	122,47 c ±9,83	13,13 a ±0,47	4,04 b ±0,00	2,12 b ±0,31	2,12 b ±0,31	71,71 b ±3,49	127,15 a ±8,82	112,37 c ±9,83	23,23 b ±2,56	24,84 a ±7,96
MR1	449,50 c ±26,18	17,42 a ±1,43	16,92 a ±1,21	11,87 a ±1,21	128,28 b ±11,95	13,23 a ±0,31	4,14 b ±0,31	2,32 a ±0,48	3,03 a ±4,68	72,41 b ±5,15	112,81 b ±13,36	116,41 b ±12,10	23,83 b ±4,10	16,16 b ±4,56
MR2	477,00 a ±35,05	18,68 a ±2,12	18,43 a ±2,07	11,87 a ±1,70	138,88 a ±11,90	13,33 a ±0,42	4,14 b ±0,31	2,02 b ±0,00	2,92 a ±0,31	74,03 a ±3,65	119,98 a ±6,41	127,01 a ±10,71	26,05 b ±3,11	18,68 b ±5,04
MR3	453,50 b ±18,26	17,42 a ±1,79	17,17 a ±1,59	11,61 a ±1,30	129,54 b ±5,71	13,13 a ±1,87	4,14 b ±0,31	2,02 b ±0,00	2,82 b ±0,42	71,81 b ±1,87	113,62 b ±6,96	117,93 b ±6,30	26,26 b ±2,93	15,65 b ±4,47
MR4	453,50 b ±21,73	18,18 a ±1,06	17,67 a ±1,19	11,11 b ±1,30	130,55 b ±8,07	13,23 a ±0,31	4,04 b ±0,00	2,12 b ±0,31	2,92 a ±0,31	75,54 a ±2,84	120,19 a ±6,40	119,44 b ±7,43	25,55 b ±2,81	15,15 c ±5,36
MR5	475,00 a ±26,56	19,95 a ±1,86	19,44 a ±2,07	12,37 a ±1,43	140,65 a ±11,04	13,43 a ±0,48	4,44 a ±0,52	2,22 b ±0,42	3,03 a ±4,68	73,42 a ±3,86	111,60 b ±6,46	128,28 a ±11,02	27,67 b ±2,94	17,37 b ±2,68
OD1	458,50 b ±21,08	17,17 b ±2,32	16,92 a ±1,70	11,11 b ±1,30	130,80 b ±10,56	13,23 a ±0,74	4,14 b ±0,31	2,02 b ±0,00	2,62 b ±0,52	71,20 b ±3,34	116,95 b ±12,34	119,69 b ±9,90	23,33 b ±2,71	17,97 b ±5,03
OD2	478,50 a ±38,88	18,43 b ±1,70	17,93 a ±1,43	10,85 b ±1,21	140,40 a ±13,63	13,73 a ±0,85	4,14 b ±0,88	2,22 b ±0,42	2,62 b ±0,52	72,92 b ±4,19	121,80 a ±8,34	129,54 a ±13,57	26,76 b ±2,74	19,39 b ±4,80
OD3	445,50 c ±27,73	16,66 b ±1,30	16,41 b ±1,33	10,60 b ±1,06	132,57 b ±9,97	13,43 a ±0,68	4,14 b ±0,31	2,42 a ±0,52	2,62 b ±0,52	72,41 b ±3,47	116,15 b ±9,71	121,96 b ±10,17	25,55 b ±3,65	17,27 c ±5,22
OD4	443,00 c ±23,11	16,41 b ±2,14	16,16 b ±1,76	10,10 b ±1,19	128,78 b ±11,35	13,43 a ±0,68	4,14 b ±0,31	2,12 b ±0,31	2,52 b ±0,53	73,02 b ±5,21	120,19 a ±13,08	118,68 b ±10,97	25,04 b ±4,61	16,76 c ±5,26
OD5	463,00 b ±20,57	18,18 a ±2,86	17,67 a ±1,68	11,36 a ±1,33	132,82 b ±6,20	13,43 a ±0,48	4,04 b ±0,00	2,02 b ±0,00	2,22 b ±0,42	73,02 b ±4,12	117,46 b ±8,20	121,46 b ±6,00	25,45 b ±3,83	15,04 c ±3,85
SJ1	463,00 b ±12,73	18,43 a ±1,70	17,17 a ±1,99	11,11 b ±1,30	129,54 b ±7,34	13,33 a ±0,42	4,04 b ±0,00	2,12 b ±0,31	2,82 b ±0,42	74,94 a ±4,09	115,44 b ±7,89	118,43 b ±6,88	23,83 b ±2,19	17,77 b ±4,97
SJ2	471,00 a ±20,78	19,44 a ±2,07	18,43 a ±1,70	12,12 a ±1,59	132,82 b ±5,48	13,23 a ±0,31	4,04 b ±0,00	2,12 b ±0,31	2,92 a ±0,31	74,43 a ±3,36	115,74 b ±13,19	120,70 b ±5,29	24,84 b ±2,48	13,23 c ±4,34
SJ3	456,00 b ±13,29	17,42 a ±1,86	17,67 a ±1,68	11,61 a ±1,30	127,77 b ±13,05	13,63 a ±0,53	4,14 b ±0,31	2,12 b ±0,31	3,03 a ±4,68	73,73 a ±3,62	125,64 a ±8,43	116,16 b ±12,82	25,95 b ±3,01	16,76 b ±5,87
SJ4	433,50 c ±20,28	16,92 b ±1,70	16,92 a ±1,21	10,85 b ±1,21	131,81 b ±5,02	13,73 a ±0,70	4,04 b ±0,00	2,22 b ±0,42	2,82 b ±0,42	73,83 a ±2,20	120,99 a ±7,43	120,95 b ±4,97	24,44 b ±2,00	12,22 c ±4,77
SJ5	450,50 c ±28,42	18,18 a ±1,06	17,42 a ±1,43	11,61 a ±1,30	134,84 a ±13,79	13,23 a ±0,31	4,04 b ±0,00	2,02 b ±0,00	2,52 b ±0,53	74,43 a ±3,95	118,67 a ±7,04	123,23 b ±13,19	23,93 b ±3,68	15,45 c ±8,98

(L)-comprimento do corpo; (ØC)-maior diâmetro do corpo; (ØV)-diâmetro do corpo na altura da vulva; (ØA)-diâmetro do corpo na altura do ânus;

(St)-comprimento do estilete; (ØbSt)-diâmetro dos bulbos do estilete; (AbSt)-altura dos bulbos do estilete; (DGO)-distância entre a abertura da

glândula esofagiana dorsal e a base do estilete; (Po)-distância da extremidade anterior do corpo à junção esôfago-intestino; (F)-comprimento do esôfago; (v-a)-distância entre a vulva e a cauda; (T)-comprimento da cauda; (PUB)-comprimento do saco pós-uterino. Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

Tabela 3: Resultado da análise de variância (ANOVA) dos caracteres morfométricos das populações de *Pratylenchus zae* coletadas nas usinas de cana-de-açúcar dos estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte.

Variáveis	Df	SSQ	MSQ	F value	p-value
L	29	99416	3428.2	4.4509	< 0,0001
ØC	29	383.80	13.2346	4.0675	< 0,0001
ØV	29	1.0175	0.035085	3.7259	< 0,0001
ØA	29	0.8121	0.028004	2.1756	< 0,0001
V	29	0.68886	0.0237538	3.4538	< 0,0001
St	29	0.06202	0.0021385	1.1065	< 0,3289
ØBst	29	7.884	0.27185	1.737	< 0,01
Abst	29	8.296	0.28605	2.1735	< 0,0001
DGO	29	5.398	0.186138	4.0485	< 0,0001
Po	29	816.4	28.151	1.5426	< 0,01
F	29	4373.2	150.799	1.7371	< 0,01
v-a	29	10914	376.34	3.3485	< 0,0001
T	29	1613.9	55.652	3.8584	< 0,0001
PUB	29	12.844	0.44288	4.5356	< 0,0001
a	29	0.5771	0.0198999	2.0823	< 0,001
b	29	12.158	0.41923	2.532	< 0,0001
c	29	1.4486	0.049950	2.1742	< 0,0001
c'	29	13.356	0.46054	3.3607	< 0,0001
V%	29	124.30	4.2861	1.3996	< 0,0903

(L)-comprimento do corpo; (ØC)-maior diâmetro do corpo; (ØV)-diâmetro do corpo na altura da vulva; (ØA)-diâmetro do corpo na altura do ânus; (St)-comprimento do estilete; (Øbst)-diâmetro dos bulbos do estilete; (Abst)-altura dos bulbos do estilete; (DGO)-distância entre a abertura da glândula esofagiana dorsal e a base do estilete; (Po)-distância da extremidade anterior do corpo à junção esôfago-intestino; (F)-comprimento do esôfago; (v-a)-distância entre a vulva e a cauda; (T)-comprimento da cauda; (PUB)-comprimento do saco pós-uterino e os índices de De Man: a (relação entre comprimento do corpo e maior largura do corpo); b (relação entre comprimento do corpo e distância entre a extremidade anterior e a junção esôfago-intestino); c (relação entre comprimento do corpo e comprimento da cauda); c' (relação entre comprimento da cauda e diâmetro da cauda na altura do ânus) e V% (relação percentual entre a distância da extremidade anterior até a vulva em relação ao comprimento do corpo da fêmea). Df é o grau de liberdade, SSQ é a soma dos quadrados, MSQ é o quadrado médio e P>F (p-value) é o nível de significância pelo teste F.

Tabela 4: Índices demanianos e desvio padrão (entre parêntesis) calculados a partir dos caracteres morfométricos de populações de *Pratylenchus zae* coletadas em cinco áreas de cada usina de cana-de-açúcar amostrada na região Nordeste, Brasil: Usina Baía Formosa, RN (BF 1-5), Usina Estivas, RN (ES 1-5), Usina Japungu, PB (JP 1-5), Usina Miriri, PB (MR 1-5), Usina Olho D'Água, PE (OD 1-5) e Usina São José, PE (SJ 1-5).

População	a	b	c	c'	V%
BF1	26,71 a (±1,83)	4,08 a (±0,58)	17,82 a (±3,73)	2,37 c (±0,43)	71,27 a (±2,82)
BF2	29,14 a (±3,41)	4,09 a (±0,49)	16,35 a (±2,66)	2,71 a (±0,43)	71,50 a (±1,83)
BF3	26,78 a (±2,23)	3,77 b (±0,32)	17,22 a (±2,26)	2,51 b (±0,45)	70,10 b (±2,49)
BF4	27,35 a (±1,78)	3,88 a (±0,53)	19,05 a (±6,58)	2,43 b (±0,58)	70,84 b (±0,98)
BF5	26,05 b (±1,53)	3,83 a (±0,34)	16,12 a (±2,85)	2,62 b (±0,56)	70,17 b (±1,35)
ES1	26,01 b (±3,00)	3,85 a (±0,38)	17,77 a (±2,94)	2,24 c (±0,37)	71,39 a (±2,38)
ES2	28,07 a (±2,25)	3,70 b (±0,27)	17,93 a (±3,16)	2,41 b (±0,37)	70,69 b (±1,64)
ES3	27,88 a (±2,27)	3,86 a (±0,44)	17,57 a (±2,29)	2,24 c (±0,31)	70,99 a (±0,80)
ES4	26,77 a (±3,85)	3,37 b (±0,23)	17,08 a (±1,67)	2,33 c (±0,29)	71,79 a (±1,75)
ES5	28,57 a (±1,87)	3,86 a (±0,34)	17,55 a (±2,29)	2,46 b (±0,46)	70,59 b (±1,40)
JP1	27,47 a (±3,12)	4,00 a (±0,57)	15,32 a (±2,01)	2,58 b (±0,33)	70,66 b (±1,61)
JP2	26,45 b (±2,21)	3,89 a (±0,36)	15,26 a (±2,16)	2,83 a (±0,46)	70,38 b (±1,80)
JP3	27,43 a (±2,67)	4,20 a (±0,40)	15,25 a (±1,99)	2,88 a (±0,44)	70,44 b (±1,61)
JP4	26,15 b (±1,05)	3,58 b (±0,26)	18,57 a (±1,61)	2,03 c (±0,14)	70,02 b (±1,01)
JP5	28,10 a (±5,17)	3,44 b (±0,31)	19,00 a (±2,63)	2,30 c (±0,25)	71,90 a (±1,31)
MR1	25,90 b (±1,85)	4,02 a (±0,37)	19,41 a (±4,08)	2,01 c (±0,30)	71,48 a (±1,66)
MR2	25,65 b (±1,47)	3,98 a (±0,38)	18,46 a (±1,89)	2,21 c (±0,22)	70,89 b (±0,96)

MR3	26,07 b (±1,44)	4,00 a (±0,34)	17,43 a (±1,77)	2,28 c (±0,32)	71,42 a (±1,03)
MR4	24,98 b (±1,27)	3,78 b (±0,30)	17,92 a (±1,97)	2,31 c (±0,27)	71,21 a (±1,17)
MR5	23,95 b (±2,06)	4,27 a (±0,39)	17,28 a (±1,49)	2,25 c (±0,29)	70,40 b (±1,14)
OD1	27,00 a (±2,60)	3,96 a (±0,51)	19,82 a (±1,89)	2,11 c (±0,25)	71,49 a (±1,29)
OD2	26,04 b (±2,37)	3,93 a (±0,36)	17,96 a (±1,66)	2,47 b (±0,23)	70,53 b (±2,96)
OD3	26,84 a (±2,22)	3,85 a (±0,36)	17,80 a (±3,04)	2,41 b (±0,31)	70,16 b (±2,57)
OD4	27,30 a (±2,94)	3,72 b (±0,46)	18,12 a (±2,81)	2,50 b (±0,50)	70,92 b (±2,11)
OD5	25,99 b (±3,80)	3,95 a (±0,29)	18,51 a (±2,57)	2,25 c (±0,30)	71,30 a (±0,89)
SJ1	25,28 b (±2,10)	4,03 a (±0,33)	19,57 a (±1,84)	2,16 c (±0,27)	72,02 a (±1,41)
SJ2	24,41 b (±2,18)	4,12 a (±0,59)	19,18 a (±2,68)	2,07 c (±0,31)	71,77 a (±1,17)
SJ3	26,45 b (±3,09)	3,64 b (±0,22)	17,77 a (±2,02)	2,25 c (±0,32)	71,97 a (±2,74)
SJ4	25,79 b (±2,18)	3,59 b (±0,30)	17,82 a (±1,33)	2,27 c (±0,29)	69,54 b (±1,70)
SJ5	24,82 b (±1,67)	3,80 b (±0,20)	19,42 a (±4,63)	2,08 c (±0,39)	70,09 b (±2,11)

Índices de De Man: a (relação entre comprimento do corpo e maior largura do corpo); b (relação entre comprimento do corpo e distância entre a extremidade anterior e a junção esôfago-intestino); c (relação entre comprimento do corpo e comprimento da cauda); c' (relação entre comprimento da cauda e diâmetro da cauda na altura do ânus) e V% (relação percentual entre a distância da extremidade anterior até a vulva em relação ao comprimento do corpo da fêmea). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

Tabela 5: Análise física de solo em cinco áreas de cada usina de cana-de-açúcar amostrada na região Nordeste, Brasil: Usina Baía Formosa, RN (BF1-5), Usina Estivas, RN (ES1-5), Usina Japungu, PB (JP1-5), Usina Miriri, PB (MR1-5), Usina Olho D'Água, PE (OD1-5) e Usina São José, PE (SJ1-5).

Amostra/Área	Argila (%)	Silte (%)	Areia (%)
BF1	57	24	19
BF2	74	15	11
BF3	43	6	51
BF4	45	6	49
BF5	50	7	43
JP1	42	8	50
JP2	47	10	43
JP3	47	10	43
JP4	41	9	50
JP5	40	10	50
OD1	66	8	26
OD2	65	9	26
OD3	65	8	27
OD4	65	9	26
OD5	59	10	31
ES1	54	6	40
ES2	51	7	42
ES3	48	5	47
ES4	47	7	46
ES5	45	7	48
SJ1	61	11	28
SJ2	60	11	29
SJ3	57	20	23
SJ4	57	20	23
SJ5	59	23	18
MR1	59	10	31
MR2	56	9	35
MR3	54	10	36
MR4	60	9	31
MR5	60	10	30

Tabela 6: Análise química de solos coletados em cinco áreas de cada usina de cana-de-açúcar amostrada na região Nordeste, Brasil: Usina Baía Formosa, RN (BF1-5), Usina Estivas, RN (ES1-5), Usina Japungu, PB (JP1-5), Usina Miriri, PB (MR1-5), Usina Olho D'Água, PE (OD1-5) e Usina São José, PE (SJ1-5).

Amostra	Mg/ dm ³	g/ dm ³	pH	cmol _c / dm ³ de solo						V (%)
	P	C		H+AL	Ca	Mg	K	SB	T	
BF1	8,6	13,8	4,0	6,2	1,2	0,4	0,2	2,2	6,8	32,8
BF2	21,6	8,9	4,7	3,6	1,2	0,3	0,2	1,8	5,5	33,3
BF3	73,4	7,2	5,3	2,7	1,7	0,6	0,1	2,5	5,2	48,1
BF4	42,6	10,3	4,5	3,9	1,0	0,4	0,3	1,7	5,7	30,7
BF5	46,6	9,4	4,4	3,6	0,9	0,2	0,2	1,5	5,1	28,9
JP1	75,2	7,9	5	3,1	1,6	0,2	0,1	1,9	5,1	38,3
JP2	190,2	11,7	5,1	3,6	3,1	0,4	0,2	3,7	7,4	50,5
JP3	21,4	7,7	4,2	3,9	0,8	0,2	0,1	1,2	5,1	23,5
JP4	5,9	8,0	4,2	3,6	0,7	0,1	0,2	1,1	4,8	4,2
JP5	8,1	8,0	4,2	3,6	0,8	0,2	0,2	1,2	4,9	25,3
OD1	53,5	8,7	5,1	2,9	1,8	0,4	0,1	2,3	5,3	44,8
OD2	165,5	8,8	5,4	2,5	2,2	0,5	0,2	3,0	5,5	54,3
OD3	102,8	10,1	5,4	2,9	2,2	0,6	0,1	3,0	6,0	51,2
OD4	40,2	9,2	5,0	3,4	2,3	0,8	0,1	3,3	6,7	49,3
OD5	173,2	9,0	5,8	2,1	3,7	0,6	0,2	4,6	6,8	68,2
ES1	129,7	11,2	5,6	2,5	3,1	1,1	0,3	4,6	7,1	64,6
ES2	92,3	10,9	5,5	2,7	2,0	0,8	0,3	3,1	5,9	53,7
ES3	248,6	11,5	5,8	2,5	3,4	1,1	0,3	4,9	7,5	66,1
ES4	223,8	16,9	5,8	2,7	3,6	1,2	0,4	5,2	8,0	65,9
ES5	244,7	14,6	6,1	2,5	3,5	1,3	0,2	5,1	7,6	66,7
SJ1	40,2	13,5	4,7	4,2	1,9	0,6	0,6	3,1	7,3	42,2
SJ2	101,8	13,1	5,0	3,9	2,6	0,6	0,3	3,6	7,6	47,9
SJ3	295,7	15,2	6,1	2,5	4,0	1,2	0,6	5,8	8,4	69,7
SJ4	16,9	17,2	4,8	4,9	2,6	1,0	0,3	4,0	9,0	44,8
SJ5	11,7	13,8	4,0	6,2	1,2	0,6	0,2	2,0	8,2	25,1
MR1	116,8	19,5	4,6	5,7	2,7	0,8	0,2	3,8	9,6	40,0
MR2	20,0	14,0	5,7	2,9	2,9	1,3	0,2	4,6	7,5	61,0
MR3	127,0	11,2	5,2	3,1	2,4	0,6	0,2	3,2	6,4	50,8
MR4	25,4	16,0	5,1	4,2	2,5	0,9	0,2	3,7	8,0	46,8
MR5	6,0	11,6	4,4	4,6	1,2	0,5	0,2	2,0	6,6	30,8

Fósforo (P); carbono (C); alumínio (Al); acidez potencial (H + Al); cálcio (Ca); magnésio (Mg); potássio (K); soma de bases (SB); capacidade de troca de cátions (T); saturação por bases (V).

CAPÍTULO 3

Controle biológico de *Pratylenchus zae* e *Meloidogyne incognita* na cultura do milho

1 **Controle biológico de *Pratylenchus zae* e *Meloidogyne incognita* na cultura do milho**

2

3 **Carmem Lúcia Pereira Abade¹, Lilian Margarete Paes Guimarães¹, Santino Aleandro**

4 **da Silva², Andressa Cristina Zamboni Machado^{2*}**

5

6 ¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Fitopatologia, CEP: 52171-

7 900, Recife, Pernambuco, Brazil; ²Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná,

8 IDR/EMATER, CEP: 86047-902, Londrina, Paraná, Brazil

9

10 *Autor para correspondência

11 E-mail: andressaczmachado@hotmail.com, andressa_machado@idr.pr.gov.br (ACZ Machado)

12 RESUMO

13 O manejo de nematoides com nematicidas biológicos vem ganhando destaque na agricultura
14 brasileira. Na cultura da soja, esta prática já é bastante comum, mas no milho, geralmente
15 cultivado como cultura de segunda safra, o controle de nematoides tem pequena adoção. O
16 objetivo desse trabalho, portanto, foi avaliar a eficiência de produtos biológicos, aplicados via
17 tratamento de sementes de milho, no controle de densidades populacionais crescentes de *P.*
18 *zeae* e *M. incognita*. Os experimentos foram realizados *in vitro* e em condições de casa de
19 vegetação. Os nematicidas biológicos testados foram: *Pochonia chlamydosporia* (Rizotec),
20 *Purpureocillium lilacinum* (Nemat) e *Bacillus firmus* (Votivo Prime). No teste *in vitro* foram
21 utilizados os mesmos nematicidas e a densidade populacional de 50 nematoides por repetição.
22 As densidades populacionais nos experimentos de casa de vegetação, foram 0 (testemunha),
23 2.000 e 6.000 nematoides por planta; As avaliações foram realizadas 24 e 48 horas, para os
24 testes *in vitro*, e aos 7 e 60 dias após inoculação (DAI), para avaliar a penetração e a
25 multiplicação dos nematoides, respectivamente. *Purpureocillium lilacinum* e *P.*
26 *chlamydosporia* causaram maior mortalidade de *P. zea* e *M. incognita*, tanto 24 quanto 48
27 horas nos testes *in vitro*. O tratamento com *P. chlamydosporia* proporcionou menor penetração
28 de *P. zea* na densidade de 6000 nematoides por planta, aos 7 DAI, enquanto para *M. incognita*,
29 menor penetração foi observada nos tratamentos com *P. lilacinum* e *P. chlamydosporia*. Aos
30 60 DAI, todos os nematicidas biológicos reduziram a população de *M. incognita* nas densidades
31 de 667 e 6.000 nematoides por planta, sendo que o tratamento com *B. firmus* apresentou, ainda,
32 o menor FR na densidade de 2.000. *B. firmus* foi o que apresentou melhor eficiência em reduzir
33 a multiplicação de *M. incognita* aos 60 DAI. O tratamento à base de *P. chlamydosporia*
34 apresentou menor valor de massa fresca de raiz, e a utilização dos diferentes nematicidas com
35 as densidades de inóculo reduziram a massa seca de parte aérea em relação a testemunha
36 absoluta.

37

38 **Palavras-chave:** *Zea mays*; fitonematoides; *Pochonia chlamydosporia*; *Purpureocillium*
39 *lilacinum*; *Bacillus firmus*; manejo.

40

41 **ABSTRACT**

42 Nematode management using biological nematicides has been gaining prominence in Brazilian
43 agriculture. In soybean crops, this practice is already common, but in maize, which usually is
44 cropped in the second season, nematode control has little adoption. Therefore, the objective of
45 this work was to evaluate the efficiency of biological nematicides, applied as seed treatment in
46 maize, in the control of different population densities of *P. zae* and *M. incognita*. Experiments
47 were conducted *in vitro* and conditions under greenhouse. Biological nematicides tested were
48 *Pochonia chlamydosporia* (Rizotec), *Purpureocillium lilacinum* (Nemat), and *Bacillus firmus*
49 (Votivo Prime). In *in vitro*, the same nematicides were tested with the population density of 50
50 nematodes per replicate. Population densities used in experiments under greenhouse were 0
51 (check), 2,000, and 6,000 nematodes per plant. Evaluations were done at 24 and 48 hours after
52 the contact of nematodes with the nematicides in *in vitro* tests, and at 7 and 60 days after
53 inoculation (DAI), to evaluate the penetration and the nematode multiplication, respectively.
54 *Purpureocillium lilacinum* and *P. chlamydosporia* caused higher mortality of *P. zae* and *M.*
55 *incognita*, both at 24 and 48 hours in the *in vitro* test. The treatment with *P. chlamydosporia*
56 allowed lower penetration of *P. zae* in the population density of 6,000 nematodes per plant, at
57 7 DAI, while for *M. incognita*, lower penetration was observed in the treatments with *P.*
58 *lilacinum* and *P. chlamydosporia*. At 60 DAI, all the biological nematicides tested reduced the
59 *M. incognita* population in the population densities of 667 and 6,000 nematodes per plant, in
60 which the treatment with *B. firmus* showed, yet, the lower value of RF in the density of 2,000.
61 *B. firmus* was the one that showed the best efficiency in reducing the multiplication of *M.*
62 *incognita* at 60 DAI. The treatment based on *P. chlamydosporia* showed lower value of fresh

63 root mass, and the use of different nematicides with inoculum densities reduced the dry mass
64 of the aerial part in relation to the absolute control.

65

66 **Key words:** *Zea mays*; phytonematodes; *Pochonia chlamydosporia*; *Purpureocillium*
67 *lilacinum*; *Bacillus firmus*; management.

68

69 1. Introdução

70 O milho, *Zea mays* L., é uma cultura que possui grande importância socioeconômica
71 (Lima 2018). Estados Unidos, China e Brasil são os principais produtores mundiais, enquanto
72 Estados Unidos, Brasil e Argentina, os maiores exportadores mundiais (USDA, 2020). Os
73 principais estados brasileiros produtores de milho são Mato Grosso, Paraná, Goiás, Mato
74 Grosso do Sul, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (CONAB, 2020) e o principal destino da
75 produção é para ração animal (Sologuren, 2015). Diversos fatores afetam sua produtividade,
76 dentre os quais se destacam as doenças causadas pelos fitonematoides, em que mais de 60
77 espécies foram relatadas na cultura em todo o mundo (Nicol et al., 2011). Dentre as espécies
78 encontradas no Brasil com relevância econômica estão *Pratylenchus brachyurus*, *P. zaeae*,
79 *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* (Andrade, 2010; Cruz et al., 2011; Ferraz e Brown, 2016;
80 Galbieri e Asmus, 2016; Galbieri et al., 2012).

81 As perdas podem chegar até 30% em lavouras de milho infestadas por *Pratylenchus*
82 (Dinardo-Miranda e Dinardo Miranda, 2018). Para *Pratylenchus* spp., a falta de cultivares
83 resistentes, além de poucas opções de plantas para rotação e aumento de cultivo em áreas
84 arenosas, aumentaram a dispersão e o impacto desse nematoide nas culturas agrícolas, entre
85 elas o milho (Inomoto 2015; Ferraz e Brown, 2016). Com relação a *Meloidogyne*, cerca de 20-
86 30% dos híbridos comercializados no Brasil são resistentes a *M. javanica*, porém para *M.*
87 *incognita*, não se conhece até o momento híbrido de milho que seja resistente a este nematoide
88 (Levy et al., 2009).

89 O manejo desses nematoides é feito basicamente da utilização de nematicidas químicos
90 ou biológicos, via tratamento de sementes ou via aplicação no sulco de plantio, integrada a outra
91 técnica, como a utilização de cultivares resistentes ou rotação de culturas. As principais formas
92 de utilização de nematicidas químicos e biológicos no Brasil, são via tratamento de sementes e
93 aplicação no sulco de plantio ou soqueira (Machado et al., 2016; Silva et al., 2019). A eficiência
94 de nematicidas químicos é variável, provavelmente em função dos diferentes tipos de solo, bem
95 como diferentes regimes de chuva e clima, densidades populacionais iniciais variáveis de
96 acordo com a espécie estudada e pela própria espécie de nematoide (Silva et al., 2019).

97 Em contrapartida, vários estudos têm demonstrado o potencial do controle biológico de
98 nematoides em diversas culturas agrícolas, pois o mesmo apresenta vantagens em relação ao
99 controle químico, entre elas não ser prejudicial ao meio ambiente, não deixar resíduos nos
100 produtos colhidos, não favorecer a seleção de populações resistentes dos nematoides, não causar
101 desequilíbrio na biota do solo e ser de fácil aplicação (Soares, 2006). O mercado global de
102 produtos biológicos para o controle de pragas e doenças na agricultura representou cerca de 2%
103 do mercado de defensivos agrícolas mundial no ano de 2016 (Machado et al., 2016). O Brasil
104 é até o presente momento, o quarto país com melhor performance na produção de
105 produtos biológicos, em que o setor é liderado por Estados Unidos, Espanha e Itália. A
106 produção de produtos biológicos no Brasil cresceu mais de 70%, superando o crescimento do
107 mercado global, que foi 17% (MAPA, 2020).

108 Mais de 200 diferentes organismos são considerados inimigos naturais dos nematoides.
109 Entre esses, os fungos e bactérias estão como agentes potenciais para controle biológico
110 (Dijksterhuis et al., 1994). Normalmente tais organismos parasitam ovos, predam juvenis,
111 adultos ou cistos, ou ainda produzem substâncias tóxicas aos nematoides (Jatala, 1986; Stirling,
112 1991). No total, 80% dos produtos registrados para fitonematoides são à base de bactérias, e o
113 restante são fungos existindo até o momento dois produtos registrados à base de *P.*
114 *chlamydosporia* e dois à base de *P. lilacinum* (Carneiro et al., 2020).

115 Como alguns exemplos de produtos comerciais registrados no Brasil para o controle de
116 espécies de importância econômica de nematoides dos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus*
117 para todas as culturas conforme dados da Agrofit podemos citar: o Votivo Prime® *B. firmus*
118 Bredemann e Werner (1933) para *M. javanica* e *P. brachyurus*; Quartzo *B. subtilis* Cohn (1872)
119 + *B. licheniformis* Chester (1901) para *P. zae* e *M. incognita*; o Nemat® *Purpureocillium*
120 *Lilacinum* Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones e Samson (2011) para *M. incognita*, *M.*
121 *javanica* e *P. brachyurus*; Trichodermil SC 1306® *Trichoderma harzianum* Rifai, (1969) para
122 *P. zae*; e Rizotec® *Pochonia chlamydosporia* Sung, Sung, Hywel-Jones e Spatafora (2007)
123 para *M. javanica* (MAPA, 2020).

124 Vários pesquisadores têm realizados estudos com biocontrole de fitonematoides.
125 retardando o parasitismo dos nematoides sobre as raízes das plantas. Como exemplo, podemos
126 citar uma pesquisa com *Pasteuria thornei* que apresentou potencial no controle de *P.*
127 *brachyurus* na cultura da soja e *P. zae* na cultura do milho (Confort, 2017). Em um estudo de
128 levantamento em que foi avaliado a eficiência do controle de *P. brachyurus* na cultura de milho
129 doce em casa de vegetação, com 7 agentes de controle biológico (*Bacillus methilotrophicus*; *B.*
130 *subtilis*; *B. firmus*; *Bacillus* sp.; *B. amyloliquefaciens* e *Trichoderma koningiopsis*), observou-
131 se que os agentes biológicos proporcionaram maior desenvolvimento vegetativo da planta, além
132 de reduzirem a reprodução do nematoide (Carvalho, 2018).

133 *B. firmus* (Votivo®) apresentou-se efetivo no controle de *M. incognita* e *P. brachyurus*
134 no milho em condições de casa de vegetação, utilizado em tratamento de sementes (Oliveira et
135 al., 2015). Neste estudo, os autores relataram tanto a proteção inicial do sistema radicular contra
136 a penetração de ambos os nematoides, quanto a redução da capacidade de multiplicação dos
137 nematoides quando da avaliação do fator de reprodução aos 45 e 60 dias após a inoculação.

138 O mesmo agente de controle biológico, *B. firmus* (Votivo®), foi avaliado em condições
139 de casa de vegetação para o controle de *M. incognita* em milho. Neste caso, as sementes tratadas
140 com o produto foram armazenadas em condições de câmara fria e, após 50, 100 e 150 dias após

141 o tratamento, além de sementes tratadas no mesmo dia, estas foram semeadas e inoculadas com
142 o nematoide, avaliando-se o efeito do tempo de armazenamento das sementes tratadas no
143 controle de *M. incognita*. Os resultados obtidos pelos autores mostraram que *B. firmus* manteve
144 sua eficiência de controle, mesmo após 100 dias de armazenamento (Matunaga et al., 2018).
145 Posteriormente, esse mesmo estudo foi ampliado com o armazenamento de sementes tratadas,
146 em condições de temperatura ambiente, com a adição dos produtos *P. lilacinum* (Nemat®) e *P.*
147 *chlamydosporia* (Rizotec®). As sementes tratadas ficaram armazenadas por 30, 60, 90, 120 e
148 150 dias após o tratamento, foram semeadas e inoculadas com *M. incognita* e, após 40 dias da
149 inoculação, a população do nematoide foi avaliada. Como resultados, foi observado que, para
150 *P. lilacinum*, não houve interferência do tempo de armazenamento na eficiência de controle,
151 enquanto para *P. chlamydosporia*, houve interferência negativa do tempo de armazenamento
152 (Matunaga, 2019).

153 Vale ressaltar que, mesmo diante de resultados de pesquisa promissores, nenhum
154 nematicida químico ou biológico, utilizado de maneira isolada ou sem o devido planejamento,
155 atingirá elevados níveis de eficiência no controle de nematoides. Além disso, os nematicidas
156 devem ser melhor estudados quanto aos seus efeitos no controle de nematoides em diferentes
157 condições ambientais, tipos de solo, culturas agrícolas, espécies de nematoides e, inclusive,
158 densidades populacionais dos nematoides, pois todas essas características podem interferir na
159 eficiência de controle. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência de
160 nematicidas biológicos, aplicados via tratamento de sementes de milho, no controle de
161 densidades populacionais crescentes de *P. zae* e *M. incognita*.

162

163 **2. Material e Métodos**

164 *2.1. Local do experimento*

165 Foram realizados dois experimentos em condições de casa de vegetação, no Instituto de
166 Desenvolvimento Rural do Paraná (IAPAR/ EMATER), situado na cidade de Londrina, PR

167 (23°21'20"S; 51°09'2"O), para avaliação da eficiência de produtos biológicos no controle de *P.*
168 *zeae* e *M. incognita* na cultura do milho. Paralelo aos experimentos em casa de vegetação,
169 foram realizados também experimentos *in vitro*, a fim de avaliar o efeito dos produtos na
170 mortalidade de *P. zea*e e *M. incognita*.

171 2.2. Obtenção dos inóculos

172 A população de *P. zea*e utilizada como inóculo foi obtida de raízes de milho, coletadas
173 no município de Londrina, Paraná, tendo sido inicialmente identificada pelas suas
174 características morfológicas e morfométricas (Castillo e Vovlas, 2007). Rotineiramente, esta
175 população é mantida em casa de vegetação em plantas de arroz, milho e quiabo. A população
176 de *M. incognita* foi obtida de raízes parasitadas de café, coletadas no município de Altônia,
177 Paraná, tendo sido inicialmente identificada por eletroforese de isoenzimas (Carneiro e
178 Almeida, 2001), sendo uma única massa de ovos separada e inoculada em tomateiros sadios
179 para purificação da população. Rotineiramente, a população de *M. incognita* é mantida em casa
180 de vegetação em plantas de tomate, quiabo ou soja.

181 Os inóculos de *P. zea*e e *M. incognita* foram obtidos a partir da trituração das raízes das
182 plantas hospedeiras através da metodologia de Boneti e Ferraz (1981), sem hipoclorito de sódio
183 no caso de *P. zea*e, sendo os nematoides extraídos, quantificados em microscópio de luz, com
184 auxílio de câmara de Peters. Para o experimento *in vitro*, os ovos de *M. incognita* extraídos por
185 esse procedimento foram depositados sobre funis de Baermann otimizado, conforme descrito
186 por Machado e Silva (2019), para obtenção dos juvenis.

187 2.3. Experimentos *in vitro*

188 Os nematoides foram distribuídos em tubos de ensaio com volume de suspensão final
189 de 5 ml. Os nematicidas biológicos testados foram Nemat[®] (*Purpureocillium lilacinum*),
190 Rizotec[®] (*Pochonia chlamydosporia*) e o Votivo[®] (*Bacillus firmus*), com doses de 0,0013;
191 0,005 e 73 µl respectivamente. Inicialmente, foi pipetada com auxílio de pipetador automático,
192 o volume de 4 ml de calda de cada um dos nematicidas biológicos testados diluídos em água.

193 Após, 1 ml da suspensão contendo 50 nematoides (adultos e juvenis de *P. zaeae* e juvenis
194 de segundo estágio, J2, de *M. incognita*) foi pipetado em cada tubo de ensaio, que foi
195 considerado a unidade experimental. Os tubos foram mantidos em câmara incubadora do tipo
196 B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio) em temperatura de 26 °C, com fotoperíodo de 12
197 horas de luz.

198 Para a avaliação do efeito dos nematicidas biológicos sobre a mortalidade dos
199 nematoides, as avaliações foram realizadas 24 e 48 horas após o tratamento. O sobrenadante de
200 cada tubo de ensaio foi retirado, com o objetivo de concentrar os nematoides. A suspensão foi
201 distribuída em câmara de Peters e foi realizada a contagem do número de nematoides ativos (ou
202 vivos), mortos e pouco móveis (PM). Nematoides ativos foram aqueles que mantiveram o
203 comportamento normal, característico da espécie; nematoides mortos, aqueles que não
204 apresentaram nenhum movimento, geralmente com o corpo completamente esticado, reto;
205 nematoides pouco móveis (PM) foram considerados aqueles com comportamento anormal para
206 a espécie ou aqueles quase paralisados.

207

208 2.4. Experimentos em casa de vegetação

209 O delineamento experimental utilizado para ambos os experimentos foi o inteiramente
210 casualizado em arranjo fatorial 4 x 3 (4 tratamentos nematicidas x 3 densidades de inóculo),
211 com doze repetições, sendo seis para avaliar a penetração dos nematoides e seis para avaliação
212 do FR, com exceção da testemunha absoluta, cujo número de repetições foram seis, uma vez
213 que essa testemunha apenas acompanhou o experimento para verificação do desenvolvimento
214 das plantas.

215 Para ambos os experimentos (*P. zaeae* e *M. incognita*), foi utilizado o híbrido de milho
216 P3764PWU, sendo semeada uma semente por vaso, após tratamento com os produtos
217 biológicos. Os produtos utilizados foram Nemat[®], Rizotec[®] e o Votivo[®], as doses foram
218 calculadas conforme recomendação do fabricante. Os tratamentos e doses de produtos

219 biológicos testados no controle de *Pratylenchus zae* e *Meloidogyne incognita*, em condições
220 de vegetação foram: testemunha (Sem nematoide e sem produto); testemunha inoculada (667
221 nematoides/ planta); testemunha inoculada (2000 nematoides/ planta); testemunha inoculada
222 (6000 nematoides/ planta); Nemat[®] *Purpureocillium lilacinum* (667 nematoides/ planta) com
223 dose recomendada de 100 a 250g/100kg de sementes, sendo utilizada no experimento
224 0,016g/10,57g de sementes; Nemat[®] *P. lilacinum* (2000 nematoides/ planta) sendo dose
225 recomendada de 100 a 250g/100kg de sementes, e utilizada no experimento 0,016g/10,57g de
226 sementes; Nemat[®] *P. lilacinum* (6000 nematoides/ planta) com dose recomendada de 100 a
227 250g/100kg de sementes, e dose 0,016g/10,57g de sementes utilizada; Rizotec[®] *Pochonia*
228 *chlamydosporia* (667 nematoides/ planta) com dose 240g/ha, e dose utilizada no experimento
229 0,063g/10,57g de sementes; Rizotec[®] *P. chlamydosporia* (2000 nematoides/ planta) com dose
230 240g/ha, sendo utilizada 0,063g/10,57g de sementes; Rizotec[®] *P. chlamydosporia* (6000
231 nematoides/ planta) com dose 240g/ha, sendo 0,063g/10,57g de sementes utilizada no
232 experimento; Votivo[®] *Bacillus firmus* (667 nematoides/ planta) com dose recomendada de 25
233 a 70ml/60 mil sementes, sendo 8,8 µl/10,57g de sementes utilizada no experimento; Votivo[®]
234 *B. firmus* (2000 nematoides/ planta) com dose recomendada de 25 a 70ml/60 mil sementes,
235 sendo 8,8 µl/10,57g de sementes utilizada, e Votivo[®] *B. firmus* (6000 nematoides/ planta) com
236 dose recomendada de 25 a 70ml/60 mil sementes, sendo 8,8 µl/10,57g de sementes.

237 A semeadura foi realizada em vasos de 945 ml, contendo solo (80% de areia, 15% de
238 argila e 5% de silte) esterilizado por calor seco (160 °C/ 5 horas). As densidades populacionais
239 dos nematoides utilizadas foram 667, 2000 e 6000 nematoides/planta, sendo a inoculação
240 realizada logo após a emergência das plântulas, cerca de cinco dias após a semeadura.

241 A irrigação foi realizada diariamente, conforme necessidade, mantendo-se o solo na
242 capacidade de campo. A adubação feita no momento da semeadura, com o fertilizante de
243 liberação lenta Osmocote[®] plus (15% N; 9% P₂O₅; 12% K₂O; 1% Mg; 2,3% S; 0,05% Cu; 0,45%
244 Fe; 0,06% Mn e 0,02% Mo).

245 A avaliação da penetração dos nematoides foi feita 7 dias após a inoculação. Para isso,
246 as raízes foram cuidadosamente separadas do solo, utilizando-se balde com água corrente, secas
247 em papel absorvente e pesadas. Após, procedeu-se a coloração dos nematoides presentes nos
248 tecidos radiculares com fucsina ácida, pela metodologia de Byrd et al. (1983). Para observação
249 dos nematoides no interior das raízes, estas foram montadas sobre lâminas de microscopia e os
250 nematoides foram quantificados em microscópio de luz, conforme descrito por Machado e
251 Mattos (2019).

252 A avaliação da multiplicação dos nematoides, e influência da presença dele na biomassa
253 fresca e seca da parte aérea e no fator de reprodução foi feita 60 dias após a inoculação, através
254 da extração dos nematoides das raízes em cada tratamento. Para isso, a parte aérea das plantas
255 foi retirada e pesada, obtendo-se o valor de massa fresca de parte aérea (MFPA). Após pesagem,
256 a parte aérea das plantas foi seca em estufa de circulação de ar forçada a 60 °C, até peso
257 constante, obtendo-se o valor de massa seca de parte aérea (MSPA). As raízes foram lavadas
258 em água corrente, pesadas e, em seguida, os nematoides foram extraídos conforme metodologia
259 de Boneti e Ferraz (1981). Os nematoides foram quantificados com auxílio de câmara de Peters
260 sob microscópio de luz. A população extraída em cada tratamento foi dividida pela população
261 inicial inoculada para obtenção FR dos nematoides. Além disso, o número de nematoides por
262 grama de raiz também foi calculado pela divisão da população final pela massa fresca de raízes.

263 2.5. Análise estatística

264 Os dados obtidos no experimento *in vitro* foram submetidos à análise de variância e ao
265 teste de normalidade dos resíduos de Shapiro-Wilk (1965). Como não foram atendidos os
266 pressupostos do modelo linear, realizou-se a análise de variância não-paramétrica seguida pelo
267 teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação das medianas. Para os dados de
268 penetração dos nematoides, FR e Nematóide/grama de raiz, foi realizada a análise de variância
269 e o teste de normalidade dos resíduos de Shapiro-Wilk (1965) e, quando necessário, foi
270 realizada a transformação dos dados conforme indicado pelo procedimento de Box-Cox (1964).

271 Após, foi feita a análise de desdobramento de interações dos fatores para cada variável por meio
272 do contraste de médias pelo teste de Scott-Knott a 5 % de significância. Para os dados de MFPA
273 e MSPA, após análise de variância e teste de normalidade dos resíduos, foi realizada análise
274 para verificação da interação dos fatores e contraste das médias fatoriais e para contraste de
275 médias do tratamento adicional com a média geral da fatorial pelo teste de Scott-Knott a 5 %
276 de significância. Para todas as análises, utilizou-se o software estatístico R (R Core Team,
277 2015).

278

279 **3. Resultados**

280 *3.1. Experimentos in vitro*

281 No experimento realizado com *P. zea* (Tabela 3), as porcentagens de nematoides
282 mortos em todos os tratamentos nematicidas biológicos diferiram significativamente da
283 testemunha, tanto na avaliação de 24 quanto na de 48 horas. Entretanto, os nematicidas à base
284 de *P. lilacinum* e *P. chlamydosporia* foram os mais eficientes para causar mortalidade em *P.*
285 *zea*, uma vez que os valores de % de mortos nesses tratamentos foram significativamente
286 maiores que os dos demais tratamentos. O tratamento à base de *B. firmus* apresentou valores
287 intermediários para ambas as variáveis analisadas. No entanto, foi o que causou a maior % de
288 pouco móveis (PM), diferindo significativamente dos demais tratamentos, com exceção da
289 testemunha avaliada em 48 h.

290 Para *M. incognita* (Tabela 4), de maneira semelhante ao observado para *P. zea*, os
291 tratamentos à base de *P. lilacinum* e *P. chlamydosporia* apresentaram os maiores valores de %
292 de mortos e os menores de % de vivos, diferindo significativamente dos demais tratamentos,
293 tanto 24 quanto 48 horas após o contato com os produtos. Os valores de % de PM também
294 foram significativamente menores em todos os tratamentos, em relação àquele à base de *B.*
295 *firmus*.

296

297 **Tabela 3.** Porcentagem de *Pratylenchus zae* mortos, pouco móveis (PM) e vivos nas avaliações
 298 realizadas 24 e 48 horas após o contato com os nematicidas biológicos, em condições *in vitro*.

Tratamentos	% mortos	% PM	% vivos
	24 horas		
Testemunha	0,00 c	0,65 b	99,35 a
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	97,64 a	2,36 b	0,00 c
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	98,47 a	1,15 b	0,38 c
<i>Bacillus firmus</i>	55,08 b	18,92 a	26,00 b
	48 horas		
Testemunha	4,99 c	30,22 a	64,78 a
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	100,00 a	0,00 b	0,00 c
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	100,00 a	0,00 b	0,00 c
<i>Bacillus firmus</i>	72,81 b	23,74 a	3,44 b

299 Cada valor representa a mediana de seis repetições. Valores seguidos de mesma letra na coluna
 300 não diferem entre si pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, a 5% de significância.

301

302 **Tabela 4.** Porcentagem de *Meloidogyne incognita* mortos, pouco móveis (PM) e vivos nas
 303 avaliações realizadas 24 e 48 horas após o contato com os nematicidas biológicos, em condições
 304 *in vitro*.

305

Tratamentos	% mortos	% PM	% vivos
	24 horas		
Testemunha	0,21 d	0,00 c	99,79 a
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	93,37 b	6,36 b	0,26 c
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	99,16 a	0,83 c	0,00 c

<i>Bacillus firmus</i>	55,18 c	16,57 a	28,25 b
48 horas			
Testemunha	1,22 c	0,26 b	98,51 a
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	100,00 a	0,00 b	0,00 c
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	100,00 a	0,00 b	0,00 c
<i>Bacillus firmus</i>	65,39 b	12,58 a	22,02 b

306 Cada valor representa a mediana de seis repetições. Valores seguidos de mesma letra na coluna
 307 não diferem entre si pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, a 5% de significância.

308

309 3.2. Experimentos em casa de vegetação

310 Os valores obtidos para o número de nematoides encontrados dentro das raízes de milho
 311 sob os diferentes tratamentos com os nematicidas biológicos e densidades de inóculo, no
 312 experimento realizado com *P. zaeae*, encontram-se resumidos na Tabela 5. Nos tratamentos
 313 nematicidas biológicos, nas densidades de inóculo de 667 e 2.000 nematoides por planta não
 314 foram observadas diferenças entre nenhum dos tratamentos (Tabela 5). No entanto, quando se
 315 inocularam 6.000 nematoides/planta, todos os nematicidas biológicos testados reduziram a
 316 penetração de *P. zaeae* nas raízes do milho em relação à testemunha, sem nematicida. O
 317 tratamento que proporcionou maior redução da penetração do nematoide foi aquele à base de
 318 *P. chlamydosporia*, enquanto os tratamentos à base de *P. lilacinum* e *B. firmus* apresentaram
 319 valores intermediários de penetração de *P. zaeae*. Analisando-se os tratamentos em relação às
 320 densidades de inóculo, na densidade de 6.000 nematoides por planta todos os tratamentos
 321 apresentaram maior número de nematoides penetrados no sistema radicular das plantas, em
 322 comparação às densidades de 667 e 2.000 nematoides/planta.

323

324 **Tabela 5.** Efeito de nematicidas biológicos no número de nematoides penetrados em raízes de
 325 milho inoculadas com diferentes densidades populacionais de *Pratylenchus zaeae*.

Tratamentos	Densidade de inóculo		
	667	2.000	6.000
Testemunha	19 aB	29 aB	323 aA
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	14 aB	36 aB	172 bA
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	7 aB	21 aB	105 cA
<i>Bacillus firmus</i>	3 aB	14 aB	245 bA

326 Cada valor representa a média de seis repetições. Valores seguidos de mesma letra minúscula
 327 na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de
 328 significância.

329

330 No experimento realizado com *M. incognita* (Tabela 6), assim como observado para *P.*
 331 *zeae*, não foram observadas diferenças entre os tratamentos nematicidas nas densidades
 332 populacionais de 667 e 2.000 nematoides/planta, enquanto na densidade de 6.000
 333 nematoides/planta, os tratamentos à base de *P. lilacinum* e *P. chlamydosporia* proporcionaram
 334 maior redução da penetração do nematoide, com valores significativamente menores que os dos
 335 demais tratamentos. Neste caso, observou-se maior diferenciação entre as densidades de
 336 inóculo na análise realizada dentro de cada tratamento nematicida, ou seja, todos os tratamentos
 337 apresentaram menor número de nematoides penetrados na densidade de 667 nematoides por
 338 planta, maiores valores na de 6.000 e valores intermediários na densidade de 2.000
 339 nematoides/planta.

340

341 **Tabela 6.** Efeito de nematicidas biológicos no número de nematoides penetrados em raízes de
 342 milho inoculadas com diferentes densidades populacionais de *Meloidogyne incognita*.

Tratamentos	Densidade de inóculo		
	667	2.000	6.000

Testemunha	19 aC	47 aB	207 aA
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	13 aC	35 aB	147 bA
<i>Pochonia chlamyosporia</i>	14 aC	37 aB	135 bA
<i>Bacillus firmus</i>	5 aC	47 aB	193 aA

343 Cada valor representa a média de seis repetições. Valores seguidos de mesma letra minúscula
 344 na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de
 345 significância

346

347 Na Tabela 7, encontram-se resumidos os resultados do experimento realizado com *M.*
 348 *incognita* para verificação da multiplicação do nematoide sob diferentes tratamentos
 349 nematicidas e diferentes densidades de inóculo. O experimento realizado com *P. zaeae*, para essa
 350 finalidade, não pôde ser avaliado em função da perda das plantas após deriva de pulverização
 351 do acaricida espiroclorfenol, que causou elevada fitotoxidez nas plantas.

352

353 **Tabela 7.** Massa fresca e seca de parte aérea e massa fresca de raízes de milho tratadas com
 354 diferentes nematicidas biológicos, sob diferentes densidades de inóculo de *Meloidogyne*
 355 *incognita*.

Tratamentos	Densidade de inóculo			Média ^{ns}
	667	2.000	6.000	
	Massa fresca da parte aérea (g) ^{ns}			Média ^{ns}
Testemunha inoculada	189,30	169,50	166,70	175,17
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	184,40	163,10	169,00	172,17
<i>Pochonia chlamyosporia</i>	167,50	159,50	164,80	163,93
<i>Bacillus firmus</i>	158,10	184,10	190,90	177,70
Média ^{ns}	174,82	169,05	172,85	-

	Massa seca da parte aérea (g) ^{ns}			Média ^{ns}
Testemunha	34,30	29,54	27,93	30,59
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	31,22	26,17	27,97	28,46
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	27,17	24,85	27,04	26,35
<i>Bacillus firmus</i>	25,08	29,75	31,19	28,68
Média ^{ns}	29,44	27,58	28,53	-
	Massa fresca de raízes (g) ^{ns}			Média
Testemunha	77,49	69,54	71,08	72,70 a
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	72,38	62,28	71,10	68,58 a
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	55,63	49,87	64,55	56,68 b
<i>Bacillus firmus</i>	61,01	70,43	67,64	66,36 a
Média ^{ns}	66,63	63,03	68,59	-

356 Cada valor representa a média de seis repetições. Valores seguidos de mesma letra minúscula
357 na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de
358 significância.

359 Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nematicidas e a
360 testemunha inoculada, assim como entre as densidades de inóculo com os diferentes
361 nematicidas para as variáveis massa fresca de parte aérea e massa seca de parte aérea (Tabela
362 7). Já para a variável massa fresca de raízes (Tabela 7), apesar de não terem sido observadas
363 diferenças significativas entre as densidades de inóculo com os diferentes nematicidas
364 biológicos, observou-se que, em relação aos tratamentos nematicidas, o tratamento à base de *P.*
365 *chlamydosporia* apresentou o menor valor para essa variável, sendo significativamente
366 diferente dos demais tratamentos nematicidas.

367 De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, na cultura do milho não foi
368 verificada diferença significativa para MFPA e MFR em função da utilização de nematicidas
369 ou densidades de inóculo. Entretanto, a utilização dos diferentes nematicidas biológicos com as

370 densidades de inóculo testadas reduziram significativamente a MSPA, em relação à testemunha
371 absoluta, sem nematicida e sem nematoide.

372

373 **Tabela 8.** Massa fresca (MFPA) e seca (MSPA) de parte aérea e massa fresca de raízes (MFR)
374 de milho na testemunha absoluta (tratamento adicional) e nos tratamentos nematicidas e
375 densidades de inóculo de *Meloidogyne incognita* (tratamento fatorial).

Tratamento	MFPA ^{ns}	MSPA	MFR ^{ns}
Adicional	190,60	32,38 a	66,43
Fatorial	172,24	28,52 b	66,08

376 Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-
377 Knott a 5% de significância.

378

379 Em relação à multiplicação de *M. incognita* em plantas de milho, sob os diferentes
380 tratamentos com os nematicidas biológicos (Tabela 9), baseando-se na variável FR em cada
381 densidade de inóculo utilizada, nas densidades de 667 e 6.000 nematoides/planta, todos os
382 nematicidas biológicos utilizados reduziram o FR de *M. incognita*, em relação à testemunha
383 inoculada, mas na densidade de 2.000 nematoides/planta, apenas *B. firmus* apresentou valor de
384 FR significativamente menor do que dos demais tratamentos.

385 Ainda com base no FR de *M. incognita*, mas considerando-se cada tratamento em
386 relação às densidades de inóculo, apenas o tratamento com *P. chlamydosporia* não apresentou
387 redução do FR em relação às três densidades de inóculo. O tratamento à base de *B. firmus*,
388 apresentou o menor FR na densidade de 2.000, enquanto que, na densidade de 6.000, o FR
389 apresentou valor intermediário. Na testemunha e no tratamento com *P. lilacinum*, o FR do
390 nematoide foi significativamente maior na densidade de 667, em relação a 2.000 e 6.000
391 nematoides/planta.

392 Em relação ao número de nematoides/grama de raízes (Tabela 9), analisando-se em cada
 393 densidade de inóculo, apenas na densidade de 2.000 nematoides/planta foram observadas
 394 diferenças significativas entre os tratamentos nematicidas, sendo *B. firmus* o mais eficiente.
 395 Considerando-se cada tratamento nematicida em relação às densidades de inóculo, o tratamento
 396 *P. lilacinum*, apresentou o menor valor na densidade de 667. A testemunha apresentou valores
 397 significativamente maiores de nematoide/grama de raízes na densidade de 6.000
 398 nematoides/planta. Para o tratamento com *P. chlamydosporia*, os menores valores de
 399 nematoide/grama de raízes foram observados na densidade de 667, e os maiores valores nas
 400 densidades de 2.000 e 6.000 nematoides, enquanto que, para *P. lilacinum*, o maior valor foi
 401 observado na densidade de 6.000, com valor intermediário de nematoide/grama de raízes na
 402 densidade de 2.000 nematoides por planta.

403

404 **Tabela 9.** Fator de reprodução (FR) e número de nematoides por grama de raízes de milho
 405 inoculadas com as densidades populacionais de *Meloidogyne incognita* de 667, 2.000 e 6.000
 406 nematoides por planta, sob diferentes tratamentos nematicidas.

Tratamentos	Densidade de inóculo		
	667	2.000	6.000
	Fator de reprodução		
Testemunha	40,83 aA	23,46 aB	23,51 aB
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	25,94 bA	18,68 aB	13,65 bB
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	16,59 bA	18,96 aA	12,83 bA
<i>Bacillus firmus</i>	17,45 bA	6,51 bC	11,10 bB
	Número de nematoides / g raiz		
Testemunha	353,76 aB	772,53 aB	2234,77 aA
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	245,04 aC	671,08 aB	1175,60 aA

<i>Pochonia chlamydosporia</i>	204,46 aB	749,89 aA	1207,82 aA
<i>Bacillus firmus</i>	197,36 aB	188,71 bB	1024,40 aA

407 Cada valor representa a média de seis repetições. Valores seguidos de mesma letra minúscula
 408 na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de
 409 significância.

410

411 **4. Discussão**

412 Os nematicidas biológicos avaliados apresentaram efeito na mortalidade de *P. zae* e *M.*
 413 *incognita* em estudos *in vitro*, a partir de 24 horas após o contato dos nematoides com os
 414 nematicidas, especialmente aqueles formulados com agentes fúngicos, como *P. lilacinum* e *P.*
 415 *chlamydosporia*. Isso porque o mecanismo de ação desses organismos é o parasitismo de ovos
 416 e juvenis de nematoides, bem como a produção de substâncias tóxicas (Jatala, 1986; Stirling,
 417 1991). Elevada mortalidade de nematoides bacteriófagos, onívoros e parasitas de plantas foi
 418 observada em estudo *in vitro* com *P. chlamydosporia*, enquanto *P. lilacinum* apresentou menor
 419 efeito na mortalidade desses grupos tróficos (Amaro, 2019). Mortalidade elevada também foi
 420 observada em condições *in vitro* de *M. incognita* com a utilização desses agentes fúngicos
 421 (Mattos, 2019). Entretanto, os mesmos produtos foram avaliados em condições *in vitro*, e não
 422 apresentaram efeito na mortalidade de juvenis de *M. incognita* (Vizentini et al., 2017).

423 Já no caso de *B. firmus*, que apresentou menor efeito de mortalidade dos nematoides no
 424 estudo *in vitro*, seu principal mecanismo de ação é de maneira indireta, uma vez que altera os
 425 exsudatos radiculares, dificultando a localização das raízes pelos nematoides, ou ainda pela
 426 indução de resistência, do contato da bactéria com o sistema radicular das plantas (Machado et
 427 al., 2016). Portanto, os piores resultados quanto à mortalidade de nematoides *in vitro* obtidos
 428 para *B. firmus* eram esperados. Em estudo *in vitro*, Jansen-Girgan et al. (2016) observaram
 429 variação na eficiência de controle de isolados de *B. firmus* em juvenis de *M. incognita*,
 430 demonstrando que a origem do isolado também tem papel fundamental no nível de controle

431 exercido por essa espécie de bactéria, talvez pela capacidade de produção de substâncias do
432 metabolismo secundário que podem ter efeito tóxico aos nematoides.

433 Menor efeito na mortalidade de diferentes grupos tróficos de nematoides em função da
434 aplicação de *B. subtilis* e *B. licheniformis* em relação à *P. chlamydosporia* ou *P. lilacinum* foi
435 observado em condições *in vitro*, o que corrobora os resultados do presente estudo (Amaro,
436 2019).

437 Os nematicidas biológicos à base de agentes fúngicos testados se mostraram eficientes,
438 ainda, na redução da penetração de *P. zae* e *M. incognita* em raízes de milho sob os diferentes
439 tratamentos, mas apenas quando da inoculação de elevada densidade de inóculo, ou seja, 6.000
440 nematoides/planta. Nas densidades de inóculo menores (667 e 2.000 nematoides por planta),
441 não houve diferença na capacidade de penetração dos nematoides, em comparação com a
442 testemunha sem tratamento. Isso pode ter ocorrido devido ao hábito de parasitismo desses
443 fungos, uma vez que, em elevadas densidades populacionais do nematoide, haveria maior
444 quantidade de ovos e juvenis que servem de alimento, favorecendo, portanto, seu
445 estabelecimento e desenvolvimento no substrato.

446 A densidade populacional do nematoide é importante não somente para predição dos
447 danos ou perdas que as culturas sofrerão devido ao seu ataque, mas também para a escolha de
448 ferramentas de manejo, uma vez que nem sempre a eficiência se mantém elevada sob altas
449 densidades populacionais. Isso porque, com elevadas densidades populacionais, uma dose do
450 nematicida químico que controla eficientemente populações mais baixas pode não surtir o
451 mesmo efeito.

452 Por exemplo, em um boletim de recomendações de manejo de nematoides em algodão
453 nos Estados Unidos, informam que a dose de aldicarbe utilizada na cultura, na faixa de 0,64 a
454 1,08 kg/ha, é suficiente para controlar nematoides e tripses (*Frankliniella schultzei*), desde que
455 as populações dos nematoides sejam consideradas baixas na área (para *M. incognita*, até 100
456 nematoides por 100 cm³ de solo) (Mueller et al., 2012). Caso a densidade populacional de *M.*

457 *incognita* seja de 250 nematoides por 100 cm³ de solo, os autores recomendam a utilização do
458 nematicida Telone II, também à base de aldicarbe, mas em outra formulação, já que a dose
459 recomendada de aldicarbe não é efetiva para elevadas densidades populacionais. Além disso,
460 em relação à utilização de nematicidas biológicos, os mesmos autores recomendam a aplicação
461 de Poncho/Votivo, à base de *B. firmus*, em tratamento de sementes, mas somente se as
462 densidades populacionais estiverem baixas.

463 Nas condições brasileiras, em áreas de cultivo de algodão sob altas infestações de *M.*
464 *incognita*, a aplicação de nematicidas não tem potencial de recuperar toda a produção perdida
465 pelo ataque do nematoide, devendo ser utilizadas outras ferramentas de manejo
466 concomitantemente ao uso de nematicidas para melhores resultados nessa condição (Inomoto e
467 Asmus, 2006).

468 Os resultados encontrados na literatura em relação à eficiência de controle exercida
469 pelos nematicidas em elevadas densidades populacionais de nematoides são, portanto,
470 conflitantes com os resultados de penetração dos nematoides e de redução do FR de *M.*
471 *incognita* obtidos em avaliação mais tardia. Aos 60 dias após a inoculação, todos os nematicidas
472 biológicos reduziram a população do nematoide nas densidades de 667 e 6.000 nematoides por
473 planta, inclusive *B. firmus*, que também apresentou o menor FR na densidade de 2.000
474 nematoides. Isso indica que, apesar de não causar mortalidade *in vitro* e não reduzir a
475 penetração de *M. incognita*, *B. firmus* apresentou efeito no desenvolvimento e multiplicação do
476 nematoide.

477 O produto utilizado, Votivo Prime[®], à base de *B. firmus*, tem em sua formulação esporos
478 da bactéria (Adapar, 2020), que são estruturas de resistência que permitem a sobrevivência em
479 condições de seca e calor, só germinando quando as condições forem adequadas (Ferreira e
480 Salgado, 1995). Por ser considerado um gênero de rizobactéria, *Bacillus* spp., em sua forma
481 endospórica, só encontrará condições ideais para seu desenvolvimento quando da presença dos
482 exsudatos radiculares, já que são colonizadores agressivos das raízes (Stafford et al., 2005). Tal

483 condição pode explicar o menor efeito de *B. firmus* nos nematoides em condições *in vitro*,
484 portanto na ausência dos exsudatos radiculares, ou em estágio de desenvolvimento inicial das
485 plantas de milho, quando possivelmente a concentração de exsudatos não atingiu o ideal para a
486 germinação dos esporos. Com as plantas de milho adultas, o efeito protetor das raízes exercido
487 por *B. firmus* pôde ser melhor visualizado no presente trabalho.

488 Em um estudo com *B. firmus* foi observado eficiência do mesmo em reduzir a
489 penetração de *M. incognita* e *P. brachyurus* em milho e também reduzir o fator de reprodução
490 do nematoide (Oliveira et al., 2015), corroborando com os resultados do presente trabalho. O
491 mesmo efeito foi visualizado nas culturas do algodão, inoculado com *M. incognita*, e da soja,
492 com *M. incognita* e *P. brachyurus* (Mattos et al., 2015; Ribeiro et al., 2015).

493 Em relação aos agentes fúngicos, vários são os relatos de redução populacional de
494 nematoides em diversas culturas, quando utilizados via tratamento de sementes ou pulverização
495 no sulco de plantio. Redução no número de galhas radiculares e na população de *Meloidogyne*
496 spp. já foi observada em plantas de tomate e soja tratadas com *P. lilacinum* (Santiago et al.,
497 2006; Freitas et al., 1999; Mattos, 2019; Matunaga, 2019) e *P. chlamydosporia* (Carvalho,
498 2017; Mattos, 2019; Matunaga, 2019), o que corrobora os resultados de redução do fator de
499 reprodução de *M. incognita* em milho obtidos no presente trabalho. Entretanto, utilizando um
500 isolado de *P. lilacinum* cultivado em meio de cultura, Nunes et al. (2010) não obtiveram redução
501 do número de galhas nas raízes de soja infestadas por *M. incognita*, quando uma suspensão de
502 esporos foi pulverizada no solo. Os autores sugeriram que as diferenças entre os isolados do
503 fungo e a concentração do inóculo (3000 ovos) utilizados, podem ter sido responsáveis pelos
504 resultados negativos obtidos em relação ao controle do nematoide.

505 Mesmo com a redução significativa da população de *M. incognita* em milho observada
506 aos 60 dias após a inoculação, não foram observadas diferenças significativas entre os
507 tratamentos para as variáveis de desenvolvimento das plantas. Exceção feita ao tratamento com
508 *P. chlamydosporia*, que causou redução da massa fresca de raízes. Esse resultado é contrastante

509 ao que geralmente é citado na literatura, ou seja, de que agentes de controle biológico
510 proporcionam melhor desenvolvimento das plantas e incrementos de produção. A eficiência de
511 cinco nematicidas biológicos via tratamento de sementes para o controle de *P. brachyurus*, foi
512 avaliada, e como resultado os autores verificaram que o tratamento com *P. chlamydosporia*
513 proporcionou maior peso de grãos, em relação à testemunha (Abreu et al., 2017).

514 Em experimento em condições de campo o efeito do uso de nematicidas biológicos no
515 controle de *P. brachyurus* na soja foi estudado, e como resultado foi observado que o tratamento
516 com *P. chlamydosporia* propiciou bom desenvolvimento da raiz e altura das plantas, porém
517 sem efeito na redução populacional do nematoide (Araújo Neto, 2018). Melhor
518 desenvolvimento do sistema radicular das plantas de soja, em relação à testemunha, também
519 foi observado no trabalho de Mattos (2019).

520 Em adição, quando se observa a análise conjunta dos dados incluindo-se a testemunha
521 adicional, sem nematicida e sem inoculação, verifica-se que houve interferência do parasitismo
522 do nematoide na massa seca de parte aérea, cujo valor foi significativamente menor nos
523 tratamentos com inoculação do nematoide, independente do nematicida biológico utilizado.
524 Efeitos negativos na incorporação de nutrientes e, conseqüentemente, redução da massa seca e
525 produtividade de diversas culturas em função do ataque de *Meloidogyne* spp. são bastante
526 relatados na literatura e foram citados por Greco e Di Vito (2009).

527 Os agentes de controle biológico utilizados no presente trabalho, portanto, apesar de
528 reduzirem a população de *M. incognita* nas plantas de milho, não apresentaram efeito benéfico
529 no desenvolvimento das plantas, indicando que o cultivo em áreas indenes ainda é a melhor
530 opção para a obtenção de elevadas produtividades. Entretanto, o controle biológico de
531 nematoides é uma prática que vem ganhando mercado a cada ano, seja pelas características de
532 menor agressividade ao meio ambiente e às plantas, seja pela eficiência que vêm apresentando,
533 especialmente em condições de campo (Machado et al., 2016).

534 O mercado de produtos biológicos mostra crescimento de mais de 70% no ano de 2018
535 no Brasil. Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico (ABCBio- CropLife),
536 aponta que o controle biológico de pragas e doenças tem potencial de crescimento anual de 20%
537 (Correio, 2020).

538 O foco principal desse mercado é a cultura da soja, mas como o milho é utilizado na
539 grande maioria das áreas de produção de soja como a cultura de segunda safra, ou safrinha, e
540 sendo este suscetível a várias espécies de nematoides que parasitam a soja, a não utilização de
541 ferramentas de manejo também na cultura do milho pode impactar negativamente, no sentido
542 de proporcionar incrementos populacionais do nematoide que poderão ser ainda mais
543 prejudiciais à cultura da soja. É de grande importância o tratamento de sementes de milho no
544 sistema de produção em que a soja é a cultura sucessora, tanto com nematicida biológico (*B.*
545 *firmus*) quanto químico (fluopyram) (Bicalho, 2019).

546 Ademais, para maximizar os benefícios da utilização de um agente de controle biológico
547 no manejo de nematoides, a adoção de ferramentas complementares de manejo é importante.
548 Práticas como aumentar a matéria orgânica no solo, realizar a rotação de culturas e/ou utilizar
549 plantas de cobertura vegetal criam condições favoráveis para que o microrganismo se estabeleça
550 adequadamente, aumentando sua eficiência (Machado et al., 2016). Em adição, a integração do
551 controle biológico com o cultivo de cultivares resistentes ou moderadamente resistentes pode
552 gerar maior redução da população do nematoide no solo, permitindo maiores produtividades e
553 a sustentabilidade dos sistemas agrícolas.

554

555 **Referências**

556 Abreu, A. B. L., Agnes, D. C., Ferreira, C. I. B., Carlos, T. S. B., Teixeira, A.V., Teles, N. L.
557 2017. Eficiência do tratamento de sementes de soja no controle de *Pratylenchus brachyurus*.
558 [On line]. [https://maissoja.com.br/eficiencia-do-tratamento-de-sementes-de-soja-no-controle-](https://maissoja.com.br/eficiencia-do-tratamento-de-sementes-de-soja-no-controle-de-pratylenchus-brachyurus/)
559 [de-pratylenchus-brachyurus/](https://maissoja.com.br/eficiencia-do-tratamento-de-sementes-de-soja-no-controle-de-pratylenchus-brachyurus/)

- 560 Adapar, 2020. Votivo Prime[®] – Bula. [On line].
561 <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Outros/votivoprime.pdf>
- 562 Agrios, N. G. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press, Burlington - MA, 948
563 pp.
- 564 Alcântara, V. S. B., Azevedo, J. L. 1981. Isolamento e seleção de fungos predadores de
565 nematoide. Revista de Agricultura. Piracicaba 56, 132-146.
- 566 Amaro, P. M. 2019. Efeito de práticas de manejo em comunidades de nematoides em áreas
567 agrícolas e em testes *in vitro*. [On line].
568 [https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalho](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=7585991#)
569 [oConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=7585991#](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=7585991#)
- 570 Andrade, E. P. 2010. Caracterização molecular de espécies de *Pratylenchus* que ocorrem no
571 Brasil e a reação de acessos de milho *P. zae* e *P. brachyurus*. [On line].
572 https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/9068/3/2010_EdnalvaPatriciadeAndrade.pdf
- 573 Araújo Neto, J. L. 2018. Efeito do uso de nematicidas biológicos no controle de *Pratylenchus*
574 *brachyurus* na cultura de soja no leste maranhense. [On line].
575 <https://monografias.ufma.br/jspui/bitstream/123456789/2347/1/JOSUELOPESDEARAUIJON>
576 [ETO.pdf](https://monografias.ufma.br/jspui/bitstream/123456789/2347/1/JOSUELOPESDEARAUIJON)
- 577 Bicalho, A.C.G. 2019. *Pratylenchus brachyurus* na soja em sucessão ao consórcio milho-
578 braquiária. [On line]. <http://www.bibliotecadigital.uel.br/document/?view=vtls000226696>
- 579 Boneti, J. I. S., Ferraz, S. 1981. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de
580 ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira 6, 553.
- 581 Box, G. E. P., Cox, D. R. 1964. An analysis of transformations. Journal of the Royal Statistical
582 Society 26, 211-252.
- 583 Byrd Jr, D.W., Kirkpatrick, J., Barker, K.R. 1983. An improved technique for clearing and
584 staining plant tissues for detection of nematodes. Journal of Nematology 15, 141-143.

- 585 Carneiro, R. M. D. G., Almeida, M. R. A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de
586 enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira* 25,
587 35-44.
- 588 Carneiro, R. M. D. G., Monteiro, T. S. A., Eckstein, B., Freitas, L. G. 2020. Controle de
589 nematoides fitoparasitas. *In: Fontes, E. M. G.; Valadares, M. C. (Eds.), Controle biológico de*
590 *pragas da agricultura. Brasília, DF: Embrapa, pg. 371-413.*
- 591 Carvalho, S. L. 2018. Levantamento e Controle Biológico de *Pratylenchus brachyurus* na
592 Cultura do Milho Doce. [On line].
593 [https://sistemas.ifgoiano.edu.br/sgcursos/uploads/anexos_9/2018-12-14-03-09-](https://sistemas.ifgoiano.edu.br/sgcursos/uploads/anexos_9/2018-12-14-03-09-30Silvio_Disserta%C3%A7%C3%A3o_v.%20final.pdf)
594 [30Silvio_Disserta%C3%A7%C3%A3o_v.%20final.pdf](https://sistemas.ifgoiano.edu.br/sgcursos/uploads/anexos_9/2018-12-14-03-09-30Silvio_Disserta%C3%A7%C3%A3o_v.%20final.pdf)
- 595 Carvalho, P. H. 2017. Controle biológico e alternativo de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*
596 em tomateiro. [On line].
597 [https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/23402/1/2017_Patr%c3%adciaHonoratodeCarvalho](https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/23402/1/2017_Patr%c3%adciaHonoratodeCarvalho.pdf)
598 [.pdf](https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/23402/1/2017_Patr%c3%adciaHonoratodeCarvalho.pdf)
- 599 Castillo, P., Vovlas, N. 2007. *Pratylenchus* (Nematoda: *Pratylenchidae*): diagnosis, biology,
600 pathogenicity and management. *Nematology monographs and perspectives. Leiden- Boston:*
601 *Brill Academic Publishers* 6, 529 pp.
- 602 CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. 2020. Acompanhamento da safra brasileira
603 de grãos. Quarto levantamento-Safra 2019/20. Brasília-DF, 7, 1-104.
- 604 Confort, P. M. S. 2017. *Pasteuria thornei*, a novel biological seed treatment for root lesion
605 nematode control in soybean and maize. [On line].
606 [https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde-02072018](https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde-02072018093507/publico/Pedro_Marcus_de_Souza_Confort.pdf)
607 [093507/publico/Pedro_Marcus_de_Souza_Confort.pdf](https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde-02072018093507/publico/Pedro_Marcus_de_Souza_Confort.pdf)
- 608 Correio. 2020. Controle biológico cresce e ganha força. [On line].
609 [https://correio.rac.com.br/_conteudo/2020/07/campinas_e_rmc/968580-controle-biologico-](https://correio.rac.com.br/_conteudo/2020/07/campinas_e_rmc/968580-controle-biologico-cresce-e-ganha-forca.html#)
610 [cresce-e-ganha-forca.html#](https://correio.rac.com.br/_conteudo/2020/07/campinas_e_rmc/968580-controle-biologico-cresce-e-ganha-forca.html#)

- 611 Cruz, J. C., Filho, I. A. P., Pimentel, M. A. G., Coelho, A. M., Karam, D., Cruz, I., Garcia, J.
612 C., Moreira, J. A. A., Oliveira, M. F., Neto, M. M. G., Albuquerque, P. E. P., Viana, P. A.,
613 Mendes, S. M., Costa, R. V., Alvarenga, R. C., Matrangolo, W. J. R. 2011. Produção de Milho
614 na Agricultura Familiar. Embrapa, Sete Lagoas, MG, Circular Técnica, 159, 1-42.
- 615 Dinardo-Miranda, L. L., Dinardo Miranda, I. 2018. Nematoides. Milho. 40 pg. [On line].
616 [http://www.nematoides.com.br/Content/Fotos/3JUL-CartilhaNemat%C3%B3ides-](http://www.nematoides.com.br/Content/Fotos/3JUL-CartilhaNemat%C3%B3ides-atualizada.compressed.pdf)
617 [atualizada.compressed.pdf](http://www.nematoides.com.br/Content/Fotos/3JUL-CartilhaNemat%C3%B3ides-atualizada.compressed.pdf)
- 618 Dijksterhuis, J., Veenhuis, M., Harder, W., Nordbring-Hertz, B. 1994. Nematophagous fungi:
619 physiological aspects and structure-function relationships. *Advances in Microbial Physiology*
620 36, 111-143.
- 621 Ferraz, L. C. C. B., Brown, D. J. F. 2016. *Nematologia de plantas: fundamentos e importância*.
622 Manaus: NORMA EDITORA, 251 pp.
- 623 Ferreira, L. P., Salgado, C. L. 1995. Bactérias. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H., Amorim, L.
624 (ed) *Manual de Fitopatologia*. Editora Agronômica Ceres, Piracicaba, SP, p. 97-131.
- 625 Freitas, L. G., Ferraz, S., Almeida, A. M. S. 1999. Controle de *Meloidogyne javanica* em
626 tomateiro pela produção de mudas de tomateiro em substrato infestado com *Paecilomyces*
627 *lilacinus*. *Nematologia Brasileira* 23, 1, 65-73.
- 628 Galbieri, R., Asmus, G. L. 2016. Principais espécies de nematoides do algodoeiro no Brasil. In:
629 Galbieri, R.; Belot, J. L. (ed.) *Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros:*
630 *Biologia e medidas de controle*. Instituto Mato-grossense do Algodão – IMAmt, Cuiabá, Brasil,
631 p. 11-36.
- 632 Galbieri, R., Inomoto, M. M., Silva, R. A., Asmus, G. L. 2012. Os nematoides na cultura do
633 algodoeiro em Mato Grosso. In: Belot, J. L. (ed). *Manual de boas práticas de manejo do*
634 *algodoeiro em Mato Grosso*. Cuiabá: IMAmt: AMPA, p. 150-161.
- 635 Gray, N. F. 1988. Fungi attacking vermiform nematodes. In: Poinair J., Jason, H. B. (eds.).
636 *Diseases of nematodes*, 2nd edition, Boca Raton: CRC Press, p. 3-38.

- 637 Greco, N., Di Vito, M. 2009. Population dynamics and damage levels. In: Perry, R. N., Moens,
638 M., Starr, J. L. (ed). Root-knot nematodes. CAB International, p. 246-274.
- 639 Inomoto, M. 2015. Perdas acarretadas por nematoides podem, com precaução, ser evitadas.
640 Visão Agrícola 13, 116-119.
- 641 Inomoto, M. M., Asmus, G. L. 2006. Manejo de nematoides une resistência, rotação e
642 nematicidas. Visão Agrícola 6, 47-50.
- 643 Jansen-Girgan, C., Claassens, S., Fourie, H. 2016. In vitro evaluations to determine the effect
644 of *Bacillus firmus* strains on the motility of *Meloidogyne incognita* second-stage juveniles.
645 Tropical Plant Pathology 41, 320-324.
- 646 Jatala, P. 1986. Biological control of plant-parasitic nematodes. Annual Review of
647 Phytopathology 24, 453-489.
- 648 Koenning, S. R., Overstreet, C., Noling, J. W., Donald, P. A, Becker, J. O., Fortnum, B. A.
649 1999. Survey of crop losses in response to phytoparasitic nematodes in the United States for
650 1994. Journal of Nematology 31, 4, 587–618.
- 651 Lima, Y. M. O. 2018. Atividade de inseticidas em tratamento de sementes sobre o manejo da
652 cigarrinha *Dalbulus maidis* (Delong e Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) e do pulgão
653 *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) (Hemiptera: Aphididae) em milho. [On line].
654 <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/22192/1/AtividadeInseticidasTratamento.pdf>
- 655 Levy, R.M., Homechin, M., Santiago, D.C., Cadioli, M.C., Baida, F.C. 2009. Reação de
656 genótipos de milho ao parasitismo de *Meloidogyne incognita* raça 1 e a *M. paranaensis*. Acta
657 Scientiarum Agronomy 31, 4, 575-578.
- 658 Machado, A. C. Z., Silva, S. A. 2019. Extração de nematoides. In: Machado, A. C. Z., Silva, S.
659 A., Ferraz, L. C. C. B. (ed). Métodos em Nematologia Agrícola. Sociedade Brasileira de
660 Nematologia, p. 9-12.

- 661 Machado, A. C. Z., Mattos, C. F. B. 2019. Coloração de Nematoides. In: Machado, A. C. Z.,
662 Silva, S. A., Ferraz, L. C. C. B. (ed). Métodos em Nematologia Agrícola. Sociedade Brasileira
663 de Nematologia, p. 95-101.
- 664 Machado, A.C.Z., Kaneko, L., Pinto, S.V. 2016. Controle Biológico. In: Galbieri, R.; Belot, J.
665 L. (ed.) Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de
666 controle. Instituto Mato-grossense do Algodão – IMAmt, Cuiabá, Brasil, p. 287-312.
- 667 Magalhães, P. C., Durães, F. O. M., Carneiro, N. P., Paiva, E. 2002. Fisiologia do Milho:
668 Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, p. 1-23.
- 669 MAPA. 2020. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Agrofit. [On line].
670 http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.
- 671 MAPA. 2020. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Mercado de biodefensivos
672 cresce mais de 70% no Brasil em um ano. [On line]. [https://www.gov.br/agricultura/pt-](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil)
673 [br/assuntos/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil).
- 674 Mattos, C. F. B. 2019. Efeito de produtos biológicos na população de *Meloidogyne incognita*
675 em soja na biomassa microbiana do solo. [On line].
676 [https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalh](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=7585546)
677 [oConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=7585546](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=7585546)
- 678 Mattos, C. F. B., Zeni, F., Dadazio, T. S., Silva, S. A., Machado, A. C. Z. 2015. Votivo®
679 (*Bacillus firmus*) no controle de *Meloidogyne incognita* em algodoeiro. [On line].
680 <http://nematologia.com.br/files/uploads/2015/06/anaisc3bn32.pdf>
- 681 Matunaga, D. S. 2019. Efeito do tempo de armazenamento na eficiência de controle de
682 *Meloidogyne javanica* em sementes de soja tratadas com nematicidas biológicos. [On line].
683 [https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalh](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=8708055)
684 [oConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=8708055](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=8708055)

- 685 Matunaga, D.S., Silva, S.A., Machado, A.C.Z. 2018. Viabilidade do tratamento de sementes de
686 milho com *Bacillus firmus* armazenadas em câmara fria no controle de *Meloidogyne incognita*.
687 [On line]. http://www.infobibos.com/anais/cbn/35/Resumos/Resumo35CBN_0077.pdf
- 688 Mueller, J. D., Kirkpatrick, T., Overstreet, C., Koenning, S., Kemerait, B., Nichols, B. 2012.
689 Managing nematodes in cotton-based cropping systems. [On line].
690 [http://www.cottoninc.com/fiber/AgriculturalDisciplines/Nematology/2012-Managing-](http://www.cottoninc.com/fiber/AgriculturalDisciplines/Nematology/2012-Managing-Nematodes/2012-Managing-Nematodes-PDF.pdf)
691 [Nematodes/2012-Managing-Nematodes-PDF.pdf](http://www.cottoninc.com/fiber/AgriculturalDisciplines/Nematology/2012-Managing-Nematodes-PDF.pdf)
- 692 Nicol, J. M., Turner, S. J., Coyne, D. L., Nijs, L. D., Hockland, S., Tahna Maafi, Z. 2011.
693 Current nematode threats to world agriculture. In: Jones, J., Cheysen, G, Fenoll, C. (eds).
694 Genomics and molecular genetics of Plant-Nematode Interactions. Berlin: Springer, p. 21-43.
- 695 Nunes, H. T., Monteiro, A. C., Pomela, A. W. V. 2010. Uso de agentes microbianos e químico
696 para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja. *Acta Scientiarum. Agronomy* 32, 403-409.
- 697 Oliveira, C. M. G., Kubo, R. K. 2007. Reconhecimento, danos e controle dos nematóides
698 parasitos da cana-de-açúcar: nematóides parasitos da cana-de-açúcar. Instituto Biológico, 1-19.
- 699 Oliveira, L.F.C., Barbosa, G.G., Meirieli, P.M., Silva, S.A., Machado, A.C.Z. 2015. Votivo®
700 (*Bacillus firmus*) no controle de *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus brachyurus* em milho.
701 [On line]. <http://nematologia.com.br/files/uploads/2015/06/anaiscbn32.pdf>
- 702 R Core Team. 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation
703 for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from: <URL [https://www.R-](https://www.R-project.org/)
704 [project.org/](https://www.R-project.org/)>. [20 Feb 2019].
- 705 Ribeiro, D. F., Barbosa, G. G., Meirieli, P. M., Silva, S. A., Machado, A. C. Z. 2015. Votivo®
706 (*Bacillus firmus*) no controle de *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus brachyurus* em soja.
707 [On line]. <http://nematologia.com.br/files/uploads/2015/06/anaiscbn32.pdf>
- 708 Santiago, D. C., Homechin, M., Silva, J. F. V., Ribeiro, E. R., Gomes, B. C., Santoro, P. H.
709 2006. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thorn.) Samson para controle de
710 *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. *Ciência Rural* 36, 4, 1055-1064.

- 711 Shapiro, S. S., Wilk, M. B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples).
712 *Biometrika* 52, 591–611.
- 713 Silva, R. A., Machado, A. C. Z., Santos, T. F. S., Silva, R. G. 2019. Nematoides no sistema de
714 produção. *Boletim de Pesquisa Fundação MT, Rondonópolis, MT*, p. 191 - 210.
- 715 Soares, P. L. M. 2006. Estudo do controle biológico de fitonematóides com fungos
716 nematófagos. [On line]. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/102317>
- 717 Sologuren, L. 2015. Importância: demanda mundial cresce e Brasil tem espaço para expandir
718 produção. In: Caixeta Filho, J. V., Nussio, L. G. *Visão Agrícola* 13, 8.
- 719 Stafford, W. H. L., Baker, G. C., Brown, S. A., Burton, S. G., Cowan, D. A. 2005. Bacterial
720 diversity in the rhizosphere of proteaceae species. *Environmental Microbiology* 7, 1755-1768.
- 721 Stirling, G.R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes: Progress, problems and
722 prospects. Wallingford: CAB International, 282 p.
- 723 USDA. 2020. 12º levantamento USDA da safra 2019/20 - abril/20. file-20200312195652-
724 boletimsojamarco2020.pdf
- 725 Vizentini, L. R., Vidal, R. L., Kobayashi, B. F., Thomazelli, G. S., Ferreira, R. J., Soares, P. L.
726 M. 2017. Avaliação *in vitro* de produtos biológicos sobre *Meloidogyne incognita*. [On line].
727 <http://www.adaltech.com.br/anais/siconbiol2017/resumos/R0010-370.html>

CAPÍTULO 4



Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- Os atributos físicos e químicos do solo, e nutrição do hospedeiro, influenciou a morfologia e morfometria das populações de *Pratylenchus* estudadas, pois estas, apresentaram alguns parâmetros fora das médias apontadas pela literatura, formando grupos distintos mesmo quando analisadas filogeneticamente;
- Somente com a utilização da taxonomia integrativa foi possível caracterizar as populações de *Pratylenchus* coletadas em usinas de cana-de-açúcar na região Nordeste do Brasil, afirmar que *P. zae* é a espécie presente, e que as análises morfométricas aliadas a ferramentas biomoleculares foi útil para o diagnóstico da espécie e para identificar a variabilidade dentro e entre populações de *P. zae*;
- *Purpureocillium lilacinum* e *P. chlamydosporia* causaram maior mortalidade de *P. zae* e *M. incognita*, tanto 24 quanto 48 horas nos testes *in vitro*;
- *Pochonia chlamydosporia* proporcionou menor penetração de *P. zae* por planta aos 7 DAI;
- Os tratamentos com *P. lilacinum* e *P. chlamydosporia* proporcionaram menor penetração de *M. incognita* na densidade de 6000 nematoides por planta;
- Todos os nematicidas biológicos reduziram a população de *M. incognita* nas densidades de 667 e 6.000 nematoides por planta;
- *Bacillus firmus* proporcionou o menor FR na densidade de 2.000 nematoides por planta, sendo mais eficiente em reduzir a multiplicação de *M. incognita* aos 60 DAI;
- O tratamento à base de *P. chlamydosporia* apresentou menor valor de massa fresca de raiz, e a utilização dos diferentes nematicidas com as densidades de inóculo reduziram a massa seca de parte aérea em relação a testemunha absoluta.