

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE AGRONOMIA**

**GREICIELLI AGUILLAR SANCHES**

**MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE *Pratylenchus brachyurus* EM CILINDROS DE  
CENOURA**

**Uberlândia – MG  
Junho-2009**

**GREICIELLI AGUILLAR SANCHES**

**MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE *Pratylenchus brachyurus* EM CILINDROS DE CENOURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Maria Amelia dos Santos

**Uberlândia – MG  
Junho - 2009**

**GREICIELLI AGUILLAR SANCHES**

**MULTIPLICAÇÃO IN VITRU DE *Pratylenchus brachyurus* EM CILINDROS DE CENOURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Maria Amelia dos Santos

Aprovado pela Banca Examinadora em 04 de Junho de 2009

Prof. Dr. Jonas Jäger Fernandes  
Membro da Banca

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz  
Membro da Banca

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Amelia dos Santos  
Orientadora

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por estar sempre comigo.

À minha família que sempre esteve ao meu lado me apoiando.

Aos meus amigos que fizeram parte dessa conquista.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Amelia dos Santos, que me auxiliou nesse trabalho.

À Universidade Federal de Uberlândia e aos demais professores que participaram da minha formação profissional.

À 39<sup>o</sup> turma de Agronomia da UFU, de maneira muito especial, por esses anos de amizade.

## RESUMO

O presente trabalho verificou a eficiência da multiplicação *in vitro* de *Pratylenchus brachyurus* em cilindros centrais de raiz de cenoura através da técnica de Moody, Lownsbery e Ahmed (1973) com modificações, conforme descrito por Gonzaga, Santos e Costa (2006). O experimento foi conduzido no Laboratório de Nematologia Agrícola da Universidade Federal de Uberlândia, no primeiro semestre de 2009. Foram inoculados sete nematóides, previamente axenizados, por cilindro de cenoura com 30 mm de comprimento e 15 mm de diâmetro. No preparo desses cilindros, os mesmos foram imersos em hipoclorito de sódio a 0,5% por 30 min. Os vinte e cinco cilindros foram colocados verticalmente em vidros esterilizados pela autoclavagem por 30 min a 120 °C e 1 atm, e após 5 dias, foram observados e detectados oito cilindros de cenoura contaminados. Os 17 cilindros restantes foram inoculados com os nematóides e colocados na câmara de incubação no escuro, por 90 dias. Após esse período, houve o processamento dos cilindros de cenoura pela técnica do liquidificador doméstico (BONETI; FERRAZ, 1981) e realizou-se a contagem dos nematóides na câmara de Peters. Ocorreu a multiplicação do nematóide em 15 cilindros que correspondem a 88% de eficiência. Os aumentos populacionais variaram entre 18 a 2071 vezes, em relação à população inicial de sete nematóides. Constatou-se presença de correlação positiva entre a severidade das lesões encontradas nos cilindros de cenoura e a taxa de multiplicação de *Pratylenchus brachyurus*, ou seja, quanto maior severidade maior era a taxa de multiplicação do nematóide. A utilização de cilindros centrais de cenoura para multiplicação de *Pratylenchus brachyurus* mostrou-se um método simples, rápido e que possibilita boa multiplicação do nematóide.

**PALAVRAS - CHAVE:** nematóides das lesões, *Daucus carota* L., reprodução.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	06
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	08
2.1 O gênero <i>Pratylenchus</i> .....	08
2.2 Medidas de controle.....	09
2.3 Multiplicação de <i>Pratylenchus brachyurus</i> em condições de laboratório.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	13
3.1 Obtenção do inóculo inicial de <i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	13
3.2 Axenização do inóculo inicial de <i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	13
3.3 Preparo dos cilindros centrais de raízes de cenoura.....	14
3.4 Inoculação e manutenção do nematóide nos cilindros centrais de raízes de cenoura.....	14
3.5 Avaliação de sintomas nos cilindros centrais de raízes de cenoura e multiplicação do nematóide.....	14
3.6 Análise estatística.....	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	17
5 CONCLUSÕES .....	23
REFERÊNCIAS .....	24

## 1 INTRODUÇÃO

Os nematóides são animais de tamanho diminuto e de aspecto vermiforme, que vivem nos mais diferentes ecossistemas terrestres e aquáticos. Dentro deste grupo, existem aqueles de grande importância agrônômica, por serem parasitas de plantas, vivendo no solo, ou no interior de estruturas vegetais como folhas, caules e principalmente raízes. Estes são caracterizados por possuírem uma estrutura conhecida como estilete. Com a utilização do estilete, esses nematóides introduzem substâncias enzimáticas nas células vegetais, digerindo o seu conteúdo e em seguida, sugam o líquido resultante (ROSSI, 2001).

Dentre os nematóides parasitas de plantas, o gênero *Pratylenchus* Filipjev, 1936 têm importância significativa. Isto se deve a sua ampla distribuição geográfica e por parasitarem várias culturas de expressivo interesse econômico como soja, milho, algodão, fumo, trigo, alfafa, maçã, pêsego, citrus entre outras. Além disso, apresentam muitas plantas infestantes, como hospedeiras alternativas, possibilitando que a sobrevivência dos mesmos em períodos de entressafra seja facilitada. Pelos motivos apresentados, este gênero é considerado no Brasil e no mundo, como o segundo grupo de fitonematóides na ordem de importância econômica (FERRAZ, 1999). Em levantamento realizado por Café Filho e Huang (1988), no Brasil, espécies de *Pratylenchus* estavam presentes em 9% de um total de 3.000 amostras analisadas, sendo que *P.brachyurus* (Godfrey) Filipjeve Sch. Stekhoven; foi à espécie de maior ocorrência, seguida por *P.zaeae* Graham, 1951 e *P. coffeae* (Zimmermann, 1898) Goodey, 1959.

De acordo com Tihohod (2000), este gênero apresenta em torno de 60 espécies, sendo que, no Brasil pelo menos 10 já foram observadas. Popularmente, nematóides desse gênero é conhecido como sendo os das lesões radiculares, pois os sintomas observados nas plantas resultam do processo de parasitismo, constituindo-se em lesões necróticas nas raízes ou em outros órgãos subterrâneos. A princípio essas lesões são pequenas, mas com o avanço do ataque, gradualmente aumentam de tamanho, favorecendo cada vez mais o acesso de outros microrganismos e a destruição do sistema radicular por completo. As plantas atacadas por espécies de *Pratylenchus* permanecem com hastes finas e sistema radicular deficiente, e assim não se desenvolvendo bem o que culmina em redução de produção e prejuízo para o produtor.

O controle de *P. brachyurus* é bastante difícil e a busca por linhagens resistentes é uma alternativa que programas de melhoramento genético de plantas vêm explorando. A

produção e disponibilidade de inóculo desses nematóides em quantidade suficiente para atender as pesquisas constituem como limitações para o andamento dos ensaios. Frequentemente quando amostras vindas do campo são usadas para obtenção de inóculo, apresentam mais de uma espécie de fitonematóide, o que compromete os estudos, que necessitam de culturas puras. A multiplicação de uma subpopulação *in vitro*, que pode partir de poucos indivíduos, facilita a separação das espécies e permite a multiplicação de fitonematóides.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade da multiplicação de *P. brachyurus* em cilindros centrais de cenoura, como forma de obtenção de inóculo puro e em quantidade compatível com necessidades de ensaios.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O gênero *Pratylenchus*

Segundo Goulart (2009b), os nematóides das lesões radiculares pertencentes ao gênero *Pratylenchus*, ocupam o segundo lugar entre todos os nematóides parasitas de plantas. *P. brachyurus* são endoparasitos migratórios que causam redução no sistema radicular e, como resultado das atividades de penetração e alimentação, lesões pequenas de coloração escura que podem ser visualizadas no interior das raízes. Os sintomas podem ser agravados na presença de fungos causadores de podridões radiculares (PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIM, 1998).

Várias espécies de fitonematóides já foram registradas no Brasil, associadas às raízes de cana-de-açúcar. Entre aquelas cuja patogenicidade à cana-de-açúcar é conhecida, o gênero *Pratylenchus* se destaca por ser amplamente disseminado (NOVARETTI et al., 1974). Dinardo-Miranda e Menegatti (2003) estimaram que na cultura da cana-de-açúcar, os danos causados pelos nematóides foram superiores a 20% da produção. Estes danificam o sistema radicular das plantas, chegando a comprometer a absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, o seu desenvolvimento. Segundo Sharma (1997, apud PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIM, 1998), nas regiões de plantio irrigado do Estado de Minas Gerais, especialmente na região de Paracatu, *P. brachyurus* é facilmente encontrado causando danos às plantas, estando normalmente associado ao nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp. Goeldi) e ao nematóide espiralado (*Helicotylenchus dihystera* Steiner).

De todas as espécies de nematóides que atacam a cultura do milho, aquelas pertencentes ao gênero *Pratylenchus* são as mais frequentes nas lavouras, destacando-se *P. brachyurus* e *P. zae* (LORDELLO, 1984).

Nos últimos anos, os nematóides das lesões radiculares têm causado perdas econômicas extremamente preocupantes em diversas culturas e em várias regiões do Brasil, especialmente na região Centro-oeste, no Domínio do Cerrado. As causas desse aumento de importância econômica no caso de *P. brachyurus*, podem estar relacionadas com ausência de rotação de culturas, com cultivo contínuo de uma mesma espécie vegetal, rotação ou sucessão com culturas que são boas hospedeiras do nematóide. Entre outros prováveis fatores, também

contribuíram para o aumento dos níveis populacionais de nematóides do gênero *Pratylenchus* no solo: sistema de "plantio direto" ou cultivo mínimo, mantendo o solo com umidade mais elevada e adequada para os nematóides; uso mais freqüente de solos com textura arenosa ou média; a compactação de solo prevalente em solos sob plantio direto; uso de irrigação, que viabiliza até três safras anuais nas áreas com este recurso; desbalanço nutricional; ocorrência simultânea de outros fitonematóides e de outros patógenos como *Fusarium oxysporum* Schlecht. e *Rhizoctonia solani* Kuhn, que se aproveitam dos danos às raízes, aumentando a severidade de podridões ou de murchas vasculares (GOULART, 2009a).

## 2.2 Medidas de controle

A primeira medida importante para o controle de *Pratylenchus brachyurus* é evitar a contaminação de áreas de cultivo. A lavagem de máquinas e implementos agrícolas para retirada de torrões aderidos que podem conter o nematóide antes do seu uso na lavoura, contribui para evitar a disseminação (TIHOHOD, 2000).

Observa-se que os métodos culturais como rotação de culturas e emprego de plantas antagonicas têm tido destaque, dentre as alternativas recomendadas, para o controle desses fitonematóides. O uso de plantas com efeito antagonico a fitonematóides, utilizadas em plantio intercalado, consorciado ou em rotação, contribui para o manejo efetivo de áreas contaminadas. O efeito de tais plantas é exercido pelos exsudatos radiculares tóxicos e/ou por mecanismos de resistência, que impedem o desenvolvimento e reprodução do nematóide no sistema radicular (PEACOCK, 1959).

Além disso, a decomposição da matéria orgânica incorporada favorece a proliferação de inimigos naturais, além de liberar substâncias, com efeito nematicida (BADRA et al., 1979). Algumas plantas contêm na parte aérea compostos nematicidas pré-formados, que podem contribuir para o controle de nematóides após a incorporação, além de atuarem contra patógenos de solo (RODRÍGUEZ-KÁBANA et al., 1994). As atividades de seus metabólicos têm papel ecológico freqüentemente associado com a sobrevivência e competição com outros organismos (HARBOURNE, 1988). Algumas dessas substâncias têm sido purificadas e identificadas, como o ácido asparagúsico, 2,5-(diidroximetil)-3,4-diidroxipirrolidina, bursaermina, atertienil e L-dopa, que foram isoladas de extratos das plantas *Asparagus officinalis* L., *Lonchocarpus costaricensis* Pittier, *Bupleurum salicifolium* Brown, *Tagetes*

spp. e *Mucuna aterrima* Merr., respectivamente (BARCELOS et al., 1997; GONZÁLEZ et al., 1994). Alguns trabalhos já evidenciaram redução da população de nematóides no solo com a utilização de extratos vegetais (COSTA et al., 2000), óleos essenciais (LEELA et al., 1992) e a própria ação antagônica de algumas espécies vegetais sobre a população de nematóides (MOURA et al., 1990). Mello et al., (2006), estudaram o potencial de controle que a erva de-Santa-Maria exerce sobre *Pratylenchus brachyurus*, e verificaram que esta espécie vegetal é eficiente tanto como opção de rotação de culturas quanto pela aplicação do extrato vegetal ao solo. Entretanto, os resultados mostraram que é mais útil no controle de *P. brachyurus* quando incorporada ao solo do que quando utilizada em rotação de culturas. A utilização de crotalária como adubo verde também tem-se mostrado eficiente no controle de *Pratylenchus brachyurus*, por serem más hospedeiras, muitas vezes consideradas antagônicas aos fitonematóides das lesões. As leguminosas são, geralmente as plantas mais utilizadas na adubação verde devido ao aumento do teor de nitrogênio no solo por fixação biológica e ainda por contribuir para reciclagem de nutrientes (ALCÂNTARA et al., 2000).

O melhoramento genético vegetal para resistência à *Pratylenchus* é considerado difícil, provavelmente porque são em geral, parasitos muito polípagos e relativamente pouco especializados (mais primitivos), de hábito endoparasita migrador, não se fixando na planta hospedeira, sempre móveis (GOULART, 2009b).

### **2.3 Multiplicação de *Pratylenchus brachyurus* em condições de laboratório**

*Pratylenchus* é um fitonematóide cuja reprodução, na maioria das vezes, ocorre na ausência de machos, que são raros entre as espécies. O ciclo de vida de *P. brachyurus* pode ser completado em menos de 30 dias, sob condições de temperatura entre 26,7 °C e 32,2°C (COSTA; RITZINGER, 2000).

Culturas monoxênicas de nematóides em plântulas, raízes excisadas ou calos vegetais, constituem o método tradicional para multiplicação e manutenção de fitonematóides em condições estéreis (CASTRO; FERRAZ, 1989a).

A multiplicação in vitro de nematóides parasitas de plantas, como *Ditylenchus dipsaci*, pode ocorrer em calos de alfafa e produzir grande quantidade de indivíduos (FAULKNER et al., 1974; KRUSBERG, 1960; KRUSBERG, 1961; PHILIPPI; PICHARD, 1988; RIEDEL; FOSTER, 1970; RIEDEL et al., 1973; WEBSTER, 1967; WEBSTER; LOWE, 1966).

Faulkner e colaboradores (1974) relataram que para a raça alfafa de *D. dipsaci*, após 25 dias e partindo de 3.200 nematóides por cultura de calo de alfafa, obtiveram o pico populacional de cerca de 253.000 nematóides a 22,5 °C. Essa taxa de multiplicação de aproximadamente 79 vezes, foi o triplo daquela obtida no trabalho de Krusberg (1961), que diferenciou apenas a temperatura, que foi de 25 °C.

Reise et al., (1987), utilizaram calos de cenoura como meio de cultura de nematóides endoparasitas, incluindo *P. brachyurus*. O método se mostrou viável para multiplicação das espécies testadas, excetuando-se, *Radopholus similis*. Concluíram que calos de cenoura foram de fácil manipulação e produziram um número maior de nematóides do que calos de alfafa, explantes de raiz e discos de cenoura. Os calos de cenoura com o seu crescimento podem ser subdivididos em várias placas filhas, e assim elimina a necessidade de começar com novo material vegetal como nas culturas de calo de alfafa.

Segundo Boncato e David (1980), Chitambar e Raski (1985) e Towson e Lear (1982), e a utilização de discos de cenoura proporcionaram resultados satisfatórios como alternativa para propagação de alguns nematóides endoparasitas. O' Bannon e Taylor (1968) utilizaram discos de cenoura em várias placas de Petri que continham agar-água 1% com substrato para *Radopholus similis* e *Pratylenchus brachyurus* e concluíram que o método foi rápido e eficiente para obtenção de altas populações desses nematóides, sem haver perda de patogenicidade. Moody et al., (1973), modificaram a técnica e colocaram vários discos de cenoura em vidros, na ausência de agar-água, e obtiveram bons resultados na multiplicação de *Pratylenchus vulnus* Allen e Jensen. Verdejo-Lucas e Pinochet (1992) mencionaram que o modo de reprodução das espécies de *Pratylenchus* pode influenciar na multiplicação dos nematóides in vitro, sendo que as espécies anfimíticas podem se multiplicar mais que as partenogênicas, que é o caso do *P. vulnus*.

Em geral, as culturas são mantidas em boas condições por um período de 2 meses sem a necessidade de subculturas (KOSHI; SOSAMMA, 1981; O' BANNON; TAYLOR, 1968). Entretanto em todos os casos, ocorre a exaustão dos tecidos e é necessário a transferência dos nematóides para novas culturas (CASTRO; FERRAZ, 1989).

Gonzaga et al., (2006), utilizando seis espécies mais comuns de *Pratylenchus* que ocorrem no Brasil, sendo, *P. brachyurus*, *P. zaeae*, espécies partenogênicas; *P. coffeae*, *P. vulnus*, *P. penetrans* (Cobb) Filipejev e Schuurmans Sterkhoven, *P. jaehni* Inserra, Duncan, Troccoli, Dunn, Santos, Kaplan e Vovlas, espécies anfimíticas. Para as espécies anfimíticas, foram inoculados 20 fêmeas e 10 machos e para as espécies partenogênicas 20 fêmeas foram inoculadas em cilindros de cenoura de 30 mm de comprimento por 15 mm de diâmetro

em recipiente de 180 mL de capacidade (110 mm de altura por 55 mm de diâmetro), ao invés de utilizar discos como descrito por Moody et al., (1973). Verificaram que embora *P. jaehni*, tenha exibido menor população final, as outras espécies anfimíticas apresentaram maiores médias populacionais finais, mas não diferiram entre si e nem de *P. zaeae* (espécie partenogenética). Essa técnica apresenta vantagens em relação ao método que utiliza discos, devido ao maior comprimento do cilindro central da raiz da cenoura que possibilitando maior tempo de incubação, pois o volume de tecido a ser colonizado é maior.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nematologia Agrícola da Universidade Federal de Uberlândia, durante o primeiro semestre de 2009, com a finalidade de multiplicação de *Pratylenchus brachyurus* em cilindros centrais de raízes de cenoura.

#### 3.1 Obtenção do inóculo inicial de *Pratylenchus brachyurus*

Inicialmente, os nematóides foram extraídos das raízes de quiabeiro (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) pela técnica do liquidificador doméstico (BONETI; FERRAZ, 1981). As raízes foram fragmentadas e colocadas no copo do liquidificador contendo solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % (1 parte de água sanitária para 4 partes de água). Procedeu-se a trituração, na menor velocidade durante 20 segundos, após esse período, a suspensão passou por um conjunto de peneiras, de 100 e 500 mesh, respectivamente sobrepostas. O resíduo da peneira de 500 mesh foi recolhido, com auxílio de uma pisseta com água para um copo de Becker, originando a suspensão que serviu como fonte de inóculo inicial.

#### 3.2 Axenização do inóculo inicial de *Pratylenchus brachyurus*

A partir da obtenção dos nematóides, foi realizada a sua axenização pela técnica de Mountain (1955), com modificações. Os juvenis e/ou adultos do nematóide foram transferidos da suspensão original com auxílio de uma micropipeta para vidros do tipo BPI contendo 600 µL da solução de antibiótico, preparada com sulfato de estreptomicina a 0,1 %, e após 10 min de repouso nessa solução, houve a remoção do excesso de solução através de uma seringa, e adição de 200 µL de água destilada e esterilizada. Após 5 min, foi removido o excesso de água e adicionados 200 µL da solução do mesmo antibiótico anterior ao BPI, por mais 10 min. Os nematóides foram inoculados sob condições assépticas no topo dos cilindros de cenoura, e colocados verticalmente em recipiente de vidro.

### **3.3 Preparo dos cilindros centrais de raízes de cenoura**

Foram preparados previamente à axenização, 25 cilindros de cenoura pela técnica de Moody et al., (1973) com modificações, conforme descrito por Gonzaga, Santos e Costa (2006). Essas modificações constaram do preparo do cilindro central de cenoura de 30 mm de comprimento por 15 mm de diâmetro, em vez de discos de 2 a 4 mm de espessura, como descritos por Moody, Lownsbery e Ahmed (1973). As cenouras foram previamente imersas em hipoclorito de sódio a 0,5% por 30 min (CHITAMBAR; RASKI, 1985), e, em seguida, em câmara de fluxo laminar foram cortadas com bisturi flambado, em cilindros de 30 mm de comprimento, mergulhados em álcool etílico comercial (92,8°), flambados, e em seguida, retirados os córtex dessas raízes.

Individualmente, esses cilindros centrais de raízes de cenoura, foram colocados em posição vertical em vidros previamente vedados com papel alumínio e autoclavados por 30 min a 121 °C e 1 atm. Foi evidenciada, inicialmente, a contaminação de oito cilindros após repouso de 5 dias e esses foram descartados. Os demais, sem contaminação, foram usados para inoculação dos nematóides.

### **3.4 Inoculação e manutenção do nematóide nos cilindros centrais de raízes de cenoura**

Foram transferidos sete juvenis e/ou adultos de *P. brachyurus* axenizados para o topo de cada cilindro central de raiz de cenoura. Após a inoculação, os cilindros foram mantidos a  $25 \pm 1$  °C em câmara de incubação, no escuro, por 90 dias.

### **3.5 Avaliação de sintomas nos cilindros centrais de raízes de cenoura e multiplicação do nematóide**

Após 90 dias da inoculação, os cilindros de cenoura foram observados para atribuição de notas para tecido lesionado de cada cilindro. As notas variaram de 1 a 6 (Figura 1), sendo que:

Nota 1: Ausência de sintomas;

Nota 2: Lesões individualizadas e em pouca quantidade;

Nota 3: Tecido com lesões claras no topo do cilindro;

Nota 4: Tecido com lesões escuras no topo do cilindro;

Nota 5: Necrose no topo do cilindro;

Nota 6: Necrose generalizada no cilindro

Após essa avaliação de sintomas, os cilindros de cenoura foram processados pela técnica do liquidificador doméstico. Os mesmos foram fragmentados e colocados no copo do liquidificador contendo solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % (1 parte de água sanitária para 4 partes de água). Procedeu-se a trituração na menor velocidade durante 20 segundos, após esse período, a suspensão passou por um conjunto de peneiras, de 100 e 500 mesh, respectivamente sobrepostas. O resíduo da peneira de 500 mesh foi recolhido, com auxílio de jatos de água de uma pisseta para um copo de Becker (BONETI; FERRAZ, 1981).

A suspensão obtida foi avaliada com auxílio da câmara de contagem de Peters no microscópio ótico determinando o número de ovos, juvenis e adultos de *Pratylenchus brachyurus*.

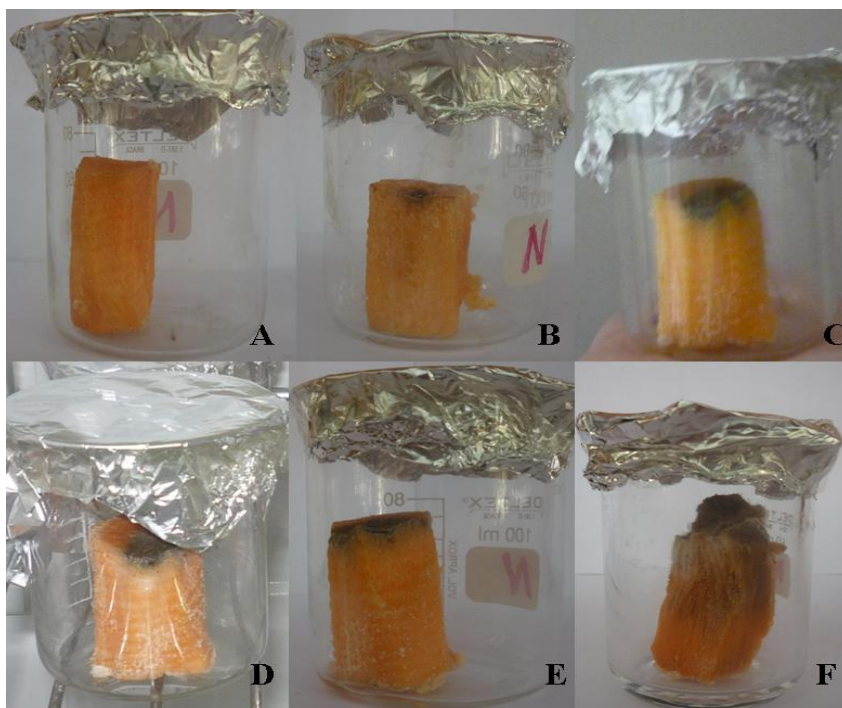


Figura 1: Notas de 1 a 6 dadas aos cilindros de cenoura, após 90 dias da incubação, considerando as lesões presentes. A - Nota 1; B - Nota 2; C - Nota 3; D - Nota 4; E - Nota 5; F - Nota 6.



### **3.6 Análise estatística**

Os dados de reprodução do nematóide foram analisados pela estatística descritiva. Foi realizado também, o teste de correlação, com os dados de reprodução do nematóide nos cilindros de cenoura e os sintomas apresentados nesses.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 25 cilindros preparados, oito apresentaram contaminação nos primeiros cinco dias e foram descartados. Os 17 cilindros de cenoura inoculados e incubados por 90 dias apresentam taxas de multiplicação variáveis (Tabela 1). A média calculada foi de 4415 ovos, juvenis e adultos de *P. brachyurus* por cilindro de cenoura com desvio-padrão de 5012,8.

Tabela 1: Número de ovos, juvenis e/ou adultos de *Pratylenchus brachyurus* determinado em cada cilindro central de cenoura após 90 dias de incubação. UFU, Uberlândia, 2009.

<b>Cilindros de cenoura</b>	<b>Juvenis/ Adultos</b>	<b>Ovos</b>	<b>Total de nematóides</b>
<b>1</b>	177	118	295
<b>2</b>	42	84	126
<b>3</b>	0	0	0
<b>4</b>	663	357	1020
<b>5</b>	200	300	500
<b>6</b>	0	0	0
<b>7</b>	3724	2352	6076
<b>8</b>	92	368	460
<b>9</b>	832	780	1612
<b>10</b>	1300	600	1900
<b>11</b>	7450	1400	8850
<b>12</b>	8400	1300	9700
<b>13</b>	8550	2400	10950
<b>14</b>	12376	1624	14000
<b>15</b>	13550	950	14500
<b>16</b>	455	975	1430
<b>17</b>	1495	2145	3640
<b>Média de total de nematóides = 4415</b>			
<b>Desvio Padrão = 5012,88</b>			

Pode-se observar que a técnica estudada apresentou resultados quanto à multiplicação de *Pratylenchus brachyurus* em 15 do total de 17 cilindros de cenoura (88%). Pode aumentar essa eficiência, estudando novo procedimento para reduzir contaminação e perda de cilindros de cenoura. A população inicial de sete nematóides por cilindro de córtex de cenoura foi aumentada no mínimo 18 vezes (cilindro 2), e no máximo de 2071 vezes (cilindro 15).

A partir do cálculo da razão entre população final e população inicial, que se refere ao fator de reprodução (FR), os valores são bem superiores a 1, indicando boa capacidade do cilindro de cenoura em permitir a multiplicação do nematóide.

Nos cilindros de cenoura foram observados danos visíveis iniciados aos 60 dias a partir da inoculação. Apresentavam pontuações escuras correspondentes ao local onde os nematóides foram inoculados. Tais danos indicam estabelecimento da população, conforme já descrito por Moody et al., (1973). Até 90 dias, essas lesões pontuais evoluíram e tomaram extensão significativa conforme a escala de notas utilizada.

Não foram observados sintomas para os cilindros 3 e 6, indicando o não estabelecimento da população, bem como a não multiplicação dos fitonematóides inoculados. O não sucesso desses dois cilindros corresponde a 11,8% de ineficiência para a técnica. De acordo com Koenning e Barker (1985), o tempo de exposição do nematóide ao tratamento com antibiótico, o espectro biocida do produto químico e a temperatura, são fatores importantes a considerar no processo de axenização. Visto que temperatura e reagentes químicos foram os mesmos, possivelmente ocorreu variação no tempo de exposição ao produto durante a axenização e inoculação, o que pode ter apresentado algum efeito tóxico a esses nematóides. Castro e Ferraz (1989 a), observaram efeito do cloreto de etoxietilmercúrio e sulfato de estreptomicina em nematóides do gênero *Tylenchorhynchus* Thorne e Malek, que permaneceram imóveis no fundo da placa de Petri contendo camada de agar-água com esses produtos, sendo poucos nematóides recolhidos na superfície superior dessa camada de agar.

A partir das notas atribuídas, realizou-se um teste de correlação dessas com a multiplicação do nematóide (Tabela 2), encontrando-se que há uma alta correlação positiva (Figura 2).

Tabela 2: Número total de nematóides de *Pratylenchus brachyurus* e notas atribuídas pelos sintomas apresentados pelo cilindro central de cenoura. UFU, Uberlândia, 2009.

<b>Cilindros de cenoura</b>	<b>Total de Nematóides</b>	<b>Notas</b>
1	295	2
2	126	2
3	0	1
4	1020	3
5	500	2
6	0	1
7	6076	4
8	460	2
9	1612	3
10	1900	3
11	8850	5
12	9700	5
13	10950	5
14	14000	6
15	14500	6
16	1430	3
17	3640	4
Fator de Correlação (r) = 0,94*		

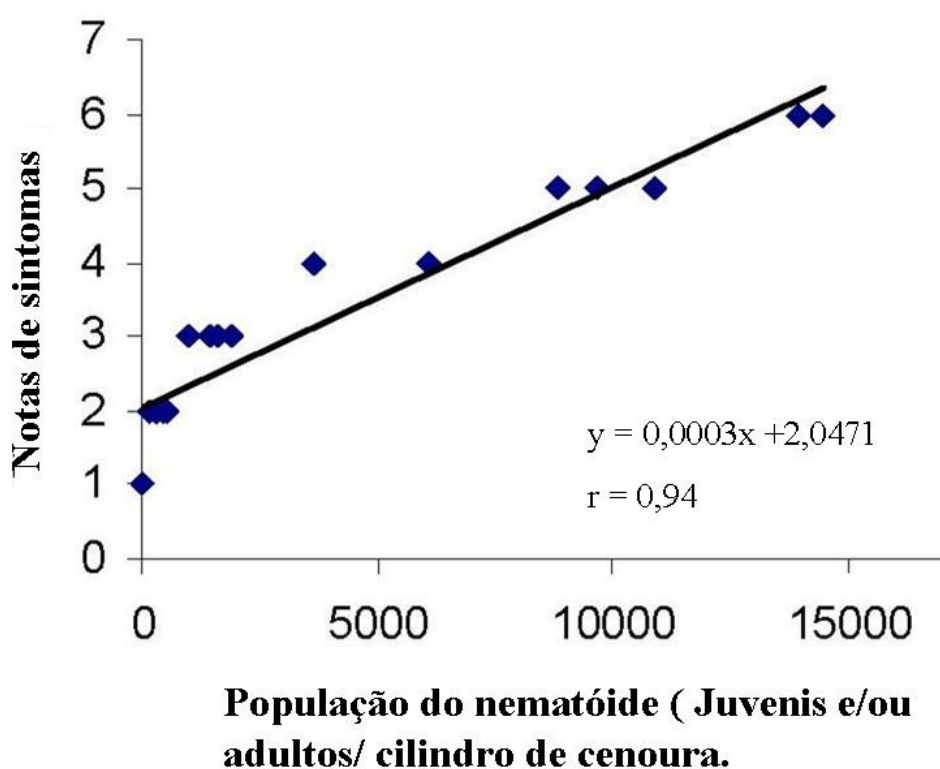


Figura 2: Número de nematóides de *Pratylenchus brachyurus* e notas atribuídas às lesões encontradas em cada cilindro central de cenoura.

Essa correlação positiva mostra que cilindros de cenoura apresentando sintomas com notas superiores, como a 6, corresponderam às maiores multiplicações do nematóide (Figura 3). Também indica que a obtenção de uma boa fonte de inóculo pode ser orientada pelos sintomas apresentados no cilindro de cenoura.

Concordando com Moody et al., (1973), confirma-se, portanto, que à medida que a população do nematóide aumenta, a necrose cresce e assume o aspecto de anasarca, de coloração marrom escura. O aumento da área da lesão é tanto mais rápido, quanto maior for a taxa de multiplicação da espécie do nematóide.

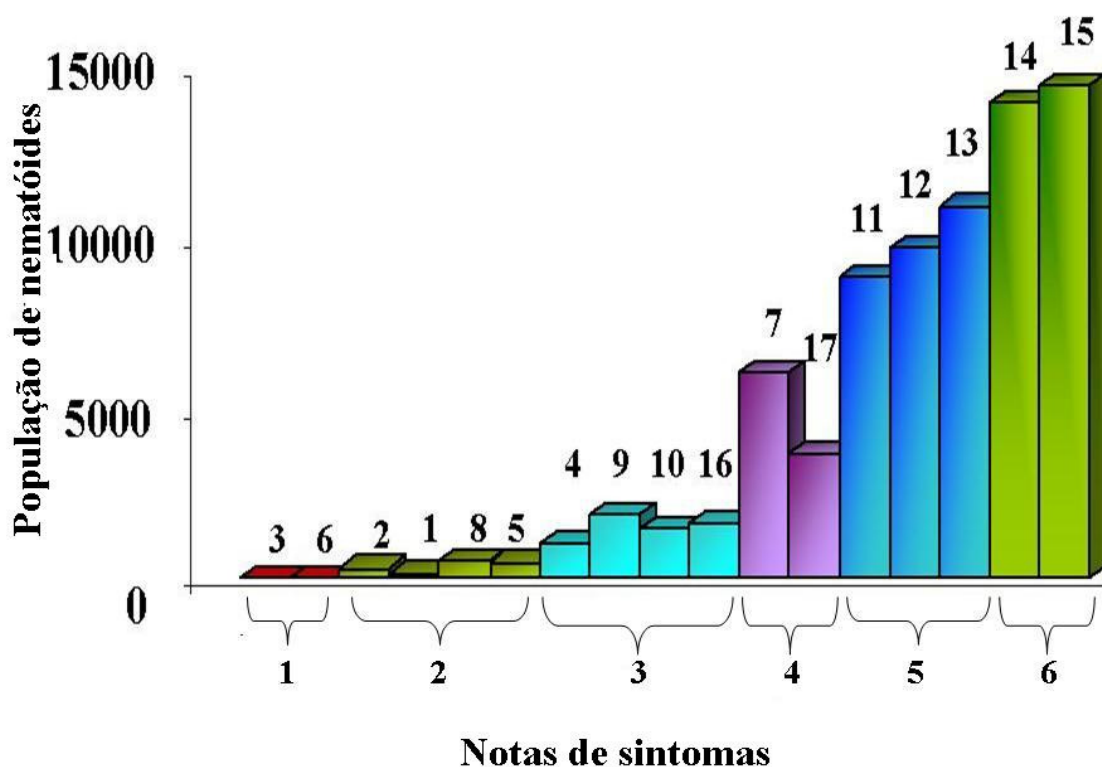


Figura 3: Notas de sintomas por faixa de população de nematóides nos cilindros centrais de raízes de cenoura. UFU, Uberlândia, 2009.

O'Bannon e Taylor (1968 b), também, verificaram que discos de cenoura em 1% agar foram apropriados para o cultivo de *Pratylenchus brachyurus*. Moody, Lownsbery, Ahmed (1973), realizaram a mesma observação para *P. vulnus*, além de mostrar ser bem mais fácil de preparo que o calo de alfafa.

Castro e Ferraz (1989 a) utilizando discos de cenoura na presença e ausência de água obteve a população final aumentada de no mínimo 11 vezes em relação à inicial em 60 dias de experimento. Entretanto, no uso de discos de cenoura ocorre exaustão dos tecidos e há necessidade de transferência dos nematóides para novas culturas após 60 dias, o que torna o processo muito trabalhoso e menos atrativo que a técnica utilizada no presente trabalho. Segundo Gonzaga et al., (2006), o uso de cilindros prolonga o tempo de armazenamento de 60 dias para 90 ou até 120 dias, possibilitando também maior taxa de reprodução. A possibilidade do tempo em até 120 dias pode ser comprovada pela nota máxima dada no presente trabalho (nota 6) em que o cilindro ainda apresentava tecido para ser colonizado.

A taxa máxima de multiplicação de *Pratylenchus brachyurus* de 630 vezes à população inicial é inferior à encontrada por Gonzaga et al., (2006), que utilizaram uma população inicial de 20 nematóides e encontraram uma taxa de multiplicação de 2280 vezes à população inicial, o que é compreensível devido ao maior número de nematóides no inóculo. Esse valor já era 141 vezes maior que a taxa de multiplicação dessa espécie obtida por Castro e Ferraz (1989a) em discos de cenoura. Para *P. zae* os cilindros de cenoura proporcionaram uma taxa de multiplicação 6900 vezes (GONZAGA et al., 2006), enquanto que essa espécie em discos de cenoura foi de apenas 145 vezes em relação ao número inoculado, conforme Castro e Ferraz (1989a).

A espessura do disco em relação ao cilindro justifica esse maior período de incubação. Conforme afirmado por Paula Júnior e Zambolim (1988), a atividade de alimentação de *Pratylenchus brachyurus* causam redução no sistema radicular, pois injetam substâncias nas células, digerindo-o seu conteúdo que é então sugado. Os discos de 2 a 4 mm de espessura, comparados com os cilindros de 30 mm de espessura, possui menor quantidade de tecido disponível para alimentação dos nematóides, restringindo assim sua reprodução, pela exaustão do tecido vegetal.

## 5 CONCLUSÕES

A utilização de cilindros centrais de raízes de cenoura para multiplicação de *Pratylenchus brachyurus* mostrou-se um método simples, rápido e proporcionou boa taxa de multiplicação do nematóide em questão.



## REFERÊNCIAS

- ALCANTÁRA, F.A.; NETO, A.E.F.; PAULA, M.B.; MESQUITA, H.A.; MUNIZ, J.A. Adubação verde na recuperação da fertilidade de um latossolo vermelho-escuro degradado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.35, p.277-288, 2000.
- BADRA, T.; SALEH, M.A.; OTEIFA, B.A. Nematicidal activity and composition of some organic fertilizers and amendments. **Revue Nématologie**, Bondy, v.2, p.29- 36, 1979.
- BONCATO, A. A.; DAVID, R. G. *Radopholus similis* on cavendish banana in Davao del Norte : II. Culture and pathogenicity. **Philippine Agriculturist**, Los Baños, v.63, n.2, p.120-125, 1980.
- BONETI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificações do método de Hussey e Baker para extração de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.6, p.553, 1981.
- CAFÉ FILHO, A. D.; HUANG, C.S. Nematóides de gênero *Pratylenchus* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 13, n.3, p.232-235, 1988.
- CASTRO, M.E. de A.; FERRAZ, S. Multiplicação in vitro de *Pratylenchus brachyurus* P. *zea*, *Radopholus similis*, e *Tylenchorhynchus sp.*, em discos de cenoura. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.13, p.31-38, 1989a.
- CASTRO, M.E de A.; FERRAZ, S. Avaliação de cinco métodos de axenização de *Pratylenchus brachyurus*, *P. zae*, *Radopholus similis* e *Thylenchorhynchus sp.* **Nematologia Brasileira**, Brasília DF, v.13, p.21-30, 1989b.
- CHITAMBAR, J.J.; RASK, D.J. Life history of *Pratylenchus vulnus* on carrot disks. **Journal of Nematology**, Lawrence, v.17, n.2, p.235-236, 1985.
- COSTA, D.C.; RITZINGER, C.H.S.P.. Nematóides e seu controle. In: REINHARDT; D.H; SOUZA, L.F.S; CABRAL, J.R.S. (Org). **Abacaxi Produção Aspectos técnicos**. 1º ed. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000, v. 7, p. 51-55.
- COSTA, M.J.N.; CAMPOS, V.P.; PFENNING, L.H.; OLIVEIRA, D.F. Patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne incognita* em tomateiros (*Lycopersicon esculentum*) com aplicação de filtrados fúngicos ou extratos de plantas e de esterco animais. **Nematologia Brasileira**, Brasília, DF, v.24, p.219-226, 2000.
- DINARDO-MIRANDA, L. L.; MENEGATTI C. C. Danos causados por nematóides a variedades de cana-de-açúcar em cana planta. **Nematologia Brasileira**, Brasília, DF, v.27, n.1, p.69-73, 2003.
- FAULKNER, L.R.; BOWER, D.B.; EVANS, D.W.; ELGIN, J.H.; ELGIN, JR. Mass culturing of *Ditylenchus dipsaci* to yield large quantities of inoculum. **Journal of Nematology**, Lawrence, v.6, n.2, p.126-129, 1974.

FERRAZ, L.C.C.B. Gênero *Pratylenchus* – os nematóides das lesões radiculares. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.7, p. 157-195, 1999.

GONZAGA, V.; SANTOS, J.M.; COSTA, M.A.F. Multiplicação de *Pratylenchus spp.* "in vitro" em cilindros de cenoura. In: 39º CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, Salvador. **Resumos...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, v.31 Suplemento, p.208, 2006.

GONZÁLEZ, J.A.; BRAUM, A.E.; REYES, R.E.; RAVELO, A.G. Inhibition of potato cyst nematode hatch by lignans from *Bupleurum salicifolium* (Umbeliferae). **Journal of Chemical Ecology**, São Paulo, v. 20, p.517-524, 1994.

GOULART, A.M.C. **Nematóides das lesões radiculares (Gênero *Pratylenchus*)**. Disponível em: <<http://www.agrosoft.org.br/agropag/103613.htm>>. Acesso em: 23 mar. 2009a.

GOULART, I.V.G.dos R. **Nematóides**. Disponível em: <<http://www.jardineiro.net/br/pragas/nematoide.php>>. Acesso em: 16 mar. 2009b.

HARBOURNE, J.B. (Ed.) **Introduction to Ecological Biochemistry**. London. Academic Press. 1988. 382p.

KOENNING, S.R.; BARKER, K.R.,1985. Gnotobiotic techniques for plant-parasitic nematodes. In: BARKER, K.R.; CARTER, C.C.; SASSER, J.N. (ed.). **An advanced treatise on Meloidogyne**. Raleigh, NC State University Graphics, vol. 2, p.49-66.

KOSHI, P.K.; SOSAMMA, V.K. Culturing of burrowing nematode *Radopholus similis* on carrot discs. **Indian Journal of Nematology**, New Delhi, v.10, n.2, p.247-249.

KRUSBERG, L.R. Hydrolytic and respiratory enzymes of species of *Ditylenchus dipsaci*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.50, p.9-22, 1960.

KRUSBERG, L.R. Studies on the culturing and parasitism of plant parasitic nematodes, in particular *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzemabosi* on alfafa tissues. **Nematologica**, Leiden, v.6, p. 181-200, 1961.

LEELA, N.K.; KHAN, R.M.; REDDY, P.P.; NIDIRY, E.S.J. Nematicidal activity of essential oils of *Pelargonium graveolens* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Mediterrânea**, Bari, v.20, p.57-58, 1992.

LORDELLO, L.G. E. **Nematóides das plantas cultivadas**. 8.ed. São Paulo: Nobel, 1984.

MELLO, A. F. S.; MACHADO, A. C. Z.; INOMOTO, M. M. Potencial de controle de Erva-de-Santa-Maria sobre *Pratylenchus Brachyurus*. **Fitopatologia brasileira**. Brasília, DF, vol.31 n.5 Sept./Oct. 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-41582006000500013&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-41582006000500013&script=sci_arttext)> Acesso em 19 mar. 2009.

MOODY, E.H.; LOWNSBERY, B.F.; AHMED, J.M. Culture of the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* on carrot disks. **Journal of Nematology**, Saint Paul, v.5, n.3, p.225-226, 1973.

MOUNTAIN, W.B. A method of culturing plant parasitic nematodes under sterile conditions. **Proceeding of the Helminthological Society of Washington**, Washington, DC, v.22, n.1, p.49-52, 1955.

MOURA, R.M.; OLIVEIRA, R.E.M.; MOURA, A.M. Reactions of ten plant species, some producers of essential oils, in relation to *Meloidogyne incognita* race 1 and *M. javanica* parasitism in mixed population. **Nematologia Brasileira**, Brasília, DF, v.14, p.39-44, 1990.

NOVARETTI, W. R. T.; ROCCIA, A. O. ; LORDELLO, L. G. E.; MONTEIRO, A.R. Contribuição ao estudo de nematóides que parasitam a cana-deaçúcar em São Paulo. In: REUNIÃO DE NEMATOLOGIA, 1º Piracicaba. **Trabalhos apresentados**. 1974. p.179-196.

O' BANNON, J. H.; TAYLOR, A. L. Migratory endoparasitic nematodes reared on carrot discs. **Phytopathology**, Saint Paul, v.58, n.3. p.385 , 1968.

PAULA JÚNIOR, T. J.; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JR, T. J.; BOREM, A. (Ed). **Feijão**. Viçosa: UFV, 1998. p.596.

PEACOCK, F.C. The development of a technique for studying the host-parasite relationships of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* under controlled conditions. **Nematologica**, Leiden, v.4, p. 43-55, 1959.

PHILLIPI, T.; PICHARD, G. Multiplication in vitro de *Ditylenchus dipsaci* em tecidos de *Medicago sativa*. **Nematropica**, Bradenton, v. 18, p. 25-32, 1988.

REISE, R.W.; HUETTEL, R. N.; R. M. SAYRE. Carrot Callus Tissue for culture of endoparasitic nematodes. **Journal of Nematology**, Saint Paul, v. 19, n. 3, p.387-389,1987.

RIEDEL, R.M.; FOSTER, J.G. Monoxenic culture of *Ditylenchus dipsaci* and *Pratylenchus penetrans* with modified Kruberg's and White's media . **Plant Disease Reporter**, Washington, DC, v. 54, n. 3, p. 251-254, 1970.

RIEDEL, R.M.; FOSTER, J.G.; MAI, W.F. A simplified medium for monoxenic culture of *pratylenchus penetrans* and *Ditylenchus dipsaci*. **Journal of Nematology**, Saint Paul, v.5, n.1, p.71-72, 1973.

RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KOKALISBURELLE, N.; ROBERTSON, D.G.; KING, P.S.; WELLS, L.W. Rotations with coastal bermudagrass, cotton, and bahiagrass for management of *Meloidogyne arenaria* and southern blight in peanut. **Journal of Nematology**, Saint Paul, v.26, p.665-668, 1994.

ROSSI, C. E. Nematóides na cultura da soja. IV REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO. Ribeirão Preto, **Anais**: jun. 2001. p. 142. Disponível em:  
<<http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/IV%20RIFIB%20anais.pdf>> Acesso em: 16 mar. 2009.

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

TOWSON, A. A.; LEAR, B. Effect of temperature of reproduction and molting of *Pratylenchus vulnus*. **Journal of Nematology**, Saint Paul, v.14, n.4, p.602-603, 1982.

VERDEJO-LUCAS, S.; PINOCHET, J. Population densities of five migratory endoparasitic nematodes in carrot disk cultures. **Journal of Nematology**, College Park, v. 24, n.1, p. 96-98,1992.

WEBSTER, J.M. The significance of biological races of *Ditylenchus dipsaci* and their hybrids. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v.59, p. 77-83, 1967.

WEBSTER, J.M.; LOWE, D. The effect of synthetic plant-growth substance, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid, on the host-parasite relationships of some plant parasitic nematodes in monoixenic callus culture. **Parasitology**, Cambridge, v. 56, p. 313-322, 1966.