

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TAXONOMIA, INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO,  
ESTUDO FITOSSANITÁRIO E DENEMATIZAÇÃO DE  
SEMENTES DE GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS**

**Luciany Favoreto  
Engenheira Agrônoma**

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Dezembro de 2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TAXONOMIA, INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO,  
ESTUDO FITOSSANITÁRIO E DENEMATIZAÇÃO DE  
SEMENTES DE GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS**

**Luciany Favoreto**

**Orientador: Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte da exigência para a obtenção do título de Doutorado em Agronomia (Entomologia Agrícola).**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL**

**Dezembro de 2008**

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**LUCIANY FAVORETO** - nascida em 29 de abril de 1971, em Londrina, Paraná, é Engenheira Agrônoma, formada pela Universidade Estadual de Maringá – UEM, em dezembro de 1998, tendo desenvolvido o Trabalho de Monografia intitulado “Levantamento, Diagnóstico e Planejamento de uma Propriedade Agrícola”. Estagiou no período de 1º-07-2000 a 31-12-2001, como Bolsista da Fundação de Apoio à Pesquisa - FUNAPE (Consórcio Café), na Área de Proteção de Plantas (Nematologia) do Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, desenvolvendo atividades de pesquisa no projeto intitulado “Levantamento e Estudo do Parasitismo de Espécies”. Estagiou no ano de 2002 no Laboratório de Nematologia do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal – SP, onde concluiu o Curso de Mestrado em Agronomia, Área de Concentração Entomologia Agrícola, em setembro de 2004, nesta mesma instituição, sob orientação do Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos e como título da pesquisas: “Estudo de nematóides em sementes de gramíneas forrageiras”. Ingressou no doutorado em março de 2005, tendo recebido uma bolsa de 2006 a 2008, concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Rosina e João (*in memoriam*), por terem me apoiado sem qualquer restrição ao longo dos anos. Tudo o que fiz e ainda farei, será sempre oferecido a eles.

A meu marido, Sérgio Ademir Calzavara, pelo amor, carinho e firmeza, que em muitos momentos foram decisivos e me fizeram seguir em frente.

A meus irmãos e irmãs, por apoiar e incentivar a conquista dos meus sonhos.

## DEDICO

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Ao Conselho do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Entomologia Agrícola da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP/FCAV, pela oportunidade que me foi dada para a realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos, pelo profissionalismo, apoio, orientação e ensinamentos ao longo destes anos, os quais me inspiraram e despertaram o meu interesse pela pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes, pelo apoio e incentivo durante o decorrer deste trabalho.

Ao professor Dr. José Carlos Barbosa, pela colaboração nas análises estatísticas dos resultados deste trabalho.

À empresa Comércio e Indústria Matsuda Imp., Exp. Ltda., com sede no município de Álvares Machado – SP, pelo suporte técnico.

Ao Engenheiro Agrônomo Alberto Takashi e a equipe técnica da Empresa Comércio e Indústria Matsuda Imp., Exp. Ltda., com sede no município de Álvares Machado – SP, pela colaboração no desenvolvimento do trabalho.

Aos proprietários Sr. Luiz Muniz Rodrigues (Sítio São Luiz) e Sr. Sílvio Antônio Cordeiro Farinelli (Faz. Mantiqueira), pela cessão das áreas de suas propriedades para a condução dos experimentos.

Ao Professor Doutor Júlio Marcos Melger Walder, Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Piracicaba-SP, pelo auxílio na irradiação das sementes.

À Profa. Dra. Rita de Cássia Panizzi e mestrande Delineide Pereira Gomes, pelo auxílio na detecção e taxonomia dos fungos.

À Dra. Renata C. V. Tenente, pelas ótimas dicas durante todos os encontros nematológicos de que participamos e pela confirmação de espécies de *Ditylenchus*.

Ao Dr. Vilmar Gonzaga, pela confirmação na taxonomia de *Aphelenchoides bicaudatus* e *Aphelenchoides fragariae*.

Ao Dr. Juvenil E. Cares da UNB, Brasília-DF, pela confirmação de espécies de *Aphelenchoides* e *Ditylenchus*.

À Dra. Sue Hockland, Plant Health Group, Central science Laboratory, Sand Hutton, York, England-UK, pela confirmação de espécies de *Aphelenchoides*.

Ao Professor Vitório Barato Neto, pela revisão gramatical.

Ao meu marido, amigo e companheiro, Sérgio Ademir Calzavara, pela paciência, amor e carinho durante todos estes anos.

Aos funcionários do Laboratório de Nematologia: Sandra, Valmir e André, pela amizade e auxílio na execução do trabalho.

A todos os que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xii
I INTRODUÇÃO.....	1
II REVISÃO DE LITERATURA.....	3
III MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Extração dos nematóides de sementes de gramíneas forrageiras.....	10
3.2 Estudo fitossanitário em sementes de gramíneas forrageiras nas principais áreas produtoras do Brasil.....	10
3.3 Estudo taxonômico dos fitonematóides extraídos de sementes de gramíneas forrageiras.....	12
3.3.1 Multiplicação dos nematóides.....	12
3.3.2 Preparação dos nematóides para estudo ao microscópio fotônico.....	13
3.3.3 Preparação dos nematóides para a microscopia eletrônica de varredura.....	14
3.3.4 Identificação de espécies de fitonematóides em sementes de gramíneas forrageiras.....	15
3.4 Estudo da denematização de sementes de gramíneas forrageiras.....	15
3.4.1. Tratamento químico.....	15
3.4.2. Irradiação de sementes.....	17
3.5. Estudo da infecção de sementes de gramíneas forrageiras por <i>Aphelenchoides sexlineatus</i> .....	18

IV RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1 Estudo fitossanitário em sementes de gramíneas forrageiras nas principais áreas produtoras do Brasil.....	19
4.2 Multiplicação dos nematóides.....	21
4.3 Estudo taxonômico dos fitonematóides encontrados em sementes de gramíneas forrageiras.....	23
4.4 Estudo da denematização de sementes de gramíneas forrageiras.....	37
4.4.1 Tratamentos Químicos.....	37
4.4.2 Irradiação de sementes.....	39
4.5 Estudo da infecção de sementes de gramíneas forrageiras por <i>Aphelenchoides sexlineatus</i> .....	40
V CONCLUSÕES.....	42
VI REFERÊNCIAS.....	43



## LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Média da porcentagem de <i>Fusarium</i> sp.( <b>F</b> ), <i>Helminthosporium</i> sp. ( <b>H</b> ) e <i>Phoma</i> sp. ( <b>P</b> ) e média do número de <i>Ditylenchus</i> sp. ( <b>D</b> ) e <i>Aphelenchoides</i> sp.( <b>A</b> ) encontrados em diferentes lotes de sementes de forrageiras, oriundas dos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia e Goiás.....	20
2	Média de <i>Aphelenchoides sexlineatus</i> ( <b>A</b> ), <i>Ditylenchus montanus</i> ( <b>D</b> ) e <i>Aphelenchus</i> sp. ( <b>Aphec</b> ) recuperados das culturas de <i>Fusarium</i> sp. ( <b>F</b> ) e <i>Didymella brioniae</i> ( <b>Db</b> ).....	21
3	Número médio de <i>Aphelenchoides</i> spp. extraídos do solo e das raízes, de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG-5, aos 60 e 120 dias após a implantação dos experimentos a campo, nos municípios de Tupaciguara (MG) e Presidente Prudente (SP).....	38
4	Número médio de <i>Aphelenchoides</i> spp. e <i>Ditylenchus</i> spp. e porcentagem de germinação das sementes de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG-5, 5 dias após tratamentos com <sup>60</sup> Co.....	40
5	Número médio de <i>Aphelenchoides sexlineatus</i> recuperados das sementes de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG-5 e da areia no segundo, quarto e sexto dias após a infestação.....	41

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Número de amostras por Estado, com destaque no mapa aos municípios onde foram efetuadas as coletas para o estudo fitossanitário de sementes forrageiras.....	11
2 Fotomicrografias de <i>Aphelenchoides besseyi</i> Christie, 1942 extraídos de sementes de <i>Brachiaria brizantha</i> (Hochst) Stapf.	24
3 Eletromicrografias de varredura de <i>Aphelenchoides besseyi</i> Christie, 1942 extraídos de sementes de <i>Brachiaria brizantha</i> (Hochst) Stapf.....	25
4 Fotomicrografias de <i>Aphelenchoides bicaudatus</i> (Imamura, 1931) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 extraídos de sementes de <i>Brachiaria brizantha</i> (Hochst) Stapf. ....	26
5 Fotomicrografias de <i>Aphelenchoides fragariae</i> (Ritzema-Bos, 1890) Christie, 1932 extraídos de sementes de <i>Brachiaria brizantha</i> (Hochst) Stapf. ....	27
6 Fotomicrografias de <i>Aphelenchoides sexlineatus</i> Eroshenko, 1967 (Partenogenética) extraídos de sementes de <i>Brachiaria brizantha</i> (Hochst) Stapf. ....	28
7 Eletromicrografias de varredura de <i>Aphelenchoides sexlineatus</i> Eroshenko, 1967 (Partenogenética) extraídos de sementes de <i>Brachiaria brizantha</i> (Hochst) Stapf. ....	29

8	Fotomicrografias de <i>Ditylenchus myceliophagus</i> Goodey extraídos de sementes de <i>Brachiaria brizantha</i> (Hochst.) Stapf....	32
9	Eletromicrografias de varredura de <i>Ditylenchus dipsaci</i> (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936 extraídos de sementes de <i>Brachiaria brizantha</i> (Hochst) Stapf.....	33
10	Fotomicrografias de <i>Ditylenchus montanus</i> (Kiknadze & Eliashvile, 1988) Brzeski, 1991 (Partenogenética) extraídos de sementes de <i>Brachiaria brizantha</i> (Hochst.) Stapf.....	34
11	Eletromicrografias de varredura de <i>Ditylenchus montanus</i> (Kiknadze & Eliashvile, 1988) Brzeski, 1991 (Partenogenética) extraídos de sementes de <i>Brachiaria brizantha</i> (Hochst) Stapf.....	35
12	Eletromicrografias de varredura de <i>Aphelenchus</i> sp. (Partenogenética) extraídos de sementes de <i>Brachiaria brizantha</i> (Hochst.) Stapf.....	36

## TAXONOMIA, INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO, ESTUDO FITOSSANITÁRIO E DENEMATIZAÇÃO DE SEMENTES DE GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS

**RESUMO** – Foi objetivo desta pesquisa: 1) Quantificar a população de nematóides e fungos em amostras de sementes procedentes dos principais Estados produtores do Brasil; 2) Estudar a taxonomia dos nematóides; 3) Estudar o processo de infecção de sementes de *Brachiaria brizantha* por nematóides; 4) Avaliar a eficácia da irradiação com  $^{60}\text{Co}$  e do tratamento químico para o controle dos nematóides. Amostras de 237 lotes de sementes de diferentes gramíneas forrageiras foram examinadas nos Laboratórios de Nematologia e de Fitossanidade da UNESP/FCAV, Câmpus de Jaboticabal, quanto à ocorrência de fungos e nematóides. No tratamento químico, usou-se um lote de sementes infectadas por 1.350 *Aphelenchoides* sp. por 10 g. As sementes foram tratadas com doses de diferentes produtos, e como testemunha usaram-se sementes não-tratadas do mesmo lote. O experimento foi conduzido a campo em duas regiões distintas. Para irradiação, empregaram-se doses de  $^{60}\text{Co}$ , no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Piracicaba – SP, sendo que 160 g de sementes de *B. brizantha* foram irradiadas com a taxa de dose de 186,8 Gy/h. Em outro experimento, 10 g de sementes de *B. brizantha*, isentas de nematóide, foram colocadas em gerbox, sobre areia autoclavada. Em seguida, foram inoculados 10 mL de uma suspensão contendo 3.000 indivíduos de *Aphelenchoides sexlineatus* (partenogenética). Os tratamentos tanto químico quanto com  $^{60}\text{Co}$  demonstraram não ter efeito sobre a população do nematóide. Confirmou-se, neste estudo, que os nematóides infectam as sementes após elas caírem no solo. Nematóides e fungos são encontrados infectando sementes de diferentes espécies forrageiras.

**Palavras-chave:** *Brachiaria* sp., *Aphelenchoides* sp., *Ditylenchus* sp., fitonematóides, sementes irradiadas.

## TAXONOMY, PATOGENIC-HOST INTERACTION, FITOSANITARY STUDY AND EFFICACY IRRADIATION AND OF CHEMIC TREATMENT FOR NEMATODE CONTROL

**SUMMARY** – It was the objective of this study: 1) To quantify the population of nematodes and fungi in samples of seeds from the main producer states of Brazil, 2) study the taxonomy of nematodes, 3) To study the process of infection of seeds of tropical grasses by nematodes, 4) Evaluate the effectiveness of irradiation with  $^{60}\text{Co}$  and chemical treatment to control nematodes. Samples of 237 seed lots of different grasses were examined in the Nematologia and Fitopatologia laboratory of UNESP / FCAV, from Jaboticabal Câmpus as the occurrence of fungi and nematodes. In the chemical treatment, used to a lot of seeds infected by 1350 *Aphelenchoides* sp. for 10 g. The seeds were treated with doses of different products and used it as a witness if untreated seeds from the same batch. The experiment was conducted under field conditions in two separate regions. For irradiation, using doses of  $^{60}\text{Co}$ , in the Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) Piracicaba - SP, of which 160 g of seeds of *B. brizantha* were irradiated with a dose rate of 186.8 Gy / h. In another experiment, 10 g of seeds of *B. brizantha*, free of nematode, were placed in gerbox on autoclaved sand. It was then inoculated 10 mL of a suspension containing 3000 specimens of *Aphelenchoides sexlineatus*. The both treatments, chemist and with  $^{60}\text{Co}$  showed no effect on the nematode population. It was confirmed in this study that the nematodes infect the seeds after they fall on the ground. Nematodes and fungi are found infected seeds of different forage species.

**Keywords:** *Brachiaria* sp., *Aphelenchoides* sp., *Ditylenchus* sp., phytonematodes, irradiated seeds.

## I. INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos, houve um expressivo aumento da área cultivada com pastagens, no Brasil, que passou de 154,1 para 177,7 milhões de hectares (SILVA & NASCIMENTO Jr., 2006).

Embora sejam conhecidas cerca de 90 espécies no gênero *Brachiaria* (Hochst) Stapf., poucos são os ecotipos utilizados comercialmente (ALVES & SOARES FILHO, 1996). Mesmo assim, a maioria das cultivares em uso ainda é muito próxima dos tipos selvagens, visto que o processo de melhoramento desses materiais ainda é incipiente (VALLE et al., 2003).

Os nematóides são animais invertebrados e aquáticos, pois necessitam de uma película de água para a manutenção de suas atividades vitais, e a transformação de peças do aparelho alimentador em estrutura estiletar resistente conferiu a esses organismos a possibilidade de extrair alimentos de células vegetais (CARES & TENENTE, 2007).

A ocorrência de nematóides em pastagens tem significativo impacto sobre a produção de massa e a persistência das forrageiras (Poaceae) (PEDERSON & QUESENBERRY, 1998). Em geral, os produtos das pastagens não são colhidos, mas, em vez disso, as pastagens são submetidas ao pastejo dos animais. Por esse motivo, é difícil determinar-se o valor econômico das pastagens, assim como o impacto que os nematóides têm na produção de massa. Citando HAUGE (1980), PEDERSON & QUESENBERRY (1998), nos EUA, estimaram que os nematóides causaram perdas de 6 % nas pastagens de trevo, de 5,4 milhões de hectares, resultando em perdas estimadas em 33 milhões de dólares. O efeito de nematóides em gramíneas forrageiras, por outro lado, pode ser muito sutil e difícil de discernir-se de outros problemas, tais como, prolongado período de seca, pressão de pastejo e outras pragas e doenças das

raízes. Contudo, BERNARD et al. (1998) mencionaram que os nematóides não somente reduzem a produtividade e a produção, mas podem, também, reduzir a qualidade da forragem. Além disso, os nematóides encontrados em sementes de gramíneas forrageiras podem, ainda, comprometer a qualidade das sementes e a regeneração natural das pastagens. Sendo que, patógenos de outras culturas, como o arroz, têm implicações de natureza quarentenária, dificultando o comércio internacional.

Além dos danos diretos, que resultam na redução da produção de massa das pastagens, os nematóides também interagem com outros organismos e, inclusive, atuam como vetores de doenças de importância para o gado. Na Austrália e nos EUA, a associação de espécies de nematóides em sementes de gramíneas forrageiras, especialmente *Anguina* spp., com bactérias *Clavibacter* spp., ocorre comumente nas pastagens (HOOPER & SOUTHEY, 1978). Na Austrália, *Anguina funesta* é o principal vetor de *C. toxicus* na gramínea *Lolium rigidum* Gaudin. Contudo, os pesquisadores acreditam que outras espécies de *Anguina* podem ser vetoras da bactéria em outras gramíneas (BERNARD et al., 1998). Se os animais se alimentarem das sementes infectadas, a toxina produzida pela bactéria pode ser fatal. Os animais sofrem convulsões, seguidas de morte. Nas décadas de 70 e 80 muitos ovinos e bovinos morreram na Austrália com essa doença (MCKAY & OPHEL, 1993).

No Brasil, os estudos nematológicos em sementes de gramíneas forrageiras são incipientes, contudo, essa pesquisa foi conduzida com os objetivos de: 1) Quantificar a população de nematóides e fungos em amostras de sementes vindas dos principais Estados produtores do Brasil; 2) Estudar a taxonomia dos nematoides encontrados nas sementes; 3) Estudar o processo de infecção de sementes de *Brachiaria brizantha* por espécies de *Aphelenchoides*; 4) Avaliar a eficácia da irradiação com  $^{60}\text{Co}$  e do tratamento químico para o controle dos nematóides.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

O aumento e a manutenção da produtividade das pastagens são vitais para a produção de proteína de origem animal. Embora existam práticas de consorciação de leguminosas com gramíneas (Poaceae) para formação de pastagens, em geral, as gramíneas são as mais utilizadas (SILVA & NASCIMENTO Jr, 2006). Os mesmos autores atribuem esse aumento à substituição de capins, tais como: o gordura, o colonião, o guiné e o angola, que permitem taxas de lotação mais baixas (0,25 animal/ha) por espécies de *Brachiaria* com taxa de lotação de 0,9 – 1,0 animal/ha.

Espécies de *Brachiaris* são plantas cespitosas, muito robustas, de 1,5 a 2,0 m de altura, com colmos inicialmente prostrados, mas produzindo afilos predominantemente eretos. Possuem rizomas muito curtos e encurvados, e colmos floríferos e eretos, freqüentemente com afilamento nos nós superiores, o qual leva à proliferação de inflorescência. Possuem bainhas pilosas e com cílios nas margens, geralmente mais longas que os entrenós, escondendo os nós. As lâminas foliares são linear-lanceoladas, esparsamente pilosas na face ventral e glabras na face dorsal. Existe inflorescência de até 40 cm de comprimento, geralmente com 4 a 6 racemos, medindo de 7 a 10 cm de comprimento. Há espiguetas unisseriadas ao longo da raque, com 5 a 5,5 mm de comprimento por 2 a 2,5 mm de largura, esparsamente pilosas no ápice (ALVES & SOARES FILHO, 1996).

O gênero *Brachiaria* é de origem africana, sendo suas espécies adaptadas a solos ácidos de baixa fertilidade, apresentando boa adaptabilidade, proporcionando produção satisfatória de forragem a todo o mundo tropical. São pouco tolerantes a baixas temperaturas, não sendo indicadas para regiões onde ocorram geadas fortes. A temperatura ótima para o desenvolvimento das plantas é de aproximadamente 30° C,



sendo que temperaturas inferiores a 25° C reduzem sua taxa de crescimento (ALVES & SOARES FILHO, 1996).

ROSA & TORRES Jr. (2006) estimaram que cerca de 20% do território nacional e 70% das áreas destinadas à produção agropecuária estão cobertas com pastagens. VERZIGNASSI & FERNANDES (2001) estimaram que, no Brasil, existiam 100 milhões de hectares de pastagens cultivadas.

Há 15 anos, MACEDO & ZIMMER (1993) haviam estimado em 45 a 50 milhões de hectares com essas espécies, sendo que as principais áreas, na opinião desses autores, estavam no Brasil Central, oeste da Bahia e norte do Mato Grosso. Foi principalmente no decorrer das últimas três décadas que essas forrageiras ganharam importância econômica no Brasil, viabilizando a atividade pecuária nos solos fracos e ácidos do Cerrado (VALLE et al., 2003).

A produção de sementes de gramíneas forrageiras representa expressiva fonte de divisas para o Brasil (SOARES, 2003). Estima-se que mais de 100.000 t/ano são produzidas e comercializadas somente no mercado interno (OLIVEIRA, 1994). As espécies de *Brachiaria* são as mais comercializadas, chegando a 60% do mercado (SOUZA, 2001) sendo predominantemente constituídas por *B. decumbens* Stapf. e *B. brizantha* (Hochst.) Stapf. (VERZIGNASSI & FERNANDES, 2001). Em relação ao mercado internacional, exportam-se para mais de 20 países, principalmente para a América Latina (SANTOS & SANTOS FILHO, 1999). Para atender a este mercado crescente, no Brasil, desenvolveu-se uma dinâmica e progressista indústria de produção de sementes forrageiras, principalmente nas regiões Centro-Sul, movimentando, anualmente, cerca de R\$ 200 milhões em exportações de sementes, tornando o Brasil o maior produtor, consumidor e exportador de sementes de forrageiras do mundo (SOUZA, 2002; SOARES, 2003).

Como ocorre com outras culturas, os fitonematóides podem causar danos, também, a todas as espécies de forrageiras. Contudo, o estudo da faixa de hospedeiros e a patogenicidade, entre as gramíneas forrageiras, têm sido muito pouco pesquisados, se comparados às outras culturas tradicionais. BERNARD et al. (1998) mencionaram que as evidências fortemente apontam os fitonematóides como causa de significativa

redução na produção de forragem, tornando as forrageiras tão sujeitas às perdas na produção quanto outras culturas.

Estudos visando a estimar as perdas que os nematóides causam às pastagens são escassos. Nos EUA, citando HAGUE (1980), PEDERSON & QUESENBARRY (1998) estimaram que os nematóides causaram perdas de 6 % nas pastagens de trevo forrageiro, de 5,4 milhões de hectares, resultando numa perda estimada em US\$ 33 milhões. Estimativas para as perdas causadas por nematóides em outras forrageiras ainda não foram elaboradas. Contudo, BERNARD et al. (1998) mencionaram que os nematóides não somente reduzem a produtividade e a produção das pastagens, mas também podem reduzir a qualidade da forragem.

Além dos danos diretos causados pelos nematóides, que resultam na redução na produção de massa das pastagens, os nematóides também interagem com outros organismos e, inclusive, atuam como vetores de doenças de grande importância para o gado. Na Austrália e nos EUA, a associação de espécies de nematóides em sementes de gramíneas forrageiras, especialmente *Anguina* spp., com bactérias *Clavibacter* spp., ocorre largamente nas pastagens (HOOPER & SOUTHEY, 1978). Na Austrália, *Anguina funesta* é o principal vetor de *C. toxicus* na gramínea *Lolium rigidum* Gaudin. Contudo, os pesquisadores acreditam que outras espécies de *Anguina* Scopoli podem ser vetoras da bactéria em outras gramíneas (BERNARD et al., 1998). Apesar de o nematóide transportar a bactéria sobre a cutícula, à medida que migram para outras plantas, essa relação da bactéria com o nematóide não é mutualística, porque a bactéria pode degradar a cutícula do nematóide dentro da semente em desenvolvimento, onde o nematóide se reproduz (BIRD & RIDDLE, 1984). Se os animais se alimentam das sementes infectadas, a toxina produzida pela bactéria pode ser fatal. Os animais sofrem convulsões seguidas de morte. Milhares de ovelhas e bois vêm morrendo na Austrália desde 1970 com essa doença (McKAY & OPHEL, 1993).

Cerca de 180 espécies de *Aphelenchoides* já foram descritas (NICKLE & HOOPER, 1991) e, em *Ditylenchus* Filipjev, 1936 são reconhecidas 81 espécies válidas. Outras 82 espécies foram removidas do gênero por razões de ordem taxionômica (STURHAN & BREZESKI, 1991). Essa enorme diversidade em ambos os grupos torna

a taxionomia desses nematóides muito difícil em relação aos demais. Segundo SHAHINA (1996), a identificação de espécies de Aphelenchoides não é fácil, pois algumas referências não estão acessíveis e existem descrições inadequadas das espécies. Além disso, *Ditylenchus* spp. e *Aphelenchoides* spp. são os fitonematóides que apresentam a maior variabilidade de nichos ecológicos no filo Nemata. Algumas espécies desses grupos causam danos severos na parte aérea de plantas cultivadas, apesar de a grande maioria ser encontrada apenas no solo (NICKLE & HOOPER, 1991).

Em arroz, *A. besseyi* Christie, 1942 causa a doença conhecida como ponta-branca-do-arroz em praticamente todas as regiões produtoras do mundo (McGAWLEY & OVERSTREET, 1998). À medida que o nematóide se alimenta ectoparasiticamente nos pontos de crescimento, cerca de 3 - 5 cm da extremidade da folha-bandeira tornam-se necróticos, esbranquiçados e retorcidos, podendo impedir ou retardar a emergência da panícula, reduzir seu tamanho e o número e tamanho dos grãos (FRANKLIN, 1959). Essa mesma autora, citando TODD & ATKINS (1958), mencionou que, em estudo mais cuidadoso de todas as partes das plantas, o nematóide foi encontrado também dentro de diferentes tecidos. Com o amadurecimento dos grãos e o secamento dos tecidos, o nematóide pode ser disseminado tanto pelas sementes quanto pela palha. Outros autores ainda mencionaram que *A. besseyi* também pode causar esterilidade das flores, menor produção de grãos ou, ainda, grãos de menor tamanho e menor peso, afetando, assim, o poder germinativo das sementes de arroz (HUANG & HUANG, 1972; OU, 1972) e, devido à possibilidade de entrar em anidrobiose (dormência e desidratação) pode, dentro das sementes, permanecer por longos períodos, voltando à atividade e reprodução quando encontrar ambiente favorável (TODD & ATKINS, 1958; YOSHII & YAMAMOTO, 1950).

Nos Estados Unidos, ATKINS & TODD (1959) relataram que a queda de produção foi de 17% nas variedades suscetíveis e 7% nas resistentes. No Japão, perdas entre 10 e 30% foram determinadas por YOSHII & YAMAMOTO (1950). FUKANO (1962), citado por HUANG (1983), demonstrou que existe uma correlação positiva entre o número de nematóides viáveis em 100 sementes e a produção de grãos, sendo 5% de perda o limite máximo tolerável. O autor concluiu que 30

nematóides viáveis em 100 sementes é o nível crítico de infestação para arroz irrigado. No Brasil, esse nematóide causa perdas de até 50% na produção de arroz, se comparado a áreas não-infestadas (SILVA, 1992).

Até 1981, apenas duas espécies de *Aphelenchoides* Fisher haviam sido relatadas no Brasil (LORDELLO, 1981). Posteriormente, COSTA MANSO et al. (1994) fizeram menção à ocorrência de 10 espécies do grupo no País.

O principal meio de disseminação de *A. besseyi* são as sementes. Tanto em outras regiões do mundo (FORTUNER & WILLIAMS, 1975; MERNY et al., 1985; GOKTE & MANTHUR, 1993) quanto no Brasil, essa mesma espécie de nematóide é encontrada em sementes de diferentes gramíneas forrageiras, embora ainda não se conheça a magnitude dos danos causados (TENENTE et al., 1994; PINHEIRO et al., 1997; TENENTE et al., 2000; GARCIA et al., 2000; GARCIA & TENENTE, 2001; SHARMA et al., 2001; BUENO et al., 2002; FAVORETO, 2004). HUANG (1978) menciona que, além dos grãos, as cascas e palhas de arroz também abrigam *A. besseyi*. Com efeito, esse nematóide não é parasito obrigatório de plantas, podendo atuar como ectoparasito ou endoparasito, dependendo do hospedeiro. Na ausência de plantas hospedeiras, cultivadas ou invasoras, pode sobreviver no solo alimentando-se de fungos saprófitos ou fitopatogênicos (HUANG, 1978; LUC et al., 1990; PEDERSON & QUESENBERRY, 1998). FORTUNER & WILLIAMS (1975) incluíram o capim-colonião (*Panicum maximum* Jacq.) e as gramíneas silvestres *Setaria italica* (L.) Beauv., *Cyperus* spp. e *Digittaria sanguinalis* (L.) Scop. na lista de hospedeiros desse nematóide.

Além de *A. besseyi*, espécies de outros gêneros também têm sido relatadas, associadas às gramíneas forrageiras. SHARMA et al. (2001) citam a ocorrência de *Aphelenchoides subtenuis* (Cobb) Steiner e Buhner, 1932 em 96,9% das 64 amostras coletadas na rizosfera de capim *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, no Estado do Acre e *Ditylenchus terricolus* Brzeski, 1991 em 92,2%, entre outros fitonematóides. Além de espécies de *Aphelenchoides*, notadamente *A. besseyi*, espécies de *Ditylenchus* também foram relatadas em sementes de gramíneas forrageiras no Brasil (FAVORETO et al., 2003; 2004; FAVORETO & SANTOS, 2004).

FAVORETO (2004) observou que os nematóides em sementes secas, usualmente, estão inativos. Quando extraídos, demandam algum tempo em suspensão aquosa para exibirem atividade. Além disso, nematóides mortos ou inativos não são extraídos pelo método do Funil de Baermann e suas variações. Por conseguinte, métodos de extração de nematóides que independem da atividade dos mesmos, são mais adequados para extração de nematóides de sementes. Por isso, o método de extração de nematóides das sementes de *Brachiaria brizantha* pela flotação centrífuga em solução de sacarose com caulim (COOLEN & D'HERDE, 1972) é mais eficaz para recuperação de nematóides que o funil de Baermann com e sem reidratação e/ou trituração prévia das sementes. FAVORETO (2004) concluiu que a população de *Aphelenchoides* spp. que infecta as sementes de gramíneas forrageiras, é maior que a população de *Ditylenchus* spp. que apenas infesta as sementes. Deste modo, o processo de beneficiamento, usualmente empregado, reduz mais a população de *Ditylenchus* spp. nas sementes beneficiadas que as de *Aphelenchoides* spp. Ainda, os nematóides encontrados em sementes de gramíneas forrageiras, também, estão presentes em todos os tecidos da planta. Assim, podem ser disseminados, inclusive, por restos vegetais.

Diferentes técnicas têm sido utilizadas para tratamento de sementes de gramíneas forrageiras visando à erradicação de nematóides. O tratamento térmico por via seca ou úmida erradicou *A. besseyi* de sementes de *Brachiaria dictyoneura* Stapf, sendo que, por via úmida, o tratamento exerceu efeito menos deletério à viabilidade das sementes com eficácia para a erradicação do nematóide em vários binômios tempo-temperatura (PINHEIRO et al., 1997). Para sementes de *Panicum maximum* Jacq., GARCIA et al. (2000) observaram que o tratamento das sementes a 60°C, por 10 minutos, ou a 57°C, por 15 minutos, erradicou o nematóide sem o comprometimento da qualidade das sementes.

O uso da irradiação é um método efetivo e apresenta vantagens como a eficiência de controle, não deixa resíduos tóxicos e, portanto, não é poluente (ARTHUR, 1997). A esterilização de materiais, o melhoramento genético, a preservação de alimentos, o retardo do amadurecimento de frutas, o controle de insetos e outros

microorganismos são alguns dos usos mais freqüentes no estudo com as radiações ionizantes (CDTN, 1999). Pela ausência de efeitos colaterais, alta eficiência e tecnologia moderna, a irradiação tornou-se uma alternativa viável constituindo-se em desinfestar grãos com determinadas doses de radiação (FRANCO et al., 1997). A irradiação é uma forma de energia, que pode provocar a alteração no DNA da célula que continua a reproduzir-se, levando a mutação celular e fragmentação dos cromossomos e do cromatídeo ou a morte celular (SILVA & ARTHUR, 2004).

Atualmente, apenas experimentos com pequenas quantidades de sementes obtiveram resultados na erradicação de *A. besseyi*; porém, para exportação de sementes de gramíneas forrageiras, é necessário o desenvolvimento de técnicas que permitam a denematização de sementes em larga escala.

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Extração dos nematóides de sementes de gramíneas forrageiras**

Os nematóides foram extraídos pela técnica de COOLEN & D'HERDE (1972) de alíquotas de 10 g de amostras de sementes de gramíneas forrageiras provenientes das diversas regiões produtoras do Brasil. Tais amostras foram coletadas e enviadas ao Laboratório de Nematologia da UNESP/FCAV pelos técnicos da empresa Comércio e Indústria Matsuda Imp., Exp. Ltda., com sede no município de Álvares Machado – SP.

#### **3.2 Estudo fitossanitário em sementes de gramíneas forrageiras nas principais áreas produtoras do Brasil**

Amostras de sementes de forrageiras provenientes das regiões produtoras do País foram analisadas quanto à ocorrência de fungos e nematóides. Amostras compostas de 237 lotes de sementes de diferentes gramíneas forrageiras sendo: *Brachiaria brizantha* (cv. MG4 e MG5), *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. ruziziensis*, *Panicum maximum* (cv. Mombaça, Massai, Tanzânia, Áries e Aruana), *Setária anceps* (cv. Kazungula), *Paspalum atratum* e *Pennisetum glaucum*, procedentes dos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Bahia e Goiás (Figura 1), foram examinadas nos Laboratórios de Nematologia e de Fitossanidade da UNESP/FCAV, Câmpus de Jaboticabal.

Os nematóides foram extraídos das sementes como descrito no item 3.1. Para detecção dos fungos, utilizou-se o método do papel-filtro (Blotter-test), conforme descrito pela International Seed Testing Association (ISTA, 1976). Foram utilizadas placas de Petri de plástico com 9 cm de diâmetro, onde foram colocadas três folhas de papel-filtro umedecidas com água destilada. Foram adotadas 10 repetições compostas

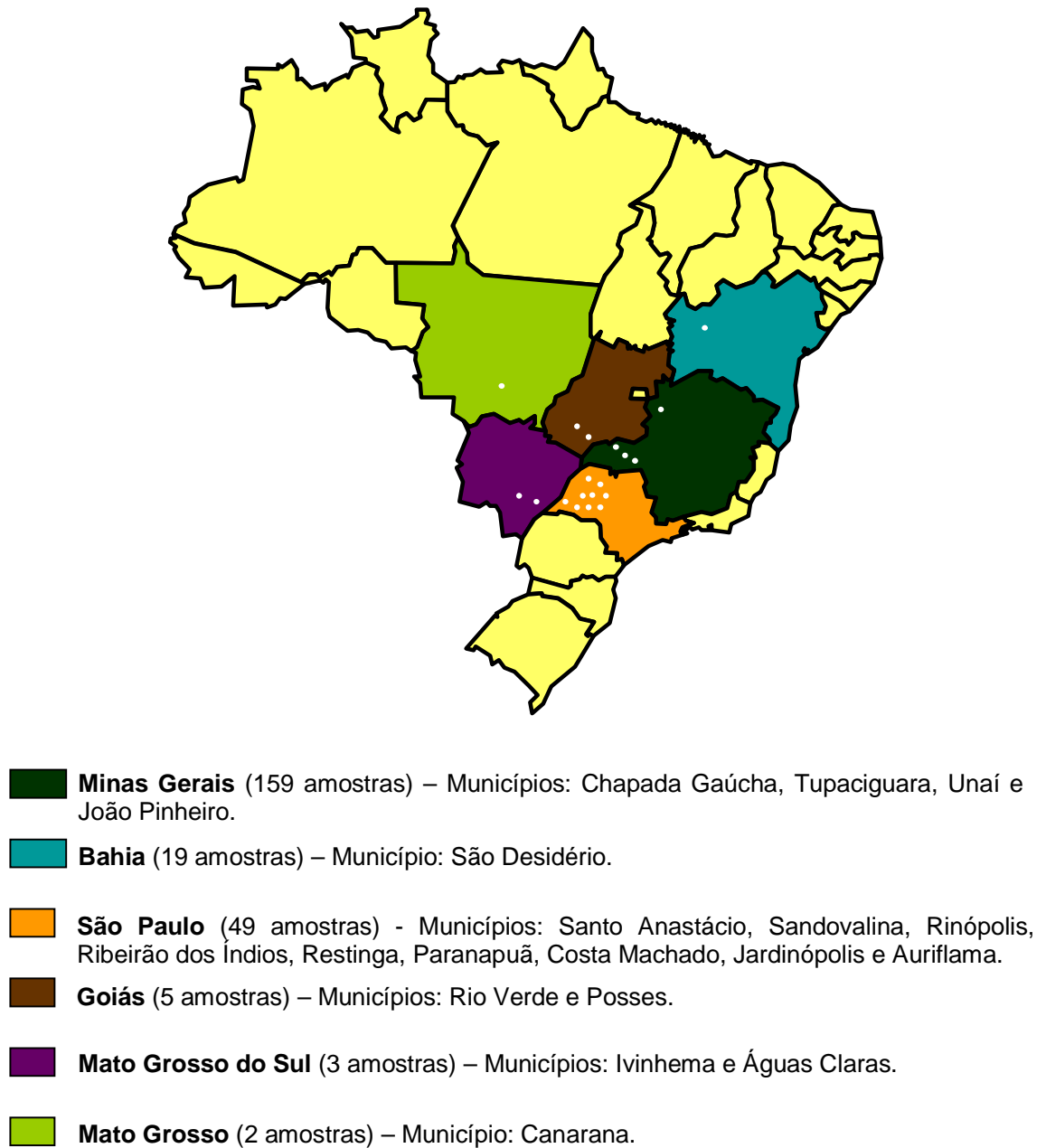


Figura 1. Número de amostras por Estado, com destaque no mapa aos municípios onde foram efetuadas as coletas para o estudo fitossanitário de sementes forrageiras.



por 10 sementes equidistantes por placa, totalizando 100 sementes analisadas por lote. As sementes foram incubadas a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclos de luz e escuro de 12 horas, onde permaneceram por 10 dias. Foram utilizadas lâmpadas fluorescentes de 40W a 40 cm acima das placas. As identificações dos fungos foram realizadas com base nas características morfológicas, com auxílio de um microscópio fotônico e um estereoscópio, utilizando a chave de classificação de BARNETT & HUNTER (1998).

### **3.3 Estudo taxonômico dos fitonematóides extraídos de sementes de gramíneas forrageiras**

Para o estudo taxonômico dos fitonematóides extraídos de sementes de gramíneas forrageiras, as características morfológicas de espécimes foram fotomicrografadas e eletromicrografadas. A obtenção dos espécimes, assim como as técnicas de preparo para aquisição de imagens serão detalhadas a seguir.

#### **3.3.1 Multiplicação dos nematóides**

Fitonematóides em sementes de forrageiras, às vezes, são encontrados em pequeno número, dificultando a identificação da espécie. A multiplicação de nematóides *in vitro*, possibilita a obtenção de um grande número de indivíduos, o que facilita os estudos de taxonomia. Devido a esse motivo, a multiplicação de *Aphelenchoides sexlineatus* Eroshenko, 1967, *Aphelenchus* sp. Bastian, 1865 e *Ditylenchus montanus* (Kiknadze & Eliashvile, 1988) Brzeski, 1991 *in vitro* foi estudada no Laboratório de Nematologia da UNESP/FCAV. Culturas de um isolado de *Fusarium* sp., obtido de inhame (*Colocasia esculenta* L. Schott.), e de *Didymella brioniae* (Auersw) Rehm, obtido de melão (*Cucumis melo* L.), foram utilizadas como substrato para a multiplicação dos nematóides em placas de Petri. Para a condução do experimento, foram utilizadas espécies partenogênicas dos gêneros mencionados. Sendo assim, 10 fêmeas foram axenizadas em solução de ampicilina a 0,1% e inoculadas em culturas dos fungos com cinco dias de crescimento em B.D.A. A seguir, foram incubadas em B.O.D. a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,

no escuro. Aos 30 dias após, efetuou-se a extração dos nematóides pela técnica do funil de Baermann. As populações nas suspensões obtidas foram estimadas ao estereoscópio com auxílio da câmara de contagem de Peters (SOUTHEY, 1970). Com os dados obtidos, foram estimados o fator de reprodução dos nematóides, segundo COOK & EVANS (1987).

### **3.3.2 Preparação dos nematóides para estudo ao microscópio fotônico**

Os espécimes obtidos, como descrito no item anterior, foram coletados um a um das suspensões, com aparato preparado com um pêlo de suíno, semelhante a um estilete, ao estereoscópio, e transferidos para recipientes de 10 mL, tipo vidros de penicilina, contendo cerca de 5 mL de água filtrada. Esses recipientes foram tampados, a seguir, e agitados manualmente por cerca de 2 minutos. Então, foram colocados em banho-maria a 55°C, por cinco minutos. Em seguida, foram adicionados 4 mL de formalina a 8% em cada recipiente, os quais foram armazenados, no escuro, até o preparo e montagem de lâminas semipermanentes e permanentes.

As montagens temporárias foram preparadas, transferindo-se 10 a 15 espécimes vivos de uma população particular, um a um, para uma gota de água filtrada, colocada no centro de uma lâmina de vidro, ao estereoscópio. Os espécimes foram relaxados em chama de uma lamparina a álcool e, em seguida, foram arranjados lado a lado no fundo e no centro da gota. Então, depositou-se uma lamínula de 21 x 22 mm e efetuou-se a lutagem com esmalte de unha incolor (TIHOHOD, 1989). As observações e fotomicrografias foram efetuadas no espaço de até 3 h após a montagem. Foram examinados e documentados fêmeas e machos. As montagens semipermanentes foram preparadas, transferindo-se alguns espécimes fixados para uma gota da solução fixadora no centro de lâminas de vidro, seguidas da deposição da lamínula e lutagem, como no caso anterior. As montagens permanentes foram efetuadas pelo método da infiltração dos espécimes em glicerina, segundo SEINHORST (1959).

Os espécimes foram examinados e fotomicrografados em um sistema de aquisição de imagens constituído por uma câmera digital Sony Hiper HAD® (Sony

Electronics Inc., 1 Sony Drive, Park Ridge - NJ, 07656, EUA), montada sobre um microscópio Olympus BX50<sup>®</sup> (**Olympus do Brasil**, São Paulo - SP) e acoplada a um microcomputador. As imagens foram digitalizadas e gravadas em computador para serem posteriormente medidas. Pelo menos 10 fêmeas de cada população foram documentadas. As mensurações nas imagens digitalizadas foram feitas, utilizando-se do software Image Pro-Plus da Media Cybernetics<sup>®</sup> (8484 Georgia Avenue, Silver Spring, MD – EUA). A identificação das espécies foi confirmada pelo Dr. Vilmar Gonzaga e Dra. Renata C. V. Tenente, da EMBRAPA/CENARGEN, Brasília-DF., pelo Dr. Juvenil E. Cares, da UNB, Brasília-DF. e pela Dra. Sue Hockland, Plant Health Group, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, England-UK.

### **3.3.3 Preparação dos nematóides para a microscopia eletrônica de varredura**

Cerca de 1.000 espécimes de cada grupo, recém-extraídos, foram transferidos como descrito no item anterior para os recipientes contendo  $\frac{3}{4}$  de seus volumes preenchidos com água filtrada. A seguir, os recipientes foram agitados manualmente por cerca de 5 minutos e deixados em repouso, em refrigerador, a 5°C, por cerca de 1 hora. Subseqüentemente, o volume de água de cada recipiente foi reduzido a 0,5 mL com uma seringa hipodérmica, e os recipientes foram novamente deixados em geladeira por 20 minutos. A seguir, o volume de cada recipiente foi preenchido com a solução fixadora, constituída de glutaraldeído a 3 % e formaldeído a 2 % (preparado com paraformaldeído), em solução-tampão de fosfato de sódio a 0,05 M e pH 7,4, e resfriada a 1 °C. Os recipientes foram mantidos em geladeira para que os nematóides se mantivessem relaxados durante todo o processo de fixação. Após o período mínimo de 72 h, o processo de preparação teve prosseguimento. Os nematóides foram transferidos em suspensão, com pipeta de Pasteur, para câmaras preparadas com cápsulas de polietileno utilizadas em inclusão de amostras para microscopia eletrônica de transmissão e tela de "silk-screen" com poros de 25 µm, conforme descrito por EISENBACK (1991). O restante da preparação foi efetuado como descrito por essa

fonte. Finalmente, os nematóides foram observados e eletromicrografados em microscópio eletrônico JEOL JSM 5410, operado em 15kV. Foram documentados: a morfologia da região labial, em vista lateral e de topo, os campos laterais, a genitália externa e a cauda de fêmeas e de machos.

### **3.3.4 Identificação de espécies de fitonematóides em sementes de gramíneas forrageiras**

Os dados morfométricos obtidos aos microscópios fotônico e eletrônico de varredura foram comparados às chaves de identificação obtidas na literatura. Para espécies de *Aphelenchoides*, foram utilizadas as chaves publicadas por vários autores (FRANKLIN, 1959; 1978; SANWAL, 1961; BAUJARD, 1989; TACCONI & AMBROGIONI, 1993; SHAHINA, 1996). Para identificação de espécies de *Ditylenchus*, foram utilizadas as chaves de FORTUNER (1982) e de HOOPER & SOUTHEY (1978).

## **3.4 Estudo da denematização de sementes de gramíneas forrageiras**

Diferentes produtos químicos e irradiação com  $^{60}\text{Co}$  foram testados a campo e em laboratório, respectivamente, para avaliação quanto a sua eficácia na denematização de sementes de gramíneas forrageiras.

### **3.4.1 Tratamento químico**

Um lote de sementes de *Brachiaria brizantha* cv. MG-5, naturalmente infectado, em média, com 1.350 espécimes de *Aphelenchoides* spp. por 10 g de sementes foi utilizado para o estudo. Porções de 1 kg de sementes foram tratadas, individualmente, com os respectivos produtos e doses: abamectina 1,5; 3,0 e 6,0 mL; imidaclopride 3,0; 6,0 e 12,0 mL; clotianidina 3,0; 6,0 e 12,0 mL; tiodicarbe 7,5; 15,0 e 30,0 mL; imidaclopride + tiodicarbe 12,0; 24,0 e 48,0 mL e carbofurano 12,5; 25,0 e 50,0 mL. Como testemunha, utilizou-se 1 Kg de sementes não-tratadas do mesmo lote.

As sementes foram tratadas em um recipiente construído com tubos de PVC de 30 cm de altura e 15 cm de diâmetro, fechados nas extremidades com tampa de rosca. Um quilograma de sementes foi colocado por recipientes e acrescido dos produtos e doses correspondente. Cada tubo foi lacrado e agitado manualmente por cinco minutos. Essa operação foi realizada para cada dose dos diferentes produtos.

Foram instalados dois experimentos a campo, sendo um na região de Presidente Prudente – SP, e o outro em Tupaciguara - MG. Os 21 tratamentos constituídos pelos produtos mencionados mais a testemunha foram implantados em blocos inteiramente ao acaso, com quatro repetições. As parcelas no campo, com dimensões de 5 x 10 m, foram marcadas e, a seguir, foram coletadas amostras de solo compostas de três subamostras por parcelas, para a determinação da população inicial dos nematóides.

Em cada parcela, foram marcadas cinco linhas espaçadas de 1 m entre elas, e 6 g de sementes/linha foram distribuídas em sulcos de 3 cm de profundidade e recobertas com uma fina camada de solo.

As avaliações dos experimentos foram efetuadas em quatro amostragens, a partir de 60 dias da semeadura, a intervalos regulares de mesma duração. Na primeira avaliação, foram coletadas amostras de solo, raízes e de folhas. Na segunda coletou-se solo, raízes, folhas e inflorescências. Na terceira avaliação coletou-se cachos com sementes maduras e, na quarta, apenas as sementes que tinham caído ao solo. Para essa última coleta, foram confeccionadas molduras de cantoneiras de ferro, de 1 x 1 m, que foram dispostas aleatoriamente em cada parcela. Todas as sementes caídas no interior das molduras foram coletadas com auxílio de vassouras, peneiradas e acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificados, e levado ao laboratório para análises.

A extração dos nematóides das partes aéreas e das raízes foi realizada em alíquotas de 10 g de cada material pela técnica de COOLEN & D'HERDE (1972), efetuada imediatamente após as coletas. Os nematóides do solo foram extraídos de alíquotas de 100 cm<sup>3</sup> pela técnica de JENKINS (1964). As populações dos nematóides ativos e inativos nas suspensões obtidas, de cada tratamento, foram estimadas ao microscópio fotônico com auxílio da câmara de contagem de Peters (SOUTHEY, 1970).

Os valores obtidos foram transformados em  $\log(x+1)$ , e submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

### **3.4.2 Irradiação de sementes**

A irradiação de sementes de *Brachiaria brizantha*, como alternativa para eliminação dos nematóides, foi estudada. Amostras de 160 gramas de sementes de *B. brizantha* foram acondicionadas em sacos de papel e irradiadas, empregando-se diferentes doses de raios-gama: 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 Kgy, provenientes de uma fonte de  $^{60}\text{Co}$ , no Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA/USP, Piracicaba-SP. A fonte de irradiação gama utilizada foi uma de Cobalto-60, tipo Gammabeam-650, da Atomic Energy of Cnda Ltda., Ottawa, Canadá, com taxa de dose de 186,8 Gy/h. Foram adotadas quatro repetições, e as mesmas quantidades de sementes não irradiadas foram consideradas testemunhas. Aos cinco dias depois de irradiadas, foram extraídos os nematóides de alíquotas de 10 g pela técnica COOLEN & D'HERDE (1972). A população dos nematóides nas amostras foi estimada ao microscópio fotônico com auxílio da câmara de contagem de Peters. Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **3.5 Estudo da infecção de sementes de gramíneas forrageiras por *Aphelenchoides sexlineatus***

A possibilidade de sementes de *Brachiaria brizantha* serem infectadas pelo nematóide após caírem ao solo foi estudada por meio de um experimento em casa de vegetação, na Universidade Estadual Paulista UNESP/FCAV, Câmpus de Jaboticabal. Dez gramas de sementes de *B. brizantha* isentas de nematóides foram colocadas em potes plásticos, sobre areia previamente autoclavada. Em seguida, foram inoculados 10 mL de uma suspensão contendo 3.000 indivíduos de *Aphelenchoides sexlineatus* (partenogenética). Esse nematóide foi escolhido, pois, além de possuir apenas fêmeas

na população, elas são grandes, o que facilita sua diferenciação de qualquer outro nematóide.

As sementes e a areia foram avaliadas separadamente a cada dois dias após a infestação dos nematóides, utilizou-se cinco repetições em cada um dos três períodos de avaliação (2, 4 e 6 dias após a infestação). As sementes foram separadas da areia por peneiramento e lavadas com jatos d'água sobre uma peneira de 20 mesh. Foi feita extração dos nematóides, triturando-se as sementes em liquidificador com água e extraindo-se os nematóides pela técnica de COOLEN & D'HERDE (1972). A extração dos nematóides da areia foi feita pela técnica de JENKINS (1964). A água resultante da lavagem das sementes foi recolhida e processada junto com a areia.

As populações dos nematóides nas suspensões obtidas foram estimadas ao microscópio fotônico com auxílio da câmara de contagem de Peters. Os valores obtidos na recuperação dos nematóides da areia foram transformados em  $\log(x+1)$ . Os valores obtidos da recuperação dos nematóides das sementes não foram transformados. Os resultados foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estudo fitossanitário em sementes de gramíneas forrageiras das principais áreas produtoras do Brasil

Os nematóides em gramíneas forrageiras podem ter efeito muito sutil e difícil de discernir de outros problemas, tais como prolongados períodos de seca, pressão de pastoreio e outros microorganismos fitoparasitas. Observou-se, neste estudo, que as sementes continham fungos e nematóides (Tabela 1) e são meio potenciais de disseminação tanto de nematóides quanto de fungos.

Nas sementes habitualmente colhidas no cacho, tais como milheto (*Penisetum glaucum*) e *Brachiaria ruziziensis*, observou-se pouca ou nenhuma quantidade de nematóide nas amostras, sugerindo que esses penetram nas sementes, quando essas caem no chão. As demais sementes continham expressivas quantidades de nematóides. Em todos os lotes de sementes de forrageiras, foram detectadas fungos do gênero *Fusarium*, *Helminthosporium* e *Phoma*.

Os nematóides não somente reduzem a produtividade e a produção, mas podem, também, reduzir a qualidade da forragem. Além disso, os nematóides encontrados em sementes de gramíneas forrageiras podem comprometer a qualidade das sementes e a regeneração natural das pastagens, além de, sendo também patógenos de culturas como arroz, ter implicações de natureza quarentenária, dificultando o comércio internacional (BERNARD et al., 1998).



Tabela 1. Média da porcentagem de *Fusarium* sp.(F), *Helminthosporium* sp. (H) e *Phoma* sp. (P) e média do número de *Ditylenchus* sp. (D) e *Aphelenchoides* sp.(A) encontrados em diferentes lotes de sementes de forrageiras, oriundas dos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia e Goiás.

Forrageiras	Média da % de fungos*			Média do número de nematóides**	
	F	H	P	D	A
<b><i>Brachiaria brizantha</i></b>					
cv. Marandu	61,5	27,0	13,0	128,0	496,0
cv. MG-4	68,0	24,0	9,0	112,0	272,0
cv. MG-5	70,0	59,0	23,0	34,7	133,3
<b><i>Brachiaria decumbens</i></b>					
<b><i>Brachiaria dictyoneura</i></b>					
<b><i>Brachiaria humidicola</i></b>					
<b><i>Brachiaria ruziziensis</i></b>					
<b><i>Panicum maximum</i></b>					
cv. Mombaça	72,5	30,0	4,0	32,0	200,0
cv. Massai	59,0	18,0	26,5	132,0	252,0
cv. Aruana	12,0	11,5	4,5	212,0	552,0
cv. Áries	26,0	17,0	13,0	216,0	1.316,0
cv. Tanzânia-I	47,5	8,0	14,5	68,0	1.332,0
<b><i>Paspalum atratum</i></b>					
cv. Pojuca	62,0	14,0	16,0	176,0	832,0
<b><i>Setaria anceps</i></b>					
cv. Kazungula	45,5	1,5	2,5	0	128,0
<b><i>Pennisetum glaucum</i></b> (Milheto)					
	45,0	11,0	1,0	0	0

\*Infecção média em 100 sementes.

\*\*Infecção média em 10 g de sementes.

Os fungos encontrados nas sementes apresentam rápido crescimento micelial e de esporulação, o que pode facilitar a contaminação de outras sementes durante o período de transporte. A contaminação das sementes dá-se predominantemente no solo, onde são colonizados por diversos fungos, incluindo saprófitas e parasitos facultativos que têm vida saprofítica no solo ou na matéria orgânica, tais como: *Fusarium* sp., *Helminthosporium* sp., *Alternaria* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Rhizoctonia* sp., *Pythium* sp. e *Cylindrocladium* sp., dentre outros (FERREIRA, 1989). Quando essas sementes são levadas para a etapa de beneficiamento e/ou armazenamento, os fungos podem ser disseminados para as sementes sadias (MEDEIROS et al., 1992). Dentre os fungos detectados em sementes neste trabalho, muitos estão associados a doenças de outras culturas.

#### 4.2 Multiplicação dos nematóides

Na Tabela 2 observa-se que todas as espécies de nematóides testadas se multiplicaram em culturas de *Fusarium* sp. e *Didymella brioniae*. Porém, existem diferenças entre os fatores de reprodução desses nematóides. A maior multiplicação foi alcançada pela espécie de *Aphelenchus* quando em cultura de *Fusarium* sp., seguida de *Aphelenchoides sexlineatus* e *Ditylenchus montanus*. Porém, quando em cultura de *D. brioniae*, observou-se que *A. sexlineatus* foi a que mais se multiplicou, seguida de *Aphelenchus* sp. e de *D. montanus*.

Tabela 2. Média de *Aphelenchoides sexlineatus* (A), *Ditylenchus montanus* (D) e *Aphelenchus* sp. (Aphec) recuperados das culturas de *Fusarium* sp. (F) e *Didymella brioniae* (Db).

Fungos	Pi			Pf			Fr		
	A	D	Aphec	A	D	Aphec	A	D	Aphec
<b>F</b>	10,0	10,0	10,0	13.920,0	8.832,0	38.384,0	1.392,0	883,2	3.838,4
<b>Db</b>	10,0	10,0	10,0	10.656,0	3.144,0	6.304,0	1.065,6	314,4	630,4

\*Média de 5 repetições para cada tratamento.

\*\* População inicial (Pi); População final (Pf); Fator de reprodução (Fr=Pf/Pi)

A enorme diversidade, em ambos os grupos, torna a taxonomia desses nematóides muito difícil em relação aos demais (NICKLE & HOOPER, 1991; STURHAN & BREZESKI, 1991). Além disso, *Ditylenchus* spp. e *Aphelenchoides* spp. são os fitonematóides que apresentam a maior variabilidade de nichos ecológicos no filo Nemata. Algumas espécies desses grupos causam danos severos na parte aérea de plantas cultivadas, apesar da grande maioria ser encontrada apenas no solo (NICKLE & HOOPER, 1991). Com efeito, esses nematóides não são parasitos obrigatórios de plantas, podendo atuar como ectoparasitos ou endoparasitos, dependendo do hospedeiro. Na ausência de plantas hospedeiras, cultivadas ou invasoras, podem sobreviver no solo alimentando-se de fungos saprófitos ou fitopatogênicos (HUANG, 1978; LUC et al., 1990; PEDERSON & QUESENBERRY, 1998).

Alguns estudos sobre a biologia desses fitonematóides requerem um grande número de indivíduos (TENENTE et al., 1994). A multiplicação de nematóides *in vitro* facilita os estudos de taxonomia, a produção de inóculo para diferentes propósitos, assim como estudos moleculares e da biologia desses organismos. Fitonematóides em sementes de forrageiras, às vezes, são encontrados em baixos níveis de população, dificultando a identificação da espécie. Estudos sobre a produção de inóculos de *Aphelenchoides* spp. e *Ditylenchus* spp. em diferentes meios de culturas já foram relatados por diversos pesquisadores (VIGLIERCHIO, 1971; MARQUES & HUANG, 1984; BRIDGE et al., 1990; TENENTE et al., 1994 e 2000; RUESS et al., 2000). Segundo RUESS et al., (2000), espécies de *Aphelenchoides* são consideradas generalistas, polípagas, alimentando-se de uma ampla gama de diferentes gêneros de fungos. Ainda, alguns fungos são mais adequados ao crescimento populacional de algumas espécies de nematóide do que outros, podendo suportar maiores números de indivíduos de nematóides alimentando-se em suas colônias.

Os resultados observados neste trabalho indicaram que ambos os fungos podem ser bons hospedeiros; porém, devido à importância fitossanitária da espécie de *Didymella brioniae* aqui utilizada como hospedeira, que causa sérios danos à cultura do melão, optou-se por não utilizá-la para a multiplicação do nematóide em laboratório, uma vez que se obtiveram também bons resultados com a cultura de *Fusarium* sp.

### 4.3 Estudo taxonômico dos fitonematóides encontrados em sementes de gramíneas forrageiras

Nas análises nematológicas realizadas em sementes de gramíneas forrageiras, foram extraídos espécimes de *Aphelenchoides* exibindo o comprimento do estilete de 15  $\mu\text{m}$  (Figura 2 A), campo lateral com quatro linhas (Figuras 2 B e 3 B), saco pós-uterino estreito, sem a presença de espermatozóides (Figura 2 C), e cauda mucronada exibindo três (Figura 2 D) e quatro mucros (Figuras 3 C e D). Esses caracteres, de acordo com algumas chaves encontradas na literatura, indicam que se trata de *A. besseyi* Christie, 1942 (FRANKLIN, 1959; SANWAL, 1961; FRANKLIN, 1978; BAUJARD, 1989; TACCONI & AMBROGIONI, 1993; SHAHINA, 1996). Além de *A. besseyi*, outra espécie do grupo encontrada exibia o comprimento do estilete de 10  $\mu\text{m}$  (Figura 4 A), ovário longo exibindo ovo (Figuras 4 B e C), campo lateral com 2 linhas (Figura 4 D), saco pós-uterino estreito não contendo espermatozóides (Figura 4 E) e cauda bifurcada (Figura 4 F). Esses caracteres, de acordo com os dados de algumas fontes (TACCONI & AMBROGIONI, 1993; SHAHINA, 1996), indicam que se trata de *A. bicaudatus* (Imamura, 1931) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941.

Outra espécie do grupo encontrada exibia o comprimento do estilete de 10  $\mu\text{m}$  e região labial mais larga que o primeiro anel do corpo (Figura 5 A), duas linhas no campo lateral (Figura 5 B), saco pós-uterino grande, quando comparado a *A. besseyi* e *A. bicaudatus* (Figura 5 C), e cauda mucronada exibindo um mucro na fêmea (Figuras 5 D) e no macho (Figura 5 E). Esses caracteres, de acordo com FRANKLIN (1978), BAUJARD (1989) e SHAHINA (1996), indicam que se trata de *A. fragarie* (Ritzema-Bos, 1890) Christie, 1932.

Encontrou-se uma espécie partenogenética (apenas fêmeas na população), exibindo o comprimento do estilete de 9  $\mu\text{m}$ , região labial ligeiramente mais larga que o primeiro anel do corpo (Figuras 6 A, 7 A e B), saco pós-uterino longo e estreito (Figura 6 B), cauda mucronada (Figura 6 C), porém exibindo mucros com crescimento fora dos padrões de espinho e estrela (Figuras 7 E e F). Este tipo de formação nos mucros, segundo SHAHINA (1996), trata-se do grupo 4, de caudas mucronadas e campo lateral

com 6 linhas (Figuras 7 G e H). Essas características morfológicas, segundo o mesmo autor, referem-se *A. sexlineatus* Eroshenko, 1967.

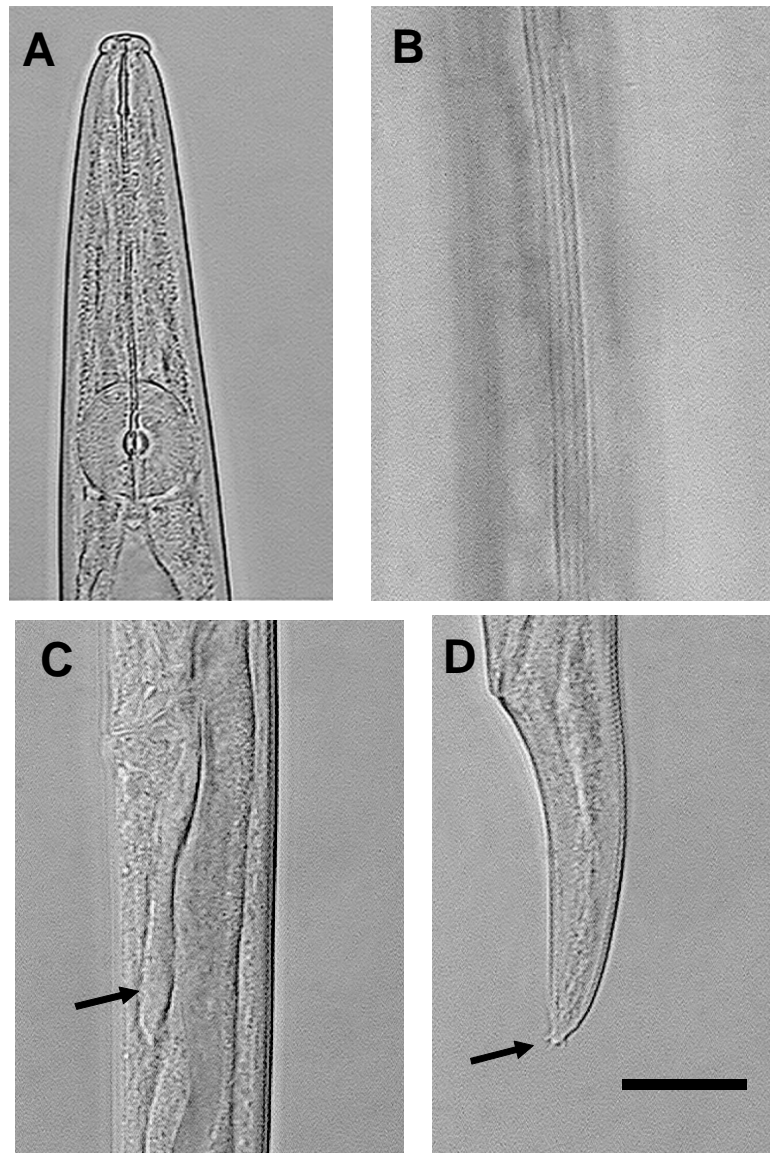


Figura 2. Fotomicrografias de *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 extraídos de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf. A) região labial; B) Campo lateral com quatro linhas; C) Saco pós-uterino; D) Cauda mucronada com três mucros. (barra de escala para todas as figuras = 20  $\mu$ m).

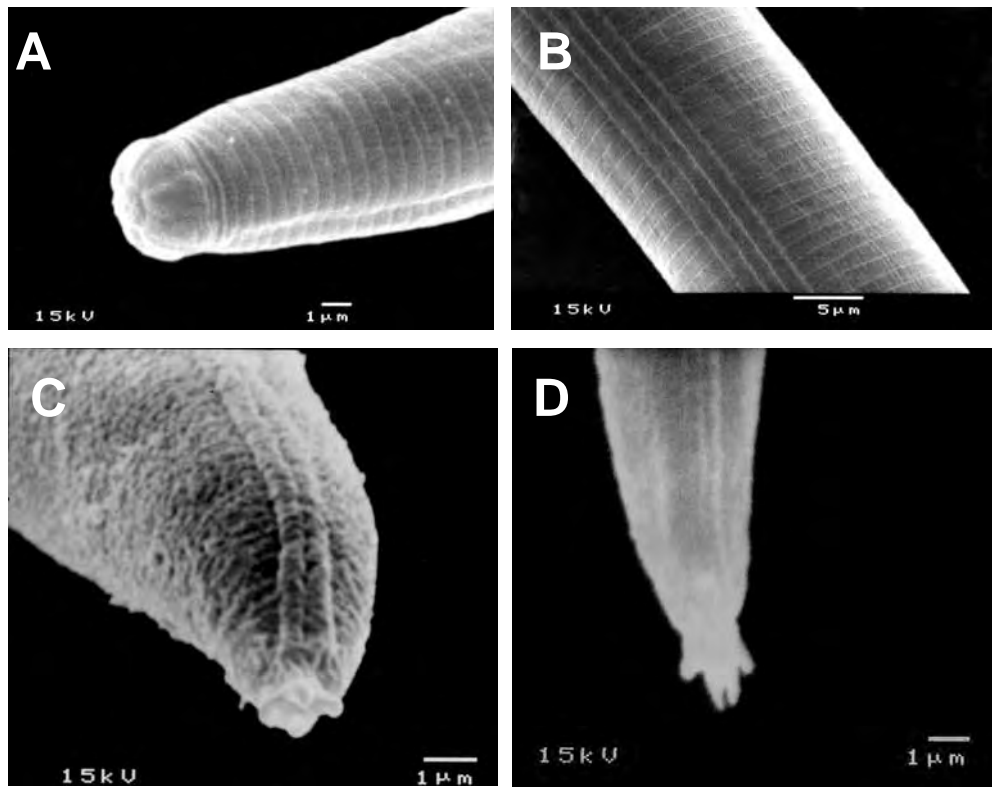


Figura 3. Eletromicrografias de varredura de *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 extraídos de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf. A) Região labial; B) Quatro linhas do campo lateral; C e D) Cauda com quatro mucros.

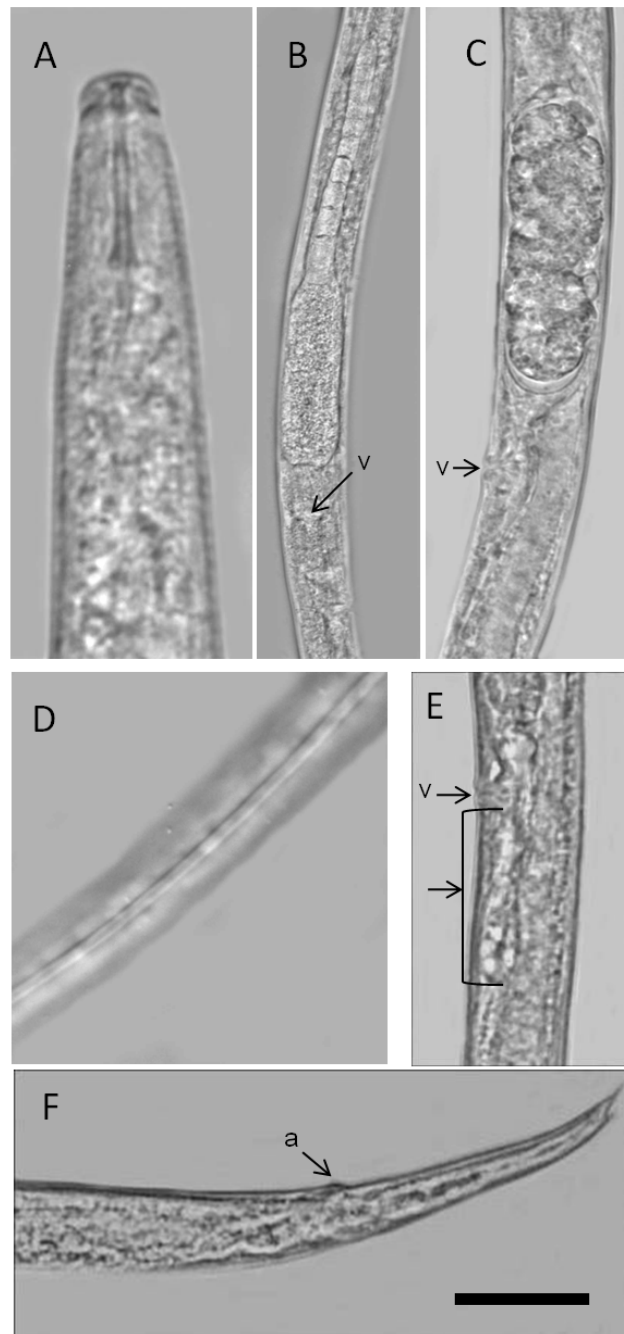


Figura 4. Fotomicrografias de *Aphelenchoides bicaudatus* (Imamura, 1931) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 extraídos de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf. A) Extremidade anterior; B) Ovário longo; C) Ovo; D) Campo lateral exibindo duas linhas; E) Saco pós-uterino; F) Cauda bimucronada. (v=vulva, a=ânus) (barra de escala para todas as figuras = 20  $\mu$ m)

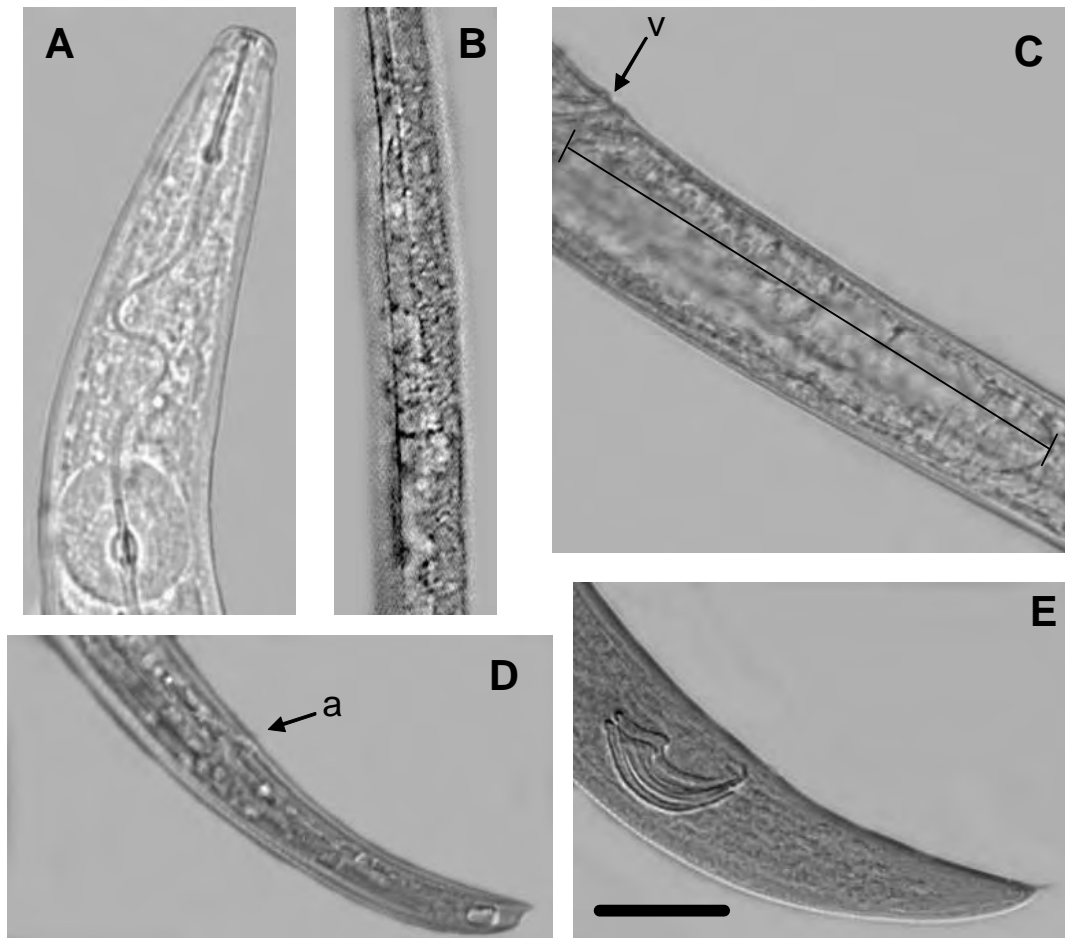


Figura 5. Fotomicrografias de *Aphelenchoides fragariae* (Ritzema-Bos, 1890) Christie, 1932 extraídos de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf. A) Extremidade anterior; B) Duas linhas no campo lateral; C) Saco pós-uterino; D) Cauda mucronada da fêmea; E) Cauda mucronada do macho. (v=vulva, a=ânus) (barra de escala para todas as figuras = 20  $\mu$ m).



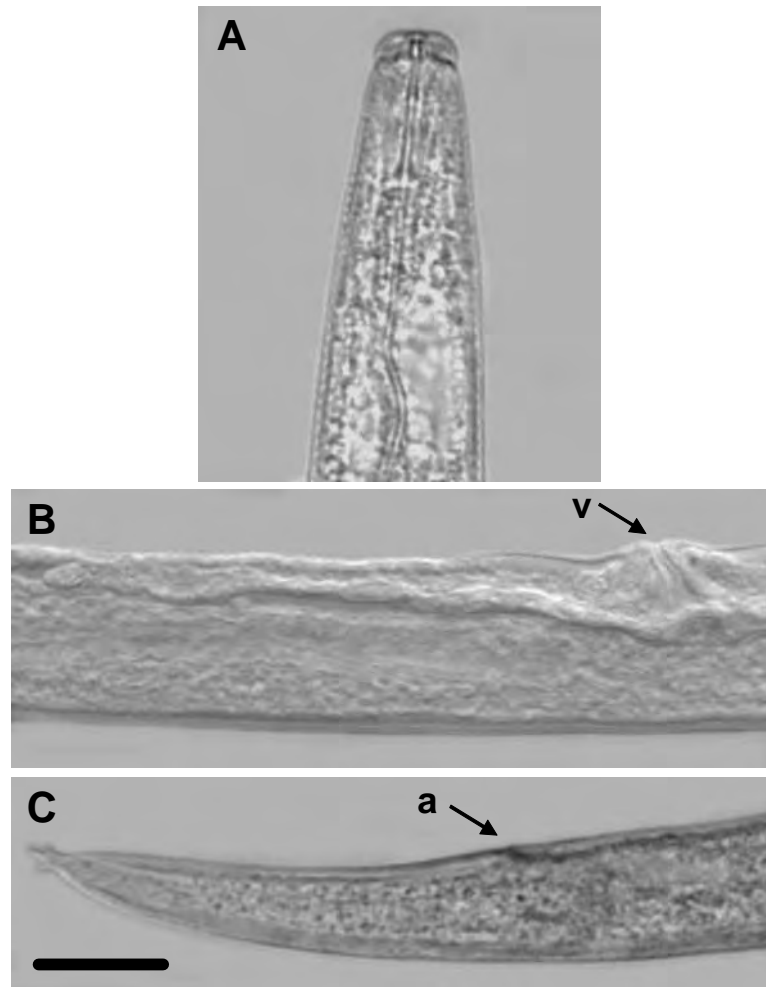


Figura 6. Fotomicrografias de *Aphelenchoides sexlineatus* Eroshenko, 1967 (Partenogenética) extraídos de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf. A) Extremidade anterior, B) Saco pós-uterino, e C) Cauda mucronada. (v=vulva, a=ânus). (barra de escala para todas as figuras = 20  $\mu$ m)

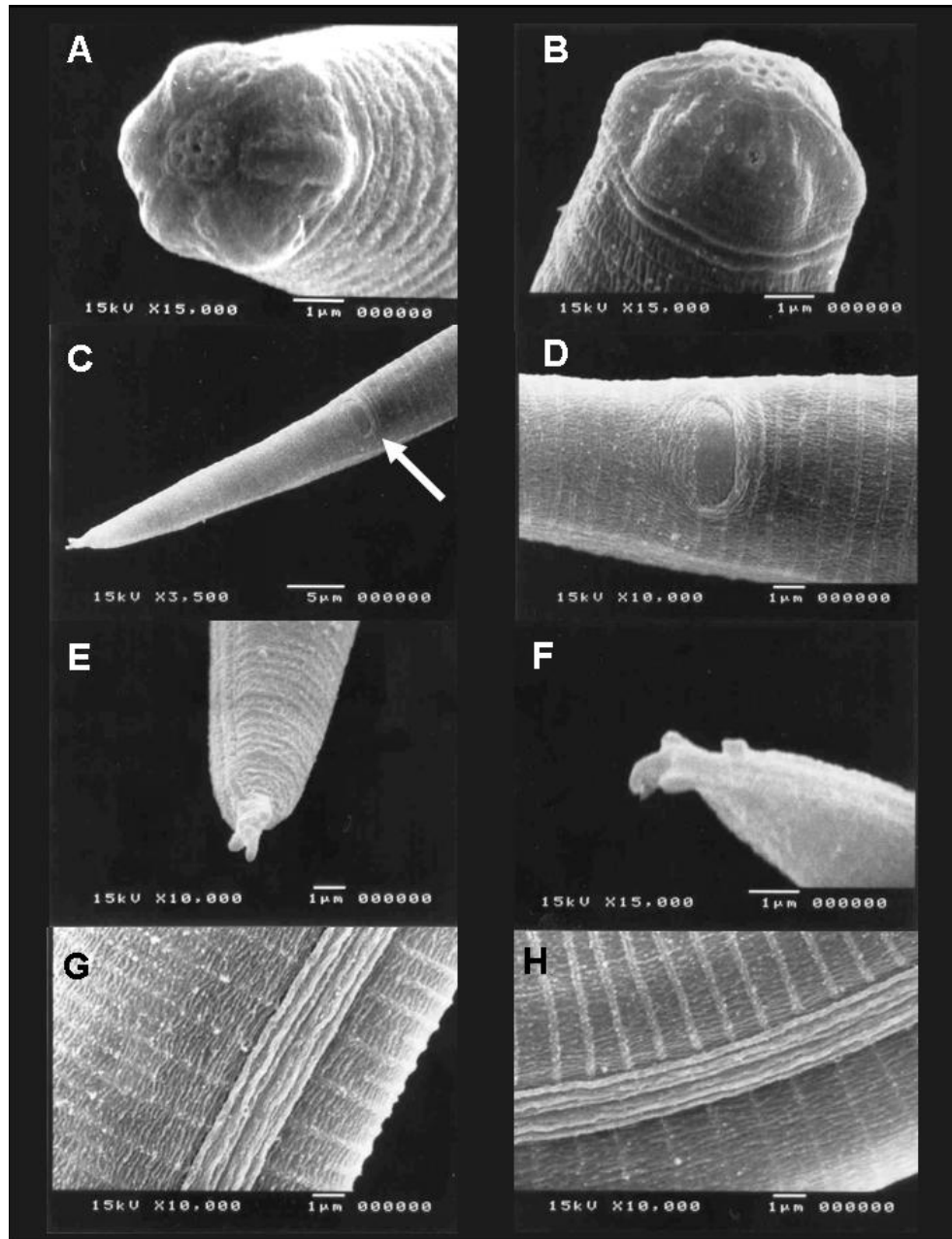


Figura 7. Eletromicrografias de varredura de *Aphelenchoides sexlineatus* Eroshenko, 1967 (Partenogenética) extraídos de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf. A-B) Região labial; C) Cauda mucronada, v=vulva; D) Vulva; E-F) Mucro; G-H) Seis linhas do campo lateral.

*Aphelenchoides besseyi* é um patógeno da cultura de arroz, agente causal da doença referida como ponta-branca, de ampla distribuição mundial (McGAWLEY & OVERSTREET, 1998). Por esse motivo, a presença desse nematóide em sementes de gramíneas forrageiras tem sérias implicações no comércio internacional de sementes de forrageiras, uma vez que países compradores de tais sementes têm esse nematóide entre as pragas quarentenárias. *Aphelenchoides bicaudatus* é um nematóide micrófago, porém pode ser encontrado associado ao solo de importantes culturas, tais como milho, algodão, cana-de-açúcar, arroz e tomate, sem, no entanto, causar prejuízo a essas culturas (SANWAL, 1961). *Aphelenchoides fragariae* é conhecido como nematóide de folhas e botões florais, sendo o morangueiro seu hospedeiro tipo, porém pode alimentar-se e multiplicar-se em culturas de diversos fungos (CARES et al., 2008). A espécie partenogenética, *A. sexlineatus*, não tinha sido anteriormente relatada no Brasil. Muito pouco se sabe sobre essa espécie, que também parece ser micrófaga, conseguindo reproduzir-se muito bem nos fungos testados neste trabalho.

Entre as espécies de *Ditylenchus* encontradas, uma exibia o comprimento médio do estilete de 7,1  $\mu\text{m}$  (Figura 8 A). O bulbo mediano é fusiforme, com paredes do lúmen espessas (Figura 8 B), sobreposição ligeiramente dorsal do esôfago sobre o intestino (Figura 8 C), campo lateral com seis linhas (Figuras 8 D), saco pós-uterino medindo cerca da metade da distância entre a vulva e o ânus (Figura 8 E), e cauda com término variando de subagudo a ligeiramente arredondado (Figuras 8 F e G). Esses caracteres, de acordo com HOOPER & SOUTHEY (1978) e FORTUNER (1982), indicam que se trata de *Ditylenchus myceliophagus* Goodey. Além de *D. myceliophagus*, outra população do grupo também foi encontrada exibindo o comprimento médio do estilete de 10  $\mu\text{m}$ . Observou-se que a região labial exibe três anéis, é dividida em seis setores, sendo os lábios laterais menores que os submedianos (Figuras 9 A). A cauda é pontiaguda (Figuras 9 B e C) e o campo lateral exibe apenas quatro linhas (Figura 9 D). Esses caracteres indicam que se trata de *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936 (HOOPER & SOUTHEY, 1978; FORTUNER, 1982). Foi encontrada uma espécie partenogenética, também neste grupo, que exibia o comprimento médio do estilete de 12  $\mu\text{m}$  (Figura 10 A). Ao MEV, observa-se que a placa labial, aproximadamente

quadrada, é dividida em seis setores; disco labial circular e proeminente, lábios submedianos fundidos com ligeira constrição dos lados ventral e dorsal, e lábios laterais visivelmente menores que os submedianos (Figuras 11 A e B). A cauda exhibe término agudo (Figuras 10 B, 11 C e D), saco pós-uterino curto, quando comparado às demais espécies do grupo mencionado (Figura 10 C), e o campo lateral exibindo seis linhas (Figuras 11 G e H). Esses caracteres indicam tratar-se de *Ditylenchus montanus* (Kiknadze & Eliashvile, 1988) Brzeski, 1991 (HOOPER & SOUTHEY, 1978; FORTUNER, 1982).

*Ditylenchus myceliophagus* já tinha sido relatado em sementes de gramíneas forrageiras (FAVORETO, 2004) e foi encontrada novamente em diversas amostras desta pesquisa. *Ditylenchus dipsaci* é o agente etiológico da doença referida como amarelão-do-alho (*Allium sativum* L.). VIGLIERCHIO (1971) observou que esse nematóide se reproduziu muito bem em fungos de solo, tais como *Verticillium* sp. e *Cladosporium* sp., em condições de laboratório. GOODEY et al. (1965) relataram que esse nematóide pode estar associado a mais de 400 espécies de plantas. Pouco se conhece sobre *Ditylenchus montanus*, espécie que não tinha sido relatada anteriormente no Brasil. Esse nematóide exibiu elevado fator de reprodução nas culturas de *Fusarium* sp. e de *Didymella brioniae* no presente estudo.

Foi observada também em sementes de gramíneas forrageiras uma espécie partenogenética de *Aphelenchus* Bastian, 1865 que ainda não foi identificada. Ao MEV, observa-se que a placa labial é arredondada, dividida em seis setores, disco labial circular e pouco proeminente (Figuras 12 A e B). A cauda termina com a largura aproximadamente igual à largura do corpo (Figuras 12 C e D) e dez linhas no campo lateral (Figura 12 F). Não existe registro desse nematóide no Brasil, sendo que esse grupo é muito pouco estudado no mundo.

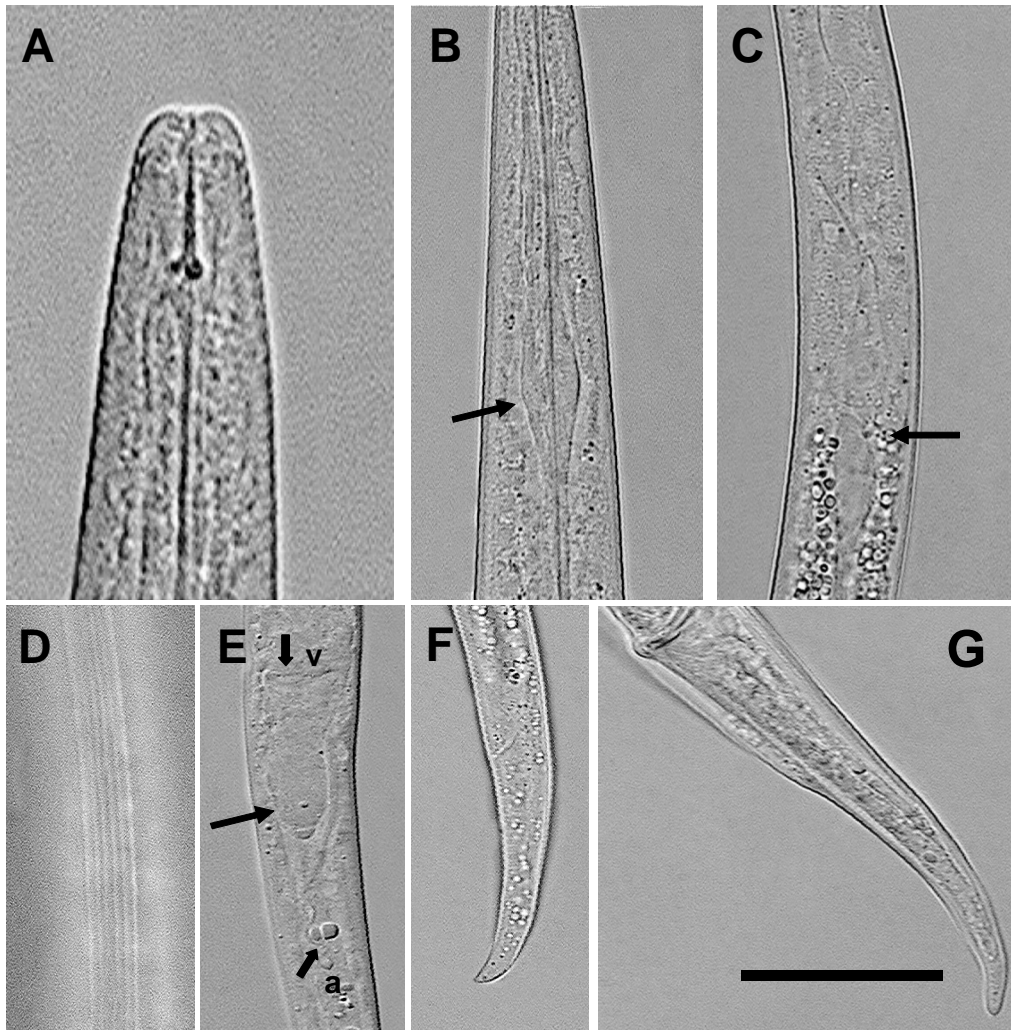


Figura 8. Fotomicrografias de *Ditylenchus myceliophagus* Goodey extraídos de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf. A) Região labial; B) Bulbo mediano fusiforme; C) Sobreposição ligeiramente dorsal do esôfago sobre o intestino; D) Seis linhas no campo lateral; E) Saco pós-uterino (v=vulva, a=ânus); F) Cauda da fêmea; G) Cauda do macho. (barra da escala = 10  $\mu$ m para todas as figuras).

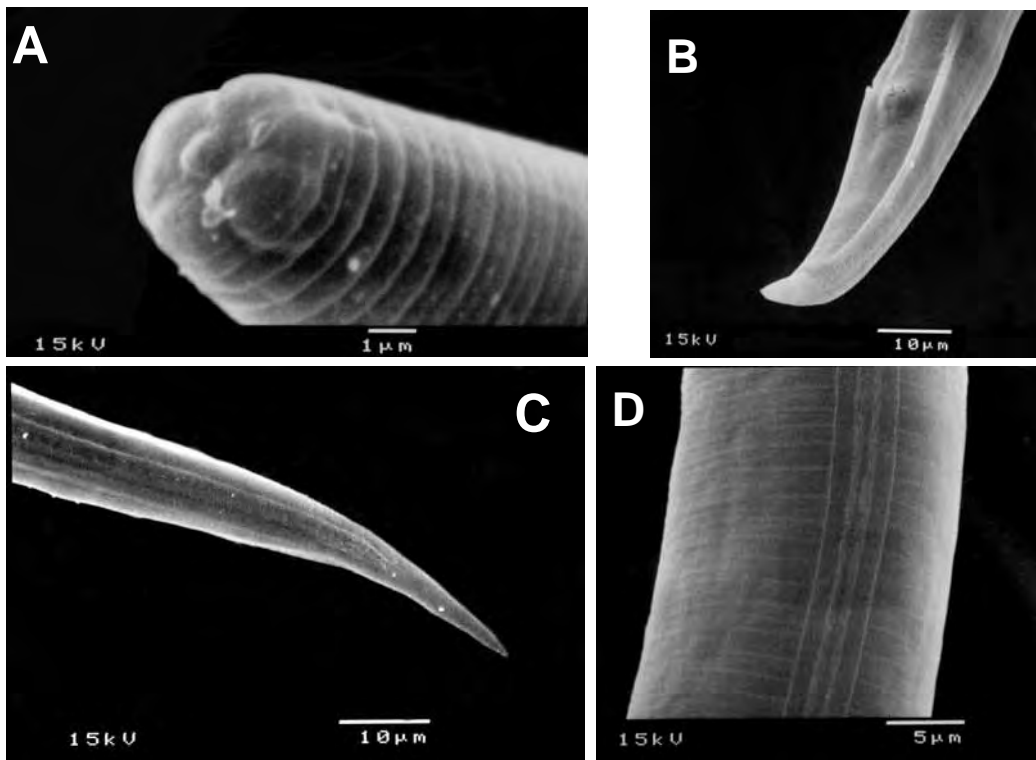


Figura 9. Eletromicrografias de varredura de *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936 extraídos de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf. A) Região labial; B) Cauda do macho; C) Cauda da fêmea; D) Quatro linhas no campo lateral.

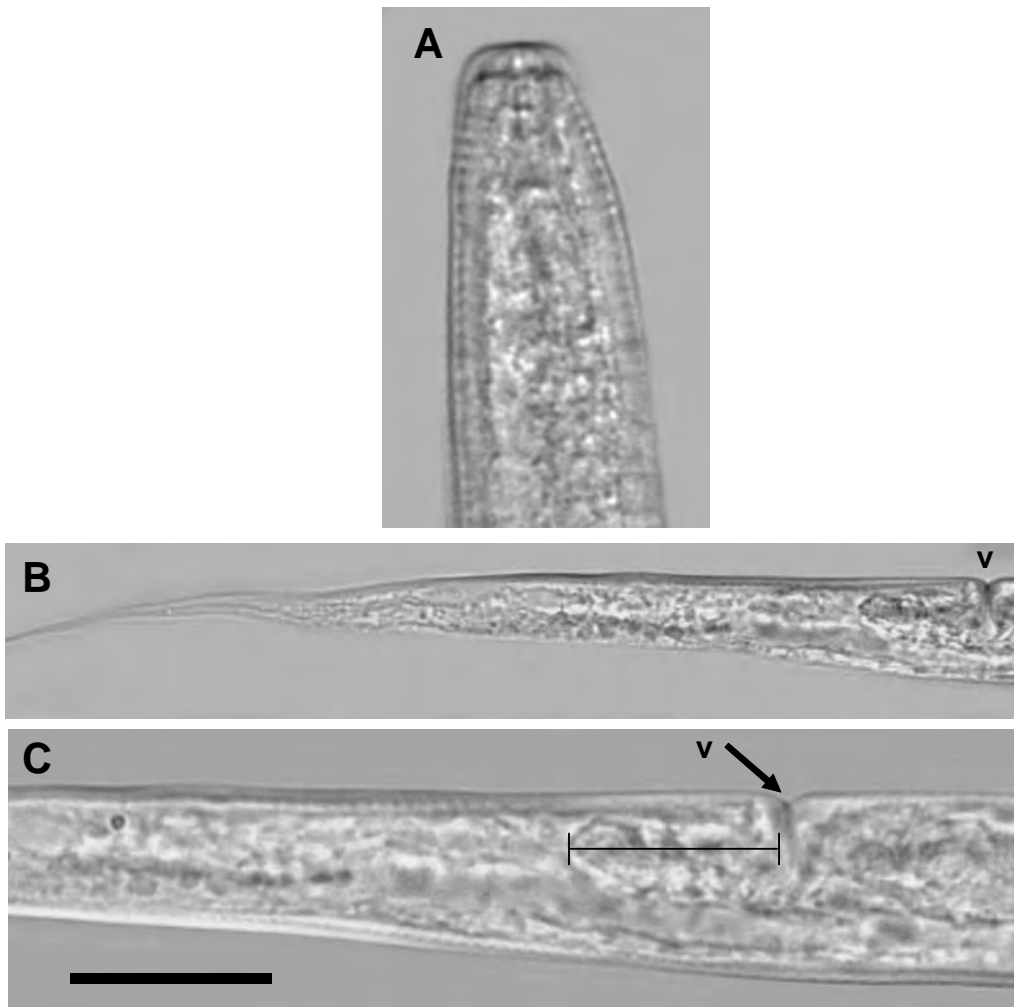


Figura 10. Fotomicrografias de *Ditylenchus montanus* (Kiknadze & Eliashvile, 1988) Brzeski, 1991 (Partenogenética) extraídos de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf. A) Região labial; B) Cauda da fêmea; C) Saco pós-uterino (v=vulva). (barra da escala = 10  $\mu$ m para todas as figuras).

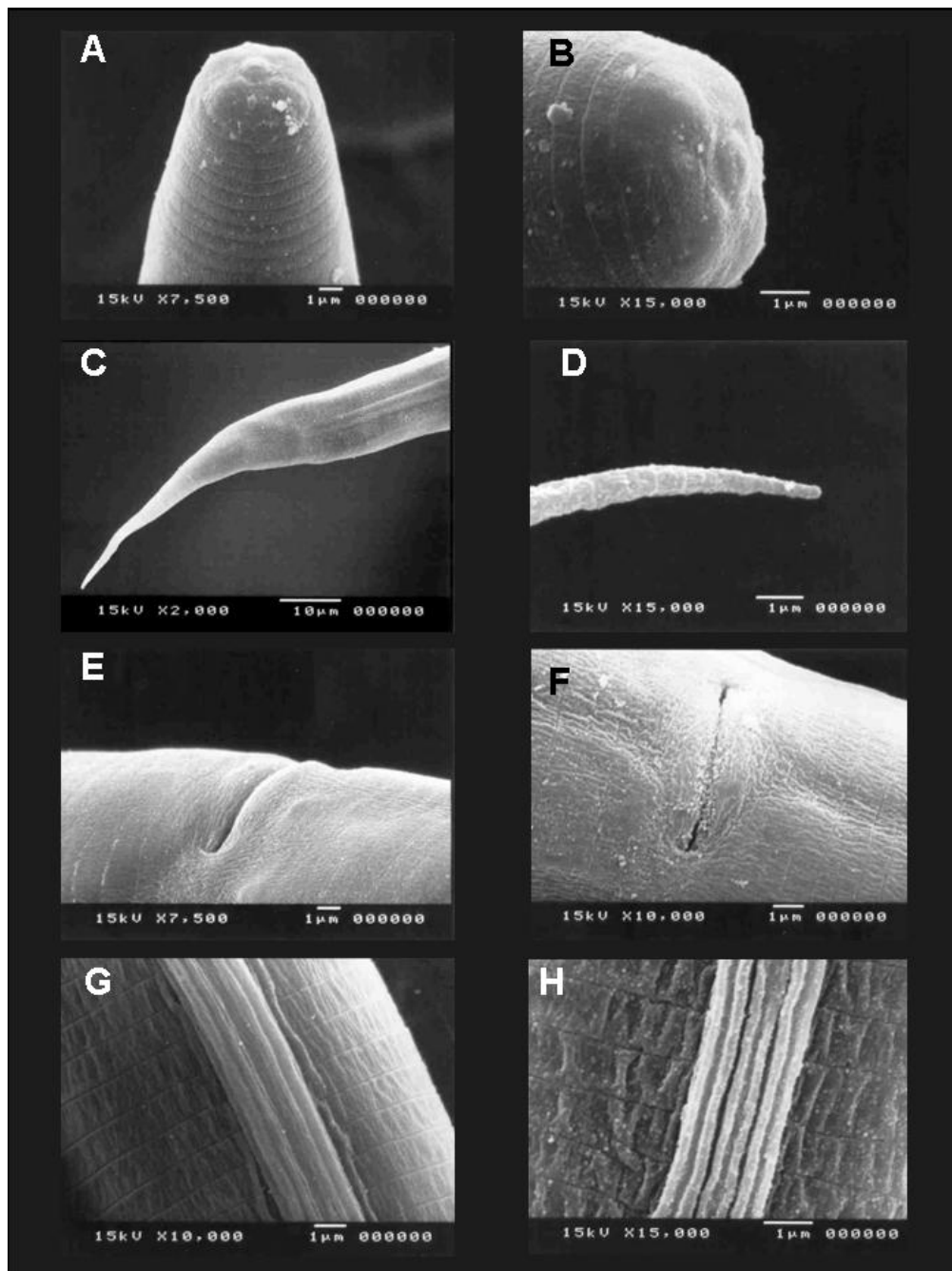


Figura 11. Eletromicrografias de varredura de *Ditylenchus montanus* (Kiknadze & Eliashvile, 1988) Brzeski, 1991 (Partenogenética) extraídos de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf. A-B) Região labial; C-D) Cauda pontiaguda; E-F) Vulva; G-H) Seis linhas do campo lateral.



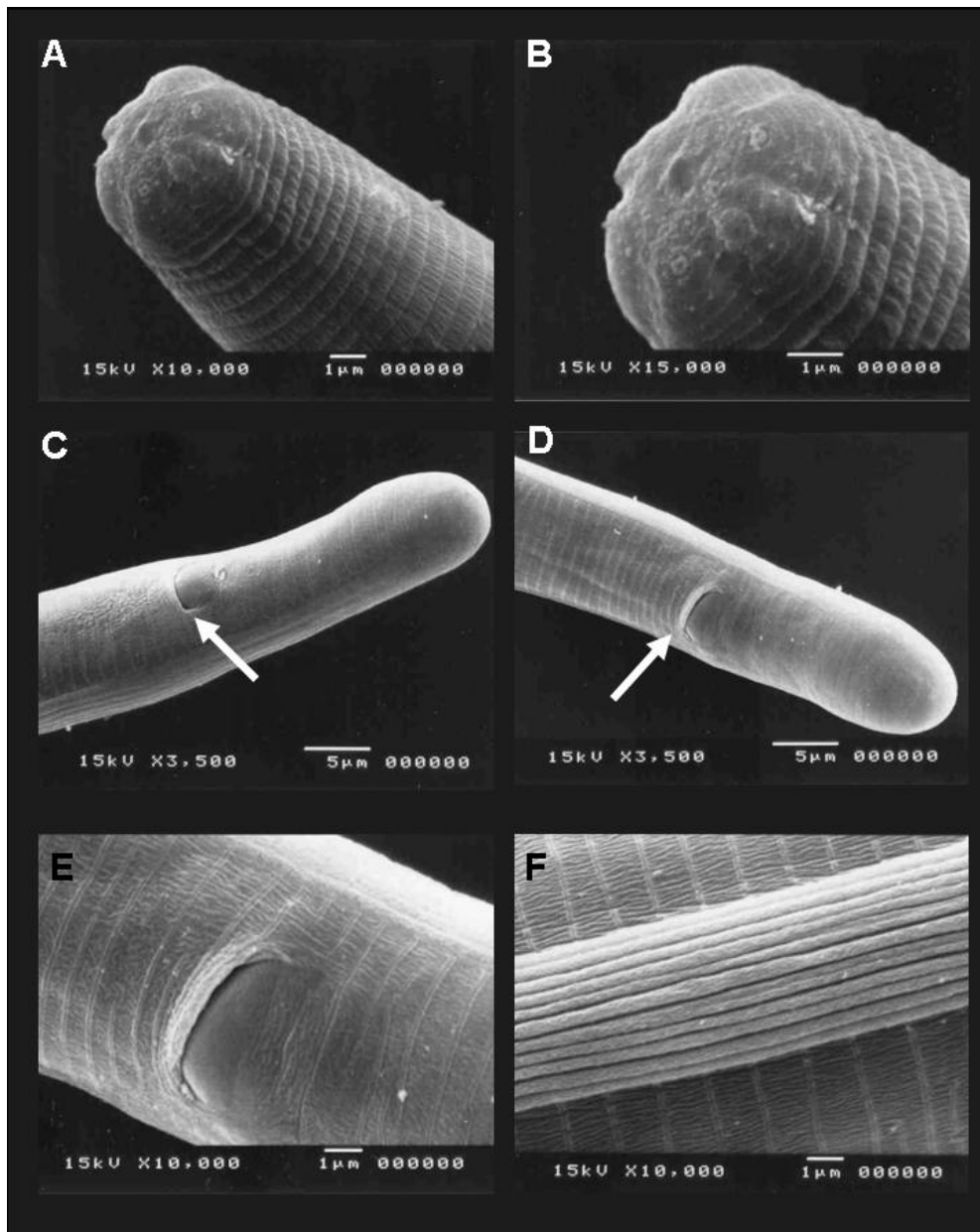


Figura 12. Eletromicrografias de varredura de *Aphelenchus* sp. (Partenogenética) extraídos de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf. A-B) Região labial; C-D) Cauda (v=vulva); E) Vulva; F) Linhas do campo lateral.

## 4.4 Estudo da denematização de sementes de gramíneas forrageiras

### 4.4.1 Tratamentos Químicos

Na análise prévia das amostras de solo coletadas nas parcelas do experimento, instalado na região de Presidente Prudente-SP foram recuperados espécimes de *Aphelenchoides* spp. em todas as parcelas, com população média de 26 espécimes/100 cm<sup>3</sup> das amostras de solo. Em seis das 21 amostras das parcelas do experimento de Tupaciguara-MG não foram encontrados espécimes de *Aphelenchoides*, e a média foi de 1,7 espécime/100 cm<sup>3</sup> das amostras de solo. Tal diferença pode ter sido causada pelo fato de que a área de Presidente Prudente já vinha sendo cultivada com pastagens de gramíneas, enquanto a área de Tupaciguara vinha sendo cultivada com soja.

Na primeira e segunda avaliações, aos 60 e 120 dias após a implantação dos experimentos a campo, foram encontrados nematóides apenas nas amostras de solo e raízes. Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos em nenhum dos locais (Tabela 3). Nas panículas com sementes maduras, coletadas na terceira avaliação, não foram encontrados nematóides nas sementes em nenhum dos locais. Na quarta avaliação, foi encontrada expressiva população de *Aphelenchoides* spp. nas sementes coletadas sobre o solo, em ambos os locais. A média do número de nematóide nas parcelas foi de 300 e de 712 nematóides em 10 g de semente, em Tupaciguara e Presidente Prudente, respectivamente. Considerando-se que as sementes de *B. brizantha* utilizadas estavam infectadas por 1.350 espécimes de *Aphelenchoides* spp. por 10 g de sementes e que esses nematóides não foram encontrados nas partes aéreas das plantas, os dados indicam que esses nematóides não são patógenos da *B. brizantha*, uma vez que não se multiplicaram no tratamento-testemunha (sem tratamento das sementes). Como também não houve diferença entre a testemunha e os demais tratamentos, os dados indicam que não houve eficácia entre os produtos utilizados para o tratamento das sementes.

Tabela 3. Número médio de *Aphelenchoides* spp. extraídos do solo e das raízes, de *Brachiaria brizantha* cv. MG-5 aos 60 e 120 dias após a implantação dos experimentos a campo, nos municípios de Tupaciguara (MG) e Presidente Prudente (SP).

Doses/kg de sementes	Tupaciguara -MG				Presidente Prudente - SP			
	60 dias		120 dias		60 dias		120 dias	
	Solo	Raiz	Solo	Raiz	Solo	Raiz	Solo	Raiz
1- 1,5mL abamectina	1,33a	0,17a	1,40a	1,27a	2,47a	1,92a	1,39a	1,26a
2- 3,0mL abamectina	0,82a	0,41a	0,61a	1,06a	2,40a	2,17a	0,61a	1,05a
3- 6,0mL abamectina	0,81a	0,45a	0,96a	0,52a	2,66a	2,73a	0,96a	0,52a
4- 3,0mL imidaclopride	0,66a	0,65a	0,66a	0,52a	2,24a	2,07a	0,66a	0,52a
5- 6,0mL imidaclopride	0,81a	0,55a	0,48a	0,89a	2,18a	2,58a	0,48a	0,89a
6- 12,0mL imidaclopride	0,94a	0,66a	0,99a	0,69a	2,38a	2,33a	0,99a	0,69a
7- 3,0mL clotianidina	0,97a	0,51a	0,96a	0,89a	2,22a	2,07a	0,95a	0,90a
8- 6,0mL clotianidina	0,76a	0,00a	0,78a	0,85a	2,61a	1,94a	0,78a	0,85a
9- 12,0mL clotianidina	0,93a	0,17a	1,07a	0,73a	2,18a	2,61a	1,07a	0,73a
10- 7,5mL tiodicarbe	0,38a	0,52a	0,35a	1,29a	2,57a	2,03a	0,35a	1,29a
11- 15,0mL tiodicarbe	0,97a	0,41a	0,89a	0,83a	2,59a	2,57a	0,89a	0,83a
12- 30,0mL tiodicarbe	0,52a	0,17a	0,85a	0,72a	2,82a	2,67a	0,85a	0,72a
13- 12,0mL imid+tiod	1,01a	0,24a	0,72a	0,41a	2,72a	2,58a	0,72a	0,41a
14- 24,0mL imid+tiod	1,00a	0,17a	0,89a	1,13a	2,41a	2,30a	0,89a	1,13a
15- 48,0mL imid+tiod	0,48a	0,00a	0,79a	1,05a	2,56a	2,49a	0,79a	1,05a
16- 12,5mL carbofurano	0,63a	0,48a	0,89a	0,45a	2,45a	2,64a	0,89a	1,45a
17- 25,0mL carbofurano	0,55a	0,59a	0,89a	1,08a	2,76a	2,76a	0,89a	1,07a
18- 50,0mL carbofurano	1,00a	0,68a	0,47a	0,78a	2,41a	2,07a	0,48a	0,78a
19- testemunha	0,78a	0,69a	0,28a	1,39a	2,38a	2,30a	0,28a	1,40a
20- testemunha	0,45a	0,35a	1,11a	0,69a	2,35a	2,12a	1,11a	0,70a
21- testemunha	1,13a	0,24a	1,00a	1,26a	2,39a	2,41a	1,00a	1,26a
Teste F	0,93 <sup>ns</sup>	0,88 <sup>ns</sup>	0,84 <sup>ns</sup>	0,76 <sup>ns</sup>	0,60 <sup>ns</sup>	0,49 <sup>ns</sup>	1,12 <sup>ns</sup>	1,30 <sup>ns</sup>

\*Dados transformados em  $\log(x+1)$

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

\*\*\*imid+tiod= imidaclopride + tiodicarbe

Resultados bastante parecidos foram obtidos por GARCIA & TENENTE (2001) quando estudaram, em laboratório, o efeito de produtos químicos aplicados às sementes de *Panicum maximum*. Esses autores observaram que os tratamentos reduziam o número de nematóides nas sementes sem erradicá-los. WHITEHEAD

(1994), estudando o efeito de carbofurano em alfafa, observou redução no número de nematóides que a infestavam. O mesmo autor sugere que uma pequena quantidade de carbofurano espalhada ao redor das sementes, no plantio, poderia ser benéfica à denematização.

Muito pouco se sabe sobre a denematização das forrageiras. Em sementes de arroz, a erradicação de *A. besseyi* vem sendo estudada há anos, sem sucesso (YOSHII & YAMAMOTO, 1950; DA SILVEIRA et al., 1989; TENENTE & MANSO, 1994). Porém, MARTINS et al. (1976) relataram a erradicação de *A. besseyi* de sementes infectadas, utilizando-se de carbofurano, em tratamento por via seca, efetuado dois dias antes da semeadura. TENENTE et al. (1999), em testes de laboratório com 50 sementes de arroz, observaram que carbofurano, em maior dose (64 mL/L/30min), foi eficiente na desinfecção dessas sementes, enquanto a metade dessa dose apenas reduziu o número de nematóides nas sementes. Entretanto, no presente estudo, não se obteve a denematização das sementes com nenhum dos produtos utilizados.

#### **4.4.2 Irradiação de sementes**

No experimento com fonte de  $^{60}\text{Co}$ , nenhuma das doses aplicadas foi efetiva na erradicação dos nematóides nas sementes, pois não diferiram da testemunha. Os resultados indicaram, ainda, que as doses de 1,0; 1,5 e 2,0 KGy comprometeram a germinação das sementes de *B. brizantha* (Tabela 4). Em sementes, a irradiação em baixas doses tem conseguido gerar plantas mais enraizadas e, por isso, mais resistentes. O retardo da maturação e a redução da transmissão do patógeno foram os resultados mais expressivos já conseguidos com a irradiação. Ainda, a aplicação consegue destruir bactérias, fungos e outros microorganismos (AQUINO, 2002). Porém, no presente estudo, não se obteve a denematização das sementes com nenhuma das doses utilizadas.

Tabela 4. Número médio de *Aphelenchoides* spp. e *Ditylenchus* spp. e porcentagem de germinação das sementes de *Brachiaria brizantha* cv. MG-5, 5 dias após tratamentos com  $^{60}\text{Co}$ .

Tratamentos	<i>Aphelenchoides</i> spp.	<i>Ditylenchus</i> spp.	Porcentagem de Germinação
Testemunha (sem irradiação)	268a	48a	68a
0,5 KGy	332a	44a	69a
1,0 KGy	336a	44a	0b
1,5 KGy	328a	44a	0b
2,0 KGy	280a	56a	0b
Teste F	1,15 <sup>ns</sup>	0,42 <sup>ns</sup>	888,28 <sup>**</sup>

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

<sup>\*\*</sup>Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>ns</sup>Não-significativo ao nível de 5% de probabilidade

#### 4.5 Estudo da infecção de sementes de gramíneas forrageiras por *Aphelenchoides sexlineatus*

Nesse experimento observou-se que as médias dos nematóides recuperados no segundo, quarto e sexto dia após a infestação foram diferentes estatisticamente (Tabela 5), ocorrendo um aumento gradativo de nematóides recuperados com o passar dos dias. Esses dados sugerem que a penetração dos nematóides nas sementes de *Brachiaria* spp. ocorre no solo, que pode ser uma constante fonte de inóculo, o que contraria as observações de YOSHII & YAMAMOTO (1950) para sementes de arroz. Ainda em arroz, SILVA (1992) observou que a penetração de *A. besseyi* ocorre na espiguetta, antes da floração, através de uma abertura natural existente na porção apical, entre a pálea e a lema.

Tabela 5. Número médio de *Aphelenchoides sexlineatus* recuperados das sementes de *Brachiaria brizantha* cv. MG-5 e da areia no segundo, quarto e sexto dias após a infestação.

Períodos (em dias)	Número de nematóides recuperados	
	Areia*	Sementes
2	3,7a	222c
4	3,6a	478b
6	3,8a	632a
P>F	0,93 <sup>ns</sup>	0,00001**
D.M.S.	1,4	107,4
C.V.	16,7	10,7

\* Medias transformadas em Log (X+1), seguidas de mesma letra (nas colunas) não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>ns</sup>Não-significativo ao nível de 5% de probabilidade

No solo, o nematóide sobrevive alimentando-se de fungos saprófitos e patogênicos, tais como: *Alternaria* spp., *Curvularia* spp., *Fusarium* spp., *Helminthosporium* spp., *Higrospora* sp. e *Botrytis cinerea* (BRIDGE et al., 1990). RUESS et al. (2000) observaram que espécies de *Aphelenchoides* podem alimentar-se e sobreviver sobre 15 dos 17 fungos testados, sendo que, em cinco deles, o nematóide conseguiu alta taxa de multiplicação. Os autores mencionaram, também, que os nematóides que se alimentam de fungos, são comumente considerados generalistas e polípagos, podendo alimentar-se de uma ampla gama de fungos. A diferença no grau de suscetibilidade apresentada por diversas plantas à infecção faz com que se atribua esse comportamento mais a fatores ambientais e do hospedeiro do que a características intrínsecas do nematóide (ATKINS & TODD, 1959). De fato, por não serem parasitos obrigatórios, já que se alimentam de fungos que crescem na matéria orgânica do solo, a penetração dos nematóides nas sementes maduras, caídas ao solo, pode ser mais por uma necessidade de abrigo do que de alimento.

## V. CONCLUSÕES

- 1) Há uma ampla distribuição dos nematóides em sementes de forrageiras nas regiões produtoras do Brasil.
- 2) Nematóides e fungos são encontrados infectando sementes de diferentes espécies de Poaceae forrageiras e são amplamente disseminados por essas no País.
- 3) A maior infecção de sementes de *Brachiaria brizantha* cv. MG-5 ocorre quando essas caem no solo. A colheita antes das sementes caírem no solo, pode ser uma alternativa para a redução da infecção dessa sementes por nematóides.
- 4) Tanto nas sementes colhidas no cacho, quanto nas colhidas no solo, foi constatada a infestação por fungos.
- 5) Espécies de *Aphelenchoides*, *Ditylenchus* e *Aphelenchus* podem ser encontradas em sementes forrageiras no Brasil.
- 6) Os tratamentos químicos utilizados não são eficazes para a denematização das sementes.
- 7) A utilização de irradiação em altas doses de  $^{60}\text{Co}$  compromete a germinação da semente e não elimina os nematóides presentes nas mesmas.
- 8) A presença de nematóides em sementes de gramíneas forrageiras parece não comprometer a produção de massa nas pastagens, entretanto tem implicações de natureza quarentenária que dificulta as exportações.

## VI. REFERÊNCIAS

ALVES, S. J.; SOARES FILHO, C. V. Espécies forrageiras recomendadas para o estado do Paraná. In: MONTEIRO, A. L. G.; MORAIS, A.; CORRÊA, E. A. S.; OLIVEIRA, J. C.; SÁ, J. P. G.; ALVES, S. J.; POSTIGLIONI, S. R.; CECATO, U. **Forragicultura no Paraná**. Londrina: IAPAR, 1996. p.181-195.

AQUINO, S. **Efeitos da radiação gama no crescimento de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxinas e no emprego da técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR) em amostras de grãos de milho inoculadas artificialmente**. 2002. 85 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2002.

ARTHUR, V. Controle de insetos-praga por radiação ionizantes. **O Biológico**, São Paulo, v. 59, n. 1, p. 77-79, 1997

ATKINS, J. G.; TODD, E. H. White tip disease of rice: III. Yield tests and varietal resistance. **Phytopathology**, Baltimore, v.49, n.4, p.189-191, 1959.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4.d St. Paul: The Americam Phythological Society, 1998. p. 218.

BAUJARD, P. Identification of Aphelenchids. In: FORTUNER, R. **Nematode identification and expert system technology**. New York: Plenum Press, 1989. p.153-156.



BERNARD, E. C.; GWINN, K. D.; GRIFFIN, G. D. Forage grasses. In: BARKER, K. R.; PETERSON, G. A.; WINDHAM, G. L.; BARTELS, J. M.; HATFIELD, J. M.; BAENZIGER, P. S.; BIGHAM, J. M. **Plant and nematode interactions**. Madison: American Society of Agronomy, 1998. p. 427-454.

BIRD, A. F.; RIDDLE, D. L. Effect of attachment of *Corynebacterium rathayi* on movement of *Anguina agrostis* larvae. **International Journal for Parasitology**, Sydney, v. 14, p. 503-511, 1984.

BRIDGE, J.; LUC, M.; PLOWRIGHT, R. A. Nematode parasite of rice. In: LUC, M.; SIKORA R.A.; BRIDGE, J. **Plant parasitic nematode in subtropical and tropical agriculture**. London: C.A.B. Int. Inst. Parasitology, 1990. p. 69-108.

BUENO, E. R. V.; PRATES, M.; TENENTE, R. C. V. Avaliação de métodos tradicionais de extração de nematóides aplicados às sementes de *Panicum maximum* infestadas por *Aphelenchoides besseyi*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 231-217, 2002.

BYRD Jr, D. W.; KIRKPATRICK, J.; BARKER, K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology**, DeLeon Springs, v.15, n.1, p. 142-143, 1983.

CARES, J. E.; TENENTE, R. C. V. Taxonomia de nematóides de sementes, bulbos e caules – parte I. Passo Fundo: RAPP, v. 15, p. 69-98. 2007.

CARES, J. E.; SANTOS, J. R. P.; TENENTE, R. C. V. Taxonomia de nematóides de sementes, bulbos e caules – parte II. Passo Fundo: RAPP, v. 16, p. 39-84. 2008.

CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA NUCLEAR. **Fatos sobre irradiação de alimentos – Séries de fichas descritivas do grupo consultivo**

**internacional sobre irradiação de alimentos (ICGFI)**. Belo Horizonte: CDTN, 1999. 46p.

COOK, R. & EVANS, K. Resistance and Tolerance. In: BROWN, R. H.; KERRY, B. R. (Ed.). **Principles and practice of nematode control in crops**. Marrickville: Academic Press, 1987. p. 179-231.

COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: State Agricultural Research Center, 1972. 77 p.

COSTA MANSO, E.; TENENTE, R. C. V.; FERRAZ, L. C. B.; OLIVEIRA, R. S.; MESQUITA, R. **Catálogo de fitonematóides encontrados associados a diferentes tipos de plantas no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1994. 488 p.

DA SILVEIRA, S. G. P.; CURI, S. M.; LEITE, N.; CAMARGO, O. B. A.; NETO F. B.; ARRUDA, H. V. Controle do nematóide *Aphelenchoides besseyi* das sementes de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 8, p. 1027-1032, 1989.

EISENBACK, J. D. Preparation of nematodes for scanning electron microscopy. In: NICKLE, W. R. **Manual of agricultural nematology**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 87-96.

FAVORETO, L. **Estudo de fitonematóides em sementes de gramíneas forrageiras**. 2004. 43 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

FAVORETO, L.; SANTOS, J. M. dos. Eficácia comparativa de métodos de extração de nematóides de sementes de gramíneas forrageiras. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 1, p. 89, 2004. Resumo.

FAVORETO, L.; SANTOS, J. M. dos; TAKASHI, A. Nematóides detectados em amostras de sementes de gramíneas forrageiras. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 1, p. 88-89, 2004. Resumo.

FAVORETO, L.; SANTOS, J. M. dos; TAKASHI, A.; RIBEIRO, N. R.; TOLEDO, A. M.; CAMPOS, A. S. Nematóides em sementes de gramíneas forrageiras do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 24., 2003, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2003. p. 143. Resumo.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal; principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: Sociedade de Investigação Florestais, 1989. 570 p.

FORTUNER, R.; WILLIAMS, K. J. O. Review of the literature on *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942, the nematode causing white tip disease of rice. **Helminthological Abstracts**, Farmham Royal, v. 44, n. 1, p. 1-40, 1975. Abstract.

FORTUNER, R. On the genus *Ditylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Tylenchida). **Revue de Nématologie**, Paris, v. 5, p. 17-38, 1982.

FRANCO, S. S. H.; FRANCO, J. G.; ARTHUR, V. Determinação da dose esterilizante de radiação gama do Cobalto-60 para adultos de *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zeamais* e *Sitophilus granarius* em arroz, milho e trigo. **Revista Ecosystema**, Espírito Santo do Pinhal, v. 22, p. 120-121, 1997.

FRANKLIN, M. T. **Plant-parasitic nematodes of the genus *Aphelenchoides* Fischer, 1894**. London: Ministry of Agriculture Fisheries and Food, 1959. 77 p.

FRANKLIN, M. T. *Aphelenchoides* and related genera. In: SOUTHEY, J. F. **Plant nematology**. London: Ministry of Agriculture Fisheries and Food, 1978. p. 172-187.

GARCIA, J. W.; TENENTE, R. C. V.; MENDES, M. A. S. Thermal treatment applied to *Panicum maximum* seeds for eradication of *Aphelenchoides besseyi* and plant pathogenic fungi. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 41-47, 2000.

GARCIA, J. W.; TENENTE, R. C. V. Controle químico de *Aphelenchoides besseyi* Christie em sementes de *Panicum maximum*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 95-98, 2001.

GOKTE, N.; MANTHUR, V. K. Treatment schedule for denematization of seeds of *Setaria italica* and *Panicum miliaceum* infested with *Aphelenchoides besseyi*. **Nematologica**, Leiden, v. 39, p. 274-276, 1993.

HOOPER, D. J.; SOUTHEY, J. F. *Ditylenchus*, *Anguina* and related genera. In: SOUTHEY, J. F. **Plant nematology**. London: Ministry of Agriculture Fisheries and Food, 1978. p. 78-97.

HUANG, C. S. O nematóide da "ponta branca" do arroz, *Aphelenchoides besseyi*, um patógeno transmitido pelas sementes. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA, 3., 1978, Mossoró. **Trabalhos Apresentados...** Mossoró: Sociedade Brasileira de Nematologia, 1978. p. 5-18.

HUANG, C. S. Detection of *Aphelenchoides besseyi* in rice seeds and correlation between seed infection and crop performance. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 11, p. 691-696, 1983.

HUANG, C. S.; HUANG, S. P. Bionomics of white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi* in rice forest and developing grains. **Botanical Bulletin Academia Sínica**, Taipei, v. 13, n. 1, p. 1-10, 1972.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. ISTA. Seed health testing. **Seed Science and Technology**, Bangalore, v. 4, p. 3-49, 1976.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 48, p. 692-695, 1964.

LORDELLO, L. G. E. Nematóides parasitos de folhas (Gênero: *Aphelenchoides*). In: **Nematóides das plantas cultivadas**. São Paulo: Livraria Nobel, 1981, p. 202-206.

LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CAB International, 1990. 629 p.

MACEDO, M. C. M.; ZIMMER, A. H. Sistema pasto-lavoura e seus efeitos na produtividade agropecuária. In: FAVORETO, V.; RODRIGUES, L. R. A.; RICARDO, A. R. **Ecossistema de pastagens**. Jaboticabal: FUNEP, 1993. p. 216-245.

MARQUES, A. S. A.; HUANG, C. S. Fungos parasitas de *Aphelenchoides besseyi*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n. 9, p. 139-143, 1984.

MARTINS, J. F. S.; GONÇALO, J. F. P.; LORDELLO, L. G. E. Tratamento químico de sementes de arroz visando a erradicação do nematóide *Aphelenchoides besseyi*. **O Solo**, Piracicaba, v. 68, n. 1, p. 58-61, 1976.

MEDEIROS, A. C. S.; MENDES, M. A. S.; FERREIRA, M. A. S. V.; ARAGÃO, F. J. L. Avaliação quali-quantitativa de fungos associados a sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* (FR. ALL) ENGL.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 14, n. 1, p. 51-55, 1992.

McGAWLEY, E. C.; OVERSTREET, C. Rice and other cereals. In: BARKER, K. R.; PETERSON, G. A.; WINDHAM, G. L.; BARTELS, J. M.; HATFIELD, J. M.; BAENZIGER,

P. S.; BIGHAM, J. M. **Plant and nematode interactions**. Madison: American Society of Agronomy, 1998. p. 455-486.

McKAY, A. C.; OPHEL, K. M. Toxigenic *Clavibacter/Anguina* associations infecting grass seedheads. **Annual Review Phytopathology**, St. Paul, v. 31, p. 151-167, 1993.

MERNY, G.; BILLARD, G.; PELLETIER, R. Technique d'éradication d' *Aphelenchoides besseyi* (Nematoda: Aphelenchina) dans les semences de *Panicum maximum*. **Revue Nématologie**, Paris, v. 8, n. 2, p. 155-160, 1985.

NICKLE, W. R.; HOOPER, D. J. The aphelenchina: bud, leaf, and insect nematodes. In: NICKLE, W. R. **Manual of agricultural nematology**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 465-507.

OLIVEIRA, M. P. Comércio de sementes movimentada US\$ 250 milhões por ano no País. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 12 Abr., 1994. Agrofolha, p. 3-6.

OU, S. H. **Rice disease**. 2. ed. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1972. 370p.

OU, S. H. **Rice disease**. London: Commonwealth Mycological Institute, 1985. p. 337-346.

PEDERSON, G. A.; QUESENBERRY, K. H. Clovers and other forage legumes. In: BARKER, K. R.; PETERSON, G. A.; WINDHAM, G. L.; BARTELS, J. M.; HATFIELD, J. M.; BAENZIGER, P. S.; BIGHAM, J. M. **Plant and nematode interactions**. Madison: American Society of Agronomy, 1998. p. 399-426.

PINHEIRO, F. P.; VIANELLO, R. P.; EBEIDALLA, F. S.; TENENTE, R. C. V. Thermal seed treatments to eradicate *Aphelenchoides besseyi* from *Brachiaria dictyoneura*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 92-97, 1997.

ROSA, F. R. T.; TORRES Jr, A. M. **Áreas de pastagens versus agricultura**. Disponível em:<<http://www.scotconsultoria.com.br>> Acesso em: 28/02/2008.

RUESS, L.; ZAPATA, E. J. G.; DIGHTON, J. Food preferences of a fungal-feeding *Aphelenchoides* species. **Nematology**, Leiden, v. 2, n. 2, p. 223-230, 2000.

SANTOS, G. F.; SANTOS FILHO, L. F. Pastagens tropicais no Brasil. In: WORKSHOP SOBRE SEMENTES DE FORRAGEIRAS, 1., 1999, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA, 1999. v.1, p.27-35.

SANWAL, K. C. A key to the species of the nematode genus *Aphelenchoides* Fischer, 1894. **Canadian Journal of Zoology**, Toronto, v.39, p.143-148, 1961.

SCHUNKE, R. M. **Alternativas de manejo de pastagem para melhor aproveitamento do nitrogênio do solo**. Campo Grande: EMBRAPA – Gado de Corte, 2001. 26 p. (Documento, 111).

SEINHORST, J. W. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. **Nematologica**, Wageningen, v.4, p.67-69, 1959.

SHAHINA, F. A diagnostic compendium of the genus *Aphelenchoides* Fischer, 1894 (Nematoda: Aphelenchida) with some new records of the group from Pakistan. **Pakistan Journal of Nematology**, Joensuu, v. 14, p. 1-32, 1996.

SHARMA, R. D.; CAVALCANTI, M. de J. B.; VALENTIN, J. F. **Nematóides associados ao capim Marandu no Estado do Acre**. Planaltina: EMBRAPA-Cerrados, 2001. 4 p. (Comunicado Técnico, 46).

SILVA, G. S. da. White tip and national rice production. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 16, p. 57-59, 1992.

SILVA, L. F. K.; ARTHUR, V. Efeito do fracionamento de doses de radiação gama sobre *Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763) (Col.: Curculionidae); *Rhyzopertha dominica* (Fabricius, 1792) (Col.: Bostrichidae) e *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Col.: Tenebrionidae). **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 253-256, 2004.

SILVA, S. C.; NASCIMENTO Jr, D. 2006. Sistema intensivo de produção de pastagens. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 2<sup>o.</sup>, 2008, São Paulo. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>> Acesso em: 28/02/2008.

SOARES, F. H. **Comparação de testes de qualidade fisiológica em sementes de *Brachiaria brizantha* (Hoschst ex A. Rich) Stapf cv. Marandu de diferentes regiões produtoras do Brasil**. 79f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

SOUZA, F. H. D. de. **Produção de sementes de gramíneas forrageiras tropicais**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2002. 43 p. (Documento, 30).

SOUZA, F. H. D. de. Produção e comercialização de sementes de plantas forrageiras tropicais no Brasil. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGEM, 2., 2002, Lavras. **Anais eletrônicos...** São Carlos: EMBRAPA Pecuária Sudeste, 2002. Disponível em: <[www.cppse.embrapa.br](http://www.cppse.embrapa.br)>. Acesso em: 16 jun. 2003.

SOUTHEY, J. F. **Laboratory for work with plant and soil nematodes**. 5. ed. London: Ministry of Agriculture Fisheries and Food, 1970. 148 p.



STURHAN, D.; BREZESKI, M. W. Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. In: NICKLE, W. R. **Manual of agricultural nematology**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 423-464.

TACCONI, R.; AMBROGIONI, L. *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 (Tylenchida, Aphelenchoididae). **Informatore Fitopatologico**, Firenze, v. 43, p. 50-56, 1993.

TENENTE, R. C. V.; MANSO, E. S. B. G. C. Tratamentos químico e térmico de sementes de arroz infestadas com *Aphelenchoides besseyi*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 28-34, 1994.

TENENTE, R. C. V.; MANSO, E. C.; GONZAGA, V. Nematóides detectados em germoplasma vegetal importado e sua erradicação nos anos de 1995 a 1998. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 79-81, 2000.

TENENTE, R. C. V.; MANSO, E. S. B. G. C.; MENDES, M. A. S.; MARQUES, A. S. A. Seed health testing for nematodes detection of plant gerplasm by CENARGEN. **Seed Science Technology**, Karlsruhe, v. 22, n. 3, p. 415-420, 1994.

TENENTE, R. C. V.; GONZAGA, V.; PINHEIRO, F. P.; TARCHETTI P.; RODRIGUES, V. **Nematropica**. DeLeon Springs, v. 29, n. 1, p.17-23, 1999.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola**. Jaboticabal: FCAV, 1989, v. 1, 80p.

TODD, E. H.; ATKINS, J. G. *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 (Nematoda: Aphelenchoididae) on rice and method of control. **Zoologicheskij Zhurnal**, Moscow, v. 45, p. 1759-1766, 1959.

VALLE, C. B. do; PEREIRA, A. V.; JANK, L. **Melhoramento de forrageiras tropicais**. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte. Disponível em: <[www.cnpgc.embrapa.br](http://www.cnpgc.embrapa.br)>. Acesso em: 16 jun. 2003.

VERZIGNASSI, J. R.; FERNANDES, C. D. **Doenças em forrageiras**. Campo Grande: EMBRAPA-Gado de Corte Divulga, 2001. 3 p. (Circular, 50).

VIGLIERCHIO, D. R. Races gênesis in *Ditylenchus dipsaci*. **Nematologica**, Winnipeg, v. 17, p. 386-392. 1971.

WHITEHEAD, A. G. Effect of cultivar, carbofurm and row spacing on the incidence of stem and leaf nematodes (*Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzemabosi*) in lucerne (*Medicago sativa*) and on lucerne herbage yield. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge. n. 122, p. 225-230, 1994.

YOSHII, H.; YAMAMOTO, S. A rice nematode disease, Senchú Shingaré byô. I. Symptoms and pathogenic nematode. **Journal of the Faculty of Agriculture**, Kyushu, v. 9, n. 3, p. 209-222, 1950.