**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

# CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DAS SEIS ESPÉCIES MAIS COMUNS DE *Pratylenchus* Filipjev, 1936 QUE OCORREM NO BRASIL

**Vilmar Gonzaga**

Engenheiro Agrônomo

JABOTICABAL - S P - BRASIL

2006

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

# CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DAS SEIS ESPÉCIES MAIS COMUNS DE *Pratylenchus* Filipjev, 1936 QUE OCORREM NO BRASIL

**Vilmar Gonzaga**

Orientador: Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal).

Jaboticabal – SP

**Novembro – 2006**

Gonzaga, Vilmar
G642c Caracterização morfológica, morfométrica e multiplicação in vitro das seis espécies mais comuns de *Pratylenchus* Filipjev, 1936 que ocorrem no Brasil / Vilmar Gonzaga. – – Jaboticabal, 2006
vii, 79 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006
Orientador: Jaime Maia dos Santos
Banca examinadora: Arlindo Leal Boiça Júnior, Maria Amélia dos Santos, Marineide Mendonça Aguillera, Modesto Barreto
Bibliografia

1. Gnotobiologia. 2. Morfologia. 3. *Pratylenchus* spp. 4. Taxonomia. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.4

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DAS SEIS ESPÉCIES MAIS COMUNS DE *Pratylenchus* Filipjet, 1936 QUE OCORREM NO BRASIL

**AUTOR:** VILMAR GONZAGA

**ORIENTADOR:** Dr. JAIME MAIA DOS SANTOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) pela Comissão Examinadora:

Dr. JAIME MAIA DOS SANTOS

Dra. MARINEIDE MENDONÇA AGUILLERA

Dra. MARIA AMÉLIA DOS SANTOS

Dr. ARLINDO LEAL BOIÇA JÚNIOR

Dr. MODESTO BARRETO

Data da realização: 06 de novembro de 2006.

Presidente da Comissão Examinadora
Dr. JAIME MAIA DOS SANTOS

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**VILMAR GONZAGA** nasceu em 27 de junho de 1963, na cidade de Cataguases-MG. Iniciou o curso de graduação em Engenharia Agronômica na Universidade Federal de Viçosa (UFV)-MG, em 1983, vindo a graduar-se em 1987. Em 1988, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia, com sua dissertação na área de Nematologia. Foi pesquisador na Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais – EPAMIG, no período de janeiro de 1993 a outubro de 1997. Em novembro de 1997, ingressou na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília-DF, onde atua no Laboratório de Quarentena Vegetal, na área de Nematologia. Cursou seu Doutorado em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal na Universidade Estadual Paulista (UNESP/FCAV), Câmpus de Jaboticabal-SP, no período de agosto de 2003 a novembro de 2006.

**Dedico Este Trabalho**

**À minha família.**

À minha mãe, Ivanda de Souza Gonzaga, pela presença e apoio em todos os momentos de minha vida, pelo exemplo de vida e pela disposição em encarar o trabalho e ajudar a todos.

Ao meu pai, Luiz Gonzaga (em memória), por todo seu esforço para criar uma família e mantê-la unida e pela certeza que tenho de que continuará sempre presente.

Aos meus irmãos, Lúcia Aparecida Gonzaga Ribeiro, Wilma de Fátima Gonzaga Espíndola, Wilma da Conceição Gonzaga Pereira, Maria do Carmo Oliveira e Geraldo Luiz Gonzaga, pela amizade e confiança.

A todos os meus sobrinhos, pela alegria e esperança.

A todos os meus amigos

**Ofereço**

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Professor Jaime Maia dos Santos, pela orientação, repasse de conhecimentos oriundos de sua grande experiência profissional, amizade e dedicação para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Agrária e Veterinárias de Jaboticabal (UNESP/FCAV), pela infra-estrutura e apoio fornecido durante o curso.

Aos membros da banca examinadora da Defesa, Dra. Maria Amélia dos Santos, Dra. Marineide Mendonça Aguillera, Dr. Arlindo Leal Boiça Junior e Dr. Modesto Barreto.

Aos membros da banca examinadora de Exame Geral de Qualificação, Dr. Modesto Barreto, Dr. Julio César Galli, Dra. Rita de Cássia Panizzi e Dra. Margarete Camargo.

Ao Professor José Carlos Barbosa, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Cenargen, pela oportunidade, auxílio e compreensão.

Ao Professor Vitório Barato Neto, pela revisão gramatical.

Aos colegas do Laboratório de Quarentena Vegetal do Cenargen, em especial à Dra. Renata César Vilardi Tenente, pelo incentivo e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Às Professoras Dra. Isabel Maria Oliveira Abrantes e Dra. Maria Susana Newton de Almeida Santos, da Universidade de Coimbra – Portugal, pelo apoio no desenvolvimento inicial deste trabalho, e aos colegas Luis, Sofia e Clara, pelo companheirismo.

Aos funcionários do Laboratório de Nematologia da UNESP/FCAV, André, Sandra e Walmir, pelo auxílio e amizade.

Aos colegas de curso, Anderson, Alaíde, Bruno, Eduardo, Ivo, Luciany, Paulo, Pedro, Sérgio e Zapparoli, pela amizade e solidariedade.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço.

**SUMÁRIO**


Página

LISTA DE TABELAS..... ii
LISTA DE FIGURAS..... iii
RESUMO..... vi
SUMMARY..... vii
I INTRODUÇÃO..... 1
II REVISÃO DE LITERATURA..... 4
III MATERIAL E MÉTODOS..... 16
3.1 Avaliação Comparativa da Multiplicação de Espécies de *Pratylenchus* em Cilindros de Cenoura..... 16
3.2 Caracterização Morfológica e Morfométrica das Seis Espécies de *Pratylenchus* mais Comuns no Brasil..... 20
3.2.1 Preparo de Espécimes para Exame ao Microscópio Óptico Composto..... 20
3.2.2 Preparo de Espécimes para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... 22
3.3 Elaboração da Grade Ilustrada para a Identificação das Principais Espécies de *Pratylenchus* que Ocorrem no Brasil..... 24
IV RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 25
4.1 Multiplicação de Espécies de *Pratylenchus* em Cilindros de Cenoura..... 25
4.2 Estudo Morfológico das Seis Espécies de *Pratylenchus*..... 28
4.3 Estudo Morfométrico das Seis Espécies de *Pratylenchus*..... 43
4.4 Análises Discriminante e Canônica das Seis Espécies de *Pratylenchus*..... 53
V CONCLUSÕES..... 61
VI REFERÊNCIAS..... 63
APÊNDICE A..... 76
APÊNDICE B..... 77
APÊNDICE C..... 78
APÊNDICE D..... 79

# LISTA DE TABELAS


| Tabela | | Página |
|---|---|---|
| 1 | Relação nominal das espécies válidas de *Pratylenchus* Filipjev de acordo com várias fontes..... | 5 |
| 2 | Espécies de *Pratylenchus* utilizadas no estudo da multiplicação in vitro em cilindros de cenoura..... | 16 |
| 3 | Espécies de *Pratylenchus* utilizadas no estudo da caracterização morfométrica ao microscópio óptico composto..... | 20 |
| 4 | Mensurações em µm e variáveis derivadas para 15 fêmeas da subpopulação de *Pratylenchus brachyurus* coletada em raízes de soja (*Glycine max*), no Município de Campo Florido-MG e multiplicada em cilindros de cenoura ..... | 44 |
| 5 | Mensurações em µm e variáveis derivadas para 15 fêmeas da subpopulação de *Pratylenchus coffeae* coletada em raízes de graviola (*Anona muricata*), no Estado de Pernambuco, e multiplicada em cilindros de cenoura..... | 45 |
| 6 | Mensurações em µm e variáveis derivadas para 15 fêmeas da subpopulação de *Pratylenchus jaehni* coletada em raízes de laranjeira (*Citrus sinensis*), enxertada em limão-cravo (*C. limonia*), no Município de Palestina-SP, e multiplicada em cilindros de cenoura ..... | 47 |
| 7 | Mensurações em µm e variáveis derivadas para 15 fêmeas da subpopulação de *Pratylenchus zeae* coletada em raízes de milho (*Zea mays*), no Município de Luís Eduardo Magalhães-BA, e multiplicada em cilindros de cenoura..... | 49 |
| 8 | Mensurações em µm e variáveis derivadas para 15 fêmeas da subpopulação de *Pratylenchus penetrans* coletada em raízes de lírio (*Lilium tennifolium*), no Município de Araxá-MG, e multiplicada em cilindros de cenoura..... | 50 |
| 9 | Mensurações em µm e variáveis derivadas para 15 fêmeas da subpopulação de *Pratylenchus vulnus* coletada em raízes de roseira (*Rosa* sp.), no Município de Andradas-MG, e multiplicada em cilindros de cenoura ..... | 52 |
| 10 | Funções de classificação para as seis espécies de *Pratylenchus* mais comuns no Brasil..... | 53 |

# LISTA DE FIGURAS


| Figura | | Página |
|---|---|---|
| 1 | Preparação dos cilindros de cenoura em condições assépticas para multiplicação de espécies de *Pratylenchus* in vitro. A) Remoção da parte central da raiz com perfurador em câmara de fluxo laminar. B) Cilindro removido da porção central da raiz. C) Acondicionamento do cilindro em vidro previamente autoclavado e selagem com filme de PVC. D) Cilindros preparados e acondicionados nos vidros, no interior da câmara..... | 18 |
| 2 | Cilindros de cenoura inoculados com *Pratylenchus* spp. e mantidos em B.O. D., a 25 ± 1°C, no escuro..... | 19 |
| 3 | Sintomas indicativos do estabelecimento e multiplicação de *Pratylenchus* spp. nos cilindros de cenoura. A) Lesão inicial sobre o ponto de inoculação, cerca de 60 dias após. B) Lesões na forma de anasarca, de coloração marrom-escura, indicando a progressiva multiplicação dos nematóides..... | 25 |
| 4 | Médias dos números de espécimes e de ovos de *Pratylenchus jaehni* (Pj), *P. brachyurus* (Pb), *P. vulnus* (Pv), *P. coffeae* (Pc), *P. zeae* (Pz) e *P. penetrans* (Pp), em cilindros de cenoura, in vitro, aos 120 dias após a inoculação. Médias de cinco repetições indicadas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade. CV % = 5,5..... | 26 |
| 5 | Principais caracteres morfológicos para identificação de *Pratylenchus brachyurus*. A) Eletromicrografia de varredura da placa labial indivisa (seta). B) Eletromicrografia de varredura da região labial angulosa, exibindo dois anéis (seta), sendo o anel da base mais estreito que o primeiro anel do corpo. C) Fotomicrografia da região anterior, exibindo o estilete (seta) com nódulos basais esféricos. D) Fotomicrografia da fêmea, exibindo a posição da vulva (seta). E) Gônada desprovida de espermateca funcional (a seta indica a posição da vulva). F) Saco pós-uterino (seta). G) Cauda hemisférica com término liso, característica da espécie. H) Variação na forma da cauda (as setas em ambas indicam o ânus). Barra das escalas = 10 μm ou outro valor, conforme indicado.. | 29 |
| 6 | Principais caracteres morfológicos para identificação de *Pratylenchus coffeae*. A) Eletromicrografia de varredura da região labial da fêmea, com dois anéis, e placa labial indivisa (seta). B) Fotomicrografia da região anterior, exibindo uma constrição em cada lado da região labial | |

(setas), indicando a presença de dois anéis. C) Fotomicrografia da fêmea, exibindo a posição da vulva (seta). D) Fotomicrografia da espermateca funcional ovalada (seta); a letra V indica a posição da vulva. E) Saco pós-uterino (seta). F) Cauda truncada característica da espécie. G) Variação na forma da cauda (as setas em ambas indicam o ânus). H) Região posterior do macho com a bursa envolvendo toda a cauda (seta). Barra das escalas = 10 μm ou outro valor, conforme indicado..... 30

7 Principais caracteres morfológicos para identificação de *Pratylenchus jaehni.* A) Eletromicrografia de varredura da região labial da fêmea, com dois anéis, e placa labial indivisa (seta). B) Fotomicrografia da região anterior, exibindo uma constrição em cada lado da região labial (setas), indicando os dois anéis. C) Fotomicrografia da fêmea indicando a posição da vulva (seta). D) Fotomicrografia da espermateca funcional arredondada (seta). E) Saco pós-uterino (seta). F e G) Cauda hemisférica, com término liso, e variação na forma da cauda, respectivamente (a seta em ambas indica o ânus). H) Região posterior do macho, com a bursa envolvendo toda a cauda (seta). Barras da escalas = 10 μm ou outro valor, conforme indicado..... 31

8 Eletromicrografia de verredura da região labial de *Pratylenchus* spp., exibindo variações no número de anéis resultantes de anelações incompletas. A) Região labial de *P. penetrans*, exibindo dois anéis à esquerda e três à direta (setas). A seta cheia indica a abertura anfidial. B) Região labial de *P. vulnus* exibindo três anéis à esquerda e dois à direita (setas), e a abertura anfidial maior que nas outras espécies incluídas no estudo (seta cheia)..... 32

9 Principais caracteres morfológicos para identificação de *Pratylenchus zeae.* A) Eletromicrografia de varredura da região labial, com três anéis (setas), exibindo anelação incompleta no lado direito e placa labial indivisa. B) Fotomicrografia da região anterior exibindo duas constrições sutis (setas), denotando a presença dos três anéis. C) Fotomicrografia da fêmea indicando a posição da vulva (seta). D) Fotomicrografia da espermateca não-funcional arredondada (seta). E) Saco pós-uterino (seta). F) Cauda subaguda com término liso predominante na espécie. G e H) Variações na forma da cauda (as setas em F - H indicam o ânus). Barras da escalas = 10 μm ou outro valor, conforme indicado..... 34

10 Principais caracteres morfológicos para identificação de *Pratylenchus penetrans.* A) Eletromicrografia de varredura da região labial da fêmea, com três anéis (setas), e placa labial em forma de “H” (seta). A seta cheia indica a abertura anfidial. B) Fotomicrografia da extremidade

anterior exibindo a região labial distinta do corpo com duas constrições sutis nos lados (setas), indicando os três anéis. C) Fotomicrografia da fêmea indicando a posição da vulva (seta). D) Fotomicrografia da espermateca funcional arredondada (seta). E) Saco pós-uterino (seta). F) Cauda cônica com término liso. G) Variação na forma da cauda com término crenado (a seta em ambas indica o ânus). H) Região posterior do macho com a bursa envolvendo toda a cauda (seta). Barras da escalas = 10 μm ou outro valor, conforme indicado..... 36

11 Caracteres morfológicos suplementares para identificação de *Pratylenchus penetrans*. A e B) Fotomicrografia e eletromicrografia de varredura, respectivamente, da região labial distinta do corpo. C) Eletromicrografia de varredura da cauda cônica..... 37

12 Principais caracteres morfológicos para identificação de *Pratylenchus vulnus.* A) Eletromicrografia de varredura da região labial da fêmea contínua à linha do corpo, exibindo três anéis (setas) e o disco labial (seta cheia). B) Fotomicrografia da extremidade anterior do corpo, indicando os três anéis (setas). C) Fotomicrografia da fêmea indicando a posição da vulva (seta). D) Fotomicrografia da espermateca funcional oblonga (seta). E) Saco pós-uterino (seta). F) Cauda subaguda com término liso. G) Variação na forma da cauda (a seta em ambas indica o ânus). H) Região posterior do macho, com a bursa envolvendo toda a cauda (seta). Barras da escalas = 10 μm ou outro valor, conforme indicado..... 40

13 Caracteres morfológicos suplementares para identificação de *Pratylenchus vulnus*. A) Fotomicrografia dos três anéis, na região labial (setas vazias), e disco labial distinto (seta cheia). B) Eletromicrografia de varredura da cauda subaguda..... 41

14 Análise de agrupamento, utilizando a primeira e a segunda raiz canônica das variáveis morfométricas de *Pratylenchus brachyurus* (Pb), *P. coffeae* (Pc), *P. jaehni* (Pj), *P. penetrans* (Pp), *P. vulnus* (Pv) e *P. zeae* (Pz)..... 55

15 Análise gráfica das variáveis posição relativa da vulva (V%) e comprimento do estilete para separar *Pratylenchus coffeae* (Pc) de *P. jaehni* (Pj)..... 57

16 Análise gráfica das variáveis comprimento do estilete e número de anéis na cauda para separar *Pratylenchus coffeae* (Pc) de *P. jaehni* (Pj)..... 58

17 Análise gráfica das variáveis comprimento do estilete e número de anéis na cauda para separar *Pratylenchus penetrans* (Pp) de *P. vulnus* (Pv)..... 59

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DAS SEIS ESPÉCIES MAIS COMUNS DE *Pratylenchus* Filipjev, 1936 QUE OCORREM NO BRASIL**

**RESUMO** – Os nematóides das lesões radiculares (*Pratylenchus* spp.) são considerados o segundo grupo de fitonematóides de maior importância econômica em todo o mundo. A morfologia e a morfometria das seis espécies mais comuns desses nematóides, no Brasil, a saber: *Pratylenchus brachyurus*, *P. coffeae, P. jaehni, P. penetrans, P. vulnus* e *P. zeae*, foram estudas aos microscópios óptico composto e eletrônico de varredura. Os dados foram analisados, também, por análise discriminante e análise canônica, tendo sido determinada uma equação da função de classificação para cada uma das espécies. Conquanto cada uma das espécies possa ser identificada por qualquer das ferramentas utilizadas, a análise morfológica, a análise morfométrica, assim como as análises discriminante e canônica devem ser consideradas ferramentas complementares no processo de identificação das espécies, aumentando a confiabilidade da identificação. Uma grade politômica ilustrada para identificação rápida dessas espécies foi elaborada. A técnica de multiplicação in vitro dessas espécies em cilindro de cenoura mostrou-se adequada para produção massiva desses nematóides, sendo que *P. penetrans* e *P. jaehni* foram as espécies que produziram, respectivamente, o maior e o menor número de indivíduos e ovos por cilindro de cenoura, aos 120 dias após a inoculação.

**Palavras-chave*:*** gnotobiologia, morfologia, *Pratylenchus* spp., taxonomia.

# MORPHOLOGIC AND MORPHOMETRIC CHARACTERIZATION AND IN VITRO MULTIPLICATION OF THE SIX MORE COMMON SPECIES OF *Pratylenchus* FILIPJEV, 1936 THAT OCCUR IN BRAZIL

**SUMMARY** – The lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) are considered the second largest group of plant parasitic nematodes of economic importance in the world. The morphology and morphometry of the six more common species of these nematodes in Brazil, namely: *Pratylenchus brachyurus*, *P. coffeae, P. jaehni, P. penetrans, P. vulnus* and *P. zeae,* were studied at the light and scanning electron microscopes. The data were also submitted to discriminant and canonical analyses and an equation of the classification function for each one of the species was determinated. Althought each one of the species can be identified by any of the tools used, the morphologic and morphometric analyses, as well as the discriminant and canonical analyses, must be considered complementary tools in the process of species identification, thus increasing the reliability of the identification. An illustrated polytomous key for a fast identification of these species was elaborated. The in vitro multiplication technique of these species in carrot cylinder was suitable for massive production of these nematodes. *Pratylenchus penetrans* and *P. jaehni* were the species that produced, respectively, the greatest and the smallest number of individuals and eggs for carrot cylinder, 120 days after the inoculation.

Key-words: gnotobiology, morphology, *Pratylenchus* spp., taxonomy.

## I INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas, foram publicadas sete revisões de *Pratylenchus* Filipjev, 1936. Na última delas, FERRAZ (1999) considerou 64 espécies válidas e 28 espécies *inquirendae*. Com as descrições de *P. brzeskii* Karssen, Waeyenberge & Moens, 2000, *P. arlingtoni* Handoo, Carta & Skantar, 2001, *P. jaehni* Inserra et al., 2001, *P. gongjuensis* Choi et al., 2006 e *P. dunensis* Pena et al., 2006, o gênero alcançou 69 espécies válidas. Por conseguinte, o grande número de espécies torna a taxonomia do grupo complexa, e, nos laboratórios de rotina, a dificuldade para identificação das espécies, usualmente, é tida como um desafio. São poucos os profissionais, tanto no Brasil quanto no exterior, que identificam, com segurança, as espécie de *Pratylenchus*.

Algumas espécies do grupo têm ampla distribuição geográfica, tanto em países de clima tropical como temperado (LUC, 1987), e causam necroses em partes subterrâneas de um grande número de culturas de importância econômica para a agricultura brasileira, tais como: soja, cana-de-açúcar, citros, café, milho, algodão, batata e diversas ornamentais (TENENTE et al., 2002). No Brasil e no mundo, esses fitonematóides ocupam o segundo lugar em importância econômica, sendo superados, apenas, pelos nematóides de galha (*Meloidogyne* spp.), conforme menção de diferentes pesquisadores (SASSER & FRECKMAN, 1987; TIHOHOD, 1993).

A identificação do gênero é relativamente simples. Com efeito, todas as espécies do grupo são vermiformes, exibem região labial baixa e esclerotizada, campo lateral geralmente com quatro linhas, sobreposição ventral das glândulas esofagianas sobre o intestino, além do fato de que as fêmeas de todas as espécies são monodelfas, prodelfas com a vulva situada no terço posterior do corpo (MAI & MULLIN, 1996).

Com a globalização e o incremento do comércio internacional, a identificação

precisa das espécies tornou-se vital, tanto a para proteção do nosso território, impedindo a entrada de novos patógenos, quanto para facilitar a colocação e a manutenção no mercado exterior de produtos agroalimentares e ornamentais produzidos em nosso País.

Em que pese o grande número de espécies no gênero, apenas seis são mais freqüentemente encontradas associadas a diferentes culturas, no Brasil, a saber: *P. brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941, *P. coffeae* (Zimmermann, 1898) Goodey, 1959, *P. jaehni* Inserra et al., 2001, *P. penetrans* (Cobb, 1917) Chitwood & Oteifa, 1952*, P. vulnus* Allen & Jensen, 1951 e *P. zeae* Grahan, 1951. Para algumas das outras espécies do grupo, existem apenas registros de sua ocorrência no País, quais sejam: *P. pseudopratensis* Seinhorst, 1968, *P. jordanensis* Hashim, 1984 e *P. pseudofallax* Café-Filho & Huang, 1989 (CAFÉ-FILHO & HUANG, 1988), enquanto as espécies *P. scribneri* Steiner, 1943, *P. fallax* Seinhorst, 1968 e *P. thornei* Sher & Allen, 1953 são alistadas como pragas quarentenárias A1 para o Brasil. Alhures, ocorrem em frutíferas, morangueiro, crisântemo, milho, tomateiro, beterraba, cebola, soja, batata, trigo, macieira, roseira, orquídeas e outras ornamentais. À época da publicação da documentação oficial, *P. vulnus* também detinha esse status (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2006).

Notadamente no caso de gêneros que contêm um grande número de espécies, a exemplo de *Pratylenchus*, a manipulação de chaves dicotômicas extensas para a identificação de uma espécie requer experiência e equipamentos adequados para observação de caracteres morfoanatômicos e morfométricos precisos. Além disso, rapidamente, essas chaves ficam obsoletas à medida que novas espécies são descritas. As chaves politômicas, conforme os princípios idealizados por STEGARESCU (1966), citado por CASTILLO & VOVLAS (2005), facilitam, em muito, o processo de identificação. Com efeito, as espécies são agrupadas em subgrupos, de acordo com caracteres principais e suplementares, facilitando o processo.

A produção de inóculo desses nematóides em quantidades suficientes para atender às pesquisas constitui uma das limitações para o progresso no estudo desse

grupo. A obtenção de subpopulações axênicas das espécies é uma etapa relevante tanto para os estudos taxionômicos, quanto para outros fins, inclusive para estudos moleculares. Freqüentemente, é encontrada mais de uma espécie numa mesma amostra vinda do campo. Nesses casos, a multiplicação de uma subpopulação in vitro, a partir de poucos indivíduos, facilita a separação das espécies.

Este estudo foi conduzido com os seguintes objetivos: 1) estudar e documentar aos microscópios óptico composto e eletrônico de varredura os caracteres morfoanatômicos e morfométricos marcantes para a identificação das espécies de *Pratylenchus* de maior importância econômica atual para o Brasil; 2) adequar uma técnica de multiplicação in vitro de *Pratylenchus* spp. para atender à demanda de inóculo nas pesquisas com esse grupo e mensurar, comparativamente, a multiplicação das seis espécies por essa técnica; 3) elaborar uma grade ilustrada para a identificação das seis espécies de *Pratylenchus* mais comuns no Brasil que seja de fácil uso e atualização pela inclusão de outras espécies, à medida que forem sendo descritas ou reportadas no País.

## II REVISÃO DE LITERATURA

As espécies de *Pratylenchus* são genericamente referidas como os nematóides das lesões radiculares devido aos sintomas na forma de lesões necróticas que causam nas raízes de seus hospedeiros (GODFREY, 1929; TIHOHOD, 1993), sendo considerados, no Brasil e no mundo, o segundo grupo de fitonematóides de maior importância econômica (LORDELLO, 1981; SASSER & FRECKMAN, 1987; TIHOHOD, 1993; FERRAZ, 1999). Esses nematóides são endoparasitos migradores de corpo fusiforme, cujo comprimento dos adultos varia de 0,3 a 0,9 mm (LOOF, 1991). De acordo com MAGGENTI (1991), o grupo tem a seguinte posição taxonômica:

Filo: Nematoda (Rudolphi, 1808) Lankester 1877;
Classe: Secernentea von Linstow, 1905;
Subclasse: Diplogasteria;
Ordem: Tylenchida Thorne, 1949;
Subordem: Tylenchina Chitwood, 1950;
Superfamília: Tylenchoidea Örley, 1880;
Família: Pratylenchidae Thorne, 1949;
Subfamília: Pratylenchinae Thorne, 1949;
Gênero: *Pratylenchus* Filipjev, 1936;

Nas últimas duas décadas, o gênero foi alvo de sete revisões (LUC, 1987; RYSS, 1988, citado por FERRAZ (1999); CAFÉ FILHO & HUANG, 1989; FREDERICK & TARJAN, 1989; HANDOO & GOLDEN, 1989; LOOF, 1991; FERRAZ, 1999). Na última delas, foram alistadas 64 espécies válidas (FERRAZ, 1999). Com as últimas descrições de *P. brzeskii* Karssen, Waeyenberge & Moens, 2000, *P. arlingtoni* Handoo, Carta & Skantar, 2001, *P. jaehni* Inserra et al., 2001, *P. gongjuensis* Choi et al., 2006 e *P. dunensis* Pena et al., 2006, o gênero passou a contar com 69 espécies válidas (Tabela 1). Além dessas, outras 28 têm o status de *inquirendae* (LOOF, 1991; FERRAZ, 1999).

Tabela 1. Relação nominal das espécies válidas de *Pratylenchus* Filipjev de acordo com várias fontes.

| |
|---|
| *P. acuticaudatus* Braasch & Decker, 1989 |
| *P. agilis* Thorne & Malek, 1968 |
| *P. alleni* Ferris, 1961 |
| *P. andinus* Lordello, Zamith & Boock, 1961 |
| *P. angulatus* Siddiqi, 1994 |
| *P. arlingtoni* Handoo, Carta & Skantar, 2001 |
| *P. bhattii* Siddiqi, Dabur & Bajaj, 1991 |
| *P. bolivianus* Corbett, 1983 |
| *P. brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941* |
| *P. brzeskii* Karssen, Waeyenberge & Moens, 2000 |
| *P. coffeae* (Zimmerman, 1898) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941* |
| *P. convallariae* Seinhorst, 1959 |
| *P. crenatus* Loof, 1960 |
| *P. crossandrae* Subramanyian & Sivakumar, 1991 |
| *P. cruciferus* Bajaj & Bhatti, 1984 |
| *P. curvicauda* Siddiqi, Dabur & Bajaj, 1991 |
| *P. delattrei* Luc, 1958 |
| *P. dunensis* Pena, Moens, Aelst & Karssen, 2006 |
| *P. ekrami* Bajaj & Bhatti, 1984 |
| *P. elamini* Zeidan & Geraert, 1991 |
| *P. estoniensis* Ryss, 1982 |
| *P. fallax* Seinhorst, 1968 |
| *P. flakkensis* Seinhorst, 1968 |
| *P. gibbicaudatus* Minagawa, 1982 |
| *P. gongjuensis* Choi, Lee, Park, Han & Choi, 2006 |
| *P. goodeyi* Sher & Allen, 1953 |
| *P. gotohi* Mizukubo & Minagawa, 1991 |
| *P. graminis* Subramanyian & Sivakumar, 1991 |
| *P. gutierrezi* Golden, Lopez & Vilchez, 1992 |
| *P. hexincisus* Taylor & Jenkins, 1957 |
| *P. jaehni* Inserra, Duncan, Troccoli, Dunn, Santos, Kaplan & Vovlas, 2001* |
| *P. jordanensis* Hashim, 1984* |
| *P. kasari* Ryss, 1982 |
| *P. kralli* Ryss, 1982 |
| *P. kumaoensis* Lal & Khan, 1989 |
| *P. loosi* Loof, 1960 |
| *P. macrostylus* Wu, 1971 |
| *P. mediterraneus* Corbett, 1983 |
| *P. microstylus* Bajaj & Bhatti, 1984 |

continua...

Tabela 1. continuação...

| |
|---|
| *P. morettoi* Luc, Baldwin & Bell, 1986 |
| *P. mulchandi* Nandakumar & Khera, 1970 |
| *P. neglectus* (Rensch, 1924) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 |
| *P. neobrachyurus* Siddiqi, 1994 |
| *P. okinawaensis* Minagawa, 1991 |
| *P. panamaensis* Siddiqi, Dabur & Bajaj, 1991 |
| *P. penetrans* (Cobb, 1917) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941* |
| *P. pinguicaudatus* Corbett, 1969 |
| *P. pratensis* (de Man, 1880) Filipjev, 1936 |
| *P. pratensisobrinus* Bernard, 1984 |
| *P. pseudocoffeae* Mizukubo, 1992 |
| *P. pseudofallax* Cafe Filho & Huang, 1989* |
| *P. pseudopratensis* Seinhorst, 1968* |
| *P. scribneri* Steiner, 1943 |
| *P. sefaensis* Fortuner, 1973 |
| *P. sensillatus* Anderson & Townshend, 1985 |
| *P. septincisus* Chang, 1991 |
| *P. subpenetrans* Taylor & Jenkins, 1957 |
| *P. subranjani* Mizukubo, Toida, Keereewan & Yoshida, 1990 |
| *P. sudanensis* Loof & Yassin, 1971 |
| *P. teres* Khan & Singh, 1975 |
| *P. thornei* Sher & Allen, 1953 |
| *P. typicus* Rashid, 1974 |
| *P. unzenensis* Mizukubo, 1992 |
| *P. ventroprojectus* Bernard, 1984 |
| *P. vulnus* Allen & Jensen, 1951* |
| *P. wescolagricus* Corbett, 1984 |
| *P. yamagutii* Minagawa, 1991 |
| *P. yassini* Zeidan & Geraert, 1991 |
| *P. zeae* Graham, 1951* |
| Fontes: LUC, 1987; RYSS, 1988, citado por FERRAZ (1999); CAFÉ FILHO & HUANG, 1989; FREDERICK & TARJAN, 1989; HANDOO & GOLDEN, 1989; LOOF, 1991; FERRAZ, 1999; KARSSEN et al., 2000; HANDOO et al., 2001; INSERRA et al., 2001; CHOI et al., 2006. |
| *Espécies com registros de ocorrência no Brasil. |

A variabilidade intra-específica em *Pratylenchus* spp. tem sido apontada como uma das principais dificuldades na taxonomia do grupo. Com efeito, a maioria dos caracteres utilizados para a identificação das espécies é muito variável (TAYLOR & JENKINS, 1957; ROMAN & HIRSCHMANN, 1969; TARTE & MAI, 1976a, b); OLOWE & CORBETT, 1984).

Segundo BROWN & BOAG (1988), citados por DOUCET & LAX (1997), os caracteres morfométricos que definem as espécies de nematóides podem variar não só entre espécimes de subpopulações distintas, mas também entre indivíduos pertencentes a uma mesma subpopulação. Diferenças morfométricas entre subpopulações de uma espécie podem ser parcialmente influenciadas por fatores do ambiente, sendo o isolamento geográfico o mais proeminente (DOUCET et al., 1996), pela planta hospedeira (TARTE & MAI, 1976a) e pela temperatura (DOUCET et al., 2001). DOUCET et al. (1996), estudando seis subpopulações de *P. vulnus*, observaram diferenças significativas em todas as variáveis morfométricas estudadas, com exceção do índice “m” ( comprimento da região anterior do estilete multiplicado por 100 e dividido pelo comprimento total do estilete). Sugeriram que a variabilidade entre as subpopulações pode ser influenciada pelo isolamento geográfico e pelas respectivas plantas hospedeiras.

Em geral, indivíduos de uma mesma espécie, extraídos de raízes, são maiores e mais vigorosos que espécimes extraídos do solo. Pode ocorrer variação também entre espécimes extraídos de diferentes espécies vegetais (LOOF, 1991). Segundo OLOWE & CORBETT (1984), o comprimento do corpo é maior quando o nematóide se encontra em uma planta hospedeira mais suscetível. FISCHER (1894), citado por LOOF (1960), verificou que espécimes de *P. penetrans* extraídos de raízes de *Clematis jackmanii* tinham maior comprimento do corpo que de outros hospedeiros. LOOF (1960) confirmou esse fato, tendo observado uma faixa de 0,54 a 0,81 mm de comprimento. Em outras plantas hospedeiras, fêmeas desse nematóide exibiram faixas do comprimento do corpo de 0,51 a 0,66 mm e de 0,43 a 0,62 mm (TAYLOR & JENKINS, 1957).

ROMAN & HIRSCHMANN (1969), ao realizarem a comparação morfológica e morfométrica de seis espécies de *Pratylenchus*, verificaram alto grau de variabilidade na maioria dos caracteres taxonômicos estudados. Os autores observaram que o número de anéis na região labial, o número e a disposição das linhas do campo lateral, e a forma dos nódulos do estilete e da cauda variaram consideravelmente na maioria das espécies estudadas. A forma dos nódulos do estilete foi razoavelmente constante em *P. brachyurus*, *P. scribneri* Steiner, 1943 e *P. vulnus*, mas altamente variável em *P. coffeae*, *P. penetrans* e *P. zeae.* Dos vinte caracteres estudados, a posição da vulva e o comprimento do estilete apresentaram os mais baixos coeficientes de variação e, por conseguinte, foram de grande valor para a identificação das espécies.

Segundo LOOF (1991), a posição da vulva é muito útil na distinção entre espécies, como, por exemplo, *P. penetrans* e *P. convallariae* Seinhorst, 1959. Entretanto, em torno de 20 espécimes de cada subpopulação devem ser avaliados para se evitarem problemas de sobreposição de valores. O mesmo autor mencionou, também, que a maioria das espécies de *Pratylenchus* tem as bordas da região labial arredondadas, isto é, a região labial da maioria das espécies não é, visivelmente, destacada do corpo. Em *P. brachyurus,* no entanto*,* os bordos da região labial são angulares. Essa diferença, por si só, é suficiente para separar essa espécie de todas as outras (LOOF, 1991).

Em um levantamento realizado por CAFÉ FILHO & HUANG (1988), no Brasil, *Pratylenchus* spp. estavam presentes em 9% de um total de 3.000 amostras analisadas. *P. brachyurus* foi a espécie de maior ocorrência, seguida de *P. zeae* e de *P. coffeae*. Além dessas, os autores registraram a ocorrência de *P. pseudopratensis* Seinhorst, 1968, *P. pseudofallax* Café Filho & Huang, 1989 e *P. jordanensis* Hashim, 1984. No caso dessa última espécie, INSERRA et al. (2005) sugeriram tratar-se de uma sinonímia com *P. zeae.*

CAFÉ FILHO & HUANG (1988) também constataram que, dos parâmetros morfométricos analisados, os mais estáveis foram a posição da vulva e o comprimento do estilete. Em estudos da variabilidade intra-específica em *P. zeae,* além do

comprimento do estilete e da posição da vulva (LÓPEZ & SALAZAR, 1988), o número de anéis na região labial também se mostrou um caráter estável (TROCCOLI et al., 1996). Com efeito, o número de anéis na região labial é um dos caracteres mais relevantes para a identificação de espécies de *Pratylenchus,* tanto que as chaves para identificação de espécies, usualmente, são iniciadas com esse caráter (CAFÉ FILHO & HUANG, 1989; HANDOO & GOLDEN, 1989; LOOF, 1991; SANTOS et al., 2005).

LOOF (1991) mencionou que o número de anéis da região labial é constante na maioria das espécies, mas é variável em *P. vulnus*, *P. pseudopratensis* e *P. wescolagricus* Corbett, 1984, podendo ser três ou quatro. Em várias espécies que apresentam três anéis, pode ocorrer que um deles seja incompleto, resultando em dois anéis em um dos lados da região labial e três no outro. KARSSEN et al. (2001) também fizeram menção à variação no número de anéis na ragião labial de *P. penetrans* e mencionaram que as anelações incompletas na região labial podem dificultar a determinação desse caráter. De fato, na subpopulação de *P. penetrans* que eles estudaram foram observados de 2 a 4 anéis, dadas as anelações incompletas. Em conseqüência disso, os autores utilizaram a técnica de RFLP para complementar a caracterização da subpopulação em estudo, comparando-a com outras cinco subpopulações da espécie.

CORBETT & CLARK (1983) examinaram, comparativamente, 18 espécies de *Pratylenchus* ao microscópio eletrônico de Varredura (MEV). Concluíram que o número de anéis e a forma da região labial foram bons caracteres taxonômicos para a identificação das espécies, possibilitando a separação delas, com base na forma da configuração do ápice da região labial, em três grupos. No grupo I, foram incluídos *P. brachyurus*, *P. coffeae*, *P. loosi* e *P. zeae*, cujos espécimes apresentam a placa labial indivisa. Com base nesse agrupamento, *P. jaehni,* descrita posteriormente, seria incluído nesse grupo, já que essa espécie também possui a placa labial indivisa (INSERRA et al., 2001). No grupo II, onde foram incluídos *P. neglectus* e *P. thornei,* os espécimes apresentam os lábios submedianos fundidos entre si e ao disco labial na face mais estreita, voltada para a abertura oral, e mais largos na face voltada para a periferia da região labial. No grupo III, representado por *P. andinus*, *P. fallax*, *P.*

*penetrans*, *P. pratensis* e *P. vulnus*, os espécimes apresentam os lábios submedianos fundidos e em forma de sino, e os setores laterais menores. Segundo os autores a configuração do ápice da região labial foi consistente para diferenciar subpopulações de várias espécies. Porém, há variações dentro de subpopulações de uma mesma espécie e entre espécies (CORBETT & CLARK, 1983).

HERNÁNDEZ et al. (2001) analisaram a região labial de nove espécies de *Pratylenchus* e agruparam-nas nos três grupos de CORBETT & CLARK (1983). VILLAIN et al. (1998) estudaram três populações de *Pratylenchus* spp. obtidas de cultura de cafeeiro da Guatemala e constataram notável variabilidade em morfologia, virulência e também incompatibilidade reprodutiva entre elas. Duas populações foram agrupadas no grupo I de CORBETT & CLARK (1983) e uma no grupo II.

Utilizando o MEV para analisar a morfologia da região labial de seis subpopulações putativas de *P. coffeae*, MIZUKUBO (1992) observou dois diferentes padrões da placa labial, onde três populações apresentaram a placa labial indivisa e em outras três a placa labial era dividida em setores submedianos e laterais. O autor sugeriu que essas seis populações poderiam ser divididas em, pelo menos, três espécies.

WILCKEN et al. (2002), ao analisarem quatro subpopulações putativas de *P. coffeae*, procedentes de culturas de cafeeiro, citros, bananeira e *Aglaonema* sp. (ornamental da família Araceae), verificaram que todos os caracteres morfométricos estudados apresentaram diferenças estatísticas significativas entre essas subpopulações.

Em estudo morfométrico de subpopulações de *P. vulnus* procedentes de diferentes países, LAX et al. (2004) observaram que o parâmetro V% (distância da extremidade anterior à vulva, como percentagem do comprimento total do corpo) e o comprimento do estilete apresentaram baixo coeficiente de variação, fato que já havia sido observado anteriormente (DOUCET et al., 1996, 2001; DOUCET & LAX, 1997), confirmando a confiabilidade desses caracteres para identificação de *P. vulnus*. LAX et al. (2004) verificaram, também, que o número de anéis na cauda de fêmeas das subpopulações de *P. vulnus* é um caráter estável para essa espécie de nematóide e

pode ser utilizado na sua diagnose. MIZUKUBO (1990) também se baseou no número de anéis na cauda, entre outros caracteres, para separar as espécies *P. penetrans* e *P. vulnus* presentes em uma amostra de solo, coletada em um pomar de macieira, no Japão. O número de anéis na cauda também foi considerado importante por outros pesquisadores para diferenciar espécies de *Pratylenchus* (SEINHORST, 1968; LOOF, 1978). CORBETT & CLARK (1983) não consideraram o número de anéis na cauda, e sim a forma da cauda, um importante caráter para a diferenciação de espécies de *Pratylenchus.* De fato, a forma da extremidade da cauda é razoavelmente constante em fêmeas de *P. brachyurus* e *P. coffeae*, sendo arredondada, truncada ou ligeiramente anelada. Em *P. vulnus*, a extremidade da cauda é ligeiramente arredondada a subaguda, o mesmo ocorrendo em *P. zeae*. O término da cauda em *P. penetrans* é geralmente arredondado e liso, mas espécimes com alguma anelação não são raros. Desde que um número razoável de espécimes seja analisado, a forma do término da cauda tem um considerável valor na identificação de espécies de *Pratylenchus* (LOOF, 1991; INSERRA et al., 2001).

INSERRA et al. (2001), analisando dados morfométricos de oito subpopulações de *P. coffeae,* procedentes de diferentes países e plantas hospedeiras, verificaram que todas eram anfimíticas, exibiam quatro linhas no campo lateral, dois anéis, ocasionalmente três na região labial, e placa labial indivisa. Todas essas subpopulações tinham o estilete ≥ 15,5 µm, posição da vulva ≥ 79 % e o parâmetro “a” ≥ 23. Esses autores ainda observaram que os parâmetros morfométricos de fêmeas dessas subpopulações são similares àqueles relatados por SHER & ALLEN (1953) e por LOOF (1960) para a espécie. Todavia, diferiam daqueles de outras populações putativas de *P. coffeae* (LOOF, 1960; 1991). Segundo INSERRA et al. (2001), a forma da cauda, entre as oito subpopulações mencionadas, varia de truncada a ligeiramente digitada ou endentada ou, ainda, subemisférica com término liso, coincidindo com as observações de LOOF (1960) para uma população topotipo de *P. coffeae*. Essas observações revelam a dificuldade que os nematologistas encontram na identificação de espécies de *Pratylenchus.*

DUNCAN et al. (1999) fizeram a análise filogenética de seqüências D2/D3 do DNA ribossomal e a análise de caracteres morfométricos de subpopulações de *P. coffeae* coletadas em plantas de citros e de cafeeiros no Brasil e sugeriram que esses nematóides pertenciam a uma ou mais espécies ainda não descritas. Posteriormente, INSERRA et al. (2001) realizaram a análise genética da mesma seqüência de DNA e também a análise detalhada de caracteres morfométricos. Constataram que a subpopulação de *Pratylenchus* obtida de raízes de plantas de citros, procedentes do Município de Itápolis-SP, diferia da subpopulação topotipo de *P. coffeae* e de outra de *P. loosi* Loof (1960). Esses autores concluíram que o nematóide coletado em Itápolis pertencia a uma nova espécie. Elaboraram a sua diagnose, descreveram-na e nomearam-na de *P. jaehni*.

INSERRA et al. (2001), no entanto, salientaram as dificuldades em separar as espécies *P. jaehni* e *P. coffeae* apenas por caracteres morfológicos e morfométricos. Relataram que somente muito poucos caracteres morfométricos de fêmeas diferiram entre *P. jaehni,* a subpopulação topotipo de *P. coffeae* e uma subpopulação de *P. loosi.* De fato, na opinião de INSERRA et al. (2001), *P. jaehni* difere dessas duas espécies no formato da cauda, cuja extremidade é usualmente hemisférica ou subemisférica e lisa, embora, ocasionalmente, ocorram fêmeas com cauda truncada ou ligeiramente endentada. Em *P. coffeae,* a cauda é truncada ou hemisférica e pontiaguda em *P. loosi.* A diagnose de *P. jaehni* em relação a *P. loosi* é, portanto, muito mais fácil que em relação a *P. coffeae*, uma vez que, em *P. jaehni*, não são encontradas fêmeas com cauda pontiaguda (INSERRA et al., 2001). Além disso, o valor de V% para *P. jaehni* é ≤ 79 e maior que esse valor para *P. coffeae* e *P. loosi*. De acordo com a mesma fonte, entretanto, a separação de subpopulações de *P. jaehni* das de *P. coffeae,* baseada em caracteres morfológicos e morfométricos, é mais difícil. Pelo menos 10 fêmeas da subpopulação devem ser examinadas para que se obtenha uma diagnose confiável. Afirmaram, também, que a morfologia de machos não proporciona caracteres diferenciais entre essas espécies. *Pratylenchus coffeae, P. loosi* e *P. jaehni*, são as únicas espécies anfimíticas que possuem dois anéis na região labial e placa labial indivisa (INSERRA et al., 2001).

Recentemente, CAMPOS (2002) constatou que *P. jaehni* é a espécie dos nematóides das lesões radiculares predominante na citricultura paulista. Segundo o autor, a extremidade da cauda lisa e hemisférica, o comprimento do estilete, a altura dos nódulos basais do estilete, o valor de V % e do parâmetro "a" são caracteres que permitem separar as subpopulações de *P. jaehni* das de *P. coffeae*. O autor confirmou que a morfologia dos machos de *P. coffeae* e *P. jaehni* não proporciona caracteres distintivos entre essas duas espécies, sendo a região labial semelhante às das fêmeas, em ambas espécies. Com efeito, HERNÁNDEZ et al. (2001) mencionaram que essas similaridades entre espécies, em alguns casos, e a variabilidade intra-específica de caracteres morfológicos e morfométricos, em outros, foi e continua sendo uma séria dificuldade a ser transposta na taxonomia de *Pratylenchus* spp.

Nas espécies anfimíticas, a forma da espermateca constitui um caráter razoavelmente útil para a separação das espécies, e três formas básicas podem ser observadas, a saber: arredondada ou ligeiramente quadrada, oval e retangular (LOOF, 1991).

Nos estudos envolvendo a taxonomia de *Pratylenchus* spp., a mutiplicação de populações in vitro é um recurso notavelmente útil. Quando se trata de espécies anfimíticas, a demonstração da incompatibilidade reprodutiva entre populações afins usualmente é feita para se demonstrar que, de fato, essas populações pertencem a espécies diferentes. No processo de multiplicação in vitro, a axenização dos nematóides é uma etapa vital para se evitar a contaminação com outros microrganismos. HASTINGS & BOSHER (1938) realizaram os primeiros estudos para axenização e manutenção de uma espécie de *Pratylenchus* em plântulas de aveia in vitro. Entretanto, foi KRUSBERG (1961) quem iniciou os estudos visando ao estabelecimento de culturas axênicas de nematóides em calo de alfafa obtido em meio de cultura relativamente complexo. Utilizando-se dessa técnica, obteve a multiplicação de *P. zeae* Graham, *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) Filipjev e *Aphelenchoides ritzemabosi* (Schwartz) Steiner & Buhrer in vitro. A seguir, outros pesquisadores também utilizaram essa técnica, com sucesso, para multiplicação de populações axênicas, tanto de *Pratylenchus* spp. quanto de outros nematóides (FEDER et al., 1962; KHERA &

ZUCKERMAN, 1962; MYERS et al., 1965; DUNN, 1973; RIEDEL et al., 1973; CHITWOOD & KRUSBERG, 1977; CASTRO & FERRAZ, 1989; ELSEN & DE WAELE, 2004).

Outra alternativa para a multiplicação de nematóides axenicamente é a técnica de discos de cenoura, publicada no final da década de 1960. O´BANNON & TAYLOR (1968) foram os pioneiros na utilização desse recurso e, a partir daí, essa técnica vem sendo utilizada para multiplicação in vitro de diferentes espécies de *Pratylenchus* (TOWSON & LEAR, 1982; VERDEJO-LUCAS & PINOCHET, 1992; INSERRA et al., 1996; STOFFELEN et al., 1999; DOUCET et al., 2001; DI VITO et al., 2002; MUDIOPE et al*.,* 2004). Essa técnica é mais simples e menos onerosa que a do calo de alfafa desenvolvida por KRUSBERG (1961), conforme confirmado por diferentes autores (BONCATO & DAVID, 1980; KOSHY & SOSAMMA, 1981; CASTRO, 1986; CASTRO & FERRAZ, 1989). Outro endoparasito migrador, *Radopholus similis* (Cobb) Thorne, também vem sendo multiplicado em disco de cenoura (CASTRO & FERRAZ, 1989; FALLAS & SARAH, 1994; TRINH et al*.,* 2004; COSTA, 2005).

Os nematóides eram inoculados em discos de cenoura de 2 a 4 mm de espessura, em placas de Petri, contendo ágar-água e antibióticos, proporcionando a obtenção de altas populações de *P. brachyurus* e *R. similis* (O'BANNON & TAYLOR, 1968). As melhorias dessa técnica, introduzidas por MOODY et al. (1973), foram consideráveis. Eles aumentaram a espessura dos discos de cenoura para 10 a 15 mm e retiraram o meio de ágar-água, além dos antibióticos, e utilizaram cinco discos por vidros. Com essa alteração da técnica, esses pesquisadores prolongaram o período de multiplicação dos nematóides nos discos para três a quatro meses após a inoculação de *P. vulnus* e obtiveram uma taxa de multiplicação de 1.000 vezes o número de nematóides inoculados. Os discos de cenoura inoculados exauriram-se e secaram no final desse período.

Mais recentemente, populações axênicas de espécies de *Pratylenchus* obtidas por essa técnica, inclusive, foram utilizadas em estudos moleculares, confirmando a pureza biológica dessas populações (WAEYENBERGE et al., 2000; INSERRA et al., 2001; De LUCA et al., 2004). Populações axênicas de *R. similis* obtidas em discos de

cenoura, recentemente, também foram empregadas em estudos moleculares (TRINH et al., 2004; COSTA, 2005).

Apesar de os discos de cenoura serem uma alternativa mais simples e menos onerosa, em relação à utilização de cultura de tecidos em calos vegetais para obtenção de populações axênicas de fitonematóides, a não-adição de um meio de cultura, para manutenção da umidade no ambiente, reduz a longevidade dos discos de cenoura, podendo influenciar negativamente na multiplicação do nematóide (MOODY et al., 1973; CASTRO & FERRAZ, 1989).

GONZAGA et al. (2004) introduziram modificações nessa técnica e obtiveram sucesso na multiplicação de *Pratylenchus* ssp. in vitro. Em vez de discos, foram utilizados cilindros de cenoura individuais de, aproximadamente, 30 mm de comprimento por 15 mm de diâmetro, retirados da porção central das raízes, sem adição de qualquer meio, e melhoraram o processo de axenização.

## III MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Nematologia e em casadevegetação do Departamento de Fitossanidade da UNESP/FCAV, Câmpus de Jaboticabal - SP. Na Tabela 2, estão relacionadas as espécies de *Pratylenchus*, utilizadas neste estudo, assim como suas procedências e hospedeiros. A subpopulação de cada espécie foi identificada, inicialmente, com base em suas características morfológicas.

Tabela 2. Espécies de *Pratylenchus* utilizadas no estudo da multiplicação in vitro em cilindros de cenoura.

| Espécie | Procedência | Hospedeiro |
|---|---|---|
| *Pratylenchus brachyurus* (Pb) | Silvânia - GO | *Sorghum bicolor* |
| *P. coffeae* (Pc) | Franca - SP | *Musa* sp. |
| *P. jaehni* (Pj) | Itajobi - SP | *Citrus limonia* |
| *P. penetrans* (Pp) | **Guaraí - TO** | *Glycine max* |
| *P. vulnus* (Pv) | Andradas - MG | *Rosa* sp. |
| *P. zeae* (Pz) | Onda Verde - SP | *Saccharum* sp. |

Nota: Subpopulações obtidas de amostras de solo e raízes dos hospedeiros alistados.

### 3.1. Avaliação Comparativa da Multiplicação de Espécies de *Pratylenchus* em Cilindros de Cenoura

As espécies foram identificadas, à medida que as amostras eram recebidas e mantidas em casadevegetação, em seus hospedeiros originais, em vasos contendo substrato autoclavado.

Os nematóides foram extraídos das raízes de seus respectivos hospedeiros pela flotação centrífuga em solução de sacarose com caulim (COOLEN & D'HERDE, 1972). Em seguida, foram axenizados pela técnica de MOUNTAIN (1955), com modificações. Com efeito, em vez de sulfato de estreptomicina, foi utilizada uma solução de ampicilina a 0,1%, e os passos subseqüentes da axenização foram conduzidos conforme descrição a seguir: os nematóides foram transferidos, um a um, para vidros tipo BPI contendo 600 µL da solução de ampicilina, e, depois de 10 minutos de repouso nessa solução, o excesso foi removido e foram acrescentados 200 µL de água esterilizada. Após 5 minutos, o excesso de água foi removido, e 200 µL da solução do antibiótico foram novamente adicionados ao BPI e deixados em repouso por mais 10 minutos. A seguir, nessa solução de antibiótico, os nematóides foram inoculados em condições assépticas no topo dos cilindros de cenoura (*Daucus carota* L.) colocados nos vidros em posição vertical, utilizando-se de uma micropipeta.

Os cilindros foram previamente preparados pela técnica de MOODY et al. (1973), com modificações, conforme descrito por GONZAGA et al. (2006). Essas modificações da mencionada técnica constaram do preparo de um cilindro de cenoura de 30 mm de comprimento por 15 mm de diâmetro, por vidro de 180 mL de capacidade (110 mm de altura por 55 mm de diâmetro), em vez de discos, como descrito por MOODY et al. (1973). As cenouras foram previamente imersas em hipoclorito de sódio a 0,05%, por 30 minutos (CHITAMBAR & RASKI, 1985), e, em seguida, em câmara de fluxo laminar, foram cortadas com bisturi flambado, em cilindros de 30 mm de comprimento, mergulhados em álcool etílico comercial (92,8$^{o}$), flambados, e, com auxílio de um perfurador, também flambado, foram retirados os cilindros centrais. Individualmente, esses cilindros foram colocados em posição vertical, em vidros previamente vedados com papel alumínio, e autoclavados (Figura 1).

A seguir, foram mantidos em repouso por 5 dias, em média, e, não havendo evidências de contaminação, foram inoculados com os nematóides axenizados, como anteriormente descrito. Na inoculação de espécies anfimíticas, foram utilizadas 20 fêmeas e 10 machos (*P. coffeae*, *P. jaehni, P. penetrans e P. vulnus*). No caso de espécies partenogenéticas (*P. brachyurus* e *P. zeae*), apenas 20 fêmeas.

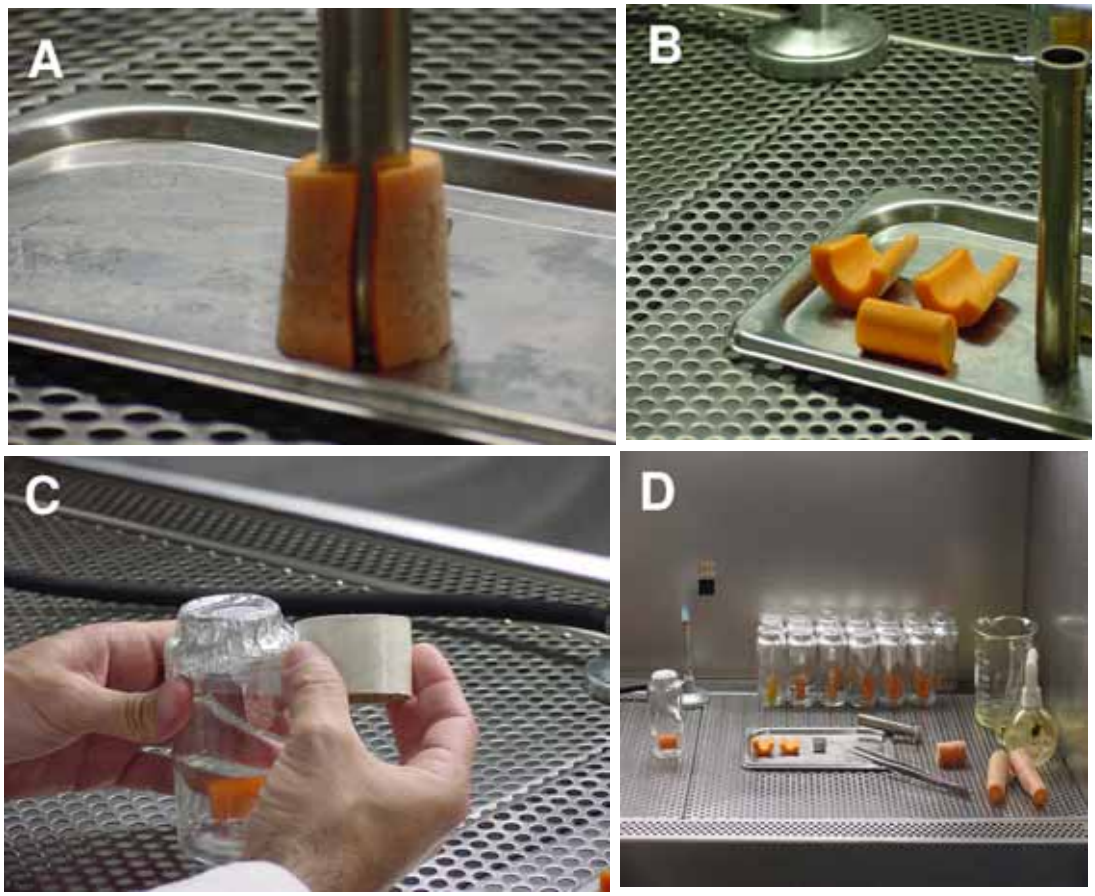



Figura 1. Preparação dos cilindros de cenoura em condições assépticas para multiplicação de espécies de *Pratylenchus* in vitro. A) Remoção da parte central da raiz com perfurador em câmara de fluxo laminar. B) Cilindro removido da porção central da raiz. C) Acondicionamento do cilindro em vidro previamente autoclavado e selagem com filme de PVC. D) Cilindros preparados e acondicionados nos vidros, no interior da câmara.

Após a inoculação, os cilindros foram mantidos a 25 ± 1 ºC em B.O.D., no escuro, por 120 dias (Figura 2).

Figura 2. Cilindros de cenoura inoculados com *Pratylenchus* spp. e mantidos em B.O. D., a 25 ± 1ºC, no escuro.

Então, os nematóides foram extraídos pela flotação centrífuga em solução de sacarose com caulim (COOLEN & D'HERDE, 1972). As concentrações das suspensões obtidas foram estimadas, assim como os números de espécimes e ovos por cilindro, com auxílio da câmara de contagem de Peters, ao estereoscópio e, com esses dados, estimaram-se, também, as taxas de multiplicação das espécies. Os dados relativos aos números totais de espécimes e ovos foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade, utilizando-se do software ESTAT 2.0.

## 3.2. Caracterização Morfológica e Morfométrica das Seis Espécies de *Pratylenchus* mais Comuns no Brasil

### 3.2.1 Preparo de Espécimes para Exame ao Microscópio Óptico Composto

Uma subpopulação de cada uma das seis espécies de *Pratylenchus* envolvidas no estudo (Tabela 3) foi multiplicada em cilindros de cenoura, conforme descrito no item 3.1. Os nematóides foram extraídos dos cilindros de cenoura pela técnica de COOLEN & D'HERDE (1972), pelo menos aos 90 dias depois da inoculação nos cilindros e utilizados no preparo de montagens temporárias em lâminas de vidro.

Tabela 3. Espécies de *Pratylenchus* utilizadas no estudo da caracterização morfométrica ao microscópio óptico composto.

| Espécie | Procedência | Hospedeiro |
|---|---|---|
| *Pratylenchus brachyurus* (Pb) | Campo Florido - MG | *Glycine max* |
| *P. coffeae* (Pc) | Estado de Pernambuco | *Anona muricata* |
| *P. jaehni* (Pj) | Palestina - SP | *Citrus limonia* |
| *P. penetrans* (Pp) | Araxá - MG | *Lilium tennifolium* |
| *P. vulnus* (Pv) | Andradas - MG | *Rosa* sp. |
| *P. zeae* (Pz) | Luís Eduardo Magalhães - BA | *Zea mays* |

Nota: Subpopulações obtidas de amostras de solo e raízes dos hospedeiros alistados.

Montagens temporárias de fêmeas ou de fêmeas e de machos de cada subpopulação foram preparadas conforme a técnica descrita por TIHOHOD (1993). As lâminas de cada subpopulação foram identificadas, e os espécimes foram examinados

e documentados em um sistema de aquisição de imagens digitais constituído por uma câmara digital Sony®, modelo Hiper HAD, montada sobre um microscópio trinocular Olympus®, modelo BX50, e acoplada a um microcomputador, em um período de até 4 horas após a montagem das lâminas.

Pelo menos 15 fêmeas ou 15 fêmeas e 10 machos de cada subpopulação foram examinados em campo claro e documentados. As imagens digitalizadas foram examinadas e gravadas em computador, utilizando-se de contraste de interferência diferencial (DIC), conforme o estudo de PADAWER (1967), quando necessário. Objetivas de 10X, 20X e 40X e objetivas de imersão de 60X e 100X com oculares de 15X foram utilizadas para exame dos espécimes. Para as fotomicrografias, foi utilizada uma fotocular de 2,5X. As mensurações foram feitas nas imagens digitalizadas, utilizando-se do Software Image-Pro® Plus 4.1 (Media Cybernetics, 8484 Georgia Avenue, Silver Spring, MD 20910, EUA).

Espécimes inteiros e detalhes da região labial, estilete, esôfago, espermateca, saco pós-uterino, cauda e outros, além de detalhes dos machos, quando presentes, foram documentados de modo a permitir a determinação dos valores das variáveis alistadas a seguir. As variáveis de 1 a 19 foram resultantes de mensurações diretas e contagem, no caso de anéis na cauda. As de 20 a 25 são proporções.

1. Comprimento do corpo (L);
2. Largura da região labial;
3. Altura da região labial;
4. Comprimento do estilete;
5. Largura dos nódulos basais do estilete;
6. Altura dos nódulos basais do estilete;
7. Distância da abertura dos ductos da glândula dorsal esofagiana aos nódulos basais do estilete (DGO);
8. Maior largura do corpo (l);
9. Distância da região labial à vulva;

10. Distância da região labial ao poro excretor;
11. Comprimento do esôfago;
12. Comprimento da sobreposição do esôfago ao intestino;
13. Distância da espermateca à vulva;
14. Largura do corpo na vulva;
15. Distância da vulva ao ânus;
16. Comprimento do saco pós-uterino;
17. Largura do corpo na região anal;
18. Comprimento da cauda;
19. Número de anéis na cauda;
20. Largura/ Altura da região labial;
21. a (comprimento do corpo dividido pela maior largura);
22. b (comprimento do corpo dividido pelo comprimento do esôfago);
23. c (comprimento do corpo dividido pela cauda);
24. c' (comprimento da cauda dividido pela largura do corpo na região anal);
25. V% (distância da extremidade anterior à vulva, como percentagem do comprimento total do corpo).

Os dados relativos às variáveis e proporções foram submetidos à Análise Estatística Descritiva, por espécie, e às Análises Discriminante e Canônica, utilizando-se, respectivamente, dos softwares SAS v.8.02 e Statistica 5.1.

### 3.2.2 Preparo de Espécimes para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Cerca de 200 espécimes de cada população, recém-extraídos dos cilindros de cenoura, foram transferidos, um a um, ao estereoscópio, para vidros individuais de 10 mL, contendo 3/4 de seu volume preenchidos com água filtrada. A seguir, os vidros foram agitados manualmente por cerca de 5 minutos e deixados em repouso, em refrigerador, a 5 $^{o}$C, por cerca de 1 hora. Subseqüentemente, o volume de água de cada vidro foi reduzido para cerca de 0,5 mL com uma seringa hipodérmica, e os vidros

foram novamente deixados em geladeira por 20 minutos. A seguir, o volume de cada vidro foi preenchido com a solução fixadora, constituída de glutaraldeído a 3 % e formaldeído a 2 %, preparado com paraformaldeído (EISENBACK, 1991), em água filtrada. Os vidros foram mantidos acerca de 4$^{o}$C, em geladeira, para que os nematóides se mantivessem relaxados durante todo o processo de fixação.

Após o período mínimo de 72 horas, o processo de preparação teve prosseguimento. Os nematóides na solução fixadora foram submetidos a um banho em ultra-som por 1 minuto, para promover a limpeza dos espécimes. A seguir, os vidros foram mantidos em repouso por cerca de 30 minutos, em temperatura ambiente. Então o volume da suspensão foi reduzido com uma pipeta de Pasteur para cerca de um terço e adicionado igual volume de água filtrada. Os vidros foram agitados manualmente e mantidos em repouso, como no caso anterior. Novamente o excesso da suspensão foi removido, e o restante da suspensão foi transferido com pipeta de Pasteur, para câmaras preparadas com cápsulas de polietileno, tamanho “OO”, utilizadas nas preparações de amostras para a microscopia eletrônica de transmissão e peças de "silk-screen" com poros de 25 μm. Os nematóides foram lavados por cerca de um minuto, aplicando-se água filtrada, gota a gota, com auxílio de uma pipeta de Pasteur. As câmaras foram fechadas, apoiadas numa placa de Petri contendo uma lâmina de água e transferidas para vidros de boca larga de cerca de 50 mL.

Numa câmara de exaustão de gases, adicionou-se a solução de tetróxido de ósmio a 2 % para pós-fixação do material, por 14 horas. A seguir, o tetróxido de ósmio foi removido na câmara de exaustão de gases, e os espécimes foram lavados com água filtrada por seis vezes consecutivas, em um intervalo de 15 minutos. Então, foram desidratados em uma série gradual de acetona (30; 50; 70; 80; 90; 95 e 100%), repetindo-se duas vezes o último passo da série. A seguir, as amostras foram secas, em secador de ponto crítico, utilizando-se de $CO_2$, montadas, metalizadas com uma camada de cerca de 35 nm de ouro, observadas e eletromicrografadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5410, operado em 15 kV (SANTOS & MAIA, 1997).

### 3.3 Elaboração de Grade Ilustrada para a Identificação das Principais Espécies de *Pratylenchus* que Ocorrem no Brasil

As ilustrações dos caracteres morfológicos e morfométricos mais marcantes que identificam as seis principais espécies de *Pratylenchus* que ocorrem no Brasil, obtidas aos microscópios óptico e eletrônico de varredura, assim como a presença ou ausência de machos foram utilizadas na elaboração de uma grade ilustrada para a identificação dessas espécies. A grade foi construída de modo a facilitar a inclusão de novas espécies, caso a ocorrência de outras seja registrada no País.

## IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Multiplicação de Espécies de *Pratylenchus* em Cilindros de Cenoura

Em geral, a partir dos 60 dias após a inoculação dos cilindros de cenoura, foram observadas manchas necróticas escurecidas no topo dos cilindros, correspondendo aos pontos onde os nematóides foram inoculados, indicando o estabelecimento da população (Figura 3 A). À medida que a população de nematóides aumentou, essa necrose cresceu e assumiu o aspecto de anasarca de coloração marrom-escura (Figura 3 B). O aumento da área dessa lesão foi tanto mais rápido quanto maior foi a taxa de multiplicação da espécie de nematóides. MOODY et al. (1973), também, já tinham observado essas alterações.

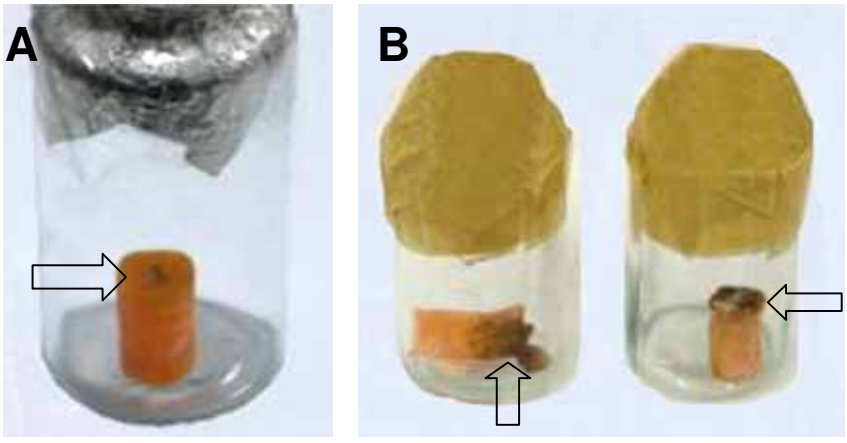



Figura 3. Sintomas indicativos do estabelecimento e multiplicação de *Pratylenchus* spp. nos cilindros de cenoura. A) Lesão inicial sobre o ponto de inoculação, cerca de 60 dias após. B) Lesões na forma de anasarca, de coloração marrom-escura, indicando a progressiva multiplicação dos nematóides.

A maior média da população final das espécies incluídas no estudo foi obtida para *P. penetrans,* correspondendo a 156.621 ovos e formas ativas, equivalendo a uma taxa de 5.200 vezes a população inicial (20 fêmeas e 10 machos), diferindo das populações finais de *P. jaehni* e de *P. brachyurus*, porém não diferindo das demais (Figura 4). Conquanto a população final de *P. zea*e não tenha diferido da obtida para *P. penetrans,* a taxa de multiplicação dessa espécie foi de 6.900 vezes, correspondendo à maior de todas as espécies em estudo, uma vez que a população inicial foi de 20 fêmeas. Embora a população final de *P. jaehni* tenha sido estatisticamente inferior, apenas, à de *P. penetrans,* a taxa de multiplicação dessa espécie nos cilindros de cenoura foi a menor entre as espécies estudadas (1.300 vezes).

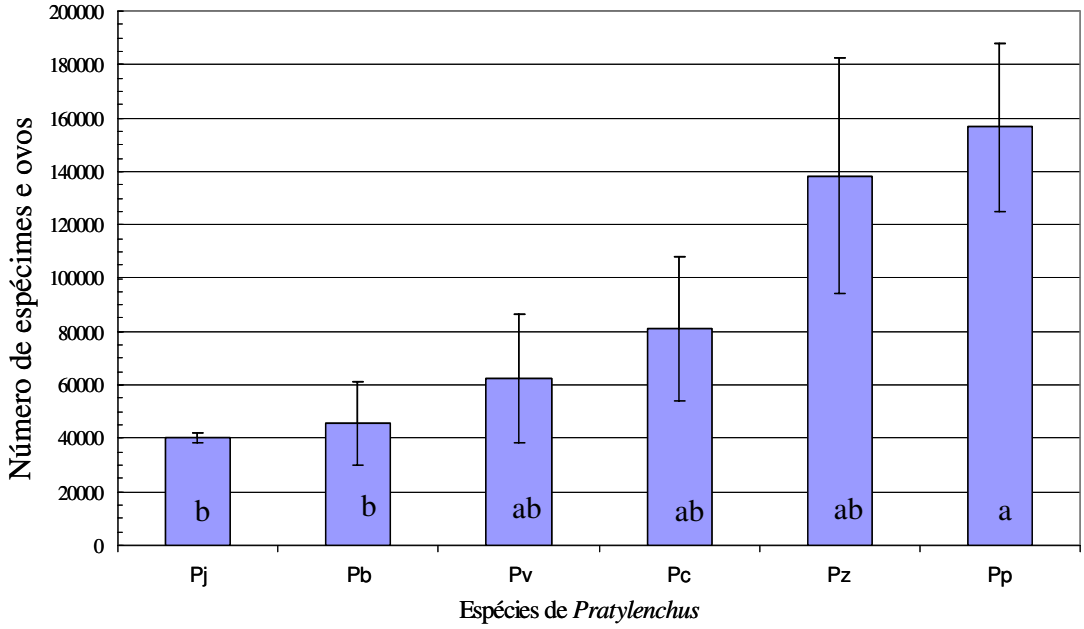



Figura 4. Médias dos números de espécimes e de ovos de *Pratylenchus jaehni* (Pj), *P. brachyurus* (Pb), *P. vulnus* (Pv), *P. coffeae* (Pc), *P. zeae* (Pz) e *P. penetrans* (Pp), em cilindros de cenoura, in vitro, aos 120 dias após a inoculação. Médias de cinco repetições indicadas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade. CV % = 5,5

Além da menor taxa de multiplicação, *P. jaehni* exibiu, também, a menor média do número de espécimes e de ovos por cilindro de cenoura (40.201) que as demais. Porém, não diferiu estatisticamente de *P. brachyurus*, *P. coffeae, P. vulnus* e *P. zeae*, quanto à média do número total de espécimes e ovos por cilindro. Em *P. brachyurus,* a taxa de multiplicação foi de 2.280. Esse valor é 141 vezes maior que a taxa de multiplicação dessa espécie obtida por CASTRO & FERRAZ (1989) em discos de cenoura. Para *P. zeae*, os cilindros de cenoura proporcionaram uma taxa de multiplicação de 6.900 vezes, enquanto essa taxa em discos foi de apenas 145 vezes, em relação ao número de espécimes inoculados (CASTRO & FERRAZ, 1989). A taxa de multiplicação de *P. vulnus* obtida no presente estudo foi de 2.000 vezes o inóculo inicial, correspondendo ao dobro da taxa obtida por MOODY et al. (1973) para esse nematóide. TOWSON & LEAR (1982) utilizaram a mesma técnica de MOODY et al. (1973), mas usando três a quatro discos de cenoura por vidro de 120 mL e obtiveram aumentos de cerca de 30 vezes na população de *P. vulnus*, em sete semanas, enquanto VERDEJO-LUCAS & PINOCHET (1992) relataram aumentos de até 16.600 vezes na população desse nematóide, em 90 dias, utilizando discos de cenoura em placas de Petri com ágar-água.

VERDEJO-LUCAS & PINOCHET (1992) mencionaram que o modo de reprodução da espécie de *Pratylenchus* pode influenciar na multiplicação do nematóide in vitro, sendo que espécies anfimíticas tendem a multiplicar-se mais que as partenogenéticas. No presente estudo, embora *P. jaehni* (anfimítica) tenha exibido a menor população final, as outras espécies anfimíticas foram as que apresentaram as maiores médias de indivíduos e ovos na população final, não diferindo entre elas nem de *P. zeae* (partenogenética).

A multiplicação de espécies de *Pratylenchus* in vitro, em cilindros de cenoura é uma técnica de fácil execução, de baixo custo e adequada à produção massiva desses nematóides, tanto para a produção de inóculo como para estudos moleculares, além de outros propósitos, como testes de produtos químicos e de agentes de controle biológico.

### 4.2. Estudo Morfológico das Seis Espécies de *Pratylenchus*

Entre as seis espécies de *Pratylenchus* incluídas no presente estudo, *P. brachyurus, P. coffeae* e *P. jaehni* possuem dois anéis na região labial e placa labial indivisa (Figuras 5 A – C, Figuras 6 A e B, Figuras 7 A e B, respectivamente). Ao microscópio óptico composto, uma constrição em cada um dos lados da região labial (setas) de *P. brachyurus* indica a presença de dois anéis (Figura 5 C). O número de anéis na região labial é um caráter relevante para identificação de *Pratylenchus* spp., tanto que, na elaboração das chaves dicotômicas, usualmente, esse é o primeiro caráter considerado (CAFÉ FILHO & HUANG, 1989; HANDOO & GOLDEN, 1989; LOOF, 1991; SANTOS et al., 2005). Esse fato já havia sido mencionado por KARSSEN et al. (2001).

Embora na maioria das espécies de *Pratylenchus* o número de anéis na região labial seja constante, cuidado especial deve ser adotado na determinação desse caráter, uma vez que, freqüentemente, ocorrem anelações transversais incompletas, como ilustrado na Figura 8. Em conseqüência disso, o exame de um espécime com essa variação revelará números diferentes de anéis nos lados da região labial (LOOF, 1991; KARSSEN et al., 2001). Portanto, para a determinação do padrão desse e de outros caracteres, em *P. jaehni*, INSERRA et al. (2001) recomendaram que, pelo menos, 10 fêmeas fossem examinadas.

A região labial de *P. brachyurus* é angulosa, e o anel da base é mais estreito que o primeiro anel do corpo (Figura 5 B e C). Esse caráter, por si só, na opinião de LOOF (1991), é suficiente para o reconhecimento da espécie. Além disso, os nódulos basais do estilete massivos e arredondados, como ilustrado na Figura 5 C, e a posição da vulva mais posterior que nas outras espécies incluídas neste estudo (Figura 5 D) são características marcantes dessa espécie (LOOF, 1991; ROMAN & HIRSCHMANN, 1969). *Pratylenchus brachyurus* reproduz-se por partenogênese, uma vez que os machos são muito raros na população, e a gônada não exibe espermateca funcional (espermateca contendo espermatozóides), como indicado na Figura 5 E. A cauda usualmente é hemisférica com término liso (Figura 5 G), embora haja variações (Figura 5 H). ROMAN & HIRSCHMANN (1969) mencionaram que esse é um dos caracteres menos variável nessa espécie, se comparado às demais espécies do grupo.

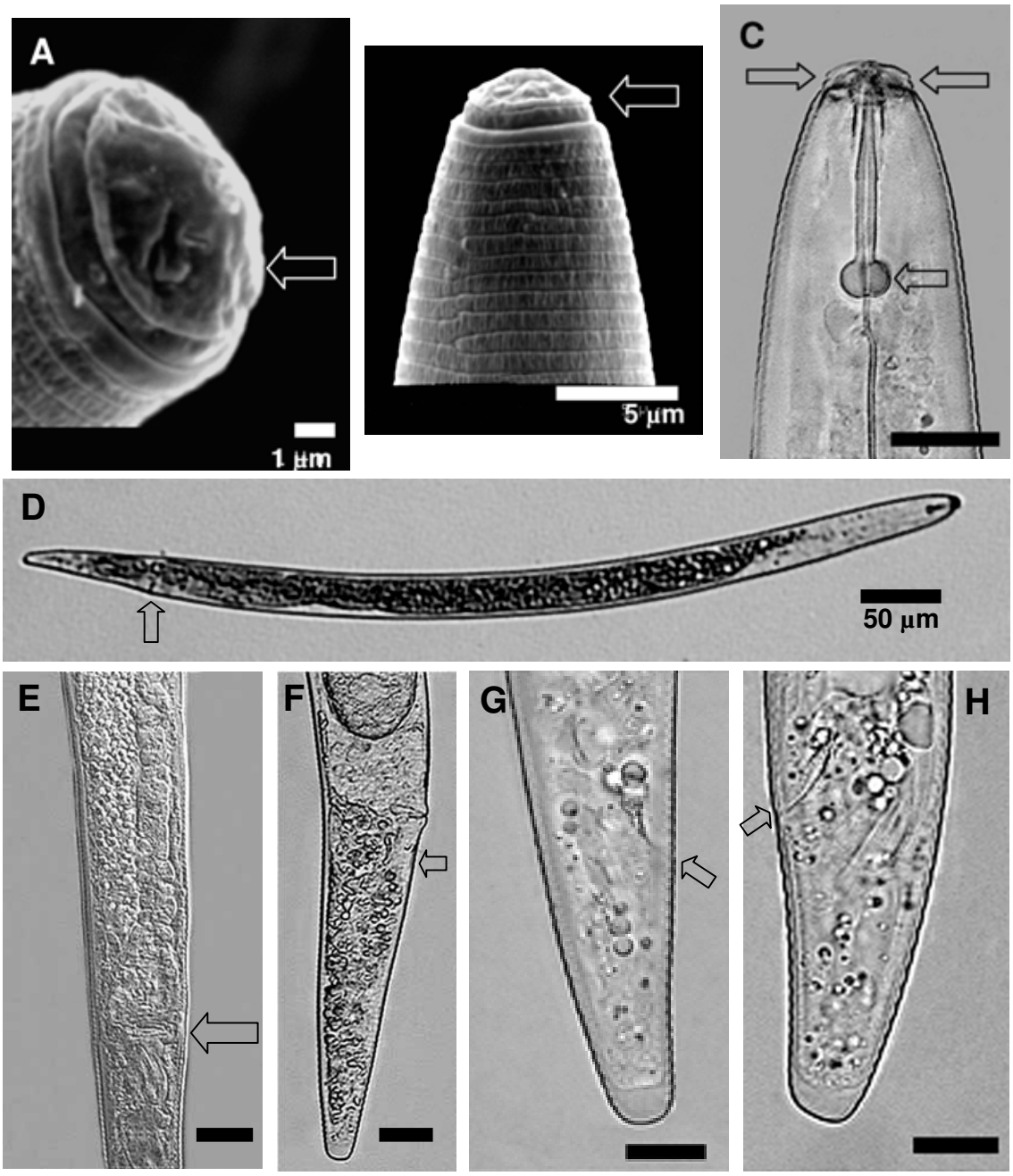



Figura 5. Principais caracteres morfológicos para identificação de *Pratylenchus brachyurus*. A) Eletromicrografia de varredura da placa labial indivisa (seta). B) Eletromicrografia de varredura da região labial angulosa, exibindo dois anéis (seta), sendo o anel da base mais estreito que o primeiro anel do corpo. C) Fotomicrografia da região anterior, exibindo o estilete (seta) com nódulos basais esféricos. D) Fotomicrografia da fêmea, exibindo a posição da vulva (seta). E) Gônada desprovida de espermateca funcional (a seta indica a posição da vulva). F) Saco pós-uterino (seta). G) Cauda hemisférica com término liso, característica da espécie. H) Variação na forma da cauda (as setas em ambas indicam o ânus). Barra das escalas = 10 µm ou outro valor, conforme indicado.

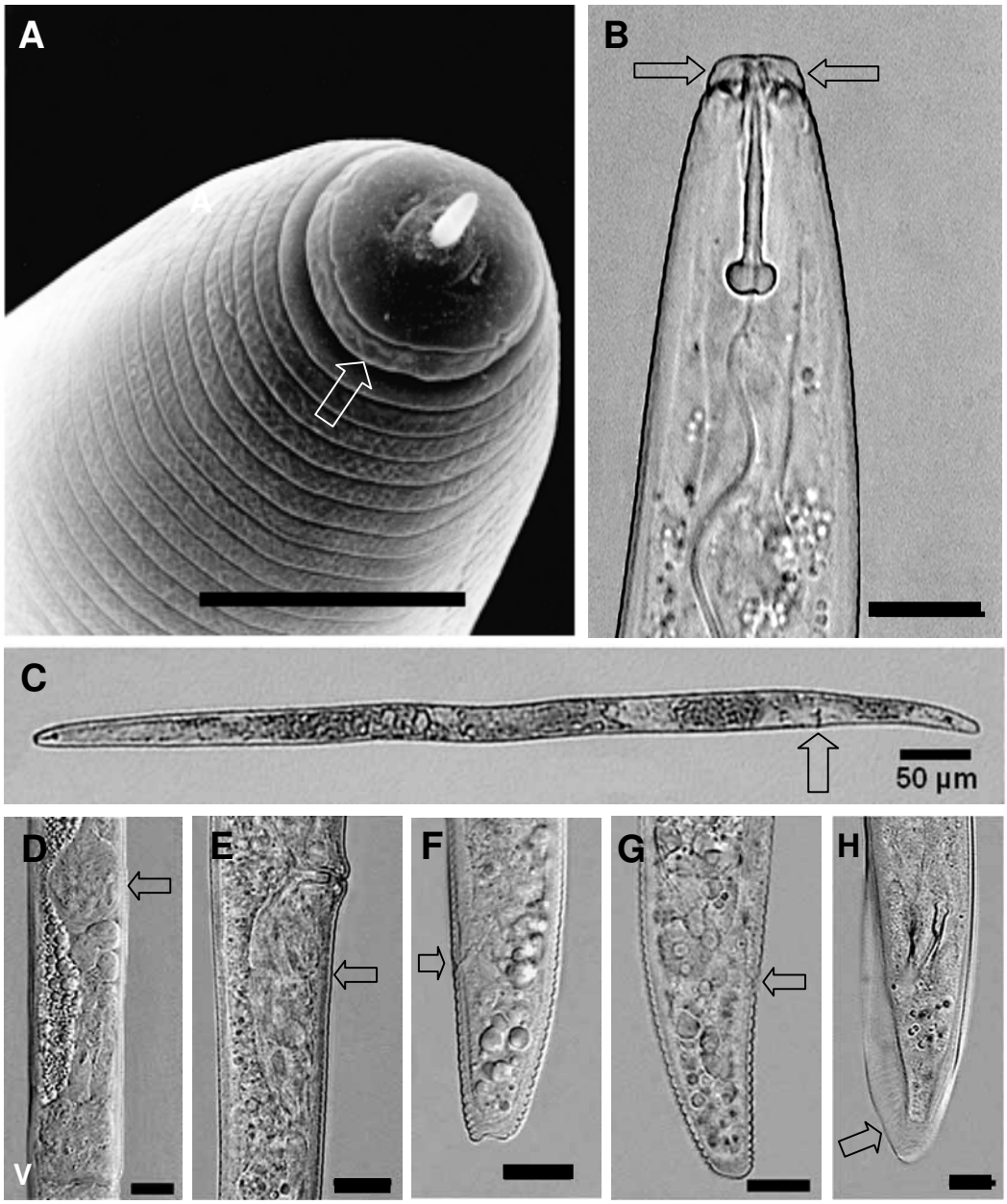



Figura 6. Principais caracteres morfológicos para identificação de *Pratylenchus coffeae*. A) Eletromicrografia de varredura da região labial da fêmea, com dois anéis, e placa labial indivisa (seta). B) Fotomicrografia da região anterior, exibindo uma constrição em cada lado da região labial (setas), indicando a presença de dois anéis. C) Fotomicrografia da fêmea exibindo a posição da vulva (seta). D) Fotomicrografia da espermateca funcional ovalada (seta); a letra V indica a posição da vulva. E) Saco pós-uterino (seta). F) Cauda truncada característica da espécie. G) Variação na forma da cauda (as setas em ambas indicam o ânus). H) Região posterior do macho com a bursa envolvendo toda a cauda (seta). Barra das escalas = 10 µm ou outro valor, conforme indicado.

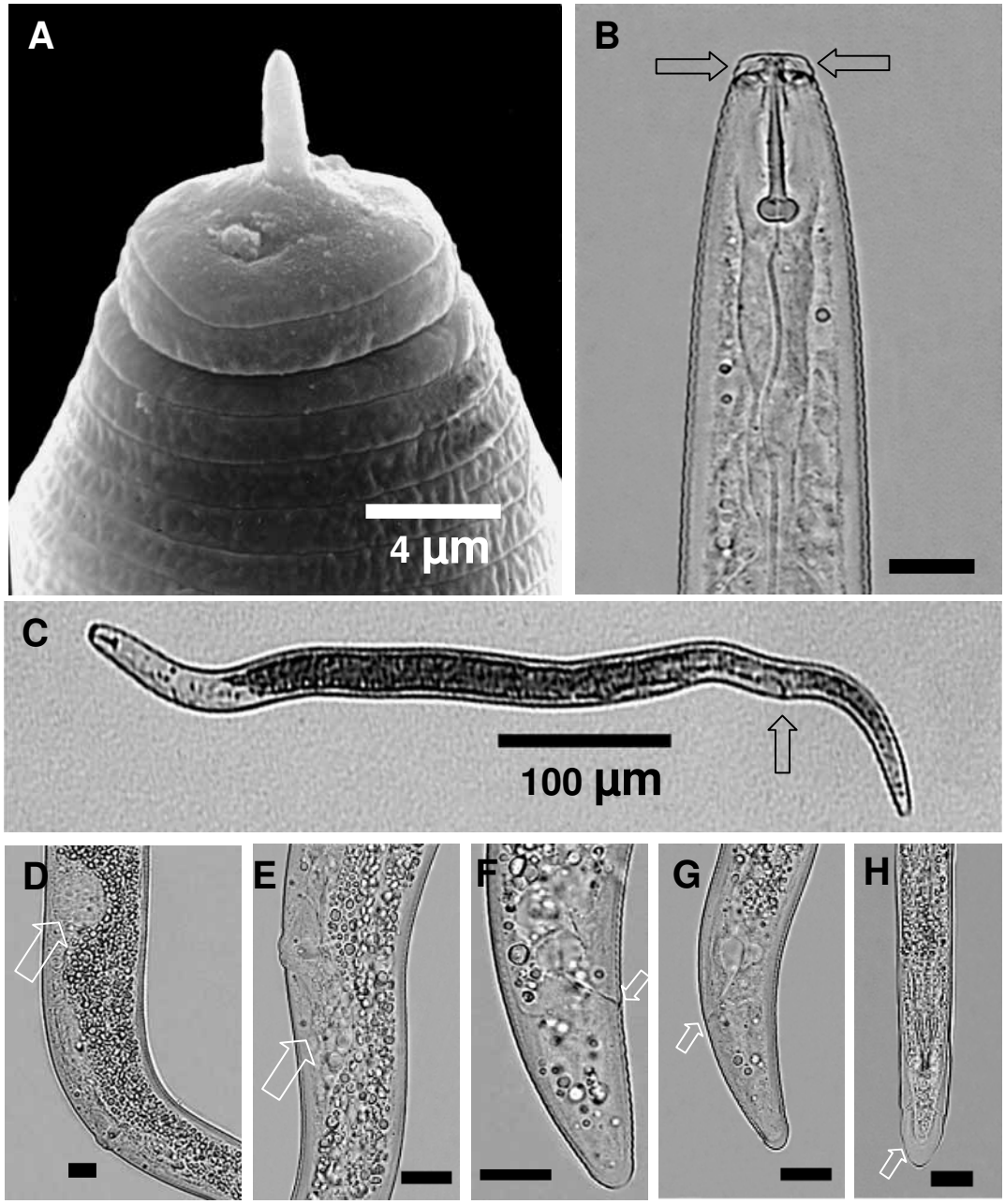



Figura 7. Principais caracteres morfológicos para identificação de *Pratylenchus jaehni.* A) Eletromicrografia de varredura da região labial da fêmea, com dois anéis, e placa labial indivisa (seta). B) Fotomicrografia da região anterior, exibindo uma constrição em cada lado da região labial (setas), indicando os dois anéis. C) Fotomicrografia da fêmea, indicando a posição da vulva (seta). D) Fotomicrografia da espermateca funcional arredondada (seta). E) Saco pós-uterino (seta). F e G) Cauda hemisférica, com término liso, e variação na forma da cauda, respectivamente (a seta em ambas indica o ânus). H) Região posterior do macho, com a bursa envolvendo toda a cauda (seta). Barras da escalas = 10 µm ou outro valor, conforme

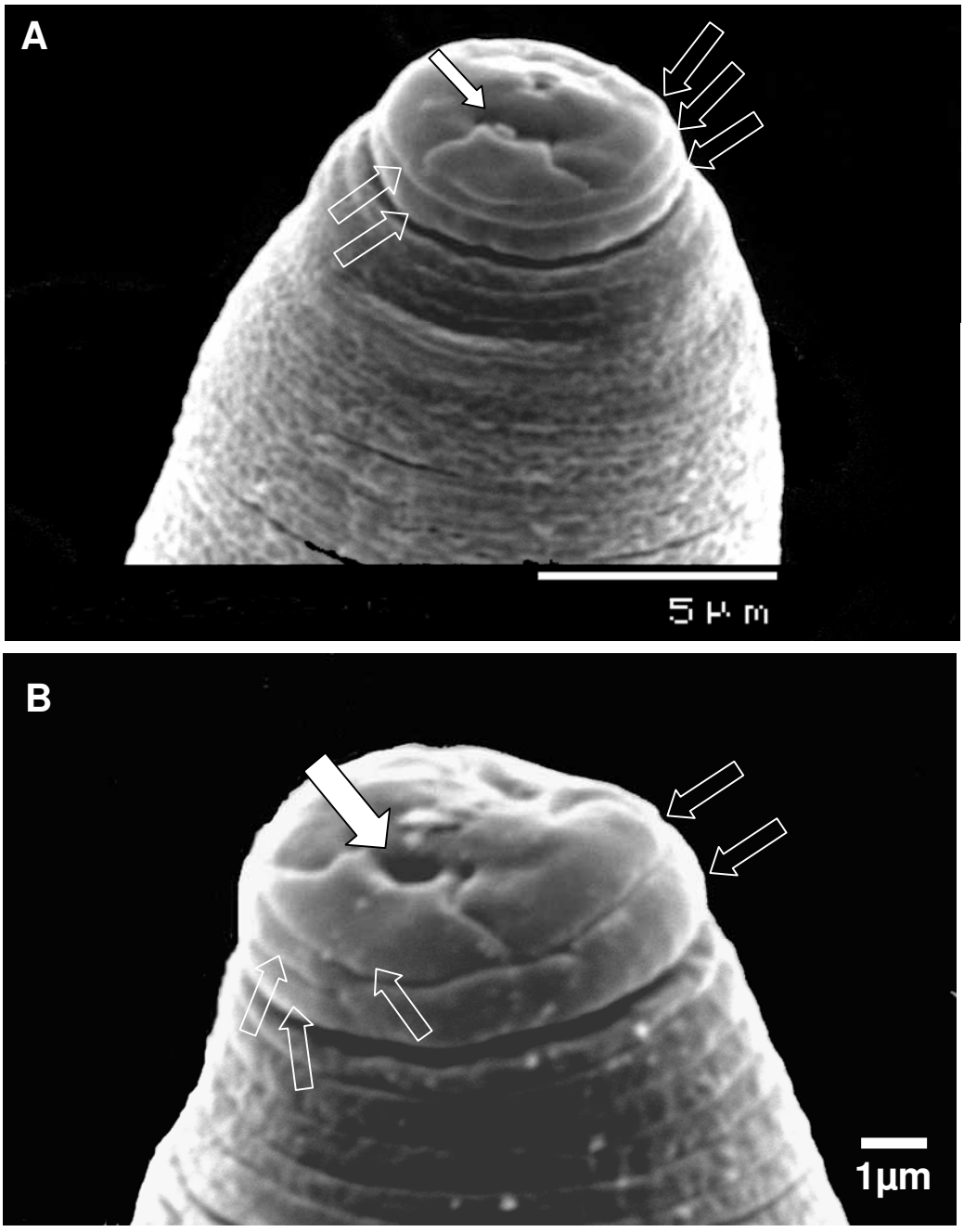



Figura 8. Eletromicrografia de verredura da região labial de *Pratylenchus* spp., exibindo variações no número de anéis resultantes de anelações incompletas. A) Região labial de *P. penetrans,* exibindo dois anéis à esquerda e três à direita (setas). A seta cheia indica a abertura anfidial. B) Região labial de *P. vulnus,* exibindo três anéis à esquerda e dois à direita (setas), e a abertura anfidial maior que nas outras espécies incluídas no estudo (seta cheia).

Ao microscópio eletrônico de varredura, os dois anéis na região labial e a placa labial indivisa de *P. coffeae* são conspícuos, como ilustrado na Figura 6 A. Ao microscópio óptico composto, no entanto, apenas uma sutil constrição em cada um dos lados da região labial (Figura 6 B) indica a presença de dois anéis. Trata-se de uma espécie anfimítica cuja vulva (Figura 6 C) é ligeiramente mais anterior que em *P. brachyurus* (Figura 5 D). A espermateca contendo espermatozóides, doravante referida como funcional, tem a forma ligeiramente ovalada (Figura 6 D), conforme menção de LOOF (2001), e o saco pós-uterino (Figura 6 E), usualmente, é maior que em *P. brachyurus* (Figura 5 F). A cauda da subpopulação examinada no presente estudo é predominantemente truncada, como ilustrado na Figura 6 F, embora haja variações (Figura 6 G), confirmando registros anteriores (ROMAN & HIRSCHMANN, 1969; SIDDIQI, 1972; LOOF, 1991). Machos são abundantes na população, sendo que a bursa envolve toda a cauda (Figura 6 H).

Em *P. jaehni*, os dois anéis na região labial também são conspícuos, tanto ao microscópio eletrônico de varredura quanto ao microscópio óptico composto (Figura 7 A e B). Como em *P. brachyurus* (Figura 5 C) e em *P. coffeae* (Figura 6 B), ao microscópio óptico composto, os dois anéis na região labial de *P. jaehni* também são indicados por uma constrição em cada um dos lados (Figura 7 B).

Visualmente, a posição da vulva em *P. jaehni* não difere de *P. coffeae.* A forma da espermateca funcional, no entanto, é arredondada (Figura 7 D). O comprimento do saco pós-uterino em *P. jaehni* (Figura 7 E) é menor que em *P. coffeae* (Figura 6 E), e a forma da cauda é o caráter-chave para a separação dessas espécies. Com efeito, em *P. jaehni* é aproximadamente hemisrférica com término liso (Figura 7 F), enquanto em *P. coffeae* prevalece a forma truncada (Figura 6 F). Machos estão presentes em ambas as populações e não exibem caracteres distintivos entre as espécies, sendo que a bursa envolve toda a cauda em ambas.

*Pratylenchus zeae* (Figuras 9 A e B) e *P. penetrans* (Figuras 10 A e B e Figuras 11 A e B) exibem três anéis na região labial (HANDOO & GOLDEN, 1989; TROCCOLI et al., 1992; LOOF, 1991). Anelações transversais incompletas na região labial, também ocorrem em *P. zeae,* conforme se observa na Figura 9 A. Essa figura, também,

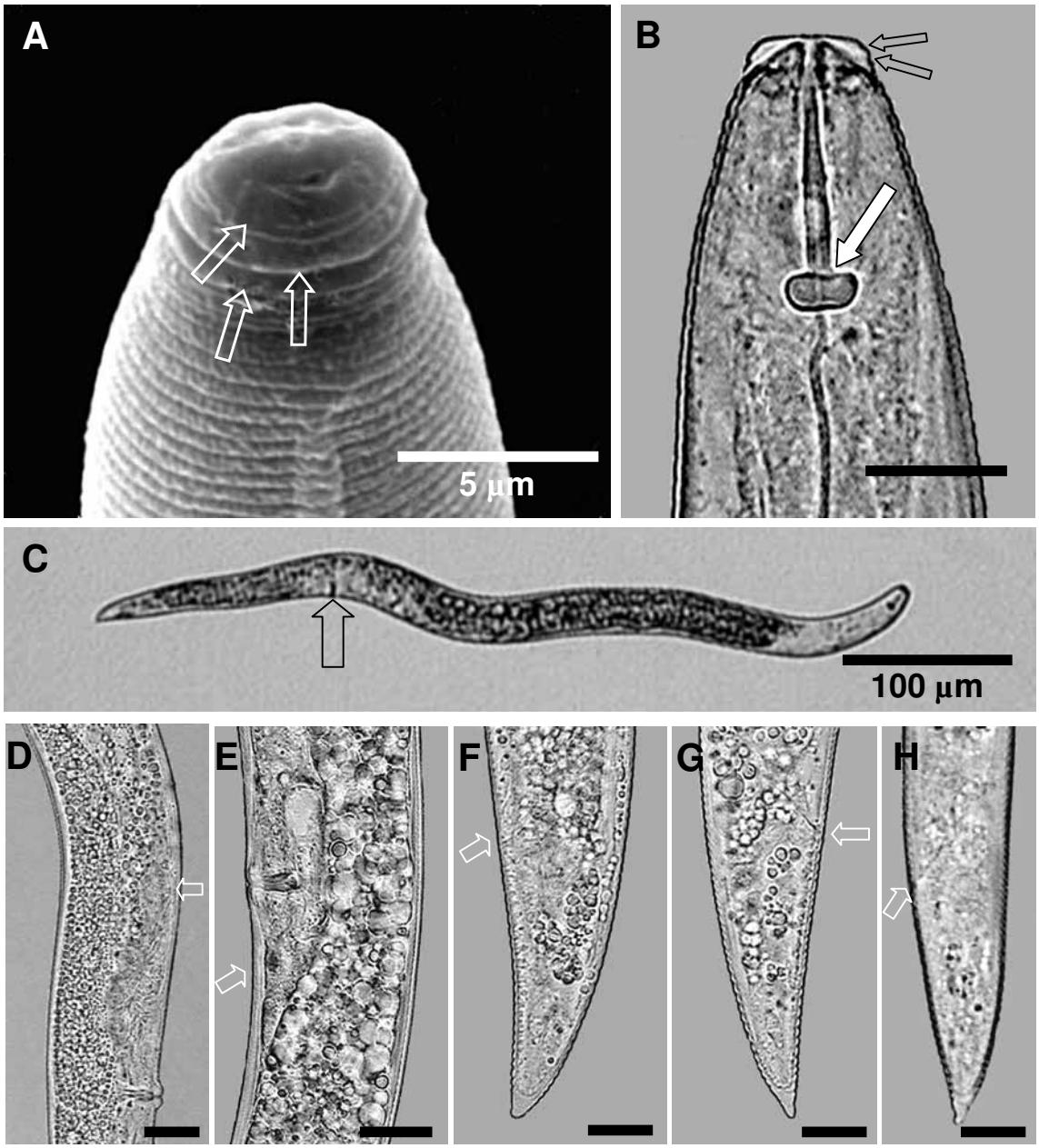



Figura 9. Principais caracteres morfológicos para identificação de *Pratylenchus zeae.* A) Eletromicrografia de varredura da região labial, com três anéis (setas), exibindo anelação incompleta no lado direito, e placa labial indivisa. B) Fotomicrografia da região anterior, exibindo duas constrições sutis (setas), denotando a presença dos três anéis. C) Fotomicrografia da fêmea, indicando a posição da vulva (seta). D) Fotomicrografia da espermateca não-funcional arredondada (seta). E) Saco pós-uterino (seta). F) Cauda subaguda com término liso predominante na espécie. G e H) Variações na forma da cauda (as setas em F - H indicam o ânus). Barras da escalas = 10 µm ou outro valor, conforme indicado.

evidencia que a placa labial de *P. zeae* é indivisa, conforme menção prévia de COBERTT & CLARK (1983). A presença de três anéis na região labial, quando o espécime é observado ao microscópio óptico composto, é denotada por duas constrições nos lados da região labial (Figura 9 B). O achatamento na porção superior dos nódulos basais do estilete, como ilustrado nessa figura (seta cheia), é considerado um caráter morfológico importante da espécie (LOOF, 1991). Entretanto, a posição mais anterior da vulva (Figura 9 C), comparada às demais espécies incluídas nesse estudo, é o caráter diagnóstico mais marcante na espécie.

A espermateca em *P. zeae* não é funcional (Figura 9 D). De fato, FORTUNER (1976) considera-a pequena e sem espermas, mesmo numa subpopulação que exibia alguns machos. Com efeito, machos de *P. zeae* são extremamente raros. Citando MERNY (1970), o autor mencionou que, até aquela época, machos dessa espécie haviam sido observados somente uma vez, em uma subpopulação coletada na Costa do Marfim. O saco pós-uterino nessa espécie (Figura 9 E) é considerado curto (FORTUNER, 1976). Entretanto, TROCCOLI et al. (1996) observaram que o comprimento dessa estrutura foi consideravelmente variável.

A forma predominante da cauda nas subpopulações de *P. zeae* examinadas no presente estudo é subaguda com término liso (Figura 9 F), confirmando a opinião de FORTUNER (1976) e LOOF (1991). Todavia, foram encontradas menções às variações nesse caráter (ROMAN & HIRSCHMANN, 1969; FORTUNER, 1976). De fato, no presente estudo, variações na forma da cauda também foram documentadas (Figuras 9 G e H).

A região labial de *P. penetrans* é ligeiramente distinta do corpo (“set off”), como ilustrado nas Figuras 10 B e 11 A e B. Essa conformação da região labial da espécie é aceita por diferentes pesquisadores (CORBETT, 1973; TROCCOLI et al., 1992; KARSSEN et al., 2001). Predominantemente, a região labial de *P. penetrans* exibe três anéis, conforme ilustrado nas figuras mencionadas e, notadamente, nas ilustrações obtidas ao MEV (Figuras 10 A e 11 B), coincidindo com os relatos de outras fontes (CORBETT, 1973; TOWNSHEND, 1991; LOOF, 1991). Estudando uma subpopulação desse nematóide coletada na Holanda, KARSSEN et al. (2001)

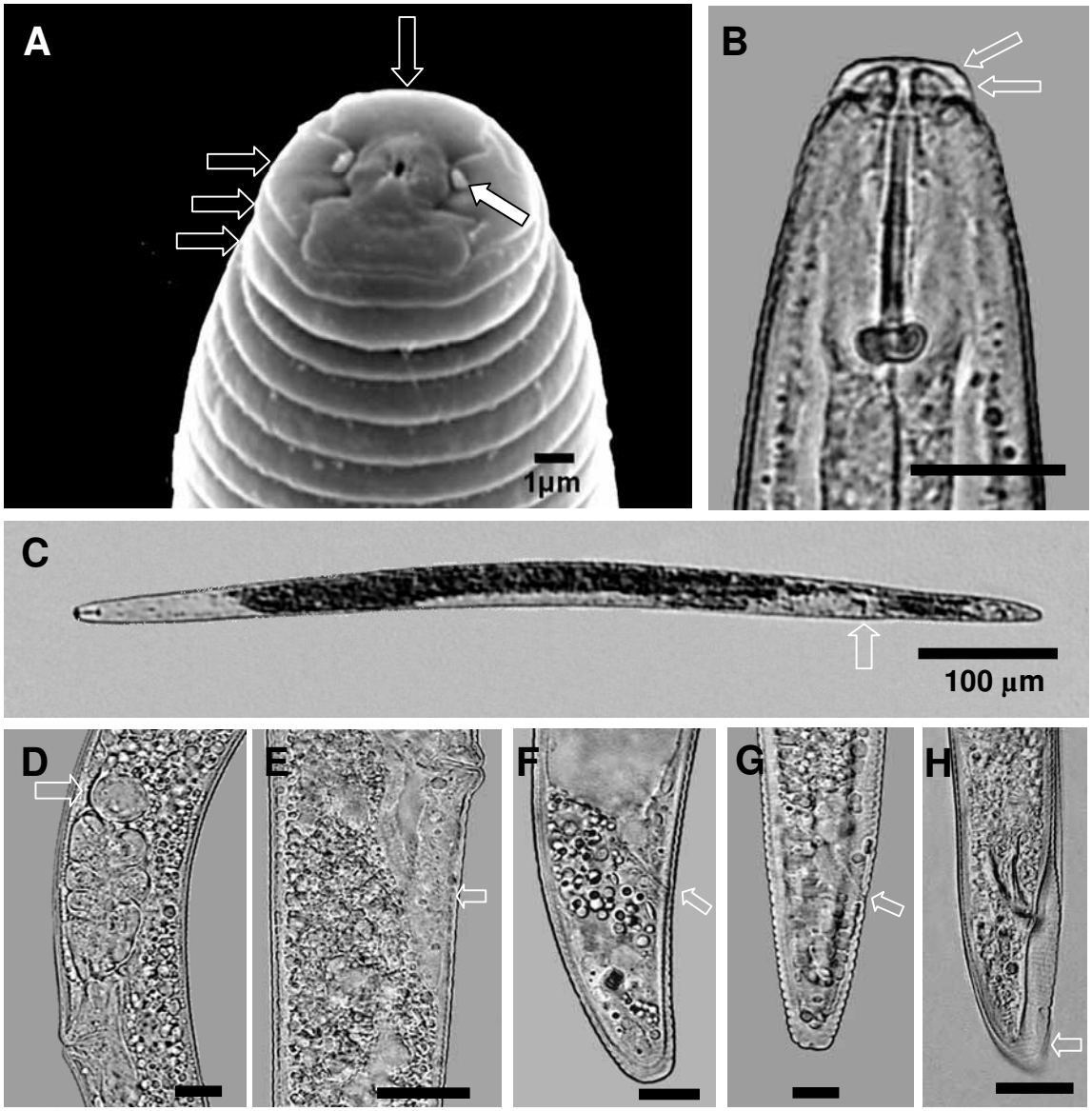



Figura 10. Principais caracteres morfológicos para identificação de *Pratylenchus penetrans.* A) Eletromicrografia de varredura da região labial da fêmea, com três anéis (setas), e placa labial em forma de "H" (seta). A seta cheia indica a abertura anfidial. B) Fotomicrografia da extremidade anterior, exibindo a região labial distinta do corpo, com duas constrições sutis nos lados (setas), indicando os três anéis. C) Fotomicrografia da fêmea, indicando a posição da vulva (seta). D) Fotomicrografia da espermateca funcional arredondada (seta). E) Saco pós-uterino (seta). F) Cauda cônica com término liso. G) Variação na forma da cauda com término crenado (a seta em ambas indica o ânus). H) Região posterior do macho com a bursa envolvendo toda a cauda (seta). Barras da escalas = 10 µm ou outro valor, conforme indicado.

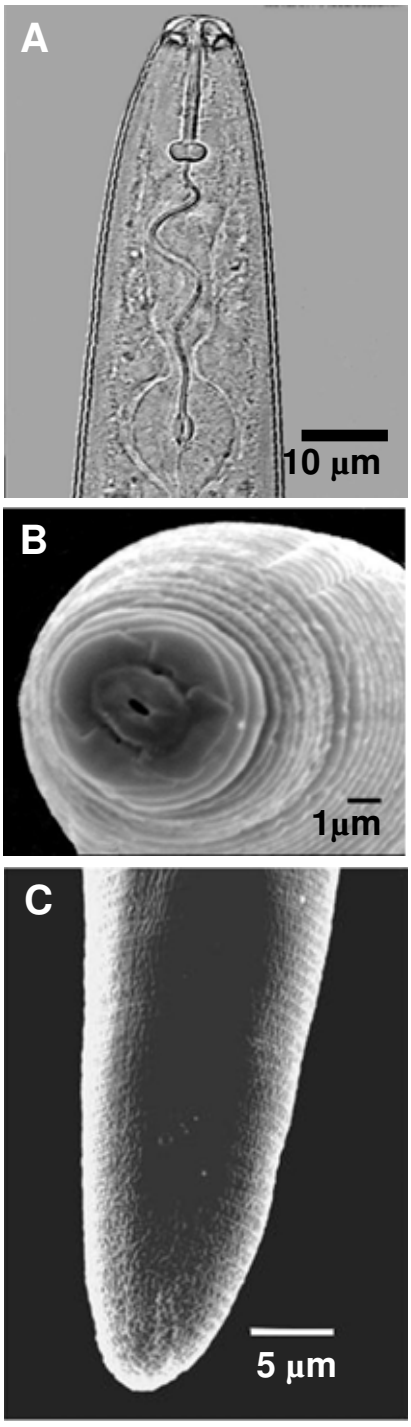



Figura 11. Caracteres morfológicos suplementares para identificação de *Pratylenchus penetrans*. A e B) Fotomicrografia e eletromicrografia de varredura, respectivamente, da região labial distinta do corpo. C) Eletromicrografia de varredura da cauda cônica.

observaram uma variação de dois a quatro anéis na região labial. No entanto, os autores atribuíram essa variação às anelações transversais incompletas nessa porção do corpo do nematóide. TOWNSHEND (1991) também observou esse fato e, no presente estudo, anelação incompleta, resultando em variação no número de anéis na região labial de *P. penetrans*, embora em menor número, também foi observada (Figura 8 A).

A posição da vulva de *P. penetrans* não é um caráter diagnóstico relevante para a identificação do nematóide. Ao microscópio óptico composto, não se nota diferença marcante desse caráter em relação a *P. coffeae* (Figura 6 C) e *P. jaehni* (Figura 7 C). Em relação a *P. brachyurus* (Figura 5 D) e *P. zeae* (Figura 9 C), a vulva de *P. penetrans* ocupa uma posição visivelmente intermediária.

Quanto à espermateca de *P. penetrans*, a maioria dos autores reconhecem-na como funcional e arredondada (CORBETT, 1973; LOOF, 1991; TROCCOLI et al., 1992), como documentado no presente estudo (Figura 10 D). Variação na forma dessa estrutura de arredondada a ligeiramente ovalada, apontada por TARTE & MAI (1976a) e por KARSSEN et al. (2001), pode ser resultante de artefatos da preparação. Com efeito, estruturas de formas arredondadas, mesmo que apenas ligeiramente pressionadas pela lamínula, no ato da preparação, podem assumir uma forma ligeiramente ovalada. De fato, em outro estudo, TARTE & MAI (1976b) ilustraram espermatecas de *P. penetrans* arredondadas. Como as pesquisas relatadas por TARTE & MAI (1976a) e TARTE & MAI (1976b), provavelmente, foram conduzidas na mesma época, é possível que a subpopulação do nematóide utilizada em ambas tenha sido a mesma, sugerindo que a forma ovalada da espermateca de *P. penetrans* no relato de TARTE & MAI (1976a) foi, possivelmente, resultante de artefato da preparação.

O saco pós-uterino de *P. penetrans* é curto (Figura 10 E), confirmando as observações de CORBETT (1973). Elaborando uma detalhada descrição da espécie, esse autor estimou que o comprimento do saco pós-uterino desse nematóide é de 1 a 1,5 vez a largura do corpo na região da vulva. Já a forma predominante do término da cauda é cônica e lisa, como documentado no presente estudo (Figuras 10 F e 11 C), coincidindo com os relatos de diferentes autores (CORBETT, 1973; LOOF, 1991;

TOWNSHEND, 1991; TROCCOLI et al., 1992; KARSSEN et al., 2001). Porém, considerável variação foi encontrada por praticamente todas as fontes consultadas, além da que foi constatada no presente estudo (Figura 10 G), correspondente ao tipo de término cônico e crenado. Entretanto, TARTE & MAI (1976a) encontraram evidências de que o ambiente pode influenciar no tipo de término da cauda, fato confirmado por TOWNSHEND (1991).

Machos de *P. penetrans* foram abundantes na subpopulação estudada e não exibem caracteres diagnósticos relevantes para a identificação da espécie. Como ocorre em outras espécies mencionadas, a bursa envolve toda a cauda (Figura 10 H).

*Pratylenchus vulnus* tem a região labial contínua com a linha do corpo (Figura 8 B, Figuras 12 A e B e Figura 13 A). Essas mesmas ilustrações, à exceção da Figura 8 B, evidenciam a presença de três anéis na região labial desse nematóide, conforme os relatos de outras fontes (DOUCET, 1988; GAO et al., 1999). Contudo, freqüentemente, foram mencionados três ou quatro anéis (ALLEN & JENSEN, 1951; ROMAN & HIRSCHMANN, 1969; CORBETT, 1974; LOOF, 1991; ROSSI et al., 2000). Variação de dois a cinco anéis na região labial de *P. vulnus* também foi relatada por DOUCET et al. (1998). No presente estudo, também foi documentada, ao MEV, a região labial de uma fêmea com dois anéis (Figura 8 B). Essas variações no número de anéis na região labial podem resultar da supressão de anéis ou da presença de anelação incompleta (Figura 8 B), da presença de anéis adicionais (DOUCET et al., 1998) e, ainda, da possibilidade de erro na determinação do número de anéis. Com efeito, conforme ilustrado nas Figuras 12 A e 13 A, o disco labial, assinalado com setas sólidas em ambas, não deve ser contado como um anel a mais na região labial. Ao microscópio óptico composto, os três anéis na região labial de *P. vulnus* são denotados pela presença de duas constrições sutis (setas), como indicado na Figura 12 B. Em alguns casos, os próprios anéis são evidentes (Figura 13 A).

A abertura anfidial em *P. vulnus* (Figura 8 B, seta sólida), em relação às outras espécies incluídas no estudo, é visivelmente maior e arredondada. HERNÁNDEZ et al. (2001) já haviam feito menção a esse fato e, inclusive, o ilustraram. Comparando a abertura anfidial de *P. vulnus* com a de *P. penetrans*, esses autores mencionaram que,

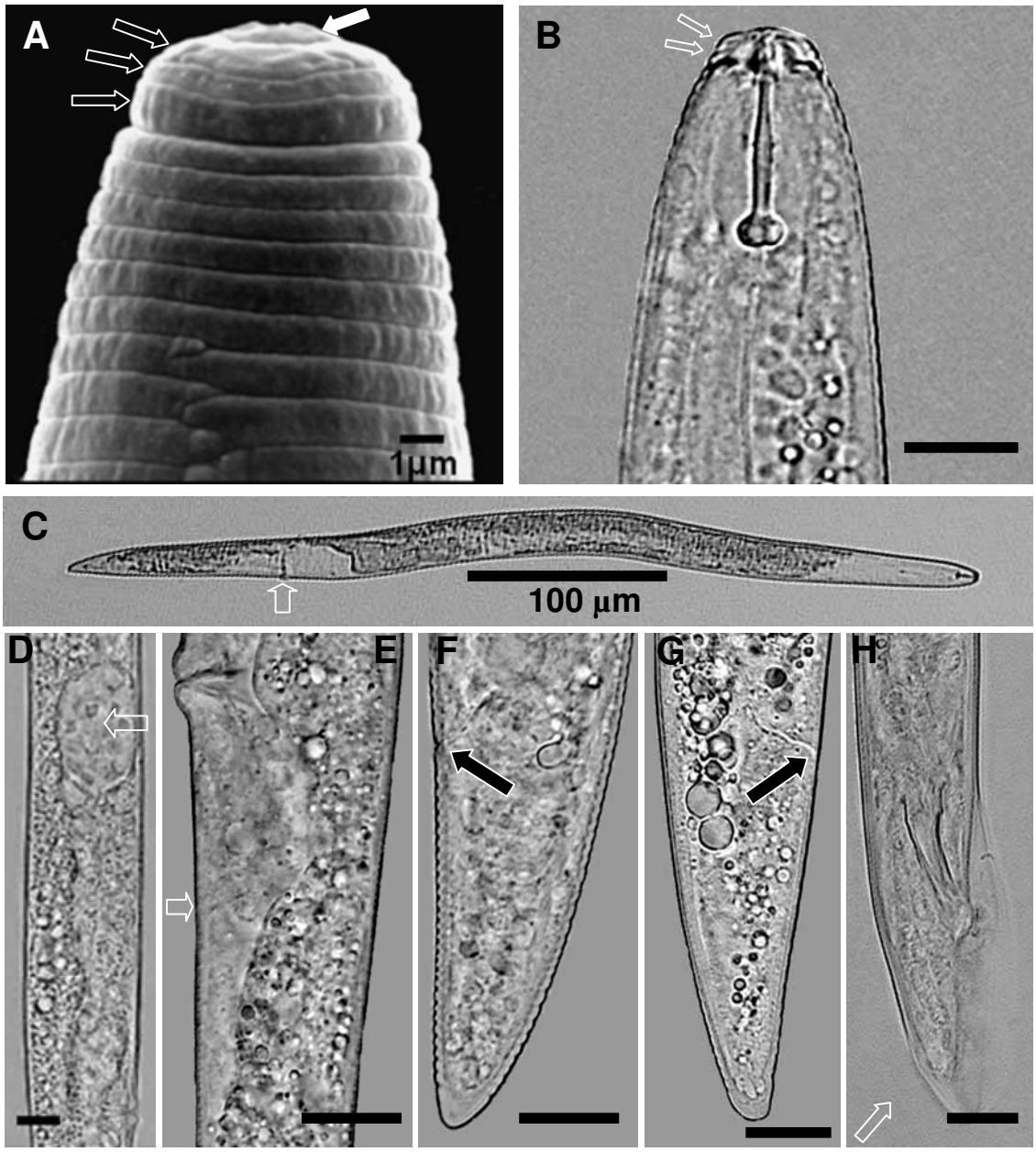



Figura 12. Principais caracteres morfológicos para identificação de *Pratylenchus vulnus.* A) Eletromicrografia de varredura da região labial da fêmea contínua à linha do corpo, exibindo três anéis (setas) e o disco labial (seta cheia). B) Fotomicrografia da extremidade anterior do corpo, indicando os três anéis (setas). C) Fotomicrografia da fêmea indicando a posição da vulva (seta). D) Fotomicrografia da espermateca funcional oblonga (seta). E) Saco pós-uterino (seta). F) Cauda subaguda com término liso. G) Variação na forma da cauda (a seta em ambas indica o ânus). H) Região posterior do macho, com a bursa envolvendo toda a cauda (seta). Barras da escalas = 10 µm ou outro valor, conforme indicado.

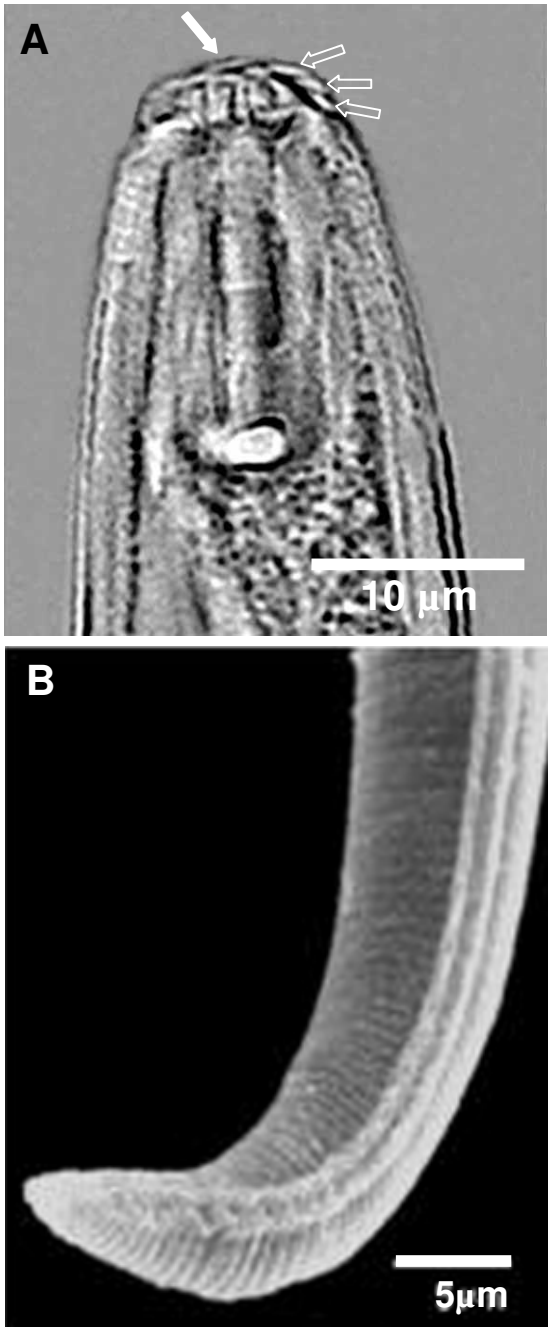



Figura 13. Caracteres morfológicos suplementares para identificação de *Pratylenchus vulnus*. A) Fotomicrografia dos três anéis, na região labial (setas vazias), e disco labial distinto (seta cheia). B) Eletromicrografia de varredura da cauda subaguda.

em *P. penetrans*, essa estrutura é menor que em *P. vulnus* e ligeiramente oblíqua, conforme observado no presente estudo (Figuras 8 A e 10 A).

Em *P. vulnus*, a posição da vulva (Figura 12 C) não é um caráter diagnóstico relevante. A espermateca funcional oblonga (Figura 12 D), por sua vez, é considerada um importante caráter taxonômico para a espécie (ROMAN & HIRSCHMANN, 1969; CORBETT, 1974; MISUKUBO, 1990; LOOF, 1991; DOUCET & LAX, 1997; GAO et al., 1999). O comprimento do saco pós-uterino é estimado em duas vezes a largura do corpo na região da vulva (Figura 12 E), coincidindo com a opinião de CORBETT (1974) e correspondendo à maior dimensão dessa estrutura, entre as espécies incluídas no presente estudo. A diferenciação celular dessa estrutura, mencionada por outros autores (CORBETT, 1974; LOOF, 1991) não foi observada na subpopulação incluída neste estudo nem nas seis subpopulações do nematóide coletadas em cinco países e estudadas por DOUCET et al.(1996), assim como no estudo de outra subpopulação da espécie (DOUCET & LAX, 1997).

Conquanto não tenha sido documentado no presente estudo, CORBETT (1974) mencionou que, em *P. vulnus*, a faixa central dos campos laterais é mais estreita que as duas laterais. KARSSEN et al. (2001) ilustraram os campos laterais de *P. penetrans,* ao MEV, exibindo a faixa central com aproximadamente a mesma largura que as laterais.

A forma da cauda de *P. vulnus* é considerada um importante caráter taxonômico para a espécie. A cauda subaguda com término liso, como ilustrado nas Figuras 12 F e 13 B, é considerada o padrão da espécie (CORBETT, 1974; GAO et al., 1999). Entretanto, ocorre considerável variação (Figura 12 G), além das muitas outras ilustradas por MIZUKUBO (1990) e das mencionadas por CORBETT (1974). Além disso, as diferentes fontes não utilizam a mesma linguagem para elaborar suas descrições das diferentes estruturas e, por si só, esse fato redunda em discrepâncias nas descrições apresentadas. Isso é confirmado pelas ilustrações contidas nas publicações que, tendo a forma semelhante, são descritas com diferentes termos.

Por tratar-se de uma espécie anfimítica, os machos cuja bursa envolve toda a cauda, são abundantes nas subpopulações de *P. vulnus* e não contêm caracteres morfologicamente importantes para o reconhecimento da espécie (Figura 12 H).

### 4.3. Estudo Morfométrico das Seis Espécies de *Pratylenchus*

A análise dos dados relativos às 19 variáveis resultantes das mensurações diretas e contagem, e também das seis variáveis derivadas das seis espécies incluídas neste estudo, foi discutida para as espécies distribuídas em dois grupos. No primeiro grupo, foram incluídas as espécies com dois anéis na região labial, a saber: *P. brachyurus*, *P.* coffeae e *P. jaehni.* No segundo grupo, ficaram as espécies com três ou mais anéis: *P. zeae, P. penetrans* e *P. vulnus.*

As Tabelas 4; 5 e 6 contêm os dados relativos às espécies do Grupo 1. As variáveis V % e o comprimento do estilete, nas três espécies do grupo, nessa ordem, apresentaram os menores coeficientes de variação (CV), confirmando relatos anteriores sobre a estabilidade desses caracteres entre as espécies de *Pratylenchus* (ROMAN & HIRSCHMANN, 1969; CAFÉ FILHO & HUANG, 1988; LÓPEZ & SALAZAR, 1988; TROCCOLI et al., 1996). A largura da região labial também apresentou um baixo CV para as espécies estudadas, confirmando a importância dessa variável para a taxonomia de *Pratylenchus* spp. (ROMAN & HIRSCHMANN, 1969; MIZUKUBO, 1990).

Os dados morfométricos relativos à subpopulação partenogenética obtida de plantas de soja coletadas no Município de Campo Florido – MG, e as ilustrações da Figura 5 confirmam tratar-se de *P. brachyurus*. As fêmeas apresentam o comprimento do estilete 20,3 µm (19,4 e 21,6) e o valor de V %= 85,7 (82,3 e 88,0), conforme os dados da Tabela 4. A análise morfológica evidenciou que a região labial é angulosa, com dois anéis, placa labial indivisa, nódulos basais do estilete esféricos, espermateca não-funcional, e término da cauda hemisférico e liso, além da ausência de machos (Figura 5), enquadrando-se na descrição da população topotipo de *P. brachyurus* (CORBETT, 1976). As demais variáveis morfométricas incluídas na Tabela 4 foram menos importantes para identifIcação da espécie que as duas mencionadas.

Os dados morfométricos relativos à subpopulação do nematóide obtida de raízes de gravioleira coletadas no Estado de Pernambuco são apresentados na Tabela 5. Trata-se de uma subpopulação anfimítica, com abundante presença de machos, as fêmeas possuem placa labial indivisa, dois anéis na região labial, espermateca arredondada e funcional, cauda truncada, endentada ou subemisférica com término liso (Figura 6), conforme as características descritas para *P. coffeae* (SIDDIQI, 1972). De acordo com os dados da Tabela 5, o comprimento do estilete foi de 16,4 µm (15,4 – 17,8), V% = 80,8 (78,6 – 83,2) e "a" = 24,7 (21,2 – 27,7). De acordo com INSERRA et al. (2001) e CAMPOS (2002), também, esses dados caracterizam a população de *P. coffeae*.

Tabela 4. Mensurações em µm e variáveis derivadas para 15 fêmeas da subpopulação de *Pratylenchus brachyurus* coletada em raízes de soja (*Glycine max*), no Município de Campo Florido – MG, e multiplicada em cilindros de cenoura.

| Caracteres | Amplitude | Média | Erro padrão da média | Desvio padrão | Coeficiente de variação |
|---|---|---|---|---|---|
| Comprimento do corpo | 585,6 - 707,0 | 663,9 | 10,2 | 39,5 | 6,0 |
| Distância da região labial à vulva | 500,5 - 622,3 | 568,9 | 8,8 | 34,1 | 6,0 |
| Largura da região labial | 8,3 - 9,5 | 9,1 | 0,1 | 0,3 | 3,3 |
| Altura da região labial | 3,9 - 4,6 | 4,3 | 0,1 | 0,2 | 4,8 |
| Comprimento do estilete | 19,4 - 21,6 | 20,3 | 0,2 | 0,6 | 2,9 |
| Largura do nódulo do estilete | 4,5 - 5,4 | 4,9 | 0,1 | 0,3 | 5,7 |
| Altura do nódulo do estilete | 3,4 - 3,9 | 3,7 | 0,0 | 0,1 | 3,4 |
| DGO | 2,7- 3,4 | 3,1 | 0,1 | 0,2 | 7,5 |
| Região labial ao poro excretor | 80,5 - 114,0 | 102,0 | 2,6 | 10,1 | 9,9 |
| Comprimento do esôfago | 60,1 - 84,5 | 73,2 | 1,8 | 6,8 | 9,3 |
| Sobreposição ao intestino | 54,6 - 79,8 | 64,1 | 2,0 | 7,9 | 12,3 |
| Maior largura do corpo | 29,4 - 37,0 | 33,4 | 0,6 | 2,3 | 6,9 |
| Largura do corpo na vulva | 21,0 - 29,9 | 24,5 | 0,7 | 2,6 | 10,7 |
| Comprimento do saco pós-uterino | 18,7 - 36,5 | 27,5 | 1,6 | 6,2 | 22,6 |
| Distância da vulva ao ânus | 40,1 - 79,2 | 59,5 | 2,5 | 9,8 | 16,5 |
| Largura do corpo no ânus | 13,2 - 21,3 | 17,4 | 0,7 | 2,6 | 14,9 |
| Comprimento da cauda | 21,3 - 41,1 | 34,2 | 1,3 | 4,9 | 14,4 |
| Número de anéis na cauda | 18,0 - 22,0 | 19.3 | 0.3 | 1.1 | 5.8 |
| Proporções | | | | | |
| Largura/Altura da região labial | 2,0 - 2,4 | 2,1 | 0,0 | 0,1 | 5,5 |
| a | 18,4 - 23,0 | 19,9 | 0,3 | 1,2 | 6,2 |
| b | 7,4 - 11,5 | 9,2 | 0,3 | 1,1 | 12,2 |
| c | 14,2 - 28,4 | 19,9 | 0,9 | 3,5 | 17,4 |
| c' | 1,6 - 2,6 | 2,0 | 0,1 | 0,3 | 13,6 |
| Percentagem | | | | | |
| V% | 82,3 - 88,0 | 85,7 | 0,4 | 1,4 | 1,6 |

Tabela 5. Mensurações em µm e variáveis derivadas para 15 fêmeas da subpopulação de *Pratylenchus coffeae* coletada em raízes de graviola (*Anona muricata*), no Estado de Pernambuco, e multiplicada em cilindros de cenoura.

| Caracteres | Amplitude | Média | Erro padrão da média | Desvio padrão | Coeficiente de variação |
|---|---|---|---|---|---|
| Comprimento do corpo | 577,5 - 762,2 | 676,0 | 16,8 | 65,2 | 9,6 |
| Distância da região labial à vulva | 459,8 - 613,4 | 546,4 | 14,0 | 54,2 | 9,9 |
| Largura da região labial | 7,5 - 8,8 | 7,9 | 0,1 | 0,3 | 4,2 |
| Altura da região labial | 1,6 - 2,4 | 2,0 | 0,1 | 0,2 | 11,4 |
| Comprimento do estilete | 15,4 - 17,8 | 16,4 | 0,2 | 0,6 | 3,6 |
| Largura do nódulo do estilete | 3,8 - 4,8 | 4,1 | 0,1 | 0,3 | 7,5 |
| Altura do nódulo do estilete | 2,4 - 3,0 | 2,8 | 0,1 | 0,2 | 7,8 |
| DGO | 3,0 - 4,1 | 3,6 | 0,1 | 0,3 | 9,5 |
| Região labial ao poro excretor | 75,5 - 113,6 | 91,9 | 2,6 | 10,0 | 10,9 |
| Comprimento do esôfago | 61,4 - 84,0 | 69,3 | 1,8 | 6,9 | 10,0 |
| Sobreposição ao intestino | 24,1 - 65,0 | 39,9 | 3,7 | 14,4 | 36,2 |
| Maior largura do corpo | 24,1 - 31,6 | 27,4 | 0,5 | 2,0 | 7,3 |
| Distância da espermateca à vulva | 26,2 - 69,5 | 52,8 | 3,4 | 13,3 | 25,3 |
| Largura do corpo na vulva | 22,7 - 28,3 | 24,6 | 0,4 | 1,5 | 6,2 |
| Comprimento do saco pós-uterino | 23,4 - 43,4 | 34,7 | 1,4 | 5,4 | 15,6 |
| Distância da vulva ao ânus | 70,3 - 95,8 | 81,1 | 2,2 | 8,5 | 10,5 |
| Largura do corpo no ânus | 14,1 - 17,1 | 15,3 | 0,2 | 0,9 | 5,8 |
| Comprimento da cauda | 25,7 - 41,1 | 32,2 | 1,1 | 4,2 | 13,2 |
| Número de anéis na cauda | 17,0 - 22,0 | 19,4 | 0.4 | 1.5 | 7.5 |
| Proporções | | | | | |
| Largura/Altura da região labial | 3,4 - 4,9 | 3,9 | 0,1 | 0,4 | 10,5 |
| a | 21,2 - 27,7 | 24,7 | 0,6 | 2,3 | 9,5 |
| b | 7,0 - 11,6 | 9,9 | 0,4 | 1,6 | 15,7 |
| c | 18,1 - 25,4 | 21,2 | 0,6 | 2,3 | 10,8 |
| c' | 1,7 - 2,5 | 2,1 | 0,1 | 0,3 | 12,6 |
| Percentagem | | | | | |
| V% | 78,6 - 83,2 | 80,8 | 0,3 | 1,2 | 1,5 |

Os dados morfométricos do nematóide obtido em raízes de laranjeira [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] var. Pêra Rio, enxertada em limão-cravo (*Citrus limonia*), do Município de Palestina - SP (Tabela 6), e as ilustrações da Figura 7 evidenciam que essa subpopulação pertence a *P. jaehni*. De fato, conforme mencionado por INSERRA et al. (2001) e CAMPOS (2002), os valores médios do comprimento do estilete, da altura dos nódulos basais do estilete e da posição da vulva (V%) são menores em *P. jaehni* que em *P. coffeae*. Conforme os dados da Tabela 6, o comprimento do estilete foi de 15,5 µm (14,8 – 16,1), a altura dos nódulos basais de 2,3 µm (2,0 – 2,7) e V% = 78,8 (75,3 – 81,8). Esses dados então em conformidade com a descrição de *P. jaehni*, elaborada com base em espécimes não fixados de uma subpopulação coletada em Itápolis - SP (INSERRA et al., 2001). De acordo com essa fonte, essa espécie possui estilete com comprimento médio < 15 µm, altura dos nódulos basais < 2, 7 µm, V% < 79 % e "a" < 23. A média do comprimento do estilete ligeiramente maior, obtida no presente estudo, foi atribuída à variação natural na espécie. A cauda é usualmente hemisférica ou subemisférica com término liso, embora ocorram variações, como ilustrado na Figura 7.

Conforme os dados morfológicos obtidos e ilustrados no presente estudo, *P. brachyurus* é facilmente separado de *P. coffeae* e de *P. jaehni* pela angulosidade da região labial, nódulos basais do estilete maciço e arredondados, ausência usual de machos na população e fêmeas desprovidas de espermateca funcional. A população de *P. coffeae* pode ser distinguida da de *P. jaehni* pela predominância de cauda truncada em *P. coffeae,* enquanto em *P. jaehni* predomina cauda hemisférica com término liso. As análises dos dados morfométricos relativos ao comprimento do estilete, altura dos nódulos basais, valor de V% e do parâmetro "a" confirmam o reconhecimento de cada uma dessas espécies.

No presente estudo, o número médio de anéis na cauda da subpopulação de *P. coffeae* foi de 19,4, variando entre 17 e 22 anéis (Figura 6 F e G), coincidindo com os dados obtidos anteriormente por COBERTT & CLARK (1983). Para *P. jaehni* o valor médio dessa variável foi de 17,2 anéis, variando de 15 a 19 anéis. Essa variável ainda não havia sido determinada para *P. jaehni* e pode ser útil no processo de separação entre essas duas espécies.

Tabela 6. Mensurações em µm e variáveis derivadas para 15 fêmeas da subpopulação de *Pratylenchus jaehni* coletada em raízes de laranjeira (*Citrus sinensis*), enxertada em limão-cravo (*C. limonia*), no Município de Palestina – SP, e multiplicada em cilindros de cenoura.

| Caracteres | Amplitude | Média | Erro padrão da Média | Desvio padrão | Coeficiente de variação |
|---|---|---|---|---|---|
| Comprimento do corpo | 514,7 - 638,9 | 586,8 | 10,8 | 41,9 | 7,1 |
| Distância da região labial à vulva | 400,8 - 510,7 | 461,7 | 8,9 | 34,5 | 7,5 |
| Largura da região labial | 7,4 - 9,5 | 8,4 | 0,1 | 0,5 | 6,1 |
| Altura da região labial | 2,0 - 2,7 | 2,3 | 0,1 | 0,2 | 9,8 |
| Comprimento do estilete | 14,8 - 16,1 | 15,5 | 0,1 | 0,4 | 2,8 |
| Largura do nódulo do estilete | 3,5 - 4,4 | 4,0 | 0,1 | 0,3 | 7,4 |
| Altura do nódulo do estilete | 2,0 - 2,7 | 2,3 | 0,1 | 0,2 | 8,5 |
| DGO | 2,5 - 3,7 | 3,1 | 0,1 | 0,3 | 10,1 |
| Região labial ao poro excretor | 65,1 - 97,4 | 86,3 | 2,2 | 8,4 | 9,7 |
| Comprimento do esôfago | 58,8 - 85,4 | 70,3 | 1,8 | 7,3 | 10,3 |
| Sobreposição ao intestino | 35,0 - 52,3 | 45,0 | 1,4 | 5,3 | 11,7 |
| Maior largura do corpo | 21,1 - 31,6 | 26,5 | 0,7 | 2,9 | 10,8 |
| Distância da espermateca à vulva | 34,7 - 68,2 | 51,9 | 2,8 | 10,7 | 20,6 |
| Largura do corpo na vulva | 19,3 - 26,9 | 22,6 | 0,6 | 2,5 | 10,9 |
| Comprimento do saco pós-uterino | 18,4 - 38,4 | 28,7 | 1,4 | 5,6 | 19,5 |
| Distância da vulva ao ânus | 72,0 - 103,1 | 85,6 | 2,3 | 8,8 | 10,2 |
| Largura do corpo no ânus | 12,2 - 19,7 | 15,9 | 0,6 | 2,4 | 14,9 |
| Comprimento da cauda | 24,3 - 34,4 | 28,2 | 0,7 | 2,7 | 9,5 |
| Número de anéis na cauda | 15,0 - 19,0 | 17,2 | 0.4 | 1.4 | 8,0 |
| Proporções | | | | | |
| Largura/Altura da região labial | 3,0 - 4,3 | 3,7 | 0,1 | 0,3 | 8,7 |
| a | 18,0 - 24,4 | 22,3 | 0,4 | 1,7 | 7,4 |
| b | 7,3 - 9,4 | 8,4 | 0,2 | 0,7 | 8,1 |
| c | 17,4 - 23,9 | 21,0 | 0,6 | 2,3 | 10,8 |
| c' | 1,3 - 2,4 | 1,8 | 0,1 | 0,3 | 16,2 |
| Percentagem | | | | | |
| V% | 75,3 - 81,8 | 78,8 | 0,4 | 1,4 | 1,8 |

Entre as espécies do Grupo 2, exibindo três ou mais anéis na região labial, também, uma das espécies é partenogenética, sendo os machos muito raros, e as outras duas são anfimíticas. Com efeito, na subpopulação obtida de raízes de plantas de milho coletadas no Município de Luís Eduardo Magalhães – BA, o comprimento do corpo das fêmeas foi de 621,4 µm (561,5 – 673,2), e o valor de V% foi o menor entre as espécies incluídas no estudo [V% = 71,3 (69,9 – 72,7)], conforme consta na Tabela 7. Não houve sobreposição do valor dessa variável entre essa subpopulação e nenhuma das outras espécies incluídas no estudo. As fêmeas apresentam três anéis na região labial indivisa (Figura 9 A), comprimento médio do estilete de 16,8 µm (16,1 – 17,5), conforme os dados da Tabela 7, espermateca não-funcional arredondada (Figura 9 D) e o término da cauda subagudo e liso com variações (Figuras 9 F – H), enquadrando a subpopulação em *P. zeae* (FORTUNER, 1976). Além disso, o valor do CV para a variável V% foi de apenas 1,3 nessa espécie, sendo o menor valor entre todas as incluídas na pesquisa, indicando a importância desse caráter para a identificação de *P. zeae*.

O número de anéis na cauda foi também o mais estável entre as seis espécies analisadas, com uma média de 22,5 anéis (21 – 24) e CV de 3,3 (Tabela 7), coincidindo com relatos prévios para essa variável em *P. zeae* (TROCCOLI et al., 1996; DOUCET & CAGNOLO, 1998). Esses dados confirmam que o número de anéis na cauda de *P. zeae* também é um parâmetro estável e pode auxiliar na identificação dessa espécie. Como no caso do Grupo 1, a separação de *P. zeae* das outras duas espécies do grupo é muito mais fácil. Isso porque essa espécie é partenogenética (machos raros), e o valor de V% é o menor entre as espécies. A separação de *P. penetrans* de *P. vulnus*, no entanto, requer dados adicionais.

As mensurações e variáveis derivadas de fêmeas da subpopulação anfimítica obtida de raízes de plantas de lírio coletadas no Município de Araxá - MG (Tabela 8) e as ilustrações das Figuras 10 e 11 confirmam que a subpopulação pertence a *P. penetrans.* Entre as variáveis morfométricas mais importantes para a identificação da espécie incluem-se o comprimento do estilete com média de 17,2 µm (16,2 – 18,3), V % = 80, 7 (76,0 – 82,7), a largura da região labial de 9,2 µm (8,4 – 9,8), o comprimento do

Tabela 7. Mensurações em µm e variáveis derivadas para 15 fêmeas da subpopulação de *Pratylenchus zeae* coletada em raízes de milho (*Zea mays*), no Município de Luís Eduardo Magalhães - BA ,e multiplicada em cilindros de cenoura.

| Caracteres | Amplitude | Média | Erro padrão da média | Desvio padrão | Coeficiente de variação |
|---|---|---|---|---|---|
| Comprimento do corpo | 561,5 - 673,2 | 621,4 | 10,3 | 40,0 | 6,4 |
| Distância da região labial à vulva | 395,5 - 477,4 | 422,9 | 7,3 | 28,3 | 6,4 |
| Largura da região labial | 8,2 - 9,6 | 9,0 | 0,1 | 0,4 | 4,1 |
| Altura da região labial | 2,3 - 2,6 | 2,4 | 0,0 | 0,1 | 3,6 |
| Comprimento do estilete | 16,1 - 17,5 | 16,8 | 0,1 | 0,4 | 2,4 |
| Largura do nódulo do estilete | 4,5 - 5,6 | 5,1 | 0,1 | 0,3 | 6,3 |
| Altura do nódulo do estilete | 2,6 - 3,1 | 2,8 | 0,0 | 0,2 | 5,4 |
| DGO | 2,6 - 3,1 | 2,9 | 0,0 | 0,2 | 5,6 |
| Região labial ao poro excretor | 81,9 - 110,5 | 96,7 | 2,0 | 7,7 | 8,0 |
| Comprimento do esôfago | 63,9 - 103,2 | 74,2 | 2,7 | 10,5 | 14,2 |
| Sobreposição ao intestino | 31,3 - 59,8 | 46,6 | 2,5 | 9,8 | 21,1 |
| Maior largura do corpo | 25,7 - 32,7 | 29,2 | 0,6 | 2,4 | 8,2 |
| Distância da espermateca à vulva | 38,0 - 63,1 | 51,5 | 1,8 | 7,0 | 13,6 |
| Largura do corpo na vulva | 22,3 - 30,0 | 27,0 | 0,6 | 2,2 | 8,3 |
| Comprimento do saco pós-uterino | 23,7 - 47,8 | 30,9 | 1,8 | 6,9 | 22,3 |
| Distância da vulva ao ânus | 108,3 - 155,1 | 136,7 | 3,1 | 12,0 | 8,8 |
| Largura do corpo no ânus | 13,9 - 18,9 | 16,0 | 0,4 | 1,4 | 9,0 |
| Comprimento da cauda | 32,4 - 44,4 | 36,8 | 0,6 | 2,4 | 6,4 |
| Número de anéis na cauda | 21,0 - 24,0 | 22,5 | 0.2 | 0.7 | 3.3 |
| Proporções | | | | | |
| Largura/Altura da região labial | 3,3 - 4,0 | 3,7 | 0,0 | 0,2 | 4,8 |
| a | 19,6 - 24,7 | 21,3 | 0,3 | 1,2 | 5,7 |
| b | 6,4 - 9,2 | 8,4 | 0,2 | 0,7 | 8,8 |
| c | 15,2 - 19,8 | 17,0 | 0,4 | 1,4 | 8,2 |
| c' | 1,9 - 2,6 | 2,3 | 0,0 | 0,2 | 7,2 |
| Percentagem | | | | | |
| V% | 69,9 - 72,7 | 71,3 | 0,2 | 1,0 | 1,3 |

Tabela 8. Mensurações em µm e variáveis derivadas para 15 fêmeas da subpopulação de *Pratylenchus penetrans* coletada em raízes de lírio (*Lilium tennifolium*), no Município de Araxá – MG, e multiplicada em cilindros de cenoura.

| Caracteres | Amplitude | Média | Erro padrão da média | Desvio padrão | Coeficiente de variação |
|---|---|---|---|---|---|
| Comprimento do corpo | 583,0 - 778,1 | 708,0 | 15,4 | 59,5 | 8,4 |
| Distância da região labial à vulva | 481,6 - 640,5 | 571,0 | 12,4 | 47,8 | 8,4 |
| Largura da região labial | 8,4 - 9,8 | 9,2 | 0,1 | 0,3 | 3,4 |
| Altura da região labial | 2,2 - 2,9 | 2,5 | 0,1 | 0,2 | 8,8 |
| Comprimento do estilete | 16,2 - 18,3 | 17,2 | 0,2 | 0,7 | 3,9 |
| Largura do nódulo do estilete | 4,0 - 5,1 | 4,5 | 0,1 | 0,3 | 7,0 |
| Altura do nódulo do estilete | 2,4 - 3,0 | 2,7 | 0,1 | 0,2 | 8,3 |
| DGO | 2,5 - 3,7 | 3,1 | 0,1 | 0,3 | 11,2 |
| Região labial ao poro excretor | 85,7 - 118,1 | 106,9 | 2,9 | 11,4 | 10,7 |
| Comprimento do esôfago | 66,3 - 95,7 | 81,4 | 2,0 | 7,6 | 9,3 |
| Sobreposição ao intestino | 35,9 - 68,1 | 49,3 | 2,6 | 10,1 | 20,4 |
| Maior largura do corpo | 26,0 - 35,1 | 31,9 | 0,7 | 2,8 | 8,8 |
| Distância da espermateca à vulva | 40,0 - 80,2 | 55,7 | 3,0 | 11,6 | 20,8 |
| Largura do corpo na vulva | 22,8 - 31,4 | 28,3 | 0,7 | 2,9 | 10,1 |
| Comprimento do saco pós-uterino | 24,0 - 44,9 | 32,7 | 1,6 | 6,0 | 18,4 |
| Distância da vulva ao ânus | 68,3 - 115,3 | 97,2 | 3,5 | 13,5 | 13,9 |
| Largura do corpo no ânus | 15,0 - 20,3 | 18,1 | 0,4 | 1,6 | 8,9 |
| Comprimento da cauda | 28,0 - 39,9 | 33,9 | 1,0 | 3,8 | 11,3 |
| Número de anéis na cauda | 15,0 - 22,0 | 19,5 | 0.5 | 2.1 | 10.6 |
| Proporções | | | | | |
| Largura/Altura da região labial | 3,2 - 4,2 | 3,6 | 0,1 | 0,3 | 8,9 |
| a | 19,4 - 23,6 | 22,2 | 0,3 | 1,0 | 4,7 |
| b | 7,6 - 9,6 | 8,7 | 0,2 | 0,6 | 7,0 |
| c | 18,1 - 23,9 | 21,0 | 0,4 | 1,5 | 7,1 |
| c' | 1,6 - 2,1 | 1,9 | 0,0 | 0,1 | 7,3 |
| Percentagem | | | | | |
| V% | 76,0 - 82,7 | 80,7 | 0,5 | 2,0 | 2,5 |

saco pós-uterino de 32,7 µm (24,0 – 44,9) e o número de anéis na cauda de 19,5 (15 – 22), apresentados na Tabela 8, os quais estão de acordo com relatos anteriores (SEINHORST, 1968; CORBETT, 1973). As fêmeas apresentam três anéis na região labial (Figuras 10 A e B, 11 B e 8 A). Esta é distinta do corpo (Figuras 10 B e 11 A e B) e exibe a placa labial em forma de "H", com lábios laterais em forma de sino (Figuras 10 A, 11 B e 8 A), coincidindo com relatos de outras fontes (COBERTT & CLARK, 1983; HERNÁNDEZ, et al., 2001; KARSSEN et al., 2001).

A maioria dos espécimes analisados apresentou a cauda cônica com término liso (Figura 10 F). Entretanto, também foram observados espécimes com cauda cônica e término crenado (Figura 10 G). Essa variação na cauda de *P. penetrans* já havia sido relatada (TAYLOR & JENKINS, 1957; TARTE & MAI, 1976a, b; TROCCOLI et al., 1992, KARSSEN et al., 2001).

Os dados morfométricos relativos à subpopulação anfimítica, obtida de raízes de roseira coletadas no Município de Andradas - MG (Tabela 9), e as ilustrações das Figuras 12 e 13 evidenciam que essa subpopulação pertence a *P. vulnus*. Entre as variáveis morfométricas mais importantes para a identificação dessa espécie, incluem-se o comprimento do estilete com média de 14,9 µm (14,1 – 16,2), V % = 78,2 (75,0 – 80,9), a largura da região labial de 8,5 µm (7,9 – 9,5) e o comprimento do saco pós-uterino de 43,7 µm (32,6 – 57,8), alistados na Tabela 9. Esses dados estão de acordo com relatos anteriores (ROMAN & HIRSCHMANN, 1969; CORBETT, 1974). As fêmeas, geralmente, apresentam a região labial com três anéis e contínua com a linha do corpo (Figuras 12 A e B, 13 A), e a placa labial é semelhante à de *P. penetrans*, porém com a abertura anfidial arredondada e maior que nas outras espécies em estudo (Figura 8 B). A espermateca é oblonga (Figura 12 D) e a cauda subaguda com término liso, embora haja variações (Figuras 12 F e G, 13 B), conforme relatado por CORBETT (1974).

Neste estudo, o número de anéis na cauda das fêmeas de *P. vulnus* foi 23,8 (21 – 28), semelhante aos valores relatados por outras fontes (SEINHORST, 1968; DOUCET, 1988; MIZUKUBO, 1990; DOUCET et al., 1996; DOUCET & LAX, 1997), salientando a importância desse caráter para a identificação da espécie.

Tabela 9. Mensurações em µm e variáveis derivadas para 15 fêmeas da subpopulação de *Pratylenchus vulnus* coletada em raízes de roseira (*Rosa* sp.), no Município de Andradas – MG, e multiplicada em cilindros de cenoura.

| Caracteres | Amplitude | Média | Erro padrão da média | Desvio padrão | Coeficiente de variação |
|---|---|---|---|---|---|
| Comprimento do corpo | 601,5 - 747,5 | 694,0 | 12,1 | 46,7 | 6,7 |
| Distância da região labial à vulva | 484,2 - 587,1 | 542,5 | 8,0 | 30,8 | 5,7 |
| Largura da região labial | 7,9 - 9,5 | 8,5 | 0,1 | 0,5 | 6,2 |
| Altura da região labial | 2,3 - 3,1 | 2,7 | 0,1 | 0,3 | 10,0 |
| Comprimento do estilete | 14,1 - 16,2 | 14,9 | 0,2 | 0,7 | 4,5 |
| Largura do nódulo do estilete | 3,1 - 4,0 | 3,6 | 0,1 | 0,2 | 6,5 |
| Altura do nódulo do estilete | 2,1 - 2,7 | 2,4 | 0,0 | 0,2 | 7,2 |
| DGO | 3,1 - 4,1 | 3,5 | 0,1 | 0,3 | 7,9 |
| Região labial ao poro excretor | 89,2 - 115,3 | 102,3 | 1,1 | 4,3 | 6,8 |
| Comprimento do esôfago | 73,4 - 89,9 | 82,3 | 1,3 | 4,9 | 8,0 |
| Sobreposição ao intestino | 31,4 - 59,8 | 47,1 | 1,8 | 7,2 | 15,2 |
| Maior largura do corpo | 23,8 - 29,6 | 27,0 | 0,3 | 0,9 | 6,6 |
| Distância da espermateca à vulva | 42,4 - 71,3 | 58,4 | 2,1 | 8,0 | 13,7 |
| Largura do corpo na vulva | 21,7 - 26,7 | 24,9 | 0,2 | 0,8 | 5,2 |
| Comprimento do saco pós-uterino | 32,6 - 57,8 | 43,7 | 2,3 | 9,0 | 20,5 |
| Distância da vulva ao ânus | 97,2 - 138,8 | 115,6 | 3,1 | 12,2 | 10,6 |
| Largura do corpo no ânus | 15,2 - 19,4 | 17,5 | 0,3 | 1,3 | 7,4 |
| Comprimento da cauda | 24,6 - 45,1 | 32,6 | 1,5 | 5,8 | 17,7 |
| Número de anéis na cauda | 21,0 - 28,0 | 23,8 | 0.5 | 2.1 | 8.9 |
| Proporções | | | | | |
| Largura/Altura da região labial | 2,5 - 3,7 | 3,2 | 0,1 | 0,3 | 10,3 |
| a | 21,7 - 27,6 | 25,6 | 0,4 | 1,7 | 6,4 |
| b | 7,2 - 9,4 | 8,4 | 0,2 | 0,7 | 7,7 |
| c | 14,7 - 29,4 | 22,0 | 1,1 | 4,2 | 19,7 |
| c' | 1,5 - 2,4 | 1,9 | 0,4 | 1,6 | 13,1 |
| Percentagem | | | | | |
| V% | 75,0 - 80,9 | 78,2 | 0,5 | 1,8 | 2,2 |

## 4.4. Análises Discriminante e Canônica das Seis Espécies de *Pratylenchus*

As variáveis V%, comprimento do estilete, largura e altura da região labial, número de anéis na cauda e a relação entre largura e altura da região labial foram as mais significativas, em ordem decrescente, para a separação das seis espécies de *Pratylenchus* estudadas, conforme o valor de F na análise da função discriminante, cujo sumário está apresentado no Apêndice A. Com base nesses dados, foram determinadas as funções de classificação para cada espécie, conforme os dados da Tabela 10, cujos coeficientes estão alistados no Apêndice B. A identificação de uma subpopulação de qualquer uma das seis espécies, utilizando esse recurso, pressupõe que os valores das variáveis seriam determinados, e aplicando-se esses valores às funções, a seguir, o maior valor obtido entre elas corresponderia à espécie em questão.

Tabela 10. Funções de classificação para as seis espécies de *Pratylenchus* mais comuns no Brasil.

| |
|---|
| ***Pratylenchus brachyurus*** (Pb)<br>Pb = - 4113,51 + 67,99273 x comprimento de estilete + 732,8825 x altura da região labial – 167,534 x largura da região labial + 463,6794 x largura/altura da região labial + 49,12516 x V% + 2,10216 x número de anéis na cauda |
| ***Pratylenchus coffeae*** (Pc)<br>Pc = - 3116,46 + 56,9684 x comprimento de estilete + 582,2344 x altura da região labial – 130,354 x largura da região labial + 387,4975 x largura/altura da região labial + 44,17841 x V% + 2,44425 x número de anéis na cauda |
| ***Pratylenchus jaehni*** (Pj)<br>Pj = - 2965,51 + 51,79086 x comprimento de estilete + 573,481 x altura da região labial – 122,185 x largura da região labial + 378,3414 x largura/altura da região labial + 43,35317 x V% + 1,611528 x número de anéis na cauda |
| ***Pratylenchus penetrans*** (Pp)<br>Pp = - 3179,66 + 56,83996 x comprimento de estilete + 574,5283 x altura da região labial – 119,547 x largura da região labial + 377,2749 x largura/altura da região labial + 44,49591 x V% + 2,62731 x número de anéis na cauda |
| ***Pratylenchus vulnus*** (Pv)<br>Pv = - 2971,86 + 49,60155 x comprimento de estilete + 578,7278 x altura da região labial – 120,59 x largura da região labial + 374,4115 x largura/altura da região labial + 42,95042 x V% + 4,444914 x número de anéis na cauda |
| ***Pratylenchus zeae*** (Pz)<br>Pz = - 2754,13 + 55,13491 x comprimento de estilete + 558,8107 x altura da região labial – 117,391 x largura da região labial + 373,1823 x largura/altura da região labial + 39,19553 x V% + 4,565064 x número de anéis na cauda |

De acordo com a matriz de classificação dos dados relativos às 15 fêmeas de cada espécie (Tabela 11), os dados de *P. coffeae* tiveram 80% de acerto. Os dados relativos às outras espécies tiveram 100% de acerto. A análise do conjunto de dados das seis espécies (Figura 14) separou os indivíduos mensurados em espécies distintas com coeficiente de correlação de 0,9878 para a primeira raiz canônica (Apêndice C). *Pratylenchus brachyurus* foi a espécie mais claramente separada das demais, correspondendo à maior distância do centróide desse grupo em relação aos centróides dos grupos das outras espécies (Figura 14).

Tabela 11. Matriz da percentagem de acerto na classificação das fêmeas das seis espécies de *Pratylenchus*.

| Espécies | Percentagem de acerto | Pb | Pc | Pj | Pp | Pv | Pz |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | p=0,16667 | | | | | |
| *Pratylenchus brachyurus* (Pb) | 100 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *P. coffeae* (Pc) | 80 | 0 | 12 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| *P. jaehni* (Pj) | 100 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| *P. penetrans* (Pp) | 100 | 0 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 |
| *P. vulnus* (Pv) | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 0 |
| *P. zeae* (Pz) | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 |
| Total | 96,67 % | 15 | 12 | 17 | 16 | 15 | 15 |

Os valores nas linhas representam as classificações observadas, enquanto nas colunas representam as classificações preditas.

Conforme ilustrado na Figura 14, *P. zeae* também foi claramente separada das demais, não havendo qualquer sobreposição dos valores das variáveis consideradas, em relação às outras espécies.

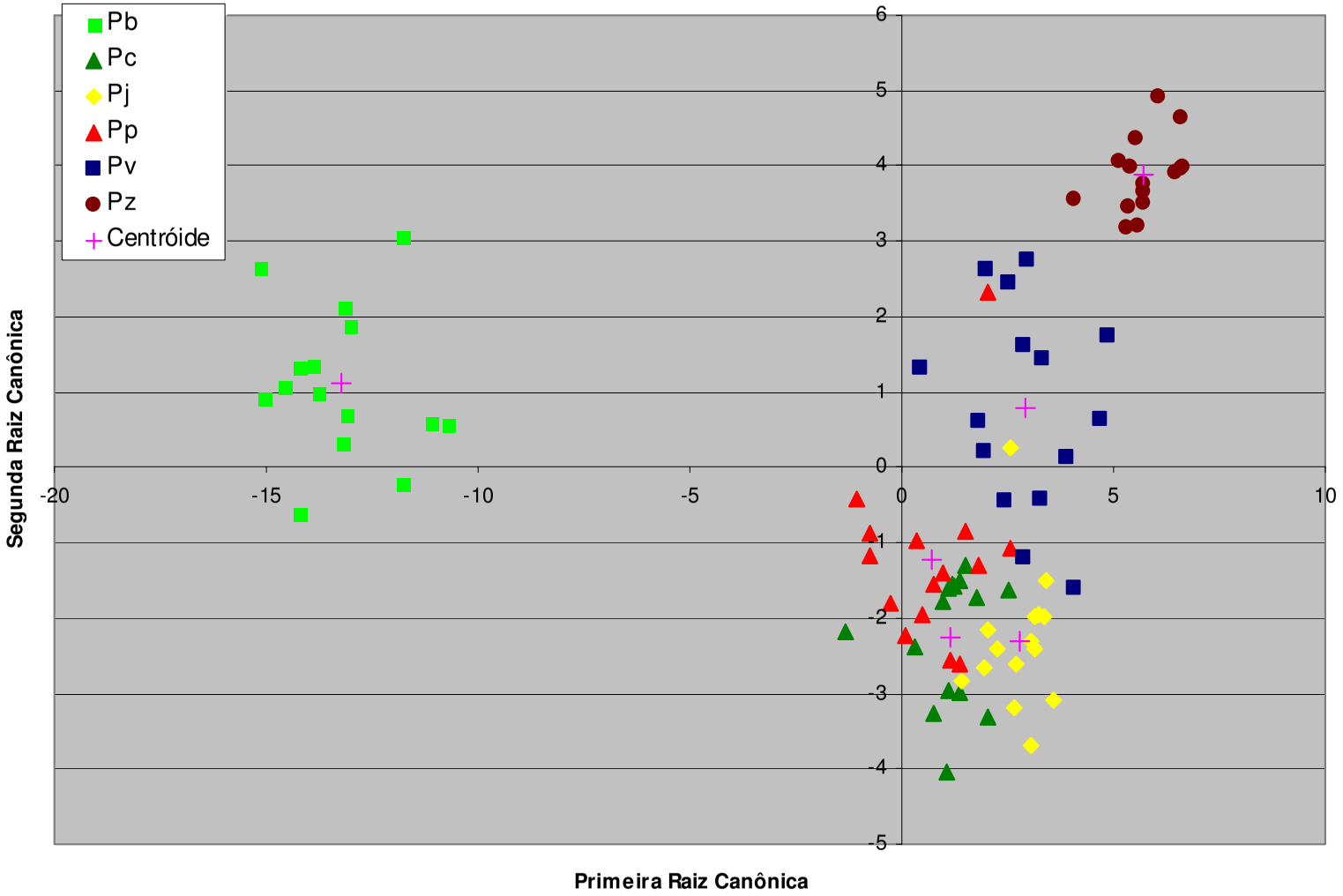



Figura 14. Análise de agrupamento utilizando a primeira e a segunda raiz canônica das variáveis morfométricas de *Pratylenchus brachyurus* (Pb), *P. coffeae* (Pc), *P. jaehni* (Pj), *P. penetrans* (Pp), *P. vulnus* (Pv) e *P. zeae* (Pz).

Os espécimes de *P. vulnus* também foram separados dos outros grupos, embora com menor uniformidade dos dados (Figura 14). Os espécimes de *P. penetrans, P. coffeae* e *P. jaehni* constituíram grupos muito próximos na análise de agrupamentos, utilizando-se da primeira e da segunda raiz canônica das variáveis morfométricas, conforme observado na Figura 14.

Os valores médios do comprimento do estilete e V%, foram comparados entre *P. coffeae* e P. *jaehni* e estão representados na Figura 15. Com apenas essas duas variáveis, foi possível separar essas espécies. Valores de V% > 80 e do comprimento do estilete > 16 µm caracterizaram a subpopulação de *P. coffeae,* enquanto valores de V% < 80 e comprimento do estilete < 16 µm se ajustaram à subpopulação de *P. jaehni* (Figura 15). Esses resultados são semelhantes aos relatados por INSERRA et al. (2001) e por CAMPOS (2002) relativos à importância dessas duas variáveis para separação de *P. coffeae* de *P. jaehni.* Além disso, a prevalência de cauda truncada em *P. coffeae* (Figura 6) e de hemisférica com término liso em *P. jaehni* (Figura 7) confirma o diagnóstico de ambas as espécies.

No presente estudo, constatou-se que o número de anéis na cauda também é uma variável relevante para a separação entre *P. coffeae* e P. *jaehni*, principalmente quando correlacionado ao comprimento do estilete. De fato, valores do comprimento do estilete > 16 µm e número de anéis na cauda > 19 caracterizaram a subpopulação de *P. coffeae*, enquanto valores menores que esses, para ambas as variáveis, se ajustaram à população de *P. jaehni* (Figura 16).

As subpopulações de *P. penetrans*, por terem três anéis na região labial (Figura 10), são facilmente separadas das subpopulações de *P. coffeae* e de *P. jaehni* que possuem apenas dois anéis na região labial, conforme anteriormente mencionado.

A distinção entre *P. penetrans* e *P. vulnus* correlacionando o comprimento do estilete com o número de anéis na cauda evidenciou que o comprimento do estilete > 16 µm e o número de anéis na cauda < 22 caracterizam *P. penetrans*. Comprimento do estilete < 16 µm e o número de anéis na cauda > 22 caracterizaram *P. vulnus* (Figura 17). Além disso, a região labial distinta do corpo, em *P. penetrans* (Figuras 10 B e 11 A e B), espermateca arredondada (Figura 10 D), saco pós-uterino 32,7 µm (24,0 – 44,9),

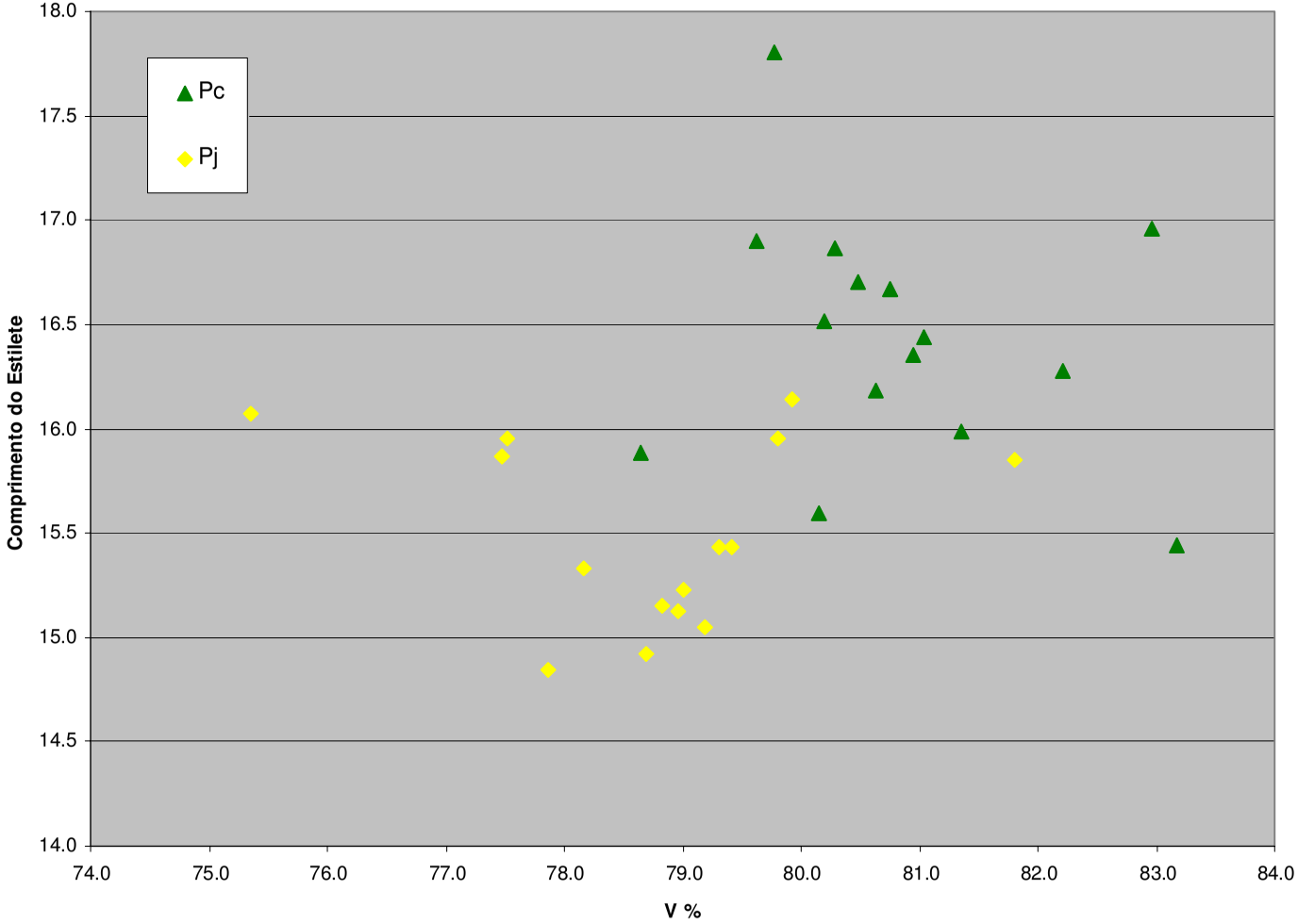



Figura 15. Análise gráfica das variáveis posição relativa da vulva (V%) e comprimento do estilete para separar *Pratylenchus coffeae* (Pc) de *P. jaehni* (Pj).

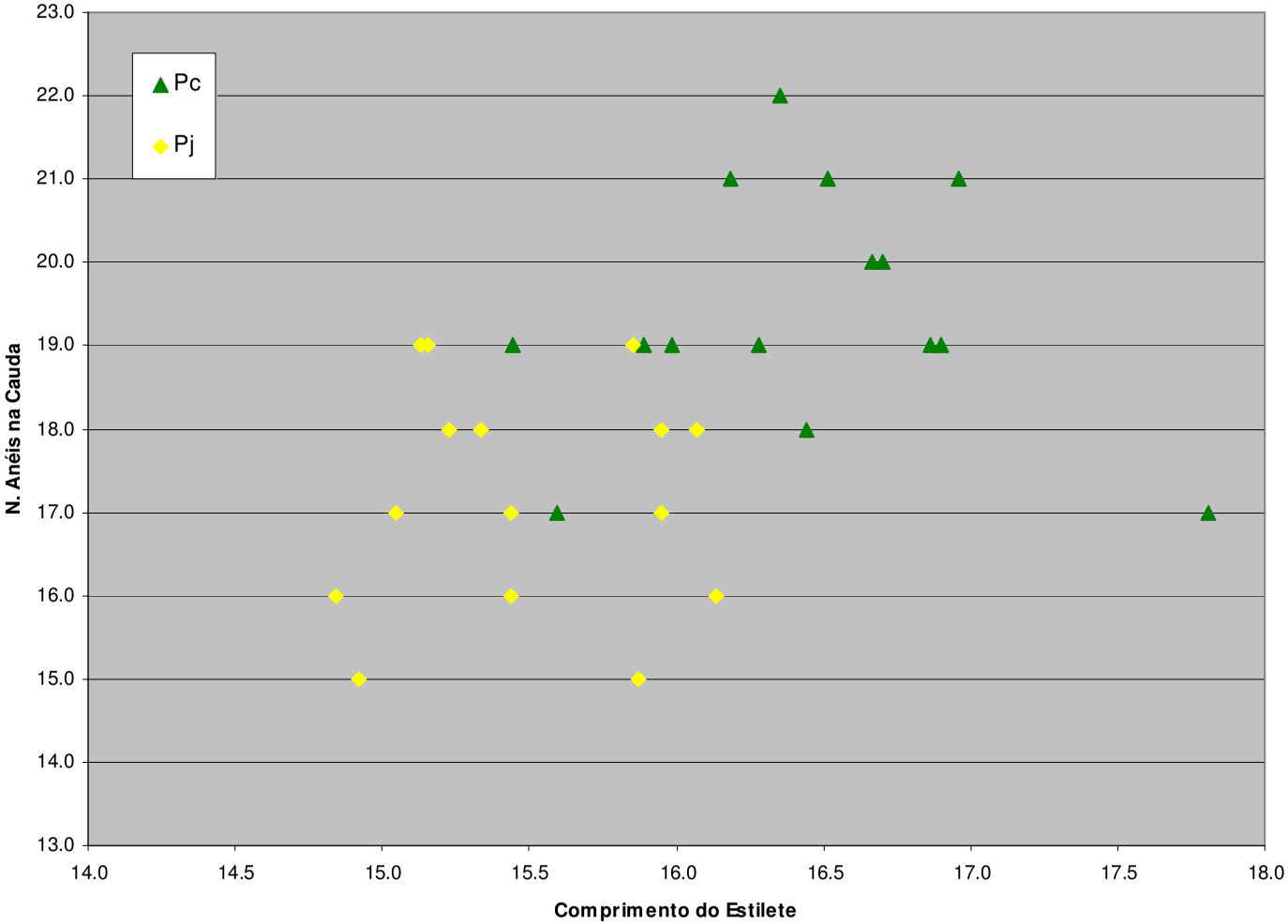



Figura 16. Análise gráfica das variáveis comprimento do estilete e número de anéis na cauda para separar *Pratylenchus coffeae* (Pc) de *P. jaehni* (Pj).

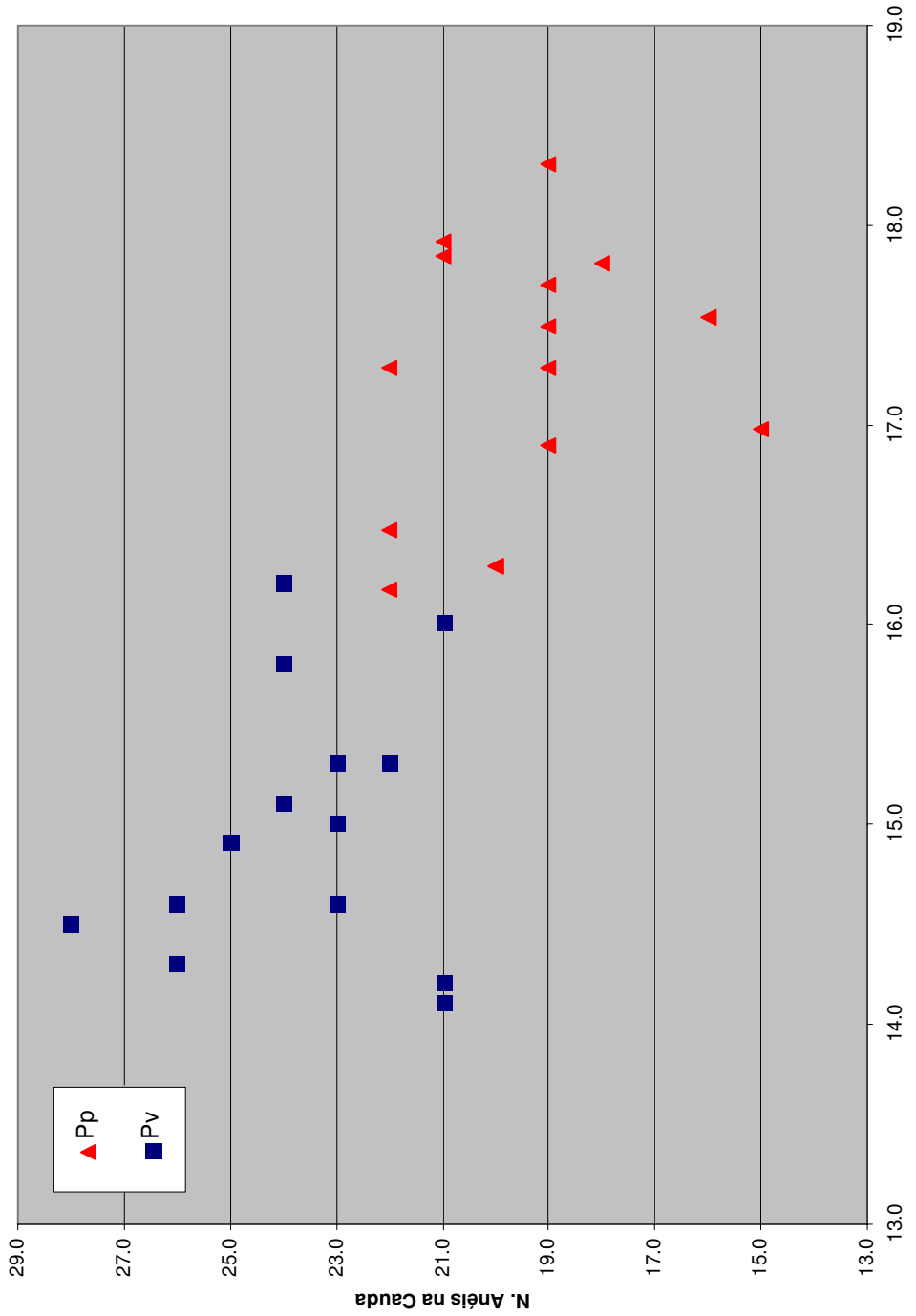



Figura 17. Análise gráfica das variáveis comprimento do estilete e número de anéis na cauda para separar *Pratylenchus penetrans* (Pp) de *P. vulnus* (Pv).

conforme dados da Tabela 8, e cauda cônica (Figuras 10 F e 11 C), em contraste com a região labial contínua com a linha do corpo, em *P. vulnus* (Figuras 12 A e B e 13 A), espermeteca oblonga (Figura 12 D), saco pós-uterino 43,7 µm (32,6 - 57,8), conforme dados da Tabela 9, e cauda subaguda (Figuras 12 F e 13 B).

Os dados desses estudos foram utlilizados na elaboração de uma grade ilustrada para a identificação das seis espécies de *Pratylenchus* incluídas nesta pesquisa e apresentada no Apêndice D.

## V CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente estudo dão suporte às seguintes conclusões:

1. A multiplicação de espécies de *Pratylenchus* in vitro, em cilindros de cenoura, é uma técnica de fácil execução, de baixo custo e adequada à produção massiva desses nematóides, tanto para a produção de inóculo como para outros propósitos.
2. *Pratylenchus penetrans* foi a espécie que produziu o maior número de indivíduos e ovos por cilindro de cenoura, in vitro, enquanto *P. jaehni* exibiu o menor número, aos 120 dias após a inoculação dos cilindros.
3. A separação das espécies mais comuns de *Pratylenchus* que ocorrem no Brasil, em dois grupos, de acordo com o número de anéis na região labial, sendo o primeiro com dois anéis e o segundo com mais de dois, facilita o processo de identificação das espécies.
4. Das 25 variáveis morfométricas consideradas no estudo da taxonomia das seis espécies mais comuns de *Pratylenchus* no Brasil, no presente estudo, as variáveis V%, comprimento do estilete, largura e altura da região labial, número de anéis na cauda e a relação largura/altura da região labial foram as mais significativas para a identificação das espécies.
5. Conquanto as seis espécies mais comuns de *Pratylenchus* que ocorrem no Brasil, possam ser identificadas por qualquer das ferramentas utilizadas individualmente, a análise morfológica, a morfométrica, assim como as análises discriminante e canônica devem ser consideradas como ferramentas complementares e utilizadas como tais.

6. A grade ilustrada para a identificação das seis espécies mais comuns de *Pratylenchus* que ocorrem no Brasil, elaborada no presente estudo, é uma ferramenta adequada para esse propósito, é de fácil manuseio e atualização simplificada pela adição dos dados de outras espécies que venham a ser identificadas no País.

## VI REFERÊNCIAS

ALLEN, M. W.; JENSEN, H. J. *Pratylenchus vulnus*, new species (Nematoda: Pratylenchinae), a parasite of trees and vines in California. **Proceedings of the Helminthological Society Washington**, Washington, v. 18, n. 1, p. 47-50, 1951.

BONCATO, A. A.; DAVID, R. G. *Radopholus similis* on cavendish banana in Davao del Norte: II. Culture and pathogenicity. **Philippine Agriculturist**, Laguna, v. 63, n. 2, p. 120-125, 1980.

CAFÉ FILHO, A. C.; HUANG, C. S. Nematóides do gênero *Pratylenchus* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Piracicaba, v. 13, n. 3, p. 232-235, 1988.

CAFÉ FILHO, A. C.; HUANG, C. S. Description of *Pratylenchus pseudofallax* n. sp. with a key to species of the genus *Pratylenchus*. **Revue de Nématologie**, Paris, v. 12, n. 1, p. 7-15, 1989.

CAMPOS, A. S. **Distribuição de *Tylenchulus semipenetrans* e *Pratylenchus jaehni* em citros, no estado de São Paulo, e estudo morfométrico comparativo de populações anfimíticas de *Pratylenchus* spp.**. 2002. 65f. Dissertação (Mestrado em Agronomia -Entomologia Agrícola) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2002.

CASTILLO, P.; VOVLAS, N. **Bionomics and identification of the genus *Rotylenchus* (Nematoda: Hoplolaimidae).** Nematology monographs and perspectives. v. 3. Leiden: Brill Academic Publishers, 2005. 377 p.

CASTRO, M. E. A. **Multiplicação 'In Vitro' de *Pratylenchus brachyurus*, *Pratylenchus* zeae, *Radopholus similis* e *Tylenchorhynchus* sp.**. 1986. 62f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1986.

CASTRO, M. E. A.; FERRAZ, S. Multipliação ´in vitro´ de *Pratylenchus brachyurus*, *P. zeae*, *Radopholus similis* e *Tylenchurhynchus* sp. em discos de cenoura. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 13, p. 31-38, 1989.

CHITAMBAR, J. J.; RASKI, D. J. Life history of *Pratylenchus vulnus* on carrot disks. **Journal of Nematology**, Lawrence, v. 17, n. 2, p. 235-236, 1985.

CHITWOOD, D. J.; KRUSBERG, L. R. Pectolytic enzymes in three populations of *Ditylenchus dipsaci*. **Journal of Nematology**, DeLeon Springs, v. 9, n. 3, p. 187-192, 1977.

CHOI, D. R.; LEE, J. K.; PARK, B. Y.; HAN, H. R.; CHOI, Y. E. A new and one unrecorded species of *Pratylenchus* from Korea (Nematoda: Pratylenchidae). **Journal of Asia Pacific Entomology**, Seul, v. 9, n. 1, p. 5-9, 2006.

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

CORBETT, D. C. M. ***Pratylenchus penetrans*. Descriptions of plant parasitic nematodes**, set 2, n. 25. Herts: Commonwealth Institute of Helminthology, 1973. 4 p.

CORBETT, D. C. M. ***Pratylenchus vulnus***. **Descriptions of plant parasitic nematodes**, set 3, n. 37, Herts: Commonwealth Institute of Helminthology, Herts, 1974. 3 p.

CORBETT, D. C. M. ***Pratylenchus brachyurus***. **Descriptions of plant parasitic nematodes**, set 6, n. 89, Herts: Commonwealth Institute of Helminthology, Herts, 1976. 4 p.

CORBETT, D. C. M.; CLARK, S. A. Surface features in the taxonomy of *Pratylenchus* species. **Revue de Nématology**, Paris, v. 6, n. 1, p. 85-98, 1983.

COSTA, D. C. **Variabilidade patogênica e genética de *Radopholus similis* em bananeira no Brasil.** 2005. 156f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2005.

DE LUCA, F.; FANELLI, E.; Di VITO, M.; REYES, A.; DE GIORGI, C. Comparison of the sequences of the D3 expansion of the 26S ribosomal genes reveals different degrees of heterogeneity in different populations and species of *Pratylenchus* from the Mediterranean region. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 110, n. 9, p. 949-957, 2004.

Di VITO, M.; CATALANO, F.; ZACCHEO, G. Reproduction of six populations of *Pratylenchus* spp. from the Mediterranean region on selected plant species. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 30, n. 1, p. 103-105, 2002.

DOUCET, M. C. Description de cuatro poblaciones de *Pratylenchus* (Nematoda: Tylenchida) provenientes de la provincia de Cordoba, Argentina. **Revista de Ciencias Agropecuarias**, Cordoba, v. 6, p. 7-21, 1988.

DOUCET, M. E.; CAGNOLO, S. Variabilidad intra e inter-especifica de caracteres morfometricos en poblaciones del orden Tylenchyda (Nematoda) provenientes de Argentina. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 26, n. 2, p. 231-236, 1998.

DOUCET, M. E.; LAX, P. Caracterizacion de una poblacion y un aislado de *Pratylenchus vulnus* Allen et Jensen, 1951 (Nematoda: Tylenchida) provenientes de la Provincia de Cordoba, Argentina. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 25, n. 2, p. 287-298, 1997.

DOUCET, M. E.; LAX, P.; PINOCHET, J. Variability of some external characters in *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen, 1951 (Nematoda: Tylenchida). **Fundamental Applied Nematology**, Paris, v. 21, n. 2, p. 205-206, 1998.

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

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

DUNCAN, L. W.; INSERRA, R. N.; THOMAS, W. K.; DUNN, D.; MUSTIKA, I.; FRISSE, L. M.; MENDES, M. L.; MORRIS, K.; KAPLAN, D. T. Molecular and morphological analysis of isolates of *Pratylenchus coffeae* and closely related species. **Nematropica,** Florida, v. 29, p. 61-80, 1999.

DUNN, R. A. Extration of eggs of *Pratylenchus penetrans* from alfafa callus and relationship between age of culture and yield of eggs. **Journal of Nematology**, St. Paul, v. 5, n. 1, p. 73-74, 1973.

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

ELSEN, A.; de WAELE, D. Recent developments in early in vitro screening for resistance against migratory endoparasitic nematodes in *Musa.* In: JAIN, S. M. & SWENNEN, R. (eds.). **Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations**. Enfield: Science Publishers, Inc., 2004. p. 194-208.

ESTAT – Sistema para análises estatísticas, versão 2.0, Unesp – Jaboticabal, 1992.

FALLAS, G. A.; SARAH, J. L. Effecto de la temperatura de almacenamiento sobre la reproducción in vitro de *Radopholus similis*. **Nematropica**, Ft. Pierce, v. 24, n. 2, p. 175-177, 1994.

FEDER, W. A.; HUTCHINS, P. C.; WHIDDEN, R. Aseptic growth of *Radopholus similis* (Coob) Thorne on okra root callus tissue. **Proceeding Florida State Horticultural Society**, Miami, v. 75, n. 1, p. 74-76, 1962.

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

FORTUNER, R. ***Pratylenchus zeae*. Descriptions of plant parasitic nematodes**, set 6, n.77. Herts: Commonwealth Institute of Helminthology, 1976. 3 p.

FREDERICK, J. J.; TARJAN, A. C. A compendium of the genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936. **Revue de Nématologie**, Paris, v. 12, n. 2, p. 243-256, 1989.

GAO, X.; CHENG, H. & FANG, C. New diagnostic characters for *Pratylenchus vulnus*. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 27, n. 1, p. 9-13,1999.

GODFREY, G. H. A destructive root disease of pineapples and other plants due to *Tylenchus brachyurus* n.sp. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 19, n. 6, p. 611-629, 1929.

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

GONZAGA, V.; SANTOS, J. M.; SILVA, V. R. Espécies de *Pratylenchus* ocorrentes em diferentes culturas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA**,** 37, Gramado. **Resumos ...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, v. 29, Suplemento, 2004. p. 217.

HANDOO, Z. A.; CARTA, L. K.; SKANTAR, A. M. Morphological and molecular characterisation of *Pratylenchus arlingtoni* n. sp., *P. convallariae* and *P. fallax* (Nematoda: Pratylenchidae). **Nematology**, Leiden, v. 3, n. 6, p. 607-618, 2001.

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

HARRIS, R. J. **A primer of multivariate statistics**. New York, Academic Press, 1975, 332p.

HASTINGS, R. J.; BOSHER, J. E. A study of the pathogenicity of the meadow nematode and associated fungus *Cylindrocarpon radicicola.* **Canadian Journal of Research**, Toronto, v. 16, n. 6, p. 225-229, 1938.

HERNÁNDEZ, M.; JORDANA, R.; GOLDARACENA, A.; PINOCHET, J. SEM observations of nine species of the genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Pratylenchidae). **Journal of Nematode Morphology and Systematics,** Madri, v. 3, n. 2, p. 165-174, 2001.

INSERRA, R. N.; DUNCAN, L. W.; DUNN, D.; HANDOO, Z. A.; TROCCOLI, A.; ROWE, J. *Pratylenchus jordanensis*, a junior synonym of *P. zeae*. **Nematropica**, Ft. Pierce, v. 35, n. 2, p. 161-170, 2005.

INSERRA, R. N.; DUNCAN, L. W.; TROCCOLI, A.; DUNN, D.; SANTOS, J. M. dos; VOVLAS, N. *Pratylenchus jaehni* sp. n. from citrus in Brazil and its relationship with *P. coffeae* and *P. loosi* (Nematoda: Pratylenchidae). **Nematology***,* Leiden, v. 3, n. 7, p. 653-665, 2001.

KARSSEN, G.; van AELSI, A. C.; WAEYENBERGE, L.; MOENS, M. Observations on *Pratylenchus penetrans* Cobb, 1917 parasitizing the coastal dune grass *Ammophila arenaria* (L.) Link in the Netherlands. **Journal of Nematode Morphology and Systematics**, Jaén, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.

KARSSEN, G.; WAEYENBERGE, L.; MOENS, M. *Pratylenchus brzeskii* sp. nov. (Nematoda: Pratylenchidae), a root-lesion nematode from European coastal dunes. **Annales Zoologici**, Warszawa, v. 50, n. 2, p. 255-261, 2000.

KHERA, S.; ZUCKERMAN, B. M. Studies on the culturing of certain ectoparasitic nematodes on plant callus tissue. **Nematologica**, Wageningen, v. 8, n. 3, p. 272-274, 1962.

KOSHY, P. K.; SOSAMMA, V. K. Culturing of burrowing nematodes, *Radopholus similis* on carrot discs. **Indian Journal of Nematology**, New Delhi, v. 10, n. 2, p. 247-249, 1981.

KRUSBERG, L. R. Studies on the culturing and biochemistry of *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzemabosi* on alfafa tissues. **Nematologica**, Wageningen, v. 6, n. 2, p. 181-200, 1961.

LAX, P.; DOUCET, M.; DI RIENZO, J. A.; PINOCHET, J.; BAUJARD, P. Inter-population variability in *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen, 1951 (Nematoda: Tylenchida). **Nematology**, Leiden, v. 6, n. 2, p. 257-260, 2004.

LOOF, P. A. A. Taxonomic studies on the genus *Pratylenchus.* **Tijschrift voor Plantenziekten**, Wageningen, v. 66, p. 29-60, 1960.

LOOF, P. A. A. The genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Pratylenchidae): a review of its anatomy, morphology, distribution, systematics and identification. **Vaxtskyddsrapporter**, Jordbruk, v. 5, n. 1, p. 1-50, 1978.

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

LÓPEZ, R.; SALAZAR, L. Nematodos asociados al arroz (*Oryza sativa* L.) en Costa Rica. VII. *Pratylenchus zeae*. **Agronomia Costarricense**, San José, v. 12, n. 2, p. 183-190, 1988.

LORDELLO, L. G. E. **Nematóides das plantas cultivadas**. São Paulo: Nobel, 1981. 314p.

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

MAGGENTI, A. R. Nemata: Higher classification. In: NICKLE, W. R. (ed.). **Manual of agricultural nematology.** New York: Marcel Dekker, Inc., 1991. p. 147-187.

MAI, W. F.; MULLIN, P. G. **Plant parasitic nematodes: a pictorial key to genera**. Ithaca: Cornell University Press, 1996, p. 277.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO Instrução Normativa SDA Nº 38, de 14 de outubro de 1999. Disponível em: <http://www. institutohorus.org.br/download/marcos_legais/Instrucao_Normativa_SDA_n_38_de_14_ de_outubro_de_1999.htm. Acesso em: 09 out. 2006.

MIZUKUBO, T. Morphological and statistical differentiation of *Pratylenchus coffeae* complex in Japan (Nematoda: Pratylenchidae). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 27, n. 2, p. 213-224, 1992.

MIZUKUBO, T. Pictogram analysis of spear length, lip region diameter and tail morphology in cohabiting *Pratylenchus penetrans* and *Pratylenchus vulnus*. **Japanese Journal of Nematology**, Saga, v. 20, p. 51-55, 1990.

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

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

MUDIOPE, J.; COYNE, D.; ADIPALA, W.; SIKORA, R. A. Monoxenic culture of *Pratylenchus sudanesis* on carrot disks, with evidence of differences in reproductive rates between geographical isolates. **Nematology**, Leiden, v. 6, n. 4, p. 617-619, 2004.

MYERS, R. F.; FEDER, W. A.; HUTCHINS, P. C. The rearing of *Radopholus similis* (Cobb) Thorne on grapefruit, okra, and alfalfa root callus tissues. **Proceedings of the Helmintholological Society of Washington**, Washington, v. 32, n. 1, p. 94-95, 1965.

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

OLOWE, T.; CORBETT, D. C. M. Morphology and morphometrics of *Pratylenchus brachyurus* and *P. zeae* II. Influence of environmental factors. Indian **Journal of Nematology**, Lawrence, v. 14, n. 1, p. 30-35, 1984.

PADAWER, J. The Nomarski interference-contrast microscope. An experimental basis for image interpretation. **Journal Royal Microscopical Society**, Oxford, v. 88, n. 3, p. 305-349, 1967.

PENA, E. DE LA; MOENS, M.; AELST, A. VAN; KARSSEN, G. Description of *Pratylenchus dunensis* sp. n. (Nematoda: Pratylenchidae), a root-lesion nematode associated with the dune grass *Ammophila* arenaria (L.) Link. **Nematology**, Leiden, v. 8, n. 1, p. 79-88, 2006.

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

ROMAN, J.; HIRSCHMANN, H. Morphology and morphometrics of six species of *Pratylenchus*. **Journal of Nematology**, Lawrence, v. 1, n. 4, p. 363-386, 1969.

ROSSI, C. E.; CALDARI Jr., P.; MONTEIRO, A. R. Occurrence of *Pratylenchus vulnus* on rose in Minas Gerais State, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 1, p. 147-148, 2000.

SANTOS, J. M.; CAMPOS, A. S.; AGUILAR-VILDOSO, C. I. Nematóides dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (eds.) **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 2005. p. 605-628.

SANTOS, J. M.; MAIA, A. S. A SEM improved technique for studying host-pathogen interactions of sedentary nematodes and for documentation of perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Acta Microscópica**, Rio de Janeiro, v.6, Suplemento, p.562-563, 1997.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. (eds). **Vistas on Nematology**. Hyattsville: Society of Nematologists, 1987. p. 7-14.

SEINHORST, J. W. Three new *Pratylenchus* species with a discussion of the structure of the cephalic framework and the spermatheca in this genus. **Nematologica**, Wageningen, v. 14, n. 4, p. 497-510, 1968.

SHER, S. A.; ALLEN, M. W. Revision of the genus *Pratylenchus* (Nematoda: Tylenchidae). **University California Publication in Zoology**, Berkeley, v. 57, p. 441-470, 1953.

SIDDIQI, M. R. ***Pratylenchus coffeae*. Descriptions of plant parasitic nematodes**, set 1, n. 6. Herts: Commonwealth Institute of Helminthology, 1972. 3 p.

STATISTICA for Windows, versão 5.1. Tulsa: Statsoft Inc., 1998.

STATISTICA ANALYSES SYSTEM – SAS, versão 8.02. Cary: SAS Institure Inc., 1999.

STOFFELEN, R.; JIMENEZ, M. I.; DIERCKXSENS, C.; TAM, V. T. T.; SWENNEN, R.; WAELE, D. Effect of time and inoculum density on the reproductive fitness of

*Pratylenchus coffeae* and *Radopholus similis* populations on carrot disks. **Nematology**, Leiden, v. 1, n. 3, p. 243-250, 1999.

TARTE, R.; MAI, W. F. Morphological variation in *Pratylenchus penetrans*. **Journal of Nematology**, DeLeon Springs, v. 8, n. 3, p. 185-195, 1976a.

TARTE, R.; MAI, W. F. Sex expression and tail morphology of female progenies of smooth-tail and crenate-tail females of *Pratylenchus penetrans*. **Journal of Nematology**, DeLeon Springs, v. 8, n. 3, p. 196-200, 1976b.

TAYLOR, D. P.; JENKINS, W. R. Variation within the nematode genus *Pratylenchus*, with the descriptions of *P. hexincisus*, n. sp. and *P. subpenetrans*, n. sp. **Nematologica**, Wageningen, v. 2, n. 2, p. 159-174, 1957.

TENENTE, R. C. V.; GONZAGA, V.; MELO, L. A. M. P.; TENENTE, M. S. M. **Bibliografia brasileira de nematóides**. Brasília: EMBRAPA–CENARGEN, 2002. 386 p. (Documentos, 76).

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: FUNEP, 1993. 372 p.

TOWNSHEND, J. L. Morphological observations of *Pratylenchus penetrans* from celery and strawberry in southern Ontario. **Journal of Nematology**, Lawrence, v. 23, n. 2, p. 205-209, 1991.

TOWSON, A. J.; LEAR, B. Effect of temperature on reproduction and motility of *Pratylenchus vulnus*. **Journal of Nematology**, DeLeon Springs, v. 14, n. 4, p. 602-603, 1982.

TRINH, P.Q.; NGUYEN, C. N.; WAEYENBERGE, L.; SUBBOTIN, S. A.; KARSSEN, G.; MOENS, M. *Radopholus arabocoffeae* sp. n. (Nematoda: Pratylenchidae), a nematode

pathogenic to *Coffea arabica* in Vietnam, and additional data on *R. duriophilus.* **Nematology**, Leiden, v. 6, n. 5, p. 681-693, 2004.

TROCCOLI, A.; LAMBERTI, F.; COSTILLA, M. A. Note morfo-biometriche su *Pratylenchus zeae* Graham, 1951. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 24, n. 1, p. 43-47, 1996.

TROCCOLI, A.; LAMBERTI, F.; GRECO, N. *Pratylenchus* species occuring in Algeria (Nematoda, Pratylenchidae). 1992. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 20, n. 1, p. 97-103, 1992.

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

VILLAIN, L.; BOUJARD, P.; MOLINA, A.; PIGNOLET, L. Morphological and biological characterisation of three *Pratylenchus* spp. populations parasitising coffee trees in Guatemala. **Nematologica**, Leiden, v. 44, p. 600-601, 1998.

WAEYENBERGE, L.; RYSS, A.; MOENS, M.; PINOCHET, J. ; VRAIN, T. C. Molecular characterisation of 18 *Pratylenchus* species using rDNA restriction fragment length polymorphism. **Nematology**, Leiden, v. 2, n. 2, p. 135-142, 2000.

WILCKEN, S. R. S.; INOMOTO, M. M.; FERRAZ, L. C. C. B.; OLIVEIRA, C. M. G. Morphometric of *Pratylenchus* populations from coffee, banana, ornamental plant and citrus in Brazil. In: International Congress of Nematology, 4, 2002, Arona. **Abstract…** Leiden: Koninklijke Brill NV, v. 4. 2002. p .248.

# APÊNDICE A

Apêndice A. Sumário da análise da função discriminante das subpopulações de seis espécies de *Pratylenchus*.

| Variáveis | λ - Wilks | λ - parcial | Teste F (5,79) | Nível de significância (p) |
|---|---|---|---|---|
| ESTILETE | 0,000896 | 0,312743 | **34,72078** | < 0,0001 |
| ALTRL | 0,000742 | 0,377766 | **26,02478** | < 0,0001 |
| LARRL | 0,000823 | 0,340346 | **30,62331** | < 0,0001 |
| L_ARL | 0,000476 | 0,589088 | **11,02111** | < 0,0001 |
| V% | 0,001577 | 0,177680 | **73,12387** | < 0,0001 |
| ANEISCA | 0,000699 | 0,401025 | **23,59900** | < 0,0001 |

λ - Wilks: 0,00028 aprox. F (30,318) = 71,325 p < 0,0001

ESTILETE = comprimento do estilete; ALTRL = altura da região labial; LARRL = largura da região labial; L_ARL = razão largura sobre altura da região labial; V% = distância da extremidade anterior à vulva, como percentagem do comprimento total do corpo do nematóide; ANEISCA = número de anéis na cauda.

## APÊNDICE B

Apêndice B. Coeficientes das funções de classificação para as seis subpopulações de espécies de *Pratylenchus* mais comuns no Brasil.

| Variáveis | Pb | Pc | Pj | Pp | Pv | Pz |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ESTILETE | 67,99273 | 56,9684 | 51,79086 | 56,83996 | 49,60155 | 55,13491 |
| ALTRL | 732,8825 | 582,2344 | 573,481 | 574,5283 | 578,7278 | 558,8107 |
| LARRL | – 167,534 | – 130,354 | – 122,185 | 119,547 | – 120,59 | – 117,391 |
| L_ARL | 463,6794 | 387,4975 | 378,3414 | 377,2749 | 374,4115 | 373,1823 |
| V% | 49,12516 | 44,17841 | 43,35317 | 44,49591 | 42,95042 | 39,19553 |
| ANEISCA | 2,10216 | 2,44425 | 1,611528 | 2,62731 | 4,444914 | 4,565064 |
| Constant | - 4113,51 | - 3116,46 | - 2965,51 | - 3179,66 | - 2971,86 | - 2754,13 |

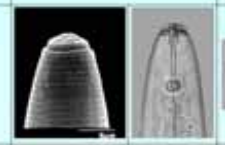
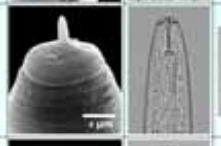
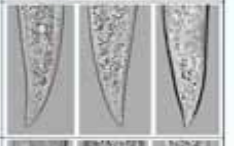
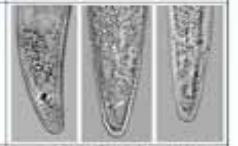
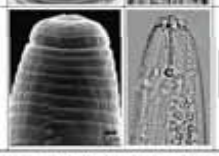
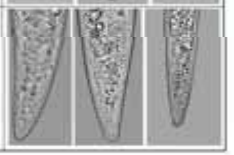
ESTILETE = comprimento do estilete; ALTRL = altura da região labial; LARRL = largura da região labial; L_ARL = razão largura sobre altura da região labial; V% = distância da extremidade anterior à vulva, como percentagem do comprimento total do corpo do nematóide; ANEISCA = número de anéis na cauda.

# APÊNDICE C

Apêndice C. Níveis de significância para os componentes principais das variáveis morfométricas de seis subpopulações de espécies *Pratylenchus*.

| Componentes principais | Auto-valor | Coefic. de correlação canônica | $\lambda$ - Wilks | $\chi^2$ | GL. | Nível de significância (p) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 40,34377 | 0,987832 | 0,00028 | 678,923 | 30 | < 0,0001 |
| 1 | 5,146746 | 0,915048 | 0,011587 | 370,0035 | 20 | < 0,0001 |
| 2 | 2,946843 | 0,864079 | 0,071222 | 219,282 | 12 | < 0,0001 |
| 3 | 1,073300 | 0,719498 | 0,281103 | 105,3299 | 6 | < 0,0001 |
| 4 | 0,715824 | 0,645902 | 0,58281 | 44,81117 | 2 | < 0,0001 |

# GRADE ILUSTRADA PARA IDENTIFICAÇÃO DAS SEIS ESPÉCIES DE *Pratylenchus* FILIPJEV, 1936 MAIS COMUNS NO BRASIL

| ESPÉCIES | CARACTERES MORFOLÓGICOS MARCANTES (examinar, pelo menos, 10 a 15 fêmeas de cada subpopulação) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Anéis na região labial | Posição da vulva | Espermateca funcional ou não funcional | Saco pós-uterino | Forma da cauda |
| ***P. brachyurus*** .Dois anéis na região labial .Comprimento do estilete 17 – 22 µm .V% 82 – 89 .Machos muito raros |  | | | | |
| ***P. coffeae*** .Dois anéis na região labial .Comprimento do estilete 14 – 19 µm .V% 76 – 84 .Machos freqüentes | | | | | |
| ***P. jaehni*** .Dois anéis na região labial .Comprimento do estilete 15 – 17,5 µm .V% 78 – 88 .Machos freqüentes |  | | | | |
| ***P. zeae*** .Três anéis na região labial .Comprimento do estilete 15 – 18 µm .V% 68 – 76 .Machos muito raros | | | | |  |
| ***P. penetrans*** .Três anéis na região labial .Comprimento do estilete 15 – 17 µm .V% 79 – 84 .Machos freqüentes | | | | |  |
| ***P. vulnus*** .Três anéis na região labial .Comprimento do estilete 14 – 19 µm .V% 78 – 84 .Machos freqüentes |  | | | |  |

Setas cheias indicam a espermateca não funcional presente em espécies partenogenéticas.