

Estudo Fitossanitário, Multiplicação e Taxonomia de Nematoides Encontrados em Sementes de Gramíneas Forrageiras no Brasil*

Luciany Favoreto^{1**}, Jaime M. Santos¹, Sergio A. Calzavara¹ & Luciano A. Lara²

*Parte da Tese da primeira autora, para obtenção do título de Doutorado em Agronomia.

¹Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista (FCAV-UNESP), 14884-900 Jaboticabal (SP) Brasil.

²Departamento Técnico, Sementes Matsuda, 17160-000, Álvares Machado (SP). Brasil.

**Autora para correspondência: lucianyfavoreto@hotmail.com

Recebido para publicação em 18 / 08 / 2009. Aceito em 10 / 05 / 2011

Editado por Claudio Marcelo G. Oliveira

Resumo - Favoreto, L., J.M. Santos, S.A. Calzavara & L.A. Lara. 2011. Estudo fitossanitário, multiplicação e taxonomia de nematoides encontrados em sementes de gramíneas forrageiras no Brasil.

A presença de patógenos nas sementes tem implicações quarentenárias que dificultam as exportações. Foi objetivo dessa pesquisa quantificar a população de nematoides e de fungos em amostras de sementes de gramíneas forrageiras procedentes dos principais Estados produtores do Brasil; estudar a multiplicação *in vitro* e a taxonomia dos nematoides encontrados. Amostras de 237 lotes de sementes de diferentes gramíneas forrageiras, procedentes dos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Bahia e Goiás foram coletadas e enviadas para análise nos laboratórios de Nematologia e de Fitopatologia da FCAV-UNESP, Campus de Jaboticabal, pela empresa Comércio e Indústria Matsuda Imp. Exp. Ltda. Os nematoides foram extraídos de alíquotas de 10 g de sementes das amostras. Para detecção dos fungos, utilizou-se o método do papel-filtro. As identificações foram realizadas com auxílio de um microscópio fotônico e estereoscópio. Na multiplicação *in vitro*, foram utilizadas populações partenogênicas de *Aphelenchoides sexlineatus*, *Aphelenchus* sp. e *Ditylenchus montanus*. Culturas de um isolado de *Fusarium* sp. e de *Didymella bironiae* foram utilizadas como substrato para a multiplicação dos nematoides em placas de Petri, onde 10 fêmeas foram inoculadas e mantidas incubadas em B.O.D. a 25 ± 1 °C no escuro. Após 30 dias, efetuou-se a extração dos nematoides pela técnica do funil de Baermann. As populações nas suspensões obtidas foram estimadas ao microscópio com auxílio da câmara de contagem de Peters. Com os dados obtidos, foi estimado o fator de reprodução dos nematoides. Para o estudo taxonômico dos fitonematoides, as características morfológicas de espécimes foram fotomicrografadas e eletromicrografadas. Os resultados indicam uma ampla distribuição dos nematoides e fungos em sementes de forrageiras nas regiões produtoras do Brasil. Foram identificadas as seguintes espécies de nematoides: *Aphelenchoides besseyi*, *A. bicaudatus*, *A. fragariae*, *A. sexlineatus*, *Ditylenchus myceliophagus*, *D. dipsaci*, *D. montanus* e *Aphelenchus* sp. Os fungos detectados foram *Fusarium* sp., *Helminthosporium* sp. e *Phoma* sp.

Palavras-chaves: nematoides, *Aphelenchoides* spp., *Ditylenchus* spp., fungos, fitoparasitas.

Summary - Favoreto, L., J.M. Santos, S.A. Calzavara & L.A. Lara. 2011. Phytosanitary study, multiplication and taxonomy of nematodes associated with seeds of forage grasses in Brazil.

Pathogens in seeds imply quarantine constraints for exportation. This research aimed to quantify nematodes and fungus populations in seed samples of forage grasses from the main Brazilian producing states, and to multiply the nematodes *in vitro*, as well to study the taxonomy of the nematodes detected. Seed samples of 237 lots of different forage grasses from São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Bahia, and Goiás States were collected and shipped for analyses in the Nematology and Plant Pathology Laboratories at

FCAV–UNESP – Jaboticabal(SP) by Comércio e Indústria Matsuda Imp., Exp. Ltd. Nematodes were extracted from 10 g of seeds. To detect the fungus, the Blotter-test was applied. The identifications were done by using a photonic microscope and a stereomicroscope. For the study of *in vitro* multiplication of the nematodes, the following parthenogenetic species were selected: *Aphelenchoides sexlineatus*, *Aphelenchus* sp. and *Ditylenchus montanus*. Cultures of the fungi *Fusarium* sp. and *Didymella brioniae* were used as substrate to multiply the nematodes in Petri dishes. Each plate was inoculated with 10 mature females, then incubated in B.O.D. at 25 ± 1 °C, in the dark. Thirty days after inoculation, the nematodes were extracted. The populations obtained in the suspensions were estimated in the microscope using Peters counting chamber, and the reproduction factor estimated. For the taxonomic study of the nematodes, morphological characters of specimens were recorded under the light and scanning electron microscopes. The results indicated a large distribution of nematodes and fungus in seeds of forage grasses in Brazil. The nematodes identified in the present study were: *Aphelenchoides besseyi*, *A. bicaudatus*, *A. fragariae*, *A. sexlineatus*, *Ditylenchus myceliophagus*, *D. dipsaci*, *D. montanus*, and *Aphelenchus* sp. In addition, species of the fungi *Fusarium*, *Helminthosporium* and *Phoma* were recovered.

Key words: nematodes, *Aphelenchoides* spp., *Ditylenchus* spp., fungus, phytoparasite.

Introdução

Nos últimos 30 anos, houve expressivo aumento da área cultivada com pastagens no Brasil, que passou de 154,1 para 177,7 milhões de hectares (Silva & Nascimento Jr., 2006). A produção de sementes de gramíneas forrageiras representa expressiva fonte de divisas para o Brasil (Soares, 2003). Estima-se que mais de 100.000 t são produzidas e comercializadas anualmente somente no mercado interno (Oliveira, 1994). As espécies de *Brachiaria* são as mais comercializadas, chegando a 60 % do mercado (Souza, 2001) e predominantemente constituídas por *Brachiaria decumbens* e *B. brizantha* (Verzignassi & Fernandes, 2001). Em relação ao mercado internacional, exporta-se para mais de 20 países, principalmente da América Latina (Santos & Santos Filho, 1999).

Cerca de 180 espécies de *Aphelenchoides* já foram descritas (Nickle & Hooper, 1991); em *Ditylenchus* são reconhecidas 81 espécies válidas. Outras 82 espécies foram removidas do gênero por razões de ordem taxionômica (Sturhan & Brzeski, 1991). Essa enorme diversidade em ambos os grupos dificulta a taxonomia desses nematóides em relação aos demais. Segundo Shahina (1996), a identificação de espécies de *Aphelenchoides* não é fácil, pois algumas referências são de difícil acesso e existem descrições inadequadas de espécies. Além disso, *Ditylenchus* spp. e *Aphelenchoides* spp. são os fitonematóides que apresentam a maior variação de nichos ecológicos no filo Nematoda (Nickle & Hooper, 1991).

Na ausência de plantas hospedeiras, cultivadas ou invasoras, nematóides do gênero *Aphelenchoides* podem sobreviver no solo alimentando-se de fungos saprófitos ou fitopatogênicos (Pederson & Quesenberry, 1998). Fortuner & Williams (1975) incluíram *Panicum maximum*, *Setaria italica*, *Cyperus* sp. e *Digitaria sanguinalis* na lista de hospedeiros de *Aphelenchoides besseyi*.

Além de *A. besseyi*, outras espécies de *Aphelenchoides* têm sido relatadas associadas às gramíneas forrageiras (Favoreto *et al.*, 2003; 2004; Favoreto & Santos, 2004). Sharma *et al.* (2001) citam a ocorrência de *A. subtennis* em 96,9 % e *Ditylenchus terricolus* em 92,2 % das 64 amostras coletadas na rizosfera de *Brachiaria brizantha* ‘Marandu’, no Estado do Acre.

Favoreto (2004) observou que os nematóides em sementes secas usualmente estão inativos. Quando extraídos, demandam algum tempo em suspensão aquosa para exibirem atividade. Além disso, nematóides mortos ou inativos não são extraídos pelo método de funil de Baermann e suas variações. Por conseguinte, o método de extração de nematóides das sementes de *B. brizantha* pela flutuação em centrífuga (Coolen & D’Herde, 1972) é mais eficaz para recuperação de nematóides que o funil de Baermann com e sem hidratação e/ou trituração prévia das sementes. A mesma autora concluiu que a população de *Aphelenchoides* spp. que infecta as sementes de gramíneas forrageiras é maior que a população de *Ditylenchus* spp., que apenas infestam as sementes. Deste modo, o processo de beneficiamento

usualmente empregado reduz mais a população de *Ditylenchus* spp. nas sementes beneficiadas que as de *Aphelenchoides* spp. Ainda, os nematoides encontrados em sementes de gramíneas forrageiras também estão presentes em todos os tecidos da planta. Assim, podem ser disseminados por restos vegetais.

No Brasil, os estudos nematológicos em sementes de gramíneas forrageiras são incipientes, razão pela qual esta pesquisa foi conduzida, com os objetivos de quantificar a população de nematoides e fungos em amostras de sementes vindas dos principais Estados produtores do Brasil, estudar a multiplicação *in vitro* e a taxonomia dos nematoides encontrados nas sementes.

Material e Métodos

Estudo fitossanitário. Amostras compostas de 237 lotes de sementes de diferentes gramíneas forrageiras, procedentes dos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Bahia e Goiás, foram analisadas quanto à ocorrência de nematoides e fungos (Tabela 1). Tais amostras foram coletadas e enviadas ao laboratório de Nematologia da FCAV-UNESP pelos técnicos da empresa Comércio e Indústria Matsuda Imp., Exp. Ltda., com sede no município de Álvares Machado (SP). Os nematoides foram extraídos das sementes pela técnica de Coolen & D'Herde (1972) de alíquotas de 10 g de sementes. A população total de nematoides fitoparasitos nas suspensões aquosas de cada amostra, obtidas ao final, foi estimada com o auxílio de um microscópio fotônico e da câmara de contagem de Peters (Southey, 1970).

Para detecção dos fungos, utilizou-se o método do papel de filtro (Blotter-test), conforme descrito pela International Seed Testing Association (ISTA, 1976). Foram utilizadas placas de Petri de plástico com 15 cm de diâmetro, onde foram colocadas três folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada. Foram adotadas 10 repetições compostas por 10 sementes equidistantes por placa, totalizando 100 sementes analisadas por lote. As placas foram fechadas para manutenção da umidade e mantidas em câmara incubadora com alternância de ciclos de luz e escuro de 12 horas e temperaturas de 20 a 21 °C, onde permaneceram por 10 dias. Foram utilizadas

lâmpadas de 40 watts a 40 cm acima das placas. As identificações dos fungos foram realizadas com base nas características morfológicas, com auxílio de um microscópio fotônico e um estereoscópio, utilizando a chave de classificação de Barnett & Hunter (1998).

Multiplicação dos nematoides *in vitro*. Para facilitar os estudos de taxonomia, procedeu-se à multiplicação *in vitro* das espécies partenogenéticas, *Aphelenchoides sexlineatus*, *Aphelenchus* sp. e *Ditylenchus montanus*, no laboratório de Nematologia da FCAV-UNESP. Culturas de um isolado de *Fusarium* sp. obtido de inhame (*Colocasia esculenta*) e de *Didymella bryoniae* obtido de melão (*Cucumis melo*) foram utilizadas para a multiplicação dos nematoides em placas de Petri. Dez fêmeas de cada espécie foram axenizadas separadamente em solução de ampicilina a 0,1 % e inoculadas em culturas dos fungos com cinco dias de crescimento em B.D.A. A seguir foram incubados em B.O.D. a 25 ± 1 °C, no escuro. Aos 30 dias após a inoculação, efetuou-se a extração dos nematoides pela técnica do funil de Baermann. As populações nas suspensões obtidas foram estimadas sob estereoscópio com auxílio da câmara de contagem de Peters (Southey, 1970). Com os dados obtidos foi estimado o fator de reprodução dos nematoides segundo Oostenbrink (1966).

Estudo taxonômico dos nematoides. Preparo dos nematoides para estudo ao microscópio fotônico. Os espécimes obtidos foram retirados das suspensões sob estereoscópio, com auxílio de aparato preparado com um pelo suíno, semelhante a um estilete, e transferidos para frascos de vidro de 10 ml, contendo cerca de 5 ml de água filtrada. Esses frascos foram tampados e agitados manualmente por cerca de 2 minutos. Então foram colocados em banho-maria a 55 °C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 ml de formalina a 8 % em cada frasco, os quais foram armazenados, no escuro, até o preparo e montagem de lâminas semipermanentes e permanentes.

As montagens temporárias foram preparadas transferindo-se 10 a 15 espécimes vivos de uma dada população, para uma gota de água filtrada colocada no centro de uma lâmina de vidro sob estereoscópio. Os espécimes foram relaxados em chama de uma lamparina a álcool e, em seguida, arranjados lado a

Tabela 1 - 'Gramíneas forrageiras e respectivos lotes de sementes amostrados quanto às ocorrências de nematóides e fungos.

Forrageiras	Quantidade de lotes analisados	Quantidades de lotes analisados por município
<i>Brachiaria brizantha</i>	77	3-Rio Verde-GO
		1-São Desidério-BA
		68-Tupaciguara-MG
		4-Chapada Gaúcha-MG
<i>Brachiaria decumbens</i>	65	4-Chapada Gaúcha-MG
		1-Costa Machado-SP
		2-Jardinópolis-SP
		5-Restinga-SP
		2-Santo Anastácio-SP
		2-São Desidério-BA
		47-Tupaciguara-MG
<i>Brachiaria dictyonera</i>	20	2- Unai-MG
		12-Costa Machado-SP
		1-Rancharia-SP
		3-Ribeirão dos Índios-SP
		3-Santo Anastácio-SP
		1-Tupaciguara-MG
<i>Brachiaria humidicola</i>	7	Aguas Claras-MS
		Canarana-MT
		João Pinheiro-MG
		Canarana-MT
		João Pinheiro-MG
		Sandovalina-SP
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	5	João Pinheiro-MG
		2-Posse-GO
		3-São Desidério-BA
<i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça	4	1-Santo Anastácio-SP
		3-Auriflama-SP
<i>Panicum maximum</i> cv. Massai	2	Paranapuã-SP
<i>Paspalum atratum</i> (capim Pojuca)	1	Santo Anastácio-SP
<i>Setaria anceps</i> cv. Kazungula	2	2-Ivinhema-MS
<i>Panicum maximum</i> cv. Tanzânia	2	2-Auriflama-SP
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG-4	35	2-Chapada Gaúcha-MG
		2-Santo Anastácio-SP
		10-São Desidério-BA
		21-Tupaciguara-MG
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG-5	8	1-Costa Machado-SP
		3-São Desidério-BA
		4-Tupaciguara-MG
<i>Panicum maximum</i> cv. Áries	6	2-Santo Anastácio-SP
		2-Costa Machado-SP
		2-Rinópolis-SP
<i>Panicum maximum</i> (Capim Aruana)	2	1-Tupaciguara-MG
		1-Costa Machado-SP
<i>Pennisetum glaucum</i> (Milheto)	1	SEM REGISTRO

lado no fundo e no centro da gota. Então, depositou-se uma lamínula de 21 x 22 mm e efetuou-se a lutagem com esmalte de unha incolor (Tihohod, 1989). As observações e fotomicrografias foram efetuadas até 3 h após a montagem. Foram examinados e

documentados fêmeas e machos. As montagens semipermanentes foram preparadas transferindo-se alguns espécimes fixados para uma gota da solução fixadora no centro de lâminas de vidro, seguidas da deposição da lamínula e lutagem, como no caso

anterior. As montagens permanentes foram efetuadas pelo método da infiltração dos espécimes com glicerina, segundo Seinhorst (1959).

Os espécimes foram examinados e fotomicrografados em um sistema de aquisição de imagens constituído por uma câmera digital Sony Hiper HAD® (Sony Electronics Inc., 1 Sony Drive, EUA), montada sobre um microscópio Olympus BX50® (Olympus do Brasil, São Paulo, SP) e acoplada a um microcomputador. As imagens foram digitalizadas e gravadas em computador para serem posteriormente medidas. Pelo menos 10 fêmeas de cada população foram documentadas. As mensurações nas imagens digitalizadas foram feitas utilizando-se do programa Image Pro-Plus da Media Cybernetics® (Silver Spring, MD, EUA).

Preparação dos nematoides para a microscopia eletrônica de varredura. Cerca de 1.000 espécimes de cada grupo, recém-extraídos, foram transferidos como descrito no item anterior para os frascos contendo 3/4 de seus volumes preenchidos com água filtrada. A seguir, os frascos foram agitados manualmente por cerca de 5 minutos e deixados em repouso, em refrigerador, a 5 °C, por cerca de 1 hora. Subsequentemente, o volume de água de cada frasco foi reduzido a 0,5 ml com uma seringa hipodérmica, e os frascos novamente deixados em geladeira por 20 minutos. A seguir, o volume de cada frasco foi preenchido com a solução fixadora constituída de glutaraldeído a 3 % e formaldeído a 2 % (preparado a partir de paraformaldeído), em solução-tampão de fosfato de sódio a 0,05 M e pH 7,4 e resfriada a 1 °C. Os frascos foram mantidos em geladeira para que os nematoides se mantivessem relaxados durante todo o processo de fixação. Após o período mínimo de 72 h, o processo de preparo teve prosseguimento. Os nematoides em suspensão foram transferidos com pipeta Pasteur, para câmaras preparadas com cápsulas de polietileno utilizadas em inclusão de amostras para microscopia eletrônica de transmissão e tela de *silk-screen* com poros de 25 mm, conforme descrito por Eisenback (1991). Finalmente, os nematoides foram observados e eletromicrografados em microscópio eletrônico JEOL JSM 5410, operado em 15 kV. Foram documentados a morfologia da região labial, em vista

lateral e de topo, os campos laterais, a genitália externa e a cauda de fêmeas e de machos.

Identificação de espécies de fitonematoides em sementes de gramíneas forrageiras. Os dados obtidos aos microscópios fotônico e eletrônico de varredura foram submetidos às chaves de identificação obtidas na literatura. Para espécies de *Aphelenchoides*, foram utilizadas as chaves publicadas por vários autores (Sanwal, 1961; Baujard, 1989; Tacconi & Ambrogioni, 1993; Shahina, 1996). Para identificação de espécies de *Ditylenchus*, foram utilizadas as chaves propostas por Fortuner (1982), Hooper & Southey (1978) e Brzeski (1991).

Resultados e Discussão

Estudo fitossanitário. Observou-se que as sementes são meio potencial de disseminação tanto de nematoides quanto de fungos (Tabela 2). Nas sementes habitualmente colhidas no cacho, tais como as de milheto e *Brachiaria ruziziensis*, recuperou-se pequena quantidade ou nenhum nematoide nas amostras. As demais sementes continham expressivas quantidades de nematoides. Em todos os lotes de sementes de forrageiras foram detectadas espécies de *Fusarium*, *Helminthosporium* e *Phoma*. Algumas espécies fitoparasitas dos fungos encontrados nesse levantamento são também patógenos de outras culturas e, por isso, possuem implicações de natureza quarentenária, o que dificulta a comercialização internacional de sementes forrageiras.

A infecção das sementes por esses microorganismos dá-se predominantemente no solo, onde são contaminadas por diversos nematoides e fungos, incluindo parasitos facultativos que têm vida saprofítica no solo, tais como espécies dos nematoides *Aphelenchoides*, *Ditylenchus* e dos fungos *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Alternaria*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Rhizoctonia*, *Pythium* e *Cylindrocladium*, dentre outros (Ferreira, 1989; Favoreto, 2008). Os fungos encontrados nas sementes apresentam rápido crescimento micelial e esporulação, o que pode facilitar a contaminação de sementes sadias durante o período de transporte, de beneficiamento e/ou armazenamento (Meneses & Oliveira, 1993).

Multiplicação dos nematoides *in vitro*. Na Tabela 3, observa-se que todas as espécies de

Tabela 2 - Principais fungos e nematoides encontrados em diferentes lotes de sementes de gramíneas forrageiras, oriundas dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia e Goiás.

Forrageiras	Média da porcentagem de sementes infectadas com fungos ¹			Média do número de nematoides em 10 g de sementes	
	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Helminthosporium</i> sp.	<i>Phoma</i> sp.	<i>Ditylenchus</i> spp.	<i>Aphelenchoides</i> spp.
<i>Brachiaria brizantha</i>	61,5	27	13	128	496
<i>B. decumbens</i>	55	22	8	96	288
<i>B. dictyonera</i>	37	5,5	17	148	48
<i>B. humidicola</i>	45	34	11,5	6,9	184
<i>B. ruziziensis</i>	77	74	27	1,6	6,4
<i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça	72,5	30	4	32	200
<i>Panicum maximum</i> cv. Massai	59	18	26,5	132	252
<i>Paspalum atratum</i> (capim Pojuca)	62	14	16	176	832
<i>Setaria anceps</i> cv. Kazungula	45,5	1,5	2,5	0	128
<i>Panicum maximum</i> cv. Tanzânia	47,5	8	14,5	68	1332
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG-4	68	24	9	112	272
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG-5	70	59	23	34,7	133,3
<i>Panicum maximum</i> cv. Áries	26	17	13	216	1316
<i>Panicum maximum</i> (capim Aruana)	12	11,5	4,5	212	552
<i>Pennisetum glaucum</i> (Milheto)	45	11	1	0	0

¹Infeção média em 100 sementes.

Tabela 3 - Reprodução dos nematoides *Aphelenchoides sexlineatus* (Aph), *Ditylenchus montanus* (Dity) e *Aphelenchus* sp. (Aphec) recuperados das culturas de *Fusarium* sp. (F) e *Didymella brioniae* (D), avaliada com base no fator de reprodução [FR = população final (Pf) / população inicial (Pi)] após 30 dias.

Culturas	Pi			P f			FR		
	Aph	Dity	Aphec	Aph	Dity	Aphec	Aph	Dity	Aphec
F	10	10	10	13.920	8.832	38.384	1.392,0	883,2	3.838,4
D	10	10	10	10.656	3.144	6.304	1.065,6	314,4	630,4

Médias de cinco repetições.

nematoides se multiplicaram em culturas de *Fusarium* sp. e *Didymella brioniae*. Porém, existem diferenças entre os fatores de reprodução dos nematoides. As maiores médias de multiplicação foram alcançadas pela espécie de *Aphelenchus* quando em cultura de *Fusarium* sp., seguida de *Aphelenchoides sexlineatus* e *Ditylenchus montanus*. Porém, quando em cultura de *D. brioniae*, observou-se que *A. sexlineatus* foi a que mais se multiplicou, seguida de *Aphelenchus* sp. e de *D. montanus*. A grande variabilidade morfológica em ambos os gêneros e a escassez de espécimes adultos nas amostras analisadas torna a taxonomia desses nematoides muito difícil em relação aos demais. Além disso, conforme menção de Tenente *et al.* (1994), os estudos sobre a biologia destes fitonematoides demandam um grande número de indivíduos, notadamente quando envolve inoculação.

Esses nematoides não são parasitos obrigatórios de plantas, podendo atuar como ectoparasitos ou endoparasitos, dependendo do hospedeiro. Na

ausência de plantas hospedeiras, cultivadas ou invasoras, podem sobreviver no solo alimentando-se de fungos saprófitos ou fitopatogênicos (Pederson & Quesenberry, 1998). A multiplicação de nematoides *in vitro* facilita os estudos de taxonomia, a produção de inóculo para diferentes propósitos, assim como estudos moleculares e da biologia desses organismos. Estudos sobre a multiplicação de espécies de *Aphelenchoides* e *Ditylenchus* em diferentes meios de culturas já foram relatados por diversos pesquisadores (Tenente *et al.*, 1994; Ruess *et al.*, 2000). Segundo Ruess *et al.* (2000), espécies de *Aphelenchoides* são consideradas generalistas, polífagas, alimentando-se de ampla gama de diferentes gêneros de fungos. Ainda, alguns fungos possuem maiores valores nutricionais do que outros, podendo suportar maiores populações de nematoides. Os resultados observados neste trabalho indicaram que ambos os fungos podem ser bons hospedeiros.

Estudo taxonômico dos nematoides. Foram identificadas quatro espécies de *Aphelenchoides* a partir

das sementes de gramíneas estudadas: *A. besseyi*, *A. bicandatus*, *A. fragariae* e *A. sexlineatus*. Uma vez que as suspensões de nematoides foram misturadas, não foi possível determinar a distribuição geográfica das espécies. Os espécimes da primeira espécie foram identificados com base nas seguintes características: o comprimento do estilete de 15 μm (Figura 1A), campo

lateral com quatro linhas (Figuras 1B e 2B), saco pós-uterino estreito sem a presença de espermatozoides (Figura 1C) e cauda mucronada exibindo três (Figura 1D) e quatro mucros (Figuras 2C e D). Esses caracteres, de acordo com as chaves obtidas da literatura (Sanwal, 1961; Baujard, 1989; Tacconi & Ambrogioni, 1993; Shahina, 1996), indicam que se trata de *A. besseyi*. Além

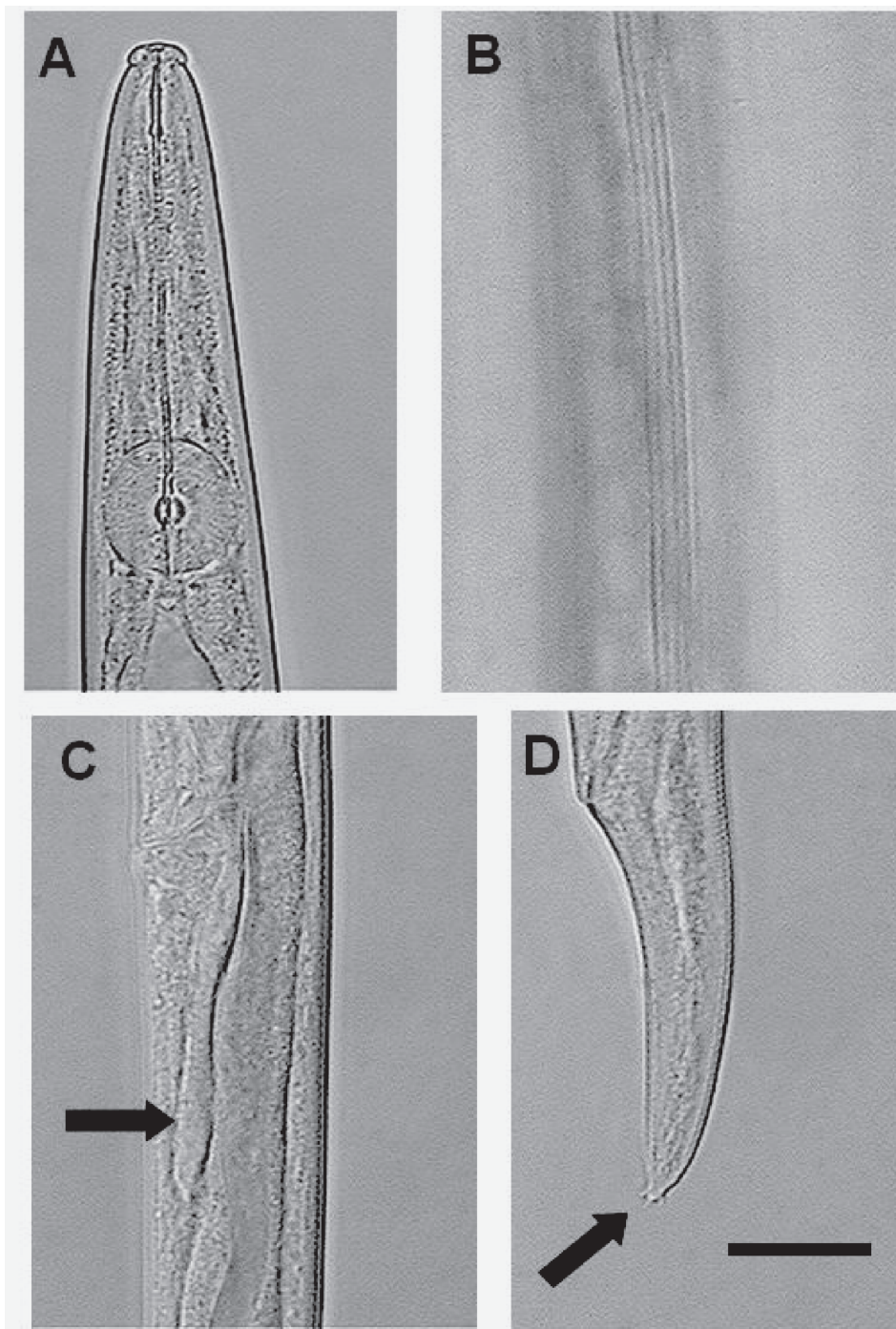


Figura 1 - Fotomicrografias de *Apbelenchoides besseyi* extraídos de sementes de *Brachiaria brizantha*. **A)** Fêmea, parte anterior do corpo; **B)** Fêmea, campo lateral com quatro linhas; **C)** saco pós-uterino; **D)** Fêmea, cauda mucronada com três mucros. Barra de escala para todas as figuras = 20 μm .

de *A. besseyi*, outra espécie do grupo encontrada exibiu o comprimento do estilete de 10 μm (Figura 3A), ovário longo exibindo ovo (Figuras 3B e C), campo lateral com duas linhas (Figura 3D), saco pós-uterino estreito não contendo espermatozoides (Figura 3E) e cauda bifurcada (Figura 3F). Esses caracteres, de acordo com Tacconi & Ambrogioni (1993) e Shahina (1996), indicam que se trata de *A. bicandatus*.

Outra espécie de *Aphelenchoides* encontrada exibiu o comprimento do estilete de 10 μm e região labial mais larga que o primeiro anel do corpo (Figura 4A), duas linhas no campo lateral (Figura 4B), saco pós-uterino longo quando comparado a *A. besseyi* e *A. bicandatus* (Figura 4C), e cauda mucronada exibindo um mucro na fêmea (Figuras 4D) e no macho (Figura 4E). Esses caracteres, de acordo com Baujard (1989) e Shahina (1996), indicam que se trata de *A. fragariae*.

Encontrou-se uma espécie partenogenética, exibindo o comprimento do estilete de 9 μm , região labial ligeiramente mais larga que o primeiro anel do corpo (Figuras 5A, 6A e B), saco pós-uterino longo e estreito (Figura 5B), cauda mucronada (Figura 5C), porém exibindo mucros com crescimento fora dos padrões de espinho e estrela (Figuras 6E e F). Este

tipo de formação nos mucros, segundo Shahina (1996), caracteriza o grupo 4 de caudas mucronadas e campo lateral com seis linhas (Figuras 6G e H). Essas características morfológicas, segundo o mesmo autor, referem-se *A. sexlineatus*.

Aphelenchoides besseyi é um patógeno da cultura de arroz, agente causal da doença referida como Ponta Branca, de ampla distribuição mundial (McGawley & Overstreet, 1998). Por esse motivo, a presença desse nematoide em sementes de gramíneas forrageiras tem sérias implicações no comércio internacional de sementes de forrageiras, uma vez que países compradores de tais sementes consideram esse nematoide como praga quarentenária. *Aphelenchoides bicandatus* é um nematoide micofago, porém pode ser encontrado na rizosfera de importantes culturas, tais como milho, algodão, cana de açúcar, arroz e tomate, sem no entanto causar prejuízo (Siddiqui, 1976). *Aphelenchoides fragariae* é conhecido como nematoide-das-folhas e botões florais, sendo o morangueiro seu hospedeiro-tipo, porém pode se alimentar e multiplicar em culturas de diversos fungos (Cares *et al.*, 2008). A espécie partenogenética, *A. sexlineatus*, não havia sido anteriormente relatada no Brasil. Muito

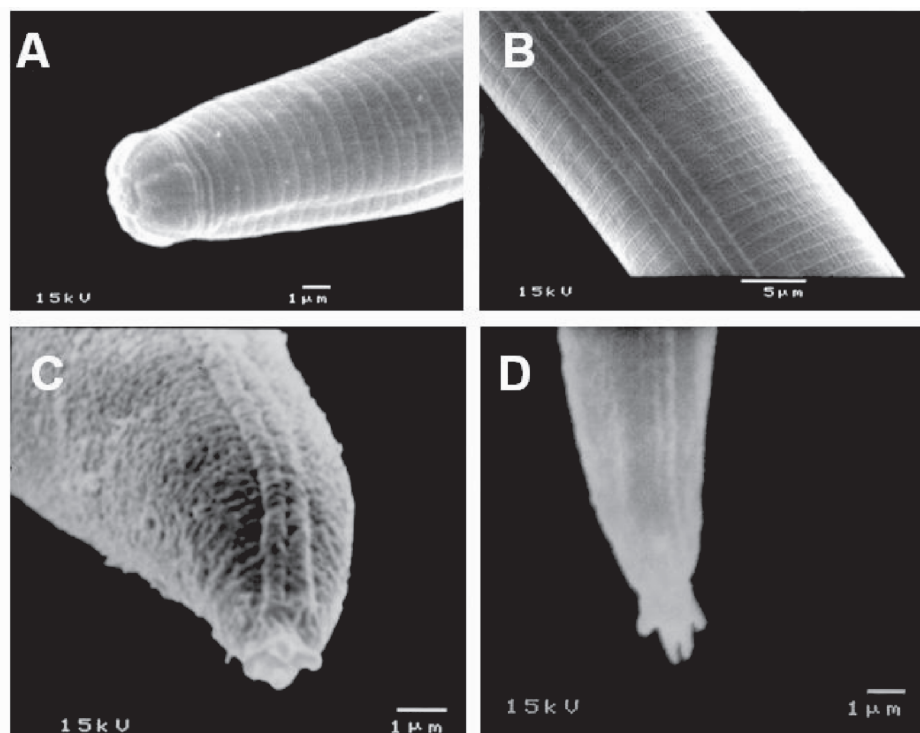


Figura 2 - Eletromicrografia de varredura de *Aphelenchoides besseyi* extraídos de sementes de *Brachiaria brizantha*. **A)** Fêmea, região labial, **B)** Fêmea, quatro linhas no campo lateral; **C e D)** Fêmea, cauda com quatro mucros.

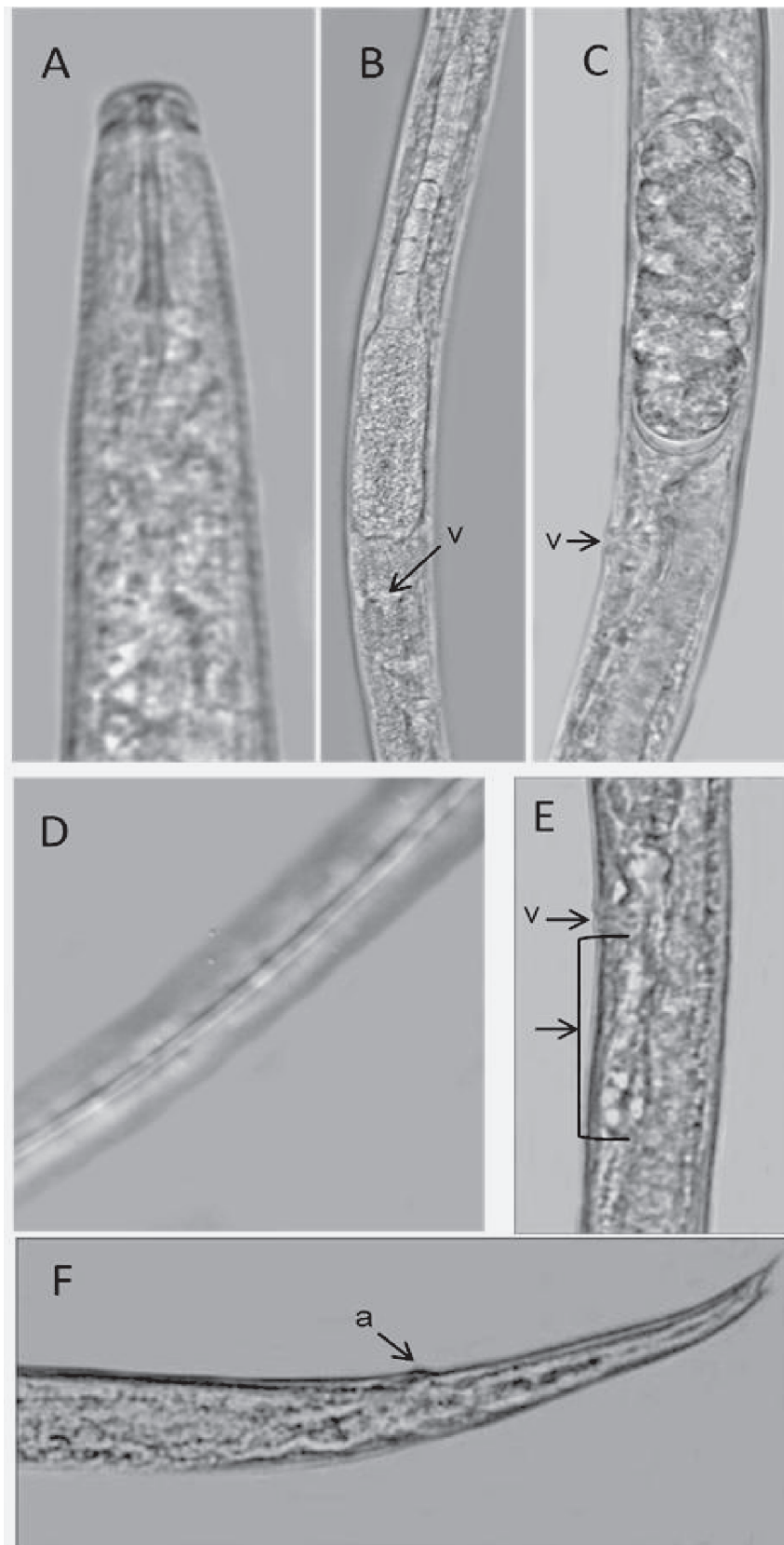


Figura 3 - Fotomicrografia de *Aphelenchoides bicaudatus* extraídos de sementes de *Brachiaria brizantha*. **A)** Fêmea, extremidade anterior; **B)** ovário longo; **C)** ovo; **D)** fêmea, campo lateral exibindo duas linhas; **E)** saco pós-uterino; **F)** cauda bimucronada (v = vulva, a = ânus). Barra de escala para todas as figuras = 20 μ m.

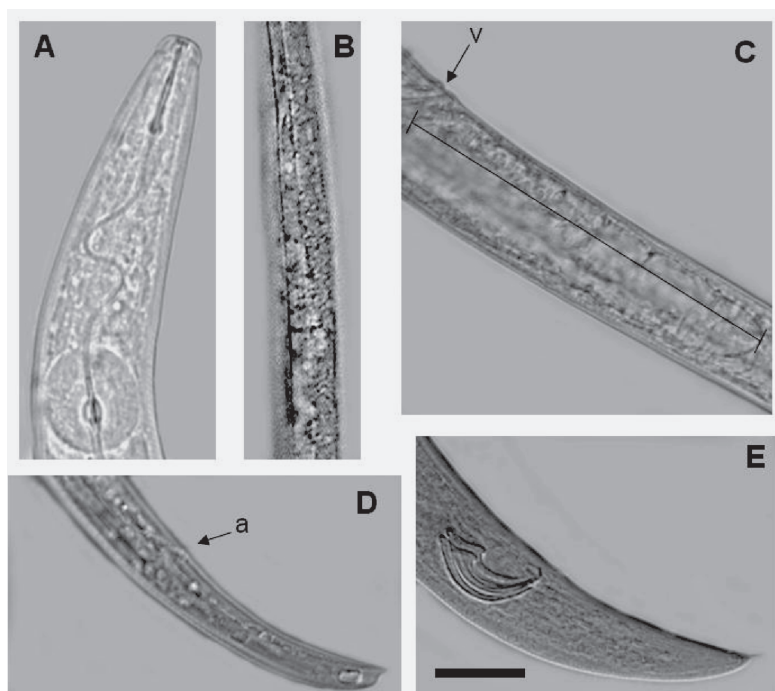


Figura 4 - Fotomicrografia de *Apbelenchooides fragariae* extraídos de sementes de *Brachiaria brizantha*. **A)** Fêmea, extremidade anterior; **B)** fêmea, duas linhas no campo lateral; **C)** saco pós-uterino (v = vulva); **D)** cauda mucronada da fêmea (a = ânus); **E)** cauda mucronada do macho. Barra de escala para todas as figuras = 20 μ m.

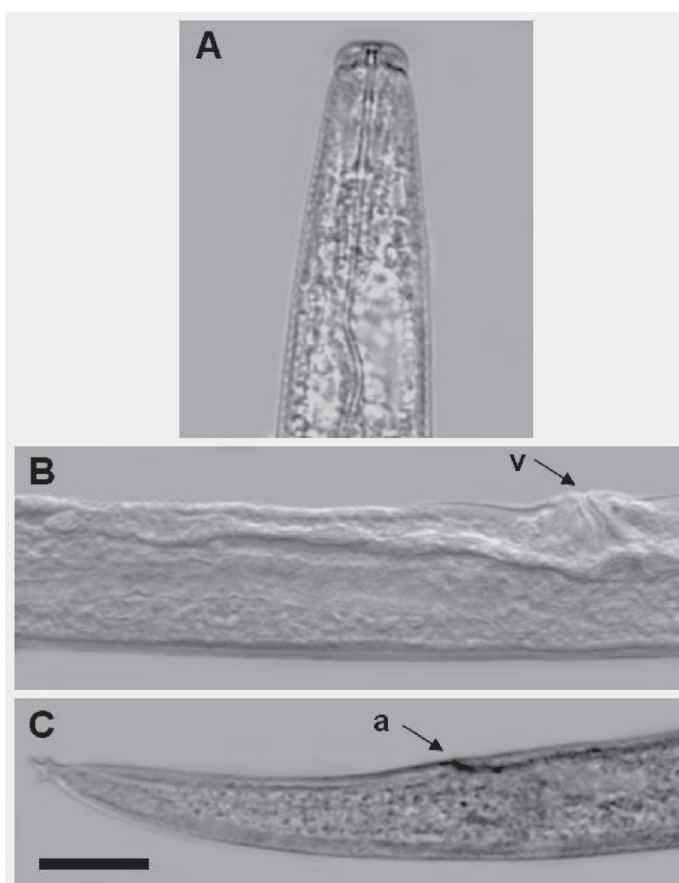


Figura 5 - Fotomicrografia de *Apbelenchooides sexlineatus* (partenogenética) extraídos de sementes de *Brachiaria brizantha*. **A)** Extremidade anterior; **B)** saco pós-uterino; **C)** Cauda mucronada (v = vulva, a = ânus). Barra de escala para todas as figuras = 20 μ m.

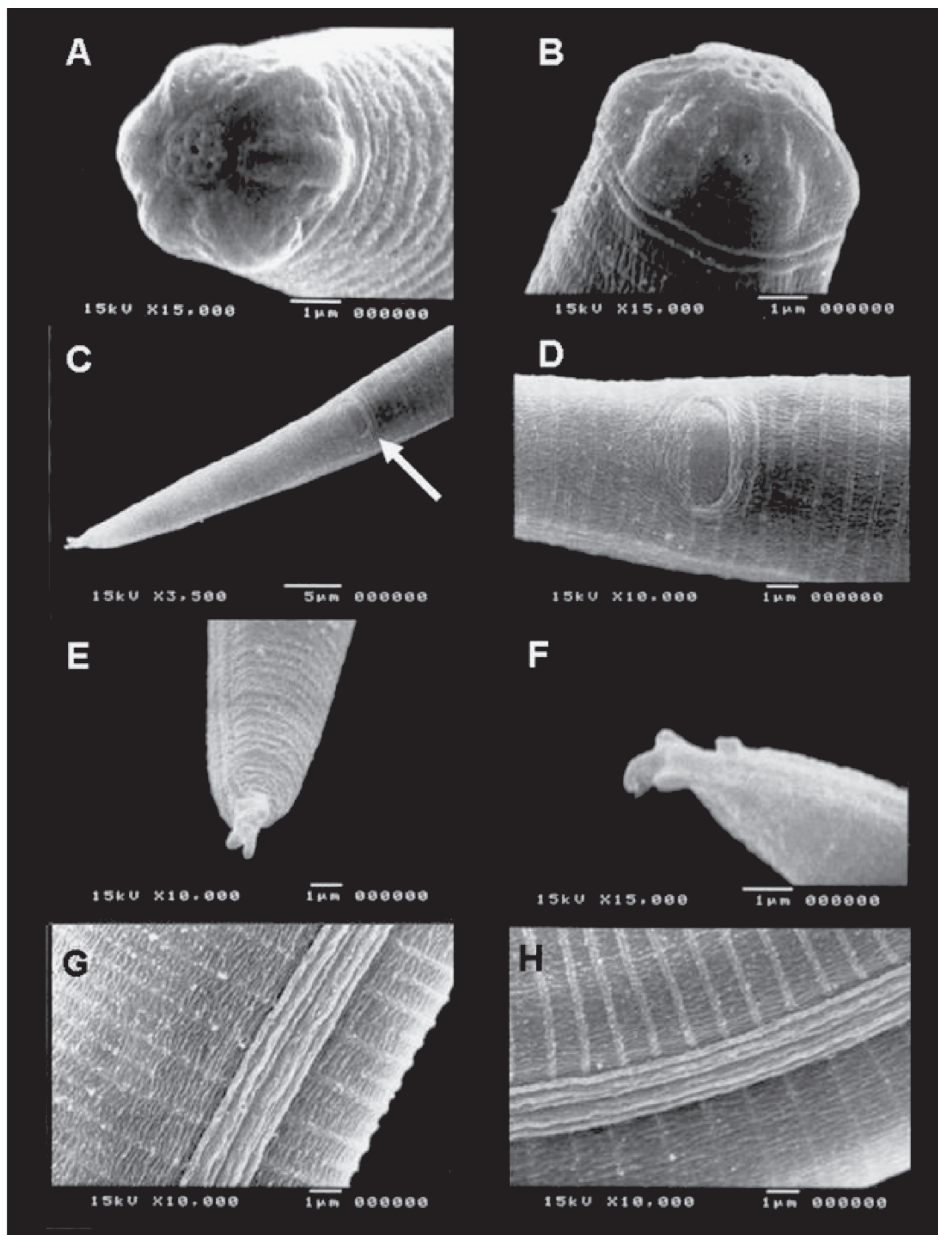


Figura 6 - Eletromicrografia de varredura de *Apbelenchoides sexlineatus* (partenogenética) extraídos sementes de *Brachiaria brizantha*. **A,B**) Região labial; **C**) cauda mucronada (v = vulva); **D**) vulva; **E,F**) mucro; **G,H**) seis linhas no campo lateral.

pouco se sabe desta espécie, que também parece ser micófaga, conseguindo se reproduzir muito bem nas duas espécies de fungos testadas neste trabalho.

Entre as espécies de *Ditylenchus* encontradas, uma exibiu o comprimento médio do estilete de 7,1 µm (Figura 7A). O bulbo mediano é fusiforme com paredes do lúmen espessas (Figura 7B), sobreposição ligeiramente dorsal do esôfago sobre o intestino (Figura 7C), campo lateral com seis linhas (Figuras 7D), saco pós-uterino medindo cerca da metade da distância entre a vulva e o ânus (Figura 7E) e, cauda

com término variando de subagudo a ligeiramente arredondado (Figuras 7F e G). Esses caracteres, de acordo com Hooper & Southey (1978) e Fortuner (1982) indicam que se trata de *Ditylenchus myceliophagus*. Além de *D. myceliophagus*, outra população do grupo também foi encontrada exibindo o comprimento médio do estilete de 10 µm. Observou-se que a região labial exibe três anéis, também dividida em seis setores, sendo os lábios laterais menores que os submedianos (Figuras 8A). A cauda é pontiaguda (Figuras 8B e C) e o campo lateral exibe apenas quatro linhas (Figura

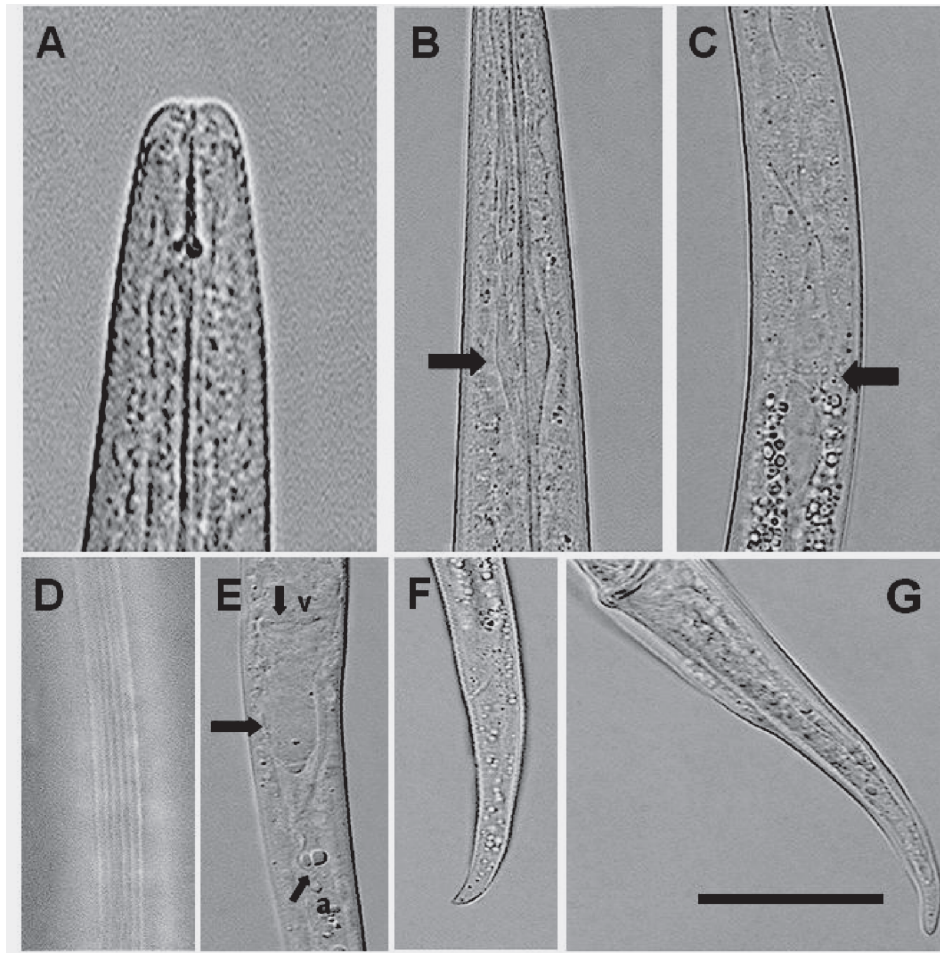


Figura 7 - Fotomicrografia de *Ditylenchus myceliophagus* extraídos de sementes de *Brachiaria brizantha*. **A)** Fêmea, região anterior; **B)** Fêmea, bulbo mediano fusiforme; **C)** fêmea, ligeira sobreposição dorsal do esôfago sobre o intestino; **D)** fêmea, seis linhas no campo lateral; **E)** saco pós-uterino (v = vulva, a = ânus); **F)** cauda da fêmea; **G)** cauda do macho. Barra da escala = 10 μ m para todas as figuras.

8D). Esses caracteres indicam que se trata de *Ditylenchus dipsaci* (Hooper & Southey, 1978; Fortuner, 1982). Foi encontrada uma espécie partenogenética, também neste grupo, que exibia o comprimento médio do estilete de 12 μ m (Figura 9A). Ao MEV, observou-se que a placa labial aproximadamente quadrada, dividida em seis setores, disco labial circular e proeminente, lábios submedianos fundidos com ligeira constrição dos lados ventral e dorsal, e lábios laterais visivelmente menores que os submedianos (Figuras 10A e B). A cauda exibe término agudo (Figuras 9B, 10C e D), saco pós-uterino curto quando comparado às demais espécies do grupo mencionado (Figura 9C), e o campo lateral exibindo seis linhas (Figuras 10G e H). Esses caracteres, indicam tratar-se de *Ditylenchus montanus* (Hooper & Southey, 1978; Fortuner, 1982).

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

Foi observado também em sementes de gramíneas

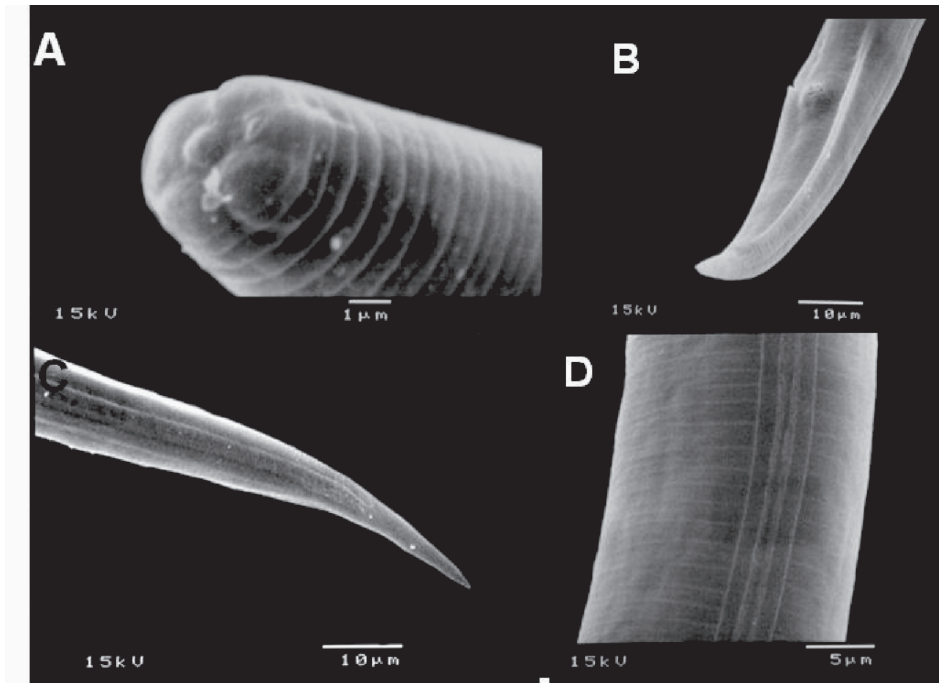


Figura 8 - Eletromicrografia de varredura de *Ditylenchus dipsaci* extraídos sementes de *Brachiaria brizantha*. **A)** Fêmea, região labial; **B)** cauda do macho; **C)** cauda da fêmea; **D)** fêmea, quatro linhas no campo lateral.

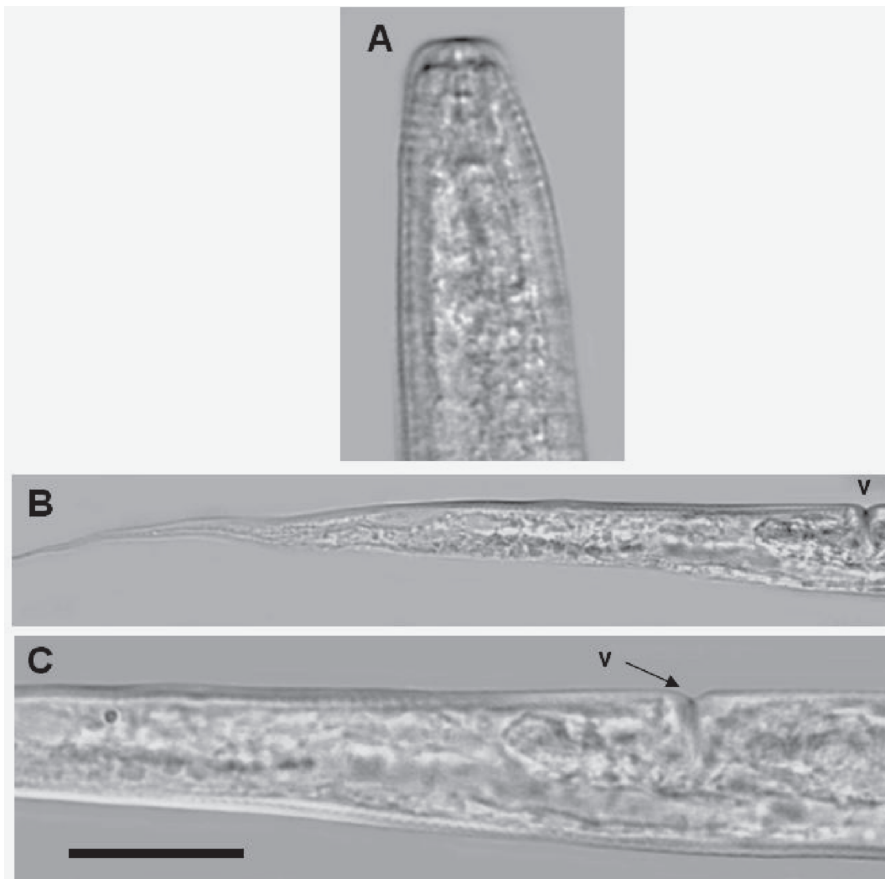


Figura 9 - Fotomicrografia de *Ditylenchus montanus* (partenogenética) extraídos de sementes de *Brachiaria brizantha*. **A)** Fêmea, parte anterior; **B)** cauda da fêmea; **C)** saco pós-uterino (v = vulva). Barra da escala = 10 µm para todas as figuras.

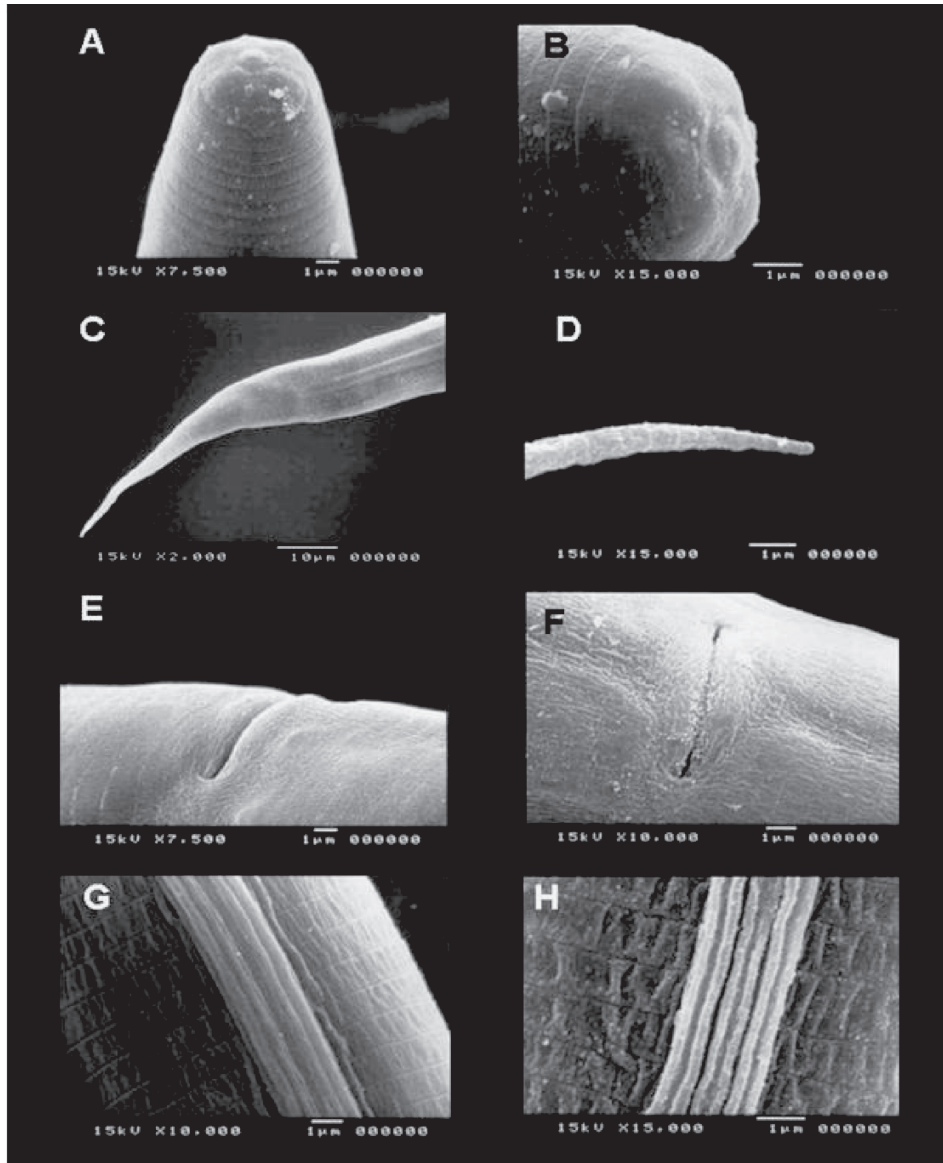


Figura 10 - Eletromicrografia de varredura de *Ditylenchus montanus* (partenogenética) extraídos sementes de *Brachiaria brizantha*. **A,B)** Região labial; **C,D)** cauda pontiaguda; **E,F)** vulva; **G,H)** seis linhas no campo lateral.

forrageiras uma espécie partenogenética de *Aphelenchus* que ainda não foi identificada. Ao MEV, observa-se que a placa labial é arredondada, dividida em seis setores, disco labial circular e pouco proeminente (Figuras 11A e B). A cauda terminando com a largura aproximadamente igual à largura do corpo (Figuras 11C e D) e dez linhas no campo lateral (Figura 11F). Não existe registro de nematoide com tais características no Brasil, sendo que esse grupo é muito pouco estudado no mundo. Por conseguinte, estudos adicionais precisam ser realizados para que se possa conhecer melhor sobre a biologia, interações com as

forrageiras e métodos para a desinfestação de grandes quantidades de sementes, facilitando a exportação destes produtos.

Agradecimentos

À Empresa Sementes Matsuda Ltda., pelo suporte na condução dos experimentos; à Dra. Renata C.V. Tenente, à Dra. Sue Hockland, ao Dr. Vilmar Gonzaga e ao Dr. Juvenil E. Cares, pela ajuda na confirmação de algumas espécies de nematoides; à Dra. Rita de Cássia Panizzi e à MSc. Delineide Pereira Gomes, pela identificação dos fungos; ao Conselho Nacional de

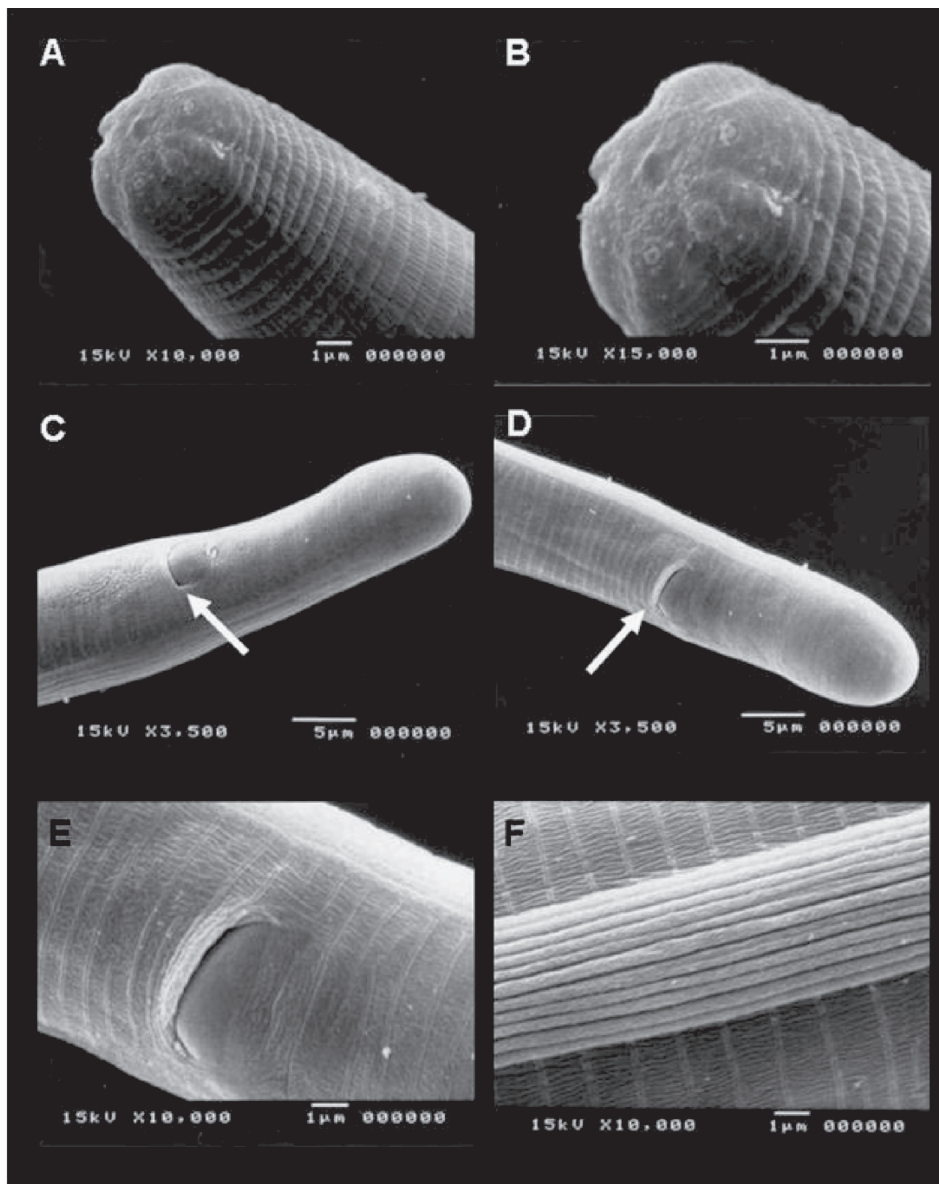


Figura 11 - Eletromicrografia de varredura de *Apbelenchus* sp. (partenogenética) extraídos de sementes de *Brachiaria brizantha*. **A,B)** Região labial; **C,D)** cauda (v = vulva); **E)** vulva; **F)** linhas do campo lateral.

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

Literatura Citada

- BARNETT, H.L. & B.B. HUNTER. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4 ed. The American Phythological Society. St. Paul (MN) EUA, 218 p.
- BAUJARD, P. 1989. Identification of Aphelenchids. In: FORTUNER, R. Nematode Identification and Expert System Technology. Plenum Publishing Corporation, New York, p. 153-156.
- BRZESKI, M.W. 1991. Review of the genus *Ditylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Anguinidae). Révue de Nématologie 14: 9-59.
- CARES, J.E., J.R.P. SANTOS & R.C.V. TENENTE. 2008. Taxonomia de nematóides de sementes, bulbos e caules – parte II. RAPP, 16: 39-84.
- COOLEN, W. A. & C. J. D'HERDE. 1972. A Method for the Quantitative Extraction of Nematodes from Plant tissue. State Agricultural Research Center, Ghent - Belgium, 77 p.
- EISENBACH, J.D. 1991. Preparation of nematodes for scanning electron microscopy. In: NICKLE, W.R. (ed). Manual of Agricultural Nematology, New York, p. 87-96.
- FAVORETO, L. 2004. Estudo de fitonematóides em sementes de gramíneas forrageiras. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal (SP), 43 p.

- FAVORETO, L. 2008. Taxionomia, interação patógeno-hospedeiro, levantamento sanitário e denematização de sementes de gramíneas forrageiras. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal (SP), 53 p.
- FAVORETO, L. & J.M. SANTOS. 2004. Eficácia comparativa de métodos de extração de nematóides de sementes de gramíneas forrageiras. *Summa Phytopathologica*, 30 (1): 89 (Resumo).
- FAVORETO, L., J.M. SANTOS & A. TAKASHI, A. 2004. Nematóides detectados em amostras de sementes de gramíneas forrageiras. *Summa Phytopathologica*, 30 (1): 88-89 (Resumo).
- FAVORETO, L., J.M. SANTOS, A. TAKASHI, N.R. RIBEIRO, A.M. TOLEDO & A.S. CAMPOS. 2003. Nematóides em sementes de gramíneas forrageiras do Brasil. *Nematologia Brasileira*, 24: 143 (Resumo).
- FERREIRA, F.A. 1989. Patologia Florestal; Principais Doenças Florestais no Brasil. Sociedade de Investigação Florestais, Viçosa, 570 p.
- FORTUNER, R. 1982. On the genus *Ditylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Tylenchida). *Révue de Nématologie*, 5: 17-38.
- FORTUNER, R. & K.J.O. WILLIAMS, 1975. Review of the literature on *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942, the nematode causing white tip disease of rice. *Helminthological Abstracts, Farmham Royal - UK*, 44 (1): 1-40.
- GOODEY J.B., M.T. FRANKLIN & D.J. HOOPER. 1965. The nematodes parasites of plants catalogued under their hosts. Technical Communication of the Commonwealth Bureau of Helminthology, St. Albans - UK, 214 p.
- HOOPER, D.J. & J.F. SOUTHEY. 1978. *Ditylenchus anguina* and related genera. In: SOUTHEY, J.F. (ed). *Plant Nematology*. Ministry of Agriculture Fisheries, and Food, London, p. 78-97.
- ISTA - INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 1976. Seed health testing. *Seed Science and Technology, Bangalore - Índia*, 4: 3-49.
- McGAWLEY, E.C. & C. OVERSTREET. 1998. Rice and other cereals. In: BARKER, K.R., G.A. PETERSON, G.L. WINDHAM, J.M. BARTELS, J.M. HATFIELD, P.S. BAENZIGER & J.M. BIGHAM (ed). *Plant and Nematode Interactions*. American Society of Agronomy, Madison, p. 455-486.
- MENESES, M. & S.M. OLIVEIRA. 1993. Fungos Fitopatogênicos. UFRPE. Imprensa Universitária, Recife, 277 p.
- NICKLE, W.R. & D.J. HOOPER. 1991. The Aphelenchina: Bud, Leaf, and Insect Nematodes. In: NICKLE, W.R. (ed). *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, New York, p. 465-507.
- OLIVEIRA, M.P. 1994. Comércio de sementes movimentadas US\$ 250 milhões por ano no País. *Folha de São Paulo*, São Paulo, p. 3-6.
- OOSTENBRINK, M., 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Med. Landbouwhogeschool, Wageningen*, 66: 3-46.
- PEDERSON, G.A. & K.H. QUESENBERRY. 1998. Clovers and other forage legumes In: BARKER, K.R., G.A. PETERSON, G.L. WINDHAM, J.M. BARTELS, J.M. HATFIELD, P.S. BAENZIGER & J.M. BIGHAM (ed). *Plant and Nematode Interactions*. American Society of Agronomy, Madison, p. 399-426.
- RUESS, L., E.J.G. ZAPATA & J. DIGHTON. 2000. Food preferences of a fungal-feeding *Aphelenchoides* species. *Nematology*, 2 (2): 223-230.
- SANTOS, G.F. & L.F. SANTOS FILHO. 1999. Pastagens tropicais no Brasil. In: Workshop sobre Sementes de Forrageiras, I. Embrapa, Sete Lagoas, p. 27-35.
- SANWAL, K.C.A. 1961. Key to the species of the nematode genus *Aphelenchoides* Fischer, 1894. *Canadian Journal of Zoology*, 39: 143-148.
- SEINHORST, J. W. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, 4: 67-69.
- SHAHINA, F. 1996. A diagnostic compendium of the genus *Aphelenchoides* Fischer, 1894 (Nematoda: Aphelenchida) with some new records of the group from Pakistan. *Pakistan Journal of Nematology*, 4: 1-32.
- SHARMA, R.D., M.J.B. CAVALCANTI & J.F. VALENTIN. 2001. Nematóides associados ao capim Marandú no Estado do Acre. Embrapa Cerrados, Planaltina, 4 p. (Comunicado Técnico).
- SIDDQUI, L.A. 1976. *Aphelenchoides bicaudatus*. C.I.H. Description of Plant Parasitic Nematodes. 6 (84): 3 p.
- SILVA, S.C. & D. NASCIMENTO JUNIOR. 2006. Sistema intensivo de produção de pastagens. In: II Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal. <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>> acesso em 28 de fevereiro de 2008.
- SOARES, F.H. 2003. Comparação de testes de qualidade fisiológica em sementes de *Brachiaria brizantha* (Hoschst ex. A. Rich) Stapf cv. Marandu de diferentes regiões produtoras do Brasil. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal (SP), 79 p.
- SOUTHEY, J.F. 1970. Laboratory for Work with Plant and Soil Nematodes, 5ed. Ministry Agriculture and Fisheries, London, 148 p. (Bulletin, 2).
- SOUZA, F.H.D. de. 2001. Produção de Sementes de Gramíneas Forrageiras Tropicais. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos (SP), 43 p. (Documento, 30).
- STURHAN, D. & M.W. BRZESKI. 1991. Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. In: NICKLE, W. R. (ed) *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, New York, 423-464.
- TACCONI, R. & L. AMBROGIONI. 1993. *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 (Tylenchida, Aphelenchoididae). *Informatore Fitopatologico, Firenze*, 43: 50-56.
- TENENTE, R.C.V. & E.S.B.G. COSTA MANSO. 1994. Tratamento químico e térmico de sementes de arroz infestadas com *Aphelenchoides besseyi*. *Nematologia Brasileira*, 18: 28-34.
- TIHOHOD, D. 1989. *Nematologia Agrícola*. Vol. 1. Editora FCAV, Jaboticabal, 80 p.
- VERZIGNASSI, J.R. & C.D. FERNANDES. 2001. Doenças em Forrageiras. EMBRAPA Gado de Corte, Campo Grande, 3 p. (Circular 50).
- VIGLIERCHIO, D.R. 1971. Races gênesis in *Ditylenchus dipsaci*. *Nematologica*, 17: 386-392.