



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *PRATYLENCHUS* QUE
OCORREM NO BRASIL E A REAÇÃO DE ACESSOS DE MILHO A *P. ZEA* E *P.
BRACHYURUS***

EDNALVA PATRÍCIA DE ANDRADE

**BRASÍLIA-DF
2010**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**

Caracterização molecular de espécies de *Pratylenchus* que ocorrem no Brasil e a reação de acessos de milho a *P. zae* e *P. brachyurus*

EDNALVA PATRÍCIA DE ANDRADE

Tese apresentada ao Departamento de Fitopatologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção de grau de Doutor em Fitopatologia.

**BRASÍLIA-DF
2010**

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia, do Instituto de Ciências Biológicas de Brasília, sob a orientação do professor PhD Juvenil Enrique Cares, e com apoio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Tese aprovada em: ____/____/____ por:

Juvenil Enrique Cares, PhD.
Professor Associado da Universidade de Brasília
Departamento de Fitopatologia
Orientador

Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro, PhD
Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
CENARGEN
Examinador

Alexandre Moura Cintra Goulart, Dr
Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
CPAC
Examinador

Cleber Furlanetto, PhD
Professor adjunto da Universidade de Brasília (UnB)
Departamento de Fitopatologia
Examinador

Leonardo Silva Boitex, PhD
Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
CNPq
Examinador

DEDICATÓRIA

À minha querida e amada mãe por ter sempre acreditado em mim e ao meu Deus seja a honra, glória e louvor!

“Mãe você não se lembra, mas eu não esqueci as tuas orações, de joelhos dobrados, com rosto molhado choravas por mim. Mãe eu era pequena, quando a senhora pra mim assim falou: Deus abençoe minha filha pra que ele cresça no caminho do amor... Mãe sou teu fruto, do coração a dor, sou teu sorriso, tu és meu abrigo na hora da dor”

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que tem feito na minha vida, pela sua infinita misericórdia.

Ao meu orientadore Dr. Juvenil Enrique Cares, pelas instruções, paciência e dedicação.

À pesquisadora Dra. Maria Cristina R. Cordeiro pelo apoio, instruções, paciência e dedicação e por ter acreditado em mim.

Ao pesquisador Dr. Vilmar Gonzaga pelo pelo apoio e instruções.

Aos membros da banca examinadora pela consideração e críticas.

Aos pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, em especial à Dra. Elizabeth de Oliveira e ao Dr. Paulo Evaristo de Oliveira Guimarães, pela oportunidade de executar parte da pesquisa desta tese naquela instituição.

Ao técnicos da Embrapa, João Batista pelo apoio, Martinelli pela valiosa ajuda.

A todos os Professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos.

Aos funcionários e técnicos da UnB que colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho: César Castro, Sr. Fábio, Dona Francisca, Sr. Francisco, Sr. Arlindo, Marivaldo, Carlos Pietrani, Kamila, Ribamar e Silene.

A todos os amigos, em especial, a Adriana Magali, Ana Paula, Andreza Tomé, Denise Martins, Eder Marques, Eliane Armando, Érico Dianese, Fabiane, Jansen Rodrigo, Michele Fayad, Niday Nunes, Patrícia Costa, Renata Estefani, Rita de Cássia, Roberta Cruz e Vânia Freitas meus sinceros agradecimentos,

À minha querida e amada Igreja (Igreja de Cristo Riacho fundo I) pelo apoio, orações e ensinamentos.

À minha querida amiga Ana Elione e família pelas orações e sincera amizade dedicada mesmo estando tão distante.

Aos meus pais (Albertino de Andrade e Maria Guarim de Andrade) e aos meus irmãos, em especial a Jeruza Guarim pela grande ajuda durante a execução deste trabalho, pelo cuidado com o meu filho durante a minha ausência, meu muito obrigada!!!

À minha família: meu marido Antônio Severino e meu filho Luís Felipe, vocês são meu maior incentivo. Obrigada pela paciência...amo vocês!!!

ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA-----	iv
AGRADECIMENTOS-----	v
ÍNDICE DE TABELAS-----	ix
ÍNDICE DE FIGURAS-----	x
RESUMO GERAL-----	xi
ABSTRACT-----	xiii
INTRODUÇÃO -----	1
A cultura do milho-----	1
Problemas Fitossanitários-----	2
Identificação de espécies de <i>Pratylenchus</i> -----	7
Manejo de fitonematoides-----	10
OBJETIVOS-----	11
LITERATURA CITADA-----	12
CAPÍTULO I-----	19
RESUMO-----	19
ABSTRACT-----	20
INTRODUÇÃO-----	21
MATERIAL E MÉTODOS-----	23
Populações de <i>Pratylenchus</i> -----	23
Extração do DNA-----	23
Reação de PCR-----	24
Restriction Fragment Polymorphism (RFP)-----	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	26
CONCLUSÕES-----	29
LITERATURA CITADA-----	30

CAPÍTULO II -----	40
RESUMO -----	40
ABSTRACT -----	41
INTRODUÇÃO -----	43
MATERIAL E MÉTODOS -----	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	51
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS -----	56
BIBLIOGRAFIA CITADA -----	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	67
PERSPECTIVAS -----	68

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I -----	19
TABELA1 -----	34
CAPÍTULO II -----	40
TABELA1 -----	63
TABELA2 -----	64
TABELA3 -----	65

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I -----	19
FIGURA 1 -----	35
FIGURA 2 -----	36
FIGURA 3 -----	37
FIGURA 4 -----	38
FIGURA 5 -----	39
CAPÍTULO II -----	40
FIGURA 1 -----	50
FIGURA 2 -----	66

RESUMO GERAL

A cultura do milho é de grande importância econômica para o Brasil, principalmente por ser usada em rotação de cultura com a cultura da soja. Estudos têm sido feitos no sentido de buscar genótipos resistentes a várias doenças. O milho é suscetível a várias doenças, principalmente aquelas causadas por fungos. Entre os patógenos de solo estão os nematoides. As espécies mais danosas à cultura do milho são aquelas pertencentes ao gênero *Pratylenchus*. No Brasil, *P. brachyurus* e *P. zae*, são os nematóides mais importantes à cultura do milho, aumentando em até duas vezes os custos de produção. Apesar de sua relevante importância, nematóides do gênero *Meloidogyne* spp. são os mais estudados. Portanto, há a necessidade de mais estudos sobre as espécies *Pratylenchus zae* e *P. brachyurus*, as mais comumente associadas à cultura do milho. A caracterização destas espécies tem sido feita através da morfologia, sendo essa em alguns casos difícil e laboriosa. Por isto, a região ITS (*Internal Transcribed Sequence*) (ITS) do *Ribosomal Desoxiribonucleic Acid* (rDNA) tem sido bastante utilizada para a caracterização molecular ou para estudos filogenéticos e evolucionários de nematoides. Neste trabalho, foram caracterizadas por meio da *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Polymorphism* (PCR-RFP) populações de *P. zae*, *P. coffeae*, *P. jaehni*, *P. penetrans* e *P. brachyurus*, oriundas de diferentes regiões geográficas do País. As análises foram conduzidas usando as enzimas de restrição *DdeI*, *HindIII*, *HpaII* e *PstI*. Os produtos amplificados por PCR revelaram fragmentos de DNA de 750 a 1200 pb. A técnica RFP mostrou a existência de variações interespecíficas, mas não revelaram variações intraespecíficas entre as populações estudadas de cada espécie. Outro objetivo deste estudo foi avaliar a reação de 18 linhagens e híbridos de milho aos nematoides *P. brachyurus* e *P. zae* e avaliar a reprodução dessas duas espécies de nematoides, sob condições de telado. As plantas foram inoculadas individualmente com aproximadamente 800

nematoides. Sessenta e dois dias após a inoculação determinou-se a capacidade reprodutiva dos nematoides, estimando-se o fator de reprodução ($FR = Pf/Pi$, sendo Pf a população final e Pi a população inicial de nematoides). O FR mostrou que, das plantas inoculadas com *P. brachyurus*, apenas a linhagem 521550 foi considerada suscetível, enquanto que, para *P. zaeae*, os acessos 531162, 262841-1-4-1, 521550 e BRS3025 foram suscetíveis. Quanto à reprodução dos nematoides, demonstrada pelo FR, notou-se que a multiplicação de *P. zaeae* foi significativamente superior à apresentada por *P. brachyurus*. O uso de espécies cultivadas resistentes aos nematoides das lesões radiculares em sistemas de rotação de culturas previne danos futuros em espécies mais suscetíveis. Portanto, os híbridos de milho avaliados apresentam grande potencial para semeadura em áreas infestadas por *P. brachyurus* e *P. zaeae*, pois permitem taxas restritas de multiplicação do nematoide. Os resultados mostraram que a maioria das linhagens avaliadas são materiais promissores a serem usados em programas de melhoramento, visando a obtenção de híbridos resistentes. Porém, mais estudos devem ser realizados para corroborar os resultados obtidos neste trabalho.

ABSTRACT

Maize is a crop of great economic importance for Brazil, mainly because it is used in crop rotation with soybeans. Studies have been carried out in search for resistant genotypes to various diseases. As in other crops, maize is susceptible to various diseases, especially those caused by fungi, such as stalk rot and ear rot. Seed borne pathogens and soil pathogens are worth mentioning because of their role in reducing germination and seedling emergence. Among these pathogens are soil nematodes. The species of nematode that more frequently attack maize crop are those belonging to the genus *Pratylenchus*. *Pratylenchus brachyurus* and *P. zaeae* are the most damaging nematodes to maize, and the control of nematodes increases up to twice the cost of yield. However, in maize, most studies focus on root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Therefore, there is a need for further studies on *P. zaeae* and *P. brachyurus*, the most commonly species associated with maize. Characterization of these species is usually accomplished by the morphology, which is in some cases difficult and laborious. Therefore, the region ITS (Internal Transcribed Sequence) (ITS) of the Ribosomal Desoxiribonucleic Acid (rDNA) has been widely used for molecular characterization, or phylogenetic and evolutionary studies of nematodes. In this work, were characterized by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Polymorphism (PCR-RFP) distinct populations of *Pratylenchus* species most commonly found in Brazil, *P. zaeae*, *P. coffeae*, *P. Jaehni*, *P. penetrans* and *P. brachyurus* from different geographical regions through the country. Analyses were conducted using the restriction enzymes *DdeI*, *HindIII*, *PstI* and *HpaII*. The PCR amplified products of ITS region revealed differences in size of molecular weight, ranging approximately from 750 to 1200 bp. RFP analysis showed the existence of interspecific variation, but did not reveal intraspecific variation among populations of each

species. Another objective of this study was to evaluate the reaction of 18 breeding lines and hybrids of maize to the nematodes *P. brachyurus* and *P. zaeae*, and to evaluate the reproduction of both nematode species under greenhouse conditions. Plants were individually inoculated with 800 nematodes. Sixty-two days after inoculation it was determined the reproductive ability of the nematodes, estimating the reproduction factor ($RF = P_f / P_i$, where P_f is the final population and P_i is the initial population of nematodes). According to FR, only breeding line 521550 was considered susceptible, while for *P. zaeae* access 531162, 262841-1-4-1, 521550 and BRS3025 were susceptible. With respect to nematode reproduction, as demonstrated by FR, it was noted that the multiplication of *P. zaeae* was significantly higher than that by *P. brachyurus*. The use of resistant species to the nematode in systems of crop rotation prevents injury and future damages on more susceptible species. Therefore, the hybrids evaluated represents potential for sowing in areas infested by *P. brachyurus* and *P. zaeae*, because they allow restricted rates of nematode multiplication. Results showed that most of the lines evaluated constitute promising source of materials for use in breeding programs to obtain resistant hybrids. However, further studies should be performed to corroborate the results obtained in this work.

INTRODUÇÃO GERAL

1. A cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) tem sua provável origem há 7 mil anos nos planaltos do México. Os Incas, Maias e Astecas, não só se alimentavam dele, mas tinham também uma relação de cunho religioso (Clayton, 1973 e Clayton, 1983).

O milho pertence à família *Poacea* (Gramineae), é uma espécie diplóide e alógama. É uma planta monóica, apresenta flores masculinas e femininas na mesma planta, porém em estruturas distintas. É considerado uma das plantas cultivadas mais antigas e uma das mais estudadas. Sua importância econômica é caracterizada pelas diversas formas de utilização, que vão desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia. Na realidade, o uso do milho em grão como alimentação animal representa a maior parte do consumo desse cereal, isto é, cerca de 70% no mundo (CIMILHO, 2010).

O milho é uma das plantas cultivadas mais importantes atualmente, e a espécie mais produzida nos países em desenvolvimento. Seu cultivo pode ser feito em locais com clima tropical, subtropical e temperado e em altitudes desde o nível do mar a superiores a 3000 metros. Devido à sua alta adaptabilidade a diversos ambientes, o milho é o cereal mais cultivado considerando o número de países, cerca de 70 (Filgueira, 2007).

Em 2008, a área plantada no mundo foi de aproximadamente 161 milhões hectares, sendo a produção e produtividade mundial de aproximadamente 823 milhões toneladas e 5.109 kg/ha, respectivamente (CIMILHO, 2010). Em 2005, o mercado mundial de milho foi abastecido basicamente por três países, os Estados Unidos (46 milhões de toneladas), a Argentina (14,0 milhões de toneladas) e a África do Sul (2,3 milhões de toneladas). A principal vantagem desses países é uma logística favorável, que pode ser decorrente da excelente estrutura de transporte (o

caso dos EUA), proximidade dos portos (o caso da Argentina) ou dos compradores (o caso da África do Sul). O Brasil eventualmente participa desse mercado, porém, a instabilidade cambial e a deficiência da estrutura de transporte dos portos têm prejudicado o país na busca de uma presença mais constante no comércio internacional de milho (Duarte et al., 2009).

O Brasil ocupa a terceira posição no ranking mundial, com a produção de aproximadamente 51 milhões de toneladas (FAO, 2010), sendo superado pelos Estados Unidos da América (331 milhões de toneladas) e China (152 milhões de toneladas). Apesar de estar entre os três maiores produtores, o Brasil não se destaca entre os países com maior nível de produtividade, devido ao grande número de produtores que cultivam esse cereal com tecnologia inadequada (CIMILHO, 2010). A maior produtividade se concentra no Centro-Sul do país, porém, quanto à produtividade em 2008, merecem destaque os estados de Tocantins, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Paraná e o Distrito Federal.

2. Problemas fitossanitários na cultura do milho

O milho sempre foi considerado uma planta rústica, capaz de suportar vários estresses ambientais. Hoje, no entanto, com a expansão das fronteiras agrícolas e com a ampliação das épocas de cultivo, esta realidade mudou. Plantios antecipados sob irrigação, plantios da safra de verão e o aumento do plantio safrinha são responsáveis pela continuidade temporal da cultura do milho, o que proporciona, a cada ano, surgimento de novos problemas para a cultura, principalmente com relação às doenças (Costa et al., 2005).

Nos últimos anos, notadamente a partir do final de década de 90, as doenças têm se tornado uma grande preocupação por parte de técnicos e produtores envolvidos no agronegócio do milho. Relatos de perdas na produtividade devido ao ataque de patógenos têm sido frequentes nas principais regiões produtoras do país. Nesse contexto, vale destacar a severa epidemia de

cercosporiose ocorrida na região sudoeste do estado de Goiás no ano de 2000, na qual foram registradas perdas superiores a 80% na produtividade (CNPMS, 2010).

É importante entendermos que a evolução das doenças do milho está estreitamente relacionada à evolução do sistema de produção desta cultura do Brasil. Modificações ocorridas no sistema de produção, que resultaram no aumento da produtividade da cultura, foram, também, responsáveis pelo aumento da incidência e da severidade das doenças. Desse modo, a expansão da fronteira agrícola, a ampliação das épocas de plantio (safra e safrinha), a adoção do sistema de plantio direto, o aumento do uso de sistemas de irrigação, a ausência de rotação de cultura e o uso de materiais suscetíveis têm promovido modificações importantes na dinâmica populacional dos patógenos, resultando no surgimento, a cada safra, de novos problemas para a cultura relacionados à ocorrência de doenças (Costa et al., 2009).

Como nas demais culturas, o milho é suscetível a várias doenças, principalmente aquelas causadas por fungos. As que trazem maiores reduções no rendimento de grãos são as podridões da base do colmo e da espiga. Coincidentemente, os agentes causais dessas podridões são os principais patógenos presentes na semente, *Fusarium moniliforme* Sheldon, *F. subglutinans* (Wollenw. & Reinking) P.E. Nelson, Toussoun & Marasas 1983, *Aspergillus niger* Tiegh. 1867, *Penicillium* sp Link 1809, *Macrophomina* sp., *Stenocarpela maydis* (Berk.) B. Sutton, 1980, *Stenocarpela macrospora* Earle B. sutton, 1977 e *Gibberella zea* (Schwein.) Petch 1936. Na região central do Brasil, os danos maiores são causados por agentes de manchas foliares. Os patógenos veiculados pelas sementes e patógenos de solo merecem destaque, por contribuírem para a redução da germinação e emergência das plantas. Entre os patógenos de solo estão os nematoides (Reis & Casa, 1996).

2.1. Importância dos nematoides na cultura do milho

Mais de 40 espécies de 12 gêneros de nematoides têm sido citadas como parasitas de raízes de milho, em todas as áreas produtoras do mundo onde este cereal é cultivado (Costa et al., 2009). A ocorrência de nematoides do gênero *Meloidogyne Goeldi, 1887* parasitando o milho e causando prejuízos significativos em condições de campo foi relatada no Brasil em 1986 por Lordello, sendo identificada a espécie *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949 raça 3 em raízes de milho que não se desenvolveram. Contudo, o milho está entre as culturas mais recomendadas para a rotação em áreas infestadas por espécies de *Meloidogyne*.

Atualmente, devido à necessidade de se controlar o nematoide de cisto (*Heterodera glycines* Ichinohe, 1915) na cultura da soja, o milho tem sido uma alternativa para a rotação de cultura, pois não é parasitado por esse nematoide. Por outro lado, essas duas culturas podem ser parasitadas por nematoides do gênero *Meloidogyne*, notadamente por *M. incognita* e *M. javanica* (Treub 1885) Chitwood, 1949 (Costa et al., 2009).

As espécies que atacam a cultura do milho com mais frequência são aquelas pertencentes ao gênero *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (Lordello, 1986). No Brasil, as espécies de nematoides mais importantes, na cultura do milho, quanto à patogenicidade, à distribuição e à alta densidade populacional, são *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941, *Pratylenchus zaeae* Graham, 1951, *Helicotylenchus dihystra*, *Criconemoides* spp. e *Xiphinema* spp. (Costa et al., 2009). Sendo que *P. brachyurus* e *P. zaeae* são as mais danosas a cultura do milho, o controle desses nematoides aumenta até duas vezes o custo de produção (Lordello, 1984). No Kenya, já foi relatada até 50% de perda em campo infestado por *P. zaeae*, essa espécie é considerada a mais importante para a cultura do milho nessa região

(Kimenju et al.,1998). Na região norte central dos Estados Unidos da América, as perdas na produção de milho têm sido associadas às espécies *P. hexincisus* Taylor and Jenkins e *P. scribneri* Steiner (Bergeson, 1978 e Norton, 1983).

2.1.1. O Gênero *Pratylenchus* Filipjev, 1936

As espécies de *Pratylenchus* são genericamente referidas como os nematoides das lesões radiculares devido aos sintomas na forma de lesões necróticas que causam nas raízes de seus hospedeiros (Godfrey, 1929 e Tihohod, 1993). Esses nematoides são endoparasitos migradores de corpo fusiforme, cujo comprimento dos adultos varia de 0,3 a 0,9 mm (Loof, 1991).

No Brasil e no mundo, esses fitonematoídes ocupam o segundo lugar em importância econômica, sendo superados, apenas, pelos nematoides das galhas, *Meloidogyne* spp. (Sasser & Freckman, 1987). Algumas espécies de *Pratylenchus* Filipjev, 1936 têm ampla distribuição geográfica, tanto em países de clima tropical como temperado (Luc, 1987), e causam necroses em órgãos subterrâneos em 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).

Pratylenchus brachyurus já foi relatada no Brasil em quiabeiro (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) (Café-filho & Huang, 1988) e sua patogenicidade foi estudada nessa cultura, a qual reagiu como boa hospedeira (Inomoto et al., 2004). Inomoto et al. (2001) estudaram o crescimento de duas cultivares de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) inoculadas com *P. brachyurus* em casa de vegetação e observaram que ambas as cultivares analisadas mostram-se boas hospedeiras de *P. brachyurus* afetando ligeiramente a massa fresca das raízes e também a massa seca da parte aérea. Porém, em condições de campo, densidades populacionais inferiores a 12000 nematoides por planta não causaram redução no crescimento das plantas (Machado et al., 2006).

O nematoide das lesões também já foi relatado como importante patógeno na cultura do milho na região norte dos Estados Unidos, onde perdas na produção foram estimadas com base nas densidades populacionais de espécies de *Pratylenchus* (Smolik & Everson, 1987; Norton, 1983). Com objetivo de controlar nematoides associados à cultura do milho, inclusive *Pratylenchus* spp., foi realizado um experimento na região centro-norte da Flórida, observando-se que o revolvimento do solo a 40 cm de profundidade aumentou a produção do milho (Rich et al., 1985).

Vários pesquisadores têm dedicado seus estudos a *P. zae* (Jordaan et al., 1987; Muchena & Bird, 1988; Arim et al., 2006; Berry et al., 2008; Guimarães et al., 2008; Cabrera et al., 2009). Na busca de controle para *P. zae*, foi avaliado o efeito de cinco espécies de plantas daninhas sobre a infestação de *P. zae* em milho, sendo que os autores concluíram que dentre as espécies testadas, *Crotalaria shaerocarpa* Perr. ex DC merece atenção especial por aumentar a população do nematóide. Já *Eleusine indica* L., além de ser suscetível a *P. zae*, também apresenta capacidade de competir com o milho (Jordan & De Waele, 1988)

Na revisão realizada por Gonzaga (2006) são listadas 69 espécies válidas de *Pratylenchus*, porém o número de espécies descritas deste gênero vem aumentando, chegando a 89 espécies (Castillo & Vovlas, 2007; Inserra et al., 2007; Mizukubo et al., 2007; Subbotin et al., 2008, Troccoli et al., 2008 e Palomares-Rius et al., 2010). Apesar do grande número de espécies no gênero, apenas seis são encontradas com mais frequência 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, Duncan, Troccoli, Dunn, Santos, Kaplan & Vovlas, 2001, *P. penetrans* (Cobb, 1917) Chitwood & Oteifa, 1952, *P. vulnus* Allen & Jensen, 1951 e *P. zae* Graham, 1951 (EMBRAPA, 2007).

3. Identificação de espécies *Pratylenchus* Filipjev, 1936

Os caracteres comumente usados para diagnose e para distinguir espécies são presença ou ausência de machos e os morfológicos e os morfométricos como, tamanho do corpo, número de anéis labiais, forma da região cefálica, tamanho do estilete, forma dos nódulos do estilete, estrutura do campo lateral, forma da espermateca, tamanho e estrutura do saco pós-uterino, forma da cauda e do término da cauda das fêmeas. Machos isolados não são em geral identificáveis apenas as fêmeas oferecem características morfológicas confiáveis para a identificação das espécies.

Várias são as ferramentas taxonômicas que podem ser aplicadas em conjunto para identificar com maior precisão as espécies de nematoides, incluindo a morfometria de espécimes com o uso de microscópio fotônico (Mota & Eisenback, 1993; Carneiro *et al.*, 1996a,b e Inserra *et al.*, 2001); estudo da morfologia através do uso de microscópio eletrônico de varredura - SEM (Eisenback, 1985; Santos & Tihohod, 1993; Tersi *et al.*, 1995; Santos & Maia, 1997 e Hernandez *et al.*, 2001); métodos eletroforéticos para estudos de padrões enzimáticos de espécies (Hussey, 1979; Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Payan & Dickson, 1990; Santos & Triantaphyllou, 1992; Alonso *et al.*, 1995; Ibrahim *et al.*, 1995 e Soares & Santos, 2000) e a detecção molecular por PCR específico ou mediante técnicas envolvendo PCR (Subbotin *et al.*, 1997; Pourjame *et al.*, 1999; Karssen *et al.*, 2000; Inserra *et al.*, 2001; Elbadri *et al.*, 2002; Saeki *et al.* 2003; Oliveira *et al.*, 2005; De La Peña *et al.*, 2006 e Machado *et al.*, 2007). O uso de critérios morfológicos ainda deve continuar sendo, o primeiro passo na identificação de nematoides (Mota & Eisenback, 1993), mas podem não ser completamente acurados, porque diferenças genéticas não podem ser visualizadas e também devido a interferências do ambiente na morfologia das espécies. No caso de nematoides fitoparasitas, no estágio juvenil, que é o estágio infectivo, é difícil distinguir

espécies morfológicamente semelhantes. Portanto, frequentemente, resultados baseados em critérios fenotípicos devem ser confirmados utilizando métodos mais acurados de identificação, como os métodos baseados em características genéticas.

Com o desenvolvimento de técnicas para os estudos em biologia molecular, tornou-se possível a distinção entre gêneros e espécies afins de nematoides, bem como de populações desses parasitas. A partir de protocolos desenvolvidos para outros organismos, esta diferenciação de nematoides pode ser efetiva, com adaptação de técnicas ou o desenvolvimento de novos métodos, possibilitando a diferenciação de fitonematoides morfológicamente semelhantes (Burrows, 1990; Caswell-Chen et al., 1992; Chacon et al., 1994; Hahn et al., 1994 e Ibrahim et al., 1994). A análise do DNA revela um elevado grau de polimorfismo, além de não ser influenciada pelo ambiente, fenótipo, ou pelo estágio de desenvolvimento do nematoide (Curran, 1991). Com isso, verificou-se que as técnicas moleculares representam um grande potencial e facilidades na identificação rotineira de nematoides (Mulholland et al., 1996; Jones et al., 1997; Saeki et al., 2003 e Al- Banna et al., 2004).

Dentre as técnicas moleculares a de RFP (Restriction Fragment Polymorphism), utilizando o DNA ribossomal, tem mostrado ser uma técnica confiável para a identificação de espécies de *Pratylenchus* e uma poderosa ferramenta para a análise da variabilidade genética (Vrain et al., 1992; Orui, 1996; Powers et al., 1997; Orui & Mizukubo, 1999; Waeyenberge et al. 2000; Mizukubo et al., 2003; Saeki et al. 2003; De La Peña et al., 2006 e Machado et al., 2006). Waeyenberge et al. (2000) utilizando a técnica RFP diferenciaram 18 espécies de *Pratylenchus* e três populações de *P. coffeae*.

Um outro marcador molecular amplamente utilizado na identificação e diferenciação de espécies é o DNA ribossomal (rDNA). O rDNA nos eucariotos está presente repetidas vezes, e cada unidade consiste de regiões codificadas para os genes rDNA 18S, 5.8S e 28S e dois espaços

internos (ITS1 e ITS2) que separam essas regiões. Cada unidade do rDNA apresenta componentes em sua sequência que envolvem variação e podem ser usados em estudos de sistemática para diferentes níveis taxonômicos (Fouly *et al.*, 1997). As regiões do rDNA 18S, 5.8S e 28S são muito conservadas e servem de base para confecção de *primers universais* (Berbee & Taylor, 1995 e Gargas & Depriest, 1996). Esses *primers* universais podem ser utilizados para uma ampla gama de espécies (White *et al.*, 1990). Por outro lado, as regiões espaçadoras ITS e IGS acumulam mais variabilidade, sendo mais utilizadas na diferenciação de espécies ou entre populações da mesma espécie (Ristaino *et al.*, 1998 e Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). A região ITS (*Internal Transcribed Spacers*) tem sido muito utilizada para a identificação de fitonematoides, como também para estudos de filogenia, de genética de populações e de processos evolucionários desses organismos (Vrain *et al.*, 1992; Wendt *et al.*, 1993; Ibrahim *et al.*, 1994; Joyce *et al.*, 1994; Orui, 1996; Cherry *et al.*, 1997; Powers *et al.*, 1997; Uehara *et al.*, 1998a,b e Saeki *et al.*, 2003).

Recentemente, utilizando a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) Machado *et al.* (2007), amplificaram a região ITS-1 do rDNA de *P. brachyurus* e por meio da análise dessa sequência verificaram diferenças em relação a outras espécies do gênero (*P. coffeae*, *P. vulnus* e *P. zaeae*). Essas diferenças na região ITS-1 foram usadas para sintetizar um par *primers* específico para diagnose de *P. brachyurus*. Ao avaliarem o *primer* em 30 populações de *P. brachyurus* os autores obtiveram um fragmento de 267 pb para todas as populações testadas. Além disso, verificaram que quando utilizaram outras espécies de *Pratylenchus* e de outros nematoides de solo, não houve amplificação de fragmentos por PCR com o *primer* desenvolvido no estudo em questão. Trabalhos semelhantes foram realizados para *P. coffeae*, *P. loosi* e *P. penetrans*, em que, a partir de um único indivíduo, inclusive juvenil, após a amplificação e sequenciamento da região ITS dessas espécies, foram construídos *primers* específicos para a diagnose das mesmas (Uehara *et al.*, 1998a,b e Saeki *et al.*, 2003).

4. Manejo de fitonematoides

Diferentes métodos isolados de controle têm sido pesquisados e aplicados, mas recentemente ênfase tem sido dada à integração de vários métodos, para tornar a operação de controle mais racional, eficiente e econômica (Rosa et al., 2003). Entre as técnicas mais recomendadas para as fitonematoses está o uso de cultivares resistentes, controle biológico, emprego de plantas antagônicas, rotação de culturas com plantas não hospedeiras, revolvimento do solo por aração nos meses mais quentes e nematicidas sistêmicos (Whitehead, 1998).

A utilização de cultivares resistentes é a medida mais eficiente de controle de nematoides que parasitam a cultura do milho (Lordello, 1984). A rotação de culturas com espécies botânicas não hospedeiras do nematóide, presente, na área de cultivo do milho, também é medida recomendada (Lordello, 1984; Araya & Caswell-Chen, 1994). Ademais, a utilização de plantas armadilhas como *Crotalaria spectabilis* Roth, as quais atraem e aprisionam juvenis de nematoides, é especificamente recomendada para o controle de *Meloidogyne* spp. Não obstante, a *C. juncea* L. possui potencial para multiplicação de *Pratylenchus* spp. e *Helicotylenchus* spp., enquanto que rotação com mucuna preta (*Mucuna aterrima* Piper & Tracy) diminui as populações iniciais de *Pratylenchus* spp (Silva et al., 1989). O controle químico dos nematoides parasitas do milho depende da disponibilidade de produtos registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), bem como da análise econômica da utilização desta tecnologia (Costa et al., 2009)

5. Objetivos

- Caracterização a nível molecular de populações de *Pratylenchus zaeae*, *P. coffeae*, *P. jaehni*, *P. penetrans* e *P. brachyurus*, oriundas de diferentes regiões geográficas do Brasil e parasitas de diferentes hospedeiros, utilizando a técnica PCR-RFP.
- Reação de linhagens e cultivares de milho (*Zea mays* L.) aos nematoides *Pratylenchus brachyurus* e *P. zaeae* em cultivo protegido.

LITERATURA CITADA

Al-Banna L, Ploeg AT, Williamson VM, Kaloshian I (2004) Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. *Journal of Nematology* 36:142-146.

Alonso SK, Alfenas AC, Santos JM, Ferraz S.(1995) Análise de isoenzimas para identificação de espécies de *Meloidogyne*. *Fitopatologia Brasileira* 20:20-23.

Araya M, Caswell-Chen EP (1994) Penetration of *Crotalaria juncea*, *Dolichos lablab*, and *Sesamum indicum* roots by *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 26:238-240.

Arim, OJ, Waceke JW, Waudu SW, Kimenju JW (2006) Effects of *Canavalia ensiformis* and *Mucuna pruriens* intercrops on *Pratylenchus zae* damage and yield of maize in subsistence agriculture *Plant Soil*. 284:243–251.

Berbee ML, Taylor JW (1995) From 18S ribosomal sequence data to evolution of morphology among the fungi. *Canadian Journal of Botany* 73:S677-S683.

Bergeson, GB (1978) Control of the lesion nematode (*Pratylenchus* spp.) in corn with carbofuran. *Plant disease reporter* 62:265-297.

Berry SD, Fargette M, Spaull VW, Morand S, Cadet P (2008) Detection and quantification of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*), lesion nematode (*Pratylenchus zae*) and dagger nematode (*Xiphinema elongatum*) parasites of sugarcane using real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes* 22:168–176.

Burrows PR (1990) The rapid and sensitive detection of the plant parasitic nematode *Globodera pallida* using a non-radioactive biotinylated DNA probe. *Revue de Nematologie* 13:185-190.

Cabrera JA , Kiewnick S, Grimm C, Dababat AA, Sikora RA (2009) Efficacy of abamectin seed treatment on *Pratylenchus zae*, *Meloidogyne incognita* and *Heterodera schachtii*. *Nematologica* 33:213-219.

Carneiro RMDG, Almeida MRA, Carneiro RG (1996a) Enzyme phenotype of Brazilian population of *Meloidogyne* spp. *Fundamental and Applied Nematology* 19:555-588.

Carneiro RMDG, Carneiro RG, Abrantes IMO, Santos MSNA, Almeida MRA (1996b) *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a rootknot nematode parasitizing coffee in Brazil. *Journal of Nematology* 28:177-189.

Carneiro RMDG, Martins I, Jorge CL (2001) Técnica para criopreservação de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira* 25:205-209.

Castillo P, Vovlas N (2007) *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management. *Nematology Monographs and Perspectives*, vol. 6. Brill, Leiden-Boston. pp. 529.

Caswell-Chen EP, Williamson VM, Wu FF (1992) Random amplified polymorphic DNA analysis of *Heterodera cruciferae* and *H. schachtii* populations. *Journal of Nematology* 24:343-351.

Chacon MR, Rodriguez E, Parkhouse RME, Burrows PR, Garate T (1994) The differentiation of parasitic nematodes using random amplified polymorphic DNA. *Journal of Helminthology* 68:109-113.

Cherry T, Slazanski AL, Todd TC, Powers TO (1997) The internal transcribed spacer region of *Belonolaimus* (Nemata: Belonolaimidae). *Journal of Nematology* 29:23-29.

CIMILHO - (<http://cimilho.cnpms.embrapa.br/estatisticas/estatisticas.php?tabela=001> Acesso em 08/07/2010)

Clayton WD (1973) The species of Andropogoneae. *Kew. Bull.* 28:49-58.

Clayton WD (1983) Notes on tribe andropogoneae (Gramineae). *Kew. Bull.* 35:813-8.

Coolen WA, D'herde CJ (1972) A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. *Gent: State Agricultural Research Center.* 77p.

Costa RV da, Casela CR, Cota LV (2009) *Sistemas de Produção*, 2 ISSN 1679-012X 5ª edição. In:http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/index.htm acesso em 08/07/2010.

Curran J (1991) Application of DNA analysis to nematode taxonomy. In: NICKLE, W.R., ed. *Manual of Agricultural Nematology*. New York: Marcel Dekker Inc., p. 125-43.

Duarte JO, Cruz JC, Garcia JC, Mattoso MJ (2009) *Sistemas de Produção*, 2 . 5ª ed. In:http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/index.htm acesso em 08/07/2010.

Eisenback JD (1985) Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. In: Barker, K.R. Carter, C.C. & Sasser, J.N. (Ed.). *An advanced treatise on Meloidogyne*. Raleigh, North Carolina State University Graphics 2:78-105.

Elbadri GAA, De Ley P, Waeyenberge L, Vierstraete A, Moens M, Vanfleteren J (2002) Intraspecific variation in *Radopholus similis* isolates assessed with restriction fragment length polymorphism and DNA sequencing of the internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA cistron. *International Journal for Parasitology* 32:199-205.

EMBRAPA (2007) (<http://icewall2.cenargen.embrapa.br:83/nemweb/nemhtml/nmbd05.asp>). Acesso em: 14 ago. 2007.

Esbenshade PR, Triantaphyllou AC (1985) Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida). *Journal of Nematology* 17:6-20.

Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Urubu F, Querol A (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of 5.8S Rna gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49:329-337.

FAO- <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> acesso em 08/07/2010.

Filgueira TRS (2007) A origem do milho: identificação de *Saccharum* como um dos parentais alotetraploides. (tese de doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP.

Fouly H, Wilkinson HT, Chen W (1997) Restriction analysis of internal transcribed spacers and the small subunit gene of ribosomal DNA among four *Gaeumannomyces* species. *Mycologia* 89:590-598.

Gargas A, Depriest PT (1996) A nomenclature for fungal PCR primers with example from intron-containing Ssu rDNA. *Mycologia* 88:745-748.

Godfrey GH (1929) A destructive root disease of pineapples and other plants due to *Tylenchus brachyurus* n.sp. *Phytopathology* 19:611-629.

Gonzaga V (2006) Caracterização morfológica, morfométrica e multiplicação in vitro das seis espécies mais comum de *Pratylenchus* Filipjev, 1936 que ocorrem no Brasil (Tese de doutorado). Universidade Estadual Paulista Jaboticabal/SP.

Guimarães LMP, Pedrosa EMR Coelho RSB, Chaves A, Maranhão SRVL, Miranda TL (2008) Efeito de metil jasmonato e silicato de potássio no parasitismo de *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus zaeae* em cana-de-açúcar. *Nematologia Brasileira* 32: 50-55.

Hahn ML, Burrows PR, Gnanapragasam NC, Bridge J, Vines NJ, Wright DJ (1994) Molecular diversity amongst *Radopholus similis* populations from Sri Lanka detected by RAPD analysis. *Fundamental and Applied Nematology* 17:275-281.

Hernandez M, Jordana R, Goldaracena A, Pinochet J (2001) SEM observations of nine species of the genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Pratylenchidae). *Journal of Nematode Morphology and Systematics* 3:165-167.

Hussey RS (1979) Biochemical systematics of nematodes – a review. *Helminthological Abstracts, Serie B, Plant Nematology* 48:141-148.

Ibrahim SK, Perry RN, Burrows PR, Hooper DJ (1994) Differentiation of species and populations of *Aphelenchoides* and of *Ditylenchus angustus* using a fragment of ribosomal DNA. *Journal of Nematology* 26:412-421.

Ibrahim SK, Perry RN, Webb RM (1995) Use of isoenzyme and protein phenotypes to discriminate between six *Pratylenchus* species from Great Britain. *Annual Applied Biology* 126:317-327.

Inomoto MM, Goulart AMC, Machado ACZ, Monteiro AR (2001) Effect of population densities of *Pratylenchus brachyurus* on the growth of cotton plants. *Fitopatologia Brasileira* 26:192-196.

Inomoto MM, Silva RA, Pimentel JP (2004) Patogenicidade de *Pratylenchus brachyurus* e *P. coffeae* em quiabeiro. *Fitopatologia Brasileira* 29:551-554.

Inserra RN, Duncan LW, Troccoli A, Dunn D, Santos JM dos, Kaplan D, Vovlas N (2001) *Pratylenchus jaehni* sp. n. from citrus in Brazil and its relationship with *P. coffeae* and *P. loosi* (Nematoda:Pratylenchidae). *Nematology* 3:653-665.

Inserra RN, Troccoli A, Gozel U, Bernard EC, Dunn D, Duncan LW (2007) *Pratylenchus hippeastri* n. sp. (Nematoda: Pratylenchidae) from *Amaryllis* in Florida with notes on *P. scribneri* and *P. hexincisus*. *Nematology* 9: 25-42.

Jones JT, Phillips MS, Armstrong MR (1997) Molecular approaches in plant nematology. *Fundamental Applied Nematology* 20:1-14.

Jordaan EM, De Waele D de (1988) Host status of five weed species and their effects on *Pratylenchus zae* infestation of maize. *Journal of Nematology* 20:620-624.

Jordaan EM, Loots GC, Jooste WJ, De Waele D (1987) Effects of root-lesion nematodes (*pratylenchusbrachyurus godfrey* and *pratylenchus-zeae graham*) and *fusarium-moniliforme sheldon* alone or in combination, on maize. *Nematologica* 33:213-219

Joyce SA, Reid AP, Driver F, Curran J (1994) Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to the identification of entomopathogenic nematodes. In: Burnell AM, Ehlers RU, Masson JP (Ed) *Genetics of entomopathogenic nematode-bacterium complexes*. Luxembourg: E.C. DG XII. p.178-187.

Karssen G, Waeyenberge L, Moens M (2000) *Pratylenchus brzeskii* sp. nov. (Nematoda: Pratylenchidae), a root-lesion nematode from European coastal dunes. *Annales-Zoologici* 50:255-261.

Kimenju JW, Waudu SW, Mwang'ombe AW, Sikora RA, Schuster RP (1998) Distribution of lesion nematodes associated with maize in Kenya and susceptibility of maize cultivars to *Pratylenchus zae*. *African Crop Science Journal* 6:367-375.

Loof PAA (1991) The family Pratylenchidae Thorne, 1949. In: Nickle WR (ed.). *Manual of agricultural nematology*. New York: Marcel Dekker, Inc. p.363-421.

Lordello AIL, Lordello RRA, Sawazaki E (1986) Suscetibilidade de genótipos de milho às raças de *Meloidogyne incognita*. *Nematologia brasileira* 10:21-22.

Lordello, LGE (1984) *Nematoides das plantas cultivadas*. 8 ed. São Paulo. Nobel.

Luc M (1987) A reappraisal of Tylenchina (Nemata): 7. The family Pratylenchidae Thorne, 1949. *Revue de Nématologie* 10:203-218.

Machado ACZ (2007) Development of a Species-Specific Reverse Primer For The Molecular Diagnosis Of *Pratylenchus Brachyurus*. In: XXVII Congresso Brasileiro de Nematologia, Goiânia, GO. Resumos.p 44.

Machado ACZ, Beluti DB, Silva RA, Serrano MAS, Inomoto MM (2006) Avaliação de danos causados por *Pratylenchus brachyurus* em algodoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 31:011-016.

- Machado ACZ, Oliveira CMG, Ferraz LCCB (2006) Caracterização molecular de populações de *Pratylenchus brachyurus* através de PCR-RFLP da região ITS-1 do rDNA. In: XXVI Congresso Brasileiro DE Nematologia, Campos dos Goytacazes, RJ. Resumos. p. 19
- Mizukubo T, Orui Y, Hanada K, Sano Z (2003) Microevolutionary trend in *Pratylenchus coffeae* sensu stricto (Nematoda: Pratylenchidae): the diversity in PCR-RFLP phenotype, compatibility on host plants and reproductive segregation. *Japanese Journal of Nematology* 33:57-76.
- Mizukubo T, Sugimura K, Uesugi K (2007) A new species of the genus *Pratylenchus* from chrysanthemum in Kyushu, western Japan (Nematoda: Pratylenchidae) *Japanese Journal of Nematology* 37:63-74.
- Mota MM, Eisenback JD (1993) Morphometrics of *Globodera tabacum tabacum*, *G. t. virginiae* and *G. t. solanacearum* (Nemata: Heteroderinae). *Journal of Nematology* 25:148-160.
- Muchena PK, Bird GW (1988) Distribution and impact of *pratylenchus zae* and *pratylenchus-brachyurus* on maize production in communal farms in manicaland-province, zimbabwe. *Journal of nematology* 20:650-650.
- Mulholland W, Carde L, O'donnell KJ, Fleming CC, Powers TO (1996) Use of the polymerase chain reaction to discriminate potato cyst nematode at the species level. In: Marshall G (Org) *Diagnostics in crop production: proceeding*. Farnham: Symposium Proceedings BCPC 65:247-252.
- Norton DC (1982) Densities of *pratylenchushexincisus* in maize and species related to maize. *Journal of nematology* 14:461-462.
- Norton, DC (1983) Maize nematode problems. *Plant Disease* 67:253-256.
- Oliveira CMG, Fenton B, Malloch G, Brown DJF, Neilson R (2005) Development of species-specific primers for the ectoparasitic nematode species *Xiphinema brevicolle*, *X. elongatum*, *X. ifacolum* and *X. longicaudatum* (Nematoda: Longidoridae) based on ribosomal DNA sequences. *Annals of Applied Biology* 146:281-288.
- Orui Y (1996). Discrimination of the main *Pratylenchus* species (Nematoda: Pratylenchidae) in Japan by PCR-RFLP analysis. *Applied Entomology and Zoology* 31:505-514.
- Orui Y, Mizukubo T (1999) Discrimination Of Seven *Pratylenchus* Species (Nematoda: Pratylenchidae) In Japan By PCR-RFLP Analysis. *Applied Entomology And Zoology* 34:205-211.
- Palomares-Rius JE, Castillo P, Liébanas G, Vovlas N, Landa BB, Navas-Cortés JA, Subbotin SA (2010) Description of *Pratylenchus hispaniensis* n. sp. from Spain and considerations on the phylogenetic relationship among selected genera in the family Pratylenchidae. *Nematology* 12:429-451.
- Payan LA, Dickson DW (1990) Comparison of populations of *Pratylenchus brachyurus* based on isozyme phenotypes. *Journal of Nematology* 2:538-545.

- Pourjame E, Waeyenberge L, Moens M, Geraert E (1999) Morphological, morphometrical and molecular study of *Pratylenchus coffeae* and *P. loosi* (Nematoda: Pratylenchidae). Proceedings, 51st International Symposium on Crop Protection, Gent, Belgium, 64:391-401.
- Powers TO, Todd TC, Burnell AM, Murray PCB, Fleming CC, Szalanski AL, Adams BA, Harris TS (1997) The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. Journal of Nematology 29:441-450.
- Reis EM, Casa RT (1996) Manual de identificação e controle de doenças de milho. Aldeia Norte. 80p.
- Rich JR, Jhonson JT, Hodge CH (1985) Corn response to subsoiling and nematicide application. Journal of nematology 17:404-407.
- Ristaino JB, Madritch M, Trout CL, Parra G (1998) PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. Applied Environmental Microbiology 63:948-954.
- Rosa RCT, Moura RM, Pedrosa EMR (2003) Ocorrência de *Rotylenchulus reniformis* em cana-de-açúcar no Brasil. Nematologia Brasileira 27:93-95.
- Saeki Y, Kawano E, Yamashita C, Akao S, Nagatomo Y (2003) Detection of plant parasitic nematodes, *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus coffeae* by multiplex PCR using specific primers. Soil Science and Plant Nutrition 49:291-295.
- Santos JM, Maia AS (1997) Estudo ao microscópio eletrônico de varredura de *Meloidogyne coffeicola* Lordello & Zamith, 1960. In: XXVIII Congresso Brasileiro DE Fitopatologia. Fitopatologia Brasileira 22(suplemento):328.
- Santos JM, Tihohod D (1993) Microscopia eletrônica de varredura do cone vulvar do nematoide do cisto da soja coletado em Nova Ponte-MG. In: XVII Congresso Brasileiro DE Nematologia, Jaboticabal, SP. Resumos. p. 73.
- Santos JM, Triantaphyllou HH (1992) Determinação dos fenótipos isoenzimáticos e estudos comparativos da morfologia de 88 populações de *Meloidogyne* spp., parasitas do cafeeiro. In: XVI Congresso Brasileiro de Nematologia, Lavras, MG, Resumos, p.88.
- Sasser JN, Freckman DW (1997) A world perspective on nematology: The role of the society. In Veech JA, Dickson DW. Vistas on Nematology. Hyattville: Society on Nematologists. P. 7-14.
- Smolik JD, Evenson PD (1987) Relationship of yields and *Pratylenchus* spp. Population densities in Dryland and irrigated corn. Annals of applied nematology 1:71-73.
- Soares PLM, Santos JM (2000) Variabilidade morfológica e bioquímica em populações de *Rotylenchulus* Linford & Oliveira, 1940 do Brasil. In: Anais do XXII Congresso Brasileiro de Nematologia. Uberlândia, MG, Resumos, p.47.

Subbotin SA, Ragsdale EJ, Mullens T, Roberts A, Mundo-Ocampo M, Baldwin JG (2008) A phylogenetic framework for root lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda): Evidence from 18S and D2–D3 expansion segments of 28S ribosomal RNA genes and morphological characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48:491-505.

Subbotin SA, Sturhan D, Waeyenberge L, Moens M (1997) *Heterodera riparia* sp.n. (Tylenchida: Heteroderidae) from common nettle, *Urtica dioica* L, and rDNA-RFLP separation of species from the *H. humuli* group. *Russian Journal of Nematology* 5:143-158.

Tenente RCV, Gonzaga V, Melo LAMP, Tenente MSM (2002) Bibliografia brasileira de nematoides. Brasília: EMBRAPA–CENARGEN. 386 p. (Documentos, 76).

Tenente RCV, Leal-Bertioli SCM (1999) Técnicas bioquímicas e moleculares na diagnose de fitonematoides. Brasília: EMBRAPA–CENARGEN. Boletim de Pesquisa N. 6.

Tersi FEA, Santos J, Maia AS (1995) Microscopia eletrônica de varredura de *Tylenchulus semipenetrans* e *Pratylenchus coffea* principais nematoides dos citros em São Paulo. In: XXVIII Congresso Brasileiro DE Fitopatologia. *Fitopatologia Brasileira* 20 (Suplemento):342.

Tihohod D (1993). *Nematologia agrícola aplicada*. Jaboticabal: FUNEP. 372 p.

Troccoli A, De Luca F, Handoo ZA, Di Vito M (2008) Morphological and molecular characterization of *Pratylenchus lentis* n. sp. (Nematoda: Pratylenchidae) from Sicily *Journal of Nematology* 40:190-196.

Uehara T, Mizukubo T, Kushida A, Momota Y (1998a) Identification of *Pratylenchus coffeae* and *P. loosi* using specific primers for PCR amplification of ribosomal DNA. *Nematologica* 44:357-368.

Uehara T, Mizukubo T, Kushida A, Momota Y (1998b) Identification of *Pratylenchus penetrans* (Cobb) by PCR using ITS-Based species-specific primers. *Japanese Journal of Nematology* 28:1-7.

Vrain TC, Wakarchuk DA, Lèvesque AC, Hamilton RI (1992) Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundamental and Applied Nematology*, v. 15, p. 563-573.

Waeyenberge L, Ryss A, Moens M, Pinochet J, Vrain TC (2000) Molecular characterisation of 18 *Pratylenchus* species using rDNA Restriction Fragment Length Polymorphism. *Nematology* 2:135-142.

Wendt KR, Vrain TC, Webster JM (1993) Separation of three species of *Ditylenchus* and some host races of *D. dipsaci* by restriction fragment length polymorphism. *Journal of Nematology* 25:555-563.

Whitehead AG (1998) *Plant Nematode Control*. CAB International, New York, 363p.

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CINCO ESPÉCIES DE *PRATYLENCHUS* SPP. ATRAVÉS DA ANÁLISE DO rDNA POR PCR-RFP (POLYMERASE CHAIN REACTION- RESTRICTION FRAGMENT POLYMORPHISM)

RESUMO

Os nematoides do gênero *Pratylenchus* são geralmente referidos como nematoides das lesões radiculares, devido as lesões necróticas que causam em seus hospedeiros. Estes parasitas têm sido considerados o segundo grupo mais importante entre os nematoides fitoparasitas na agricultura, causando severos danos em diversas culturas. O gênero *Pratylenchus* engloba 89 espécies morfológicas. A caracterização dessas espécies em geral é realizada através da morfologia, sendo essa, em alguns casos, difícil e laboriosa. Por isto, a região ITS (*Internal Transcribed Sequence*) (ITS) do *Ribosomal Deoxyribonucleic Acid* (rDNA) tem sido bastante utilizada para a caracterização molecular ou em estudos filogenéticos e evolucionários de nematoides. Neste trabalho, foram caracterizadas por meio da técnica *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Polymorphism* (PCR-RFP) distintas populações de *P. zaeae*, *P. coffeae*, *P. jaehni*, *P. penetrans* e *P. brachyurus* oriundas de diferentes regiões geográficas do Brasil. As análises foram conduzidas usando as enzimas de restrição *DdeI*, *HindIII*, *HpaII* e *PstI*. Os produtos amplificados por PCR fragmentos de DNA de 750 a 1200 pb. Análises RFP mostraram a existência de variações interespecíficas, mas não revelaram variações intraespecíficas entre as populações estudadas de cada espécie.

Palavras chave: *Pratylenchus*, PCR-RFLP, ITS.

ABSTRACT – Nematodes in the genus *Pratylenchus* are generally referred as the root lesion nematode in allusion to the symptoms these parasites cause in their plant hosts. These nematodes have been considered as the second most important group of plant-parasitic-nematodes in agriculture, causing yield losses in a variety of crops. The genus *Pratylenchus* includes 89 putative morphospecies. Their characterization is mostly accomplished by taking in account morphological approaches which in some cases is difficult and time consuming. Therefore, the ITS (Internal Transcribed Sequence) region of the Ribosomal Deoxiribonucleic Acid (rDNA) has been used in molecular characterization and in phylogenetic and evolutionary studies. In this work, molecular characterization was performed with different populations of *P. zaeae*, *P. coffeae*, *P. jaehni*, *P. penetrans*, and *P. brachyurus* from diverse geographic regions of Brazil, using Polymerase Chain Reaction followed by Restriction Fragment Polymorphism (PCR-RFP). The analyses were conducted with four different restriction enzymes as *DdeI*, *HindIII*, *HpaII*, and *PstI*. The amplified PCR products from the ITS region revealed differences in molecular weight ranging in size from 750 to 1200 pb, and the posterior RFP analysis showed an interspecific variation among species but absence of intraspecific variation among the populations studied of each species.

Key words: *Pratylenchus*, PCR-RFLP, ITS.

INTRODUÇÃO

Os nematoides do gênero *Pratylenchus* Filipjev, 1936, são geralmente referidos como nematoide das lesões radiculares, devido aos sintomas de lesões necróticas que causam em seus hospedeiros. Estes parasitas tem sido considerados o segundo grupo mais importante entre os nematoides fitoparasitas na agricultura, causando severos danos em diversas culturas, sendo superados apenas pelos nematoides de galhas do gênero *Meloidogyne* (Sasser & Freckman, 1987; Tihohod, 1993). Embora as espécies de *Pratylenchus* sejam bastante polípagas, existe uma clara diferença quanto à preferência desses nematoides por espécie hospedeira. Por exemplo, *P. vulnus* Allen & Jensen, 1951, encontrada associada a roseiras e *P. penetrans* (Cobb, 1917) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941, são comumente relatadas em plantas frutíferas perenes. *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev e Shuurmans Stekhoven, 1941, na Califórnia se associa principalmente à cultura do algodão (McKenry & Roberts, 1985). No Brasil, seis espécies de *Pratylenchus* tem sido relatadas com maior frequência: *P. brachyurus*, *P. zae* Graham, 1951, *P. coffeae* (Zimmerman, 1898) Filipjev & Shuurman Stekhoven, 1941, *P. jaehni* Inserra, Ducan, Troccoli, Dunn, Santos, Kaplan & Vovlas, 2001, *P. penetrans*, e *P. vulnus* (Gonzaga, 2006).

O controle de *Pratylenchus* spp. é difícil e alternativas de manejo desse nematoide nem sempre são eficazes, uma vez que as espécies apresentam um amplo círculo de plantas hospedeiras, o que na maioria das vezes inviabiliza o uso da rotação de culturas, assim como são escassas as fontes de resistência para as principais espécies vegetais cultivadas no Brasil.

O sucesso de um programa de manejo de nematoides muitas vezes depende da rápida e segura identificação da espécie presente na área (Qiu et al., 2007). A correta identificação a nível de espécie é crucial para a prevenção da disseminação dos nematoides fitopatogênicos, local e

internacionalmente, bem como, para o sucesso das estratégias de manejo desses parasitas (De Waele & Elsen, 2007).

As dificuldades para a identificação de espécies de *Pratylenchus* são em decorrência da escassez de características morfológicas aplicáveis à diagnose de indivíduos desse gênero, bem como da variabilidade intraespecífica de algumas dessas características (Tarjan & Frederick, 1978; Handoo & Golden, 1989; Mounport et al., 1990). Certamente, características morfológicas, tais como, número de anéis labiais, forma da espermateca e estruturas do campo lateral, são geralmente eficientes para a identificação de espécies de *Pratylenchus* (Loof, 1978). Entretanto, o reconhecimento dessas características requer um substancial treinamento, além da necessidade de muitos espécimes de fêmeas para um diagnóstico preciso. Variações morfométricas em estudos com espécies de *Pratylenchus* foram previamente relatadas (Doucet et al., 1998, 2001). Essas variações indicam que nem sempre pelas características morfométricas pode-se chegar à identificação correta das espécies de *Pratylenchus*.

Nos últimos 20 anos é crescente o uso de técnicas moleculares para análise de DNA (Vogler & Monaghan, 2007) e análises de proteínas (Andrés et al., 2000) entre os nematologistas, para confirmar a validade de espécies de nematoides e, também, para ajudar na identificação e descrição de novas espécies (DeWaele & Elsen, 2007).

Dentre os estudos de identificação de nematoides com o uso de ferramentas moleculares, destacam-se aqueles que utilizam as sequências ITS do rDNA. Essas sequências são variáveis (ITS 1 e ITS 2) e intercalam, respectivamente, as subunidades das regiões 18S, 5.8S e 26S do rRNA. Assim, as regiões ITS são capazes de distinguir vários organismos além de permitirem estudos filogenéticos e evolucionários (Bulman & Marshall, 1997; Uehara et al., 1998; Carta et al., 2001; Handoo et al., 2001; Saeki et al., 2003; Berry et al., 2007). Especialmente para caracterização molecular de nematoides, o estudo dessas regiões tem mostrado consideráveis

variações interespecíficas e intraespecíficas (Iwahori et al., 1998; Inserra et al., 2001; Hajieghrari et al., 2007; Zhao et al., 2008; Landa et al., 2008; Munera et al., 2009; Trinh et al., 2009; Deimi et al., 2009; Oh et al., 2009; Kanzaki et al., 2009; Van den Berg et al., 2009).

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar em nível molecular populações de *P. zaeae*, *P. coffeae*, *P. jaehni*, *P. penetrans* e *P. brachyurus*, provenientes de diferentes hospedeiros, oriundas de diferentes regiões do Brasil, utilizando análises da região ITS através da PCR-RFP.

MATERIAL E MÉTODOS

Populações de *Pratylenchus* spp.

Neste trabalho foram analisadas 18 populações, sendo sete de *Pratylenchus zaeae*, seis de *P. brachyurus*, três de *P. jaehni*, uma de *P. coffeae* e uma de *P. penetrans*. As populações foram obtidas em diferentes regiões do Brasil oriundas de diferentes hospedeiras (Tabela 1). A identificação inicial foi realizada com base no exame microscópico de espécimes montados em lâminas permanentes e comparação das características morfológicas observadas com aquelas descritas na literatura (Handoo & Golden, 1989). Os nematoides de cada população foram multiplicados e mantidos em cilindros de cenoura, em ambiente estéril à temperatura de 25 °C, conforme metodologia descrita por Gonzaga (2006).

Extração do DNA

A extração do DNA dos nematoides de cada população foi realizada de acordo com o protocolo de purificação de DNA de tecido animal descrito em Kit *Dneasy Blood and Tissue* (Qiagen), como descrito abaixo. Aproximadamente 100 nematoides de cada população foram colocados individualmente sob esteromicroscópio e utilizados na extração.

Os nematoides foram pescados e colocados em eppendorfs contendo 10 µl de água destilada esterilizada. Em seguida foram adicionados 180 µl de tampão de lise (ATL) e os nematoides foram macerados com pistilos plásticos (procedimento feito no gelo). Acrescentando-se 10 µl de proteinase K e incubando-se as amostras em banho maria a 60°C por aproximadamente 1h e 40 minutos, até que o material se tornasse viscoso. Acrescentou-se 200 µl de tampão AL e incubou-se as amostras a 70°C por 10 minutos, em seguida adicionou-se 200 µl de etanol (96-100%). O material foi pipetado para uma coluna de mini Dneasy e centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto (15-25°C). Descartou-se o que passou pela coluna e foram acrescentados 500 µl de tampão de lavagem AW1 e centrifugou-se o material novamente a 8000 rpm por 1min (15-25°C), descartou-se novamente o material que passou pela coluna e foi acrescentado o tampão de lavagem AW2 e centrifugou-se a 14000 rpm por 3 minutos (15-25°C), sendo que o material que passou pela coluna foi descartado. Por fim, acrescentou-se 50 µl de água destilada e esterilizada e centrifugou-se a 8000 rpm (15-25°C). Esse procedimento foi repetido e as amostras levadas para uma centrífuga a vácuo para reduzir o volume final.

Após a extração, o DNA das amostras foi quantificado em espectrofotômetro do tipo Nanodrop (Modelo ND-1000) e utilizado nas reações de PCR.

Reações de PCR

Cada reação de PCR foi realizada em tubos de 0,2 ml contendo cerca de: 1 ng do DNA de cada espécie; 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogene) (220 µM de cada dNTP; 22 mM Tris-HCl (pH 8,4); 55 mM KCl; 1,65 mM MgCl₂; 250 µM (0,4 µM) dos *primers* universais (18S -5' TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT 3' e 26S - 5' TTT CAC TCG CCG TACTA AGG 3') como descrito por Vrain et al. (1992) em um volume total de 25 µl de reação. As condições de amplificação utilizadas foram: 94°C por 2 minutos (1 ciclo), 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C

(Desnaturação), 1 minuto a 53 °C (anelamento), 2 minuto a 72°C (extensão), seguido por extensão final a 72°C por 6 minutos. Após a amplificação do DNA, 8 µl da reação foi depositado em gel de agarose a 1% para corrida em aparelho eletroforético horizontal contendo tampão Tris Borato EDTA (TBE) (Tris-Borato 100 mM, EDTA 2 mM) e corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml). Os fragmentos de DNA foram visualizados em transiluminador de luz UV e fotodocumentado em sistema EDAS, Kodak.

Restriction Fragment polymorphism (RFP)

Para a análise de RFP dos produtos amplificados de cada população foram utilizados cerca de 10 a 15 µl de cada PCR para a digestão com 15 U das enzimas de restrição *DdeI* (Fermentas Life Sciences), *HindIII* (Sigma), *HPaII* (Fermentas Life Sciences) e *PstI* (Fermentas Life Sciences) em tampão apropriado, de acordo com as recomendações dos fabricantes. A digestão foi conduzida por 16 h a 37 °C. Os produtos da digestão enzimática foram separados em eletroforese em gel de agarose 1% e, corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) em TBE. Ao término da corrida eletroforética os géis foram visualizados em luz UV e fotodocumentados em sistema EDAS, Kodak. A estimativa do peso molecular dos produtos amplificados do DNA de cada população na PCR, bem como dos produtos da digestão enzimática foi realizada por meio da comparação com o marcador de peso molecular 100 pB ou 1 Kb (Invitrogen) também adicionados aos géis. O resultado de cada digestão enzimática dos produtos amplificados na PCR e PCR-RFP foi confirmado em duplicatas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação da região ITS do rDNA de cada população produziu fragmentos de DNA de 750 a 1200pb (Figura 1). Este resultado demonstra que a região ITS 1 – ITS 2 é variável em tamanho entre as espécies analisadas e, somente *P. coffeae* foi perfeitamente distinguível dos demais no gel de agarose a 1%. *Pratylenchus penetrans* foi o que apresentou o menor fragmento amplificado para aquela região, de aproximadamente 750 pb. Os demais (*P. zaeae*, *P. brachyurus* e *P. jaehni*) apresentaram regiões de cerca de 800 a 900 pb, o que diminui a distinguibilidade entre as espécies, dificultando em alguns casos a separação das mesmas. Subbotin et al. (2008) observaram, baseado em análise da região D2–D3 28S, 18S, divergências filogenéticas entre *P. zaeae* e *P. brachyurus*.

Na análise em PCR-RFP os padrões de bandas nos géis de agarose demonstraram claramente diferenças de tamanho e número de fragmentos de digestão com as quatro enzimas analisadas. A única espécie que apresentou sítios de restrição para todas as enzimas foi *P. coffeae* (Figuras 2, 3, 4 e 5). *Pratylenchus penetrans* apresentou sítios para duas enzimas (*HpaII* e *DdeI*) (Figuras 4 e 5). Duas espécies apresentaram sítios para duas enzimas como a *HindIII* e *PstI* (*P. brachyurus*) (Figuras 2 e 3) e *DdeI* e *HpaII* (*P. jaehni*) (Figuras 4 e 5). *Pratylenchus zaeae* somente apresentou claramente sítios de restrição para a enzima *DdeI* (Figura 5), cujo fragmento parece ser digerido por *HpaII* (Figura 4), pois notou-se um fragmento menor que o original (Figura 1).

Os fragmentos originados de todas as digestões com o DNA de *P. coffeae* confirmaram o tamanho amplificado na PCR de cerca de 1,2 a 1,3 Kb conforme observado no trabalho de Waeynberge et al. (2000). Nesse caso, ainda com a enzima *DdeI* somente pode-se distinguir fragmentos resultantes de aproximadamente 500 pb. Assim, pode-se esperar que existam sítios que produzam fragmentos menores não visualizados no gel. Este resultado também foi observado

em alguns casos em *P. jaehni* (*DdeI* e *HpaII*), *P. brachyurus* (*DdeI*, *HindIII* e *PstI*) e *P. penetrans* (*DdeI*, *HpaII* e *PstI*).

As espécies *P. brachyurus* e *P. coffeae* foram aquelas que mais se distinguiram das demais. Essas diferenças foram observadas através dos fragmentos obtidos da digestão de com as enzimas *HindIII*, *HpaII* e *PstI* para *Pratylenchus coffeae* e também dos fragmentos obtidos da digestão com as enzimas *HindIII*, *DdeI* e *PstI* para *P. brachyurus*. As espécies *P. jaehni* e *P. penetrans* destacaram-se das demais com a enzima *HpaII*, porém não foi possível a distinção entre elas. A espécie *P. zae* não pode ser exatamente e individualmente distinguida com nenhuma enzima quando comparada com as outras quatro espécies estudadas devido às semelhanças em tamanho dos fragmentos gerados. Porém, não foi possível observar a existência de variação intraespecífica ao menos nas sete populações analisadas.

Os resultados da digestão dos fragmentos com *DdeI* demonstraram que as espécies *P. zae*, *P. coffeae*, *P. jaehni* e *P. penetrans* resultaram em fragmentos de tamanhos similares, tais como 500-550 pb e 200-250 pb, o que dificulta a diferenciação dessas espécies com a aplicação dessa enzima. No entanto, estes resultados sugerem que os sítios de restrição para *DdeI* são conservados nessas quatro espécies, sendo divergentes apenas para *P. brachyurus*. Divergências entre *P. brachyurus* e outras espécies de *Pratylenchus* também foram encontradas por Andrés et al. (2000). Estudando nove espécies de *Pratylenchus*, os autores observaram um certo distanciamento genético entre *P. brachyurus* e as espécies *P. penetrans* e *P. coffeae*. Também Subbotin et al. (2008) observaram, baseado em análise da região D2–D3 28S, 18S, divergências genética entre *P. zae* e *P. brachyurus*.

A digestão com a enzima *DdeI* mostrou um perfil semelhante de restrição para a maioria das espécies (Figura 5). Porém, essa enzima foi a única que digeriu claramente o fragmento do rDNA de *P. zae*. No entanto, essa espécie não pode ser individualmente distinguida com

exatidão com nenhuma das enzimas quando comparada às demais espécies estudadas devido à similaridade em tamanhos dos fragmentos gerados, diferindo dos resultados obtidos por Waeynberg et al. (2000)

As análises de RFP da região ITS do rDNA amplificada em PCR para as enzimas *PstI*, *HindIII*, *HpaII* e *DdeI*, revelaram variabilidade interespecífica entre as espécies de *Pratylenchus* das populações brasileiras estudadas, confirmando os resultados obtidos por Waeynberge et al. (2000), que demonstraram variação interespecífica para dezoito espécies de *Pratylenchus* de diferentes regiões geográficas por meio da análise da combinação de pelo menos duas enzimas. Assim, com a análise simultânea dos fragmentos da região ITS 1 de rDNA resultantes da digestão com duas enzimas pode ser possível proceder a identificação individual de *P. zaeae* e/ou das demais espécies que ocorrem no Brasil. Além disto, este tipo de análise não confirmou a inexistência de variabilidade intraespecífica nas espécies aqui estudadas. Orui & Mizukubo (1999), estudando espécies de *Pratylenchus* de amostras de tabaco, através das análises PCR-RFLP, concluíram que foi possível distinguir entre *P. penetrans*, *P. crenatus*, *P. neglectus*, *P. zaeae* e *Pratylenchus* sp. Reid et al. (1997), estudando dezessete espécies de nematoides entomopatogênicos, concluíram que a região ITS é ideal para distinguir espécies, dependendo da enzima de restrição usada para RFLP.

Alguns estudos têm revelado variações intraespecíficas em populações de nematoides (Hugall et al., 1999; Subbotin et al., 2000; Waeyenberge et al., 2000). As principais causas dessa variação estão na presença de sequências repetidas e nas diferenças em tamanho na região ITS do rDNA (Harris & Grandall, 2000; Canole et al., 2001; Depaquit et al., 2002). Neste estudo não foi observada essa variação intraespecífica em nenhuma das espécies estudadas, para as quais foram analisadas mais de uma população, porém, através do estudo em outras regiões do rDNA, como por exemplo a D1, D2 ou D3 desses genes, ou usando dupla digestão ou ainda outras técnicas tais

como a Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), variações intraespecíficas poderão ser detectadas entre as populações. A técnica de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) tem sido empregada com esse objetivo (Cenis, 1993), mas sua reprodutibilidade tem sido motivo de discussão. Este trabalho oferece seqüenciar os fragmentos de DNA visando a obtenção de possíveis marcas genéticas específicas para as diferentes espécies de *Pratylenchus* como *P. brachyurus*, *P. jaehni*, *P. penetrans* e *P. zaeae*.

Este trabalho representa o primeiro relato da utilização do PCR-RFP para caracterizar em nível molecular diferentes populações brasileiras pertencentes a cinco espécies de *Pratylenchus*.

CONCLUSÕES

A análise RFP demonstrou diferença interespecífica para as espécies *Pratylenchus coffeae*, *P. brachyurus*, *P. jaehni* e *P. penetrans*, no conjunto da análise de quatro diferentes enzimas, porém não demonstrou variabilidade intraespecífica nas populações analisadas.

Este estudo demonstra que a técnica molecular baseada em PCR-RFP é uma ferramenta útil na diagnose de espécies de *Pratylenchus*.

LITERATURA CITADA

Andrés MF, Pinochet J, Hernández-Dorrego A, Delibes A (2000) Detection and analysis of inter- and intraspecific diversity of *Pratylenchus* spp. using isozyme markers Plant Pathology. 49:640-649.

Berry S, Fargette M, Morand S, Cadet P (2007). Reliability of PCR-based techniques for detection and discrimination of plant-parasitic nematodes of sugarcane. Nematology 9: 499-514.

Bulman SR, Marshall JW (1997). Differentiation of Australasian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR) New Zealand Journal Of Crop And Horticultural Science 25:123-129.

Canole JC, Chilton, NB, Jarvis, T, Gasser, RB, (2001) Mutation scanning analysis of microsatellite variability in the second internal transcribed spacer (precursor ribosomal RNA) for three species of *Metastrongylus* (Strongylida: Metastrongyloidea) Parasitology 122:195-206.

Carta LK, Skantar AM, Handoo ZA (2001). Molecular, morphological and thermal characters of 19 *Pratylenchus* spp. and relatives using the D3 segment of the nuclear LSU rRNA gene .Nematropica 31:193-207.

Cenis JL (1993) Identification of four major *Meloidogyne* spp. By random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). Phytopathology 83: 76-80.

De Waele, D. e Elsen, A. (2007) Challenges in Tropical Plant Nematology. Annual Review of Phytopathology. 45: 457-85.

Deimi AM, De Luca F, Vovlas N e Troccoli A (2009). Characterisation and parasitic habits of a root-lesion nematode from chrysanthemum in Iran and its relationship to *Pratylenchus pseudocoffeae*. Nematology 11:757-768

Depaquit J, Ferté, H, Lèger, N, Lefranc F, Alves-Pires C, Hanafi H, Maroli M, Morillas-Marquez F, Rioux JA, Svodobova M e Volf P (2002) ITS2 sequences heterogeneity in *Phlebotomus sergenti* and *P. similis* (Diptera, Psychoididae): Possible sequences in their ability to transmit *Leishmania tropica*. International Journal for Parasitology 32: 199-205.

Doucet ME, Lax P e Pinoche, J. (1998) Variability of some external characters in *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen, 1951 (Nematoda; Tylenchida). Fundamental and Applied Nematology 21:205-206.

Doucet ME, Lax, P, Di Rienzo, JA, Pinoche, J, Baujard, P. (2001) Temperature- induced morphometrical variability in an isolate of *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen, 1951 (Nematoda; Tylenchida). Nematology 3:1-8.

Duncan LW, Inserra RN, Thomas WK, Dunn D, Mustika I, Frisse LM, Mendes ML, Morris K, Kaplan DT (1999) Molecular and morphological analysis of isolates of *Pratylenchus coffeae* and closely related species Nematropica 29: 61-80.

Gonzaga, V. (2006) Caracterização morfológica, morfométrica e multiplicação in vitro das seis espécies mais comuns de *Pratylenchus* Filipjev, 1936 que ocorrem no Brasil. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista Jaboticabal/SP.

Hajjehgari B, Torabi-Giglou M, Waeyenberge L (2007) Comparative d2/d3 LSU-rDNA sequence study of some Iranian *Pratylenchus loosi* populations. African Journal of Biotechnology 6: 2458-2466.

Handoo, Z.A., Golden, A.M. 1989. A key and diagnostic compendium to the species of the genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (lesion nematodes). Journal of Nematology 21:202-218.

Harris DJ, Grandall KA (2000) Intra-genomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): Implications for phylogenetic and microsatellite studies. Molecular Biology and Evolution 17:284-291.

Hugall A, Stanton, J, Moriz, C (1999) Reticulate evolution and the origins of ribosomal internal transcribed spacer diversity in apomictic *Meloidogyne*. Molecular Biology and Evolution 16:157-164.

Inserra RN, Duncan LW, Troccoli A, Dunn D, dos Santos JM, Kaplan D, Vovlas N (2001) *Pratylenchus jaehni* sp. n. from citrus in Brazil and its relationship with *P. coffeae* and *P. loosi* (Nematoda: Pratylenchidae) Nematology 3:653-665.

Iwahori H, Tsuda K, Kanzaki N, Izui K, Futai K (1998) PCR-RFLP and sequencing analysis of ribosomal DNA of *Bursaphelenchus nematodes* related to pine wilt disease. Fundamental and Applied Nematology 21: 655-666.

Kanzaki N, Giblin-Davis RM, Center BJ (2009) Description of *Ektaphelenchoides spondylis* n. sp. (Nematoda: Ektaphelenchinae) isolated from *Spondylis buprestoides* (Coleoptera: Cerambycidae) in Japan. Nematology 11: 181-188.

Landa BB, Rius JEP, Vovlas N, Carneiro RMDG, Maleita CMN, Abrantes IMD, Castillo P (2008) Molecular characterization of *Meloidogyne hispanica* (Nematoda, Meloidogynidae) by phylogenetic analysis of genes within the rDNA in *Meloidogyne* spp. Plant Disease 92: 1104-1110.

Loof PAA (1978) The genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Pratylenchidae): a review of its anatomy, morphology, distribution, systematics, and identification. Research Information Center. Swedish University of Agricultural Science. Uppsala Sweden.

McKenry MV, Roberts, PA (1985) Phytonematology study guide. Publication Number 4045. Cooperative Extension, University of California. Division of Agricultural and Natural Resources. Oakland.

Mounport D, Baujard P, Mertiny B (1990) Étude ultrastructurale de la cuticule de *Pratylenchus brachyurus*, *P. loosi* and *P. sefaensis* (Nematoda: Pratylenchidae). Revue de Nématologie 13:249-254.

- Munera GE, Bert W, Decraemer W (2009). Morphological and molecular characterisation of *Pratylenchus araucensis* n. sp. (Pratylenchidae), a root-lesion nematode associated with *Musa* plants in Colombia. *Nematology* 11:799-813.
- Oh HK, Bae CH, Il Kim M, Wan X, Oh SH, Han YS, Lee HB, Kim I (2009) Molecular Biological Diagnosis of *Meloidogyne* species occurring in Korea. *Plant Pathology Journal* 25: 247-255.
- Orui Y, Mizukubo T (1999). Geographical distribution of *Pratylenchus* species in tobacco fields in eastern Japan. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* 43:75-79.
- Qiu J, Westerdalh, BB, Williamson, VM (2007) Detection and quantification of root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* using real time PCR. *Journal of Nematology* 39 (Abstract):95-96.
- Reid AP, Hominick WM, Briscoe BR (1997) Molecular taxonomy and phylogeny of entomopathogenic nematode species (Rhabditida: Steinernematidae) by RFLP analysis of the ITS region of the ribosomal DNA repeat unit. *Systematic Parasitology* 37:187–193.
- Saeki Y, Kawano E, Yamashita C, Akao S, Nagatomo Y (2003) Detection of plant parasitic nematodes, *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus coffeae* by multiplex PCR using specific primers. *Soil Science and Plant Nutrition* 49: 291-295.
- Sasser JN, Freckman DW (1987) A world perspective on nematology: the role of the society. In: Veech JA, Dickman DW (Eds) *Vistas on nematology*. Hyattsville, Society of nematologists. p.7-14.
- Subbotin SA, Halford, PD, Warry A, Perry RN (2000) Variations in ribosomal DNA sequences and phylogeny of *Globodera* parasitizing solanaceous plant. *Nematology* 2: 591-604.
- Subbotin SA, Ragsdale EJ, Mullens T, Roberts A, Mundo-Ocampo M, Baldwin JG (2008) A phylogenetic framework for root lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda): Evidence from 18S and D2–D3 expansion segments of 28S ribosomal RNA genes and morphological characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48:491-505.
- Tarjan AC, Frederick JJ (1978) Intraspecific morphological variation among populations of *Pratylenchus brachyurus* and *P. coffeae*. *Journal of Nematology* 10:152-160.
- Tihohod D (1993) *Nematologia Agricola Aplicada*. Jaboticabal, Funep, p.372.
- Trinh PQ, Waeyenberge L, Nguyen CN, Baldwin JG, Karssen G, Moens M (2009) *Apratylenchus vietnamensis* gen. n., sp n. and *A. binhi* gen. n., sp n., sedentary Pratylenchidae (Nematoda: Tylenchida) from coffee in Vietnam, with proposal of Apratylenchinae subfam. n. *Nematology* 11:565-581.
- Uehara T, Mizukubo T, Kushida A, Momota Y (1998). Identification of *Pratylenchus coffeae* and *P. loosi* using specific primers for PCR amplification of ribosomal DNA. *Nematologica* 44: 357-368.
- Van den Berg E, Subbotin SA, Handoo ZA, Tiedt LR (2009) *Hirschmanniella kwazuna* sp. n. from South Africa with notes on a new record of *H. spinicaudata* (Schuurmans Stekhoven, 1944)

Luc & Goodey, 1964 (Nematoda: Pratylenchidae) and on the molecular phylogeny of *Hirschmanniella* Luc & Goodey, 1964. *Nematology* 11:523-540.

Vogler AP, Monaghan MT (2007) Recent advances in DNA taxonomy. *Journal of Zoology Systematic Evolutionary Research* 45:1–10.

Vrain TC, Wakarchuk DA, Lèvesque AC, Hamilton RI (1992) Intraspecific rDNA restriction fragment polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundamental and Applied Nematology* 15:563-573.

Waeyenberge L, Ryss A, Moens M, Pinochet J, Vrain TC (2000) Molecular characterization of 18 *Pratylenchus* species using rDNA restriction fragment polymorphism. *Nematology* 2:135-142.

Zhao ZQ, Ye WM, Giblin-Davis RA, Li DM, Thomas WK, Davies KA, Riley IT (2008) Morphological and molecular analysis of six aphelenchoidoids from Australian conifers and their relationship to *Bursaphelenchus* (Fuchs, 1937). *Nematology* 10: 663-678.

Tabela 1: Populações de *Pratylenchus* spp. utilizadas nas análises RFP.

Espécie	Hospedeiro	Local	Código
<i>P. zaeae</i>	Milho	Luís Eduardo Magalhães (BA)	1
<i>P. zaeae</i>	Dracena	Juquiá (SP)	2
<i>P. zaeae</i>	Cana-de-açúcar	Paineiras (SP)	3
<i>P. zaeae</i>	Milho	Onda verde (SP)	4
<i>P. zaeae</i>	Milho	Brasília (DF)	5
<i>P. zaeae</i>	Cana-de-açúcar	Rio de Janeiro	6
<i>P. zaeae</i> *	Cana-de-açúcar	Inhumas (GO)	7
<i>P. coffeae</i>	Graviola	Recife (PE)	8
<i>P. jaehni</i>	Citros	Palestina (SP)	9
<i>P. jaehni</i>	Citros	Mogiguaçu (SP)	10
<i>P. jaehni</i>	Citros	Itajobi (SP)	11
<i>P. penetrans</i>	Lírio	Araxá (MG)	12
<i>P. brachyurus</i>	Cana-de-açúcar	Santa Adélia (SP)	13
<i>P. brachyurus</i> *	Soja	Ipameri (GO)	14
<i>P. brachyurus</i>	Soja	Luziânia (GO)	15
<i>P. brachyurus</i>	Soja	Chapadões (GO)	16
<i>P. brachyurus</i>	Soja	Paraúna (GO)	17
<i>P. brachyurus</i>	Milho	Silvânia (GO)	18

*Populações utilizadas como inoculo para o ensaio de resistência genética, capítulo II.

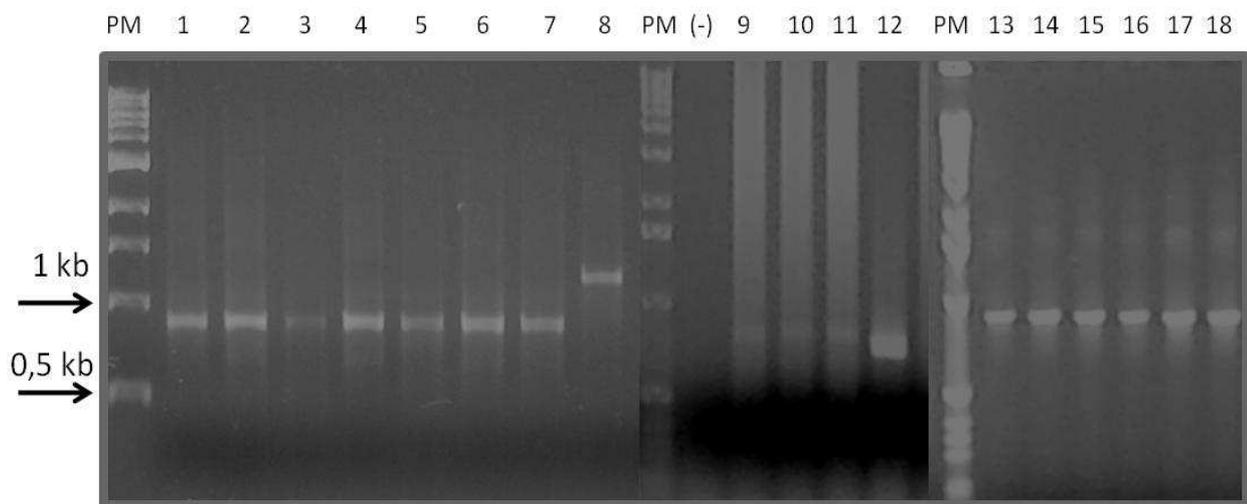


Figura 1: Amplificação do Espaço Interno transcrito (ITS) do DNA ribossomal através da reação da polimerase em cadeia (PCR) de *Pratylenchus* spp. PM: Marcador de peso molecular 1kb; 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7: *P. zaeae*; 8: *P. coffeae*; (-) controle negativo; 9, 10, 11: *P. jaehni*; 12: *P. penetrans*; 13, 14, 15, 16, 17, 18: *P. brachyurus*.

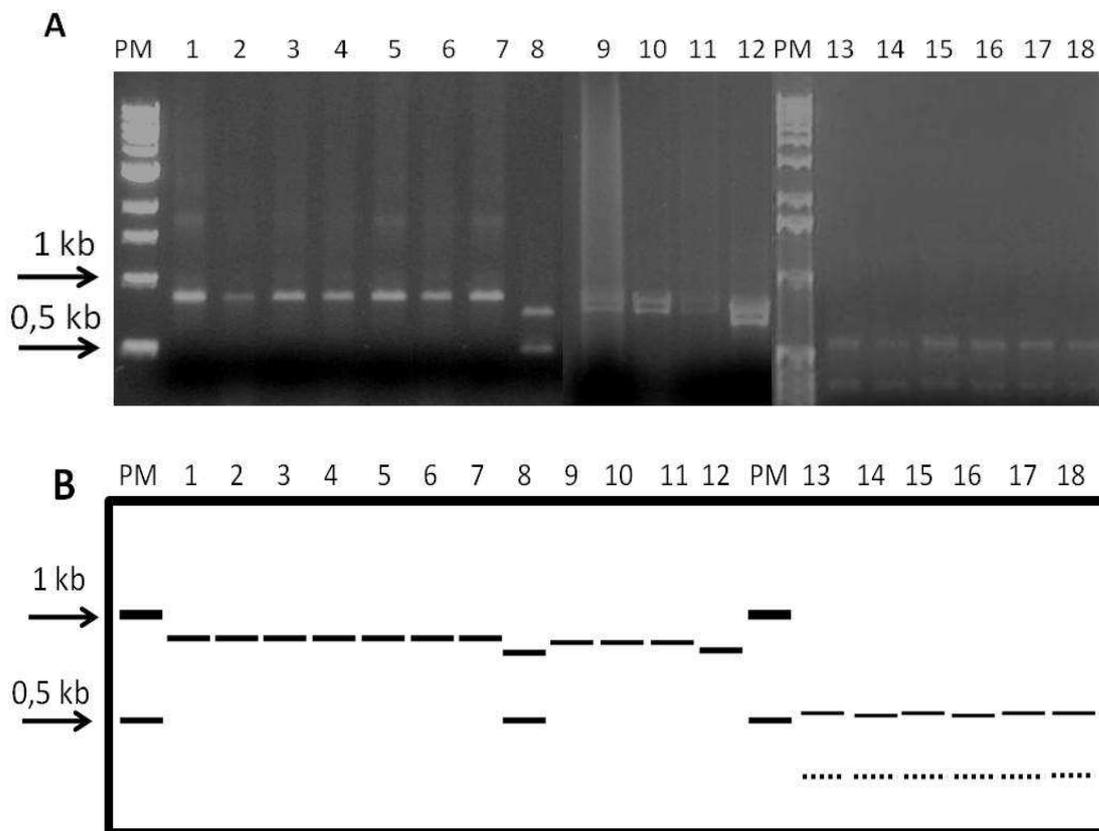


Figura 2- (A) Fragmentos de restrição, obtido com a enzima *PstI*, da região ITS de rDNA amplificada por PCR de *Pratylenchus* spp.; (B) esquema consolidado. PM- marcador de peso molecular 1kb; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 (*P. zae*); 8 (*P. coffeae*); (-) controle negativo; 9, 10, 11 (*P. jaehni*); 12 (*P. penetrans*); 13, 14, 15, 16, 17, 18 (*P. brachyurus*).

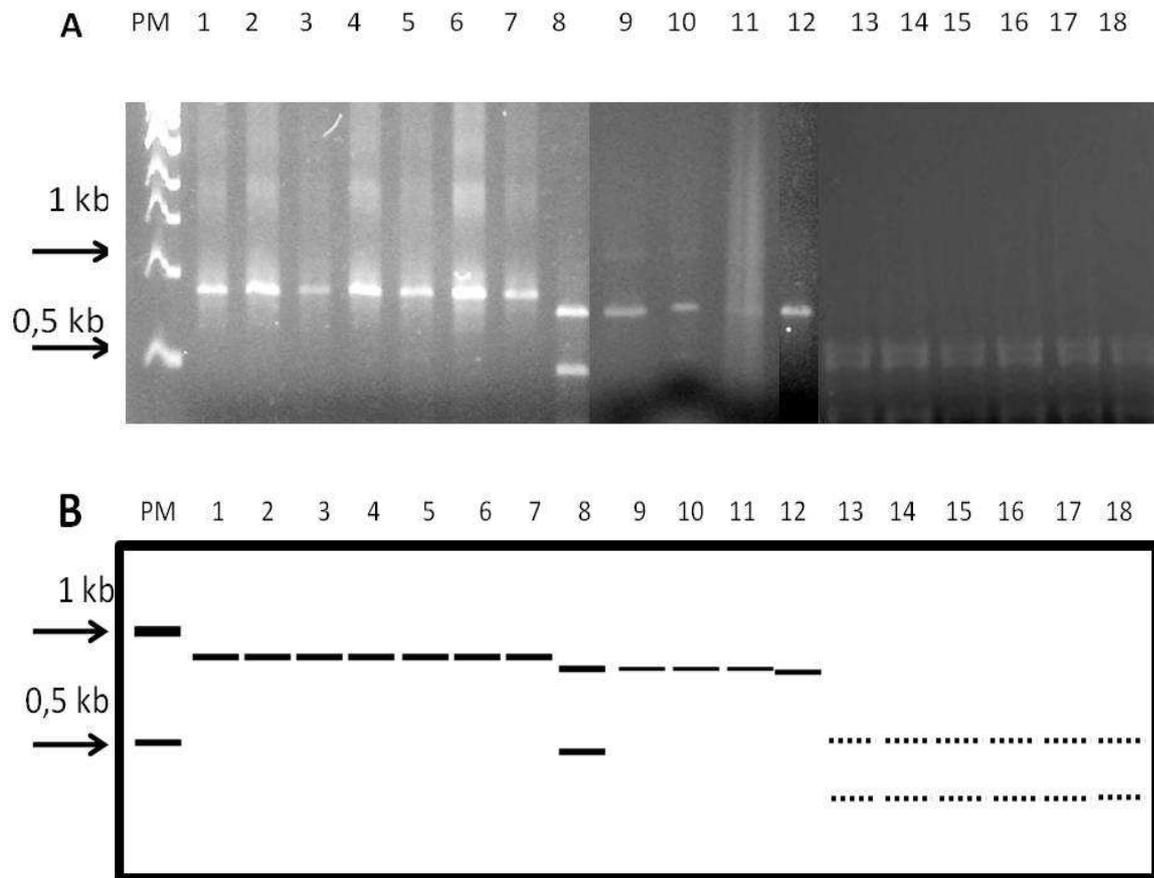


Figura 3: (A) Fragmentos de restrição, obtido com a enzima *HindIII*, de rDNA da região ITS amplificada por PCR de *Pratylenchus* spp.; (B) esquema consolidado. PM- marcador de peso molecular 1kb; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 (*P. zaeae*); 8 (*P. coffeae*); (-) controle negativo; 9, 10, 11 (*P. jaehni*); 12 (*P. penetrans*); 13, 14, 15, 16, 17, 18 (*P. brachyurus*).

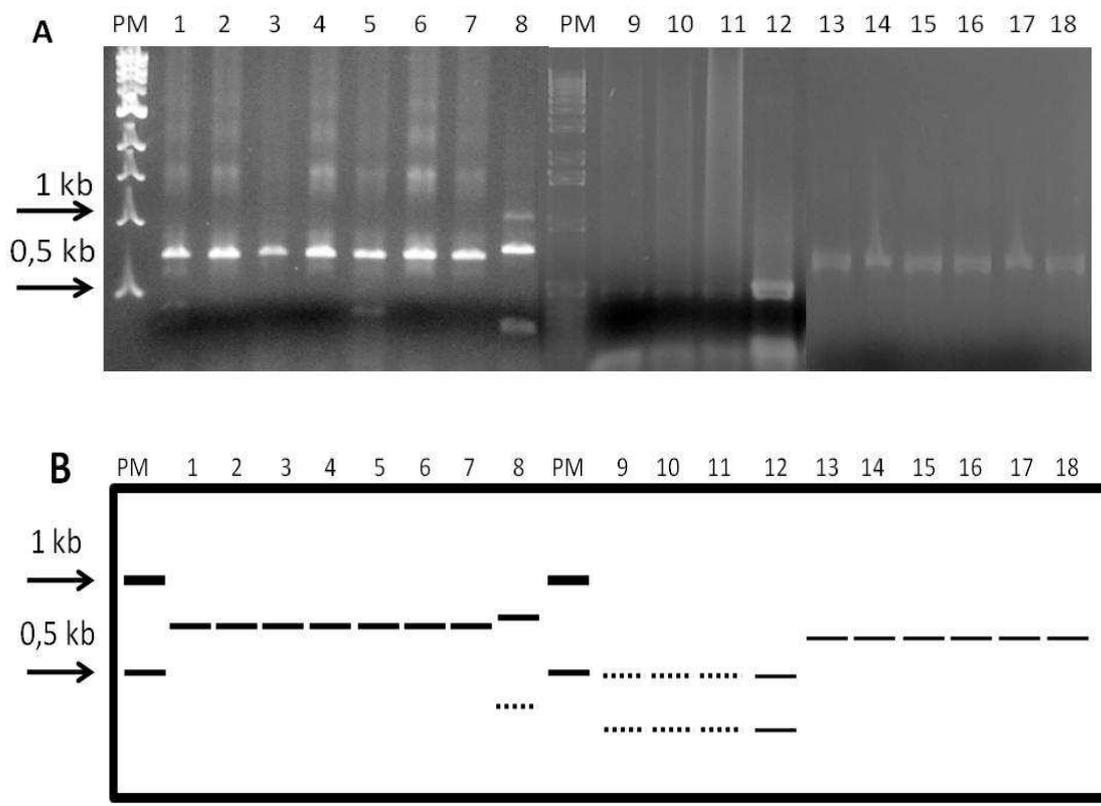


Figura 4: (A) Fragmentos de restrição, obtido com a enzima *HpaII*, da região ITS de rDNA amplificada por PCR de *Pratylenchus* spp.; (B) esquema consolidado. PM- marcador de peso molecular 1kb; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 (*P. zaeae*); 8 (*P. coffeae*); (-) controle negativo; 9, 10, 11 (*P. jaehni*); 12 (*P. penetrans*); 13, 14, 15, 16, 17, 18 (*P. brachyurus*).

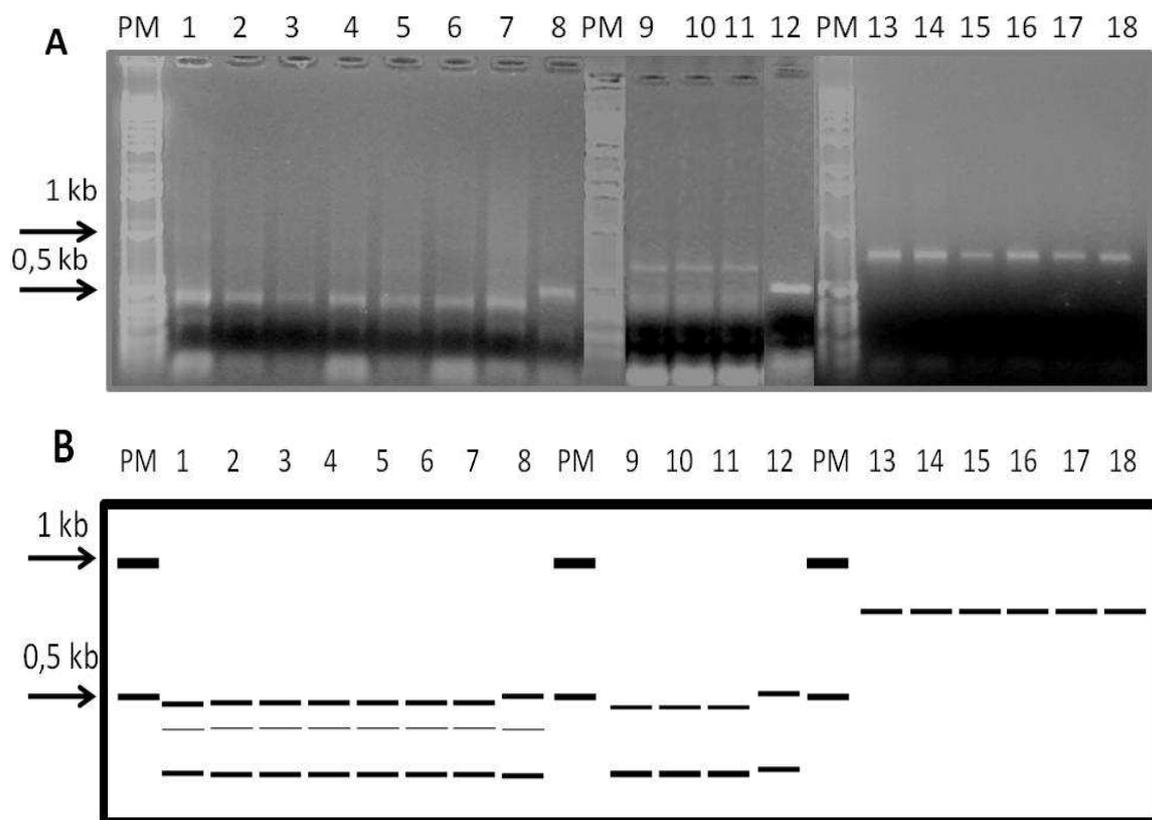


Figura 5: (A) Fragmentos de restrição, obtido com a enzima *DdeI*, da região ITS de rDNA amplificada por PCR de *Pratylenchus* spp.; (B) esquema consolidado. PM- marcador de peso molecular 1kb; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 (*P. zaeae*); 8 (*P. coffeae*); (-) controle negativo; 9, 10, 11 (*P. jaehni*); 12 (*P. penetrans*); 13, 14, 15, 16, 17, 18 (*P. brachyurus*).

CAPÍTULO 2

REAÇÃO DE ACESSOS DE MILHO (*ZEA MAYS* L.) A ESPÉCIE DE *PRATYLENCHUS* *BRACHYURUS* E *P. ZEA*

RESUMO

A cultura do milho é de grande importância econômica para o Brasil, principalmente por ser usada em rotação de cultura em plantios de soja. Estudos têm sido feitos no sentido de buscar genótipos resistentes a várias doenças. Porém, a maioria dos estudos se concentram em nematoides causadores de galhas (*Meloidogyne* spp.). Portanto havendo a necessidade de mais estudos sobre as espécies *Pratylenchus zae* e *P. brachyurus*, as quais estão comumente associadas à cultura do milho. Os objetivos deste estudo foram avaliar a reação de 18 linhagens e híbridos de milho aos nematoides *P. brachyurus* e *P. zae* e avaliar a reprodução das duas espécies de nematoides, sob condições de telado. As plantas foram inoculadas individualmente com aproximadamente 800 nematoides. Sessenta e dois dias após a inoculação determinou-se a capacidade reprodutiva dos nematoides, estimando-se o fator de reprodução ($FR = Pf/Pi$, sendo Pf a população final e Pi a população inicial de nematoides). O FR mostrou que das plantas inoculadas com *P. brachyurus*, apenas a linhagem 521550 foi considerada suscetível, enquanto que para *P. zae* os acessos 521162, 262841-1-4-1, 521550 e BRS3025 foram suscetíveis. Quanto à reprodução dos nematoides, demonstrada pelo FR, notou-se que a multiplicação de *P. zae* foi significativamente superior à apresentada por *P. brachyurus*. O uso de espécies cultivadas resistentes aos nematoides das lesões radiculares em sistemas de rotação de culturas previne danos futuros em espécies mais suscetíveis. Portanto, os híbridos de milho avaliados apresentam grande potencial para semeadura em áreas infestadas por *P. brachyurus* e *P. zae*, pois permitem taxas restritas de multiplicação do nematoide. Os resultados mostraram que a maioria das

linhagens avaliadas constitui materiais promissores para ser usados em programas de melhoramento, para obtenção de híbridos resistentes.

REACTION ACESS OF MAIZE (*ZEA MAYS* L.) TO THE NEMATODES

PRATYLENCHUS BRACHYURUS AND *P. ZEA*

ABSTRACT

Maize is a crop of great economic importance for Brazil, mainly because it is used in crop rotation to soybeans. Studies have been done to seek genotypes resistant to various plant diseases. However, most studies focus on the root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). Therefore, there is a need for additional studies on the lesion nematodes *Pratylenchus zae* and *P. brachyurus*, commonly associated with maize. The objectives of this study were to evaluate the reaction of 18 breeding lines and two hybrids of maize to the nematodes *P. brachyurus* and *P. zae*, and to evaluate the reproduction of these nematode species under greenhouse conditions. Plants were individually inoculated with 800 nematodes. Sixty-two days after inoculation, reproductive ability of the nematodes was determined, estimating the reproduction factor ($RF = Pf / Pi$; Pf is the final population and Pi is the initial population of nematodes). Splitting the analysis by nematode species, only breeding line 521550 was considered susceptible to *P. brachyurus*, while for *P. zae* access 521162, 262841-1-4-1, 521550 and BRS3025 were susceptible. As for the reproduction of the nematodes, as demonstrated by FR, the multiplication of *P. zae* was significantly higher than that by *P. brachyurus*. The use of resistant plant species to lesion nematodes in crop rotation systems prevents future damage in more susceptible species. Therefore, the hybrids evaluated in this study have great potential for sowing in areas infested by *P. brachyurus* and *P. zae*, since they allow restricted multiplication rate of the nematode. The results suggest that the breeding lines evaluated are promising materials to be used in breeding programs to obtain hybrids resistant to the lesion nematodes.

INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a terceira posição no *ranking* mundial em produção de grãos de milho, colhendo em média 12 milhões de hectares a cada safra, sendo superado apenas pelos Estados Unidos e pela China (FAO, 2010).

Além de ocupar uma área cultivada considerável no território brasileiro, gerando empregos no setor agrícola, o milho é importante pela sua utilização direta na alimentação humana e de animais, bem como na indústria para a produção de cola, amido, óleo, álcool, flocos alimentícios, bebidas e de vários outros produtos importantes em nosso cotidiano. A importância do milho na produção animal pode ser reconhecida pelo consumo de 80% de todo o milho produzido no país na forma de ração (Souza & Braga, 2004).

Por ser um dos cereais de maior importância econômica no mundo, o milho é uma das espécies vegetais mais estudadas. Constantemente, programas de melhoramento estão buscando novos procedimentos para a obtenção de variedades mais produtivas e economicamente rentáveis.

Os programas de melhoramento genético do milho foram impulsionados no início do século XX, com o desenvolvimento de linhas puras ou linhagens, oriundas do processo clássico de autofecundação das plantas de milho por várias gerações e com a descoberta do vigor híbrido ou heterose, fenômeno que proporciona grande produtividade em plantas F1 provenientes do cruzamento de parentais que exibem alta divergência genética entre si. Através do conhecimento e da aplicação dos princípios da genética clássica, permitiu-se a introdução de novos caracteres na cultura do milho, como a resistência a doenças e pragas, melhor qualidade nutricional, maior produtividade, menor tombamento e quebra do colmo e, demais caracteres importantes à cultura (CIB, 2010).

Os conceitos para o desenvolvimento do milho híbrido surgiram por volta de 1909, em que dois estudos independentes chegaram a semelhantes conclusões. Desde o início do século passado, o método utilizado na formação do milho híbrido vem adotando os mesmos procedimentos de auto-fecundações sucessivas para obtenção das linhagens, sendo essas avaliadas quanto à capacidade de combinação e obtenção dos híbridos. A auto-fecundação contínua de indivíduos por sete a dez gerações resulta em linhagens puras, sendo que a fixação dos alelos nessas linhas puras leva à redução no vigor e na produtividade, entretanto o vigor híbrido restaurado pelo cruzamento de linhagens endogâmicas provoca significativos aumentos na produtividade (East, 1909; Shull, 1909).

No entanto, para que a produção comercial de milho híbrido seja eficiente, são necessários métodos para identificar as linhagens com resistência aos patógenos e que apresentem os melhores desempenhos “*per se*” ou em combinações híbridas (Melo et al., 2001).

A cultura do milho é de grande importância econômica para o Brasil, também por ser uma opção economicamente atrativa para uso em rotação de cultura em plantios de soja objetivando o controle de alguns fitonematoides (Johnson, 1985 e Raymundo, 1985). Visando garantir a sustentabilidade desse sistema de rotação, estudos têm sido feitos no sentido de desenvolver híbridos com resistência múltipla a doenças (Baldwin & Barker, 1970; Brito & Antonio, 1989; Jones et al., 1997; Schuelter et al., 2003; Vieira et al., 2009). No que se refere a nematoides, a maioria desses estudos concentra-se em nematoides causadores de galhas, *Meloidogyne* spp. (Waudou & Norton, 1986; Jordaan et al., 1987; Aung et al., 1990; Silva e Carneiro, 1993; Medeiros et al., 2001; Manzotte et al., 2002; Ribeiro et al., 2002; Carneiro et al., 2006 e Carneiro et al., 2007). Entretanto, observa-se a necessidade de se conhecer mais sobre as espécies *Pratylenchus zae* e *P. brachyurus* em relação ao milho, as quais são rotineiramente associadas à cultura.

As espécies de *Pratylenchus* Filipjev, 1936 são referidas como os “nematóides das lesões radiculares” devido aos sintomas na forma de lesões necróticas que causam nas raízes de seus hospedeiros (Godfrey, 1929 e Tihohod, 1993). No Brasil e no mundo, esses fitonematóides ocupam o segundo lugar em importância econômica, sendo superados, apenas, pelos nematóides de galha *Meloidogyne* spp. (Sasser & Freckman, 1987 e Tihohod, 1993). Causam necroses em raízes e outros órgãos subterrâneos em 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).

As espécies de nematóides que atacam a cultura do milho com mais frequência são aquelas pertencentes ao gênero *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (Lordello, 1986). No Brasil, as espécies de nematóides mais importantes para a cultura do milho, quanto à patogenicidade, à distribuição e à alta densidade populacional, são *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941, *Pratylenchus zae* Graham, 1951, *Helicotylenchus dihystra*, *Criconemoides* spp. e *Xiphinema* spp. (Costa et al., 2009). *P. brachyurus* e *P. zae* são as mais danosas a cultura do milho sendo que o controle desses nematóides aumenta até duas vezes o custo de produção (Lordello, 1984). No Quênia, a espécie mais importante é *P. zae*, sendo já relatada até 50% de perda em campo infestado (Kimenju et al., 1998). Na região central-norte dos Estados Unidos da América, as perdas na produção de milho têm sido associadas mais frequentemente às espécies *P. hexincisus* Taylor and Jenkins e *P. scribneri* Steiner (Bergeson, 1978 e Norton, 1983).

P. brachyurus já foi relatado no Brasil em quiabeiro *Abelmoschus esculentus*(L.) Moench (Café-filho & Huang, 1988) e sua patogenicidade foi estudada nessa cultura, a qual reagiu com boa hospedeira (Inomoto et al., 2004). Inomoto et al., (2001) estudaram o efeito de *P. brachyurus* no crescimento de duas cultivares de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) em casa de vegetação e

observaram que ambas as cultivares analisadas mostram-se boas hospedeiras ao *P. brachyurus* afetando ligeiramente a massa fresca das raízes e também a massa seca da parte aérea. Porém, em condições de campo observou-se que ele é pouco agressivo ao algodoeiro, uma vez que densidades populacionais inferiores a 12000 nematoides por planta não causaram redução no crescimento das plantas (Machado et al., 2006).

O nematoide das lesões radiculares também já foi relatado como importante patógeno na cultura do milho na região norte dos Estados Unidos, onde perdas na produção foram estimadas com base nas densidades populacionais de espécies de *Pratylenchus* (Smolik & Everson, 1987; Norton, 1983). Com objetivo de controlar nematoides associados à cultura do milho, inclusive *Pratylenchus* spp., foi realizado um experimento na região centro-norte da Flórida, observando-se que o revolvimento do solo a 40 cm de profundidade aumentou a produção do milho (Rich et al., 1985).

Vários pesquisadores têm dedicado seus estudos a *P. zaeae* (Jordaan et al., 1987; Muchena & Bird, 1988; Arim et al., 2006; Berry et al., 2008; Guimarães et al., 2008; Cabrera et al., 2009). Na busca de controle de *P. zaeae*, foi avaliado o efeito de cinco espécies de ervas daninhas sobre a infestação de *P. zaeae* em milho, sendo que os autores concluíram que, dentre as espécies testadas, *Crotalaria shaerocarpa* Perr. ex DC merece atenção especial por aumentar a população do nematoide e também *Eleusine indica* L., além de ser suscetível a *P. zaeae*, também apresenta capacidade de competir com o milho (Jordan & De Waele, 1988)

No Brasil, tornaram-se também frequentes trabalhos visando caracterizar a reação de genótipos de milho, em função da capacidade reprodutiva dos nematoides nas raízes, devido a busca constante em desenvolver cultivares resistentes a nematoide e a necessidade de conhecer mais sobre a patogenicidade dos mesmos (Brito e Antonio, 1989; Guimarães Filho, 1993; Lordello et al., 1989; Asmus & Andrade, 1997; Carneiro et al., 2006).

Em estudos moleculares visando caracterizar as populações de *P. zaeae* e *P. brachyurus* (Capítulo 1), observaram-se divergências dos resultados publicados por Waeyenberge et al. (2000), as quais motivaram os estudos com os objetivos de avaliar a reação de linhagens e híbridos de milho (*Zea mays* L.) da Embrapa Milho e Sorgo, aos nematoides *P. brachyurus* e *P. zaeae* e avaliar a reprodução de populações desses nematoides sob condições de telado.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido usando o delineamento inteiramente casualizado em fatorial 3x20x5 (1- solo não infestado, 2- *Pratylenchus zae* e 3- *P. brachyurus*, 20 acessos e 5 repetições). Cada parcela experimental consistiu de uma planta por vaso de 3 litros, totalizando 300 vasos. O experimento foi conduzido na Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), em Sete Lagoas, MG, Brasil, no período de novembro de 2009 a fevereiro de 2010. Os acessos avaliados fazem parte do programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo (Tabela 1). Foram avaliados 18 linhagens e dois híbridos comerciais sob condições de telado (Figura 1). O viveiro (242 m² e 3m de altura) onde foi instalado o experimento era protegido com tela branca anti afídeos e coberto com telhas de fibra de vidro.

Três sementes de cada acesso foram semeadas em cada vaso plástico de 3 litros, contendo substrato Plantimax®. Após a emergência, procedeu-se o desbaste, deixando-se uma planta por vaso.

Os inóculos foram obtidos a partir de populações puras mantidas em cilindros de cenoura em câmara de crescimento tipo BOD a 25°C, com ausência de fotoperíodos, conforme metodologia descrita por Santos (2007). A população de *Pratylenchus zae* e a de *P.brachyurs* foram oriundas de cana-de-açúcar (Inhumas, GO) e soja (Ipameri, GO), respectivamente. Para cada espécie em estudo, preparou-se uma suspensão contendo aproximadamente 800 nematoides/mL e as inoculações foram feitas com 1 mL dessa suspensão, dez dias após a semeadura, em orifícios feitos próximo ao colo das plantas.

Sessenta e dois dias após as inoculações as partes aéreas das plantas foram medidas, utilizando fita métrica, e em seguida, cortadas e acondicionadas em sacos de papel, esses sacos contendo a parte aérea das plantas foram levados a estufa aquecida a 50°C por uma semana, em seguida foram pesados para determinação da massa seca. Posteriormente, os sistemas radiculares

e 200 cm³ de substrato de cada vaso, foram coletados para extração dos nematoides conforme metodologia de Jenkins, 1964. As raízes foram pesadas e 20g separadas para extração dos nematoide conforme metodologia de Coolen & D'Herde (1972). A suspensão de nematoides obtida foi contada com auxílio de uma lupa. Estimou-se o fator de reprodução [FR= população final/população inicial (800 nematoides)] para avaliar a interação nematoide/genótipo. A população final de nematoides foi estimada através da soma dos nematoides das raízes e substrato. Os acessos que apresentaram fator de reprodução inferior a 1,0 foram considerados resistentes e aqueles que apresentaram fator de reprodução maior ou igual a 1,0, suscetíveis (Oostenbrink, 1966).

Os dados foram submetidos à análise de variância, através do programa SISVAR (Ferreira, 2008) e, as médias comparadas pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.



Figura 1: Vista parcial do experimento para determinação do fator de reprodução de *Pratylenchus brachyurus* e *P. zae*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A viabilidade do inóculo pode ser constatada através do fator de reprodução (FR) obtido na linhagem 16 considerada suscetível a *P. brachyurus* e a *P. zae* (Tabela 1).

Considerando o FR, quando os dados foram analisados por espécie, apenas a linhagem 16 foi considerada suscetível, quando inoculada com *P. brachyurus*, porém quando as plantas foram inoculadas com *P. zae*, os acessos 5, 16 e 19 mostraram um FR igual ou superior a 1, portanto, foram consideradas suscetíveis (Tabela 1). Esse fato pode ser confirmado observando-se o número total de nematoides nas raízes e no substrato para esses acessos, os quais mostram população final maiores significativamente do que os outros acessos (Tabela 1). O nível de resistência da maioria dos materiais estudados pode ser considerado satisfatório, uma vez que, os valores individuais de FR observados foram inferiores a 0,7. Resultados semelhantes foram obtidos por Carneiro et al. (2006), onde cultivares de aveia inoculadas com *Meloidogyne incognita* raça 1 mostraram FR inferiores a 0,5. Quando o fator de reprodução foi comparado entre as espécies de nematoides estudadas (Figura 2) observou-se que a reprodução de *P. zae* foi significativamente superior à de *P. brachyurus*. Porém, não houve diferença significativa quanto à altura e ao peso seco (Dados não apresentados) das plantas inoculadas com ambos os nematoides, embora as plantas inoculadas com *P. brachyurus* tenham se mostrado maiores (182,34 cm) que as inoculadas com *P. zae* (177,89 cm). Embora a porcentagem de linhagens suscetíveis seja baixa, é necessário considerar que, em áreas infestadas com esses nematoides, plantas com tais características não favorecem o controle do nematoide, pois sua população será gradativamente aumentada.

Quando foi analisada a altura das plantas, observou-se que os híbridos avaliados (acessos 19 e 20) e as linhagens 7 e 8 mostraram altura média significativamente superiores aos demais acessos (Tabela 3). Com o desdobramento da análise por espécie de nematoide os dois híbridos

mantiveram o mesmo comportamento, exibindo maiores alturas, enquanto que as linhagens 7 e 8, quando inoculadas com *P. zaeae*, comportaram-se de maneira estatisticamente igual aos demais acessos estudados. Quando analisadas as plantas não inoculadas (SN) e aquelas inoculadas com *P. brachyurus*, os acessos 7, 8, 19 e 20 apresentaram as maiores alturas (Tabela 3). A linhagem 7, quando inoculada com *P. zaeae*, foi significativamente menores que as plantas não inoculadas e as inoculadas com *P. brachyurus* (Tabela 3). A linhagem 10 apresentou altura significativamente superior, quando inoculada com *P. brachyurus*, quando comparadas com as plantas inoculadas com *P. zaeae* e as não inoculadas. O contrário foi observado com a linhagem 14, a qual mostrou-se significativamente superior, quanto à altura, quando inoculada com *P. zaeae*, em relação às plantas inoculadas com *P. brachyurus* e sem nematoide. A altura da linhagem 17 não foi afetada quando inoculada com ambos os nematoides estudados. Nesse caso, observou-se um crescimento significativamente superior das plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas.

São freqüentes os relatos mostrando que plantas inoculadas com nematoides inicialmente aceleram o crescimento em comparação a plantas não inoculadas, a exemplo dos estudos com maracujazeiro inoculado com *Rotylenchulus reniformis* Lindford & Oliveira, 1940 e tomateiro inoculado com *Meloidogyne incognita* (Sharma et al., 2003; Silva Paula, 2006), porém, à medida que a população aumenta, a planta tende a responder com redução no crescimento. Um dos possíveis mecanismos que explicaria o aumento no crescimento das plantas na presença do nematoide seria o estímulo à formação de raízes laterais, o que favoreceria a absorção de nutrientes (Christie, 1959).

Os híbridos usados nesse estudo se comportaram de forma semelhante, não apresentando diferenças significativas, porém, em geral eles apresentaram as maiores alturas (Tabela 3).

Quando a variável estudada foi o peso seco, a análise geral dos dados mostrou que os híbridos estudados foram significativamente superiores. Igual resultado foi obtido quando

analisadas as plantas inoculadas com as espécies de nematoide individualmente (Tabela 2). Não houve diferença estatística para o peso seco quando comparado entre os nematoides, com exceção das linhagens 9 e 13, onde as plantas não inoculadas apresentaram peso superiores às inoculadas com *P. brachyurus* e *P. zae* (Tabela 2).

Julgando pelo fator de reprodução, as linhagens de milho avaliadas, na sua maioria, parecem promissoras para serem usadas em programas de melhoramento. Além disso, os híbridos avaliados mostram-se potencialmente viáveis para uso em sistemas de rotação de culturas, principalmente para rotação com soja, porque, dentre as espécies de nematoide que mais causam prejuízos à cultura da soja no Brasil está a espécie *Pratylenchus brachyurus* (Torres et al., 2008) e o uso de genótipos de milho que reduzam a população desse nematoide torna a rotação de cultura uma eficiente medida de manejo.

A baixa população de *Pratylenchus* nas plantas estudadas mostra que as mesmas não são boas hospedeiras do nematoide. Arim *et al.* (2006), em busca de plantas de cobertura visando o controle de *P. zae* em milho, relataram elevada população de *P. zae* associada a crotalária (*Crotalaria ochroleuca* G. Don), sugerindo essa planta como ótima hospedeira desse nematoide. Esses dados foram confirmados por Dasaeger & Rao (2003), que relataram algumas espécies de crotalária (*Crotalaria ochroleuca*, *C. agatiflora* Schweinf e *C. grahamiana* Grahamine) como boas hospedeiras de *P. zae*, *P. thornei* Sher & Allen e *P. pseudopratensis* Seinhort.

Existem poucos trabalhos sobre a reação de adubos verdes a *P. brachyurus*, principalmente em condições controladas (Wang et al, 2002). Algumas plantas usadas como adubos, como a mucuna preta e a mucuna cinza (*Mucuna pruriens* (L) DC, não podem ser recomendadas para áreas infestadas com *P. brachyurus*, pois provavelmente seu uso teria consequências negativas à cultura subsequente, se for suscetível ao nematoide (soja, feijão e abacaxi, etc.). *Crotalaria spectabilis* Roth, *C. breviflora* DC e guandu anão (*Cajanus cajan* (L)

Millsp), que são adubos verdes, pouco usados no Brasil, podem ser recomendados para áreas infestadas com *M. javanica* e/ou *P. brachyurus* (Inomoto et al, 2006). Apesar dessas plantas serem valiosas no manejo desses nematoides, elas não são perfeitamente adaptadas ao sistema de plantio direto, pois necessitam ser incorporadas ao solo (Tanaka *et al.*, 1992, Wang *et al.*, 2002); portanto, em áreas nas quais a soja é cultivada sob sistema de plantio direto, o manejo desses nematoides poderia ser realizado com culturas de coberturas não hospedeiras ou más hospedeiras, como o milho híbrido BRS 1015, que foi testado neste estudo.

As poucas diferenças significativas entre as plantas inoculadas e as não inoculadas nesse estudo indicam que os acessos estudados são maus hospedeiros das duas espécies de nematoides, isso também foi observado no estudo de Arim et al. (2006), o qual observou baixo fator de reprodução de *P. zae* em milho. Diferenças genotípicas nos acessos de milho avaliados neste estudo podem explicar as diferentes respostas obtidas. Arim et al. (2002) revelaram que a variedade comercial de milho Emap11 foi boa hospedeira (FR= 2,9) a *P. zae*, enquanto que as variedades H627 (FR=1,3) e Pan5195 (FR= 1,8) foram más hospedeiras.

É importante enfatizar que a maioria dos acessos de milho avaliados foram resistentes a ambas as espécies de *Pratylenchus*. Assim, os genótipos comerciais testados podem ser indicados para uso em rotação em áreas infestadas por essas espécies de nematoides. O uso de espécies cultivadas resistentes ao nematoide das lesões radiculares em sistemas de rotação de culturas previne danos futuros em espécies mais suscetíveis. Portanto os híbridos de milho BRS3025 e BRS1055 avaliados apresentam grande potencial para semeadura em áreas infestadas por *P. brachyurus* e *P. zae*, pois apresentam taxas restritas de multiplicação do nematoide e as linhagens que apresentaram reação de resistência aos nematoides constituem materiais promissores para serem usados em programas de melhoramento, visando a obtenção de híbridos resistentes. No entanto, novos ensaios serão necessários para confirmação dos resultados obtidos

nesse trabalho.

CONCLUSÕES

Os híbridos de milho, BRS3025 e BRS1055, testados podem ser indicados para uso em rotação em áreas infestadas por *P. brachyurus* e *P. zea*, pois apresentam taxas restritas de multiplicação desses nematoide.

As linhagens com resistência aos nematoides acima constituem materiais promissores para ser usados em programas de melhoramento, para obtenção de híbridos resistentes.

PERSPECTIVAS

Os experimentos deverão ser repetidos para confirmação dos resultados. Nesse caso deverão ser usados padrões de resistência e suscetibilidade, para dar maior confiabilidade ao trabalho.

Se os resultados confirmarem que a resistência das linhagens observadas nesse estudo, as mesmas poderão ser analisadas para direcionar os possíveis cruzamentos para obtenção de milho híbrido no programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo.

BIBLIOGRAFIA CITADA

Jenkins WR (1964) A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report* 48: 692.

Arim OJ, Waceke JW, Waudu SW, Kimenju JW (2002) Response of cover crops and commercial maize (*Zea mays* L.) varieties cultivated in Central highlands of Kenya to *Pratylenchus* spp. (lesion nematodes). In: Proceedings of the Fifth Regional Forum for Agricultural Resource Husbandry 12–16th August 2002, Entebbe, Uganda, pp 318–319.

Arim, O J, Waceke JW, Waudu SW, Kimenju JW (2006) Effects of *Canavalia ensiformis* and *Mucuna pruriens* intercrops on *Pratylenchus zae* damage and yield of maize in subsistence agriculture *Plant Soil*. 284:243–251.

Asmus GL, Andrade PJM (1997) Reprodução de *Meloidogyne javanica* em cultivares de milho. *Nematologia Brasileira* 21:39-47.

Baldwin JG, Barker KR (1970) Host suitability of select hybrids, varieties and inbreds of corn to populations of *Meloidogyne* spp. *Journal of Nematology* 2:345-350.

Bergeson, GB (1978) Control of the lesion nematode (*Pratylenchus* spp.) in corn with carbofuran. *Plant Disease Reporter* 62:265-297.

Berry SD, Fargette M, Spaul V, Morand S, Cadet P (2008) Detection and quantification of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*), lesion nematode (*Pratylenchus zae*) and dagger nematode (*Xiphinema elongatum*) parasites of sugarcane using real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes* 22:168–176.

Brito JA, Antonio H (1989). Resistência de genótipos de milho a *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira* 13:129-137.

Cabrera JA, Kiewnick S, Grimm C, Dababat AA, Sikora RA (2009) Efficacy of abamectin seed treatment on *Pratylenchus zae*, *Meloidogyne incognita* and *Heterodera schachtii*. *Nematologica* 33:213-219.

Carneiro, RG, Moritz, MP, Mônico, APA, Lima, ACC, Santiago, DC (2006) Reação de cultivares de aveia às raças 1 e 3 de *Meloidogyne incognita* e *M. paranaensis*. *Nematologia Brasileira* 30: 281-285.

Christie JR (1959) *Plant nematodes: their bionomics and control*. Gainesville, Florida. University of Florida. 25p.

CIB- <http://www.cib.org.br/> acesso em 10/07/2010.

Coolen, WA, D'Herde, CJ (1972). A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent, State Agricultural Research Center, 77p.

Costa RV da, Casela CR, Cota LV (2009) Sistemas de Produção, 2 ISSN 1679-012X 5ª edição. In:http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/index.htm acesso em 08/07/2010.

Desaeger J, Rao MR (2003) Significance of lesion and spiral nematodes in crotalaria-maize rotation in western Kenya. *Nematropica* 33:27-40.

East EM (1909) The distinction between development and heredity in breeding. *American Naturalist* 43:173-181.

Ferreira DF (2008) SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium (Lavras)*. 6:36-41.

Guimarães Filho O (1993) Reação de genótipos de milho (*Zea mays* L.) a *Meloidogyne javanica*. Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 54p. Tese de Mestrado.

Guimarães LMP, Pedrosa EMR, Coelho RSB, Chaves A, Maranhão SRVL, Miranda TL (2008) Efeito de metil jasmonato e silicato de potássio no parasitismo de *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus zae* em cana-de-açúcar. *Nematologia Brasileira* 32: 50-55.

Inomoto MM, Goulart AMC, Machado ACZ, Monteiro AR (2001) Effect of population densities of *Pratylenchus brachyurus* on the growth of cotton plants. *Fitopatologia Brasileira* 26:192-196.

Inomoto MM, Silva RA, Pimentel JP (2004) Patogenicidade de *Pratylenchus brachyurus* e *P. coffeae* em quiabeiro. *Fitopatologia Brasileira* 29:551-554.

Johnson, A. W. (1985) Specific crop rotation effects combined with cultural practices and nematicides. Pp. 283-301 in J. N. Sasser, and C. C. Carter, eds. *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Vol. 1: Biology and Control. NCSU and USAID Cooperative Publication, Raleigh, NC, U.S.A.

Jones JT, Phillips MS, Armstrong MR (1997) Molecular approaches in plant nematology. *Fundamental Applied Nematology* 20:1-14.

Jordaan EM, De Waele D (1988) Host status of five weed species and their effects on *Pratylenchus zae* infestation of maize. *Journal of Nematology* 20:620-624.

Jordaan EM, Loots GC, Jooste WJ, De Waele D (1987) Effects of root-lesion nematodes (*Pratylenchus brachyurus* Godfrey and *Pratylenchus zae* Graham) and *Fusarium moniliforme* Sheldon alone or in combination, on maize. *Nematologica* 33:213-219

Kimenju JW, Waudu SW, Mwang'ombe AW, Sikora RA, Schuster RP (1998) Distribution of lesion nematodes associated with maize in Kenya and susceptibility of maize cultivars to *Pratylenchus zae*. *African Crop Science Journal* 6:367-375.

Lordello AIL, Lordello RR, A Sawazak E (1989) Resistência de milho a *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira* 13:71-79.

Lordello LGE (1984) *Nematoides das plantas cultivadas*. 8 ed. São Paulo. Nobel.

Machado ACZ, Beluti DB, Silva RA, Serrano MAS, Inomoto MM (2006) Avaliação de danos causados por *Pratylenchus brachyurus* em algodoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 31:011-016.

Melo, WM.C., Pinho RGV, Ferreira DF (2001) Capacidade combinatória e divergência genética em híbridos comerciais de milho. *Ciência Agrotécnica* 25:821-830.

Muchena PK, Bird GW (1988) Distribution and impact of *Pratylenchus zae* and *Pratylenchus brachyurus* on maize production in communal farms in Manicaland-Province, Zimbabwe. *Journal of Nematology* 20:650-650.

Norton DC (1982) Densities of *Pratylenchus hexincisus* in maize and species related to maize. *Journal of Nematology* 14:461-462.

Norton, DC (1983) Maize nematode problems. *Plant Disease* 67:253-256.

Oostenbrink, M (1966) Major characteristics of the relation between nematodes and plants *Med. Landbouwhogeschool, Wageningen* 66:3-46.

Raymundo S A (1985) Cropping systems research and root-knot nematode control. pp. 277-281 in JN Sasser and CC Carter, Eds. *An Advanced Treatise on Meloidogyne* . Vol. 1: Biology and Control. NCSU and USAID Cooperative Publication, Raleigh, NC, U.S.A.

Rich JR, Jhonson JT, Hodge CH (1985) Corn response to subsoiling and nematicide application. *Journal of Nematology* 17:404-407.

Santos JRP (2007) Caracterização de genótipos de *Musa* com base na reação a *Radopholus similis* e de genótipos contrantes para resistência com base em marcadores moleculares RAPD. (Tese de mestrado). Universidade de Brasília. pp. 72.

Sharma RD, Junqueira NTV, Gomes AC (2003) Reaction of passionfruit genotypes to the reniform nematode, *Rotylenchulus reniformis*. *Nematologia Brasileira* 25:211-215.

Shull, G.H. (1909) A pure line method of corn breeding. Report “Americam Breeders Association”, Washington, v.5, p.51-59.

Silva Paula M (2006) Diversidade genetica e reação de *Passiflora* spp. a *Meloidogyne javanica*. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. 98p.

Smolik JD, Evenson PD (1987) Relationship of yields and *Pratylenchus* spp. Population densities in dryland and irrigates corn. *Annal of Applied Nematology* 1:71-73.

Torres RG, Ribeiro NR, Boer CA, Fernandes O, Figueiredo AG, Ferreira Neto, A (2008) Manejo integrado de nematoides em sistema de plantio direto no cerrado. In: Boletim técnico Manejo de nematoide SPD cerrados_2008.[pdf] acesso em 16/07/2010

Arim OJ, Waceke JW, Waudu SW, Kimenju JW (2002) Response of cover crops and commercial maize (*Zea mays* L.) varieties cultivated in Central highlands of Kenya to *Pratylenchus* spp. (lesion nematodes). In: Proceedings of the Fifth Regional Forum for Agricultural Resource Husbandry 12–16th August 2002, Entebbe, Uganda, pp 318–319.

Arim, O J, Waceke JW, Waudu SW, Kimenju JW (2006) Effects of *Canavalia ensiformis* and *Mucuna pruriens* intercrops on *Pratylenchus zae* damage and yield of maize in subsistence agriculture Plant Soil. 284:243–251.

Asmus GL, Andrade PJM (1997) Reprodução de *Meloidogyne javanica* em cultivares de milho. Nematologia Brasileira 21:39-47.

Baldwin JG, Barker KR (1970) Host suitability of select hybrids, varieties and inbreds of corn to populations of *Meloidogyne* spp. Journal of Nematology 2:345-350.

Bergeson, GB (1978) Control of the lesion nematode (*Pratylenchus* spp.) in corn with carbofuran. Plant Disease Reporter 62:265-297.

Berry SD, Fargette M, Spaul V, Morand S, Cadet P (2008) Detection and quantification of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*), lesion nematode (*Pratylenchus zae*) and dagger nematode (*Xiphinema elongatum*) parasites of sugarcane using real-time PCR. Molecular and Cellular Probes 22:168–176.

Brito JA, Antonio H 1989. Resistência de genótipos de milho a *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira 13:129-137.

Cabrera JA, Kiewnick S, Grimm C, Dababat AA, Sikora RA (2009) Efficacy of abamectin seed treatment on *Pratylenchus zae*, *Meloidogyne incognita* and *Heterodera schachtii*. Nematologica 33:213-219.

Carneiro, RG, Moritz, MP, Mônico, APA, Lima, ACC, Santiago, DC (2006) Reação de cultivares de aveia às raças 1 e 3 de *Meloidogyne incognita* e *M. paranaensis*. Nematologia Brasileira 30: 281-285.

Christie JR (1959) Plant nematodes: their bionomics and control. Gainesville, Florida. University of Florida. 25p.

CIB- <http://www.cib.org.br/> acesso em 10/07/2010.

Coolen, WA, D'Herde, CJ (1972). A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent, State Agricultural Research Center, 77p.

Desaeger J, Rao MR (2003) Significance of lesion and spiral nematodes in crotalaria-maize rotation in western Kenya. Nematologica 33:27-40.

East EM (1909) The distinction between development and heredity in breeding. American Naturalist 43:173-181.

Guimarães Filho O (1993) Reação de genótipos de milho (*Zea mays* L.) a *Meloidogyne javanica*. Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 54p. Tese de Mestrado.

Guimarães LMP, Pedrosa EMR, Coelho RSB, Chaves A, Maranhão SRVL, Miranda TL (2008) Efeito de metil jasmonato e silicato de potássio no parasitismo de *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus zae* em cana-de-açúcar. *Nematologia Brasileira* 32: 50-55.

Inomoto MM, Goulart AMC, Machado ACZ, Monteiro AR (2001) Effect of population densities of *Pratylenchus brachyurus* on the growth of cotton plants. *Fitopatologia Brasileira* 26:192-196.

Inomoto MM, Silva RA, Pimentel JP (2004) Patogenicidade de *Pratylenchus brachyurus* e *P. coffeae* em quiabeiro. *Fitopatologia Brasileira* 29:551-554.

Johnson, A. W. (1985) Specific crop rotation effects combined with cultural practices and nematicides. Pp. 283-301 in J. N. Sasser, and C. C. Carter, eds. *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Vol. 1: Biology and Control. NCSU and USAID Cooperative Publication, Raleigh, NC, U.S.A.

Jordaan EM, De Waele D (1988) Host status of five weed species and their effects on *Pratylenchus zae* infestation of maize. *Journal of Nematology* 20:620-624.

Jordaan EM, Loots GC, Jooste WJ, De Waele D (1987) Effects of root-lesion nematodes (*Pratylenchus brachyurus* Godfrey and *Pratylenchus zae* Graham) and *Fusarium moniliforme* Sheldon alone or in combination, on maize. *Nematologica* 33:213-219

Kimenju JW, Waudu SW, Mwang'ombe AW, Sikora RA, Schuster RP (1998) Distribution of lesion nematodes associated with maize in Kenya and susceptibility of maize cultivars to *Pratylenchus zae*. *African Crop Science Journal* 6:367-375.

Lordello AIL, Lordello RR A Sawazak E (1989) Resistência de milho a *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira* 13:71-79.

Lordello LGE (1984) *Nematóides das plantas cultivadas*. 8 ed. São Paulo. Nobel.

Machado ACZ, Beluti DB, Silva RA, Serrano MAS, Inomoto MM (2006) Avaliação de danos causados por *Pratylenchus brachyurus* em algodoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 31:011-016.

Melo, WM.C., Pinho RGV, Ferreira DF (2001) Capacidade combinatória e divergência genética em híbridos comerciais de milho. *Ciência Agrotécnica* 25:821-830.

Muchena PK, Bird GW (1988) Distribution and impact of *Pratylenchus zae* and *Pratylenchus brachyurus* on maize production in communal farms in Manicaland-Province, Zimbabwe. *Journal of Nematology* 20:650-650.

Norton DC (1982) Densities of *Pratylenchus hexincisus* in maize and species related to maize. *Journal of Nematology* 14:461-462.

Norton, DC (1983) Maize nematode problems. *Plant Disease* 67:253-256.

Oostenbrink, M (1966) Major characteristics of the relation between nematodes and plants Med. Landbouwhogeschool, Wageningen 66:3-46.

Raymundo S A (1985) Cropping systems research and root-knot nematode control. pp. 277-281 in JN Sasser and CC Carter, Eds. An Advanced Treatise on *Meloidogyne* . Vol. 1: Biology and Control. NCSU and USAID Cooperative Publication, Raleigh, NC, U.S.A.

Rich JR, Jhonson JT, Hodge CH (1985) Corn response to subsoiling and nematicide application. Journal of Nematology 17:404-407.

Santos JRP (2007) Caracterização de genótipos de *Musa* com base na reação a *Radopholus similis* e de genótipos contrantes para resistência com base em marcadores moleculares RAPD. (Tese de mestrado). Universidade de Brasília. pp. 72.

Sharma RD, Junqueira NTV, Gomes AC (2003) Reaction of passionfruit genotypes to the reniform nematode, *Rotylenchulus reniformis*. Nematologia Brasileira 25:211-215.

Shull, G.H. (1909) A pure line method of corn breeding. Report “Americam Breeders Association”, Washington, v.5, p.51-59.

Silva Paula M (2006) Diversidade genetica e reação de *Passiflora* spp. a *Meloidogyne javanica*. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. 98p.

Smolik JD, Evenson PD (1987) Relationship of yields and *Pratylenchus* spp. Population densities in dryland and irrigates corn. Annal of Applied Nematology 1:71-73.

Torres RG, Ribeiro NR, Boer CA, Fernandes O, Figueiredo AG, Ferreira Neto, A (2008) Manejo integrado de nematóides em sistema de plantio direto no cerrado. In: Boletim técnico Manejo de nematóide SPD cerrados_2008.[pdf] acesso em 16/07/2010

Tabela 1: Reação de linhagens e híbridos de milho, baseada no fator de reprodução, a *Pratylenchus brachyurus* e *P. zaeae*, 62 dias após a inoculação.

Código do acesso	Nome do acesso	<i>Pratylenchus brachyurus</i>			<i>Pratylenchus zaeae</i>		
		PF (TNR+TNS)	FR	Reação	PF (TNR+TNS)	FR	Reação
17	2841	102,44 a	0,13	R	117,44 a	0,15	R
14	521237	115,58 a	0,15	R	147,19 a	0,19	R
20	BRS1055	204,49 ab	0,26	R	204,49 ab	0,26	R
18	161.1 S13	218,36 ab	0,27	R	233,36 ab	0,29	R
09	L37	239,39 ab	0,30	R	292,84 ab	0,36	R
11	228-3	258,14 ab	0,32	R	307,40 ab	0,38	R
12	521236	295,37 ab	0,37	R	306,02 ab	0,38	R
06	L93	308,31 ab	0,39	R	353,31 ab	0,44	R
08	L726	315,75 ab	0,40	R	351,74 ab	0,44	R
13	L93	370,94 ab	0,50	R	420,46 ab	0,53	R
07	L5046	400,78 ab	0,50	R	423,28 ab	0,53	R
15	57500.07	442,51 ab	0,55	R	502,50 ab	0,63	R
04	531542	455,34 ab	0,57	R	489,74 ab	0,61	R
01	L3	451,75 ab	0,56	R	519,25 ab	0,64	R
10	262841-1-4-1	530,96 ab	0,66	R	577,85 ab	0,72	R
03	521274	549,03 ab	0,68	R	614,34 ab	0,77	R
02	TR6DM-25	589,59 ab	0,73	R	663,00 ab	0,83	R
19	BRS 3025	547,67 ab	0,68	R	802,10 b	1,0	S
05	521162	556,19 ab	0,69	R	859,32 b	1,1	S
16	521550	787,74 b	1,0	S	859,32 b	1,1	S

PF= População final de nematoides; TNR= Total de nematoides nas raízes; TNS= total de nematoides no substrato; R=resistente; S= Suscetível; 1 a 18= linhagens e 19 e 20= híbridos. As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade.

Tabela 2: Peso da matéria seca (g) da parte aérea de milho inoculado com *Pratylenchus brachyurus* e *P. zaeae*, 62 dias após inoculação.

Código do acesso	Nome do acesso	População de nematoide					
		Sem Nematóide		<i>P. brachyurus</i>		<i>P. zaeae</i>	
1	L3	66,4	A a	64,9	A ab	70,3	A abc
2	TR6DM-25	65,3	A a	57,3	A a	64,9	A abc
3	521274	60,3	A a	67,6	A abc	62,6	A ab
4	531542	59,5	A A	65,7	A abc	67,1	A abc
5	521162	44,6	A A	62,5	A a	53,3	A a
6	521283	67,3	A A	57,2	A a	47,1	A a
7	L5046	65,6	A A	72, 51	A abc	53,4	A a
8	L726	64,6	A A	53,6	A a	66,5	A abc
9	L37	68,3	B A	45,1	A a	47,6	AB a
10	262841-1-4-1	46,7	A A	49,0	A a	48,0	A a
11	228-3	59,9	A A	66,3	A abc	64,6	A abc
11	521236	54,4	A A	49,4	A a	44,9	A a
12	L93	75,2	B Ab	47,0	A a	42,2	A a
13	521237	44,1	A A	61,0	A a	44,2	A a
14	57500.07	53,3	A A	45,1	A a	61,5	A ab
15	521550	59,2	A A	55,9	A a	69,4	A abc
17	2841	54,0	A A	65,4	A abc	59,3	A a
18	161.1 S13	47,9	A A	59,1	A a	43,6	A a
19	BRS 3025	104,8	A B	97,7	A bc	93,1	A bc
20	BRS1055	102,7	A B	98,3	A c	96,1	A c

Códigos do acesso de 1 a 18= linhagens e 19 e 20= híbridos.

Letras maiúsculas comparam as médias nas linhas pelo teste de Tukey 5% probabilidade.

Letras minúsculas comparam as médias na coluna pelo teste de Tukey 5% probabilidade.

Tabela 3: Altura (cm) da parte aérea de plantas de milho inoculadas com *Pratylenchus brachyurus* e *P. zae*, 62 dias após inoculação.

Código do acesso	Nome do acesso	População de nematóide					
		Sem nematoide		<i>P. brachyurus</i>		<i>P. zae</i>	
1	L3	130,2	A a	119,8	A a	145,8	A a
2	TR6DM-25	150,8	A abc	162,8	A abc	175,4	A Abcd
3	521274	167,4	A abcd	152,4	A abc	153,0	A Ab
4	531542	182,8	A bcde	192,6	A bcdef	172,2	A Abc
5	521162	150,0	A ab	179,8	A bcde	173,0	A Abcd
6	521283	152,8	A abc	157,2	A abc	156,4	A Ab
7	L5046	224,0	B e	217,8	AB ef	185,8	A Abcd
8	L726	206,4	A de	213,2	A def	192,2	A Abcd
9	L37	179,6	A abcde	160,0	A abc	173,8	A Abcd
10	262841-1-4-1	156,4	A abcd	205,6	B cdef	184,2	AB Abcd
11	228-3	186,6	A bcde	177,6	A bcde	185,0	A Abcd
12	521236	186,7	A bcde	191,2	A bcdef	175,2	A Abcd
13	L93	190,5	A bcde	205,3	A cdef	181,8	A Abcd
14	521237	169,0	AB abcd	164,6	A abcd	199,0	B Bcd
15	57500.07	145,0	A ab	150,6	A ab	144,4	A A
16	521550	195,2	A bcde	185,8	A bcdef	175,6	A Abcd
17	2841	151,4	A abc	190,4	B bcdef	186,6	B Abcd
18	161.1 S13	152,4	A abc	167,2	A abcd	161,4	A Ab
19	BRS 3025	200,8	A cde	223,0	A ef	223,0	A Cd
20	BRS1055	222,2	A e	232,8	A f	215,4	A d

PB= *Pratylenchus brachyurus*; *P. zae*; SN=sem nematoide; R=resistente; S= Suscetível; 1 a 18= linhagens e 19 e 20= híbridos.

Letras maiúsculas comparam as médias nas linhas pelo teste de Tukey 5% probabilidade.

Letras minúsculas comparam as médias nas coluna pelo teste de Tukey 5% probabilidade.

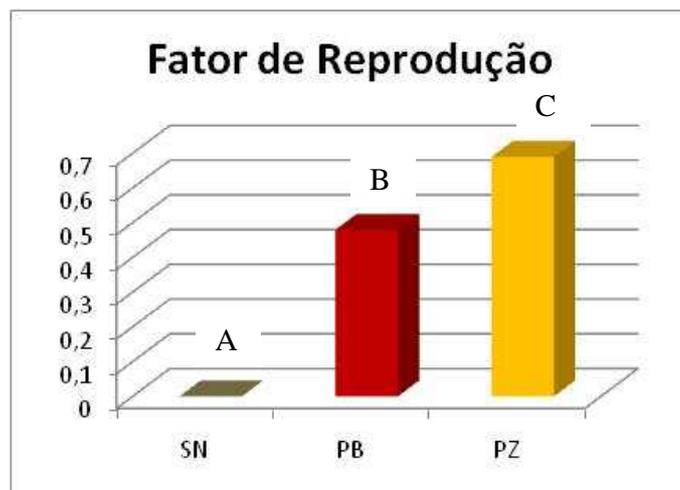


Figura 2: Médias do fator de reprodução de *Pratylenchus brachyurus* e *P. zae* em linhagens e híbridos de milho, 62 dias após a inoculação. SN= Não inoculados, PB=*Pratylenchus brachyurus* e PZ=*Pratylenchus zae*. (teste de Tukey 5% de probabilidade)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O padrão obtido através da técnica molecular PCR-RFP demonstrou que a região ITS do rDNA pode ser usada para diferenciar espécies de *Pratylenchus*.

Este trabalho representa o primeiro relato da utilização do PCR-RFP para caracterizar em nível molecular diferentes populações brasileiras de cinco espécies de *Pratylenchus*.

Os híbridos de milho, BRS3025 e BRS1055, testados podem ser indicados para uso em rotação em áreas infestadas por *P. brachyurus* e *P. zaeae*, pois apresentam taxas restritas de multiplicação desses nematoides.

As linhagens com resistência (L3, TR6DM-25, 521274, 531542, 521283, L5046, L726, L37, 228-3, 521236, L93, 521237, 57500.07, 2841 e 161.1 S13) aos nematoides citados acima constituem materiais promissores para ser usados em programas de melhoramento, para obtenção de híbridos resistentes.

PERSPECTIVAS

Os fragmentos obtidos na PCR poderiam ser usados para seqüenciamento e o resultado pode ser utilizados para análise filogenética, e conseqüentemente, poder-se-ia verificar a relação genética inter e intra populacional. A partir do seqüenciamento seria possível desenhar um par de *primer* espécie específico para *P. zae*.

Para observação de variabilidade intraespecífica das populações de *Pratylenchus*, poderiam ser usadas outras técnicas com objetivo de detectar esse tipo de variabilidade. E ainda podem ser testadas outras enzimas, além de testar maior número de populações de cada espécie estudada.

Os experimentos deverão ser repetidos para confirmação dos resultados. Nesse caso deverão ser usados padrões de resistência e suscetibilidade, para dar maior confiabilidade ao trabalho.

Se os resultados confirmarem que a resistência das linhagens observadas nesse estudo, as mesmas poderão ser analisadas para direcionar os possíveis cruzamentos para obtenção de milho híbrido no programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo.