



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VANESSA LOPES LIRA

**DIAGNÓSTICO TAXONÔMICO DO NEMATOIDE RENIFORME E
POTENCIALIDADE DE FILTRADOS FÚNGICOS PARA O CONTROLE
BIOLÓGICO**

Recife
2020

VANESSA LOPES LIRA

**DIAGNÓSTICO TAXONÔMICO DO NEMATOIDE RENIFORME E
POTENCIALIDADE DE FILTRADOS FÚNGICOS PARA O CONTROLE
BIOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Leonor Costa Maia

Coorientador: Dr^o. Antônio Félix da Costa

Coorientador: Dr^o. Romero Marinho de Moura

Recife
2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Lira, Vanessa Lopes

Diagnóstico taxonômico do nematoide reniforme e potencialidade de
filtrados fúngicos para o controle biológico / Vanessa Lopes Lira- 2020.
129 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Leonor Costa Maia

Coorientadores: Antônio Félix da Costa
Romero Marinho de Moura

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife,
2020.

Inclui referências e anexos.

1. *Rotylenchulus reniformis* 2. Coentro 3. Feijoeiro caupi
I. Maia, Leonor Costa (Orientadora) II. Costa, Antônio Félix da (Coorientador)
III. Moura, Romero Marinho de (Coorientador) IV. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-101

VANESSA LOPES LIRA

**DIAGNÓSTICO TAXONÔMICO DO NEMATOIDE RENIFORME E
POTENCIALIDADE DE FILTRADOS FÚNGICOS PARA O CONTROLE
BIOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 20/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Leonor Costa Maia
Departamento de Micologia/UFPE

Dra. Neiva Tinti de Oliveira
Departamento de Micologia/UFPE

Dra. Ana Paula Sant'Anna da Silva
Departamento de Bioquímica/UFPE

Dr. Romero Marinho de Moura
Departamento de Micologia/UFPE

Dr. Gabriel Olivo Locatelli
Centro Acadêmico de Vitória – CAV/UFPE

Ao meu esposo Fábio e aos meus filhos Brenno e Brenda

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e conceder coragem e força para enfrentar e superar obstáculos.

Ao meu esposo, Fábio Santos, pelo carinho, incentivo e paciência ao longo dessa trajetória.

À Prof^a Dr^a. Leonor Costa Maia, pela oportunidade que me foi concedida, pela orientação e por todo o apoio.

Ao amigo e prof^o Dr. Romero Marinho de Moura, pela orientação, amizade e por sempre acreditar no meu potencial.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA, por ter fornecido todo o suporte necessário para o desenvolvimento dessa pesquisa. Em especial, agradeço ao Dr. Antonio Félix da Costa, pela orientação e inestimável apoio que foi fundamental para o sucesso desse trabalho. Muito obrigada pela disponibilidade e dedicação. Sou grata aos que fazem parte do Programa Feijão; todos de alguma forma, contribuíram para a realização dessa pesquisa. Agradeço também a Luis Gilvan “Nazaré” e a Venézio Santos pelos serviços prestados.

Ao Engenheiro Agrônomo da Hortivale, Rildo Gomes Feitosa, pelo auxílio nas coletas de solo e ao Prof^o Dr. André Esteves pelo espaço cedido para extração das amostras de solo.

A todos os que fazem parte do Laboratório de Fungos Fitopatogênicos e Biocontroladores e, em especial, à Msc. Ana Cláudia Tenório do Amaral, pelo suporte na identificação molecular dos nematoides e pela amizade. À Msc. Deyse Viana dos Santos pela colaboração na realização de todas as etapas experimentais. Ao Dr. Renan do Nascimento Barbosa, pelo apoio na identificação molecular dos fungos. Ao Dr. Roger Fagner Ribeiro de Melo, pelo auxílio na identificação morfológica dos fungos.

Ao Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica e, em especial à Dr^a Ana Paula Sant'Anna da Silva, pela colaboração na condução e avaliação dos experimentos bioquímicos.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB), pela oportunidade que me foi dada de desenvolver essa pesquisa.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela bolsa concedida.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito, não sou o que deveria ser, mas, graças a Deus, não sou o que eu era antes (KING, 2012).

RESUMO

Rotylenchulus reniformis é um dos maiores problemas fitossanitários da cultura do coentro e do feijoeiro caupi. Esse fitonematoide parasita mais 300 espécies de plantas, ocasionando expressiva redução na produtividade de várias culturas. Existem diversos métodos de controle de fitonematoides, mas, no caso do coentro e de outras culturas de ciclo curto, a opção mais favorável é o controle biológico. O biocontrole, quando possível, é uma técnica agronomicamente rentável, que favorece a conservação do equilíbrio do meio ambiente e não induz o surgimento de espécies resistentes do patógeno. Entre os agentes utilizados no biocontrole, os fungos são os que apresentam maior potencial. Neste trabalho, foi avaliado o efeito de filtrados de 17 fungos na mortalidade e eclosão de *R. reniformis* por meio de teste *in vitro* e em plantas de coentro e de feijoeiro caupi. Os filtrados que apresentaram os mais altos efeitos nematicidas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, tiveram seus compostos ativos semipurificados e os grupos metabólicos identificados por cromatografia em camada delgada. O grupo dos compostos fenólicos, os quais estão incluídos os flavonóides e derivados cinâmicos, foi o mais abundante nesses extratos fúngicos e apresentaram efeitos antagônicos ao nematoide em estudo. Também, foi realizada a caracterização morfológica, molecular e de raça de 11 populações de *R. reniformis*. Todas foram identificadas como sendo *R. reniformis* raça A, com ampla diversidade morfológica. Nos testes de biocontrole *in vitro*, os isolados identificados como *Fusarium inflexum*, *Penicillium* A25, *Penicillium* TA14, *Penicillium citrinum*, *Thielavia terricola*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma brevicompactum* e *Trichoderma harzianum* induziram mortalidade da ordem de 88,5 a 100% dos juvenis de *R. reniformis*, em 48 h de exposição aos filtrados e permitiram apenas 4,6 a 19,5% de eclosão. Em teste com plantas de coentro e feijoeiro caupi, esses filtrados reduziram significativamente o número de massas de ovos e o fator de reprodução do patógeno, apresentando-se como alternativa viável de controle do nematoide reniforme.

Palavras chave: Biocontrole. Coentro. Feijoeiro caupi. Fungos antagônicos a fitonematoides. *Rotylenchulus reniformis*

ABSTRACT

Rotylenchulus reniformis, also known as the reniform nematode, is one of the most important phytosanitary problems in cilantro and cowpea crops. This nematode parasite more than 300 plant species, almost always causing significant yield reduction on important cash crops. Several controlling methods are used to reduce the reniform nematode damages, but, in the case of cilantro and other short cycle crops, the biocontrol seems to be the more appropriate. The biocontrol, when available, are economically and ecologically recommended, which favors the conservation of the environment and does not induce resistant species. Among the biological agents, fungi are considered to have the greatest potential. In this present research, the effect of filtrates of 17 fungi on mortality and hatching of *R. reniformis* juveniles was evaluated by *in vitro* test and in cilantro and cowpea plants. The filtrates that presented the best nematicidal effects, both *in vitro* and *in vivo* tests, had their chemical compounds semipurified and the metabolic groups characterized by thin layer chromatography. It was observed that the phenolic compounds were the more abundant group in those fungal extracts, and presented antagonistic effects on the studied nematode. Morphological, molecular and race characterization of 11 *R. reniformis* species was also performed. All were identified as *R. reniformis* race type A, with wide morphological diversity. In the *in vitro* biocontrol tests, the filtrates of *Fusarium inflexum*, *Penicillium A25*, *Penicillium TA14*, *P. citrinum*, *Thielavia terricola*, *Trichoderma longibrachiatum*, *T. brevicompactum* and *T. harzianum* induced the mortality rate of 88,5 to 100%, after 48 hours of exposure, and allowed only 4,6 to 19,5% of hatching. When tested with cilantro and cowpea plants, these filtrates reduced the number of egg masses and the reproduction factors, thus constituting an alternative, with high economic potential, for biocontrol of the reniform nematode.

Keywords: Biocontrol. Cilantro. Cowpea. Fungi antagonistic to phytonematodes. *Rotylenchulus reniformis*

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 –	Microfotografia de macho e fêmea de <i>Rotylenchulus reniformis</i>	21
Figura 2 –	Presença de galhas “tumores” nas raízes causadas por nematoides do gênero <i>Meloidogyne</i>	22
Figura 3 –	Ciclo de vida de <i>Rotylenchulus reniformis</i>	24
Figura 4 –	Representação esquemática da região do DNA ribossômico para os eucariotos, evidenciando os três genes ribossômicos, 18S, 5.8S, 28S, regiões D2/D3 do gene 28S e as regiões espaçadoras ITS-1 e ITS-2.....	27
Figura 5 –	Caracteres morfométricos utilizados para a identificação de <i>Rotylenchulus</i> spp.....	29

ARTIGO I

Figura 1 –	Ciclo de vida de <i>Rotylenchulus reniformis</i>	39
Figura 2 –	Microfotografia apresentando alguns caracteres morfológicos usados na identificação de espécies do gênero <i>Rotylenchulus</i> . A) setas: região labial alta, distância dos nódulos do estilete à abertura da glândula dorsal (DGO), formato dos nódulos do estilete e poro excretor; B) setas: reto (poro anal) e porção hialina; C) Visão geral do corpo de uma fêmea adulta imatura de <i>R. reniformis</i> , vendo-se a vulva, indicada pela seta.....	40

ARTIGO II

Figura 1 –	<i>Rotylenchulus reniformis</i> : A) Caracteres morfológicos usados para a identificação taxônomica; B) Região labial, nódulos do estilete arredondados e válvula do bulbo mediano proeminente (setas); C) Cauda afilada com término arredondado e a presença de porção hialina (seta).....	58
------------	---	----

Figura 2 –	Figura 2. Relação filogenética de população de <i>Rotylenchulus reniformis</i> oriunda de cultivo de coentro no Estado de Pernambuco, Brasil. Árvore filogenética por análise Bayesiana gerada a partir do conjunto de dados da região D2/D3 do gene 28S DNAr com o modelo HKY+G.....	60
Figura 3 –	Reprodução de populações <i>Rotylenchulus reniformis</i> em plantas de algodão, feijão-caupi e mamona. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Cada valor é uma média de quatro repetições.....	62

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 –	Fitonematoides de maior importância científica e econômica em nível mundial.....	22
Tabela 2 –	Fungos produtores de metabólitos tóxicos a <i>Rotylenchulus reniformis</i>	35

ARTIGO II

Tabela 1 –	Medidas em μm e variáveis derivadas de fêmeas de populações de <i>Rotylenchulus reniformis</i> coletadas de solos com plantio de coentro (<i>Coriandrum sativum</i>), em Municípios do estado de Pernambuco. Estatística incluindo média (n=20), desvio padrão e amplitude.....	61
------------	--	----

ARTIGO III

Tabela 1 –	Efeito de filtrados de culturas fúngicas na mortalidade e eclosão de juvenis de <i>Rotylenchulus reniformis</i>	75
Tabela 2 –	Efeito de filtrados fúngicos na reprodução de <i>Rotylenchulus reniformis</i> em <i>Vigna unguiculata</i>	76
Tabela 3 –	Efeito de filtrados de culturas fúngicas no desenvolvimento de <i>Vigna unguiculata</i> , infestado por <i>Rotylenchulus reniformis</i>	77
Tabela 4 –	Efeito de filtrados fúngicos na reprodução de <i>Rotylenchulus reniformis</i> em plantas de coentro.....	78
Tabela 5 –	Efeitos de filtrados de culturas fúngicas no desenvolvimento de plantas de coentro, infestada por <i>Rotylenchulus reniformis</i>	89

ARTIGO IV

Tabela 1 –	Mortalidade de juvenis de <i>R. reniformis</i> (%) após 24 h de exposição às frações fúngicas em diferentes concentrações.....	90
Tabela 2 –	Mortalidade de juvenis de <i>R. reniformis</i> (%) após 48 h de exposição às frações fúngicas em diferentes	

	concentrações.....	91
Tabela 3 –	Inibição da eclosão de juvenis de <i>R. reniformis</i> (%) após exposição às frações fúngicas em diferentes concentrações.....	93
Tabela 4 –	Triagem química das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e aquosa obtidas dos 8 filtrados de culturas fúngicas.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm	Micrômetro
ANOVA	Análise de variância
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
BOD	Biochemical Oxygen Demand
CCD	Cromatografia em camada delaga
DGO	Abertura da glândula dorsal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAr	DNA ribossômico
et al.	e outro
FACEPE	Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
FAO	Food and Agricultural Organization of the United Nations
FR	Fator de Reprodução
HLB	Holterman Lysis Buffer
Kg/ha^{-1}	Quilograma por hectare
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
mg/L	Miligrama por litro
PCR	Polymerase Chain Reaction
TAE	Tris-Acetato-EDTA

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	19
1.1.1	Objetivo Geral	19
1.1.2	Objetivos Específicos.....	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	OS NEMATOIDES.....	20
2.2	O GÊNERO <i>ROTYLENCHULUS</i> LINFORD & OLIVEIRA,	
2.3	1940.....	23
2.4	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE <i>ROTYLENCHULUS RENIFORMIS</i>	25
2.5	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CULTURA DO	
2.6	FEIJÃO-CAUPI.....	30
	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CULTURA DO	
	COENTRO.....	31
	CONTROLE POPULACIONAL DE <i>ROTYLENCHULUS</i>	
	SPP.....	32
3	ARTIGO I – <i>ROTYLENCHULUS RENIFORMIS</i> (NEMATODA: TYLENCHIDA): BIOLOGIA, IDENTIFICAÇÃO, PATOGENICIDADE E MANEJO.....	36
4	ARTIGO II – IDENTIFICAÇÃO ESPECÍFICA, CARACTERIZAÇÃO E RAÇA PREDOMINANTE DO NEMATOIDE RENIFORME EM COENTRO NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL.....	52
5	ARTIGO III – POTENCIALIDADE DE FILTRADOS FÚNGICOS NO BIOCONTROLE DO NEMATOIDE RENIFORME EM PLANTAS DE COENTRO E DE FEIJÃO-CAUPI.....	69
6	ARTIGO IV –. COMPOSTOS BIOATIVOS FÚNGICOS COM PROPRIEDADES NEMATICIDAS A	

<i>ROTYLENCHULUS RENIFORMIS</i>.....	85
CONCLUSÃO.....	101
REFERÊNCIAS.....	102
ANEXO A - TRABALHOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS DURANTE O DOUTORADO.....	114
ANEXO B - INSTRUÇÕES <i>EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY</i>.....	115
ANEXO C - INSTRUÇÕES <i>NEMATOLOGY</i>	123

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Sociedade Brasileira de Nematologia, por ano, os fitonematoides causam prejuízos da ordem de 35 bilhões de reais ao agronegócio nacional; apenas na produção da soja são estimadas perdas de R\$ 16,2 bilhões. (NASCIMENTO, 2018). Entre as culturas de destaque no país afetadas pelos fitonematoides estão o feijoeiro caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e o coentro (*Coriandrum sativum* L.), ambas amplamente cultivados, especialmente no Nordeste, onde são muito apreciados na culinária regional. Apesar da importância comercial, os cultivos dessas duas hortaliças ainda enfrentam problemas sem controle satisfatório, entre os quais o parasitismo de *Rotylenchulus reniformis* Linford e Oliveira, conhecido popularmente por nematoide reniforme. Esse fitonematoide parasita um total de mais de 300 espécies de plantas nativas e cultivadas (ROBINSON et al., 1997). Do ponto de vista fitopatológico, causa doenças de expressiva severidade, ocasionando redução na produtividade agrícola, o que tem levado pesquisadores a buscarem formas de controle alternativo às técnicas utilizadas convencionalmente.

Diversos métodos de controle vêm sendo utilizados contra os nematoides fitopatogênicos, dentre os quais o controle químico, feito por meio da aplicação de nematicidas sistêmicos, a rotação de culturas utilizando-se plantas não suscetíveis, uso de variedades resistentes e o controle biológico. Para este método, existem, aproximadamente, 200 inimigos naturais de fitonematoides no solo (PIMENTEL et al., 2009); e, dentre esses, os fungos são considerados os que possuem maior potencial de uso prático (ASKARY, 2015).

Nos últimos anos, têm-se intensificado estudos visando identificar compostos antagônicos a fitonematoides, obtidos a partir de filtrados de culturas fúngicas. Em mais de 200 compostos extraídos de fungos foi constatada a presença de metabólitos tóxicos com propriedades nematicidas, conforme lista divulgada por Li e Zhang (2014). Esses metabólitos podem exercer efeito sobre a eclosão, mobilidade, reprodução e/ou afetar a capacidade de penetração dos fitonematoides na planta hospedeira, ou, ainda, alterar a fisiologia da planta, tornando-a menos atrativa a esses fitopatógenos (KHAN et al., 1984). Entre os trabalhos mais recentes, foi investigado o efeito antagônico dos filtrados obtidos do fungo *Myrothecium roridum* sobre juvenis de *Meloidogyne incognita* (PARK et al., 2016).

O controle biológico representa um dos principais meios de combate das doenças e pragas da agricultura moderna e apresenta muitas vantagens em relação ao controle químico, pois não desequilibra o meio ambiente, não deixa resíduos em alimentos, é de fácil aplicação, além de não favorecer o surgimento de espécies resistentes ao produto nematicida (SOARES, 2006; NUNES, 2008).

Alguns bionematicidas foram formulados a partir de *Paecilomyces lilacinus* e *Trichoderma harzianum*. Esses produtos afetam diretamente a capacidade reprodutiva do nematoide, entre outros efeitos (ASKARY, 2015). Contudo, o conhecimento de filtrados fúngicos com propriedades nematicidas ainda é limitado e informações básicas são necessárias para o desenvolvimento de novas estratégias de biocontrole, dentre as quais destacam-se a identificação correta dos fitonematoides por meio morfométrico e/ou molecular, sua distribuição no solo, sua biologia, e interação parasita-hospedeiro.

Rotylenchulus reniformis foi assinalado em coentro, pela primeira vez, por Moura et al. (1997). Essa doença, transformou-se em problema epidêmico, espalhando-se pelas regiões produtoras do estado de Pernambuco e ainda não há um controle efetivo. No entanto, o diagnóstico da espécie do nematoide foi realizado considerando-se apenas os aspectos micrométricos e morfológicos, sendo importante a complementação dos dados com estudos moleculares. Nesse contexto, esta tese apresenta de início, a fundamentação teórica do tema e, a seguir, quatro artigos. O 1º referente a revisão bibliográfica, que aborda a biologia, a identificação, a patogenicidade e o manejo de *R. reniformis*. O 2º versa sobre filtrados fúngicos no biocontrole do nematoide reniforme, em plantas de coentro e de feijoeiro caupi. O 3º apresenta os compostos químicos fúngicos obtidos, com propriedades nematicidas a *R. reniformis*. O 4º é abordado a identificação morfométrica, molecular e a raça predominante do nematoide reniforme em coentro no Estado de Pernambuco, Brasil. Ao final, são apresentadas considerações gerais sobre o conjunto de resultados.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Identificar populações de campo do nematoide reniforme e estudar possíveis efeitos nematicidas de filtrados obtidos de fungos isolados de solo em *R. reniformis*. em testes *in vitro* e *in vivo*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Isolar e selecionar fungos do solo com potencial para produção de exsudatos tóxicos a nematoides;
- Coletar e descrever por análise morfológica e molecular e de raça, populações do nematoide causador do nanismo do coentro, e realizar análise filogenética.
- Realizar testes de biocontrole *in vitro* e *in vivo* para avaliação do potencial antagonico dos exsudatos a *R. reniformis*;
- Identificar as classes metabólicas aos quais pertencem os metabólitos com propriedades nematicidas.

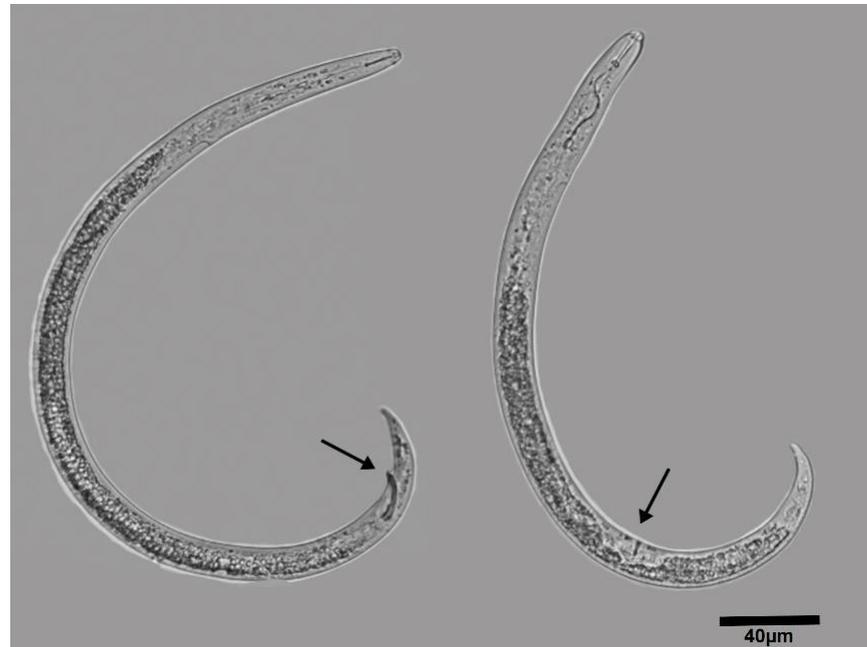
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 OS NEMATOIDES

Nematoides são animais vermiformes, de corpo filiforme, não segmentado, e revestido por cutícula semipermeável e flexível, pertencentes ao filo Nematoda. São os metazoários mais abundantes na terra, e estima-se que constituem em torno de 90% de todos os organismos multicelulares (KUBO, MACHADO; OLIVEIRA, 2013). Estudos têm mostrado que um único hectare de solo arável pode conter em torno de 3.000.000 de nematoides (DECRAEMER; HUNT, 2013). Existem aproximadamente 25.000 espécies descritas (BRUSCA; BRUSCA, 2007), distribuídas em todos os biomas aquáticos e terrestres, desde que haja umidade suficiente para sobreviver, pois são extremamente sensíveis a estresse hídrico e altas temperaturas. No entanto, algumas espécies têm a habilidade de diminuir o metabolismo corporal quando as condições do ambiente não são oportunas, retomando-o quando as condições voltam ao normal (FERRAZ; BROWN, 2016).

De acordo com os hábitos alimentares, os nematoides são classificados em nematoides de vida livre, incluindo os bacteriófagos, micófagos, algívoros e predadores; zooparasitas e fitonematoídes (FERRAZ; BROWN, 2016). O tamanho do corpo pode variar de 0,2 μm a um metro ou mais de comprimento e a variação da forma ocorre principalmente nos fitonematoídes, que são incolores e apresentam sistema digestório completo. O sistema excretor é composto por uma ou duas células renetes ou um sistema de tubos coletores e ausência de sistemas circulatório e respiratório. O sistema nervoso central é ganglionar, com presença de um anel nervoso envolvendo o esôfago (BRUSCA; BRUSCA, 2007). Os órgãos sensoriais são considerados anexos do sistema nervoso, contribuindo para a captação de estímulos químicos e mecânicos do ambiente, entre esses, destacam-se os anfídios, localizados na região cefálica e os fasmídeos, presentes na região caudal. São dioicos, em sua maioria (Figura 1), e se reproduzem por anfimixia (reprodução cruzada), sendo os machos menores que as fêmeas. Algumas espécies de nematoides reproduzem-se por partenogênese. Essa forma de reprodução ocorre a partir de um único indivíduo, sem a presença da cópula, resultando em ovos não fertilizados. São raros os casos de hermafroditismo.

Figura 1: Microfotografia de macho e fêmea de *Rotylenchulus reniformis*. Presença de espícula no macho (seta) e vulva na fêmea (seta).



Fonte: Lira, 2018.

Os nematoides apresentam grande importância ambiental, pois além de estarem relacionados com as condições ecológicas do solo (GOULART, 2010), também são eficientes bioindicadores (HAEGERBAEUMER et al., 2018). No entanto, os fitonematoides, que compõem 15 % das aproximadamente 4.100 espécies conhecidas (DECRAEMER; HUNT, 2013), são os mais estudados, devido à importância econômica e aos imensos prejuízos que causam na produção agrícola.

Os fitonematoides vivem normalmente no solo e apresentam ação nociva sobre as raízes, rizomas e tubérculos, dos quais se alimentam, dificultando a absorção e o transporte de água e nutrientes (Figura 2). Esses organismos podem tornar as culturas mais suscetíveis à ação de organismos oportunistas, principalmente fungos e bactérias, ocasionando crescimento deficiente da planta, podendo ocorrer perda total da produção (FERRAZ; BROWN, 2016).

Figura 2: Presença de galhas “tumores” nas raízes causadas por nematoides do gênero *Meloidogyne*.



Foto: V. L. Lira

Jones et al. (2013) fizeram um levantamento dos 10 nematoides de maior importância científica e econômica (tabela 1) segundo 225 nematologistas, indicando que a lista não é definitiva, podendo variar dependendo da região do mundo onde a pesquisa está sendo realizada.

Tabela 1. Fitonematoides de maior importância científica e econômica em nível mundial

Ordem de colocação	Espécies
1°	<i>Meloidogyne spp.</i>
2°	<i>Heterodera spp. e Globodera spp.</i>
3°	<i>Pratylenchulus spp.</i>
4°	<i>Radopholus similis</i>
5°	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
6°	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>
7°	<i>Rotylenchulus reniformis</i>
8°	<i>Xiphinema index</i>
9°	<i>Nacobbusa berrans</i>
10°	<i>Aphelenchoides besseyi</i>

Fonte: Jones et al. (2013)

2.20 GÊNERO *ROTYLENCHULUS* LINFORD & OLIVEIRA, 1940

O gênero *Rotylenchulus* compreende 11 espécies (VAN DEN BERG et al., 2016), com ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais e extensa gama de hospedeiros botânicos, cultivados e não cultivados (ROBINSON et al., 1997). Entre as espécies desse gênero, *R. reniformis* é a mais importante economicamente, sendo objeto de centenas de estudos (MOURA; SILVA; LIRA, 2018; KHANAL et al., 2018).

Rotylenchulus reniformis, conhecido popularmente como nematoide reniforme, foi descrito pela primeira vez por Linford e Oliveira, em 1940, em plantas de feijão-caupi, no Hawaii, EUA, e apresenta a seguinte classificação taxômica de acordo com Siddiqi (2000):

Filo: Nematoda

Classe: Secernentea

Subclasse: Tylenchia

Ordem: Tylenchida

Subordem: Tylenchina

Superfamília: Tylenchoidea

Família: Rotylenchulidae

Subfamília: Rotylenchulinae

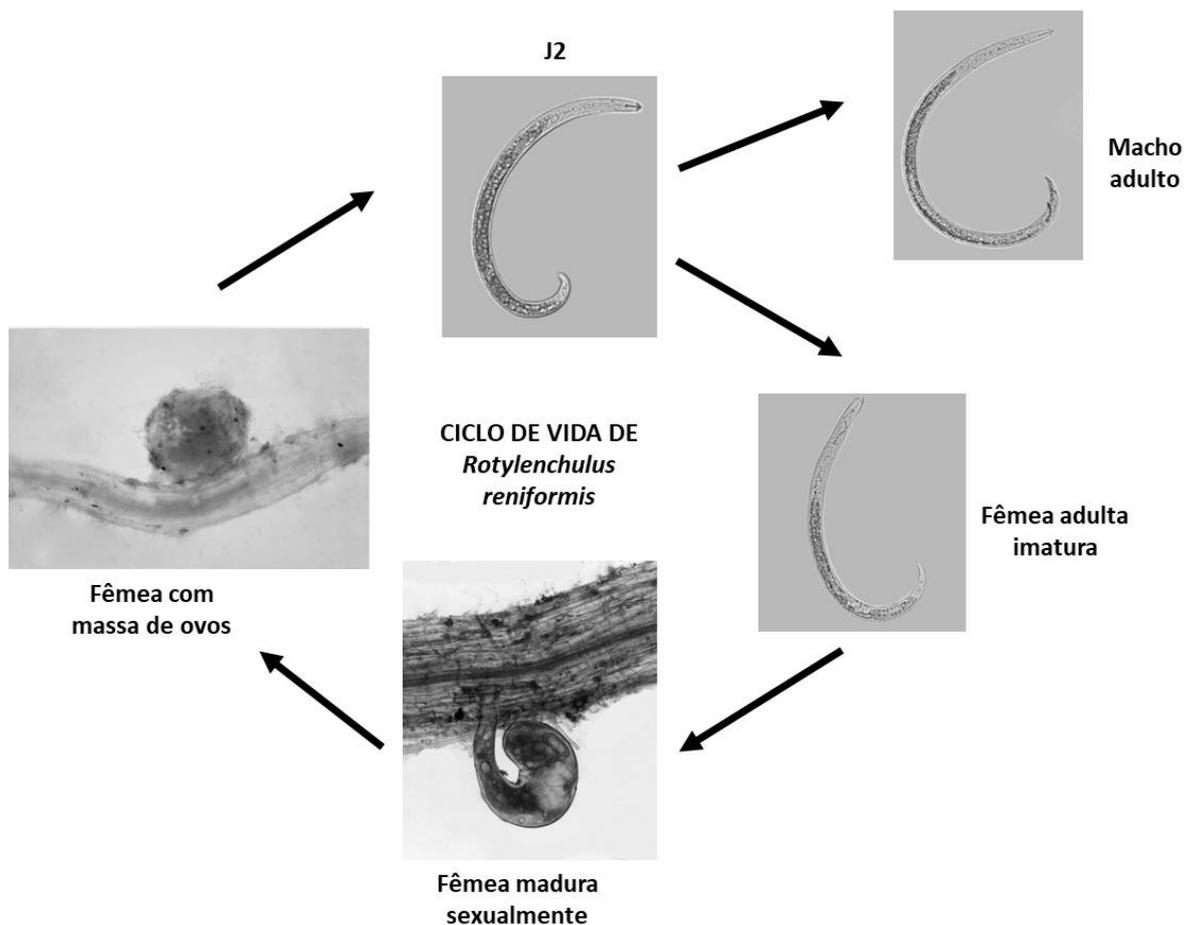
Gênero: *Rotylenchulus*

Espécie: *Rotylenchulus reniformis* Linford e Oliveira, 1940.

O nematoide reniforme é uma espécie semiendoparasita. O ciclo de vida se inicia quando as fêmeas maduras depositam os ovos em uma matriz gelatinosa, conservando e protegendo-os de inimigos naturais e das condições ambientais adversas (FERRAZ; e BROWN, 2016). As massas de ovos produzidas pela fêmea contêm, em média, 50 a 120 ovos. Após, aproximadamente, uma a duas semanas, juvenis de segundo estágio (J2) eclodem do ovo; no solo, sem se alimentar, passam para os estádios seguintes (J3 e J4), retendo a cutícula dos estádios anteriores após a muda. Após essa fase são originados machos (não parasitas) ou fêmeas, ainda imaturos sexualmente; esta é a forma infectante da espécie. Na presença da raiz da planta hospedeira, a fêmea vermiforme penetra no córtex radicular, estabelecendo

um sítio de alimentação permanente, local em que a forma do corpo se altera e passa à reniforme (em forma de rim), ficando exposto e bem visível fora da raiz (Figura 3). Adquirindo comportamento sedentário, o nematoide torna os sistemas radiculares pouco eficientes na absorção e transporte de água e nutrientes, e promove o desenvolvimento irregular da cultura, o que muitas vezes pode ser confundido com problemas de compactação de solo, encharcamento, ou mesmo de carência nutricional. As raízes, embora subdesenvolvidas, não mostram sintomas claros do parasitismo (ASMUS; ISHIMI, 2009). O ciclo de vida pode durar menos de três semanas ou mais de dois anos se o hospedeiro não estiver presente ou o solo estiver seco (ROBINSON et al., 1997).

Figura 3. Ciclo de vida *Rotylenchulus reniformis*



Foto/crédito: V.L Lira

De acordo com Robinson *et al.* (1997), o número de hospedeiros para o nematoide reniforme chega a 314 espécies, de 77 famílias botânicas. Nos Estados Unidos, essa espécie foi considerada a maior praga do algodão (KOENNING *et al.*, 2004), com capacidade para diminuir a produção em até 60 %, causando perdas que podem exceder milhões de dólares (LAWRENCE *et al.*, 2007). No Brasil, entre as culturas mais prejudicadas estão o algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e a soja (*Glycine max* L.) (DIAS *et al.*, 2010), além de outras de importância econômica como o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] (GARDIANO; KRZYZANOWSKI; SAAB, 2012), o coentro (*Coriandrum sativum*), o melão (*Cucumis melo* L.) e a graviola (*Annona muricata* L.) (MOURA *et al.*, 1997, 2002, 2005).

2.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE *ROTYLENCHULUS RENIFORMIS*

O Filo Nematoda é um dos mais diversificados em termos de táxons, habitando uma ampla gama de ambientes. Embora mais de 25.000 espécies já tenham sido descritas (ZHANG, 2013), estimava-se que o número total de nematoides seria de um milhão (LAMBSHEAD, 1993), com esses organismos compreendendo cerca de 90% de todos os organismos multicelulares existentes na biosfera (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Os nematoides fitoparasitas são considerados os mais difíceis de serem identificados, devido ao tamanho diminuto, similaridade morfológica e ao pequeno número de características chave que podem ser utilizadas para o diagnóstico taxonômico da espécie (OLIVEIRA, 2010). Dessa forma, torna-se necessário considerável conhecimento em taxonomia para um diagnóstico seguro. O número de taxonomistas que se dedicam ao estudo de nematoides é restrito, mas novas tecnologias têm sido desenvolvidas, de forma a facilitar a sistemática de nematoides, tornando mais prático e confiável o processo de identificação (LUCA *et al.*, 2004).

Técnicas baseadas no uso de DNA apresentam grande potencial e trazem facilidades nas identificações rotineiras de nematoides (AL-BANNA *et al.*, 2004), pois são altamente sensíveis, específicas, podem ser realizadas por profissionais não especializados na taxonomia morfológica, além de proporcionar um diagnóstico rápido e preciso. O diagnóstico molecular a partir do DNA de fitonematoides permite

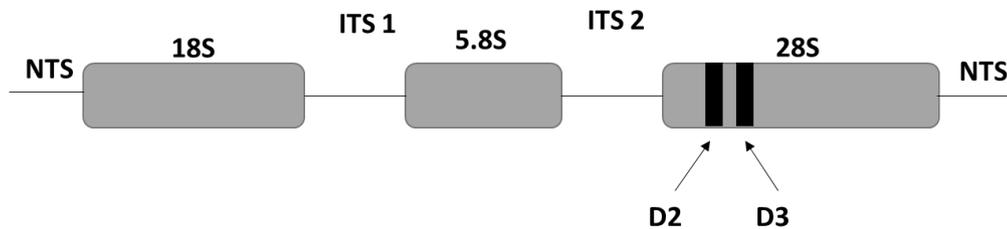
a análise simultânea de vários genes, cuja identificação é estável, já que não são influenciados pelo ambiente, pelo fenótipo ou fase do desenvolvimento do nematoide (CORDEIRO et al., 2008).

As técnicas bioquímicas e moleculares utilizadas para estudos de fitonematoides são: isoenzimáticas, sorológicas e moleculares. As moleculares são análise de sequências de genes de rDNA (DNA ribossomal), mtDNA (DNA Mitocondrial), SCARs (Sequence Characterized Amplified Regions), marcadores moleculares RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA), RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms), e ainda qPCR (Real-time PCR) satDNAs (Satellite DNA) e microarranjo (BLOK; POWERS, 2009).

Outra técnica bastante segura, mas que ainda não se encontra em uso rotineiro em laboratórios para diagnose de nematoides é o Código de Barras do DNA (DNA barcoding) proposto nos Estados Unidos, em 2003, para identificação de organismos (POWERS, 2004). O princípio dessa técnica é de que cada organismo apresenta em seu genoma um pequeno trecho, específico para a espécie, e que nessa região, geralmente do DNA mitocondrial (mtDNA) ou DNA ribossômico (DNAr), existiria uma variação suficiente para separar todas as espécies que habitam o planeta atualmente, inclusive os fitonematoides (POWERS, 2004). Isso facilita a discriminação e a descoberta de espécies de forma rápida e precisa, utilizando regiões de genes curtos e padronizados. No entanto, as análises dos caracteres morfológicos por meio de microscopia de luz, de varredura ou de transmissão, ainda são os primeiros passos para o diagnóstico de fitonematoides.

No filo Nematoda, a região gênica mais estudada está no DNA ribossômico (DNAr) (ROBERTS et al., 2016), pois a forma repetitiva da organização dos genes na molécula faz desse tipo de DNA alvo adequado para amplificação do DNA por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR), visando à identificação de espécies, além de apresentar domínios que evoluem em ritmos diferentes. Dessa forma, torna-se possível a análise da evolução, tanto intraespecífica, por meio das regiões mais variáveis (ITS1 e ITS2), como o estudo de táxons mais distantes, a partir de observações dos segmentos mais conservados (18S, 5.8S, 28S) (Figura 4) (ROBERTS et al., 2016).

Figura 4. Representação esquemática da região do DNA ribossômico para os eucariotos, evidenciando os três genes ribossômicos, 18S, 5.8S, 28S, regiões D2/D3 do gene 28S e as regiões espaçadoras ITS-1 e ITS-2.



Fonte: Lira, 2018.

A região D2/D3 do gene 28S do DNAr tem sido amplamente utilizada para inferir relações evolutivas e como marcadora de diagnóstico para discriminação de espécies de nematoides. A presença de regiões altamente conservadas e segmentos variáveis faz do gene 28S uma região apropriada para análise de relações entre espécies, porque sequências variáveis fornecem caracteres filogeneticamente informativos, enquanto as estruturas conservadas facilitam a identificação de posições homólogas (GILLESPIE et al., 2004; BAE; ROBBINS; SZALANSKI, 2010).

Nessa última década, estudos de filogenia molecular com o gênero *Rotylenchulus*, baseados na região D2/D3 do gene 28S do DNAr, foram realizados por diversos autores. Cantalapiedra-Navarrete et al. (2013) conseguiram distinguir por meio da expansão D2/D3 do gene 28S do DNAr uma nova espécie denominada *Rotylenchulus paravitis*. Esse organismo deve ser considerado um exemplo de especiação dentro do gênero. Esses autores ainda afirmam que a diversidade desses nematoides não está totalmente compreendida, necessitando de estudos adicionais.

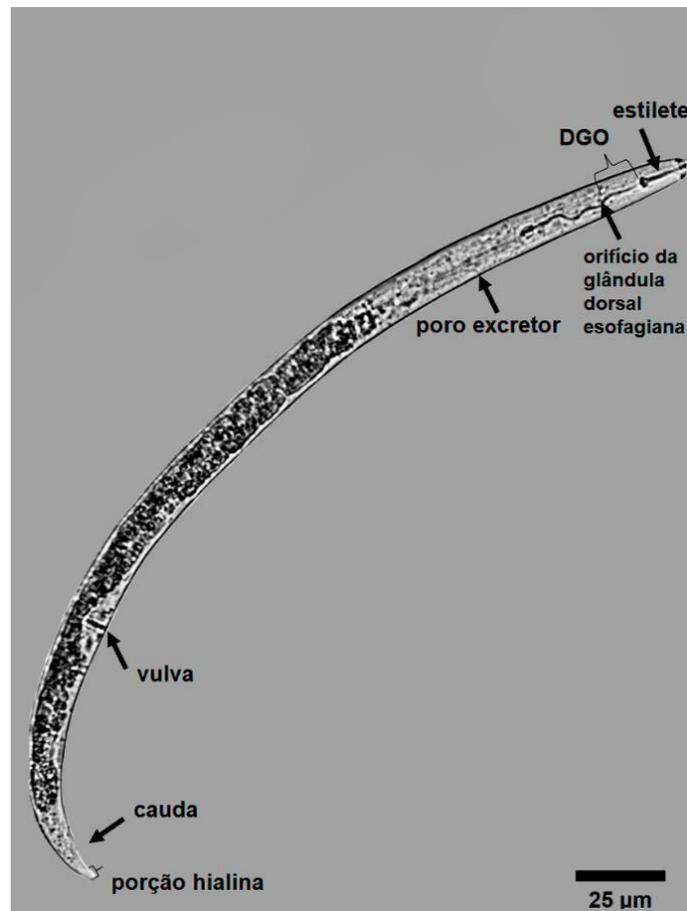
A partir das sequências do fragmento da região D2/D3 da expansão 28S do DNAr, Van Den Berg et al. (2016) também descreveram uma nova espécie, isolada do solo e raízes de cana-de-açúcar, a qual foi denominada *R. macrosomoides*. Os autores desenvolveram *primers* específicos com base nas sequências das regiões D2/D3 do gene 28S do DNAr, para diferenciar *R. reniformis* das demais espécies do gênero; a técnica é simples, rápida e eficiente para o diagnóstico de espécies deste gênero. Ao final, analisaram as relações filogenéticas entre a nova espécie e outras

seis das 10 conhecidas no gênero: *R. clavicaudatus*, *R. leptus*, *R. macrodoratus*, *R. macrosoma*, *R. reniformis* e *R. sacchari*. O estudo revelou que *R. reniformis* e *R. macrosoma* são mais estreitamente relacionados, mas as relações entre as outras espécies de *Rotylenchulus* permanecem não resolvidas.

Adam et al. (2018) utilizaram a região D2/D3 do gene 28S do DNAr para estudos de diagnóstico das espécies e relação filogenética de populações de *R. reniformis* coletadas do Egito e outros países; os isolados apresentaram uma relação homogênea, embora ocorram frequentes variações genéticas dentro da espécie.

Estudos de diagnóstico taxonômico para o gênero *Rotylenchulus* são fundamentados no uso de vários caracteres morfológicos de fêmeas vermiformes, por apresentarem mais características diagnósticas que os machos. Entre esses caracteres estão comprimento do estilete, tamanho e formato dos bulbos do estilete, comprimento da cauda, da faringe e do corpo, distância da região cefálica à vulva, expresso em porcentagem em relação ao comprimento do corpo (valor V), comprimento e formato da cauda. Relações métricas corporais também são utilizadas para identificação: valor "a" = comprimento do corpo dividido pela maior largura do corpo; "b" = comprimento do corpo dividido pelo comprimento do esôfago; "c" = comprimento do corpo dividido pelo comprimento da cauda (Figura 5) (LOPES; PIMENTEL; CARES, 2016).

Figura 5. Caracteres morfométricos utilizados para a identificação de *Rotylenchulus* spp.



Fonte: Lira, 2018.

Em 1968, Dasgupta et al. (1968) haviam sugerido a separação de espécies do gênero com base na forma da região labial e comprimento da porção hialina da cauda, separando-os em cinco grupos. O grupo I é representado por espécies que apresentam região labial baixa, arredondada à hemisférica e $h < 8 \mu\text{m}$, nas quais se enquadram *R. anamictus*, *R. parvus* e *R. brevitubulus*. No grupo II, são incluídas as espécies que têm a região labial alta, conoide, sem anelação visível e $h < 13 \mu\text{m}$, abrangendo *R. leptus* e *R. sacchari*. O grupo III é representado apenas por *R. reniformis*, que apresenta região labial alta, conoide, arredondada com anéis e $h < 13 \mu\text{m}$. No grupo IV, estão as espécies que têm região labial alta, conoide, com ou sem anelação e $h = 8$ a $24 \mu\text{m}$, entre elas: *R. borealis*, *R. macrosoma* e *R. clavicaudatus*. O grupo V englobando apenas *R. macrodoratus*, caracterizada por apresentar a região labial alta e agudamente conoide com anelação e $h < 13$.

Robinson et al. (1997) propuseram uma chave para identificação, considerando apenas os seguintes caracteres: comprimento do estilete, presença ou ausência de macho, valor V e formato da cauda. Em diversos estudos de identificação taxônomica de *R. reniformis* foram utilizados a chave dicotômica sugerida por Robinson et al. (1997) e afirmaram que esses caracteres são suficientes para diagnose das espécies do gênero *Rotylenchulus* (Soares et al., 2003, 2004)

2.4 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CULTURA DO FEIJÃO-CAUPI

O feijão-caupi é uma leguminosa de alto valor proteico e energético. Cultura de grande importância socioeconômica, constitui um dos principais componentes da dieta alimentar nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, além de gerar emprego e renda (SILVA; ROCHA; MENEZES JUNIOR, 2016).

De acordo com dados da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAOSTAT, 2018), o continente africano é responsável pela maior produção mundial de feijão-caupi, correspondendo a 96 %. Os três maiores países produtores são: Nigéria (3.027.596 milhões de toneladas), Niger (1.987.100 milhão de toneladas) e Burkina Faso (603.635 mil toneladas). O Brasil é o quarto maior produtor, com produção média anual de 558,3 mil toneladas em 1.027,1 mil hectares (CONAB, 2018).

No Brasil, a produção de feijão caupi ocorre predominantemente nas Regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, principalmente devido às condições edafoclimáticas favoráveis. Entre os estados, Mato Grosso por utilizar tecnologias mais adequadas, apresenta a maior produção, mesmo sem ocupar a maior área com o cultivo desse feijão (SILVA; ROCHA; MENEZES JUNIOR, 2016). De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2018), o Distrito Federal, na safra de 2017/18 apresentou a maior produtividade em grãos, com 1.261 Kg/ha⁻¹, enquanto a Paraíba, a menor, com 234 Kg/ha⁻¹. Pernambuco apresenta-se como 7º estado com maior produção de feijão-caupi no país, no entanto o índice de produtividade ainda é baixo, devido ao baixo uso de tecnologia mais avançadas (SILVA; ROCHA; MENEZES JUNIOR, 2016) e ao ataque por fitopatógenos, entre esses, os nematoides, dos quais o feijão-caupi é considerado bom hospedeiro de *R. reniformis* (INSERRA; DUNN; VOVLAS, 1994; GARDIANO; KRZYZANOWSKI; SAAB, 2012).

O feijão-caupi também apresenta alto potencial para adubação verde, pois contribui para fixação biológica do N₂ por meio de simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium/Bradyrhizobium* nas raízes. Além disso promove aumento da matéria orgânica, proporcionando melhoria das propriedades químicas, físicas e biológicas do solo, contribuindo para a recuperação da fertilidade e protegendo contra a erosão (RUMJANEK et al., 2005).

2.5 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CULTURA DO COENTRO

O coentro (*Coriandrum sativum* L.) pertence à família *Apiaceae*, e é originário da Europa Mediterrânea e Ásia Ocidental. Essa hortaliça, de grande valor e importância comercial, é utilizada em várias regiões, principalmente no Norte e Nordeste, sendo um dos condimentos mais apreciados na culinária brasileira devido ao intenso aroma (MELO et al., 2009).

Apesar de não ser o principal mercado consumidor, parte da produção de sementes ocorre no Rio Grande do Sul; a produção e o consumo *in natura* de 80 % das folhas de coentro ocorrem em todos estados do Norte e Nordeste (JULIÃO et al., 2015), onde encontram-se condições climáticas apropriadas para o cultivo. De acordo com a Associação Brasileira de Comércio e Sementes, em 2009, a produção de coentro no Brasil ocupou uma área de 36,6 mil hectares, enquanto a comercialização de sementes ultrapassou os nove milhões de reais e desde então a sua produção vem aumentando, devido à crescente demanda. No entanto, há escassez de dados estatísticos referentes à produção e comercialização dessa olerícola no país, e isso se deve ao fato do cultivo ainda ocorrer de forma manual e em pequenas propriedades (REIS; LOPES, 2016).

Em Pernambuco, o coentro é cultivado principalmente por pequenos produtores rurais. Entre as cultivares disponíveis para comercialização, Verdão é a mais utilizada pelos agricultores por apresentar precocidade (30 a 40 dias), excelente rusticidade e boa resistência às doenças de folhagens (HORTIVALE, 2018), garantindo rápido retorno do investimento, e tornando-se uma fonte alternativa de renda. Porém, é muito suscetível a fitonematoides, principalmente *Meloidogyne* spp. e *R. reniformis* ocasionando o nanismo do coentro (HORTIVALE, 2018; MOURA et al., 1997).

2.6 CONTROLE POPULACIONAL DE *ROTYLENCHULUS* SPP.

Diversos métodos de controle vêm sendo utilizados contra os nematoides fitopatogênicos, como controle químico, rotação de culturas, uso de cultivares resistentes, entre outros (FERRAZ et al., 2010). Para o controle químico, utilizando-se nematicidas sistêmicos, são necessários equipamentos motorizados de alto custo e se recomenda, antes da aplicação, uma análise da relação custo-benefício (MOURA, 2010). Além disso, a aplicação dos nematicidas requer trabalhadores de campo bem treinados, pois, por serem altamente tóxicos, acarretam inúmeros problemas à saúde, tanto dos aplicadores, quanto dos consumidores de alimentos, além de fortes impactos ambientais. No solo, os nematicidas interferem negativamente na microbiota, destruindo organismos benéficos (RITZINGER; FANCELLI, 2006).

A rotação de culturas também é recomendada para o manejo de fitonematoides. É realizada utilizando-se plantas não hospedeiras, restringindo, dessa forma, a multiplicação dos nematoides, e contribuindo para a redução populacional. O cultivo de gramíneas como sorgo, milho e braquiária, permite o controle de *R. reniformis* em áreas infestadas (ASMUS, 2008a). Entretanto, esse método muitas vezes é dificultado por fatores econômicos, devido à tendência à monocultura, e pelo fato das plantas utilizadas na rotação não serem tão rentáveis quanto a cultura principal, embora muitas possam ser usadas como adubo verde, pois melhoram as características químicas, físicas e biológicas do solo (FERRAZ; SANTOS, 1995).

A resistência genética de plantas aos nematoides é outra prática utilizada para evitar perdas ocasionadas por esses patógenos, por aliar eficiência, praticidade e segurança ambiental. Porém, para *R. reniformis* a maioria das cultivares existentes não apresenta resistência suficiente para o controle (ASMUS; LAMAS 2007).

O controle biológico é um método alternativo, representa um dos principais meios de combate às doenças e pragas da agricultura moderna que conta com técnicas biotecnológicas e apresenta uma série de vantagens em relação ao químico, não causa desequilíbrio ambiental, não deixa resíduos tóxicos em alimentos e não favorece o surgimento de espécies resistentes (SOARES, 2006; NUNES, 2008).

Diversos organismos são considerados inimigos naturais dos fitonematoides, entre eles: vírus, artrópodes, ácaros, tardígrados, bactérias e fungos (STIRLING, 1991). Apenas no solo, há aproximadamente 200 inimigos naturais dos fitonematoides (PIMENTEL et al., 2009), mas, nem todos podem ser utilizados para o biocontrole.

De acordo com Ferraz et al. (2010), para um micro-organismo ser considerado bom biocontrolador, deve possuir várias características como não ser patogênico a plantas e animais em geral, entre eles, à espécie humana; ser eficiente em reduzir a população de nematoides, principalmente quando estiver em alta densidade; conseguir sobreviver a condições extremas do solo na ausência do hospedeiro; parasitar diversas espécies de nematoides; ser capaz de se dispersar assim que aplicado no solo; permanecer infectivo após longo tempo de armazenamento; ser compatível com fertilizantes, defensivos agrícolas, entre outras práticas culturais. Embora seja difícil reunir todas essas características em um organismo, os fungos têm sido considerados os de maior potencial por apresentarem maior quantidade de atributos (FERRAZ; SANTOS, 1995; CHEN; DICKSON, 2004).

Resultados promissores (AL-HAZMI; TARIQJAVEED, 2016; SILVA et al., 2017) mostram que os fungos atuam no biocontrole adotando diferentes estratégias de ação, o que permitiu a classificação em quatro categorias: fungos predadores, endoparasitas, oportunistas (parasitos de ovos, de cistos e de fêmeas sedentárias) e produtores de metabólitos tóxicos (CHEN; DICKSON, 2004; FERRAZ et al., 2010).

Os fungos predadores capturam nematoides móveis no solo a partir da formação de estruturas de captura ou armadilhas especializadas formadas ao longo do crescimento vegetativo das hifas. Essas armadilhas apresentam características singulares, conforme a espécie fúngica, podendo ser em forma de anéis constritores ou não constritores, nódulos e hifas adesivas (FERRAZ et al., 2010). Os fungos endoparasitas possuem o maior número de espécies atacando nematoides e normalmente têm mais especificidade que os predadores; não formam armadilhas, porém usam conídios que emitem estruturas para infectar os nematoides; as hifas consomem o conteúdo do corpo dos nematoides e esporulam interna ou externamente (JANSSON et al., 1997). Fungos oportunistas colonizam fêmeas e ovos de fitonematoides, principalmente *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp. e *Globodera* spp. (FERRAZ et al., 2010). As hifas fúngicas penetram a casca e se

desenvolvem no interior do ovo do nematoide, colonizando o conteúdo ou ainda o embrião em desenvolvimento, destruindo-o (GIROTTO et al., 2008). Os metabólitos tóxicos produzidos por fungos podem exercer efeito sobre a eclosão, a mobilidade e a capacidade de penetração dos nematoides no hospedeiro, ou ainda alterar a fisiologia da planta, tornando-a menos atrativa aos nematoides (KHAN et al., 1984).

De acordo com as características estruturais e propriedades químicas, os metabólitos podem ser classificados em três grandes grupos: terpenos, substâncias fenólicas e substâncias nitrogenadas. Os terpenos representam o maior e mais diverso grupo de metabólitos, com mais de 35 mil substâncias identificadas (REZENDE et al., 2016); são basicamente estruturados em unidades de isoprenos, constituídos pela união de cinco átomos de carbono podendo ser produzidos por plantas, fungos, bactérias e animais (DVORA; KOFFAS, 2013).

Os compostos fenólicos são uma classe de substâncias químicas formadas pela substituição de um ou mais átomos de hidrogênio por um grupo hidroxila ligado diretamente a um hidrocarboneto aromático (REZENDE et al., 2016), entre os principais fenólicos estão as cumarinas, os flavonoides, os taninos, os ácidos fenólicos e as ligninas. Entre os diversos efeitos biológicos dessas substâncias, destacam-se: atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e anti-tumoral, o que representa um campo promissor para a indústria cosmética, alimentícia e farmacêutica (CUNHA et al., 2016).

Os compostos nitrogenados são substâncias que apresentam o heteroátomo nitrogênio em sua constituição e entre as principais classes estão os alcaloides, as betalainas, os glicosídeos cianogênicos e os glucosinolatos; esses compostos atuam principalmente como sistema de defesa em plantas (REZENDE et al., 2016).

Nos últimos anos têm sido intensificados estudos com o objetivo de identificar compostos antagônicos a fitonematoides obtidos a partir de filtrados de culturas fúngicas. Esses compostos, na grande maioria, apresentam alta produção de metabólitos com propriedades nematicidas (LI; ZHANG, 2014). Li e Zhang (2014) listaram mais de 200 compostos, extraídos de fungos, que apresentam atividades tóxicas aos nematoides.

O conhecimento de exsudatos com propriedades nematicidas para a espécie *R. reniformis* é limitado (Tabela 3), necessitando de estudos mais atuais.

Tabela 2. Fungos produtores de metabólitos tóxicos a *Rotylenchulus reniformis*.

Espécies	Referências
<i>Alternaria tenuis</i>	Khan e Husain, 1989
<i>Aspergillus flavus</i>	Ali, 1990
<i>A. fumigatus</i>	Ali, 1990
<i>A. niger</i>	Alcantara e Azevedo, 1980
<i>A. ochraceus</i>	Ali, 1990
<i>Curvularia lunata</i>	Khan e Husain, 1989
<i>Fusarium solani</i>	Khan e Husain, 1989
<i>Helminthosporium sp.</i>	Alcantara e Azevedo, 1980
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Khan e Husain, 1989
<i>Penicillium isolandicum</i>	Ali, 1990
<i>Trichoderma koningii</i>	Bokhari, 2009
<i>T. hamatum</i>	Bokhari, 2009
<i>T. harzianum</i>	Bokhari, 2009

Diante da importância de compreender o mecanismo de ação dos metabólitos fúngicos sobre o biocontrole dos fitonematóides, diversos pesquisadores realizaram isolamento e identificação dessas moléculas. Degenkolb e Vilcinskas (2016 a,b) reuniram 101 metabólitos secundários, sintetizados por basidiomicetos nematófagos e por ascomicetos e basidiomicetos não-nematófagos, além de outros 83 metabólitos primários e secundários, produzidos por ascomicetos nematófagos; Alguns desse metabólitos não possuem atividades nematotóxica, mas apresentam substâncias quimioatrativas, por exemplo, blumenol A e Paganin A, isolados de *Arthrobotrys entomophaga*. Liu e colaboradores (2017) isolaram e identificaram um novo metabólito indoloditerpeno denominado acetato de gymnoascole, produzido pelo fungo *Gymnoascus reessii*. O composto foi testado em ovos e juvenis de *Meloidogyne incognita* e mostrou-se eficiente como medida de controle.

3 ARTIGO I - publicado nos *Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agrônomicas*

***Rotylenchulus reniformis* (NEMATODA: TYLENCHIDA): BIOLOGIA, IDENTIFICAÇÃO, PATOGENICIDADE E MANEJO**

VANESSA LOPES LIRA^{1,3}
ANTONIO FÉLIX DA COSTA²
ROMERO MARINHO DE MOURA^{3,4,5}
LEONOR COSTA MAIA³

¹ PPG – Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE

² Instituto Agrônomico de Pernambuco – IPA, Recife, PE

³ Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

⁴ Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica.

⁵ Academia Brasileira de Ciência Agrônômica

E-mail para correspondência: vanessallira@yahoo.com.br

Resumo: O gênero *Rotylenchulus* apresenta onze espécies, das quais *R. reniformis* é a mais importante economicamente. Trata-se de um fitonematoide, conhecido popularmente por nematoide reniforme, de ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em regiões tropicais e subtropicais. Parasita mais de 300 espécies de plantas, cultivadas e não cultivadas. Do ponto de vista fitopatológico, pode ocasionar expressiva redução da produtividade de diversas culturas, muitas de alta importância econômica, a exemplo da soja, do algodoeiro e do meloeiro, além de diversas hortaliças. Essa diversidade parasitológica tem motivado muitos pesquisadores a desenvolverem novas técnicas alternativas de controle, de modo a minimizar o uso do método químico. Entre as pesquisas mais frequentes se encontram a rotação de culturas, o desenvolvimento de cultivares

resistentes, e o controle biológico. Para a maioria das situações de campo envolvendo o nematoide reniforme, a identificação específica da população se faz necessária. A presente revisão temática tem por objetivo básico prover informações sobre biologia, ciclo de vida, identificação morfológica e molecular de *R. reniformis*. Além disso visa orientar os novos fitonematologistas em seus primeiros passos no estudo desse fitopatógeno.

Termos para indexação: controle alternativo; morfometria; nematoide reniforme.

***Rotylenchulus reniformis* (NEMATODA: TYLENCHIDA): BIOLOGY, IDENTIFICATION, PATHOGENICITY AND MANAGEMENT**

Abstract: The genus *Rotylenchulus* presents 11 species and *R. reniformis* is the most economically important. This genus has a large geographic distribution and occurs in most tropical and subtropical regions of the world. This plant pathogen species has more than 300 host plants and is worldwide recognized as important yield losses reducer, affecting several cash crops commodities such as soybean, cotton, melon and many vegetables. This host diversity has led researchers to seek for new techniques as alternative to the chemical control. Among the main methods used there are: crop rotation, resistant cultivars and biological control. For most field situations, the specific identification of the nematode population is needed. This review was aimed to provide information on biology, life cycle, and morphological and molecular identification. It is expected that the presented information may help young nematologists in their first steps to get acquainted with this important plant pathogen.

Indexs terms: alternative control; morphometry; reniform nematode.

INTRODUÇÃO

O gênero *Rotylenchulus* Linford & Oliveira 1940 compreende 11 espécies (VAN DEN BERG et al., 2016), algumas de ampla distribuição geográfica. Trata-se de um fitonematoide que possui extensa lista de plantas hospedeiras (ROBINSON et al., 1997). *Rotylenchulus reniforme* Linford & Oliveira 1940 é a espécie mais importante economicamente; quando comparado a outros fitonematoides, é o sétimo

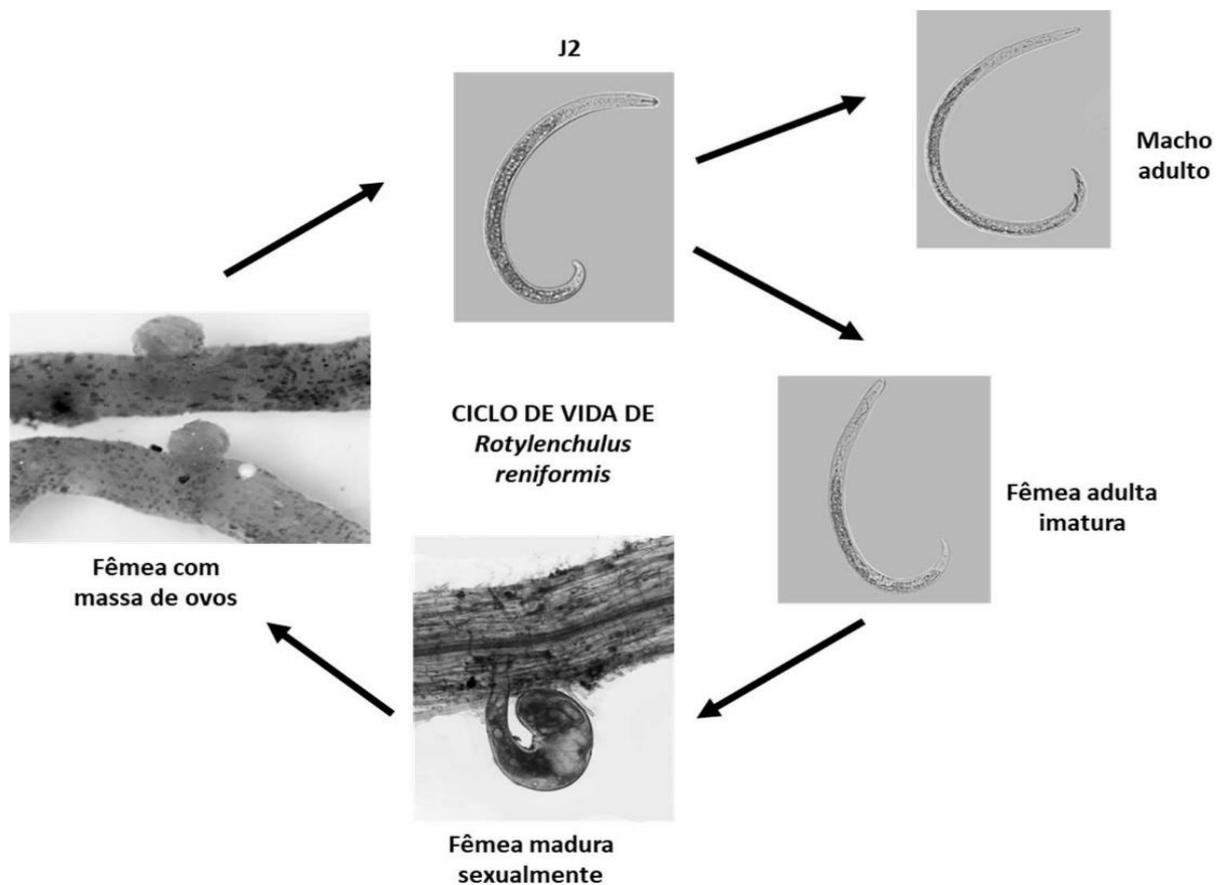
mais relevante, de acordo com levantamento feito por 225 nematologistas (JONES et al., 2013). *Rotylenchulus reniformis*, também conhecido por nematoide reniforme, é uma espécie de hábito semiendoparasítico, ou seja, no parasitismo, não penetra totalmente o seu corpo na raiz, apenas a região anterior; mais ou menos um terço do comprimento do corpo. Após o início da alimentação, a região que fica exposta aumenta de volume e assume a forma de um rim, de onde advém a denominação popular de nematoide reniforme. Essa espécie foi descrita pela primeira vez por Linford e Oliveira, em 1940, parasitando plantas de feijoeiro-caupi, no Hawaii, EUA. Durante 21 anos, *R. reniformis* permaneceu como espécie única do gênero.

CICLO DE VIDA

O ciclo de vida do nematoide reniforme tem início quando as fêmeas adultas maduras depositam, aproximadamente, 50 a 120 ovos, dentro de uma matriz gelatinosa que envolve totalmente o corpo do nematoide em sua parte reniforme, exposta no solo. Esses ovos possuem, individualmente, um juvenil do segundo estágio, referido por J2. Em condições favoráveis, os J2 eclodem no solo. Em seguida se desenvolvem, processando-se duas ecdises, que levam aos estágios seguintes J3 e J4, sem se alimentarem. Em condições ambientais desfavoráveis, assumem um tipo de vida latente, denominado criptobiose, sobrevivendo muito tempo. Os machos não fitoparasitas permanecem no solo, copulam e morrem. As fêmeas completam o seu desenvolvimento orgânico e funcional no solo e são denominadas fêmeas adultas imaturas. Em condições ambientais favoráveis ocorrem as cópulas; portanto, *R. reniformis* se reproduz por anfimixia. Esta é a forma infectante da espécie, ou seja, a que infecta a planta. Na presença da raiz da planta hospedeira, a fêmea vermiforme penetra, conforme mencionado, apenas a região anterior do corpo no córtex radicular, estabelecendo um sítio de alimentação permanente, passando a ter comportamento sedentário. No local definitivo de alimentação, formam-se células diferenciadas à frente da região frontal da fêmea, das quais o nematoide retira os seus alimentos. Com a evolução do parasitismo (interação planta-nematoide), a fêmea aumenta seu volume corporal, passando à forma reniforme (forma de rim) e, em seguida, expele pela vulva uma massa gelatinosa que encobre toda a porção do corpo projetada para fora da raiz, iniciando, logo em seguida, a postura dos ovos. Diante de múltiplas infecções, surge

elevado número de necroses radiculares e diminuição ou desaparecimento de pelos absorventes; esses são os sintomas primários da doença, que é conhecida popularmente por rotilenculose. Como consequência, o sistema radicular se torna ineficiente, dificultando a absorção e o transporte de água e nutrientes; na sequência, surgem os sintomas secundários, ou reflexos, caracterizados por nanismo, clorose e amarelecimento foliar (ASMUS; ISHIMI, 2009). O ciclo de vida de *R. reniformis* dura um período de duas e meia semanas, podendo se prolongar por até mais de dois anos, dependendo da temperatura e da presença de planta hospedeira (ROBINSON et al., 1997).

Figura 1- Ciclo de vida de *Rotylenchulus reniformis*.



Foto/crédito: V.L Lira; R.M. Moura

IDENTIFICAÇÃO DE *Rotylenchulus* spp

Para identificação de espécies do gênero *Rotylenchulus* são utilizados, principalmente, caracteres morfológicos de fêmeas adultas imaturas, entre os quais: presença ou ausência de machos na população, região labial, comprimento do estilete e, também tamanho e forma dos nódulos do estilete. Distância dos nódulos do estilete à abertura da glândula dorsal (DGO). Comprimento do corpo, da cauda e do esôfago. Maior largura do corpo. Distância da região cefálica à vulva, expressa em porcentagem do comprimento do corpo (valor V), formato da cauda e a presença de uma região hialina na extremidade. Consideram-se, também, as seguintes relações corporais: valor a = comprimento do corpo dividido pela maior largura do corpo; b = comprimento do corpo dividido pelo comprimento do esôfago; c = comprimento do corpo dividido pelo comprimento da cauda (Figura 2) (LOPES; PIMENTEL; CARES, 2016).

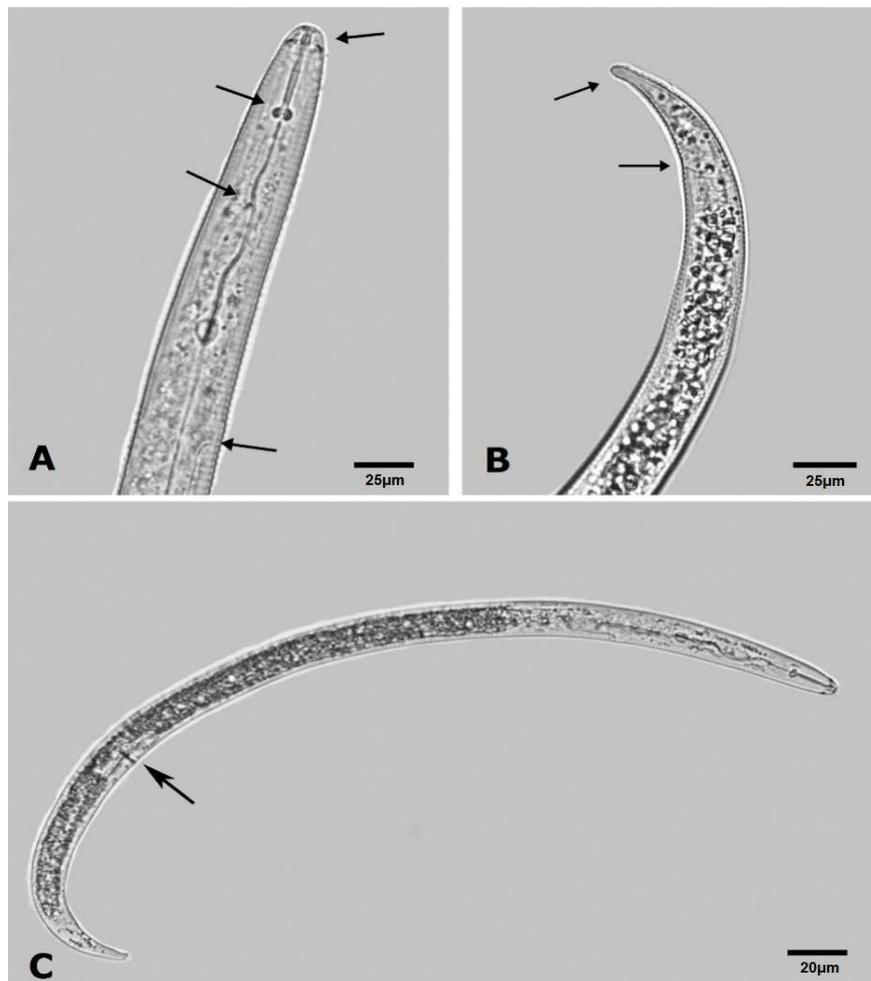


Foto: V. L. Lira

Figura 2- Microfotografia apresentando alguns caracteres morfológicos usados na identificação de espécies do gênero *Rotylenchulus*. A) setas: região labial alta, distância dos nódulos do estilete à abertura da glândula dorsal (DGO), formato dos nódulos do estilete e poro excretor; B) setas: reto (poro anal) e porção hialina; C) Visão geral do corpo de uma fêmea adulta imatura de *R. reniformis*, vendo-se a vulva, indicada pela seta.

De modo geral, os fitonematoides são considerados organismos difíceis de serem identificados, devido às similaridades morfológicas, tamanho diminuto e pequena quantidade de caracteres morfológicos taxonômicos que podem ser utilizados nos diagnósticos de espécies (OLIVEIRA, 2010).

Diversos pesquisadores propuseram chaves de identificação para o gênero *Rotylenchulus*. Dasgupta, Raski e Sher (1968) sugeriram a separação das espécies com base na forma da região labial e comprimento da porção hialina da cauda. No entanto, Germani (1978) afirmou que os caracteres usados por esses autores são muito variáveis e não permitem uma clara distinção dentro do gênero. Dessa forma, Germani propôs uma nova chave para separação das espécies a partir de fêmeas adultas imaturas, considerando como principais caracteres diferenciadores o comprimento do estilete, a posição da vulva, a forma da região cefálica e a presença ou ausência de machos na população. Lehman e Inserra (1990), ao estudarem variações morfométricas de populações de *R. reniformis* e *R. parvus*, de várias regiões geográficas dos Estados Unidos, observaram que essas duas espécies podem ser separadas apenas pelo comprimento do corpo de fêmeas adultas imaturas, do comprimento do estilete e o da cauda. Robinson et al. (1997) também propuseram uma chave dicotômica para identificação de espécies do gênero *Rotylenchulus*, considerando entre os principais caracteres suficientes para diagnose, o comprimento do estilete e o valor V; desde então, esta é a chave de classificação mais em uso.

A quantidade de pesquisadores que se dedicam à taxonomia dos fitonematoides ainda é considerada reduzida. No entanto, novas tecnologias têm sido desenvolvidas de modo a facilitar, uniformizar e dar mais segurança aos protocolos de diagnóstico (LUCA et al., 2004). Nesse processo evolutivo-tecnológico de identificação de espécies, o diagnóstico molecular, a partir da análise do DNA de

fitonematoides, representou grande avanço potencial e trouxe facilidades na identificação taxonômica rotineira, por ser rápido e preciso. Permite, por exemplo, a análise simultânea de vários genes, cuja identificação é considerada estável, podendo ser realizado em qualquer fase do desenvolvimento do nematoide, além de não ser influenciado pelo ambiente (AL-BANNA et al., 2004; CORDEIRO et al., 2008).

As técnicas moleculares mais utilizadas nos estudos de fitonematoides são as isoenzimáticas, as sorológicas, rDNA (DNA ribossômico), e as fundamentadas em mtDNA (DNA mitocondrial), SCARs (Sequence Characterized Amplified Regions), RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA), qPCR (Real-time PCR) RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms), satDNAs (Satellite DNA) e microarranjo (BLOK; POWERS, 2009). A técnica do Código de Barras do DNA (DNA barcoding) também vem se tornando rotineira e o seu princípio se fundamenta no fato de que, cada organismo, independentemente do filo, apresenta no genoma um pequeno trecho, específico, suficiente para separar todos os organismos que habitam o planeta (POWERS, 2004). A região D2/D3 do gene 28S do DNA ribossômico (DNAr) é a mais utilizada para se inferir relações evolutivas entre espécies de fitonematoides e de táxons mais distantes, por ser um dos segmentos mais conservados (ROBERTS et al., 2016).

Nos últimos anos, diversos estudos de identificação e diversidade de espécies de *Rotylenchulus* foram realizados, utilizando-se as regiões D2/D3 do DNAr. Dentre esses, os de Zhang et al. (2011) utilizaram as sequências da região D2/D3 do gene 28S do DNAr para identificação de populações de *R. reniformis* parasitando frutíferas e hortaliças na China. Também foi a partir das sequências do fragmento da região D2/D3 da expansão 28S do DNAr que Van Den Berg et al. (2016) descreveram uma nova espécie, isolada do solo e raízes de cana-de-açúcar na África do Sul, a qual foi denominada *R. macrosomoides*. O estudo também mostrou que *R. reniformis* apresenta uma relação irmã com *R. macrossoma*, porém a relação entre as outras espécies de *Rotylenchulus* permanece não determinada. Palomares-Rius et al. (2017) utilizaram as sequências da região D2/D3 do gene 28S do DNAr para identificação e primeiro assinalamento de *R. macrossoma* na Grécia e o primeiro registro de *R. macrossoma* parasitando avelã no Norte da Espanha.

IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DE *Rotylenchulus reniformis*

Conforme mencionado, *R. reniformis* parasita mais de 300 espécies de plantas de 77 famílias (ROBINSON et al., 1997). Nos Estados Unidos, esse nematoide foi considerado o mais importante problema fitossanitário da cultura do algodão, com capacidade de diminuir a produção em até 60% (KOENNING et al., 2004). Essas perdas podem resultar em prejuízos econômicos que podem exceder a ordem de milhões de dólares (LAWRENCE et al., 2007). No Brasil, entre as culturas mais afetadas por esse nematoide estão: o algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) (ASMUS; ISEMBERG, 2003), a soja (*Glycine max* L.) (DIAS et al., 2010), o feijoeiro-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (GARDIANO; KRZYZANOWSKI; SAAB, 2012), o meloeiro (*Cucumis melo* L.) (MOURA; PEDROSA; GUIMARÃES, 2002) e o coentro (*Coriandrum sativum*) (MOURA et al., 1997) o que ocasiona altas perdas econômicas de campo. Contudo, o número de espécies de vegetais parasitadas tem aumentado, como mostram novos assinalamentos realizados após a publicação da última revisão bibliográfica sobre o nematoide reniforme (MOURA et al., 1997; 2005).

De acordo com a literatura, algumas plantas permanecem com o status indefinido em relação à hospedabilidade a *R. reniformis*, caso da cana-de-açúcar, cebola, espinafre, arroz, inhame entre outras (ROBINSON et al., 1997). Alguns trabalhos têm relatado a presença de *R. reniformis* em áreas de cana-de-açúcar; no entanto, pesquisas subsequentes mostraram que a ocorrência do nematoide era devido à presença de plantas invasoras hospedeiras associadas à cultura comercial (BRATHWAITE, 1976; MOURA; SILVA; LIRA, 2016/2017). Diversas plantas invasoras já foram referidas como boas hospedeiras de *R. reniformis*, contribuindo para a disseminação e sobrevivência deste nematoide, principalmente nos períodos das entressafras (INSERRA et al., 1989).

Estudos outros mostram que a reprodução e a patogenicidade de *R. reniformis* podem variar de acordo com a cultura (MCGAWLEY; PONTIF; OVERSTREET, 2010), o que tem levado à conclusão de que o nematoide reniforme possui raças parasitárias (VADHERA; SHUKLA, 1999; RAO; GANGULY, 1996; SINGH; AZAM, 2012). Dasgupta e Seshadri (1971a) foram os primeiros a

designar raça A e B para *R. reniformis* ao avaliar o nível de reprodução desse nematoide em plantas de feijão-caupi, algodão e mamona. Foram classificados na raça A populações que se reproduziam nos três hospedeiros e raça na B apenas as populações que se multiplicaram no feijão-caupi. Esta classificação ainda é a mais utilizada. É importante a identificação das espécies em nível de raça, principalmente em estudos de melhoramento genético visando à obtenção de cultivares resistentes.

MEDIDAS DE CONTROLE DE *Rotylenchulus reniformis*

Diversos métodos de controle têm sido utilizados contra os nematoides fitopatogênicos, entre os quais: controle químico, rotação de culturas, uso de cultivares resistentes, controle biológico e algumas práticas culturais (FERRAZ et al., 2010). Para o controle químico, são utilizados nematicidas sistêmicos, mas para aplicação são necessários equipamentos motorizados de alto custo e trabalhadores de campo bem treinados. Por serem altamente tóxicos esses nematicidas acarretam inúmeros problemas à saúde pública, além de fortes impactos ambientais. Por serem aplicados no solo, os nematicidas interferem negativamente na microbiota, destruindo organismos benéficos, podendo, também, contaminar águas subterrâneas (lençóis freáticos e aquíferos) (RITZINGER; FANCELLI, 2006) e por requerer mais de 90 dias de período de carência, são impedidos de serem aplicados em certas culturas de ciclo curto, tal como o coentro (30 dias no campo) e o meloeiro (60 dias).

A rotação de culturas é uma técnica de controle muito recomendada para o manejo de fitonematoides. É executada utilizando plantas não hospedeiras, o que restringe a multiplicação dos nematoides, e contribui para a redução populacional. O cultivo de gramíneas a exemplo do sorgo, do milho e da braquiária, permite o controle de *R. reniformis* em áreas infestadas com eficiência e lucratividade (ASMUS, 2008). Entretanto, alguns fatores dificultam o sucesso do sistema de rotação, entre os quais, o tempo de sobrevivência do nematoide no solo, mesmo na ausência de planta hospedeira. É o caso de *R. reniformis* que pode sobreviver por até dois anos, devido ao mecanismo da anidrobiose (ASMUS et al., 2015). Dessa forma, para obtenção de resultados satisfatórios, é necessário um período maior de

rotação (LIRA; MOURA, 2013). De um modo geral, as plantas utilizadas na rotação não são tão rentáveis quanto a cultura principal, não permitindo renda financeira ao agricultor durante a rotação (FERRAZ; SANTOS, 1995).

A resistência genética de plantas é outra prática utilizada para controle de fitonematoides. As cultivares resistentes são desenvolvidas por meio do melhoramento genético, geralmente dispendioso economicamente, e desenvolvido através de longos anos. Quando disponíveis, alinham eficiência de controle, praticidade e segurança ambiental. Porém, a maioria das cultivares existentes nas diferentes culturas suscetíveis não apresenta resistência suficiente para o controle de *R. reniformis* (ASMUS; LAMAS 2007). No entanto, estudos sobre a resistência de genótipos de soja ao nematoide reniforme têm mostrado resultados promissores e que futuramente poderão ser utilizados em programas de melhoramento (MELO; SANTOS; ASMUS, 2013).

Finalmente, tem-se o controle biológico; é um método alternativo, de grande potencial prático, econômico e de segurança ambiental. Além de apresentar uma série de vantagens em relação ao método químico, não deixa resíduos tóxicos em alimentos, é de fácil aplicação, favorece a conservação do ambiente e não induz o surgimento de espécies resistentes (SOARES, 2006; NUNES, 2008). Diversos organismos são considerados antagônicos a fitonematoides e no solo, há, aproximadamente, 200 inimigos naturais (PIMENTEL et al., 2009). Entretanto, nem todos podem ser utilizados para biocontrole de fitonematoides, pois, para ser considerado bom biocontrolador, o micro-organismo não deve ser patogênico às plantas nem a animais em geral. Deve ser eficiente em reduzir a população do fitonematoide, principalmente quando em alta densidade. O biocontrolador deve: conseguir sobreviver a condições adversas do solo na ausência do hospedeiro; parasitar diversas espécies de nematoides; ser capaz de se dispersar rapidamente quando aplicado no solo; permanecer infectivo após longo tempo de armazenamento e ser compatível com fertilizantes, defensivos agrícolas, entre outras práticas culturais (FERRAZ et al., 2010). Embora seja difícil reunir todas essas características em um único organismo, os fungos têm sido considerados os de maior potencial, por apresentarem maior quantidade desses atributos (FERRAZ; SANTOS, 1995; CHEN; DICKSON, 2004).

O controle biológico se apresenta como excelente alternativa de controle principalmente para as culturas de ciclo curto, caso do coentro, altamente suscetível

à doença “nanismo”, causada por *R. reniformis*. Nesse caso específico, não há variedades resistentes e o curto ciclo da planta no campo, que é de 90 dias, inviabiliza o uso de nematicidas, pois o período residual desses agrotóxicos é de 90 dias. Essa impossibilidade de utilização se justifica também por questões ecológicas locais, devido à alta probabilidade de contaminação de mananciais hídricos, sempre próximos aos plantios de coentro. O conhecimento sobre fungos nematófagos ainda é limitado e informações básicas são essenciais para o desenvolvimento de estratégias efetivas de controle, entre elas, a ecologia microbiana do solo, capacidade saprofítica de biocontroladores, competitividade biótica, produção massal de micro-organismos para aplicação no campo, identificação correta dos fitonematoides, sua distribuição e sobrevivência no solo, e a biologia da interação fungo-nematoide-planta. Alguns bionematicidas já foram formulados a partir de alguns desses fungos, entre os quais: *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma harzianum* e *Pochonia chlamydosporia* (ASKARY, 2015).

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela Bolsa de Pós-Graduação (Doutorado) concedida à primeira autora e ao (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio à última autora (Proc. 307129/2015-2).

REFERÊNCIAS

- AL-BANNA, L. et al. Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species specific. **Journal of Nematology**, College Park, v. 36, n. 2, p. 142-146, Jun. 2004.
- ASKARY, T. H. Nematophagous fungi as biocontrol agents of phytonematodes. In: ASKARY, T. H.; MARTINELLI, P. R. P. (Ed.) **Biocontrol agents of phytonematodes**, Wallingford: CAB International, 2015. p. 81-125.
- ASMUS, G. L. Ocorrência e manejo do nematoide reniforme em Mato Grosso do Sul. In: **TECNOLOGIA e produção: soja - milho 2008/2009**. 5. ed. Maracaju, MS:

- Fundação-MS, 2008. p. 123-125. ASMUS, G. L.; ISEMBERG, K. Danos em algodoeiro associados ao nematoide reniforme *Rotylenchulus reniformis* em Mato Grosso do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 4., 2003, Goiânia. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. CD-ROM.
- ASMUS, G. L.; ISHIMI, C. M. Flutuação populacional de *Rotylenchulus reniformis* em solo cultivado com algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 1, p. 51- 57, jan. 2009.
- ASMUS, G. L.; LAMAS, F. M. Avaliação da tolerância de cultivares de algodoeiro ao nematoide reniforme. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 6., 2007, Uberlândia. **Resumos**. Uberlândia: ABRAPA, 2007. p. 118.
- ASMUS, G. L. et al. Manejo de nematoides. In: FREIRE, E. C. (Ed.). **Algodão no cerrado do Brasil**. Brasília, DF: Positiva, 2015. p.445-483.
- BLOK, V. C.; POWERS, O. Biochemical and molecular identification. In: PERRY, R.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Ed.) **Root-knot nematodes**. Wallingford: CABI International, 2009. p. 98-118.
- BRATHWAITE, C.W.D. Plant-parasitic nematodes associated with sugarcane in Barbados. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 60, n. 4, p. 294-295, 1976.
- CHEN, S.; DICKSON, D. W. Biological control of nematodes by fungal antagonists. In: CHEN, Z. X.; CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. (Ed.). **Nematology: advances and perspectives**. Beijing: Tsinghua University Press; Cambridge: CABI Pub, 2004. v. 2, p. 979-1039.
- CORDEIRO, M. C. R. et al. **Identificação molecular de nematoides das galhas, *Meloidogyne* spp.** Planaltina: Embrapa Cerrados. 2008.
- CUNHA, A. L., MOURA, K. S., BARBOSA, J. C., SANTOS, A. F. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. *Diversitas Journal*, v. 1, n. 2, p. 175-181, 2016.
- DASGUPTA, D. R.; RASKI, D. J.; SHER, S. A. A revision of the genus *Rotylenchulus* Linford & Oliveira, 1949. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, Washington, v. 35, n. 1, p. 169-92, 1968.

DASGUPTA, D. R.; SESHADRI, A. R. Races of the reniform nematode, *Rotylenchulus reniformis* Lindford and Oliveira, 1940. **Indian Journal of Nematology**, New Dehi, v. 1, p. 21-24, 1971.

DIAS, W. P. et al. **Nematoides em soja**: identificação e controle. Londrina: Embrapa Soja, 2010.

FERRAZ, S.; SANTOS, M. A. Controle biológico de fitonematoides pelo uso de fungos. **Revisão Anual de Proteção de Plantas**, v. 3, p. 283-314, 1995.

FERRAZ, S. et al. **Manejo sustentável de fitonematoides**. 1. ed. Viçosa: Ed. da UFV, 2010.

GARDIANO, C. G.; KRZYZANOWSKI, A. A.; SAAB, O. J. G. A. Hospedabilidade de plantas melhoradoras de solo à *Rotylenchulus reniformis* Linford e Oliveira (1940). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 2, p. 313-317, 2012.

GERMANI, G. Caracteres mopho-biometriques de trois species ou est – africanes de *Rotylenchulus* Linford and Oliveira, 1940 (Nematoda – Tylenchida). **Revue de Nématologie, Bondy**, v. 1, n. 2, p. 241-25, 1978.

INSERRA, R.N. et al. **Weed hosts of *Rotylenchulus reniformis* in ornamentais nurseries of Southern Florida**. Gainesville, FL: Florida Department of Agriculture and Consumer Services, 1989. (Nematology circular, n. 171).

JONES, J. T. et al. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 14, n. 9, p. 946–961, Dec. 2013.

KOENNING, S. R et al. Plant-parasitic nematodes attacking cotton in the United States: old and emerging production challenges. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 2, p. 100-113, Feb. 2004.

LAWRENCE, G. W. et al. Population estimation of the reniform nematode using hyperspectral reflectance data and applications to variable rate nematicide applications. Proceedings of the National Beltwide Cotton Conference, National Cotton Council. Memphis TN 1. 2007.

LEHMAN, P.S.; INSERRA, R.N. Morphometric variation of *Rotylenchulus parvus* and *Rotylenchulus reniformis* populations in the southern United States. **Soil and Crop Science Society of Florida Proceedings**, Florida, v. 49, p. 220-226, 1990.

- LINFORD, M. B.; OLIVEIRA, J. M. *Rotylenchulus reniformis* n. gen., n. sp., a nematode parasite of roots. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, Washington, v. 7, n. 1, p. 35-42, 1940.
- LIRA, V. L.; MOURA, R. M. **Pratylenchus coffeae** (Nematoda: Tylenchidae): um problema da agricultura nordestina. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*, Recife, v. 10, p. 143-159, 2013.
- LOPES, C. M. L.; PIMENTEL, R. R.; CARES, J. E. Gênero *Rotylenchulus*. In: OLIVEIRA, C.M. G.; SANTOS, M. A.; CASTRO, L. H. S. **Diagnose de fitonematoides**. Campinas: Millennium, 2016. p.163-180.
- LUCA, F. et al. Comparison of the sequences of the D3 expansion of the 26S ribosomal genes reveals different degrees of heterogeneity in different populations and species of **Pratylenchus** from the Mediterranean region. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 949-957, 2004.
- MCGAWLEY, E. C.; PONTIF, M. J.; OVERSTREET, C. Variation in reproduction and pathogenicity of geographic isolates of *Rotylenchulus reniformis* on cotton. **Nematropica**, Bradenton, Fla., v. 40, n. 2, p. 275-288, Dec. 2010.
- MELO, C. L. P.; SANTOS, W. R.; ASMUS, G. L. Resistance of soybean genotypes to the reniform nematode in a controlled environment. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 13, n. 1, p. 23-32, Mar. 2013.
- MOURA, R. M.; MARANHÃO, S. R. V. L.; GUIMARAES, L. M. P. Soursop, a new host of *Rotylenchulus reniformis*. **Fitopatologia Brasileira**, Campinas, SP, v. 30, n. 4, p. 437, 2005.
- MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R.; GUIMARÃES, L. M. P. Nematoses de alta importância econômica da cultura do melão no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Campinas, SP, v. 27, p. 225, 2002.
- MOURA, R. M.; SILVA, J. V. C. L.; LIRA, V. L. SP 70-1011: genótipo de cana-de-açúcar para uso em rotação de culturas no controle do nematoide reniforme. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 13/14, p. 257-265, 2016-2017.

- MOURA, R. M. et al. O nanismo do coentro, uma nova doença causada pelo nematoide *Rotylenchulus reniformis*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, SP, v. 21, n. 2, p. 13-22, 1997.
- NUNES, H. T. **Agentes microbianos no controle de nematóides e fungos fitopatogênicos de soja e sua compatibilidade com agroquímicos**. 2008. 73 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
- OLIVEIRA, C. M. G. Aplicação conjunta de técnicas moleculares e taxonomia clássica na resolução de problemas taxonômicas de nematoides. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 35, p. 58, 2010.
- PALOMARES-RIUS, J. E. et al. Prevalence and molecular diversity of reniform nematodes of the genus *Rotylenchulus* (Nematoda: Rotylenchulinae) in the Mediterranean Basin. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 150, p. 439-455, 2017.
- PIMENTEL, M. S.; PEIXOTO, A. R.; PAZ, C. D. Potencial de controle biológico de *Meloidoyne* utilizando fungos nematófagos e bactérias em cafeeiros. **Coffee Science**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 84-92, jan./jun. 2009.
- POWERS, T. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, n. 1, p. 367-383, 2004.
- RAO, G. M. V. P.; GANGULY, S. Host preference of six geographical isolates of reniform nematode, *Rotylenchulus reniformis*. **Indian Journal of Nematology**, New Delhi, v. 26, p. 19-22, 1996.
- RITZINGER, C. H. S. P.; FANCELLI, M. Manejo integrado de nematoides na cultura da bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 28, n. 2, p. 331-338, 2006.
- ROBERTS, D. et al. Diagnose molecular de nematoides parasitos de plantas. In: OLIVEIRA, C. M. G.; SANTOS, M. A.; CASTRO, L. H. S. **Diagnose de fitonematoides**. Campinas: Millennium, 2016. p.281-324.
- ROBINSON, A. F. et al. *Rotylenchulus* species: identification, distribution, host ranges, and crop plant resistance. **Nematropica**, Bradenton, v. 27, n. 2, p. 127-180, 1997.

SINGH, N.; AZAM, M. F. Studies on the pathogenicity of three host races of *Rotylenchulus reniformis* on castor. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 45, n. 5, p. 522- 525, 2012.

SOARES, P. L. M. **Estudo do controle biológico de fitonematoides com fungos nematófagos**. 2006. 252 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

VADHERA, I.; BHATT, J.; SHUKLA, B. N. Prevalence of a new race of *Rotylenchulus reniformis* in Madhya Pradesh. **Journal of Mycological Plant Pathology**, New Delhi, v. 29, p. 32-134, 1999.

VAN DEN BERG, V. Morphological and molecular characterisation of one new and several known species of the reniform nematode, *Rotylenchulus* Linford & Oliveira, 1940 (Hoplolaimidae: Rotylenchulinae), and a phylogeny of the genus. **Nematology**, Leiden, v. 18, n. 1, p. 67-107, Jan. 2016.

ZHANG, Y. et al. Morphological and molecular characterization and host range of *Rotylenchulus reniformis* population occurring in Hangzhou, Zhejiang, China. **Acta Phytopathologica**, Sinica, v. 41, n. 1, p. 37-43, 2011.

4 ARTIGO II - artigo submetido à revista *Nematology*

Identificação específica, caracterização e raça predominante do nematoide reniforme em coentro no Estado de Pernambuco, Brasil

Resumo

Este estudo teve como principais objetivos identificar, a nível de espécie e raça fisiológica, 11 populações de campo do nematoide reniforme, encontrado associado a plantas de coentro afetadas pela doença nanismo do coentro, em diferentes regiões produtoras do Estado de Pernambuco, Brasil. Foram utilizadas técnicas morfométricas e moleculares pela amplificação e sequenciamento da expansão D2/D3 do gene 28S rDNA. Para o estudo de raças, foi utilizado o grupo padrão de plantas formado pelo algodoeiro, feijão-caupi e mamona. Todas as populações foram identificadas como *R. reniformis*, com ampla diversidade morfológica. As sequências das 11 populações de *R. reniformis* apresentaram 99 % de homologia quando comparadas com outras sequências depositadas no GenBank. A análise filogenética mostrou que *R. reniformis*, *R. macrossoma* e *R. borealis* têm uma relação de parentesco muito próxima. No teste de raças, todas as populações foram caracterizadas como raça A; o menor índice de reprodução de *R. reniformis* ocorreu em plantas de algodão. De acordo com a literatura, as variações morfológicas e reprodutivas da espécie são consequências do efeito da temperatura, do estresse ambiental, da influência geográfica ou mesmo do genótipo da planta hospedeira.

Palavras-chave: algodão, código de barras, feijão-caupi, identificação, mamona, região D2/D3.

1. Introdução

O gênero *Rotylenchulus* Linford & Oliveira (Tylenchina:Hoplolaimidae), conhecido popularmente por nematoide reniforme, compreende 11 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (Van Den Berg *et al.*, 2016). Entre essas espécies, *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira é a mais relevante, não apenas por ser um dos principais problemas fitossanitários de

diversas culturas de importância econômica, mas também pela elevada capacidade de sobrevivência no solo na ausência de planta hospedeira (Asmus *et al.*, 2015).

O controle de fitonematoides é bastante complexo devido à alta capacidade reprodutiva desses organismos, eficientes mecanismos de sobrevivência em condições ambientais adversas, ampla gama de hospedeiras, além da existência de raças parasitárias dentro da espécie, como é o caso de *R. reniformis*, cujo potencial reprodutivo e virulência podem variar de acordo com a cultura (McGawley *et al.*, 2010). Dasgupta & Seshadri (1971a) foram os primeiros a determinar raça A e B para *R. reniformis* de acordo com a capacidade de reprodução em planta de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.), mamona (*Ricinus communis* L.) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.). Embora outros estudos apontem a existência de outras raças (Vadhera & Shukla, 1999; Rao & Ganguly, 1996; Singh & Azam, 2012), esta classificação ainda é a mais utilizada. É importante ressaltar que a identificação correta das espécies e raças associadas a problemas fitossanitários é fator primordial para o manejo adequado e efetivo, principalmente em estudos de melhoramento genético visando à obtenção de cultivares resistentes a esses fitopatógenos.

Os fitonematoides são considerados organismos difíceis de serem identificados, devido ao pequeno tamanho, similaridade interespecífica e número limitado de características taxonômicas para o diagnóstico da espécie (Oliveira, 2010). No entanto, técnicas baseadas no uso de DNA representam grande potencial e têm a finalidade de facilitar a discriminação e descoberta de espécies de forma rápida e precisa (Oliveira *et al.*, 2011), além de poderem ser realizadas por profissionais não especializados na taxonomia morfológica. Para os fitonematoides, a região D2/D3 do gene 28S do DNAr tem sido amplamente utilizada como marcadora de diagnóstico para identificação de espécies e para inferir relações evolutivas entre elas, por ser um dos segmentos genéticos mais conservados (Roberts *et al.*, 2016). Contudo, a identificação morfológica ainda é a base para a taxonomia e classificação dos nematoides.

Nesta última década, estudos de filogenia molecular com o gênero *Rotylenchulus*, baseados na região D2/D3 do gene 28S do DNAr, foram realizados por diversos autores. A partir das sequências dessa região, Palomares-Rius *et al.* (2017) realizaram o primeiro registro de *R. macrossoma* Dasgupta, Raski & Sher na Grécia e o primeiro assinalamento de *R. macrossoma* parasitando avelã (*Corylus avellana* L.) no Norte da Espanha. Adam *et al.* (2018) utilizaram o

sequenciamento da expansão D2/D3 do gene 28S do DNAr 28S do DNAr para estudos de diagnóstico das espécies e para inferir relações evolutivas de populações de *R. reniformis* coletadas no Egito com as de outros países, com os isolados apresentando uma relação homogênea, mas frequentes variações genéticas ocorrem dentro da espécie. Embora o gênero *Rotylenchulus* apresente 11 espécies descritas, no Brasil apenas *R. reniformis* foi relatada (Lopes et al., 2016) sendo assinalada pela primeira vez em coentro, por Moura et al. (1997). Porém na ocasião o diagnóstico foi realizado considerando-se apenas os aspectos micrométricos e morfológicos, sendo importante a complementação dos dados com estudos moleculares.

Considerando a existência de raças, a variedade morfométrica dentro da espécie e a necessidade de ampliar os estudos sobre *R. reniformis*, o objetivo deste estudo foi caracterizar por técnicas morfológicas, moleculares e testes de parasitismo, sob condições de casa de vegetação, 11 populações de *Rotylenchulus* sp., isolados de plantas de coentro (*Coriandrum sativum* L.), em municípios do Estado de Pernambuco, Brasil.

2. Material e métodos

2.1 Obtenção de isolados de *Rotylenchulus* sp.

Onze amostras de solo e raízes de coentro da variedade Verdão, portadoras de sintomas da doença nanismo do coentro, foram coletadas para obtenção das populações do nematoide renifome. Os locais de coleta foram os municípios de Arcoverde (uma amostra), Chã-Grande (duas amostras), Glória do Goitá (uma amostra), Passira (três amostras) e Vitória de Santo Antão (quatro amostras), todos no estado de Pernambuco, Brasil. As amostras foram coletadas em pontos aleatórios em propriedades particulares, individualmente acondicionadas em sacos plásticos, com etiqueta de identificação. Para obtenção de populações puras, uma única massa de ovos foi extraída de cada população, utilizando-se solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % conforme metodologia de Hussey & Baker (1973) e inoculada em plantas de coentro variedade Verdão, as quais foram cultivadas em vasos com capacidade de 1kg de solo/areia (2:1) esterilizados em autoclave. Após as inoculações, as plantas foram mantidas em casa de vegetação do Instituto Agrônômico de Pernambuco – IPA, Recife, Pernambuco, Brasil.

2.2 Identificação morfológica

Foram analisados 20 espécimes por amostra de solo/área. Fêmeas jovens foram utilizadas na preparação de lâminas temporárias para fotomicrografias e mensurações em um sistema de aquisição de imagens digitais constituído por uma câmera digital LEICA, modelo ICC50 HD, montada em microscópio LEICA, modelo DM 500, e acoplada a um microcomputador utilizando o programa LAS EZ (Leica Application Suite). Para identificação da espécie, foi utilizada a chave de identificação de Dasgupta et al. (1968). As variáveis morfológicas analisadas foram: comprimento do corpo, maior largura do corpo, comprimento do estilete, distância entre a abertura da glândula dorsal esofagiana e a base dos nódulos basais do estilete (DGO) comprimento do esôfago, comprimento da cauda, comprimento da porção hialina da cauda (h) e as seguintes relações corporais: valor “a” (comprimento do corpo dividido pela maior largura), “b” (comprimento do corpo dividido pelo comprimento do esôfago), “c” (comprimento do corpo dividido pelo comprimento da cauda), e “V%” (distância da região cefálica à vulva, expressa em porcentagem do comprimento do corpo). A amplitude, a média e o desvio-padrão foram determinados para cada população estudada.

2.3 Identificação molecular

Para a identificação molecular da espécie foi utilizado o sequenciamento da expansão D2/D3 da região 28 S do DNA ribossômico (DNAr), seguindo o método da Proteinase-K (HLB: Holterman Lysis Buffer) (Holterman *et al.*, 2006). O DNA genômico foi extraído de um único espécime de cada população de *Rotylenchulus* spp. Cada nematoide foi seccionado ao meio com auxílio de uma agulha em uma gota de 25 µL HLB (proteínase K 800 µg/mL, β-mercaptoetanol 1 % (v/v), NaCl 0,2M e Tris HCl 0,2M pH 8) + 25 µL água Mili-Q e transferidos para microtubos e incubados em termociclador a 65° C por 2 horas e a 99° C por 5 min. Após a extração do DNA as amostras foram mantidas a -20°C (Consoli *et al.*, 2012).

Para as reações de PCR foi utilizado o kit Go Taq® Hot Start Green Master Mix, fabricante Promega Corporation – São Paulo/ SP. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL utilizando 12,5 µL do Go Taq®, 1,5 µL do primer D2 (5'- ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3'), 1,5 µL do primer D3 (5'- TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'), 3 µL de DNA genômico e 6,5 µL de água Mili-Q.

As condições de amplificação utilizadas para a expansão D2 / D3 encontram-se em Tanha Maafi *et al.* (2003). Os produtos da amplificação foram corados com 0,5µg/mL de *GelGreen*TM e submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1 % em tampão 1X TAE (Sambrook *et al.*, 1989) e posteriormente visualizado em um transiluminador de luz UV e fotografado. Os produtos de PCR foram purificados por digestão enzimática usando o kit *Illustra*TM *ExoPro Star*TM 1-Step (GE Healthcare Life Sciences) de acordo com o protocolo do fabricante e encaminhados para a Plataforma Tecnológica de Genômica e Expressão Gênica do Centro de Biociências (CB) da UFPE para sequenciamento.

2.4 Alinhamento das sequências e análise filogenética

Os eletroferogramas foram editados utilizando Sequencher 4.7 (Gene Codes, Ann Arbor, Michigan). As sequências obtidas foram comparadas às sequências de outras espécies de nematoides depositadas no GenBank, usando o Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências de *Rotylenchulus* spp. foram alinhadas utilizando o software ClustalX v.2 (Larkin *et al.*, 2007).

O Software Topali 2.5 (Milne *et al.*, 2004) foi utilizado em busca do melhor modelo de substituição de nucleotídeos, assim o modelo utilizado foi HKY+G. As relações filogenéticas foram analisadas por inferência Bayesiana (1.000.000 de gerações) utilizando o MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) e analisadas com Software Topali 2.5. As espécies *Hoplolaimus seinhorsti* e *Rotylenchus vitis* foram inseridas como outgroup. As árvores resultantes foram visualizadas e editadas no software FigTree 1.4.3 (Rambaut, 2016).

2.5 Reprodução de *R. reniformis* em algodão, mamona e feijão-caupi

Onze populações puras de *R. reniformis*, devidamente identificadas a nível de espécie, oriundas de plantas de coentro e mantidas em casa de vegetação foram utilizadas para detecção de raças segundo a classificação de Dasgupta & Seshadri (1971). Amostras de solo de cada vaso com os isolados foram coletadas e nematoides extraídos segundo a técnica de Jenkins (1964); as raízes foram processadas pelo método do liquidificador e centrífuga (Coolen & D'Herde, 1972). Os nematoides de cada população, contido nas suspensões, foram contados com auxílio de caixas de acrílico transparentes e microscópio de luz.

Para os testes de suscetibilidade foram utilizadas plantas de feijão-caupi cultivar BR-IPA 206, mamona cultivar BRS Energia e algodão cultivar BRS Aroeira, as quais foram cultivadas em sacos plásticos com 1kg de capacidade contendo solo esterilizado, utilizando-se apenas uma planta por recipiente. Duas semanas após a germinação as plantas foram inoculadas próximo à raiz com suspensão contendo 1000 espécimes/ovos de *R. reniformis*. Para cada tratamento, foram utilizadas quatro repetições, em delineamento inteiramente casualizado. Após 60 dias da inoculação, as plantas foram cuidadosamente removidas do substrato e os solos e raízes processados para contagem dos nematoides e determinação do fator de reprodução ($FR = \text{População final} / \text{População inicial}$). Os resultados foram transformados para $\sqrt{(x+1)}$ e submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de significância.

3. Resultados

3.1 Identificação e caracterização das populações de *Rotylenchulus* spp.

3.1.1 Análise morfométrica

Após a análise das 11 populações de *Rotylenchulus* spp. oriundas das rizosferas de coentro, todas foram identificadas como *R. reniformis*. Os nematoides apresentavam região labial alta e conoide; os nódulos do estilete eram arredondados, o bulbo mediano oval com válvula proeminente e a DGO (distância entre a abertura da glândula dorsal esofagiana e a base do estilete) foi aproximadamente o comprimento do estilete (Figura 1 B). As glândulas esofagianas apresentavam sobreposição lateral e principalmente ventral ao intestino, ovários didélficos (dois ovários) anfidélficos (ovários opostos, um de cada lado da vulva) e vulva não saliente (Figura 1 A), cauda afilada com terminal arredondado e presença de porção hialina (Figura 1 C).

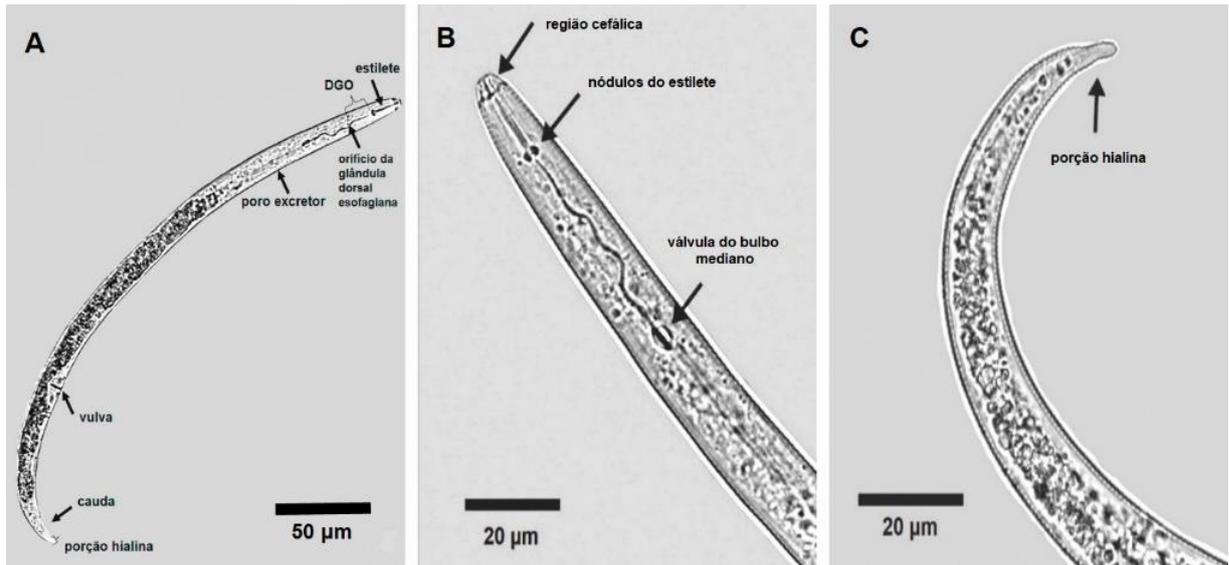


Figura 1. *Rotylenchulus reniformis*: A) Caracteres morfológicos usados para a identificação taxônômica; B) Região labial, nódulos do estilete arredondados e válvula do bulbo mediano proeminente (setas); C) Cauda afilada com término arredondado e a presença de porção hialina (seta);

Os dados relativos às mensurações das 11 variáveis taxonômicas são apresentados na Tabela 1. Considerando todas as 11 populações, a amplitude do comprimento do corpo foi de 310,0 a 540,0 μm . A maior largura do corpo apresentou amplitude de 15,0 a 30,0 μm . O valor mínimo e máximo para o comprimento do estilete foi de 15,0 e 25,0 μm , respectivamente. Quanto ao DGO, verificou-se variação entre 10,0 a 17,5 μm . Para o esôfago, a amplitude ficou entre 100,0 a 150,0 μm . O comprimento da cauda variou entre 10,0 e 30,0 μm . A amplitude para o valor “h” foi de 5,0 a 12,5 μm . Os valores referentes às relações corporais foram: “a”: 12,0 a 27,5 μm ; “b”: 2,5 a 4,4 μm ; “c”: 13,0 a 38,0 μm e “V”: 62,1 a 83,7 μm .

3.1.2 Análise molecular das populações de *Rotylenchulus* spp.

A partir da amplificação da região D2/D3 do gene 28S DNAr, foram obtidas 11 sequências de *R. reniformis*, as quais foram depositadas no GenBank com códigos de acesso de números MN860056 a MN860066. Todas as sequências obtidas das populações de *R. reniformis* apresentaram 99% de similaridade com o gene 28S DNAr de outros acessos desta espécie depositados no GenBank. A partir do alinhamento das sequências da região D2/D3 foi apresentada a relação filogenética de

R. reniformis por análise Bayesiana (Fig. 2). No total, foram incluídas 30 sequências (incluindo *Rotylenchus vitis* e *Hoplolaimus seinhorsti* como grupos externos) da região D2/D3 do gene 28S DNAr, sendo observado que todas populações do nematoide reniforme provenientes do coentro se agruparam no mesmo clado de outras sequências da mesma espécie. A análise filogenética também mostrou que *R. reniformis*, *R. macrossoma* e *R. borealis* têm uma relação de parentesco muito próxima.

3.2 Testes de reprodução

Os dados apresentados na figura 3 mostram que as 11 populações de *R. reniformis* se reproduziram em plantas de feijão-caupi, mamona e algodão, o que caracteriza todas as populações estudadas como raça A. No entanto, as populações de ARC, CG2, GG, VSA3, VSA4, PS1 e PS3 apresentaram menor taxa de reprodução em plantas de algodão, com abundante presença de machos, quando comparadas às registradas em feijoeiro caupi e mamona. Nas populações VSA1 e VS2, o feijão-caupi foi a melhor hospedeira em relação às outras culturas, resultando em melhores índices de reprodução no solo, na raiz, e conseqüentemente no fator de reprodução. Para as populações CG1 e PS2 não houve diferença significativa na reprodução entre as plantas de feijão-caupi, algodão e mamona.

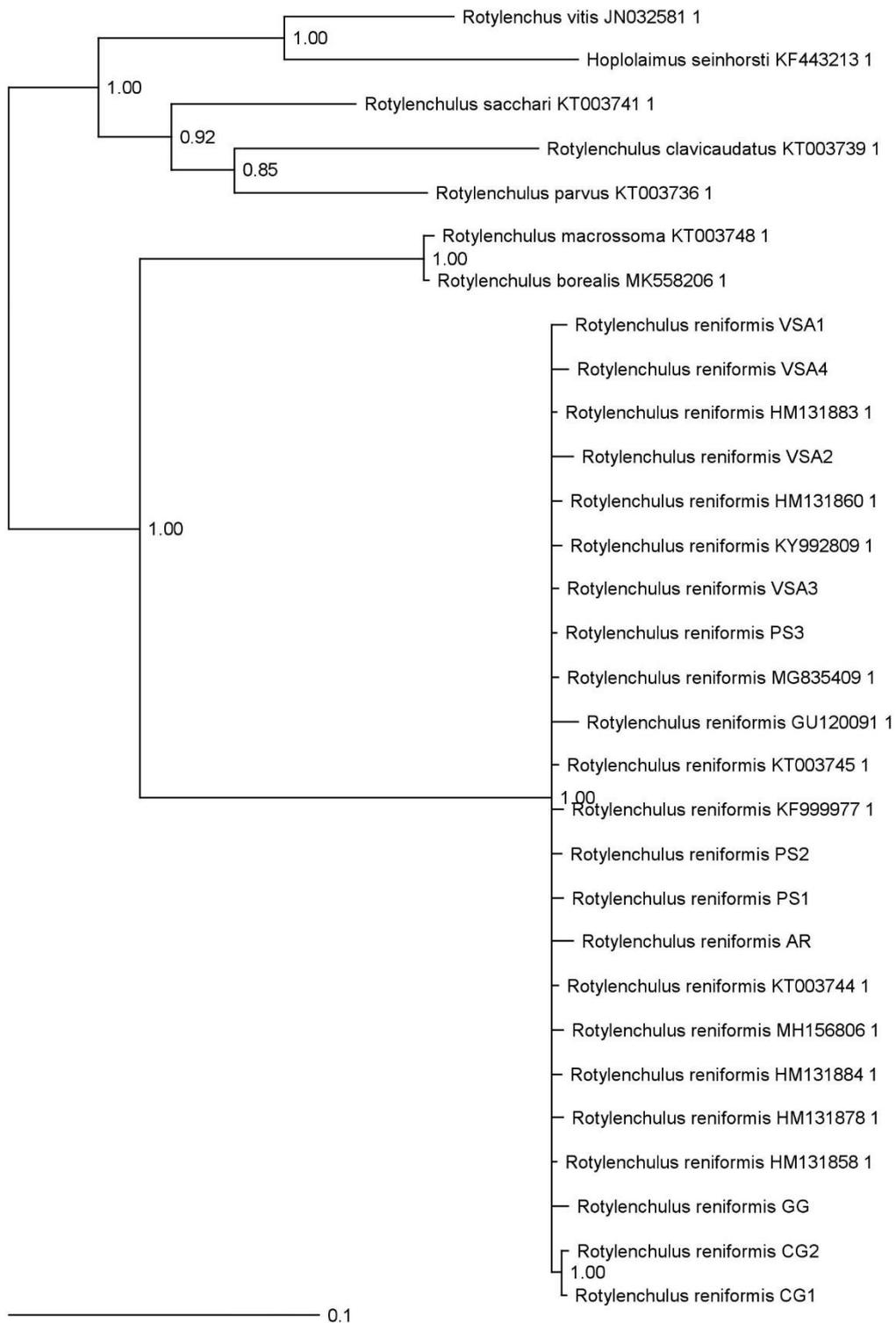


Figura 2. Relação filogenética de população de *Rotylenchulus reniformis* oriunda de cultivo de coentro no Estado de Pernambuco, Brasil. Árvore filogenética por análise Bayesiana gerada a partir do conjunto de dados da região D2/D3 do gene 28S DNAr com o modelo HKY+G.

Tabela 1. Medidas em μm e variáveis derivadas de fêmeas de populações de *Rotylenchulus reniformis* coletadas de solos com plantio de coentro (*Coriandrum sativum*), em Municípios do estado de Pernambuco. Estatística incluindo média (n=20), desvio padrão e amplitude. Medidas em μm .

Populações	Comprimento	Maior largura	Comprimento	DGO	Comprimento	Comprimento	h ^w	a ^x	b ^y	c ^z	V% ^k
<i>R. reniformis</i>	do corpo	do corpo	do estilete		do esôfago	da cauda					
AR	384,3,0±29,5	20,5±2,2	19,0±1,8	12,7±1,6	119,0±6,4	25,6±2,2	9,3±2,1	18,8±1,4	3,2±0,2	15,0±1,4	69,3±2,3
	340,0-460,0	20,0-30,0	17,5-22,5	10,0-15,0	110,0-130,0	20,0-30,0	7,5-12,5	15,3-21,5	2,8-3,5	13,0-18,4	64,2-73,5
CG1	377,5±16,1	20,2±1,1	19,3±1,1	14,5±1,5	125,7±6,7	19,8±5,8	8,6±1,9	18,6±0,9	3,0±0,1	21,0±7,4	73,6±7,1
	340,0-400,0	20,0-25,0	17,5-20,0	12,5-17,5	120,0-140,0	10,0-25,0	7,5-12,5	16,0-20,0	2,6-3,2	14,4-38,0	62,1-83,7
CG2	399,7±18,3	20,5±2,2	19,1±1,2	15,7±2,0	113,5±9,8	24,6±1,6	10,2±1,8	19,6±1,5	3,0±0,2	16,3±1,5	71,5±2,4
	350,0-430,0	20,0-30,0	17,5-20,0	12,5-17,5	120,0-150,0	22,5-27,5	7,5-12,5	14,3-21,5	2,5-3,5	14,0-21,5	64,2-75,0
GG	380,0±19,7	20,7±2,4	18,5±1,2	14,5±1,7	126,5±7,4	24,6±0,9	7,6±0,9	18,5±2,0	3,0±0,2	15,4±0,9	72,9±2,3
	350,0-420,0	20,0-25,0	17,5-20,0	12,5-17,5	110,0-140,0	22,5-25,0	5,0-10,0	12,0-21,0	2,6-3,5	14,0-16,8	67,5-75,6
VSA1	395,7±34,3	21,0±3,0	19,3±1,6	14,6±1,4	124,5±8,2	23,5±2,2	7,6±1,5	19,1±2,4	3,1±0,3	16,9±1,6	72,8±2,3
	340,0-470,0	20,0-30,0	15,0-22,5	12,5-17,5	120,0-140,0	17,5-25,0	5,0-10,0	12,6-23,5	2,6-3,6	13,6-20,0	68,2-78,3
VSA2	367,5±27,8	19,2±1,8	18,7±1,5	14,1±1,4	122,5±11,6	24,6±0,9	8,2±1,1	19,1±2,8	3,0±0,2	14,9±0,9	72,6±2,2
	310,0-420,0	15,0-20,0	17,5-22,5	12,5-17,5	100,0-140,0	22,5-25,0	7,5-10,0	15,5-26,6	2,5-3,5	13,6-16,8	69,2-78,3
VSA3	420,1±26,3	22,5±4,4	21,8±1,6	14,7±1,8	131,7±12,2	22,5±2,2	9,3±2,5	19,1±2,4	3,2±0,3	18,7±1,1	71,6±1,9
	390,0-460,0	20,0-30,0	20,0-25,0	12,0-17,0	110,0-150,0	20,-25,0	5,0-10,0	15,0-22,5	2,6-4,1	16,0-21,0	68,2-74,4
VSA4	361,0±25,3	19,2±1,8	18,7±1,5	13,8±1,2	125,0±13,1	23,5±1,8	7,6±1,5	18,9±2,5	2,9±0,2	15,4±1,4	72,5±2,4
	310,0-390,0	15,0-20,0	17,5-22,5	12,5-15,0	110,0-150,0	20,0-25,0	5,0-10,0	16,0-26,0	2,5-3,5	13,7-19,5	66,7-75,6
PS1	410,5±39,7,0	20,5±2,2	20,0±1,7	13,1±1,7	119,8±11,8	22,3±3,5	9,2±1,8	20,1±2,1	3,4±0,4	18,9±4,5	71,5±3,6
	350,0-480,0	20,0-30,0	17,5-25,0	10,0-17,5	100,0-140,0	12,5-25,0	7,5-12,5	17,5-24,0	2,5-4,4	15,8-28,6	62,8-77,9
PS2	455,7±40,0	22,0±4,1	20,3±1,4	13,3±1,6	124,7±9,9	21,2±2,6	9,7±2,5	21,2±3,4	3,6±0,3	21,6±2,6	70,4±2,2
	380,0-540,0	20,0-30,0	17,5-25,0	12,5-17,5	110,0-140,0	17,0-25,0	7,5-12,5	15,0-27,5	3,2-4,3	15,2-28,0	67,3-75,0
PS3	418,5±38,4	21,0±3,0	19,5±1,0	13,1±1,7	124,0±8,7	22,6±2,8	9,7±3,2	20,5±1,8	3,3±0,3	18,8±3,4	70,9±1,8
	380,0±500,0	20,0-30,0	17,5-20,0	10,0-17,5	110,0-140,0	17,5-25,0	7,5-12,5	17,5-23,5	2,7-4,0	14,0-23,5	68,5-74,4

h^w = comprimento da porção hialina da cauda;

a^x = comprimento do corpo dividido pela maior largura;

b^y = comprimento do corpo dividido pelo comprimento do esôfago;

c^z = Comprimento do corpo dividido pelo comprimento da cauda;

V^k = comprimento da região cefálica à vulva em relação ao comprimento do corpo expresso em porcentagem;

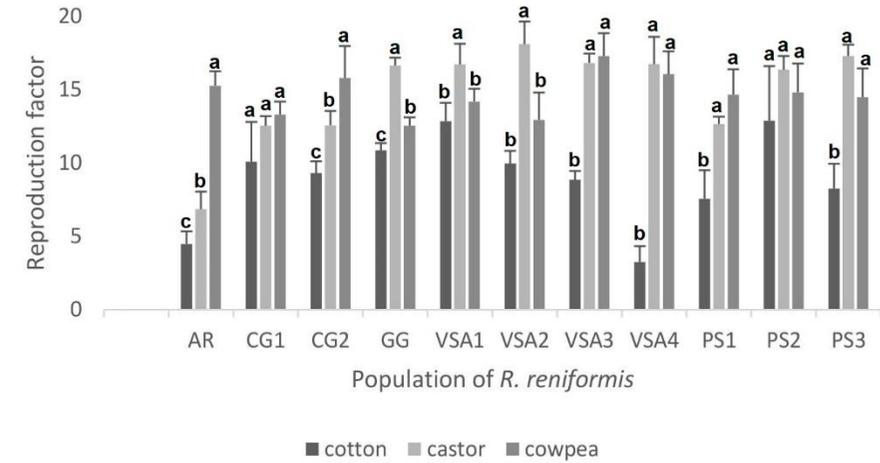
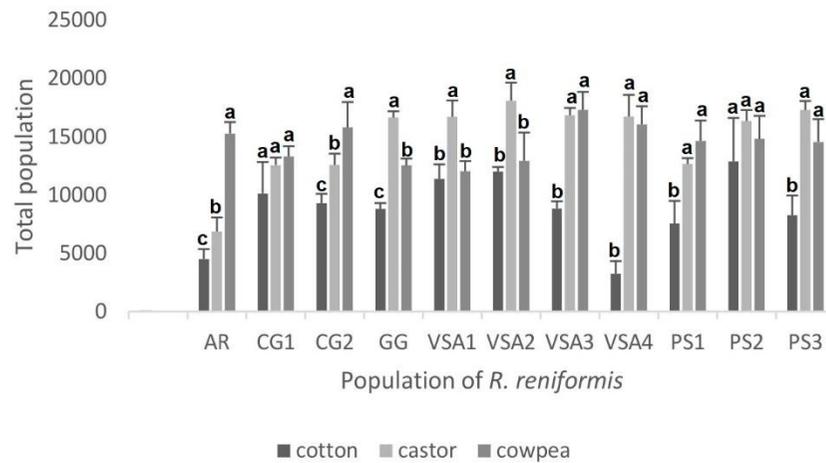
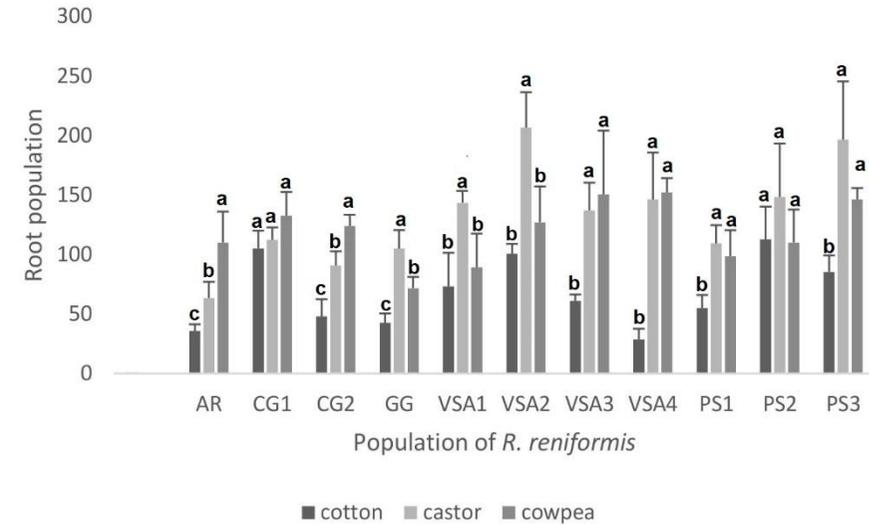
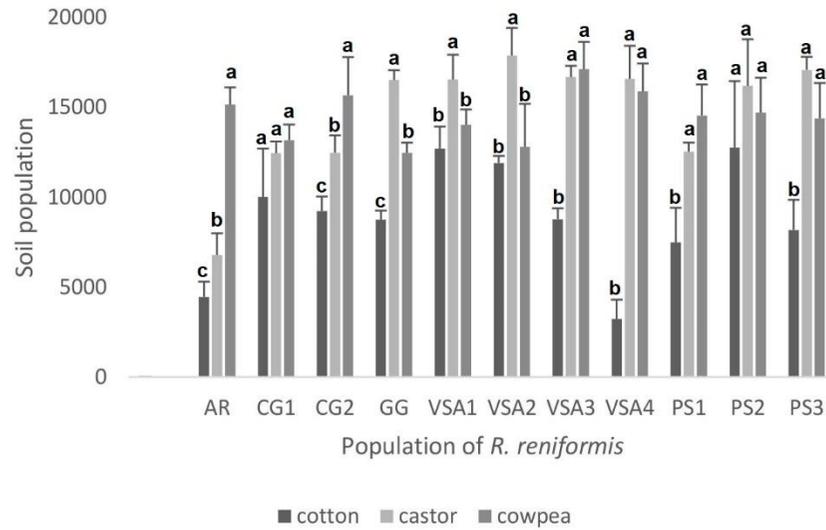


Figura 3. Reprodução de populações *Rotylenchulus reniformis* em plantas de algodão, feijão-caupi e mamona. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Cada valor é uma média de quatro repetições.

4. Discussão

A confirmação da etiologia do nanismo do coentro, agora fundamentada no estudo de 11 populações de campo, com dados obtidos nas principais áreas produtoras de coentro do estado de Pernambuco, traz novas possibilidades de planejamentos para programas de Manejo Integrado de Doenças (MID) dirigidos ao patossistema coentro/nematoide reniforme, originalmente feita por Moura et al. (1997), fundamentando-se em estudos morfológicos de espécimes de uma população local. Na presente pesquisa, embora todas as 11 populações tenham sido identificadas como *R. reniformis*, mais de 50 % apresentaram diferenças quanto ao comprimento e largura do corpo, 70 % em relação ao comprimento do estilete e todas as populações apresentaram espécimes com valores ligeiramente maiores ou menores do que o descrito por Dasgupta (1968) para os demais caracteres morfológicos, confirmando a instabilidade morfométrica dentro da espécie. O comprimento do estilete e o valor "V" são as duas características taxonômicas consideradas mais importantes na identificação de *Rotylenchulus* spp. No entanto, os valores médios das populações estudadas se enquadraram nos parâmetros morfométricos mais usados para *R. reniformis*.

De acordo com Soares (2004) as populações brasileiras desta espécie apresentam variáveis morfométricas com valores maiores do que em qualquer outra região do mundo. Essas variações podem ser consideradas normais da espécie ou ocorrer devido ao isolamento geográfico, influência da temperatura do solo na biologia do nematoide ou interação com plantas hospedeiras (Doucet et al. 1996; 2001).

A técnica do código de barras com base na região D2/D3, do gene 28S (rDNA), tem facilitado as identificações taxonômicas e pesquisas de biodiversidade, além de proporcionar um diagnóstico rápido e preciso da espécie em estudo (Kiewnick et al., 2016). Van Den Berg et al. (2016) descreveram uma nova espécie, isolada do solo e raízes de cana-de-açúcar, a qual foi denominada *R. macrosomoides* a partir das sequências do fragmento amplificado da região D2/D3 da expansão 28S do DNAr. Esses autores também desenvolveram *primers* específicos com base nas mesmas sequências para diferenciar *R. reniformis* das demais espécies do gênero. Lopez-Nicora et al. (2018) também utilizaram as

sequências da região D2/D3 do gene 28S do DNAr para identificação e primeiro assinalamento de *R. reniformis* parasitando soja no Paraguai.

Neste estudo, essa técnica mostrou-se como ferramenta rápida e eficaz para a identificação das populações de *R. reniformis*, estando todas intimamente relacionadas com outras populações desta espécie presentes no GenBank além de mostrar o relacionamento filogenético muito próximo entre *R. reniformis*, *R. macrossoma* e *R. borealis*, porém a relação entre as outras espécies de *Rotylenchulus* permanece não determinada como já relatado por Van Den Berg et al., (2016) e Palomares-Rius et al., (2017).

Há relatos da existência de diferentes raças parasitárias para *R. reniformis* com base na capacidade reprodutiva em algumas plantas hospedeiras (Dasgupta & Seshadri, 1971; Vadhera & Shukla, 1999; McGawley et al., 2010; Singh & Azam, 2012). No entanto, a reprodução e o nível de patogenicidade na cultura podem ser influenciados pela proporção de machos na população e também devido às variações morfométricas da espécie, como por exemplo, presença de valores instáveis para a largura corporal e o comprimento esofágico (Nakasono, 2004; Ganguly & Ramesh, 1997). Embora todas as 11 populações tenham sido caracterizadas como pertencendo à raça A, comprovando ser esta a raça mais disseminada da espécie, elas apresentaram variações reprodutivas nas plantas de algodão, feijão-caupi e mamona. O fato da cultura do algodoeiro apresentar-se menos suscetível ao nematoide quando comparada às outras culturas também foi relatado por Dasgupta & Seshadri (1971) e Adam et al. (2018). Dasgupta & Seshadri (1971) observaram um aumento na porcentagem de machos em plantas de algodão, fato também observado nesse estudo. Esse aumento pode ocorrer devido a vários fatores como temperatura e estresse ambiental, gerando diminuição na quantidade de nutrientes disponíveis para o desenvolvimento do nematoide, o que faz com que esse desequilíbrio na proporção sexual entre os espécimes torne a cultura menos parasitada (Triantaphyllou, 1973).

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE - Proc.IBPG-0737-2.12/15) e pelo Conselho

Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Proc. 307129/2015-2).

Referências

Adam, M., Diab, S. F., Farahat, A., Alsayed, A. A. & Heuer, H. (2019). Molecular identification, race detection, and life cycle of *Rotylenchulus reniformis* in Egypt. *Nematropica* 48, 59-67.

Asmus, G. L., Inomoto, M. M., Silva, R. A., & Galbieri, R. (2015). Manejo de nematoides. In: Freire, E. C. (Ed.). *Algodão no cerrado do Brasil*. Brasília, DF, Positiva, pp.445-483.

Consoli, E. A., Oliveira, S. A., Harakava, R. & Oliveira, C. M. G. (2012). Desenvolvimento de diagnóstico molecular para a identificação de *Pratylenchus jaehni*. *Nematologia Brasileira* 36, 62-70.

Coolen, W.A. & D'Herde, C.J. (1972). A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. *A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue*.

Dasgupta, D. R.; Raski, D. J. & SHER, S. A. (1968). A revision of the genus *Rotylenchulus* Linford & Oliveira, 1949. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 35, 169-92.

Dasgupta, D. R. & Seshadri, A. R. (1971). Races of the reniform nematode, *Rotylenchulus reniformis* Lindford and Oliveira, 1940. *Indian Journal of Nematology* 1, 21-24.

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

Ganguly, S. & Ramesh, V. (1997). Crop-induced morphobiometrical variability in reniform nematode, *Rotylenchulus reniformis*. II. Young females, males and juveniles. *Annals of Plant Protection Sciences* 5, 75-89.

Holterman, M., van der Wurff, A., van den Elsen, S., van Megen, H., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J. & Helder, J. (2006). Phylum-wide analysis of SSU rDNA

reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. *Molecular biology and evolution* 23, 1792-1800.

Hussey, R. S. & Barker, K. R. (1973). A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57, 1025-1028.

Jenkins, W. R. (1964). A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 48, 692.

Kiewnick, S., Bühlmann, A. & Frey, J.-E. (2016). DNA-barcoding of invertebrate plant pests. In: Boonham, N., Tomlinson, J. & Mumford, R. (Eds.). *Molecular methods in plant disease diagnostics*, Wallingford, UK, CAB International, pp. 98.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. & Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.

Lopes, C. M. L., Pimentel, R. R. & Cares, J. E. (2016). Gênero *Rotylenchulus*. In: Oliveira, C.M.G., Santos, M.A., Castro, L.H.S. (Ed.). *Diagnose de fitonematoides*. Campinas, SP, Millennium Editora, pp.163-180.

Lopez-Nicora, H. D., Pedrozo, L. M., Grabowski Ocampos, C., Orrego Fuente, A. L., Hahn Villalba, E., Ralston, T. I. & Niblack, T. L. (2018). First Report of the Reniform Nematode (*Rotylenchulus reniformis*) from Soybean in Paraguay. *Plant disease* 102, 2043-2043.

Subbotin, S., Maafi, Z. T. & Moens, M. (2003). Molecular identification of cyst-forming nematodes (Heteroderidae) from Iran and a phylogeny based on ITS-rDNA sequences. *Nematology* 5, 99-111.

McGawley, E. C., Pontif, M. J. & Overstreet, C. (2010). Variation in reproduction and pathogenicity of geographic isolates of *Rotylenchulus reniformis* on cotton. *Nematropica* 40, 275-288.

Milne, I., Wright, F., Rowe, G., Marshall, D. F., Husmeier, D. & McGuire, G. (2004). TOPALi: software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. *Bioinformatics* 20, 1806-1807.

Moura, R. M., Pedrosa, E. M. R., Maranhão, E. A. A., Reis, O. V. (1997). O nanismo

do coentro, uma nova doença causada pelo nematoide *Rotylenchulus reniformis*. *Nematologia Brasileira* 21, 13-22.

Nakasono, K. (2004). Studies on morphological and physio-ecological variations of the reniform nematode, *Rotylenchulus reniformis* Linford and Oliveira, 1940 with an emphasis on differential geographical distribution of amphimictic and parthenogenetic populations in Japan. *Journal of nematology* 36, 356.

Oliveira, C. M. G. (2010). Aplicação conjunta de técnicas moleculares e taxonomia clássica na resolução de problemas taxonômicas de nematoides. *Tropical Plant Pathology* 35, 58.

Oliveira, C. M. G. D., Monteiro, A. R. & Blok, V. C. (2011). Morphological and molecular diagnostics for plant-parasitic nematodes: working together to get the identification done. *Tropical Plant Pathology* 36, 65-73.

Palomares-Rius, J. E., Cantalapiedra-Navarrete, C., Archidona-Yuste, A., Tzortzakakis, E. A., Birmpilis, I. G., Vovlas, N., Subbotin, S. A. & Castillo, P. (2018). Prevalence and molecular diversity of reniform nematodes of the genus *Rotylenchulus* (Nematoda: Rotylenchulinae) in the Mediterranean Basin. *European journal of plant pathology* 150, 439-455.

Rambaut, A. (2016) FigTree v1.4.3: Tree figure drawing tool. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> [Acessado em 4 Novembro 2019].

Rao, G. M. V. & Ganguly, S. (1996). Host preference of six geographical isolates of reniform nematode, *Rotylenchulus reniformis*. *Indian Journal of Nematology* 26, 19-22.

Roberts, D., Oliveira, C. M. G., Neilson, R. & Blok, (2016). V. Diagnose molecular de nematoides parasitos de plantas. In: Oliveira, C.M.G., Santos, M.A. & Castro, L.H.S. (Ed.). *Diagnose de fitonematoides*. Campinas, Millennium Editora, pp.281-324.

Robinson, A. F., Inserra, R. N., Caswell-Chen, E. P., Vovlas, N. & Troccoli, A. (1997). *Rotylenchulus* species: Identification, distribution, host ranges, and crop plant resistance. *Nematropica* 27, 127-180.

Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.

Sambrook, J., Edward, F. F. & Tom, M. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

Singh, N. & Azam, M. F. (2012). Studies on the pathogenicity of three host races of *Rotylenchulus reniformis* on castor. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 45, 522- 525.

Soares, P. L., Santos, J. M. D. & Ferraudo, A. S. (2004). Estudo morfométrico comparativo de 58 populações brasileiras de *Rotylenchulus reniformis* (Nemata: Rotylenchulinae). *Fitopatologia Brasileira* 29, 419-424.

Triantaphyllou, A. C. (1973). Environmental sex differentiation of nematodes in relation to pest management. *The Annual Review of Phytopathology* 11, 441-462.

Vadhera, I., Bhatt, J. & Shukla, B. N. (1999) Prevalence of a new race of *Rotylenchulus reniformis* in Madhya Pradesh. *Journal of Mycological Plant Pathology* 29, 32-134.

Van Den Berg, E., Palomares-Rius, J. E., Vovlas, N., Tiedt, L. R., Castillo, P. & Subbotin, S. A. (2016). Morphological and molecular characterisation of one new and several known species of the reniform nematode, *Rotylenchulus* Linford & Oliveira, 1940 (Hoplolaimidae: Rotylenchulinae), and a phylogeny of the genus. *Nematology* 18, 67-107.

5 ARTIGO III - artigo aceito na revista *Nematropica*

Potencialidade de filtrados fúngicos no biocontrole do nematoide reniforme (*Rotylenchulus reniformis*) em plantas de coentro e de feijão-caupi

Resumo

Neste estudo avaliaram-se os efeitos de filtrados de culturas fúngicas sobre o fitonematoide *Rotylenchulus reniformis* por meio de testes *in vitro* e em plantas de feijão-caupi e de coentro, em casa de vegetação. Foram utilizados 17 isolados fúngicos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Thielavia* e *Trichoderma*, obtidos a partir de rizosfera de coentro. Testes de biocontrole de *R. reniformis in vitro* foram realizados em placas de Elisa; a mortalidade foi avaliada após 24h e 48 h de exposição aos filtrados e os testes de eclosão 12 dias após a exposição. Para os testes *in vivo*, mudas de feijão-caupi e de coentro foram inoculadas com 1.000 juvenis/ovos por vaso e o efeito dos filtrados sobre a reprodução de *R. reniformis* foi avaliado após 45 dias. Os isolados identificados como *Fusarium inflexum*, *Thielavia terricola*, *Trichoderma longibrachiatum*, *T. brevicompactum*, *T. harzianum*, *Penicillium citrinum* e duas potenciais novas espécies desse gênero mostraram-se promissores na ação nematicida e na redução da eclosão, promovendo a mortalidade de 58 a 100% dos nematoides e permitiram que apenas 4,6 a 19,5% dos juvenis eclodissem nos testes *in vitro*. Em teste *in vivo* com feijão-caupi e coentro, filtrados desses isolados reduziram significativamente o número de massas de ovos (>83,6 % e >95 %) e o fator de reprodução (>95 % e >95 %) de *R. reniformis*, respectivamente, apresentando alto potencial e eficiência no biocontrole do nematoide reniforme.

Palavras-chave: Controle alternativo; controle biológico; fitoparasitas; metabólicos tóxicos

1. Introdução

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e o coentro (*Coriandrum sativum* L.) são amplamente cultivados no Brasil, especialmente no Nordeste, onde são muito apreciados na culinária regional. Apesar da grande importância comercial, os cultivos dessas hortaliças enfrentam sérios problemas fitossanitários de difícil

controle, dentre os quais o fitonematoide *Rotylenchulus reniformis* Linford e Oliveira. Entre as espécies do gênero, esta é a mais importante do ponto de vista econômico; quando comparado a outros fitonematoides, é o sétimo mais relevante (Jones *et al.*, 2013). *Rotylenchulus reniformis* é polífago, com mais de 300 espécies de plantas hospedeiras, e ocasiona expressiva redução na produtividade dessas culturas, resultando em prejuízos econômicos que podem atingir a ordem de milhões de dólares (Lawrence *et al.*, 2007; Robinson *et al.*, 1997). No Nordeste, as culturas do coentro, melão e graviola apresentam as mais significativas perdas com o parasitismo do nematoide reniforme (Moura *et al.*, 1997, 2002, 2005).

Entre os métodos de controle utilizados estão o uso de nematicidas, rotação de culturas e cultivares resistentes. Os nematicidas químicos, embora ainda sejam amplamente utilizados, apresentam alto custo e acarretam inúmeros problemas à saúde pública, além de fortes impactos ambientais (Lira *et al.*, 2018). É importante ressaltar que para culturas de ciclo curto (menos de três meses) o uso dos nematicidas é proibido em qualquer circunstância de campo, pois os efeitos residuais sistêmicos persistem por mais de 90 dias na planta. O coentro e o meloeiro têm ciclo comercial (permanência no campo) de 30 e 60 dias, respectivamente. Assim, o controle biológico de doenças de plantas é um método alternativo e promissor, de grande potencial prático, econômico, que permite a redução populacional de diversas pragas agrícolas, além de apresentar uma série de vantagens em relação ao método químico, pois não deixa resíduos tóxicos em alimentos, é de fácil aplicação, favorece a conservação do ambiente e não induz o surgimento de espécies resistentes (Nunes *et al.*, 2010). No solo há aproximadamente 200 inimigos naturais dos fitonematoides (Pimentel *et al.*, 2009) e os fungos têm sido considerados os de maior potencial biocontrolador. Entre os principais mecanismos para o biocontrole de fitonematoides incluem-se a competição por espaço e nutrientes, indução de resistência na planta, predação, parasitismo e antibiose (Stirling, 2014).

Estudos têm destacado a presença de metabólitos bioativos em filtrados de culturas fúngicas com ação nematostática e nematicida, reduzindo significativamente a população do nematoide alvo. Li e Zhang (2014) reuniram mais de 200 compostos extraídos de fungos que apresentam atividades tóxicas aos nematoides. No entanto, o conhecimento de metabólitos com propriedades nematicidas para *R. reniformis* é limitado, necessitando de mais estudos.

Para testar a hipótese de que fungos isolados da rizosfera de coentro têm potencial para uso no biocontrole do nematoide reniforme, objetivou-se nesse estudo determinar o efeito de filtrados desses fungos na mortalidade e eclosão de *R. reniformis*. Para isso foram realizados testes *in vitro* e em casa de vegetação, utilizando plantas de feijão-caupi e de coentro, reconhecida como hospedeiras do parasita.

2. Material e Métodos

2.1 Obtenção de isolados de *R. reniformis*

Amostras de solo e raízes de coentro da variedade Verdão foram coletadas em áreas comerciais de produção de coentro no Distrito de Natuba, no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil, para obtenção das populações de nematoides. As amostras foram coletadas em pontos aleatórios, acondicionadas em sacos plásticos com etiqueta de identificação e processadas pelo método de Jenkins (1964) e as raízes foram processadas em liquidificador e centrifugadas (Coolen e D'Herde, 1972). As populações de nematoides foram identificadas por meio da chave de classificação de Jatala (1991) e mantidas em casa de vegetação do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA, Recife, PE, em plantas de coentro, fornecendo água e adubação necessária.

2.2 Isolamento e obtenção de culturas puras dos fungos

As amostras de solo coletadas para obtenção dos nematoides também foram utilizadas para isolamento de fungos. Alíquotas dessas amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, com etiqueta de identificação e armazenadas a 5 °C, até o processamento.

Para esse objetivo, as amostras de solo foram processadas seguindo as recomendações de Clark (1965). Resumidamente, 25g de cada amostra de solo foram transferidas para frascos de Erlenmeyer contendo 225 mL de água destilada esterilizada, onde foram homogeneizadas manualmente por cinco minutos. Em seguida, procedeu-se com diluições em série até o fator 10^{-4} , das quais alíquotas de 1mL foram transferidas para placas de Petri contendo o meio batata-dextrose-ágar (BDA), acrescido de cloranfenicol (10 mg L^{-1}). Esse procedimento foi realizado em câmara asséptica. As placas permaneceram em BOD (Biochemical Oxygen

Demand), com temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o crescimento das colônias, observado por sete dias.

Para a purificação das culturas fúngicas, fragmentos das colônias foram transferidos para meio BDA + Cloranfenicol (10 mg L^{-1}) contido em placas de Petri, e o crescimento acompanhado por sete dias. Após a purificação, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio ($18 \times 180\text{ mm}$), contendo BDA, para manutenção e identificação das espécies.

2.3 Identificação dos fungos

Os isolados foram identificados com auxílio de microscópios estereoscópico e óptico, observando-se as características macroscópicas (coloração, aspecto e diâmetro das colônias) e microscópicas (microestruturas), com base na literatura especializada. Para análise molecular, o DNA genômico de culturas crescidas por cinco dias também foi extraído utilizando o *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, reações de PCR foram conduzidas para amplificar fragmentos de sequências como dos espaços internos transcritos (ITS), utilizando os *primers* ITS1 and ITS4 (White *et al.*, 1990), fator de alongação 1- α (*EF-1 α*) usando os *primers* EF1 α e EF2 (O'Donnell *et al.*, 1998), e β -tubulina (BenA) usando os primers Bt2a e Bt2b. As recomendações para as reações de PCR estão descritas em Samson *et al.* (2010). Os produtos amplificados foram purificados com PureLink – PCR Purification Kit – Invitrogen e sequenciados na Plataforma Multiusuária de Sequenciamento e Expressão Gênica – UFPE. As sequências obtidas foram comparadas utilizando a ferramenta BLASTn com outras contidas em banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para a identificação de similaridade.

2.4 Obtenção de filtrados fúngicos e testes de biocontrole

Dezessete isolados fúngicos foram selecionados e inoculados em placa de Petri contendo o meio BDA. Após sete dias de incubação a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, três discos de 5 mm de diâmetro de cada cultura foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 250 ml, contendo 100 ml de meio líquido Czapek- Dox, previamente esterilizado a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min. Após 15 dias a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ em agitação orbital a 160 rpm, o conteúdo dos frascos de Erlenmeyer foi filtrado duas vezes em papel Whatman n° 1 e, logo após, filtrado em membrana de acetato de celulose com $0,22\text{ }\mu\text{m}$ de porosidade,

para eliminação de quaisquer resíduos e conídios dos fungos, obtendo-se a fase líquida, denominada filtrado fúngico, que foi utilizado para o ensaio *in vitro*.

2.5 Teste *in vitro* com *R. reniformis* em placa de Elisa

Massa de ovos foram extraídas das raízes de coentro, utilizando-se solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % conforme metodologia de Hussey e Baker (1973), a partir de uma população pura do nematoide reniforme. Os ovos foram colocados em câmara de eclosão a 27 °C. Os juvenis eclodidos foram coletados até obtenção de número suficiente para montagem do experimento.

Para o teste de mortalidade, um bioensaio foi instalado em placas de Elisa com 96 células, seguindo-se a metodologia adaptada por Costa *et al.* (2001), sendo adicionados em cada célula 100 µL do filtrado de cada fungo e 20 µL da suspensão contendo 50 juvenis de *R. reniformis*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, e cada tratamento foi constituído por um filtrado fúngico; as testemunhas foram meio Czapek-Dox e água destilada, sendo quatro repetições por tratamento. As placas foram vedadas com filme plástico e colocadas em câmara de crescimento tipo BOD a 27 °C, em ausência de luz. O número de nematoides imobilizados foi contado com auxílio de um microscópio estereoscópico após 24 e 48h da instalação do ensaio, utilizando hidróxido de sódio (NaOH) 1 M a 1 % (Chen e Dickson, 2000). Foram considerados mortos os nematoides que mantiveram os corpos paralisados após a adição de NaOH.

Para teste de eclosão, foi utilizada a mesma metodologia descrita para o teste de mortalidade de juvenis, colocando-se 50 ovos por cavidade da placa de Elisa. A avaliação foi realizada no 12º dia da aplicação dos filtrados. Os dados foram transformados para $\sqrt{x/100}$ e submetidos à análise de variância (ANOVA) com auxílio do software SASM - Agri (Canteri *et al.*, 2001). Após a análise, as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

2.6 Teste *in vivo* em plantas de feijão-caupi e de coentro

Os filtrados dos fungos que apresentaram os melhores resultados no controle de *R. reniformis in vitro* (mortalidade de juvenis acima de 60 % e taxa de eclosão menor que 50 %) foram testados em casa de vegetação em culturas de feijão-caupi variedade BR-IPA 206 e coentro variedade Verdão, em casa de vegetação. As plantas foram cultivadas em sacos plásticos com 500 g de solo autoclavado,

utilizando-se apenas uma planta por recipiente. Quinze dias após o plantio, as plantas foram inoculadas com uma suspensão contendo 1.000 juvenis/ovos, colocando-se 10 mL na base de cada planta. Três dias após as inoculações, 50 mL de cada filtrado fúngico foram adicionados em torno da planta (Ali, 1990). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 20 tratamentos que consistiram em oito filtrados, duas plantas (coentro e feijão-caupi) e duas testemunhas (inoculada com *R. reniformis* e não inoculada) para cada tipo de planta. Para cada tratamento, foram utilizadas quatro repetições.

Após 45 dias das inoculações, as plantas foram cuidadosamente removidas do substrato e os solos e raízes processados. Para cada planta foram avaliados comprimento da parte aérea e da raiz, biomassa seca da parte aérea e fresca da raiz, número de massa de ovos e fator de reprodução. Logo após, foi realizada a contagem dos nematoides presentes nas suspensões, sendo obtidas as populações totais no solo (PS) e nas raízes (PR) e determinada a população final (Pf), calculando-se o fator de reprodução (FR) por meio da relação $FR = Pf/Pi$. Os resultados foram transformados em $\sqrt{x+1}$ e submetidos à análise de variância, seguido pelo teste de Tukey a 5 % de significância.

3. Resultados

3.1 Identificação dos fungos

De acordo com as análises morfológicas e moleculares os 17 isolados em estudo foram identificados como: *Aspergillus fumigatus* Fresen, *A. parasiticus* Speare, *A. terreus* Thom, *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn, *Fusarium inflexum* Schneid, *F. solani* (Mart.) Sacc., *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson, *Penicillium* A25, *Penicillium* TA14, *Penicillium* 20.2, *Penicillium* 19.3, *Penicillium citrinum* Thom, *Talaromyces* TM 4, *Thielavia terricola* (J.C. Gilman & E.V. Abbott) C.W. Emmons, *Trichoderma brevicompactum* G.F. Kraus, C.P. Kubicek & W. Gams, *Trichoderma harzianum* Rifai e *T. longibrachiatum* Rifai. Os isolados de *Penicillium* A25, *Penicillium* TA14, *Penicillium* 20.2, *Penicillium* 19.3 e *Talaromyces* TM4 provavelmente constituem novas espécies e serão descritas posteriormente.

3.2 Efeito dos filtrados fúngicos na mortalidade e eclosão de juvenis de *R. reniformis* em testes in vitro.

Os filtrados fúngicos dos 17 isolados apresentaram atividade nematicida em vários níveis sobre os juvenis de *R. reniformis*, sendo os resultados proporcionais ao tempo de exposição aos filtrados (Tabela 1). *Penicillium* A25, *Penicillium* TA14, *Penicillium citrinum*, *Thielavia terricola*, *Trichoderma harzianum* e *Fusarium inflexum* induziram 100% de mortalidade dos juvenis após 48h de imersão. Os isolados de *Trichoderma longibrachiatum* e *T. brevicompactum* ocasionaram a morte de 97,0 e 88,5% de juvenis, respectivamente. O filtrado produzido por *Aspergillus fumigatus* também se mostrou eficiente, causando a morte de 55,2% dos nematoides.

Os metabólitos produzidos por *Penicillium* 20.2, *Penicillium* 19.3, *Talaromyces* TM4, *Curvularia lunata*, *Fusarium solani*, *Aspergillus terreus* e *A. parasiticus* apresentaram baixo efeito tóxico a *R. reniformis*, promovendo a mortalidade apenas de 9,5 a 48,5 % dos juvenis, mas ainda assim diferiram estatisticamente das testemunhas. O filtrado de *P. lilacinus* não apresentou atividade nematicida a *R. reniformis*. Não houve qualquer relação entre o pH dos filtrados fúngicos e a morte dos nematoides (Tabela 1).

Todos os filtrados que apresentaram efeito nematicida significativo sobre o nematoide reniforme também provocaram redução percentual significativa da eclosão. *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus*, *C. lunata*, *Penicillium* A25, *Penicillium* TA14, *P. citrinum*, *Penicillium* 19.3, *T. terricola*, *T. brevicompactum*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *F. inflexum* e *Paecilomyces lilacinus* permitiram a eclosão de 4,6-41,0 % dos juvenis. Esses índices de juvenis não eclodidos foram mais significativos do que os registrados para os tratamentos com filtrados de *A. parasiticus*, *F. solani*, *Penicillium* 20.2 e *Talaromyces* TM4, (53,6- 69,7 %) cujos filtrados apresentaram baixo efeito ovicida a *R. reniformis*.

Tabela 1. Efeito de filtrados de culturas fúngicas na mortalidade e eclosão de juvenis de *Rotylenchulus reniformis*.

Filtrados fúngicos	pH	Mortalidade de juvenis (%)		Eclosão (%)
		24 h	48 h	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5,2	20,6 def	55,2 b	29,0 abcde
<i>Aspergillus parasiticus</i>	7,9	4,3 fg	9,5 e	62,1 fgh
<i>Aspergillus terreus</i>	9,4	22,8 de	34,9 cd	41,0 def
<i>Curvularia lunata</i>	8,7	6,4 efg	17,4 de	32,4 bcde
<i>Fusarium solani</i>	6,4	8,5 efg	18,2 de	67,9 gh

<i>Penicillium</i> A25	7,2	100,0 a	100,0 a	11,0 abc
<i>Penicillium</i> TA14	5,4	100,0 a	100,0 a	14,2 abc
<i>Penicillium</i> 20.2	8,1	4,2 fg	12,0 e	53,6 efg
<i>Penicillium citrinum</i>	3,7	60,9 b	100,0 a	4,6 a
<i>Thielavia terricola</i>	8,0	100,0 a	100,0 a	4,9 a
<i>Trichoderma brevicompactum</i>	7,9	60,7 b	88,5 a	8,3 abc
<i>Trichoderma harzianum</i>	8,0	100,0 a	100,0 a	8,7 abc
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	8,6	58,9 b	97,0 a	6,6 ab
<i>Penicillium</i> 19.3	4,1	32,1 cd	42,1 bc	41,0 def
<i>Fusarium inflexum</i>	8,0	100,0 a	100,0 a	19,5 abcd
<i>Talaromyces</i> TM 4	5,6	27,5 cd	48,5 bc	69,7 gh
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	8,8	1,4 g	2,8 e	34,1 cde
Controle A (Meio Czapek)	7,2	0,5 g	2,8 e	86,6 hi
Controle B (Água destilada)	7,0	0,2 g	0,7 e	99,0 i

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Valores transformados em $\arcsen \sqrt{x/100}$.

3.3 Efeito dos filtrados fúngicos no biocontrole de *R. reniformis* em feijoeiro-caupi.

Todos os filtrados fúngicos promoveram significativa redução no número de massa de ovos (>83,6 %) e do Fator de Reprodução (FR) (>95 %) da população de *R. reniformis* nas plantas de feijão-caupi (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito de filtrados fúngicos na reprodução de *Rotylenchulus reniformis* em *Vigna unguiculata*, após 45 dias das inoculações .

Tratamentos	Massa de ovos (unid.)	Fator de reprodução (PF/PI)
Testemunha	45,70 a	18,62 a
<i>Penicillium</i> A25	5,25 b	0,23 b
<i>Penicillium</i> TA14	3,50 b	0,10 b
<i>Penicillium citrinum</i>	3,25 b	0,27 b
<i>Thielavia terricola</i>	2,50 b	0,26 b
<i>Trichoderma harzianum</i>	4,50 b	0,37 b
<i>Trichoderma brevicompactum</i>	1,75 b	0,38 b
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	1,00 b	0,28 b
<i>Fusarium inflexum</i>	7,50 b	0,93 b
CV (%)	39,29	20,54

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Valores transformados para $\sqrt{(x+1)}$. *PF/PI: população final/população inicial

Os filtrados das culturas fúngicas não afetaram negativamente o desenvolvimento das plantas. Os tratamentos com *Penicillium* A25, *P. citrinum*, *T. brevicompactum* e *F. inflexum* apresentaram maior biomassa seca da parte aérea, diferindo significativamente da testemunha inoculada apenas com o nematoide reniforme. O filtrado de *F. inflexum* se destacou por proporcionar um aumento de 20% no crescimento das plantas em relação ao controle. Entretanto, nos tratamentos com os filtrados de *Penicillium* TA14, *P. citrinum* e *T. longibrachiatum*, as plantas apresentaram menor desenvolvimento da parte aérea, quando comparadas aos demais tratamentos, sem diferir dos controles. Os demais tratamentos também não diferiram das testemunhas (Tabela 3).

A biomassa fresca das raízes e os sistemas radiculares não foram afetados pelos filtrados fúngicos (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito de filtrados de culturas fúngicas no desenvolvimento de *Vigna unguiculata*, infestado por *Rotylenchulus reniformis* após 45 dias das inoculações.

Tratamentos	Comprimento da planta (cm)	Biomassa seca da parte aérea (g)	Biomassa fresca da raiz (g)	Comprimento da raiz (cm)
Testemunha não inoculada	125,50 ab	1,52 a	3,00 a	12,50 a
Testemunha com nematoide	79,50 c	0,64 b	1,00 b	13,50 a
<i>Penicillium</i> A25	123,70 abc	1,45 a	2,00 ab	20,50 a
<i>Penicillium</i> TA14	86,70 bc	1,00 ab	1,25 b	19,00 a
<i>Penicillium citrinum</i>	94,50 bc	1,47 a	2,00 ab	13,50 a
<i>Thielavia terrícola</i>	116,50 abc	1,26 ab	1,50 ab	14,00 a
<i>Trichoderma harzianum</i>	115,50 abc	1,31 ab	1,75 ab	19,50 a
<i>Trichoderma brevicompactum</i>	114,00 abc	1,43 a	2,50 ab	17,20 a
<i>T. longibrachiatum</i>	83,20 bc	1,26 ab	2,25 ab	16,50 a
<i>Fusarium inflexum</i>	140,00 a	1,46 a	1,75 ab	15,00 a
CV (%)	13,53	8,94	6,80	12,80

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Valores transformados para $\sqrt{x+1}$.

3.4 Efeito dos filtrados fúngicos no biocontrole de *R. reniformis* em coentro.

Os filtrados fúngicos exerceram influência positiva de controle da reprodução do nematoide reniforme quando comparados às testemunhas, havendo redução do número de massa de ovos (>95 %) e do Fator de Reprodução (>95 %) (Tabela 4).

As plantas apresentaram crescimento significativo nos tratamentos com *P. citrinum* e *T. brevicompactum* (Tabela 5) diferindo das testemunhas com o nematoide. Para os demais tratamentos não houve diferença significativa. As plantas que receberam filtrados de *Penicillium citrinum* também apresentaram maior biomassa seca da parte aérea quando comparadas às dos demais tratamentos. As plantas com o filtrado de *T. longibrachiatum* apresentaram menor biomassa seca, resultado similar ao da testemunha inoculada com *R. reniformis*. Os resultados não diferiram significativamente dos demais tratamentos com filtrados e com as testemunhas. (Tabela 5).

A biomassa fresca das raízes e o comprimento do sistema radicular não foram afetados pela presença dos filtrados (Tabela 5).

Tabela 4. Efeito de filtrados fúngicos na reprodução de *Rotylenchulus reniformis* em plantas de *Coriandrum sativum*, após 45 dias das inoculações.

Tratamentos	Massa de ovos (unid.)	Fator de reprodução (PF/PI*)
Testemunha com <i>R. reniformis</i>	28,75 a	14,07 a
<i>Penicillium</i> A25	1,25 b	0,18 b
<i>Penicillium</i> TA14	0,25 b	0,23 b
<i>Penicillium citrinum</i>	0,50 b	0,38 b
<i>Thielavia terrícola</i>	0,75 b	0,35 b
<i>Trichoderma harzianum</i>	1,25 b	0,36 b
<i>Trichoderma brevicompactum</i>	1,00 b	0,27 b
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0,75 b	0,19 b
<i>Fusarium inflexum</i>	0,50 b	0,70 b
CV (%)	26,56	15,96

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Valores transformados para $\sqrt{(x+1)}$. *PF/PI: população final/população inicial

Tabela 5. Efeito de filtrados de culturas fúngicas no desenvolvimento de plantas de *Coriandrum sativum*, infestada por *Rotylenchulus reniformis*, após 45 dias das inoculações.

Tratamentos	Comprimento da planta (cm)	Biomassa seca da parte aérea (g)	Biomassa fresca da raiz (g)	Comprimento da raiz (cm)
<i>Testemunha absoluta</i>	21,20 ab	0,44 ab	0,25 a	11,50 a
<i>Testemunha com nematoide</i>	14,20 b	0,14 b	0,00 a	9,90 a
<i>Penicillium A25</i>	20,20 ab	0,36 ab	0,50 a	16,50 a
<i>Penicillium TA14</i>	20,20 ab	0,19 ab	0,75 a	13,00 a
<i>Penicillium citrinum</i>	22,20 a	0,47 a	0,75 a	13,00 a
<i>Thielavia terricola</i>	20,00 ab	0,22 ab	0,75 a	15,50 a
<i>Trichoderma harzianum</i>	20,50 ab	0,16 ab	0,50 a	13,50 a
<i>Trichoderma brevicompactum</i>	22,70 a	0,33 ab	0,75 a	11,50 a
<i>T. longibrachiatum</i>	17,50 ab	0,13 b	0,25 a	12,20 a
<i>Fusarium inflexum</i>	21,20 ab	0,17 ab	0,75 a	12,50 a
CV (%)	8,13	5,20	1,08	13,55

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Valores transformados para $\sqrt{(x+1)}$.

4. Discussão

No presente estudo, os efeitos significativos de antagonismo exercidos sobre *R. reniformis* pela ação dos filtrados de *Penicillium A25*; *Penicillium TA14*; *P. citrinum*; *Thielavia terricola*; *Trichoderma harzianum* e *Fusarium inflexum* evidenciaram a possibilidade de controle do nematoide reniforme por meio de filtrados fúngicos. Além de matarem juvenis e controlarem a reprodução do nematoide, diminuindo a produção de massa de ovos e, conseqüentemente, o número de ovos por sistema radicular, os filtrados se mostraram aparentemente atóxicos às plantas. Esse fato é de máxima importância para certos patossistemas, a exemplo do coentro - *R. reniformis*, que possui um tempo de permanência no campo de apenas 30 dias, o que inviabiliza o controle químico. O mecanismo de ação envolvido em cada relacionamento fungo-nematoide ora estudado, não foi esclarecido, mas hipóteses podem ser consideradas. Segundo Ali (1990), filtrados de *Penicillium* spp. podem causar alterações fisiológicas nas raízes das plantas, afetando o relacionamento planta-nematoide. Resultados similares foram obtidos por Bokhari (2009) quando avaliou o efeito de filtrados de espécies de *Trichoderma* no controle de *R. reniformis*; filtrados de *T. hamatum* e *T. harzianum* foram os mais

efetivos, causando redução dos movimentos dos juvenis em 57 a 93 %, respectivamente.

Em casa de vegetação, os filtrados fúngicos mostraram-se efetivos devido à provável produção de metabólitos bioativos capazes de causar imobilização e morte dos nematoides antes de penetrarem nas raízes. Esses efeitos podem ser eficientes em vários ou em apenas um estágio específico de vida do fitonematoide (Costa *et al.*, 2001). Alguns fungos quitinolíticos, por exemplo, espécies de *Trichoderma* e *Thielavia* podem penetrar nas massas de ovos por meio da ação de quitinases e proteases, possibilitando o parasitismo pelo fungo, diminuindo o nível de eclosão dos juvenis e induzindo mecanismos de defesa das plantas, devido à ação específica das enzimas peroxidase, polifenol oxidase e fenilalanina amonialiase, contribuindo assim para o controle da população de nematoides (Sahebani e Hadavi, 2008; Siddaiah *et al.*, 2017).

No presente trabalho, *F. inflexum*, além de induzir a mortalidade de juvenis de *R. reniformis* nos testes *in vitro* e inibir a reprodução dos nematoides em experimento *in vivo*, promoveu aumento significativo no crescimento em plantas de feijão-caupi. *Fusarium inflexum* pertence ao complexo de espécies *Fusarium oxysporum*. Membros desse complexo residem, frequentemente, na rizosfera de diversas plantas, até mesmo das consideradas não hospedeiras, podendo infectar e causar doenças em diversas espécies botânicas. No entanto, em muitos casos, essa colonização pode ser benéfica, favorecendo o desenvolvimento da planta e até mesmo aumentando a tolerância ao estresse abiótico (Di *et al.*, 2016); esses fungos produzem compostos orgânicos voláteis que induzem o crescimento de plantas por meio do transporte e sinalização de fitohormônios (Bitas *et al.*, 2015). Este é o primeiro relato de filtrados de culturas de *F. inflexum* no controle de fitonematoides.

Os efeitos dos filtrados de *Fusarium solani*, *C. lunata*, *P. lilacinus* e *Penicillium 20.2* não diferiram significativamente em comparação com as testemunhas; talvez seja necessário um período maior de exposição dos nematoides aos filtrados desses fungos, uma vez que o efeito é diretamente proporcional ao tempo de exposição (Singh e Mathur, 2010). Resultados semelhantes foram obtidos por Singh e Mathur (2010) ao analisar o efeito antagônico de *F. solani* a *Meloidogyne incognita*, obtendo apenas 8,3 e 18,5 % de mortalidade dos J2 após 24 e 72 h de exposição ao filtrado fúngico, respectivamente. No caso de *C. lunata* e *P. lilacinus*, os resultados ora apresentados diferiram dos obtidos por Khan e Husain (1989) que registraram 100 %

de *R. reniformis* mortos após 48 h de exposição ao filtrado dessas espécies. Provavelmente, essa variação no efeito dos isolados sobre a mortalidade deve-se à diversidade metabólica e ao grau de toxicidade ao nematoide em estudo.

Nos testes *in vivo*, o comprimento das raízes não diferiu significativamente das testemunhas. Segundo Schomarker e Been (2013), os nematoides apenas afetam o desenvolvimento da cultura, quando presentes no solo em altas densidades, antes mesmo do momento do plantio, induzindo a formação excessiva de raízes laterais de forma a compensar a absorção de água e nutrientes ou deixar o sistema radicular deficiente; também pode ocorrer que as plantas infectadas por nematoides apresentem o mesmo peso das não infectadas, pois, a partir de um determinado tempo, as plantas adquirem peso constante devido ao amadurecimento da cultura.

Independentemente do mecanismo de ação envolvido no antagonismo ora constatado, mais pesquisas nesta área são necessárias para a elucidação de questões pontuais, tornando possível o uso desse tipo de técnica no controle de um dos mais importantes fitopatógenos.

5. Referências

- Ali, H. H. A. 1990. Nematicidal action of fungal culture filtrates. *Japanese Journal of Nematology* 20: 1-7.
- Bitas, V., N. McCartney, N. Li, J. Demers, J. E. Kim, H. S. Kim, K. M. Brown, and S. Kang. 2015. *Fusarium oxysporum* volatiles enhance plant growth via affecting auxin transport and signaling. *Frontiers in Microbiology* 6: 1248, 1-14.
- Bokhari, F. M. (2009). Efficacy of some *Trichoderma* species in the control of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 42: 361-369.
- Canteri, M. G., R. A. Althaus, J. S. Virgens Filho, E. A. Giglioti, and C. V. Godoy. 2001. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft - Knott, Tukey e Duncan. *Revista Brasileira de Agrocomputação* 1: 18-24.
- Chen, S. Y and D. W. Dickson. 2000. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology* 32: 117-121.

- Clark, F. E. 1965. Agar-plate method for total microbial count. Pp. 1460-1466 in C. A. Black, D. D. Evans, J. L. White, L. E. Ensminger, F. E. Clark, and R. C. Dinaver, Eds. Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties. New York: American Society of Agronomy.
- Coolen, W. A., and C. J. D'Herde. 1972. A Method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ed. Ghent. State of Nematology and Entomology Research Station.
- Costa, M. J. N., V. P. Campos, L. H. Pfenning, and D. F. Oliveira. 2001. Toxicidade de filtrados fúngicos a *Meloidogyne incognita*. Fitopatologia Brasileira 26: 749-755.
- Di, X., F. L. W. Takken, and N. Tintor. (2016). How Phytohormones Shape Interactions between Plants and the Soil-Borne Fungus *Fusarium oxysporum*. Frontiers in Plant Science 7[170].
- Hussey, R. S. and K. R. Barker. 1973. A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter 57: 1025-1028.
- Jatala, P. 1991. Reniform and false root-knot nematodes, *Rotylenchulus* and *Nacobbus* spp. Pp. 509-528 in W. R. Nickle, Ed. Manual of Agricultural Nematology. New York: Marcel Dekker.
- Jenkins, W. R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter 48: 692.
- Jones, J. T., A. Haegeman, E. G. Danchin, H. S. Gaur, J. Helder, M. G. K. Jones, T. Kikuchi, R. Manzanilla-López, J. E. Palomares-Rius, W. M. Wesemael, and R. N. Perry, R.N. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 14: 946-961.
- Khan, T. A. and S. I. Husain. 1989. Effect of culture filtrates of soil fungi on the mortality and hatching of reniform nematode (*Rotylenchulus reniformis*). Indian Journal of Nematology 19: 35-40.
- Lawrence, G. W., R. King, G. R. Ellis, R. Doshi, K. S. Lawrence, S. Samson, and C. Caceres. 2007. Population estimation of the reniform nematode using hyperspectral reflectance data and applications to variable rate nematicide application. Proceedings of the National Beltwide Cotton Conference. Memphis: National Cotton Council.

- Li, G.-H. and K.-Q. Zhang. 2014. Nematode-Toxic Fungi and their Nematicidal Metabolites. *Nematode-Trapping Fungi* 23: 313-375.
- Lira, V. L., A. F. Costa, R. M. Moura, and L. C. Maia. 2018. *Rotylenchulus reniformis* (Nematoda: Tylenchida): biologia, identificação, patogenicidade e manejo. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica* 15: 91-102.
- Moura, R. M., E. M. R. Pedrosa, E. A. A. Maranhão, and O. V. Reis. 1997. O nanismo do coentro, uma nova doença causada pelo nematoide *Rotylenchulus reniformis*. *Nematologia Brasileira* 21: 13-22.
- Moura, R. M., E. M. R. Pedrosa, and L. M. P. Guimarães. 2002. Nematoses de alta importância econômica da cultura do melão no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 27: 225.
- Moura, R. M., S. R. V. L. Maranhão, and L. M. P. Guimaraes. 2005. Soursop, a new host of *Rotylenchulus reniformis*. *Fitopatologia Brasileira* 30: 437-437.
- Nunes, H. T., A. C. Monteiro, and A. W. V. Pomela. 2010. Uso de agentes microbianos e químicos para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja. *Acta Scientiarum. Agronomy* 32: 403-409.
- O'Donnell, K., H. C. Kistler, E. Cigelnik, and R. C. Ploetz. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 2044-2049.
- Pimentel, M. S., A. R. Peixoto, and C. D. Paz. 2009. Potencial de controle biológico de *Meloidogyne* utilizando fungos nematófagos e bactérias em cafeeiros. *Coffee Science* 4: 84-92.
- Robinson, A. F., R. N. Inserra, E. P. Caswell-Chen, N. Vovlas, and A. Troccoli. 1997. *Rotylenchulus* species: Identification, distribution, host ranges, and crop plant resistance. *Nematropica* 27: 127-180.
- Sahebani, N., and N. Hadavi. 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 2016-2020.

- Samson, R. A., J. Houbraeken, U. Thrane, J. C. Frisvad, and B. Andersen. 2010. Food and indoor fungi. CBS laboratory manual series 2. Utrecht: CBS-Fungal Biodiversity Centre.
- Schomaker, C. H. and T. H. Been. 2006. Plant growth and population dynamics. Pp. 275-301 in: R. N. Perry, and M. Moens, eds. Plant Nematology. Wallingford, CT.
- Siddaiah, C. N., N. R. Satyanarayana, V. Mudili, V. K. Gupta, S. Gurunathan, S. Rangappa, S. S. Huntrike, and R. K. Srivastava. 2017. Elicitation of resistance and associated defense responses in *Trichoderma hamatum* induced protection against pearl millet downy mildew pathogen. Scientific Reports 7: 43991.
- Singh, S., and N. Mathur. 2010. In vitro studies of antagonistic fungi against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Biocontrol Science and Technology 20: 275-282.
- Stirling, G. R. 2014. Suppression of nematodes and other soilborne pathogens with organic amendments. Pp. 255-279 in G. R. Stirling, ed. Biological control of plant-parasitic nematodes: Soil ecosystem management in sustainable. Wallingford: CAB International, Wallingford, CT.
- White, T. J., T. Bruns, S. J. W. T. Lee, and J. L. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications 18: 315-322.

6 ARTIGO IV - artigo a ser submetido à revista *European Journal of Plant Pathology*

Compostos bioativos fúngicos com propriedades nematocidas a *Rotylenchulus reniformis*

Resumo

Rotylenchulus reniformis é um dos principais problemas de diversas culturas de valor econômico. Em vista da necessidade de técnicas mais efetivas e, simultaneamente, menos agressivas ao homem e ao ambiente, estratégias de controle baseadas no uso de metabólitos fúngicos com propriedades nematocidas tem se mostrado promissora. O objetivo deste estudo foi obter frações bioativas produzidas por fungos e investigar os seus efeitos na mortalidade e inibição da eclosão de juvenis de *R. reniformis*. Também, visou identificar as classes metabólicas aos quais pertencem os metabólitos com propriedades nematocidas. Os fungos foram cultivados em meio líquido para produção de compostos bioativos e submetidos à partição líquido-líquido, a partir dos solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e aquosa, cujos efeitos foram testados sobre a mortalidade e eclosão de juvenis de *R. reniformis*, em diferentes concentrações. As frações tiveram seus compostos ativos semipurificados. Os grupos metabólicos dessas frações foram identificados por cromatografia em camada delgada. As frações clorofórmicas obtidas de *F. inflexum*, *P. citrinum* e *Penicillium* TA14 e as de acetato de etila oriundas de *T. harzianum*, *P. citrinum* e de *Penicillium* A25 foram as mais efetivas na ação nematocida e na inibição da eclosão, promovendo a mortalidade de 70,83 % a 96,79 % de juvenis e inibiram a eclosão em até 100% dos juvenis nos testes *in vitro*. Os flavonoides e derivado cinâmicos seguido pelos terpenos foram as classes metabólicas mais abundantes e que apresentaram mais efeitos antagônicos ao nematoide nesse estudo. Os resultados indicaram a potencialidade nematocida e ovicida dos metabólitos que podem contribuir para novos estudos no desenvolvimento de produtos biológicos para o controle do nematoide reniforme.

Palavras-chave: Atividade nematocida, biocontrole; fitonematoides; metabólitos tóxicos

1. Introdução

Os fitonematoides estão entre as principais pragas da agricultura, pois causam perdas em diversas culturas de importância econômica. Estima-se que os prejuízos sejam de 35 bilhões de reais ao agronegócio nacional e de até 157 bilhões de dólares para a produção agrícola mundial (Nascimento, 2018; Galbieri & Asmus, 2016). Outras estimativas indicam que em termos mundiais a perda provocada por nematoides nas 20 mais importantes culturas chega a \$215.77 bilhões de dólares anuais (Abd-Elgawad & Askary, 2018). *Rotylenchulus reniformis* é reconhecido como o principal problema fitossanitário do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), por causar perdas de aproximadamente 100 milhões de dólares anualmente, nesta cultura, nos Estados Unidos (Lopes et al., 2016). No Estado de Mato Grosso, maior produtor desta cultura no Brasil, com 66,2 % da área cultivada (Conab, 2019), 15 % de todas as áreas se plantadas encontram infestadas pelo nematoide reniforme (Galbieri et al., 2016).

Entre os métodos de controle para *R. reniformis*, o uso de nematicidas ainda é o mais utilizado. (Kubo et al., 2012). Esse método eleva o custo da produção e acarreta inúmeros problemas de saúde pública, além de fortes impactos ambientais (Lira et al., 2018). Embora os nematicidas sejam capazes de aumentar a produtividade em torno de 10%, ao final do ciclo da cultura, as populações de nematoides são maiores em áreas tratadas do que em não tratadas (Inomoto & Asmus, 2006). É importante ressaltar que para culturas de ciclo curto (menos de três meses) o uso dos nematicidas sintéticos se torna inviável, pois os efeitos residuais sistêmicos persistem na planta por mais de 90 dias.

Dentre as práticas alternativas no controle integrado do nematoide reniforme, o uso de fungos antagônicos produtores de metabólitos bioativos tem se mostrado opção viável, uma vez que essas substâncias podem ter ação nematostática e/ou nematicida, reduzindo significativamente a população do nematoide alvo e contribuindo para uma agricultura sustentável (Li & Zhang, 2014). Entre as principais vantagens no uso desses metabólitos em relação aos nematicidas sintéticos, encontra-se a possibilidade da formulação de compostos menos tóxicos ao meio ambiente, com amplo modo de ação e degradação rápida (Ferraz et al., 2010).

De acordo com as características estruturais, os metabólitos podem ser classificados em três grandes grupos: terpenos, substâncias fenólicas (incluindo

taninos, flavonoides, cumarinas e derivados cinâmicos) e substâncias nitrogenadas, a exemplo dos alcaloides. Destes principais grupos de metabólitos secundários, os terpenos correspondem a 55 %, seguido dos alcaloides com 27 % e os compostos fenólicos com 18 % do total (Kumar & Dubey, 2019); em todas essas classes constatou-se a presença de compostos bioativos com propriedades nematostáticas e nematicidas (Rocha et al., 2017). Diante da importância de compreender o mecanismo de ação dos metabólitos fúngicos sobre os fitonematoides, diversos pesquisadores realizaram o isolamento e a identificação dessas moléculas (Degenkolb & Vilcinskis, 2016a). No entanto, o conhecimento de compostos de origem fúngica com propriedades nematicidas para *R. reniformis* ainda é escasso, sendo necessários mais estudos. O objetivo deste estudo foi identificar classes de metabólitos com propriedades nematicidas produzidas por fungos, por meio de fracionamentos direcionados por testes *in vitro* de mortalidade e inibição da eclosão de juvenis de *R. reniformis*.

2. Material e Métodos

2.1 Obtenção e fracionamento dos filtrados fúngicos

Os fungos *Fusarium inflexum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium A25*, *Penicillium TA14*, *Thielavia terricola*, *Trichoderma brevicompactum*, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma longibrachiatum* foram previamente selecionados (Lira et al., dados não publicados) e cultivados em placas de Petri contendo o meio BDA. Após sete dias de repicagem e incubação a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, três discos de 5 mm de diâmetro de cada cultura foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio líquido Czapek- Dox, previamente esterilizado a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min. Após 15 dias a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ em agitação orbital a 160 rpm, na ausência de luz, o conteúdo dos frascos de Erlenmeyer foi filtrado duas vezes em papel Whatman nº 1 e, logo após, filtrado em membrana de acetato de celulose com $0,22\text{ }\mu\text{m}$ de porosidade, para eliminação de quaisquer resíduos e conídios dos fungos, obtendo-se a fase líquida, denominada filtrado fúngico. Foi produzido 1 L para cada espécie de fungo testada.

Os filtrados aquosos, contendo os metabólitos sintetizados pelos fungos, foram submetidos à partição líquido-líquido em ordem crescente de polaridade, utilizando hexano (Hex), clorofórmio (Clo) e acetato de etila (AcOEt). As amostras foram concentradas em rotaevaporador a 40°C , obtendo-se os extratos orgânicos

brutos (frações) de Hex, Clo e AcOEt. A fração aquosa (Aq) remanescente foi liofilizada. As quatro frações obtidas de cada fungo foram pesadas para avaliação do rendimento.

2.2 Análise química dos compostos fúngicos

Para avaliação das principais classes metabólicas, entre elas: taninos, flavonoides, derivados cinâmicos, terpenos/esteroides e alcaloides, todas as frações foram submetidas à análise química e 3 mg de cada extrato bruto foram diluídos em metanol. Em seguida, as amostras e os padrões foram aplicados de forma manual em placas cromatográficas de sílica gel 60 - F₂₅₄ (Macherey-Nagel®, Germany). As placas foram desenvolvidas em cubas após saturação utilizando os seguintes sistemas: acetato de etila/ácido fórmico/água (90:5:5), tolueno/acetato (70:30), acetato de etila/ácido acético/ácido fórmico/água (100:11:11:26). A cuba foi saturada durante aproximadamente 15 minutos, em temperatura ambiente. A largura e o comprimento das placas cromatográficas foi de 5 x 5 cm e as bandas aplicadas com largura de 0,5 cm, com uma distância entre elas e das bordas das placas de 0,5 cm. Após a eluição das placas, estas foram secas em temperatura ambiente, observadas sob 365 nm e luz visível e em seguida digitalizadas. Na sequência foram reveladas com cloreto férrico a 5 % em metanol para análise de taninos hidrolisáveis; com cloreto de alumínio a 5 % em metanol para investigação de flavonoides e derivados cinâmicos; com o reagente Lieberman-Burchard para análise de terpenos e esteroides e com o reagente Dragendorff para verificação de alcaloides.

2.3 Teste de mortalidade e eclosão de *R. reniformis*

Massas de ovos foram extraídas de raízes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Santa Cruz Kada, utilizando-se solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % conforme metodologia de Hussey & Baker (1973), a partir de uma população pura do nematoide reniforme. Os ovos foram colocados em câmara de eclosão a 27 °C. Os juvenis obtidos foram coletados diariamente e armazenados para montagem do experimento.

Para o teste de mortalidade, um bioensaio foi instalado em placas de Elisa com 96 células, seguindo-se a metodologia adaptada por Amaral et al. (2002), sendo adicionados em cada célula 20 µL de uma suspensão contendo 35 juvenis de *R. reniformis* e 100 µL de cada amostra dissolvida em solução aquosa de Tween a 1 %.

As frações de Hex, Clo e AcOEt e Aq de cada isolado fúngico foram avaliadas nas concentrações de 500, 250, 125 e 6,25 µg/mL com quatro repetições, em delineamento inteiramente casualizado, utilizando solução aquosa de Tween a 1 % como testemunha. Em seguida as placas foram vedadas com filme plástico e colocadas em câmara de crescimento tipo BOD a 27 °C, em ausência de luz. O número de nematoides imobilizados foi estabelecido com auxílio de um microscópio estereoscópico após 24 e 48 h da instalação do ensaio, usando o método de Chen & Dickson (2000), utilizando hidróxido de sódio (NaOH) 1 M a 1 %. Foram considerados mortos os nematoides que mantiveram os corpos paralisados após 3 minutos da adição de NaOH.

Para teste de eclosão, foi utilizada a mesma metodologia descrita para o teste de mortalidade de juvenis, adicionando 50 ovos por cavidade da placa de Elisa. A avaliação foi realizada no 15º dia da aplicação dos filtrados. Os dados foram transformados para $\sqrt{x}/100$ e submetidos à análise de variância (ANOVA) com auxílio do software SASM - Agri (Canteri, et al., 2001). Após a análise, as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

3. Resultados

Entre as quatro frações testadas, as clorofórmicas provenientes de *F. inflexum*, *P. citrinum* e *Penicillium* TA14, apresentaram efeito nematicida, causando a mortalidade dos juvenis de *R. reniformis* em 93,33, 100 e 93,33 % em 24 h e de 100, 100 e 98,66 % após 48 h de exposição as frações, na maior concentração. As frações de AcOEt dos isolados de *T. harzianum*, *P. citrinum* e de *Penicillium* A25 também se destacam, promovendo respectivamente a morte de 100, 100 e 76,67 % dos nematoides em 24h e 100, 100 e 100% após 48h na na concentração de 500 µg/mL. Entre as frações aquosas, as produzidas por *F. inflexum*, *T. brevicompactum* e *T. longibrachiatum* induziram a mortalidade em 96,66, 71,33 e 94,00 em 24 h de exposição e 100, 80 e 98,67 % após 48 h, também na concentração de 500 µg/mL. As frações de Hex, com exceção de *T. terricola* (100 %) apresentaram resultados inferiores de mortalidade em relação aos demais tratamentos. Todas as concentrações utilizadas apresentaram atividade nematicida em diferentes níveis, no entanto a de 500 µg/mL induziu a maior taxa de mortalidade dos nematoides. Também pode-se observar que o efeito nematicida das frações sobre os juvenis de *R. reniformis* foi proporcional ao tempo de exposição (24 e 48 h) (Tabela 1 e 2).

Tabela 1. Mortalidade de juvenis de *R. reniformis* (%) após 24 h de exposição às frações fúngicas em diferentes concentrações.

Isolado fúngico	Conc*. (µg/mL)	Mortalidade de juvenis (%) em 24h			
		Hexânica	Clorofórmica	Acetato de etila	Aquosa
<i>Fusarium inflexum</i>	500	0,00 e C	93,33 ab A	72,33 cd B	96,66 a A
	250	0,00 e C	80,00 bcd A	44,67 e B	74,00 b A
	125	0,00 e C	68,00 de A	16,34 fg B	67,66 b A
	62.5	0,00 e C	56,66 ef A	1,67 gh C	43,33 de B
<i>Penicillium citrinum</i>	500	1,33 e B	100,00 a A	100,00 a A	4,00 h B
	250	0,00 e B	100,00 a A	91,53 ab A	1,33 h B
	125	0,00 e B	90,00 abc A	83,33 bc A	0,00 h B
	62.5	0,00 e C	84,33 bcde A	23,33 f B	0,00 h C
<i>Penicillium TA14</i>	500	0,00 e B	93,33 ab A	0,00 h B	0,00 h B
	250	0,00 e B	78,00 cd A	0,00 h B	0,00 h B
	125	0,00 e B	47,33 fg A	0,00 h B	0,00 h B
	62.5	0,00 e B	33,33 g A	0,00 h B	0,00 h B
<i>Penicillium A25</i>	500	0,00 e D	15,33 h C	76,67 c A	52,00 cd B
	250	0,00 e C	6,66 hi C	70,00 cd A	32,67 ef B
	125	0,00 e C	1,66 hi C	61,67 d A	20,00 fg B
	62.5	0,00 e B	0,00 i B	45,00 e A	0,00 h B
<i>Thielavia terricola</i>	500	100,00 a A	10,66 hi B	0,00 h C	11,33 gh B
	250	78,33 b A	7,66 hi B	0,00 h B	4,00 h B
	125	37,67 c A	0,00 i B	0,00 h B	0,00 h B
	62.5	18,33 d A	0,00 i B	0,00 h B	0,00 h B
<i>Trichoderma brevicompactum</i>	500	6,00 de B	0,00 i C	2,00 gh C	71,33 b A
	250	0,00 e B	0,00 i B	0,00 h B	52,00 cd A
	125	0,66 e B	0,00 i B	0,00 h B	29,33 ef A
	62.5	0,00 e B	0,00 i B	0,00 h B	28,67 ef A
<i>Trichoderma harzianum</i>	500	0,66 e B	0,00 i B	100,00 a A	1,33 h B
	250	0,00 e B	0,00 i B	93,33 ab A	0,00 h B
	125	0,00 e B	0,00 i B	76,66 c A	0,00 h B
	62.5	0,00 e B	0,00 i B	68,67 cd A	0,00 h B
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	500	13,33 de B	4,33 hi BC	0,00 h C	94,00 a A
	250	0,00 e B	4,66 hi B	0,00 h B	62,67 bc A
	125	0,00 e B	0,00 i B	0,00 h B	31,33 ef A
	62.5	0,00 e B	0,00 i B	0,00 h B	11,33 gh A
Controle (Tween)	1%	0,67 e A	0,67 i A	0,67 h A	0,67 h A

Médias seguidas de uma mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 2. Mortalidade de juvenis de *R. reniformis* (%) após 48 h de exposição às frações fúngicas em diferentes concentrações.

Isolado fúngico	Conc*. (µg/mL)	Mortalidade de juvenis (%) em 48h			
		Hexânica	Clorofórmica	Acetato de etila	Aquosa
<i>Fusarium inflexum</i>	500	0,00 h B	100,00 a A	100,00 a A	100,00 a A
	250	0,00 h C	100,00 a A	79,33 bc B	100,00 a A
	125	0,00 h C	100,00 a A	52,33 d B	100,00 a A
	62,5	0,00 h D	95,00 a A	14, 33 e C	78,33 bc B
<i>Penicillium citrinum</i>	500	12,67 efg B	100,00 a A	100,00 a A	8,67 hij B
	250	11,33 efgh B	100,00 a A	100,00 a A	2,67 ij C
	125	9,33 fgh B	100,00 a A	100,00 a A	0,00 j C
	62,5	7,00 fgh C	100,00 a A A	50,00 d B	0,00 j C
<i>Penicillium TA14</i>	500	5,67 fgh B	98,66 a A	6,00 ef B	0,00 j B
	250	1,33 gh B	94,00 a A	0,00 f B	0,00 j B
	125	0,00 h B	58,66 b A	0,00 f B	0,00 j B
	62,5	0,00 h B	48,00 bc A	0,00 f B	0,00 j B
<i>Penicillium A25</i>	500	23,33 de D	44,67 c C	100,00 a A	83,33 b B
	250	8,67 fgh D	20,00 def C	90,00 ab A	63,33 de B
	125	1,33 gh C	8,00 fgh C	76,67 c A	53,33 ef B
	62,5	0,00 gh C	0,00 h C	46,66 d A	13,33 hi B
<i>Thielavia terricola</i>	500	100,00 a A	30,66 d B	0,00 f D	20,00 h C
	250	80,00 b A	15,67 efg B	0,00 f C	8,67 hij B
	125	53,33 c A	5,33 gh B	0,00 f B	0,66 j B
	62,5	26,67 d A	0,00 h B	0,00 f B	0,00 j B
<i>Trichoderma brevicompactum</i>	500	22,00 de B	20,67 de B	15,67 e B	80,00 b A
	250	11,33 efgh BC	3,33 gh C	12,00 ef B	66,67 cd A
	125	7,67 fgh B	1,67 h B	6,33 ef B	54,00 e A
	62,5	0,00 h B	0,00 h B	3,67 ef B	39,33 g A
<i>Trichoderma harzianum</i>	500	2,33 fgh C	11,33 efgh B	100,00 a A	2,00 ij C
	250	0,00 h B	0,00 hB	100,00 a A	0,66 j B
	125	0,00 h B	0,00 h B	100,00 a A	0,00 j B
	62,5	0,00 h B	0,00 h B	100,00 a A	0,00 j B
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	500	14,33 def B	12,00 efgh B	0,00 f C	98,67 a A
	250	3,33 fgh B	5,33 gh B	0,00 f B	83,33 b A
	125	0,00 h B	3,33 gh B	0,00 f B	41,33 fg A
	62,5	0,00 h B	0,00 h B	0,00 f B	15,33 h A
Controle (Tween)	1%	0,67 h A	0,67 h A	0,67 f A	0,67 j A

Médias seguidas de uma mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

No teste de eclosão, três frações oriundas do isolado de *F. inflexum* apresentaram efeito ovicida a *R. reniformis*, entre elas as frações Clo, AcOEt e Aq inibiram a eclosão de juvenis em 78 %, 80,7 % e 86 % respectivamente, na concentração de 500 µg/mL. Mesmo em concentrações mais baixas essas frações impediram a eclosão de mais de 54% dos juvenis de *R. reniformis*. Para as frações provenientes de *P. citrinum*, *Penicillium* TA14 e *T. terricola*, a mais efetiva foi a clorofórmica, pois reduziu de forma significativa a eclosão dos juvenis em 100 %, 89,3 % e 100 % na concentração de 500 µg/mL e em concentrações inferiores a taxa de inibição da eclosão foi de 81,33 e 67,33 e 82 % respectivamente. A fração hexânica de *T. terricola* também se destacou, pois impediu a eclosão de 95,33 % dos juvenis na maior concentração. Para o isolado de *Penicillium* A25, a fração que apresentou maior porcentagem de inibição foi a AcOEt impedindo a eclosão de 75,33 a 90,67 % na menor e maior concentração. Em relação aos fungos do gênero *Trichoderma*, as frações que apresentaram maior efeito ovicida foi a aquosa, com valores 76 % para *T. brevicompactum*, 100 % para *T. harzianum* e 80 % para *T. longibrachiatum* na concentração de 500 µg/mL (Tabela 3). A fração de AcOEt do isolado *T. harzianum*, também reduziu a eclosão dos juvenis em 60,67 a 98,67 % na menor e maior concentração. Ao analisar de forma conjunta as frações mais efetivas na inibição da eclosão, observa-se que as frações clorofórmicas e aquosas apresentaram maior atividade ovicida a *R. reniformis*, as quais foram provenientes de *F. inflexum*, *P. citrinum*, *Penicillium* TA14, *T. terricola*, *T. brevicompactum*, *T. harzianum* e *T. longibrachiatum*, seguido da fração AcOEt oriunda de *Penicillium* A25. A hexânica, quando comparada às demais frações, foi a menos efetiva (Tabela 3).

O perfil químico qualitativo das frações fúngicas mostra que as classes de metabólitos mais abundantes foram os flavonoides e derivados cinâmicos, os quais foram produzidos pelas espécies de *Penicillium*, *F. inflexum*, *T. terricola* e *T. longibrachiatum*, seguidos pelos terpenos sintetizado por *P. citrinum*, *Penicillium* A25, *T. terricola*, *T. harzianum* e *T. longibrachiatum*. As frações aquosas, acetato de etila e clorofórmicas apresentaram mais metabólitos com efeito nematocida e ovicida do que as demais frações. (Tabela 4). Alcaloides foram detectados apenas na fração aquosa de *T. brevicompactum* e os taninos hidrolisáveis para a fração de AcOEt de *T. terricola* e *T. longibrachiatum*. Dentre as frações analisadas, a aquosa mostrou sempre o maior e hexano o menor rendimento (Tabela 4).

Tabela 3. Inibição da eclosão de juvenis de *R. reniformis* (%) após exposição às frações fúngicas em diferentes concentrações.

Isolado fúngico	Conc*. (µg/mL)	Inibição da eclosão de juvenis (%)			
		Hexânica	Clorofórmica	Acetato de etila	Aquosa
<i>Fusarium inflexum</i>	500	8,00 ij B	78,00 bcdef A	80,67 bcd A	86,00 abc A
	250	2,00 ij B	68,00 defg A	70,67 de A	75,33 bcde A
	125	0,67 j B	65,33 fg A	67,34 def A	66,33 defg A
	62.5	0,00 j B	56,66 g A	54,67 f A	61,33 efg A
<i>Penicillium citrinum</i>	500	50,67 def C	100,00 a A	71,34 de B	40,66 jl D
	250	38,67 fg C	99,33 a A	57,34 ef B	32,00 jlm C
	125	30,67 g B	88,66 abc A	39,34 g B	18,66 mno C
	62.5	16,00 hi BC	81,33 bcde A	24,67 hi B	7,33 o C
<i>Penicillium TA14</i>	500	2,00 ij C	89,33 ab A	2,67 jl C	56,66 ghi B
	250	1,33 j C	78,66 bcdef A	0,00 l C	44,00 hij B
	125	2,67 ij C	74,66 cdef A	0,67 l C	38,00 jl B
	62.5	0,00 j C	67,33 efg A	0,00 l C	34,00 jl B
<i>Penicillium A25</i>	500	41,33 fg C	20,66 h D	90,67 ab A	60,66 fg B
	250	27,33 gh C	14,00 hi D	89,34 abc A	43,33 ij B
	125	0,67 j C	6,33 i C	80,00 bcd A	27,33 lmn B
	62.5	0,00 j C	0,00 i C	75,33 a A	12,00 o B
<i>Thielavia terricola</i>	500	95,33 a A	100,00 a A	37,33 gh B	44,00 hij B
	250	82,67 ab B	98,67 a A	25,33 ghi D	36,67 jl C
	125	78,67 bc B	99,33 a A	16,67 ij C	13,67 no C
	62.5	78,67 bc A	82,00 bcd A	8,67 jl B	6,67 o B
<i>Trichoderma brevicompactum</i>	500	4,67 ij B	2,67 i B	1,33 l B	76,00 bcd A
	250	2,00 ij B	0,00 i B	0,00 l B	70,00 defg A
	125	4,00 ij B	0,00 i B	0,67 l B	68,67 defg A
	62.5	0,00 j C	0,00 i B	0,00 l B	58,00 gh A
<i>Trichoderma harzianum</i>	500	3,33 ij C	23,33 h B	98,67 a A	100,00 a A
	250	0,00 j C	12,67 hi B	93,33 ab A	98,67 a A
	125	0,00 j C	5,33 i C	75,33 cd B	88,67 ab A
	62.5	0,00 j C	4,67 i C	60,67 ef A	40,67 jl B
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	500	76,67 bc A	13,33 hi B	0,00 l C	80,00 bcd A
	250	64,67 cd A	12,00 hi B	0,67 l C	72,67 cdef A
	125	58,67 de B	4,00 i C	0,00 l C	70,00 defg A
	62.5	49,00 ef A	4,00 i B	0,00 l B	56,67 ghi A
Controle (Tween)	1%	0,67 j A	0,67 i A	0,67 l A	0,67 o A

Médias seguidas de uma mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Resultados foram transformados em $\arcsen \sqrt{x/100}$.

*Concentração.

Tabela 4. Triagem química das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e aquosa obtidas dos 8 filtrados de culturas fúngicas.

Tratamentos	Classes Metabólicas					Rendimento (g)
	Taninos Hidrolisáveis	Flavonoides	Derivados Cinâmicos	Terpenos/ Esteroides	Alcaloides	
14.3 Hex	-	-	-	-	-	0,004
14.3 Clo	-	+	+	-	-	0,265
14.3 AcOEt	-	+	+	-	-	0,161
14.3 Aq	-	+	+	-	-	3,075
P3 Hex	-	+	+	+	-	0,006
P3 Clo	-	+	+	+	-	0,114
P3 AcOEt	-	+	+	+	-	0,053
P3 Aq	-	+	+	+	-	8,101
A25 Hex	-	+	+	+	-	0,030
A25 Clo	-	+	+	+	-	0,026
A25 AcOEt	-	+	+	+	-	0,166
A25 Aq	-	+	+	-	-	8,025
TA14 Hex	-	-	-	-	-	0,106
TA14 Clo	-	+	+	-	-	2,460
TA14 AcOEt	-	+	+	-	-	0,119
TA14 Aq	-	+	+	-	-	5,750
14.1 Hex	-	-	+	-	-	0,482
14.1 Clo	-	+	-	+	-	0,442
14.1 AcOEt	+	+	-	+	-	0,349
14.1 Aq	-	-	-	-	-	6,481
TB Hex	-	-	-	-	-	0,179
TB Clo	-	-	-	-	-	0,144
TB AcOEt	-	-	-	-	-	0,091
TB Aq	-	-	-	-	+	7,851
TH Hex	-	-	-	-	-	0,337
TH Clo	-	-	-	-	-	5,460
TH AcOEt	-	-	-	+	-	0,080
TH Aq	-	-	-	-	-	8,856
T1 Hex	-	-	+	-	-	0,106
T1 Clo	-	-	+	-	-	0,262
T1 AcOEt	-	+	+	+	-	0,007
T1 Aq	+	+	+	-	-	3,150

(+) Presença; (-) Ausência.

14.3 – *Fusarium inflexum*; P3 – *Penicillium citrinum*; TA14- *Penicillium TA14*; A25 – *Penicillium A25*;

14.1 – *Thielavia terricola*; TB – *Trichoderma brevicompactum*; TH – *Trichoderma harzianum*; T1 – *Trichoderma longibrachiatum*.

4. Discussão

Neste estudo foi relatada a forte atividade nematicida das frações metabólicas produzidos principalmente por isolados de *F. inflexum* e *P. citrinum* sobre *R. reniformis*. As frações clorofórmica, acetato de etila e aquosa apresentaram maior eficácia tanto na mortalidade quanto na inibição da eclosão dos nematoides, além de maior concentração de metabólitos, evidenciando seu potencial para controle do nematoide reniforme.

A maioria dos metabólitos com ação antagônica aos nematoides apresentou o nível de polaridade intermediária a altamente polar. É provável que esses compostos apresentem hidroxilas em sua estrutura química, sendo esta uma das características dos compostos polares, os quais foram atraídos pelos solventes clorofórmio e acetato de etila de polaridade similar, pois o processo de solubilidade de uma substância química está diretamente relacionado com a estrutura da molécula e com o nível de polaridade, e conseqüentemente com as forças de atração entre elas (Martins et al., 2013). Isso justifica o fato das frações hexânicas, que são apolares, terem apresentado baixa quantidade de metabólitos, quando comparadas às demais frações, e não serem tão efetivas na atividade nematicida e ovicida a *R. reniformis*.

O perfil químico dos extratos de Hex, Clo, AcOEt e Aq obtido dos isolados fúngicos difere daqueles descritos na literatura para os flavonoides. Embora estudos relatem que os flavonoides estão entre os compostos fenólicos quase ausentes nos fungos (Vizzotto et al., 2010), neste trabalho, juntamente com derivados cinâmicos, esses compostos foram os grupos metabólicos mais abundantes produzidos principalmente por *F. inflexum* e pelas espécies de *Penicillium*. Compostos fenólicos produzidos por *F. inflexum* e *Penicillium* spp., que são fungos de solo, apresentam alto potencial antimicrobiano contra bactérias e outras espécies fúngicas, atuando principalmente na inibição da síntese de ácidos nucleicos e rompendo a estrutura da membrana microbiana por meio de ações lipofílicas (Hendra et al., 2011; Salas et al., 2011). Fungos de solo são reconhecidos pela potencialidade em produzir metabólitos bioativos e isto possivelmente deve-se à capacidade em decompor matérias orgânicas e contribuir na ciclagem de nutrientes (Abdel-Aziz et al., 2017).

Embora os metabólitos secundários estejam mais relacionados com a vantagem competitiva e o sistema de defesa do organismo que o produz, é relatado que os flavonoides também contribuem na diferenciação de estágios do desenvolvimento fúngico, incluindo, germinação de esporos, comprimento hifal,

estágios de diferenciação e formação de células auxiliares, além de contribuir também para os mecanismos de sinalização envolvidos na relação simbiótica entre espécies vegetais e fúngicas (Parasuraman & Siddhardha, 2019; Scervino et al., 2005).

Neste trabalho, os compostos fenólicos foram eficazes na ação nematicida, a exemplo dos oriundos de *F. inflexum* que produziram flavonoides e derivados cinâmicos; juntos, esses compostos promoveram a mortalidade em mais de 86 % dos juvenis de *R. reniformis*. De acordo com Musila et al. (2013) a existência de uma ou mais classes de metabólitos determina a extensão da atividade biológica de uma fração. Dessa forma, vários compostos químicos, possivelmente, devem estar presentes principalmente nas frações Clo, AcOEt e Aq, potencializando a ação nematicida e ovicida sobre *R. reniformis*.

Terpenos foram sintetizados por vários dos isolados fúngicos testados, mas entre eles a fração terpênica produzida por *T. harzianum* apresentou maior ação nematicida e ovicida. Espécies do gênero *Trichoderma* estão entre as principais produtoras de terpenos, e *T. harzianum* se destaca por apresentar amplo mecanismo de ação contra diversos fitopatógenos, principalmente no controle de nematoides (Meyer et al., 2019). Medico et al. (2018) testaram um novo nematicida à base de terpenos contra espécies de *Meloidogyne* em Solanaceas e Cucurbitaceas. O composto foi capaz de induzir a mortalidade dos nematoides atuando nas substâncias lipídicas contidas nas membranas celulares, causando lise e conseqüentemente morte celular, além de inibir a formação de galhas e a eclosão de juvenis de *Meloidogyne* spp. Os terpenos com atividade nematicida podem atuar rompendo a membrana celular dos nematoides, por meio de ações lipofílicas, ou atuar no sistema nervoso, afetando processos controlados por enzimas (Gonçalves et al., 2016).

O manejo de fitonematoides é uma tarefa difícil, muitas vezes sendo necessária a integração de diversos métodos (Inomoto & Asmus, 2006). Embora o controle populacional de fitopatógenos por meio de agentes biológicos tenha crescido em torno de 15% ao ano no Brasil (Mittmann, 2017), no controle de fitonematoides ainda é um dos métodos pouco utilizados em campo devido a alguns obstáculos, a exemplo do sistema de produção em grandes áreas, número elevado de pragas e principalmente devido à prática do uso dos agroquímicos. Estes, embora sejam altamente tóxicos, causando diversos problemas à saúde humana e

ao meio ambiente, ainda constituem uma das formas de manejo mais utilizadas devido à facilidade de obtenção e uso dos produtos (Moura, 2015). O biocontrole, além de contribuir para uma agricultura alternativa e sustentável, auxilia em pesquisas de desenvolvimento de produtos menos tóxicos ao meio ambiente e ao homem. Dessa forma, pesquisas sobre caracterização das substâncias produzidas por fungos visando à obtenção de novos compostos nematicidas devem ser incentivados.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE - Proc.IBPG-0737-2.12/15) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Proc. 307129/2015-2).

Referências

- Abd-Elgawad, M. M., & Askary, T. H. (2018). Fungal and bacterial nematicides in integrated nematode management strategies. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(1), 74.
- Abdel-Aziz, M. S., Ghareeb, M. A., Saad, A. M., Refahy, L. A., & Hamed, A. A. (2017). Chromatographic isolation and structural elucidation of secondary metabolites from the soil-inhabiting fungus *Aspergillus fumigatus* 3T-EGY. *Acta Chromatographica*, 30(4), 243-249.
- Amaral, D. R., Oliveira, D.F., Campos, V.P., & Carvalho, D. A. (2002). Efeito de alguns extratos vegetais na mobilidade, mortalidade e patogenicidade de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. *Nematologia Brasileira*, 26, 43-48.
- Canteri, M. G., Althaus, R. A., Virgens-Filho, J. S., Giglioti, E. A., & Godoy, C. V. (2001). SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. *Revista Brasileira de Agrocomputação*, 1(2), 18-24.
- Chen, S. & Dickson, D. W. (2004). Biological control of nematodes by fungal antagonists. In: Z. X. Chen, S. Y. Chen, & D. W. Dickson (Ed.), *Nematology: advances and perspectives* (pp. 979-1039). Wallingford: CABI international.

- Conab (Companhia Nacional de Abastecimento). (2019) Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2018/19. <https://www.conab.gov.br/>. Acessado em 22 de Dezembro de 2019.
- Degenkolb, T., & Vilcinskas, A. (2016). Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part I: metabolites from nematophagous ascomycetes. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(9), 3799-3812.
- Faske, T. R., & Hurd, K. (2015). Sensibilidade de *Meloidogyne incognita* e *Rotylenchulus reniformis* ao Fluopyram. *Journal of nematology*, 47(4), 316–321.
- Ferraz, S., Freitas, L. D., Lopes, E. A., & Dias-Arieira, C. R. (2010). *Manejo sustentável de fitonematoides*. Viçosa: UFV.
- Galbieri, R., Vaz, C. M. P., Asmus, G. L., Crestana, S., Matos, E. S., & Magalhães, C. A. S. (2016). Influência de parâmetros de solo na ocorrência de fitonematoides. In R. Galbieri & J. L. Belot (eds.), *Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de controle* (pp. 37-89). Cuiabá: IMAmt.
- Galbieri, R., & Asmus, G. L. (2016). Principais espécies de nematoides do algodoeiro no Brasil. In R. Galbieri & J. L. Belot (eds.), *Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle* (pp 11–36). Cuiabá: IMAmt.
- Gonçalves, F. J. T., Barbosa, F. G., Lima, J. S., Coutinho, I. B. L., Oliveira, F. C., Rocha, R. R., & Andrade Neto, M. (2016). Antagonist activity of the essential oil *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae) on *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18(1), 149-156.
- Gupta, R. L., Prasad, D., & Patra, D. (2007). Nematotoxicity of o, o-diaryl on-propyl phosphorothionates against *Rotylenchulus reniformis*. *Annals of Plant Protection Sciences*, 15(1), 223-225.
- Hussey, R. S., & Barker, K. R. (1973). A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57, 1025-1028.
- Inomoto, M. M., & Asmus, G. L. (2006). Controle de nematoides une resistência, rotação e nematicidas. *Visão Agrícola*, 6, 47-50.

- Hendra, R., Ahmad, S., Sukari, A., Shukor, M. Y., & Oskoueian, E. (2011). Flavonoid analyses and antimicrobial activity of various parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl fruit. *International journal of molecular sciences*, 12(6), 3422-3431.
- Kubo, R. K., Machado, A. C. Z., & Oliveira, C. M. G. (2012). Efeito do tratamento de sementes no controle de *Rotylenchulus reniformis* em dois cultivares de algodão. *Arquivos dos Instituto Biológico*, 79(2), 239-245.
- Kumar, D., & Dubey, K. K. (2019). Hybrid Approach for Transformation for Betulin (an Anti-HIV Molecule). In V. K. Gupta, & A. Pandey (Eds.), *Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications* (pp. 193-203). Amsterdam:Elsevier.
- Li, G.-H., Zhang, K.-Q. (2014). Nematode-toxic fungi and their nematocidal metabolites. In: K. D. Hyde, & K.-Q. Zhang (eds.), *Nematode-trapping fungi* (pp. 313-375). New York: Springer.
- Lira, V. L., Costa, A. F., Moura, R. M., & Maia, L. C. (2018). *Rotylenchulus reniformis* (Nematoda: Tylenchida): biologia, identificação, patogenicidade e manejo. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, 15, 91-102.
- Lopes, C. M. L., Pimentel, R. R., & Cares, J. E. (2016). Gênero *Rotylenchulus*. In: C. M. G. Oliveira, M. A. Santos, & L. H. S. Castro (Ed.), *Diagnose de fitonematoides* (pp. 163-180). Campinas: Millennium Editora.
- Martins, C. R., Lopes, W. Ar., & Andrade, J. B. (2013). Solubilidade das substâncias orgânicas. *Química Nova*, 36(8), 1248-1255.
- Medico, E., Hende, E. V., El-Ouadi, K., & Villagra, M. M. (2018). A new terpene nematocide against root knot nematodes on solanaceous and cucurbits. *Atti, Giornate Fitopatologiche, Chianciano Terme (SI). Bologna: CABI international*.
- Meyer, M. C., Mazaro, S. M., & da Silva, J. C. (2019). *Trichoderma*: uso na agricultura. Brasília, DF: *Embrapa Soja-Livro científico*.
- Mittmann, L. M. (2017). Controle biológico: bem-vindos inimigos (naturais). *Revista A Granja*, 73(823), 1-15.
- Moura, A. P. (2015). *Manejo Integrado de Pragas: Estratégias e Táticas de Manejo para o Controle de Insetos e Ácaros-praga em Hortaliças*. Brasília, DF: Embrapa.

Musila, M. F., Dossaji, S. F., Nguta, J. M., Lukhoba, C. W., & Munyao, J. M. (2013). In vivo antimalarial activity, toxicity and phytochemical screening of selected antimalarial plants. *Journal of ethnopharmacology*, 146(2), 557-561.

Nascimento, D. (2018). Inimigo oculto: Como reconhecer e controlar populações de nematoides no solo e nas culturas. *Revista Canavieiros*, 139, 90-94.

Parasuraman, P., & Siddhardha, B. (2019). Natural Value-Added Compounds from Fungal Communities. In A.N. Yadav, S. Mishra, S. Singh, A. Gupta (Eds.), *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi* (pp. 177-193).

Switzerland:Springer.

Rocha, T. L., Evaristo, R.G.S., Sá, M. F. G., Souza, D. S. L., Silva, M. C. M., Polez, V. L. P., Roessner, U., & Bacic, T. (2017). *Nematotoxic composition of synergistic effect, use of a nematotoxic composition of synergistic effect. U.S. Patent No. 9,750,247. Washington, DC:U.S.*

Salas, P.M., Céliz, G., Geronazzo, H., Daz, M., Resnik, S.L. (2011). Antifungal activity and enzymatically – modified flavonoids isolated from citrus species. *Food Chemistry*, 124, 1411-1415.

Scervino, J. M., Ponce, M. A., Rosa, E. B., Vierheilig, H., Ocampo, J. A., & Godeas, A. (2005). Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycological Research*, 109(7), 789-794.

Vizzotto, M., Krolow, A. C. R., & Weber, G. E. B. (2010). *Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado.

CONCLUSÃO

Este estudo mostrou a eficiência de filtrados produzidos a partir de culturas fúngicas como forma de controle alternativo para prevenir perdas ocasionadas por *Rotylenchulus reniformis*.

De acordo com os objetivos e metodologia proposta foi possível identificar oito isolados fúngicos que produziram metabólitos com potencial nematicida e ovicida, tanto em experimento *in vitro* quanto em testes realizados em casa de vegetação com plantas de coentro e feijão-caupi ao fitopatógeno em estudo. Também foram identificados os principais grupos a que pertencem os metabólitos que apresentaram efeitos antagônicos à *R. reniformis*. Paralelamente, foi realizada a caracterização morfológica, molecular e raça de 11 populações deste nematoide.

O controle biológico, embora ainda se apresenta como uma técnica pouco empregada, é uma prática de alta eficiência, praticidade e segurança ambiental, além da possibilidade de contribuir para a formulação de novos compostos menos tóxicos ao meio ambiente e com amplo modo de ação. Pesquisas sobre biocontrole de *R. reniformis* são limitadas, necessitando de mais estudos. Dessa forma, informações básicas como identificação e biologia do nematoide, assim como estudos de interação parasita-hospedeiro são essenciais para assegurar a forma de manejo mais apropriada para o controle populacional de cada espécie de fitonematoide.

REFERÊNCIAS

- ABCSEM. Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas. Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/docs/>. Acesso em 18 de maio de 2017.
- ADAM, M.; DIAB, S. F.; FARAHAT, A.; ALSAYED, A. A.; HEUER, H. molecular identification, race detection, and life cycle of *Rotylenchulus reniformis* in egypt. *Nematropica*, v. 48, n. 1, p. 59-67, 2018.
- AL-BANNA, L.; PLOEG, A. T.; WILLIAMSON, V. M.; KALOSHIAN, I. Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species specific. *Journal of Nematology*, v. 36, p. 142-146, 2004.
- ALCANTARA, V. S. B.; AZEVEDO, J. L. Toxicity of fungal filtrates to the nematodes *Rotylenchulus reniformis*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 5, p. 201-206, 1980.
- ALDINA R. F.; INDARTI, S.; WIBOWO A. Pathogenicity of Nematofagous Fungus for Control of *Pratylenchus coffeae* Nematodes on Coffee Plants. In: Isnansetyo A., Nuringtyas T. (eds) Proceedings of the 1st International Conference on Tropical Agriculture. Springer, Cham, 2017. p. 243-251.
- AL-HAZMI, A.S.; TARIQJAVEED, M. Efeitos de diferentes densidades de inóculo de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride* sobre *Meloidogyne javanica* em tomateiro. *Revista Saudita de Ciências Biológicas*, v. 23, n. 2, p.288-292, 2016.
- ALI, H. H. A. Nematicidal action of fungal culture filtrates. *Japanese Journal of Nematology*, v. 20, p. 1-7, 1990.
- ASKARY, T. H. Nematophagous fungi as biocontrol agents of phytonematodes. In ASKARY, T. H.; MARTINELLI, P. R. P. (Eds.). *Biocontrol Agents of Phytonematodes*. CABInternational, Wallingford, Oxfordshire, UK, 2015. p. 81-125.
- ASMUS, G. L. Ocorrência e manejo do Nematóide Reniforme em Mato Grosso do Sul. In: *TECNOLOGIA e produção: soja - milho 2008/2009*. 5. ed. Maracaju: Fundação-MS, 2008. 123-125.
- ASMUS, G. L.; ISHIMI, C. M. Flutuação populacional de *Rotylenchulus reniformis* em solo cultivado com algodoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 44, n. 1, p. 51- 57, 2009.

- ASMUS, G. L.; LAMAS, F. M. Avaliação da tolerância de cultivares de algodoeiro ao nematóide reniforme. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 6., 2007, Uberlândia. O algodão como oportunidade de negócios: resumos. Uberlândia: ABRAPA: AMIPA: Embrapa Algodão, 2007. p. 118 Painel 191.
- BAE, C. R.; ROBBINS, T.; SZALANSKI, A. L. Secondary structure models of D2-D3 expansion segments of 28S rRNA for *Hoplolaimina* species. *Journal of Nematology*, v. 42, n. 3, p. 218-229, 2010.
- BARROS, A. H. C.; TABOSA, J. N.; ANDRADE JÚNIOR, A. S.; SILVA, A. A. G.; SANTOS, J. C. P.; AMARAL, J. A. B.; LACERDA, F. F.; SILVA, A. C.; BASTOS, L. O. P. Zoneamento de risco climático para cultura do feijão-caupi no estado de Pernambuco. Embrapa Documentos. 2005.
- BLOK, V. C.; POWERS, O. Biochemical and molecular identification. In: PERRY, R.; MOENS, M.; STARR, J. L. (eds.) *Root-knot Nematodes*, Wallingford, CABI International, p. 98 - 118, 2009.
- BOKHARI, F. M. Efficacy of some *Trichoderma* species in the control of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, v. 42, p. 361-369, 2009.
- BRUSCA, R.C.; G.J. BRUSCA, 2007. *Invertebrados*. 2ª. ed Rio de Janeiro. Editora Guanabara-Koogan, 968 pp.
- CANTALAPIEDRA-NAVARRETE, C.; NAVAS-CORTÉS, J. A.; LIÉBANAS, G.; VOVLAS, N.; SUBBOTIN, S. A.; PALOMARES-RIUS, J. E.; CASTILLO, P. Comparative molecular and morphological characterisations in the nematode genus *Rotylenchus*: *Rotylenchus paravitis* n. sp., an example of cryptic speciation. *Zoologischer Anzeiger*, v. 252, p. 246–268, 2013.
- CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A. GODOY, C. V. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. *Revista Brasileira de Agrocomputação*, v.1, n.2, p.18-24. 2001.
- CHEN SY; DICKSON, DW. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, v. 32, p. 117-121, 2000.

- CHEN, S; DICKSON, D. W. Biocological control of nematodes by fungal antagonists. In: CHEN, Z; CHEN, S.; DICKSON, D. W. (Eds.). *Nematology – Advances and perspectives*, v. 2: Nematode Management and utilization. Tsinghua: University Press; CABI Publishing, 2004. p. 979-1039.
- CLARK, F. E. Agar-plate method for total microbial count. In: BLACK, C. A. et al. (Ed.). *Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties*. Madison: American Society of Agronomy, 1965. p. 1460-1466.
- COOLEN, W.A.; D'HERDE, C.J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent: State Nematology and Entomology Research Station, 1972. 77p.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2017/18, sétimo levantamento, v. 5, n. 7. Brasília, DF, 2018. 144 p.
- CORDEIRO, M. C. R.; GOULART, A. M. C.; COSTA, A. M. SHARMA, R. D. Identificação molecular de nematoides das galhas, *Meloidogyne* spp. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. 20 p. (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 219).
- COSTA, M. J. N.; CAMPOS, V. P.; PFENNING, L. H.; OLIVEIRA, D. F. Toxicidade de filtrados fúngicos a *Meloidogyne incognita*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 26, n. 4, p. 749-755, 2001.
- DASGUPTA, D. R.; RASKI, D. J.; SHER, S. A. A revision of the genus *Rotylenchulus* Linford & Oliveira, 1949. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, v. 35, p. 169-92, 1968.
- DECRAEMER, W.; HUNT, D. J. Structure and classification. In: Perry, R. N.; Moens, M. (eds). *Plant Nematology*. Wallingford, Oxfordshire, Reino Unido: CAB International, 2013. p. 3-39.
- DEGENKOLB, T.; AND VILCINSKAS, A. Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part I: Metabolites from nematophagous ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, p. 3799-3812, 2016a.

DEGENKOLB, T.; AND VILCINSKAS, A. Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part II: Metabolites from nematophagous ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, 3813-3824, 2016b.

DI, X.; TAKKEN, F. L. W.; TINTOR, N. How Phytohormones Shape Interactions between Plants and the Soil-Borne Fungus *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Plant Science*, 7. 2016

DIAS, W. P.; GARCIA, A.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, G. E. S. Nematoides em soja: identificação e controle. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 8 p. (Circular Técnica 76).

DVORA, H., KOFFAS, M.A.G. In: McNeil, B.; Archer, D.; Giavasis, I.; Harvey, L. (ed). 1° Ed. Microbial production of flavonoids and terpenoids. *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals*. Cambridge: Elsevier, 2013. Chap. 10, p. 234-261.

FERRAZ, L. C. C.B., BROWN, D. J. F. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. 1ed., Manaus: Norma Editora, 2016. 251p.

FERREIRA, P. A.; FERRAZ, S.; LOPES, E. A.; FREITAS, L. G. Parasitismos de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo de compatibilidade entre isolados fúngicos. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 2, n. 3, p.15, 2008.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; DIAS-ARIEIRA, C. R. Manejo sustentável de fitonematoides, 1 ed., Viçosa: Editora UFV, 2010. 306 p.

FERRAZ, S.; SANTOS, M. A. Controle biológico de fitonematoides pelo uso de fungos. *Revisão Anual de Proteção de Plantas*, v. 3, p. 283-314, 1995.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Base de dados Faostat. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 27abr. 2018.

GARDIANO, C. G.; KRZYZANOWSKI, A. A.; SAAB, O. J. G. A. Hospedabilidade de plantas melhoradoras de solo à *Rotylenchulus reniformes* Linford e Oliveira (1940). *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v. 79, n. 2, p. 313-317, 2012.

- GILLESPIE, J.; CANNONE, J.; GUTELL, R.; COGNATO, A. A secondary structural model of the 28S rRNA expansion segments D2 and D3 from root worms and related leaf beetles. *Insect Molecular Biology*, v. 13, p. 495-518, 2004.
- GIROTTI, M. J.; AQUINO, L. F. B.; PEREZ, R. B. NEVES, M. F.; SACCO, S. R. O uso de fungos nematófagos no controle biológico de nematoides parasitas: revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v.10, n.6, p.1-7. 2008.
- GOULART, A. M. C. Ecologia e biodiversidade de nematoide: parte II. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v. 18, p. 220-275, 2010.
- GRIFFITHS, R.; WHITELEY, A.S.; O'DONNELL, A.G., BAILEY, M.J. Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA and rRNA-Based Microbial Community Composition. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 66, n. 12, p. 5488–5491, 2000.
- HAEGERBAEUMER, A.; HÖSS, S.; HEININGER, P.; TRAUNSPURGER, W. Response of nematode communities to metals and PAHs in freshwater microcosms. *Ecotoxicology and environmental safety*, v.148, p. 244-253, 2018.
- HORTIVALE. Hortivale - Sementes do Vale Ltda. 2018. Disponível em: <http://www.hortivale.com.br/>. Acesso em: 02 de maio de 2018.
- HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter*, v. 57, p.1025-1028, 1973.
- INSERRA, R. N.; DUNN, R. A.; VOVLAS, N. Host response of ornamental palms to *Rotylenchulus reniformis*. *Journal of Nematology*, v. 26, n. 4S, p. 737-743, 1994.
- JANSSON, H-B.; TUNLID, A.; NORDBRING-HERTZ, B. Biological control: Nematodes. In: ANKE, T. Ed. *Fungal Biotechnology*. Weinheim: Chapman and Hall, 1997. p. 38-50.
- JATALA, P. Reniform and false root-knot nematodes, *Rotylenchulus* and *Nacobbus* spp. In: NICKLE, W.R. (Ed.) *Manual of agricultural nematology*. New York. Marcel Dekker, 1991. p.509-528.
- JENKIN, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, v. 48, p. 692, 1964.

JONES, J. T.; HAEGEMAN, A.; DANCHIN, E. G.; GAUR, H. S.; HELDER, J.; JONES, M. G. K.; KIKUCHI, T.; MANZANILLA-LÓPEZ, R.; PALOMARES-RIUS, J. E.; WESEMAEL, W. M. L.; PERRY, R. N. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, v.14, p. 946–961, 2013.

JULIÃO, L.; SALES, C. C. N.; RASERA, G. B. STRANGUETTI, M. P. Hortifruti Brasil: Ervas & Especiarias: O complemento que faz a diferença! Piracicaba: Cepea, 2015. 38 p. Disponível em: <<http://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/ervas-especiarias-o-complemento-que-faz-a-diferenca.aspx>>. Acesso em: 26 maio 2016.

KHAN, T. A.; AZAM, M. F.; HUSAIN, S. I. Effect of fungal filtrates of *Aspergillus niger* and *Rizoctonia solanion* penetration and development of root-knot nematodes and the plant growth to tomato var. Marglobe, Indian, *Journal of Nematology*, v. 14, p. 106-109, 1984.

KHAN, T. A.; HUSAIN, S. I. Effect of culture filtrates of soil fungi on the mortality and hatching of reniform nematode (*Rotylenchulus reniformis*). *Indian Journal of Nematology*, v. 19, p. 35-40, 1989.

KHANAL, C.; MCGAWLEY, E. C.; OVERSTREET, C.; STETINA, S. R. The Elusive Search for Reniform Nematode Resistance in Cotton. *Phytopathology*, v. 108, p. 532-541, 2018.

KOENNING, S. R.; KIRKPATRICK, T. L.; STARR, J. L.; WRATHER, J. A.; WALKER, N. R.; MUELLER, J. D. Plant-parasitic nematodes attacking cotton in the United States: old and emerging production challenges. *Plant Disease*, v. 88, n.2, p. 100-113, 2004.

KUBO, R. K.; MACHADO, A. C. Z.; OLIVEIRA, C. M. G. Nematoides fitoparasitos da bananeira. In: NOGUEIRA, E. M. C.; ALMEIDA, I. M. G.; FERRARI, J. T.; BERIAM, L. O. S. (Ed.). Bananicultura: manejo fitossanitário e aspectos econômicos e sociais da cultura. São Paulo: Instituto Biológico, 2013. p. 136-163.

LAMBSHEAD, P. J. D. Recent developments in marine benthic biodiversity research. *Oceanis*, v. 19 n. 6, p. 5-24, 1993.

LAWRENCE, G. W.; KING, R.; ELLIS, G. R.; DOSHI, R.; LAWRENCE, K. S.; SAMSON, S.; CACERES, C. Population Estimation of the Reniform Nematode Using Hyperspectral Reflectance Data and Applications to Variable Rate Nematicide

Applications. Proceedings of the National Beltwide Cotton Conference, National Cotton Council. Memphis, TN. 1. 2007.

LI, G.-H.; ZHANG, K.-Q. Nematode-Toxic Fungi and their Nematicidal Metabolites. *Nematode-Trapping Fungi*, v. 23, n. 1, p. 313-375, 2014.

LIU, T.; MEYER, S. L. F.; CHITWOOD, D. J.; CHAUHAN, K. R.; DONG, D.; ZHANG, T.; LI, J.; LIU, W. C. New Nematotoxic Indoloditerpenoid Produced by *Gymnoascus reessii* za-130. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, n.15, p. 3127-3132, 2017.

LIU, J.-H.; WANG, L.; QIU, J.-Y.; JIANG, L.-L.; YAN, J.-Y.; LIU, T.; LIU, W.-C.; DUAN, Y.-X. Nematicidal activity of *Gymnoascu reesii* against *Meloidogyne incognita*. *African Journal of Microbiology Research*, v. 5, n.18, p. 2715-2719, 2011.

LOPES, E. A.; FERRAZ, S.; FERREIRA, P. A.; FREITAS, L. G.; DHINGRA, O. D.; GARDIANO, C. G.; CARVALHO, S. L. Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira*, v. 31, n. 2, p.78-84, 2007.

LOPES, C. M. L.; PIMENTEL, R. R.; CARES, J. E. Gênero *Rotylenchulus*. In: OLIVEIRA, C.M.G.; SANTOS, M.A.; CASTRO, L.H.S. Diagnose de fitonematoides. Campinas: Millennium Editora, 2016. Cap. 8, p.163-180.

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

MELO, R.A.; MENESES, D.; RESENDE, L.V.; WANDERLEY JÚNIOR, L.J.G.; MELO, P.C.T.; SANTOS, V.F. Caracterização morfológica de genótipos de coentro. *Horticultura Brasileira*, v. 27, p. 371-376, 2009.

MOURA, R. M. Um sistema integrado de controle de fitonematoides da cana-de-açúcar para o nordeste. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*, Recife, v. 7, p. 50-61, 2010.

MOURA, R M.; MARANHAO, S. R. V. L.; GUIMARAES, L. M. P. Soursop, a new host of *Rotylenchulus reniformis*. *Fitopatologia Brasileira*, v.30, n.4, p.437-437, 2005.

MOURA, R.M; PEDROSA, E.M.R.; GUIMARÃES, L.M.P. Nematoses de alta importância econômica da cultura do melão no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, p.225, 2002.

MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R; MARANHÃO, E. A. A; REIS, O. V. O nanismo do coentro, uma nova doença causada pelo nematoide *Rotylenchulus reniformis*. *Nematologia Brasileira*, v. 21, p. 13-22, 1997.

MOURA, R. M.; SILVA, J. V. C. L. LIRA, V. L. "SP 70-1011: genótipo de cana-de-açúcar para uso em rotação de culturas no controle do nematoide-reniforme. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*, v. 13, n.1, 257-265, 2018.

NASCIMENTO, D. Inimigo oculto: Como reconhecer e controlar populações de nematoides no solo e nas culturas. *Revista Canavieiros*, 139: 90-94, 2018.

NUNES, H. T. Agentes microbianos no controle de nematoides e fungos fitopatogênicos de soja e sua compatibilidade com agroquímicos. 2008. 75 f. Tese (Doutorado) Curso de Microbiologia Agropecuária., Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, 2008.

NYAKU, S. T.; KANTETY, R. V.; TILAHUN, Y.; LAWRENCE, K. S.; SOLIMAN, K. M.; CEBERT, E.; SHARMA, G. C. 18S and ITS1 Genomic Sequence Variations in *Rotylenchulus reniformis* Isolates from Alabama. *The Journal of Cotton Science*, v. 17, p. 184-194, 2013.

OLIVEIRA, C. M. G. Aplicação conjunta de técnicas moleculares e taxonomia clássica na resolução de problemas taxonômicas de nematoides. *Tropical Plant Pathology*, v.35, p. 58, 2010.

OLIVEIRA, C. M. G.; MONTEIRO, A. R.; BLOK, V. C. Morphological and molecular diagnostics for plant-parasitic nematodes: working together to get the identification done. *Tropical Plant Pathology*, v. 36, n. 2, p. 65-73, 2011.

PARK, H. W.; KIM, H. H.; KIM, D. H.; CHO, M. R.; KIM, J. C.; SHIN, T. S.; LEE, S. I.; YOON, J. B. Biocontrol potential of *Myrothecium roridum* Tode ex Fr.(Hypocreales: Incertae sedis) against root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood (Tylenchida: Heteroderidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, v. 19, n. 2, 447-450, 2016.

- PATIL, J.; SHARMA, M. K.; YADAV, S. Management of reniform nematode, *Rotylenchulus reniformis* on cowpea by using botanicals. Indian Journal of Ecology, v. 43, n. 2, p. 613-614, 2016.
- PIMENTEL, M. S.; PEIXOTO, A. R.; PAZ, C. D. Potencial de controle biológico de *Meloidogyne* utilizando fungos nematófagos e bactérias em cafeeiros. Coffee Science, v. 4, n. 1, p. 84-92, 2009.
- POWERS, T. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. Annual Review of Phytopathology, v. 42, p. 367-383, 2004.
- REIS, A.; LOPES, C. A. Doenças Do coentro no Brasil. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2016. 6 p. (Circular Técnica 157).
- REZENDE, F. M. de; ROSADO, D.; MOREIRA, F. A.; de CARVALHO, W. R. S. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. Laboratório de Ensino de Botânica, p. 93, 2016.
- RITZINGER, C. H. S. P.; FANCELLI, M. Manejo integrado de nematoides na cultura da bananeira. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 28, n. 2, p. 331-338, 2006.
- ROBERTS, D.; OLIVEIRA, C. M. G.; NEILSON, R.; BLOK, V. Diagnose molecular de nematoides parasitos de plantas. In: OLIVEIRA, C.M.G.; SANTOS, M.A.; CASTRO, L.H.S. Diagnose de fitonematoides. Campinas: Millennium Editora, 2016. Cap. 14, p.281-324.
- ROBINSON, A. F.; INSERRA, R. N.; CASWELL-CHEN, E. P.; VOVLAS, N.; TROCCOLI, A. *Rotylenchulus* species: identification, distribution, host ranges, and crop plant resistance. Nematropica, v. 27, p. 127-180, 1997.
- RUMJANEK, N.G.; MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.P. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F.R.; ARAUJO LIMA, J.A.; SILVA, P.H.S.; RIBEIRO, V.Q. (Ed.). Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p.279-335.
- SANTIN, R. C. M. Potencial do Uso dos Fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no Biocontrole de *Meloidogyne incógnita* em *Phaseolus vulgaris*. 2008. 91 p. Tese (Doutorado em Fitossanidade) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

- SILVA, G. H.; OLIVEIRA, D. F.; CAMPOS, V. P. Purificação de metabólitos fúngicos com efeitos tóxicos sobre *Meloidogyne incognita*. Fitopatologia Brasileira. v. 27. n. 6. p. 594-598. 2002.
- SILVA, S. D.; CARNEIRO, R. M. D. G.; FARIA, M.; SOUZA, D. A.; MONNERAT, R. G.; LOPES, R. B. Evaluation of *Pochonia chlamydosporia* and *Purpureocillium lilacinum* for Suppression of *Meloidogyne enterolobii* on Tomato and Banana. Journal of Nematology, p. 49, n.1, p.77-85, 2017.
- SILVA, K. J. D.; ROCHA, M. M.; MENEZES JUNIOR, J. A. de. Socioeconomia. In: BASTOS, E. A. (Coord.). A cultura do feijão-caupi no Brasil. Teresina: EMBRAPA Meio Norte, 2016. p. 6-12.
- SOARES, P. L. M. Estudo do controle biológico de fitonematoides com fungos nematófagos. 2006. 217 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- STIRLING, G. R. Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects. Wallingford: CAB International, 1991, 282p.
- TORRES, G. R. C.; PEDROSA, E. M. R.; SIQUEIRA, K. M. S.; MOURA, R. M. Response of cucurbit species to *Rotylenchulus reniformis*. Fitopatologia Brasileira, v.30, n.1, p.85-87, 2005.
- VAN DEN BERG, V.; PALOMARES-RIUS, J. E.; VOVLAS, N.; TIEDT, L. R.; CASTILLO, P.; SUBBOTIN, S. A. Morphological and molecular characterisation of one new and several known species of the reniform nematode, *Rotylenchulus* Linford & Oliveira, 1940 (Hoplolaimidae: Rotylenchulinae), and a phylogeny of the genus. Nematology, v. 18, p. 67-107, 2016.
- ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology, v. 7, n. 1-2, p. 203-214, 2000.
- ZHANG, Y.; MATAFEO, A.; SHI, H.-L.; ZHENG J.-W. Morphological and molecular characterization and host range of *Rotylenchulus reniformis* population occurring in Hangzhou, Zhejiang, China, Acta Phytopathologica Sinica, v. 41, n. 1, n. 37-43, 2011.
- ZHANG, Z.-Q. Animal biodiversity: An update of classification and diversity in 2013. Zootaxa, v.1, p. 5-11, 2013.

ANEXO A - Trabalhos publicados em periódicos durante o doutorado

1. **LIRA, V. L.**; SANTOS, A. C. S.; TIAGO, P. V.; OLIVEIRA, N. T.; MOURA, R. M. Hiperparasitismo de *Fusarium* spp. em *Austropuccinia psidii* em Jambo-do-Pará. SUMMA PHYTOPATHOLOGICA, v.45, p.204 - 206, 2019.
2. SANTOS, D. V.; **LIRA, V. L.**; MOURA, R. M. Efeitos de Metabólitos de *Trichoderma* spp. no Biocontrole de *Meloidogyne enterolobii*. ANAIS DA ACADEMIA PERNAMBUCANA DE CIÊNCIA AGRONÔMICA, v. 16, p. 131-142, 2019.
3. MOURA, R. M.; **LIRA, V. L.** Predação de *Arthrobotrys dactyloides* (Ascomycota: Orbiliaceae) sobre *Pratylenchus coffeae* (Nematoda: Pratylenchidae) em Inhame-da-Costa. ANAIS DA ACADEMIA PERNAMBUCANA DE CIÊNCIA AGRONÔMICA, v.15, p.153 - 158, 2018.
4. **LIRA, V. L.**; COSTA, A. F.; MOURA, R. M.; MAIA, L. C. *Rotylenchulus reniformis* (Nematoda: Tylenchida): Biologia, Identificação, Patogenicidade e Manejo. ANAIS DA ACADEMIA PERNAMBUCANA DE CIÊNCIA AGRONÔMICA, v.15, p.91 - 102, 2018.
5. AMARAL, A. C. T.; **LIRA, V. L.**; MOURA, R. M.; TIAGO, P. V.; OLIVEIRA, N. T. Biocontrole de espécies de *Trichoderma* sobre *Meloidogyne enterolobii*. ANAIS DA ACADEMIA PERNAMBUCANA DE CIÊNCIA AGRONÔMICA, v.15, p.159 - 166, 2018.
6. MOURA, R. M.; **LIRA, V. L.**; SANTOS, A. C. S.; MELO, R. F. R. *Cordyceps* sp. (Ascomycota: Hypocreales) Parasitism on Ant in the Northeast of Brazil. ANAIS DA ACADEMIA PERNAMBUCANA DE CIÊNCIA AGRONÔMICA, v.15, p.169 - 172, 2018.
7. MOURA, R. M.; **LIRA, V. L.**; SANTOS, D. V.; PEREIRA, R. C. A. Dois casos de Ferrugem-Negra assinalados no estado de Pernambuco, Brasil. ANAIS DA ACADEMIA PERNAMBUCANA DE CIÊNCIA AGRONÔMICA, v.15, p.137 - 145, 2018.
8. **LIRA, V. L.**; MOURA, R. M. Gramíneas e leguminosas para o controle do nematoide *Pratylenchus coffeae*. ANAIS DA ACADEMIA PERNAMBUCANA DE CIÊNCIA AGRONÔMICA, v.13, p.191 - 199, 2016.
9. MOURA, R. M.; SILVA, J. V. C. L. E.; **LIRA, V. L.** SP 70-1011: genótipo de cana-de-açúcar para uso em rotação de culturas no controle do nematoide-

reniforme. ANAIS DA ACADEMIA PERNAMBUCANA DE CIÊNCIA AGRONÔMICA.,
v.13, p.257 - 265, 2016.

ANEXO B – Instruções *European Journal of Plant Pathology*

Instructions for Authors

Online Manuscript Submission

Springer now offers authors, editors and reviewers of *European Journal Plant Pathology* the option of using our fully web-enabled online manuscript submission and review system. To keep the review time as short as possible (no postal delays!), we encourage authors to submit manuscripts online to the journal's editorial office. Our online manuscript submission and review system offers authors the option to track the progress of the review process of manuscripts in real time. Manuscripts should be submitted to: <http://ejpp.edmgr.com>; The online manuscript submission and review system for *European Journal of Plant Pathology* offers easy and straightforward log-in and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats: for manuscripts - Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX; for figures - TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript.

NOTE: By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also in printout + disk.

In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript on line, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the tool bar.

Electronic figures

Electronic versions of your figures must be supplied. For vector graphics, EPS is the preferred format. For bitmapped graphics, TIFF is the preferred format. The following resolutions are optimal: line figures - 600 - 1200 dpi; photographs - 300 dpi; screen dumps - leave as is. Colour figures can be submitted in the RGB colour system. Font-related problems can be avoided by using standard fonts such as Times Roman, Courier and Helvetica.

Colour figures

Colour figures are free of charge. Please indicate at submission which figures should be printed in colour.

Language

We appreciate any efforts that you make to ensure that the language is corrected before submission. This will greatly improve the legibility of your paper if English is not your first language.

General

No page charges are applicable, but prospective authors should condense their text as much as possible. The *European Journal of Plant Pathology* welcomes research papers, review papers and short communications. Fifty offprints will be supplied free of charge. Research papers describing original research should address biological problems. They should contain a novel and well formulated hypothesis, a sound experimental approach, results that confirm or reject the hypothesis and should offer novel insight into the existing body of knowledge. Research papers should not exceed twenty pages of printed text, including tables, figures and references (one page of printed text = approximately 600 words). The Short communication format is intended for presentation of important observations that can be clearly described in an abbreviated format. For example, molecular data useful for typing pathogens or the first report of preliminary data would be suitable for this section. Short descriptions of genes isolated from pathogens and pest organisms, and of plant genes with a putative function in plant–pathogen interactions can also be presented in the Short communication format. Short communications should contain firm data and will be refereed. A short communication should have an abstract and should not exceed four printed pages in total. There are no subheadings and a description of Materials and methods should be integrated in the text. Authors who wish to submit a review should first contact the Editorial Office or the Editor-in-Chief, since only Mini reviews on topical issues will be considered for publication. Reviews should not exceed 12 pages of printed text, including Tables, Figures, and References. Papers already published or in press elsewhere will not be accepted. If any part of the subject matter or experiments included in a manuscript submitted to the journal has been the subject of any prior publication, this prior publication must be identified. Papers of restricted local importance will not be accepted. Manuscripts should be written in standard English. Manuscripts should be typed clearly, double-spaced throughout on with margins of 3–5 cm. All pages

(including the Tables, Figures, Legends and References) should be numbered consecutively. As a guide for acceptable style please consult recent issues of the journal and the Council of Biology Style Manual, 6th edition (1987), available from the American Institute of Biological Sciences, 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814, USA. Failure to comply with these instructions will delay consideration of the manuscript.

Authors are invited to submit the names of at least four suitable referees who would be competent to provide a review of their paper; however the final choice of referees will be at the discretion of the editor.

The manuscript should be arranged in the following order:

Title Page

The title should be brief but informative.

the Author's full name (if more than one, use 'and' before the last name and indicate to whom correspondence should be addressed).

Affiliation(s)/Address(es) should be complete, and should include a fax number and E-mail address for correspondence.

Key words/Abstract/Abbreviations

Key words (a maximum of 6, in alphabetical order, suitable for indexing). Key words should differ from words mentioned in the title.

Abstract (brief and informative, not to exceed 250 words). No abbreviations should be used in the abstract. Abbreviations (arranged alphabetically; only those which are not familiar and/or commonly used).

Main Text

The text must be developed under the following headings:

- Introduction
- Materials and methods
- Results
- Discussion

The relative importance of headings and subheadings should be clear.

The approximate location of Figures and Tables should be indicated in the margin.

References

Authors are requested to limit the number of references listed in full scientific papers and short communications to 35. This limit may be exceeded in review articles, or at the discretion of the editor where the subject matter of a paper justifies more than the limit.

1. Journal article:

Barlow, D. H. & Lehman, C. L. (1996). Advances in the psychosocial treatment of anxiety disorders.

Archives of General Psychiatry, 53, 727-735

2. Book chapter:

Cutrona, C. E. & Russell, D. (1990). Type of social support and specific stress: Towards a theory of optimum matching. (In I.G. Sarason, B. R. Sarason, & G. Pierce (Eds.), *Social support: An interactional view* (pp. 341-366). New York: Wiley.)

3. Book, authored:

Capland, G. (1964). *Principles of preventive psychiatry*. (New York: Basic Books)

4. Book, edited:

Felner, R. D., Jason, L. A., Moritsugu, J. N. & Farber, S. S. (Eds.) (1983). *Preventive psychology: Theory, research and practice*. (New York: Pergamon Press)

5. Paper presented at a conference:

Phelan, J. C., Link, B. G., Stueve, A. & Pescosolido, B. A. (1996, November). *Have public conceptions of mental health changed in the past half century? Does it matter?* (Paper presented at the 124th Annual Meeting of the American Public Health Association, New York)

6. Patent:

Name and date of patent are optional

Norman, L. O. (1998) Lightning rods. US Patent 4,379,752, 9 Sept 1998

7. Dissertation:

Trent, J.W. (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

8. Published and In press articles with or without DOI:

8.1 In press

Wilson, M., et al. (2006). References. In: Wilson, Mm (ed) *Style manual*. Springer. (Berlin Heidelberg New York: Springer) (in press)

8.2 Article by DOI (with page numbers)

Slifka, M. K.& Whitton, J. L. (2000). Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Journal of Molecular Medicine* 78,74–80. DOI 10.1007/s001090000086

8.3 Article by DOI (before issue publication with page numbers)

Slifka, M. K. & Whitton, J, L, (2000), Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Journal of Molecular Medicine* (in press). DOI 10.1007/s001090000086

8.4 Article in electronic journal by DOI (no paginated version)

Slifka, M. K.& Whitton, J. L. (2000). Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Journal of Molecular Medicine*. DOI 10.1007/s801090000086

9. Internet publication/Online document

9.1. Internet articles based on a print source

VandenBos, G., Knapp, S., & Doe, J. (2001). Role of reference elements in the selection of resources by psychology undergraduates [Electronic version]. *Journal of Bibliographic Research*, 5, 117-123.

VandenBos, G., Knapp, S., & Doe, J. (2001). Role of reference elements in the selection of resources by psychology undergraduates. *Journal of Bibliographic Research*, 5, 117-123. Retrieved October 13, 2001, from <http://jbr.org/articles.html>

9.2. Article in an Internet-only journal

Fredrickson, B. L. (2000, March 7). Cultivating positive emotions to optimize health and well-being. *Prevention & Treatment*, 3, Article 0001a. Retrieved November 20, 2000, from <http://journals.apa.org/prevention/volume3/pre0030001a.html>

9.3. Article in an Internet-only newsletter

Glueckauf, R. L., Whitton, J., Baxter, J., Kain, J., Vogelgesang, S., Hudson, M., et al. (1998, July). Videocounseling for families of rural teens with epilepsy -- Project update. *Telehealth News*,2(2). Retrieved from <http://www.telehealth.net/subscribe/newslettr4a.html>

9.4. Stand-alone document, no author identified, no date

GVU's 8th WWW user survey. (n.d.). Retrieved August 8, 2000, from <http://www.cc.gatech.edu/gvu/usersurveys/survey1997-10/>.

Electronic copy of a journal article, three to five authors, retrieved from database.

Borman, W. C., Hanson, M. A., Oppler, S. H., Pulakos, E. D., & White, L. A. (1993). Role of early supervisory experience in supervisor performance. *Journal of Applied Psychology*, 78, 443-449. Retrieved October 23, 2000, from PsycARTICLES database

Figures

All photographs, graphs and diagrams should be referred to as a 'Figure' and they should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Multi-part figures ought to be labelled with lower case letters (a, b, etc.). Please insert keys and scale bars directly in the figures. Relatively small text and great variation in text sizes within figures should be avoided as figures are often reduced in size. Figures may be sized to fit approximately within the column(s) of the journal. Provide a detailed legend (without abbreviations) to each figure, refer to the figure in the text and note its approximate location in the margin. Please place the legends in the manuscript after the references.

Tables

Each table should be numbered consecutively (1, 2, etc.). In tables, footnotes are preferable to long explanatory material in either the heading or body of the table. Such explanatory footnotes, identified by superscript letters, should be placed immediately below the table. Please provide a caption (without abbreviations) to each table, refer to the table in the text and note its approximate location in the margin. Finally, please place the tables after the figure legends in the manuscript.

Virus Nomenclature

ICTV approved guidelines should be used. ICTV uses italics for virus names when these are approved Species in the Genus. Examples from the potyviridae: Papaya ringspot virus (PRSV) as a Species in the Genus. Synonyms for Papaya ringspot virus, such as Watermelon mosaic virus 1 are not written in italics. Tentative Species in the Genus, i.e. Alstromeria streak virus (AlStV) are

also not in italic.

Abbreviations and Units

SI units should be used, e.g: mg, g, km, m, cm, mm, ppm, cpm, Ci(Curie), l(litre), ml, s(second), min(minute), h(hour), mol, m⁻³, kg per ha or kg ha⁻¹. The minus index form is always to be used in Tables.

- Use mg l⁻¹, not mg/l. If a non-standard abbreviation is to be used extensively, it should be defined in full on page 2 and follow the abstract.

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author by e-mail. Your response, with or without corrections, should be sent within 72 hours.

Do's

1. Consistency. Be absolutely consistent and check the use of punctuation, abbreviations, capitals and lower case in headings, spelling, etc. If possible, use the spelling checker on your computer.
2. Special characters. If the ASCII character set or the character set(s) of your wordprocessing package does not contain the special characters you need, key in a code between angle brackets,
3. and use this each and every time you want the character to appear. Make the code self-explanatory. Note: Always supply us with a list of the codes that you have used!
4. Headings. Start headings etc. flush left, with two space lines above (i.e. three Hard Returns) and one space line below (two Hard Returns). Distinguish different levels of headings and be consistent.
5. Paragraphs. Indent all paragraphs with a [TAB] code, and separate them from one another with one Hard Return.
6. Block quotations should be indented with an [Indent] code and should have one space line (i.e. two Hard Returns) above and below.
7. Equations. One-line equations without fractions can be typeset from the diskette when they are keyed in as plain text. Other equations can not be used from the diskette: they will be typeset manually from the hard copy.

8. References. Strictly follow the Instructions for Author.

Don'ts

1. Hyphenation. Do not hyphenate words at the end of a line. Use only one hyphen for words such as “well-being“, and “re-do“ and use two hyphens for sequences of dates and years such as “conference dates are 12–15 September, 1992“, “age groups between 20–30 years are welcome“, and page number indications in References, e.g. “pp. 240–243“.
2. Hard Returns. Do not use Hard Returns except when absolutely necessary, such as at the end of paragraphs, headings, etc. Otherwise, let the word wrap feature of your wordprocessor do this work for you.
3. TAB feature and Spacebar. If you need more than one space between two items, e.g. when you write in columns, always use the [TAB] feature of your wordprocessing package. Use the spacebar only for separating words from one another. Do not use the spacebar to format tables, for centering or laying out texts, or for any other form of line or page formatting.

Springer Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springers online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please click on the link below to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

ANEXO C – Instruções *Nematology*

Instructions for Authors

Scope

Nematology (*NEMY*) is an international journal for the publication of all aspects of nematological research, from molecular biology to field studies. Papers on nematode parasites of arthropods, and on soil free-living nematodes, and on interactions of these and other organisms, are particularly welcome. Research on fresh water and marine nematodes is also considered when the observations are of more general interest.

Ethical and Legal Conditions

The publication of a manuscript in a peer-reviewed work is expected to follow standards of ethical behavior for all parties involved in the act of publishing: authors, editors, and reviewers. Authors, editors, and reviewers should thoroughly acquaint themselves with Brill's publication ethics, which may be downloaded here: brill.com/page/ethics/publication-ethics-cope-compliance.

Online Submission

Authors are required to submit their manuscript online via the Editorial Manager (EM) online submission system at: editorialmanager.com/nem. First-time users of EM need to register first. Go to the website and click on the "Register Now" link in the login menu. Enter the information requested. During registration, you can fill in your username and password. If you should forget your Username and Password, click on the "send login details" link in the login section, and enter your e-mail address exactly as you entered it when you registered. Your access codes will then be e-mailed to you. Prior to submission, authors are encouraged to read the 'Instructions to Authors'. When submitting via the website, you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. A revised document is uploaded the same way as the initial submission. The system automatically generates an electronic (PDF) proof, which is then used for reviewing purposes. All correspondence, including the editor's request for revision and final decision, is sent by e-mail. Authors also have the opportunity to suggest and oppose

reviewers by submitting the names and (e-mail) addresses.

File Formats

The manuscript text should be a Rich Text Format (.rtf) file. Illustrations should be uploaded as separate files: high quality JPEG (minimum resolution 300 dpi) or TIF with LZW compression. Line figures should be at 600 dpi and can be bitmap, JPEG or TIF. Avoid assembling images in PowerPoint or Word as the quality is usually not good enough for publication.

Supplementary Media / Data Files

To support and enhance your manuscript, NEMY accepts electronic supplementary material, including supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound or video clips, large appendices, data tables and other items that cannot be included in the article PDF itself. Authors should submit the material in electronic format together with the other manuscript files and supply a concise and descriptive caption for each file. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of the broadly accepted file formats for video, audio, etc. and limit the file size (e.g., for video: max. 3 GB). Supplementary files supplied will be published online at FigShare (www.figshare.com), to which reference is made in the published article on Brill Online Books and Journals, and vice versa.

Contact Address

For any questions or problems relating to your manuscript please contact: nematology@brill.com. For eventual questions about Editorial Manager, authors can also contact the Brill EM Support Department at: em@brill.com.

Submission Requirements

Peer Review

Receipt of manuscripts will be acknowledged. Each manuscript will be reviewed by two members of the Editorial Board or other recognised authorities in the field.

Types of Contributions

Nematology publishes full research papers, short communications, Forum articles, perspectives on nematology, and reviews of books and other media. Short communications are published occasionally. They are not intended as a method of publishing unreplicated experiments or pilot studies. Short communications are not divided into sections and do not have a summary. Usually, only one table or figure is permitted. Forum articles are occasional invited contributions enabling an author to express a view or discuss a specific topic on current or fundamental subjects relevant to the remit of the journal. There is no prescribed length for Forum articles, but they are not intended as exhaustive literature reviews. Forum articles will be reviewed in the usual way.

Language

Papers must be written in English. Spelling should be consistent throughout.

Manuscript Structure

Well-presented scripts, which conform to the journal format and which are internally consistent in style, are much easier to review and edit and therefore likely to be published more readily. Observations and data may be presented in the text, in tables, or in figures, but should not be repeated; details of statistical procedures must be included. Text should be double spaced, and all pages numbered consecutively.

First Page

The first page of the manuscript should contain the title, complete name(s) of the author(s) and their professional postal addresses. Please indicate clearly the name and e-mail address of the corresponding author.

Summary and Keywords

The second page will contain a short summary and keywords, not including any used in the title.

Headings

Papers should be clearly structured with headings.

The text of the manuscript will begin at the third page and consist of an

introduction, without heading, and then Materials and methods, Results or Descriptions, Discussion, Acknowledgements, References, Tables and Figures.

Taxonomic Papers

Taxonomic papers must include full citations of all works relevant to nematode descriptions, except those that are not the principal subject of the paper. This is not usually necessary in general research papers, although the principal organisms should be given taxonomic authorities in the text. In taxonomic papers, slides with specimens must be sent if requested by referees, and type specimens must be deposited in at least one well-recognised international nematode collection. Accession numbers (e.g., GenBank) must be given for new molecular sequences.

References

References follow the Harvard System: begin with authors' names and initials, year of publication, full title of periodical, volume and page numbers; e.g.:

Jones, J.T., Furlanetto, C. & Kikuchi, T. (2005). Horizontal gene transfer from bacteria and fungi as driving force in the evolution of plant parasitism in nematodes. *Nematology* 7, 641-646. DOI: 10.1163/156854105775142919.

Give book titles in full, with place of publication, then name of publisher, e.g.:

Bird, A.F. & Bird, J. (1991). *The structure of nematodes*. New York & London, Academic Press. Theses are cited in the same way as books.

For articles in books, give authors and article title, followed by In: editors' names, book title, place of publication then publisher, and page numbers of article; e.g.:

Decraemer, W. & Hunt, D.J. (2006). Structure and classification. In: Perry, R.N. & Moens, M. (Eds). *Plant nematology*. Wallingford, UK, CABI Publishing, pp. 3-32.

References to abstracts should end with [Abstr.]

References to translations should list the title of the article between square brackets [...]

Tables and Figures

Tables

Each table should be presented separately, numbered as Table 1 (lower case, Arabic numbers) et seq. Tables constructed using the MS Word Table tool are preferred.

Figures

Figures should be submitted as separate source files in .eps, .tif, or .jpg format, in a size suitable for the typesetting area of the journal which is 170 × 210 mm. The resolution of these files should be at least 300 dpi for half-tone figures, and 600 dpi for line drawings. Number the files. The text in a figure must be legible, and should not be smaller than 7 pt. The size of this lettering for any text in a figure should be the same for all figures in the manuscript.

There should be a separate page giving the full list of figure legends, which should include any necessary keys to symbols. Scale bars on each figure or photograph should be included to indicate magnification/reduction. Colour plates can be printed if authors are willing to pay the additional per page printing costs: authors should discuss this with the Editors. Colour plates will be included on the on-line version free of charge.

Copyright

The use of general descriptive names, trademarks, etc. in this publication, even if the former are not specifically identified, is not to be taken as a sign that such names are exempt from the relevant protective Instructions to Authors' laws and regulations and may accordingly be used freely by anyone.

Publication

Proofs

Upon acceptance, a PDF of the article proofs will be sent to each author by e-mail to check carefully for factual and typographic errors. Authors are responsible for checking these proofs and are strongly urged to make use of the Comment & Markup toolbar to note their corrections directly on the proofs. At this stage in the production process only minor

corrections are allowed. Alterations to the original manuscript at this stage will result in considerable delay in publication and, therefore, are not accepted unless charged to the author. Proofs should be corrected and returned to the Editor as quickly as possible.

The Editors reserve the right to adjust the style to achieve a certain degree of uniformity.

E-offprints

A PDF file of the article will be supplied free of charge by the publisher to authors for personal use. Brill is a RoMEO yellow publisher. The Author retains the right to self-archive the submitted (pre-peer-review) version of the article at any time. The submitted version of an article is the author's version that has not been peer-reviewed, nor had any value added to it by Brill (such as formatting or copy editing). The Author retains the right to self-archive the accepted (peer-reviewed) version after an embargo period of 12 months. The accepted version means the version which has been accepted for publication and contains all revisions made after peer reviewing and copy editing, but has not yet been typeset in the publisher's lay-out. The publisher's lay-out must not be used in any repository or on any website (brill.com/resources/authors/publishing-books-brill/self-archiving-rights).

Consent to Publish

Transfer of Copyright

By submitting a manuscript, the author agrees that the copyright for the article is transferred to the publisher if and when the article is accepted for publication. For that purpose the author needs to sign the Consent to Publish which will be sent with the first proofs of the manuscript.

Open Access

Should the author wish to publish the article in Open Access he/she can choose the Brill Open option. This allows for non-exclusive Open Access publication under a Creative Commons license in exchange for an Article Publication Charge (APC), upon signing a special Brill Open Consent to Publish Form. More information on Brill Open can be found on brill.com/brillopen.