

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Dissertação

**Caracterização de populações de *Aphelenchoides besseyi* (Christie 1942),
provenientes do arroz (*Oryza sativa*) e estudo da sua patogenicidade na cultura
da soja (*Glycine max*).**

ANGÉLICA HALFEN

Pelotas, 2020

ANGÉLICA HALFEN

**Caracterização de populações de *Aphelenchoides besseyi* (Christie 1942),
provenientes do arroz (*Oryza sativa*) e estudo da sua patogenicidade na cultura
da soja (*Glycine max*).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fitossanidade (área de conhecimento: Fitopatologia).

Orientador (a): Prof. Dr. Cesar Bauer Gomes

Co-Orientador (as): Dr.^a Andressa C. Zamboni Machado e Dr.^a Luciany Favoreto

Pelotas, 2020

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cesar Bauer Gomes - Pesquisador EMBRAPA Clima Temperado
Doutor em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa.

Prof.^a Dr.^a Andressa C. Zamboni Machado - Pesquisadora IAPAR-PR
Doutora em Fitopatologia pela ESALQ

Prof. Dr. Jeronimo Vieira de Araújo Filho - Professor UFPel
Doutor em Fitopatologia pela ESALQ.

Prof. Dr. Cley Dionizeti Martins - Pesquisador Embrapa ETB
Doutor em Fitopatologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Dedico esta tese a minha mãe **Inês Halfen** pelo amor, carinho e apoio inesgotável durante todos esses anos longe de casa.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Inês Halfen, minhas irmãs Jéssica e Angelita Halfen, principalmente à minha mãe, pelo apoio inesgotável nessa jornada. Sou o fruto da tua força, bondade e dignidade, obrigado por ter lutado junto comigo em todos os momentos e pelas inúmeras vezes que você me enxergou melhor do que sou.

Aos meus amigos Paola, Danielle, Emanoela, Caroline, Fernanda, Isadora, Gabriela e demais amigos que não cito aqui, pela sincera amizade e carinho, pois através delas esta jornada se tornou muito mais valiosa e gratificante.

Aos meus queridos amigos do laboratório Wellington, Giliard, Helena, Danielle pelo incentivo e por me proporcionarem momentos de muita alegria.

Aos professores Cesar Gomes e Jeronimo Araujo por suas inestimáveis contribuições em minha formação profissional, na forma de ensinamentos, dedicação e apoio. Principalmente ao professor e orientador Cesar por me dar a oportunidade de mostrar meu potencial e acreditar no meu trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo, à Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, representada pelos professores que se dedicam ao ensino, buscando qualificação e profissionalismo dos alunos.

Visão sem ação não passa de um sonho. Ação sem visão é só um passatempo. Visão com ação pode mudar o mundo.

Joel Barker (Pensador)

Resumo

HALFEN, Angélica. **Caracterização de populações de *Aphelenchoides besseyi* (Christie 1942), provenientes do arroz (*Oryza sativa*) e estudo da sua patogenicidade na cultura da soja (*Glycine max*).** 2020, 76f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

A ocorrência do distúrbio da haste verde (Soja Louca II) na cultura da soja foi detectada pela primeira vez no Brasil há cerca de quinze anos. No entanto, a etiologia da doença foi associada à *Aphelenchoides besseyi* apenas em 2017. Os problemas dessa complexa doença na soja aumentaram em regiões tropicais, caracterizadas por clima quente e chuvoso, resultando em perdas significativas de produtividade principalmente nas regiões do norte e centro-oeste do país. No entanto, em outras regiões como o extremo sul do Brasil, onde naturalmente ocorre o nematoide da Ponta branca (*A. besseyi*) em arroz irrigado, e a soja tem sido usada sistematicamente na rotação de culturas, ainda não foi detectada a síndrome da haste verde. Nesse sentido, amostras de sementes de arroz provenientes de diferentes regiões do país foram prospectadas quanto à ocorrência do nematoide da ponta branca e nível de infecção. A seguir, nas amostras cujo patógeno foi detectado, procedeu-se a caracterização morfológica, morfométrica e molecular dos espécimes pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) com primers espécie-específicos para *A. besseyi*. Após a caracterização e confirmação da espécie em 27 populações estudadas, três delas, provenientes do RS, GO e TO, juntamente com uma população de *A. besseyi* originária de soja, foram multiplicadas em *Fusarium* sp. *in vitro* e inoculadas, separadamente, sob dois níveis (600 e 1200 espécimes/planta) em plantas de soja suscetíveis (cv. BRS 284), mantidas em casa de vegetação. Decorridos 60 dias da inoculação, as plantas foram avaliadas quanto aos sintomas da síndrome de Soja Louca II, patogenicidade e reprodução do nematoide (FR= Fator de Reprodução). Plantas de soja não inoculadas foram utilizadas como testemunhas. Verificou-se a presença do nematoide da ponta branca em 21,37% das amostras de sementes de arroz avaliadas, cujos níveis populacionais variaram de 10 a 490 e de 10 a 220 nematoides totais e vivos/100 sementes, respectivamente, cuja frequência foi maior no estado de TO (100%), seguido de GO (55%), SC (27,58) e RS (10%). Pela análise dos parâmetros morfológicos e morfométricos, as populações estudadas foram identificadas como *Aphelenchoides besseyi*, que a seguir foram confirmadas molecularmente pela banda de 570pb evidenciada pelo *primer* 11. Nos testes de patogenicidade, verificou-se que todas as populações de arroz foram capazes de causar sintomas de Soja Louca II e se reproduzirem nas plantas de soja; no entanto menores níveis de inóculo (600) apresentaram maiores índices de reprodução (FR) do nematoide, onde, de forma geral, as populações de *A. besseyi* provenientes de arroz apresentaram maiores

valores de FR que aquela oriunda de soja. Nesse sentido, áreas de arroz infestadas por *A. besseyi* e localizadas em regiões quentes e chuvosas, constituem-se como fontes de inóculo potencial para a manifestação da síndrome da haste verde na soja.

Palavras-chave: *Aphelenchoides besseyi*. Soja. Arroz. Morfologia. Soja Louca II, Retenção foliar.

Abstract

HALFEN, Angelica. **Characterization of *Aphelenchoides besseyi* (Christie 1942) populations from rice (*Oryza sativa*) and study of its pathogenicity in soybean (*Glycine max*) crop.** 2020, 87f. Dissertation (Master's) - Graduate Program in Plant Health. Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

The occurrence of green stem disturbance (Soja Louca II) was firstly detected in soybean crop by the first time in Brazil about fifteen years ago. However, this disease etiology was associated with *Aphelenchoides besseyi* only in 2017. The problems of this complex disease in soybean has been increased in tropical regions characterized by hot and rainy weather, resulting in significant losses of productivity mainly in the northern and central-western regions of the country. However, in other Brazilian regions such as the extreme south, where the white tip nematode (*A. besseyi*) occur in irrigated rice naturally and the soybean has been used systematically in crop rotation, the green stem syndrome has not yet been detected. In this sense, samples of rice seeds from different regions of Brazil were prospected for the white tip nematode occurrence and its level of infection. In the samples whose pathogen was detected, the specimens were morphologically, morphometrically and molecularly characterized by the PCR technique (Polymerase Chain Reaction) with species-specific primers for *A. besseyi*. After the characterization and confirmation of the species on 27 studied populations, three of them, from RS, GO and TO together with a population of *A. besseyi* from soybean, were multiplied in *Fusarium* sp. *in vitro*. Subsequently, each nematode population was inoculated at two levels (600 and 1200 specimens/plant) in susceptible soybean plants (cv. BRS 284), kept in a greenhouse. Sixty days after inoculation, the plants were evaluated for Soja Louca II syndrome symptoms besides pathogenicity and reproduction (RF=Reproduction Factor) of *A. besseyi*. Uninoculated soybean plants were used as control. In the rice samples evaluated, the presence of the white tip nematode was rate at 21.37% of them, whose their population levels ranged from 10 to 490 and from 10 to 220 total and live nematodes /100 seeds, respectively. The frequency occurrence was higher in the TO state (100%), followed by GO (55%), SC (27,58%) and RS (10%). By morphological and morphometric parameters analyzed of the observed nematode, all populations were identified as *Aphelenchoides besseyi*, in which this species was confirmed molecularly by the 570bp band shown by the *primer* 11. In the pathogenicity tests, all rice populations were able to cause symptoms of Soja Louca II and to reproduce in soybean plants; however, lower levels of inoculum (600) resulted higher values of nematode RF. In general, the *A. besseyi* populations from rice presented higher RF than soybean population in the evaluated plants. In this sense, areas of rice infested by *A. besseyi* and located in hot and rainy regions are considered as potential sources of inoculum for green rush syndrome the manifestation on soybeans.

Key-words: *Aphelenchoides besseyi*. Soybean. Rice. Soja Louca II, Foliar retention.

Lista de Figuras

- Tabela 1.** Identificação das amostras de sementes de arroz (irrigado e sequeiro) utilizadas para prospecção da ocorrência do nematoide da ponta branca (*Aphelenchoides besseyi*)25
- Tabela 2.** Amostras submetidas à reação de PCR conforme *primer* desenvolvidos por Sercero (2019)33
- Tabela 3.** Condições de amplificação do DNA35
- Tabela 4.** Número de espécimes de *Aphelenchoides* sp. vivos, mortos e totais obtidos nas amostras por local, safra e sistema de cultivo de arroz irrigado.....37
- Tabela 5.** Classes de frequência do nematoide da ponta branca em sementes de arroz de diferentes Estados do Brasil conforme níveis de infestação estabelecidos por Huang et al.; (1976).....38
- Tabela 6.** Parâmetros morfométricos (μm) e morfológicos de fêmeas e machos adultos de 27 populações de *Aphelenchoides besseyi* provenientes de diferentes regiões orizícolas brasileiras.....40
- Tabela 7.** Análise fatorial das variáveis massa fresca, número de espécimes de *A besseyi* (Ab) obtidos na lavagem, número de nematoides obtidos no processamento, população final (lavagem + processamento), fator de reprodução 1 (Pf lavagem/Pi), fator de reprodução 2 (Pf processamento/Pi), fator de reprodução total (Pf/Pi), e nível de significância.....57
- Tabela 8.** Número de nematoides extraídos pela lavagem e processamento da parte aérea, e, população final (PF=lavagem + processamento) em plantas de soja cv (BRS 284) submetidas a dois níveis de inoculo inicial, em casa de vegetação.....58

Tabela 9. Fator de Reprodução de quatro populações de *A. besseyi* levando-se em consideração a população final obtida da lavagem da parte aérea (FR1), do seu processamento (FR2) e a população final (lavagem + processamento) em plantas de soja submetidas a dois níveis de inóculo (600 ou 1200 espécimes/planta), em casa de vegetação.....59

Tabela 10. Massa fresca da parte aérea de plantas de soja cv (BRS 284) em plantas de soja submetidas ou não à inoculação com quatro diferentes populações de *A. besseyi* independentemente do nível de inóculo (600 ou 1200 espécimes/planta), em casa de vegetação.....60

Lista de Tabelas

- Figura 1.** Extração de nematoide de sementes de arroz por descascamento manual para detecção de fitonematoides. Amostras utilizadas para processamento (A e B); Placas de Petry com as sementes descascadas (C); incubação (D); Lavagem do material sobre as peneiras 20 e 635 meshes (E e F); Suspensões aquosas das amostras em tubos falcon (G); Avaliação da ocorrência e quantificação de *Aphelenchoides* sp. sob microscópio estereoscópio (H); Avaliações morfológicas e morfométricas dos espécimes sob microscópio utilizando-se o programa Leica Application Suite V3.7 (I).....30
- Figura 2.** Características morfológicas e morfométricas de *Aphelenchoides* sp. mensuradas sobre microscópio estereoscópio. Corpo do nematoide com detalhes do estilete, vulva, ânus e distância entre vulva e ânus (A); Mucros na porção terminal da cauda (B e C); Vulva (D); Espícula (E)...32
- Figura 3.** Esquema de corte de um único indivíduo de *Aphelenchoides* sp. para extração de DNA.....35
- Figura 4.** Método de extração de DNA e realização da PCR . Master mix e *primers* utilizados para reação (A); Preparação dos microtubos para realizar a PCR (B); Amostras colocadas no termociclador (C); Amostras homogeneizadas na hack com azul de bromofenol e adicionadas ao gel de agarose (D); Gel na cuba (E); Gel colocado em solução corante para revelação das bandas (F).....36
- Figura 5.** Morfologia do aparelho reprodutivo e digestivo de machos e fêmeas. vulva aparelho reprodutor feminino (A); espícula, aparelho reprodutor masculino (B); parte anterior do corpo com esôfago visível (C); lábios, estilete e metacorpo visíveis (D).....39

- Figura 6.** Micrografia da cauda conoidal de espécimes de *Aphelenchoides besseyi* provenientes de amostras de sementes de arroz. A) cauda apresentando dois mucros; B) cauda apresentando três mucros; C) cauda apresentando de três a quatro mucros; D e E) cauda apresentando quatro mucros.....43
- Figura 7.** Produto da PCR de 27 populações de *Aphelenchoides besseyi* provenientes de sementes de arroz em géis de agarose a 1% utilizando-se o *primer* espécie-específico 11 com marcador molecular 1 Kb.....47
- Figura 8.** Avaliação da patogenicidade de populações de *A. besseyi* em soja (BRS 284) A) Laboratório de nematologia II na Embrapa Soja; B) Casa de vegetação em que foi montado o experimento; C) Nebulização das plantas; D, E e F) Plantas de soja inoculadas com o nematoide 50 dias após o plantio.....52
- Figura 9.** Lavagem e processamento das amostras: A) pré-lavagem da planta de soja; B) lavagem da planta; C) recolhimento da suspensão em Becker; D) processamento das amostras em liquidificador; E) peneiramento; e, F) recolhimento da suspensão processada em Becker para posterior avaliação do número de espécimes de *A. besseyi*/amostra.....54
- Figura 10.** Contagem do número de nematoides nas amostras lavadas e processadas. A) Tubos de ensaio contendo nematoides para contagem; B) Materiais utilizados para redução da amostra e lâmina de Peters para contagem; C) Tubo ensaio contendo amostra reduzida a 4 ml.....55
- Figura 11.** Sintomas de haste verde e retenção foliar em plantas de soja inoculadas com populações de *A. besseyi* oriundas do arroz: A) nanismo e embolhamento foliar; B) retorcimento e embolhamento foliar; C) tons de verde escuro mais intenso juntamente com embolhamento foliar; D) comparação de planta inoculada, com sintomas, em relação à testemunha (não inoculada).....56

Sumário

1 Introdução geral.....	15
Capítulo 1	20
Prospecção e caracterização morfométrica, morfológica e molecular de populações do nematoide da ponta branca em arroz (<i>Oryza sativa</i>)	20
1. Introdução	21
2. Material e Métodos.....	24
2.1 Prospecção da ocorrência do nematoide da ponta branca em sementes de arroz provenientes de diferentes regiões produtoras do país.....	24
2.2. Obtenção das amostras.....	25
2.3. Processamento do material, extração e quantificação de fitonematoides.....	29
2.4. Caracterização morfométrica e morfológica das populações de <i>Aphelenchoides</i> sp.	31
2.5 Caracterização molecular das populações de <i>Aphelenchoides</i> sp. detectadas nas amostras a partir da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase).	33
3. Resultados e Discussão	36
3.1 Detecção, quantificação e determinação de níveis de infecção do nematoide da ponta branca em amostras de sementes de arroz provenientes de diferentes regiões orizícolas do Brasil.	36
3.2 Caracterização morfométrica e morfológica de espécies de <i>Aphelenchoides</i> detectados em amostras de sementes de arroz de diferentes regiões orizícolas do Brasil.....	39
3.3 Caracterização molecular de espécimes de <i>Aphelenchoides</i> sp.....	43
4.Conclusões.....	46
Capítulo II	48

Patogenicidade de populações de <i>Aphelenchoides besseyi</i> provenientes de arroz em soja.....	48
1. Introdução.....	49
2. Material e Métodos.....	52
3. Resultados e discussão	55
3.1. Avaliação dos sintomas das plantas inoculadas com <i>A. besseyi</i>	55
3.2 Reprodução das populações de <i>A. besseyi</i> provenientes de arroz em soja e efeito do nematoide no desenvolvimento das plantas.....	56
4. Conclusão gerais.....	63
Referências	64
Apendice I	72
Apendice II	75

1 Introdução geral

O agronegócio é uma importante fonte de geração de riqueza para Brasil, sendo um dos setores de maior crescimento na economia (GASQUES et al., 2004; HOFER et al., 2006; IBGE, 2016; RODRIGUES, 2017). Nas últimas décadas, tem respondido por mais de um quinto do Produto Interno Bruto (PIB), metade do saldo da balança comercial e pela geração de parcela significativa de empregos no Brasil (BARBOSA; SOUSA, 2014; CONAB, 2015a; IBGE, 2016; CEPEA, 2016; RODRIGUES, 2017). Neste cenário, o arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo cereal mais produzido (CONAB, 2019). Na perspectiva mundial da orizicultura, a China e a Índia são, respectivamente, o primeiro e segundo maiores produtores, sendo também grandes consumidores de arroz. Na América do Sul, a produção do cereal concentra-se no Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina, sendo a produção brasileira, responsável por cerca de 80% do volume total no MERCOSUL (SANTOS; TAVARES, 2018; SOSBAI, S018).

No mercado da orizicultura brasileira, a região Sul se destaca com os estados de maior produção, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor de arroz, seguido de Santa Catarina o que corresponde a 80% do total produzido no país (SOSBAI, 2018; CONAB, 2019). No Brasil, este cereal é cultivado em dois sistemas básicos de produção: arroz irrigado, predominante nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina com os sistemas de cultivo convencional e pré-germinado, respectivamente, e, parte do Tocantins, apenas no sistema convencional; já o cultivo de arroz de terras altas ou de sequeiro, é cultivado principalmente nos Estados do Mato Grosso, Maranhão, Pará, Goiás e parte do estado de Tocantins.

Segundo dados da Conab, na safra 2019/20, foi prevista uma área plantada de arroz entre 1.829,9 e 1.963,3 milhões de hectares, com produtividade de 6.237 kg ha^{-1} , e produção estimada entre 11 e 11,8 milhões de toneladas. A área irrigada prevista foi de 1.445,3 milhões de hectares, e, de sequeiro, estimada em 518 mil hectares (CONAB, 2019). Alguns dos principais importadores de arroz são a Arábia Saudita, China, Estados Unidos e Irã (FAO, 2014; USDA, 2015)

Dentre os fatores que afetam a produtividade do arroz, problemas de ordem fitossanitária, causados por fitonematoides, podem comprometer seriamente o desenvolvimento das plantas e levar a sérios prejuízos econômicos (PRASAD et al.,

2011). Mais de uma centena de espécies de nematoides têm sido relatadas em arroz de sequeiro e irrigado em muitos países (Bridge et al., 2005). Os principais fitonematoides associados à cultura de arroz são *Aphelenchoides besseyi* (Christie, 1942); *Ditylenchus angustus* (Buther, 1913) Filipjev, 1936; *Hemicycliophora* (De Man, 1921); *Helicotylenchus* spp. (Steiner, 1945); *Heterodera* spp. (Rao & Jayaprakash, 1978); *Hirschmanniella* spp. (Luc & Goodey, 1964); *Hoplolaimus indicus* (Daday, 1905); complexo *Meloidogyne* spp. (Goeldi, 1892); *Pratylenchus* spp. (Filipjev, 1936); *Rotylenchulus* spp. (Linford & Oliveira, 1940); *Rotylenchus* spp. (Filipjev, 1936); *Tylenchorhynchus* spp. (Cobb, 1913); *Xiphinema* spp. (Cobb, 1913), (Bridge et al., 2005; Geraert, 2010; Villanueva et al., 1992; Prot et al., 1994). Dentre esses, *Aphelenchoides besseyi* é conhecido por causar a ponta-branca-do-arroz e o nanismo de verão em morangueiro, porém é capaz de parasitar mais de 200 espécies de plantas distribuídas em 35 gêneros (CHENG et al., 2013).

Pertencente ao Domínio Eukaryota, Reino Metazoa, Filo Nematoda, Ordem Aphelenchida e Família Aphelenchoididae (DE LEY; BLAXTER, 2002), as espécies do Gênero *Aphelenchoides*, encontradas possuem habilidade de parasitar a parte aérea das plantas (tecidos dos seus órgãos aéreos), podendo causar consideráveis perdas em muitos dos casos em que são relatadas. *A. besseyi* é um dos mais importantes patógenos transmitidos por sementes, causando consideráveis perdas econômicas nas áreas de cultivo de arroz (TOGASHI; HOSHINO, 2001). Esta espécie faz parte da lista dos 10 fitonematoides mais importantes ao nível mundial por causar danos econômicos significativos na produtividade do arroz nos países onde o cereal é cultivado (JONES et al., 2013; KEPENEKCI, 2013).

A ponta-branca-do-arroz pode ocorrer em sistemas de cultivo de sequeiro ou irrigado; porém, conforme Silveira et al. (1977), os danos são maiores em lavouras irrigadas. Conforme observações de Jamali et al., (2006), a água no sistema de irrigação por inundação oferece melhor condição de infecção do inóculo, aumentando a facilidade para o parasitismo dos estádios juvenis; permitindo assim, mais tempo para o seu desenvolvimento, multiplicação e disseminação. Conforme os mesmos autores, o aumento das populações do nematoide está associado à suscetibilidade da cultivar e ao uso contínuo de sementes contaminadas. No entanto, a incidência e a severidade da doença em uma localidade podem variar de ano para ano em função fatores ambientais como a umidade do ar e práticas culturais.

Os danos causados por *A. besseyi* em arroz estão associados a sua alimentação como ectoparasítica nos meristemas de crescimento das folhas, resultando em clareamento ou escurecimento leve de suas extremidades, os quais mais tarde se tornam necróticas. Além disso, o nematoide ocasiona o retorcimento da ponta da folha apical (bandeira) a qual envolve a panícula tornando-se branca a marrom com o tempo. Nesse sentido, o retorcimento da folha bandeira além de impedir a emergência da panícula, pode interferir negativamente no seu tamanho e comprimento (AMIN,2020), motivo pelo qual tal nematose é chamada de ponta branca.

No século passado, o nematoide da ponta branca foi responsável por severas perdas econômicas em arroz no Japão e nos Estados Unidos, mas hoje se encontra sob controle devido a adoção de medidas fitossanitárias como a utilização de cultivares tolerantes e o tratamento de sementes (Cares et al., 2008). Em vários países da Ásia e da África, *A. besseyi* tem sido responsável pela redução da produtividade em 10-71% das lavouras orizícolas (Bridge et al., 2005; Cheng et al., 2013). No Brasil, apesar desse nematoide ser amplamente disseminado e relatado em associação a diferentes hospedeiros, informações sobre danos causados são raras (Silveira & Curi, 1990; Oliveira & Kubo, 2007; Cares et al., 2008; Favoreto et al., 2011). Em lavouras de arroz, desde meados da década de 90, *A. besseyi* não tem sido associado a danos significativos. Em 2015, foi realizada uma pesquisa entre a Universidade Federal do Rio Grande do Sul e o Instituto Riograndense do Arroz Irrigado, em que foi feita a verificação da incidência e distribuição do nematoide da ponta branca em áreas produtoras de arroz irrigado no estado, porém os dados ainda não estão disponíveis para consulta (LOPES,2015).

Dentre as culturas relatadas como hospedeiras de *A. besseyi*, além do arroz e do morango, algumas plantas ornamentais e forrageiras também favorecem sua reprodução (Chaves et al., 2011). No Brasil, a soja (Favoreto et al., 2015; Meyer et al., 2017) e o algodão (Favoretto, et al 2018) foram recentemente associadas ao parasitismo por esse nematoide. O crescimento nacional da sojicultura, somado a adoção de práticas inadequadas como a utilização desenfreada da monocultura, ou o sistema contínuo de sucessão com culturas que não quebram o ciclo dos fitopatógenos, vem causando desequilíbrios nas populações de agentes etiológicos relacionados a doenças e pragas e, frequentemente, ultrapassam o limiar econômico de dano para a soja (LORETO et al., 2019). Em 2015, os nematoides

foram listados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, entre as pragas consideradas de maior risco sanitário e com potencial de provocar prejuízos econômicos à agricultura brasileira (MAPA, 2015).

Nos últimos anos, o nematoide *A. besseyi*, vem preocupando os produtores de soja no Brasil. Em 2015, essa espécie foi identificada, como o agente causal da retenção foliar e haste verde em plantas de soja (Meyer et al., 2017). Dois anos mais tarde, foram detectadas plantas de algodoeiro com sintomas semelhantes aos da soja, causados pelo mesmo agente etiológico na região de Sapezal-MT (Favoreto et al., 2017). Atualmente, a presença deste nematoide é um grave problema que afeta a produção de soja e algodão em algumas regiões do Brasil (Meyer et al., 2017; Favoreto et al., 2017). Na Costa Rica *A. besseyi* é relatado no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) causando danos consideráveis (Chaves et al., 2013), porém, em nossas condições, essa espécie ainda não foi detectada na cultura muito embora o feijão caupi (*Vigna unguiculata*) tenha sido relacionado como um excelente hospedeiro (Favoreto et al., 2017).

Há cerca de 15 anos (safra 2005/2006), a ocorrência de sintomas do distúrbio haste verde e retenção foliar, denominada até então como síndrome de “Soja Louca II” (Gilioli et al. 2007), começou a atingir níveis epidêmicos, principalmente nas regiões quentes e chuvosas dos estados do Maranhão, Tocantins, Pará e norte de Mato Grosso, causando perdas na produção de soja de até 100% (Meyer et al. 2008; Meyer et al. 2009). De acordo com observações de Meyer et al. (2010), a manifestação dos sintomas na soja se dá entre o final do estágio vegetativo e o início do reprodutivo quando então as folhas apresentam coloração mais escurecida e menor pilosidade em relação às normais; além disso, as hastes exibem deformações e engrossamento dos nós, as vagens podem apresentar lesões, rachaduras, apodrecimento e redução do número de grão, alto índice de abortamento de vagens, provocando, muitas vezes, a indução de uma nova floração e sintomas de superbrotamento. Na cultura da soja, *A. besseyi* penetra nas raízes e movimenta-se internamente nos tecidos do xilema, passando pela haste até a inflorescência da planta que, por fim, é o local onde ele se alimenta e completa seu ciclo de vida entre 8 a 12 dias, dependendo da temperatura (Favoreto et al., 2018b)

A. besseyi se multiplica rápida e eficientemente no interior dos tecidos das plantas hospedeiras. Sua disseminação pode ocorrer pelo contato entre as folhas das plantas de soja doentes com aquelas das plantas sadias desde que haja

presença de água livre, seja pelos respingos de chuva ou mesmo pelo orvalho noturno. É possível também que o nematoide possa se espalhar mais uniformemente numa área de produção pelos resíduos de plantas doentes expelidos pelas colhedoras, aliado à ação dos ventos (Favoreto et al., 2011; Ferraz; Brown, 2016).

Segundo Marchesan (2013), em passado recente, o cultivo da soja em áreas de arroz passou por momentos importantes, experimentando evolução no cultivo, nos resultados obtidos e nas perspectivas do agronegócio. Conforme o mesmo autor, a rotação de culturas em áreas de várzea é uma oportunidade ímpar para recuperar e/ou consolidar a sustentabilidade do processo de produção de grãos neste ambiente. A cultura da soja, por ser uma leguminosa e pelas características de planta é uma excelente opção técnica, que agora está sendo adotada pelos produtores também em função dos preços e de mercado. Visto que a soja tem sido utilizada em frequente rotação/sucessão com a cultura de arroz (Barneche, 2016; 2018) e as duas culturas são hospedeiras de *Aphelenchoides besseyi*, estudos do aumento de inóculo nessas áreas pode potencializar os danos em ambas espécies vegetais. Além do mais, na ausência de plantas hospedeiras, *A. besseyi* pode sobreviver se alimentando de fungos no solo ou ainda em anidrobiose em sementes de arroz ou forrageiras que ficam na lavoura (Todd & Atkins (1958), o que dificulta a implantação de práticas de manejo.

Na safra gaúcha de 2015/16, houve relatos de lavouras de soja com danos de desordem fitossanitária similares aqueles causados pela soja louca II. (Santos et al., 2016). No entanto, em análise nematológica de material do mesmo local, o diagnóstico não foi confirmado (Favoretto, L., Comunicação Pessoal).

Considerando-se a importância das culturas do arroz e da soja para o país e a ausência de estudos mais detalhados quanto à distribuição e patogenicidade de *A. besseyi* nessas espécies vegetais, serão objetivos desse estudo: a) prospectar a ocorrência do nematoide da ponta branca em lotes de sementes de arroz provenientes de diferentes regiões produtoras do país, e, caracterizar as espécies de *Aphelenchoides* encontradas nas sementes; e, b) avaliar a patogenicidade de diferentes populações do nematoide provenientes de arroz na cultura da soja.

Capítulo I

Prospecção e caracterização morfométrica, morfológica e molecular de populações do nematoide da ponta branca em arroz (*Oryza sativa*).

1 Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma gramínea cerealífera de fundamental importância para a nutrição humana. O gênero *Oryza* possui diversas espécies, mas apenas duas são cultivadas – *Oryza sativa*, cultivada mundialmente, e *Oryza glaberrima*, cultivada em alguns países da África Ocidental (FONSECA et al., 2006).

Na perspectiva mundial da cadeia orizícola, a China e a Índia são, respectivamente, o primeiro e o segundo maiores produtores, sendo também grandes consumidores de arroz. Na América do Sul, a produção do cereal concentra-se no Brasil, Uruguai e Argentina, respondendo o Brasil por cerca de 80% da produção do MERCOSUL (safra 2015/16) (SANTOS; TAVARES, 2018). Juntamente com o trigo e o milho, o arroz é um dos principais cereais mais produzidos e considerado alimento básico para grande parte da população mundial. Segundo dados da FAO (2004), só na Ásia, mais de dois milhões de pessoas obtêm de 60 a 70% do consumo de energia do arroz e seus derivados; além disso é de grande importância para a segurança alimentícia em países com economia menos desenvolvida.

O arroz, em todas as fases de desenvolvimento, é afetado por diversas doenças que reduzem a produtividade e afetam a qualidade dos grãos (Prabhu et al., 2006), bem como a qualidade sanitária e fisiológica das sementes. Mais de 35 gêneros e 130 espécies de fitonematoides já foram relatados em arroz (Gerber et al., 1987), porém apenas 29 podem causar perdas e/ou danos na cultura (Bridge et al., 2005).

O nematoide da ponta branca do arroz, *Aphelenchoides besseyi* (Christie 1942), é relatado como um dos mais importantes patógenos transmitidos por sementes (TOGASHI; HOSHINO, 2001). Relatos da severidade da doença são associados a perdas de rendimento variáveis em diferentes países que vão de 14,5 a 46,7% no Japão, de 29 a 46% em Taiwan, 41 a 71% na Rússia e de 20 a 60% na Índia (JAMALI et al., 2006). No Brasil, RS, danos significativos foram registrados na década de 60 com perdas entre 30 a 50% de produtividade (NUNES, 2013). De acordo com o mesmo autor, com a introdução de cultivares americana no programa de melhoramento do arroz no Brasil, a partir da década de 70/80, incorporou-se resistência aos materiais genéticos. No entanto, dependendo das condições climáticas, durante o período de cultivo, ainda se observa recorrência do problema.

Nas lavouras orizícolas, uma vez presente no solo, o nematoide da ponta branca infecta as plântulas, movendo-se até as bainhas das folhas jovens, onde se alimentam nas regiões do meristema apical, na fase reprodutiva da planta. Durante a fase de perfilhamento, estes nematoides movem-se para a região de formação das estruturas reprodutivas da planta hospedeira, onde entram nas espiguetas e se alimentam ectoparasitadamente nos tecidos do ovário, estames, lodículas e embrião (Huang & Huang, 1972; Bridge et al., 2005).

Algumas plantas de arroz suscetíveis a *A. besseyi* podem não ter sintomas, porém a perda de rendimento de grãos ocorre apenas naquelas sintomáticas. Durante o crescimento inicial de plantas de arroz infectadas com *A. besseyi*, o sintoma mais visível é o surgimento das pontas cloróticas na bainha das folhas novas. Essas pontas posteriormente secam e se enrolam, enquanto o restante da folha pode parecer normal. As folhas jovens dos perfilhos infectados podem ser salpicadas com um padrão de respingo branco ou ter áreas cloróticas distintas; além disso, suas margens podem se tornar distorcidas e enrugadas, e as bainhas não apresentarem sintomas (CABI, EPPO, 2015). Em casos de infecções graves, a folha bandeira da planta de arroz fica retorcida impedindo ou dificultando a emissão completa da panícula (Yoshii; Yamamoto, 1950), o grão permanece pequeno (Todd e Atkins, 1958) e o endosperma pode ficar descolorido e rachado. Adicionalmente, as plantas infectadas amadurecem tardiamente e apresentam panículas estéreis carregadas em perfilhos produzidos a partir de nós elevados (Uebayashi et al., 1976).

O aumento das populações de *A. besseyi* pode ser explicado pela suscetibilidade da cultivar de arroz e pelo uso contínuo de sementes contaminadas. No entanto, a incidência e a severidade da doença em uma localidade podem variar de ano para ano em função de fatores ambientais e práticas culturais (JAMALI et al., 2006). Os primeiros relatos de danos causados pelo patógeno na produtividade do arroz, no Rio Grande do Sul, foram na década de 60, onde perdas de 30% a 50% na produção de grãos foram relatadas nas cultivares Agulha Precoce, Caloro e IRGA 407. Com a introdução das cultivares de alto grau de tolerância como as americanas Bluebelle, Belle Patna, Labelle e Lebonnet, a partir de 1970; e, com lançamento de 'BR-IRGA 409', nos anos 80, que chegou ocupar 62,4% da área cultivada no estado do Rio Grande do Sul, os danos e as perdas causados por *A. besseyi* se tornaram raros ou esporádicos (NUNES, 2013, TERRES et al., 2004).

A reprodução de *A. besseyi* pode ser anfimítica ou por partenogênese. A temperatura ideal para a oviposição e a eclosão dos nematoides encontra-se próxima a 30°C, temperatura na qual os nematoides finalizam seu ciclo em 10 dias. Já em temperaturas mais amenas, próximas de 13°C, tem seu desenvolvimento paralisado (BRIDGE et al., 2005). Nesse sentido, considerando-se uma cultivar de arroz suscetível, pelo menos, sete a dez gerações do nematoide podem ocorrer em condições favoráveis.

Espécimes de *A. besseyi* são capazes de sobreviver em anidrobiose por períodos de oito meses até três anos após a colheita (Cralley, 1949 ; Yoshii e Yamamoto, 1950b ; Todd, 1952 ; Todd e Atkins, 1958). Os espécimes permanecem inativos no interior da semente, entre a casca e o grão e, conforme passa o tempo que semente foi colhida, a infectividade do nematoide diminui (Cralley e French, 1952). Conforme Sivakumar (1987b), *A. besseyi* pode ainda sobreviver e se reproduzir saprofiticamente se alimentando dos fungos como *Curvularia* sp. e *Fusarium* sp., presentes na palhada após a colheita. Segundo o banco de dados global encontrado no site da European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO 2016), a distribuição de *A. besseyi* é ampla e ocorre na maioria das áreas produtoras de arroz no mundo, disseminado-se por sementes infectadas.

Conforme dados da Abrasem (2012), a taxa de utilização de sementes pelos orizicultores brasileiros é de 50% no arroz de terras altas e 53% no arroz irrigado. O restante das lavouras é semeado com grãos, salvos da safra anterior e/ou adquiridos de outros produtores para o propósito da semeadura. Visto que a semente é o principal veículo de disseminação desse nematoide, essas práticas facilitam a permanência ou a introdução do nematoide no campo quando se usa material infectado com o nematoide.

Uma das grandes dificuldades no diagnóstico desse gênero, além da escassez de taxonomistas treinados para a correta identificação (FERRIS et al., 1994; LUC et al., 2010), reside no fato de que, frequentemente os espécimes encontrados nas amostras para análise, estejam em anidrobiose, o que resulta na alteração da morfologia destes nematoides. Técnicas de identificação baseadas no diagnóstico molecular dessas espécies foram desenvolvidas, facilitando, assim, o diagnóstico rápido e efetivo desses nematoides. O uso do código de barras do DNA para a identificação de organismos foi proposto inicialmente nos Estados Unidos, em 2003, com base na percepção existente de que, em um pequeno trecho do genoma

do organismo, específico para cada espécie, geralmente o DNA mitocondrial ou DNA ribossômico, haveria variação suficiente para separar as espécies que habitam o planeta atualmente (Powers, 2004). No Brasil, esta técnica já foi aplicada com sucesso no esclarecimento do status taxonômico de nematoides dos gêneros *Pratylenchus* e *Aphelenchoides* (Oliveira et al., 2009; 2011b).

Na cultura da soja, *A. besseyi* está associado à doença popularmente conhecida como Soja Louca II, causando distúrbios na planta como retenção e embolhamento foliar, além de haste verde, abortamento de vagens e morte dos meristemas apicais (MEYER et al., 2017). Nos estados produtores de arroz, a soja tem sido utilizada em sucessão como opção de rotação de culturas. Nos estados onde predomina o plantio em áreas de várzea, as perdas causadas pela competição com o arroz vermelho, tem aumentado cada vez mais o que facilitou a implantação da soja. Com os resultados de controle de plantas daninhas alcançados em consequência da soja RR, a adoção dessa cultura na sucessão do arroz tem sido vista com bons olhos pelo produtor; além de auxiliar na redução de doenças e contribuir para diversificação de culturas (Marchesan, 2013; Barneche, 2016).

Visto que sementes do arroz, vindas de campos infectados com *A. besseyi*, são um importante veículo de disseminação do patógeno, além de que a soja tem se mostrado um hospedeiro favorável em aéreas onde o nematoide está presente (MEYER et al., 2017), a rotação entre essas duas culturas pode ser um agravante na incidência dessa síndrome. Dessa forma, teve-se por objetivo no presente estudo: a) prospectar a ocorrência e níveis de infecção do nematoide da ponta branca em lotes de sementes de arroz provenientes de diferentes regiões produtoras do Brasil; e, b) caracterizar morfométrica, morfológica e molecularmente as populações de *Aphelenchoides* detectadas nas amostras sementes estudadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS.

2.1. Prospecção da ocorrência do nematoide da ponta branca em sementes de arroz provenientes de diferentes regiões produtoras do país

2.2 Obtenção das amostras

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia/Nematologia da Embrapa Clima Temperado, localizada em Pelotas, estado do Rio Grande do Sul, no ano de 2019.

Cento e trinta e uma amostras de aproximadamente 500g de sementes de arroz, provenientes de diferentes regiões brasileiras produtoras do sul, norte e centro-oeste (Tabela 1), foram utilizadas nesse trabalho. As mesmas foram colhidas entre as safras de 2015/2016 a 2018/2019 e fornecidas pela Embrapa Clima Temperado, Instituto Rio Grandense do Arroz Irrigado (IRGA), Embrapa Arroz e Feijão, Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC Lages), Ouro verde consultoria, Centro Tecnológico do Chasqueiro e de técnicos da Universidade Estadual de Maringá (UEM), conforme Tabela 1.

Das 131 amostras recebidas, 107 foram oriundas de lavouras de arroz irrigado, sendo 76 amostras de lavouras conduzidas pelo sistema convencional e 31 de lavouras de sistema pré-germinado. As demais, 24 amostras, foram de lavouras de arroz terras altas (sequeiro) sendo oito de plantio direto e as demais de plantio convencional.

Tabela 1. Identificação das amostras de sementes de arroz (irrigado e sequeiro) utilizadas para prospecção da ocorrência do nematoide da ponta branca (*Aphelenchoides besseyi*).

	CULTIVAR	SAFRA	LOCAL	ORIGEM
1.	BRS 358 PC	2016/2017	Capão do Leão/ RS	Embrapa Clima Temperado
2.	BRS PAMPA CL PC	2017/2018	Capão do Leão/ RS	Embrapa Clima Temperado
3.	BRS ATALANTA PC	2015/2016	Capão do Leão/ RS	Embrapa Clima Temperado
4.	BRS PAMPEIRA PC	2017/2018	Uruguaiana/RS	Embrapa Clima Temperado
5.	BRS CATIANA PC	2017/2018	Dom Pedrito/RS	Embrapa Clima Temperado
6.	BRS PAMPA PC	2016/2017	Capão do Leão/ RS	Embrapa Clima Temperado
7.	GURI INTA CL PC	2018/2019	Centro Tecnológico do Chasqueiro, terceiro distrito de Arroio Grande/RS	Eng. Agrônomo Jonatas Munari
8.	BRS PAMPEIRA PC	2018/2019	Centro Tecnológico do Chasqueiro, terceiro distrito de Arroio Grande/RS	Eng. Agrônomo Jonatas Munari
9.	BRIRGA 431 PC	2018/2019	Centro Tecnológico do Chasqueiro, terceiro distrito de Arroio Grande/RS	Eng. Agrônomo Jonatas Munari
10.	BRIRGA 409 PC	2018/2019	Centro Tecnológico do Chasqueiro, terceiro distrito de Arroio Grande/RS	Eng. Agrônomo Jonatas Munari
11.	BRIRGA 424 RI PC	2018/2019	Centro Tecnológico do Chasqueiro, terceiro distrito de Arroio Grande/RS	Eng. Agrônomo Jonatas Munari
12.	GURI INTA CL PC	2018/2019	Taim, Rio Grande/ RS	Ouro Verde consultoria
13.	BRIRGA 424 RI PC	2018/2019	Taim, Rio Grande/ RS	Ouro Verde consultoria
14.	BRS 358 PC	2017/2018	Capão do Leão/ RS	Embrapa Clima Temperado
15.	BRIRGA 424 RI PC	2017/2018	Camaquã/ RS	IRGA PELOTAS
16.	GURI INTA CL	2017/2018	Pedro Osório/RS	IRGA PELOTAS

PC				
17.	BRS 358 PC	2017/2018	Arambaré/RS	IRGA PELOTAS
18.	BRIRGA 431 PC	2017/2018	Cachoeirinha/ RS	IRGA PELOTAS
19.	BRIRGA 424 RI PC	2017/2018	Santa Vitória do Palmar/ RS	IRGA PELOTAS
20.	BRIRGA 424 RI PC	2017/2018	Rio Grande/ RS	IRGA PELOTAS
21.	BRIRGA 409 ORGÂNICO PC	2017/2018	Santa Vitória do Palmar/ RS	IRGA PELOTAS
22.	BRIRGA 424 RI PC	2017/2018	Capão do Leão/ RS	IRGA PELOTAS
23.	BRIRGA 424 RI PC	2017/2018	Pedro Osório/RS	IRGA PELOTAS
24.	GURI INTA CL PC	2017/2018	Arambaré/RS	IRGA PELOTAS
25.	BRIRGA 417 PC	2017/2018	Pedras Altas/RS	IRGA PELOTAS
26.	BRIRGA 426 PC	2017/2018	Herval/RS	IRGA PELOTAS
27.	L3000 PC	2017/2018	Pedras Altas/RS	IRGA PELOTAS
28.	BR IRGA 424 RI PC	2017/2018	Arambaré/RS	IRGA PELOTAS
29.	BRS PAMPA PC	2018/2019	Capão do Leão/ RS	Embrapa Clima Temperado
30.	BRS PAMPA CL PC	2018/2019	Capão do Leão/ RS	Embrapa Clima Temperado
31.	BRS ESMERALDA PD*	2018/2019	Fazenda Capivara, Santo Antônio de Goiás/ GO	Embrapa Arroz e Feijão
32.	BRS A501 CL PD	2018/2019	Fazenda Capivara, Santo Antônio de Goiás/ GO	Embrapa Arroz e Feijão
33.	BRS 502 PD*	2018/2019	Fazenda Capivara, Santo Antônio de Goiás/ GO	Embrapa Arroz e Feijão
34.	AN CAMBARÁ PD*	2018/2019	Fazenda Capivara, Santo Antônio de Goiás/ GO	Embrapa Arroz e Feijão
35.	BRS ESMERALDA PC*	2018/2019	Fazenda Capivara, Santo Antônio de Goiás/ GO	Embrapa Arroz e Feijão
36.	BRS A501 CL PC*	2018/2019	Fazenda Capivara, Santo Antônio de Goiás/ GO	Embrapa Arroz e Feijão
37.	BRS 502 PC*	2018/2019	Fazenda Capivara, Santo Antônio de Goiás/ GO	Embrapa Arroz e Feijão
38.	AN CAMBARÁ PC*	2018/2019	Fazenda Capivara, Santo Antônio de Goiás/ GO	Embrapa Arroz e Feijão
39.	BRS CATIANA PC	2018/2019	Fazenda Palmital, Goianira/ GO	Embrapa Arroz e Feijão
40.	BRS PAMPA CL PC	2018/2019	Fazenda Palmital, Goianira/ GO	Embrapa Arroz e Feijão
41.	BRS A701 CL PC	2018/2019	Fazenda Palmital, Goianira/ GO	Embrapa Arroz e Feijão
42.	BRS A702 CL PC	2018/2019	Fazenda Palmital, Goianira/ GO	Embrapa Arroz e Feijão
43.	BRS PAMPEIRA PC	2018/2019	Fazenda Palmital, Goianira/ GO	Embrapa Arroz e Feijão
44.	AB 131092 PC	2018/2019	Fazenda Palmital, Goianira/ GO	Embrapa Arroz e Feijão
45.	BRIRGA 409 PC	2018/2019	Fazenda Palmital, Goianira/ GO	Embrapa Arroz e Feijão
46.	BRIRGA 417 PC	2018/2019	Fazenda Palmital, Goianira/ GO	Embrapa Arroz e Feijão
47.	BRIRGA 424 RI PC	2018/2019	Fazenda Palmital, Goianira/ GO	Embrapa Arroz e Feijão
48.	SCS122 Miúra PC	2018/2019	Fazenda Palmital, Goianira/ GO	Embrapa Arroz e Feijão
49.	BRS CATIANA PC	2018/2019	Lagoa da Confusão/TO	Embrapa Arroz e Feijão

50.	BRS A702 CL PC	2018/2019	Lagoa da Confusão/TO	Embrapa Arroz e Feijão
51.	BRS PAMPEIRA PC	2018/2019	Lagoa da Confusão/TO	Embrapa Arroz e Feijão
52.	SCS122 Miúra PC	2018/2019	Lagoa da Confusão/TO	Embrapa Arroz e Feijão
53.	BRIRGA 424 RI PC	2018/2019	Santo Antônio da Patrulha/RS	Embrapa Arroz e Feijão
54.	GURI INTA CL PC	2018/2019	Santo Antônio da Patrulha/RS	Embrapa Arroz e Feijão
55.	PUITÁ CL PC	2018/2019	Santo Antônio da Patrulha/RS	Embrapa Arroz e Feijão
56.	GURI INTA CL PC	2018/2019	Santo Antônio da Patrulha/RS	Irga cachoeirinha
57.	BRIRGA 431 CL PC	2018/2019	Taquara/RS	Irga cachoeirinha
58.	BRIRGA 424 RI PC	2018/2019	Glorinha/RS	Irga cachoeirinha
59.	PUITÁ CL PC	2018/2019	Osório/RS	Irga cachoeirinha
60.	BRS A502 VCU*	2018/2019	SINOP/MT	Embrapa Arroz e Feijão
61.	BRS A502 VCU*	2018/2019	União do Sul/ MT	Embrapa Arroz e Feijão
62.	BRS A502 ER*	2018/2019	SINOP/MT	Embrapa Arroz e Feijão
63.	BRS A502 EP*	2018/2019	SINOP/MT	Embrapa Arroz e Feijão
64.	BRS A502 ERF*	2018/2019	SINOP/MT	Embrapa Arroz e Feijão
65.	BRS ESMERALDA ER*	2018/2019	SINOP/MT	Embrapa Arroz e Feijão
66.	BRS ESMERALDA EP*	2018/2019	SINOP/MT	Embrapa Arroz e Feijão
67.	BRS ESMERALDA ERF*	2018/2019	SINOP/MT	Embrapa Arroz e Feijão
68.	BRS ESMERALDA CG136*	2018/2019	SINOP/MT	Embrapa Arroz e Feijão
69.	BRS AN CAMBARÁ ER*	2018/2019	SINOP/MT	Embrapa Arroz e Feijão
70.	BRS AN CAMBARÁ EP*	2018/2019	SINOP/MT	Embrapa Arroz e Feijão
71.	BRS AN CAMBARA ERF*	2018/2019	SINOP/MT	Embrapa Arroz e Feijão
72.	BRS AN CAMBARA CG136*	2018/2019	SINOP/MT	Embrapa Arroz e Feijão
73.	BRS A501 ERF*	2018/2019	SINOP/MT	Embrapa Arroz e Feijão
74.	BRS MG CAÇULA*	2018/2019	SINOP/MT	Embrapa Arroz e Feijão
75.	BRS GO SERRA DOURADA*	2018/2019	SINOP/MT	Embrapa arroz e feijão
76.	IRGA 424 RI PC	2017/2018	Mostardas-RS	IRGA CACHOEIRINHA
77.	GURI INTA CL PC	2017/2018	Mostardas-RS	IRGA CACHOEIRINHA
78.	BRIRGA 431 CL PC	2017/2018	Capivari do Sul- RS	IRGA CACHOEIRINHA
79.	GURI INTA CL PC	2018/2019	Arroio Grande/ RS	IRGA PELOTAS
80.	BRIRGA 424 RI PC	2017/2018	Capivari do Sul- RS	IRGA CACHOEIRINHA

81.	GURI CL PC	2017/2018	Capivari do Sul- RS	IRGA CACHOEIRINHA
82.	BRS PAMPA LOTE 001 PC	2018/2019	Dom Pedrito- RS	Embrapa Clima Temperado
83.	BRS PAMPA LOTE 002 PC	2018/2019	Dom Pedrito- RS	Embrapa Clima Temperado
84.	BRS PAMPA LOTE 003 PC	2018/2019	Dom Pedrito- RS	Embrapa Clima Temperado
85.	BRIRGA 431 CL PC	2018/2019	Capão do Leão/ RS	IRGA PELOTAS
86.	BRIRGA 426 PC	2018/2019	Cristal/ RS	IRGA PELOTAS
87.	BRIRGA 424 RI PC	2018/2019	Pedro Osório/RS	IRGA PELOTAS
88.	GURI INTA CL PC	2018/2019	Rio Grande/ RS	IRGA PELOTAS
89.	L3000 PC	2018/2019	Cristal/ RS	IRGA PELOTAS
90.	GURI INTA CL PC	2018/2019	Arroio Grande/ RS	IRGA PELOTAS
91.	BRIRGA 431 CL PC	2018/2019	Rio Grande/ RS	IRGA PELOTAS
92.	ANA 9005 CL PC	2018/2019	Capão do Leão/ RS	IRGA PELOTAS
93.	BRIRGA 424 RI PC	2018/2019	Camaquã/ RS	IRGA PELOTAS
94.	BRIRGA 431 CL PC	2018/2019	Santa Vitória do Palmar/ RS	IRGA PELOTAS
95.	BRIRGA 424 RI PC	2018/2019	Capão do Leão/ RS	IRGA PELOTAS
96.	GURI INTA CL PC	2018/2019	Arambaré/RS	IRGA PELOTAS
97.	BRS PAMPA CL LT001PC	2018/2019	Uruguaiana/RS	EMBRAPA ESTAÇÃO TERRAS BAIXAS
98.	BRS PAMPA CL LT002PC	2018/2019	Uruguaiana/RS	EMBRAPA ESTAÇÃO TERRAS BAIXAS
99.	BRS PAMPA CL LT003 PC	2018/2019	Uruguaiana/RS	EMBRAPA ESTAÇÃO TERRAS BAIXAS
100.	SCS 116 SATORU LT01PG	2018/2019	Pouso Redondo/SC	CAV UDESC LAGES
101.	SCS 116 SATORU LT02PG	2018/2019	Pouso Redondo/SC	CAV UDESC LAGES
102.	SCS 116 SATORU LT04PG	2018/2019	Rio do Oeste/ SC	CAV UDESC LAGES
103.	SCS 116 SATORU LT05PG	2018/2019	Rio do Oeste/ SC	CAV UDESC LAGES
104.	SCS 116 SATORU LT08PG	2018/2019	Rio do Oeste/ SC	CAV UDESC LAGES
105.	SCS 122 MIÚRA LT100PG	2018/2019	Pouso Redondo/SC	CAV UDESC LAGES
106.	SCS 122 MIÚRA LT101PG	2018/2019	Pouso Redondo/SC	CAV UDESC LAGES
107.	SCS 122 MIÚRA LT102PG	2018/2019	Pouso Redondo/SC	CAV UDESC LAGES
108.	PRIMORISO LT200PG	2018/2019	Pouso Redondo/SC	CAV UDESC LAGES
109.	PRIMORISO LT201PG	2018/2019	Pouso Redondo/SC	CAV UDESC LAGES

110. PRIMORISO LT202PG	2018/2019	Laurentino/ SC	CAV UDESC LAGES
111. PRIMORISO LT204PG	2018/2019	Laurentino/ SC	CAV UDESC LAGES
112. PRIMORISO LT207PG	2018/2019	Pouso Redondo/SC	CAV UDESC LAGES
113. EPAGRI 109 LT300PG	2018/2019	Pouso Redondo/SC	CAV UDESC LAGES
114. EPAGRI 109 LT302PG	2018/2019	Pouso Redondo/SC	CAV UDESC LAGES
115. EPAGRI 109 LT304PG	2018/2019	Pouso Redondo/SC	CAV UDESC LAGES
116. BRS TIOTAKA LT400PG	2018/2019	Taió/ SC	CAV UDESC LAGES
117. BRS TIOTAKA LT401PG	2018/2019	Taió/ SC	CAV UDESC LAGES
118. BRS TIOTAKA LT402PG	2018/2019	Taió/ SC	CAV UDESC LAGES
119. BRS TIOTAKA LT403PG	2018/2019	Taió/ SC	CAV UDESC LAGES
120. BRS TIOTAKA LT404PG	2018/2019	Taió/ SC	CAV UDESC LAGES
121. PÉROLA LT500PG	2018/2019	Pouso Redondo/SC	CAV UDESC LAGES
122. SARDO LT601PG	2018/2019	Mirim Doce/ SC	CAV UDESC LAGES
123. SARDO LT602PG	2018/2019	Mirim Doce/ SC	CAV UDESC LAGES
124. SCS 121CL LT733PG	2018/2019	Agronômica/SC	CAV UDESC LAGES
125. SCS 121CL LT735PG	2018/2019	Agronômica/SC	CAV UDESC LAGES
126. SCS 121CL LT737PG	2018/2019	Agronômica/SC	CAV UDESC LAGES
127. SCS 121CL LT738PG	2018/2019	Agronômica/SC	CAV UDESC LAGES
128. SCS 121CL LT739PG	2018/2019	Agronômica/SC	CAV UDESC LAGES
129. IRGA 424 RIPC	2018/2019	Querência do Norte/PR	Universid. Estad Maringá
130. BRS 701 CLPC	2018/2019	Querência do Norte/PR	Universid. Estad. Maringá
131. IAC 122PC	2018/2019	Querência do Norte/PR	Universid. Estad. Maringá

* Amostras de arroz terras altas **PC**- Plantio Convencional; **PD**- Plantio Direto; **CL**- Sistema clearfield; PG- Sistema de cultivo pré-germinado

Após o recebimento das amostras, parte dessas foram processada para avaliação da ocorrência e quantificação de fitonematoides, sendo o restante, armazenado a 6°C, em câmara fria, para estudos posteriores.

2.3. Processamento do material, extração e quantificação de fitonematoides.

Para cada amostra de 500g de sementes de arroz (irrigado/sequeiro), procedeu-se a extração dos nematoides (Figura 1) pelo método de descascamento manual utilizando-se 100 sementes (FLEGG; HOOPER, 1970) onde as cascas e os grãos foram submergidos em placa de Petry contendo 20mL de água esterilizada,

mantida em BOD a 25°C por 24h. Decorrido o período, o material incubado foi lavado sobre peneiras granulométricas de malha 20 meshes (abertura 0,84mm) e de 635 meshes (abertura 0,020mm) para retenção dos nematoides. A seguir, recolheu-se 50mL da suspensão aquosa de cada amostra para observação da presença e contagem do número de nematoides vivos e mortos, sob microscópio estereoscópio.



Figura 1. Extração de nematode de sementes de arroz por descascamento manual para detecção de fitonematoides. Amostras utilizadas para processamento (A e B); Placas de Petry com as sementes descascadas (C); incubação (D); Lavagem do material sobre as peneiras 20 e 635 meshes (E e F); Suspensões aquosas das amostras em tubos falcon (G); Avaliação da ocorrência e quantificação de *Aphelenchoides* sp. sob microscópio estereoscópio (H); Avaliações morfológicas e morfométricas dos espécimes sob microscópio utilizando-se o programa Leica Application Suite V3.7 (I).

Após a detecção e identificação de espécimes do gênero *Aphelenchoides* nas amostra, conforme Mai; Mulling (1996), sob microscópio estereoscópio, foram feitas três contagens consecutivas em sub amostras de 5 mL contidas em placa quadriculada, calculando-se, posteriormente, a média do número de nematoides

vivos, mortos e totais no volume total correspondente as 100 sementes. A seguir, foram estabelecidos os padrões de infecção, onde as amostras foram divididas por estado e município, conforme categorização por nível de infestação (0 a 100) determinado por Huang et al. (1976).

2.4. Caracterização morfométrica e morfológica das populações de *Aphelenchoides* sp.

Imediatamente após a detecção e quantificação de *Aphelenchoides* sp. nas amostras de sementes avaliadas, montaram-se lâminas temporárias, onde aproximadamente 20 espécimes (10 fêmeas e 10 machos adultos) de cada amostra positiva foram observados, fotografados e mensurados, sob microscópio binocular Leica DM 1000 utilizando-se o programa Leica Application Suite V3.7, para identificação da espécie, conforme diferentes parâmetros, dentre eles, alguns destacados na Figura 2.

Foram mensurados os seguintes caracteres: comprimento do corpo (L), comprimento da cauda, estilete, diâmetro do corpo na região do ânus e na região mediana do corpo, distância da extremidade anterior até a vulva, distância da vulva até o ânus (VA), largura dos lábios, largura do bulbo mediano, esôfago e tamanho das espículas para espécimes machos e fêmeas. A seguir, para cada amostra, determinou-se o intervalo máximo, mínimo e média de cada parâmetro morfométrico (anexo). Com base nessas medidas, foram calculados os segundos índices: $V\%$ (expressa de forma proporcional a distância entre a extremidade anterior até a vulva em relação a L); b (comprimento do corpo em relação à distância da extremidade anterior do nematoide à base do esôfago); c (razão entre L e comprimento da cauda); a (razão entre o comprimento do corpo e o diâmetro máximo do corpo) (Siddiqi, 2000). Adicionalmente, observações morfológicas quanto ao tipo de esôfago e número de mucros na cauda foram também realizadas (Figura 2). Posteriormente, montou-se uma tabela com os valores morfométricos e observações de cada população os quais foram comparados com aqueles descritos por Christie (1942), Fortuner (1970), Amim (2002), Kham (2012) e Jesus (2015) (Apêndice 2).

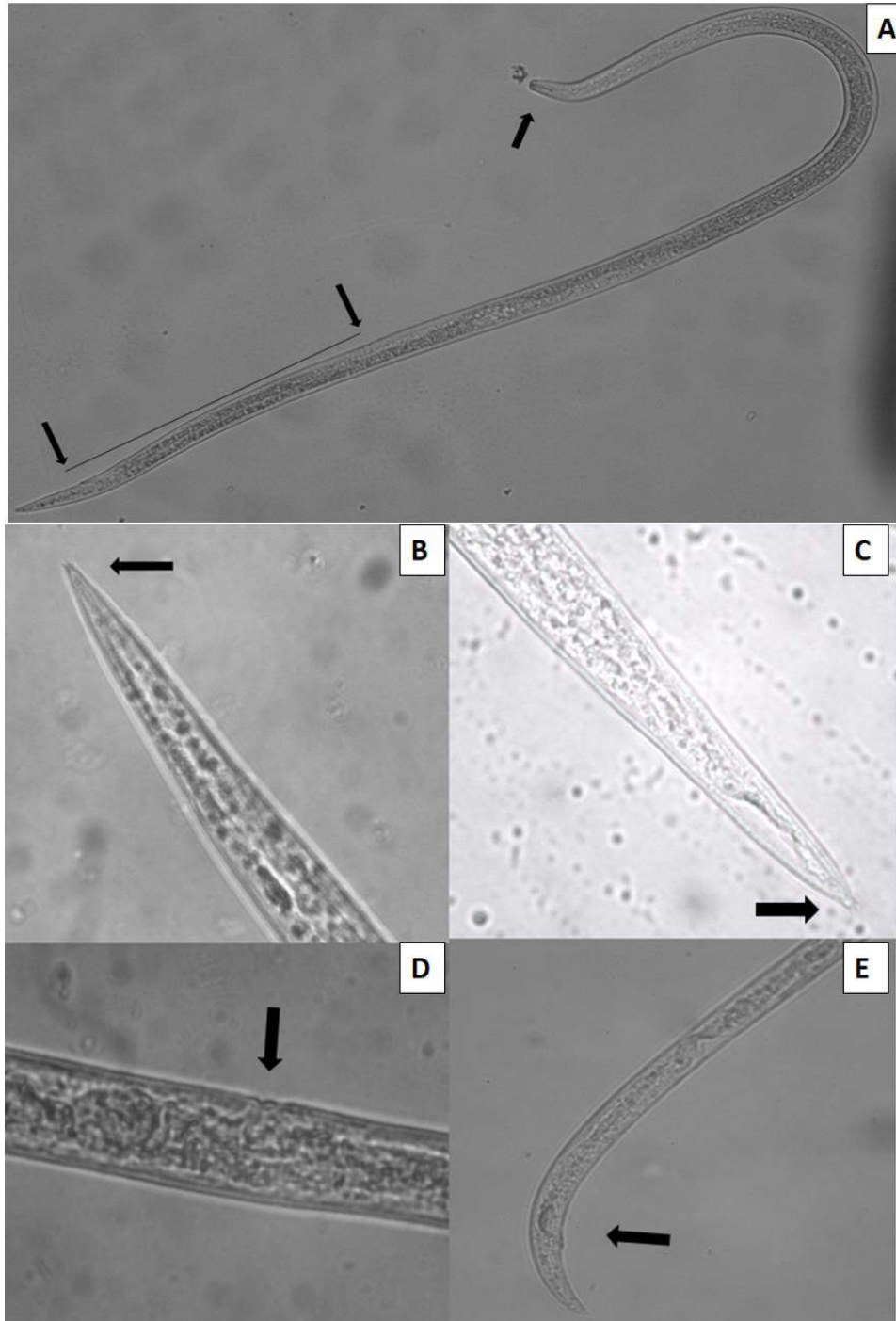


Figura 2. Características morfológicas e morfométricas de *Aphelenchoides* sp. mensuradas sobre microscópio estereoscópio. Corpo do nematoide com detalhes do estilete, vulva, ânus e distância entre vulva e ânus (A); Mucros na porção terminal da cauda (B e C); Vulva (D); Espícula (E).

2.5. Caracterização molecular das populações de *Aphelenchoides* sp. detectadas nas amostras a partir da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase).

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Nematologia do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) a partir da realização da técnica de PCR utilizando-se um *primer* espécie-específico desenvolvido para diagnosticar *A. besseyi* conforme Sercero (2019). No estudo desenvolvido por tal autor, a especificidade do *primer* foi determinada através do uso de DNA extraído de outras espécies do gênero *Aphelenchoides* além de testes efetuados com DNA de outros gêneros/espécies de outros nematoides (*Pratylenchus brachyurus*, *Meloidogyne* spp., *Rotylenchulus reniformis*, *Scutellonema brachyurus*, *Helicotylenchus dihystra*, *Ditylenchus dipsaci*, *Aphelenchus avenae*) utilizando-se o *primer* 11 no sentido anverso e reverso, 11R (5' GTATTCAATCCCGCGACT 3) e 11F (5' CATCCTGTTCGGGCATAGTT 3').

Primeiramente, foram obtidos os nematoides de cada amostra positiva pelo método de descascamento manual (FLEGG; HOOPER, 1970), sendo os mesmos mantidos em suspensão aquosa até sua utilização. A seguir, as populações de cada amostra (Tabela 2) foram enumeradas em sequência para proceder à identificação nos microtubos, utilizando-se cinco nematoides por população (repetição). Para tanto, as PCR's foram divididas em quatro etapas. No primeiro gel, foram utilizadas quatro repetições das amostras BRS 358 do Capão do Leão/RS, BRS A 701 CL Goianira/ GO, BRS PAMPEIRA Lagoa da Confusão/TO e uma população vinda da soja do município de Ipiranga do Norte/MT, enumeradas de um a quatro respectivamente, e, assim, sucessivamente, para as demais amostras onde o nematoide foi detectado e os respectivos géis (Tabela 2).

Tabela 2. Amostras submetidas à reação de PCR conforme primer desenvolvidos por Sercero (2019).

AMOSTRA	Nº nematoides	ORIGEM	Nº GEL PCR
1. BRS 358	5	RS	1
2. BRS A701 CL	5	GO	1
3. BRS PAMPEIRA	5	TO	1
4. SOJA/MT	5	MT	1
5. SCS 116 SATORU LT 01	5	SC	2
6. SCS 116 SATORU LT 02	5	SC	2
7. BRS PAMPEIRA	5	RS	2
8. BRS TIOTAKA LT 400	2	SC	3
9. BRS TIOTAKA LT 401	2	SC	3
10. BRS TIOTAKA LT 402	2	SC	3

11. BRS TIOTAKA LT 403	2	SC	3
12. BRS CATIANA	2	RS	3
13. BRS A702CL	2	GO	3
14. BRS PAMPEIRA	2	GO	3
15. AB 131092	2	GO	3
16. IRGA 409	2	GO	3
17. BRS CATIANA	2	TO	3
18. BRA A702CL	2	TO	3
19. BRS ATALANTA	2	RS	3
20. BRS 502	2	GO	3
21. SCS 121 CL LT735	2	SC	4
22. SCS 121 CL LT 737	2	SC	4
23. BRS PAMPA	2	RS	4
24. SCS 122 MIÚRA	2	TO	4
25. BRS ESMERALDA PD	2	GO	4
26. BRS A501CL	2	GO	4
27. NA CAMBARÁ	2	GO	4
28. BRS ESMERALDA	2	GO	4

Para tanto, os nematoides coletados de cada amostra foram fracionados, individualmente sobre uma lâmina sob microscópio com o auxílio de uma pinça (Figura 3), em uma gota de 2 μ L do tampão WLB - Worm Lysis Buffer (880 μ L de água deionizada, 50 μ L de KCl 1 M, 50 μ L de solução de Gelatin 1%, 10 μ L de Tris HCl ph 8,2 1 M, 4,5 μ L de Tween 20 100%, 3,3 μ L de proteinase K (20 mg mL) e 2,5 μ L de MgCl₂ 1 M (WILLIAMS et al., 1994). Após a secção, cada nematoide foi colocado individualmente em microtubo de 0,2 mL identificado e acrescido de 23 μ L de WLB; e, a seguir, foram submetidos à incubação em termociclador (60°C por 1 hora, seguido de 95°C por 15 minutos, resfriando a 4 °C) para extração do DNA genômico, sendo esse processo, repetido para todas as populações. Posteriormente, as amostras das diferentes populações de *Aphelenchoides* sp., submetidas à extração do DNA genômico, foram divididas em grupos de cinco ou dois exemplares, (repetição) conforme tabela 2.

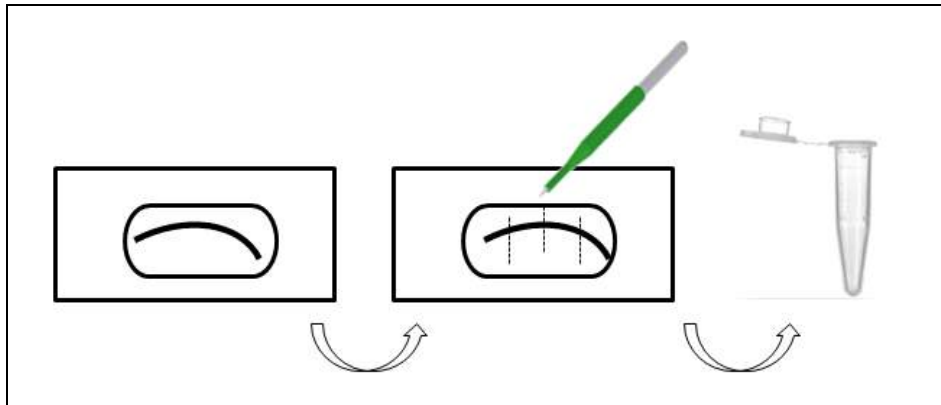


Figura 3. Esquema de corte de um único indivíduo de *Aphelenchoides* sp. para extração de DNA.

Para a amplificação do DNA e reação de PCR, foi utilizado o kit "Platinum" PCR Supermix (Invitrogen). Novamente foram identificados os microtubos de 0,2 mL, e, em cada um, foram adicionados 21 μ L do supermix (Invitrogen), 2 μ L de DNA genômico, 1 μ L de cada *primer*, 11F e 11R, anverso e reverso da região D2/D3 (ALBANNA et al., 2004). No termociclador, a mistura foi pré-aquecida a 94°C, 55°C, 72°C e 4°C, realizando-se 35 ciclos, conforme (Tabela 3).

Tabela 3. Condições de amplificação do DNA

Temperatura e duração de cada ciclo					
94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C	4 °C
5 min	30 s	45 s	2 min	10 min	∞
35 ciclos					

Após a amplificação do DNA, 8 μ L do produto da PCR foi adicionado a uma *hack* contendo 1,8 μ L de azul de bromofenol, (marcador 1kb na parte inicial do gel) para visualização em tampão 1X TBE (SAMBROOK et al., 1989) em gel de agarose a 1% (Figura 4). Nesse sentido, o marcador 1kb foi utilizado para comparação das bandas, sendo a marcação 570kb, correspondente ao *primer* 11, específico, para *A. besseyi*. Após 18 minutos na cuba com voltagem de 90; 400; 63 V cada gel foi imerso por 35 min, em solução corante "Uni Safe Dye" e visualizado em transiluminador de luz UV e fotografado para confirmação da espécie em estudo.

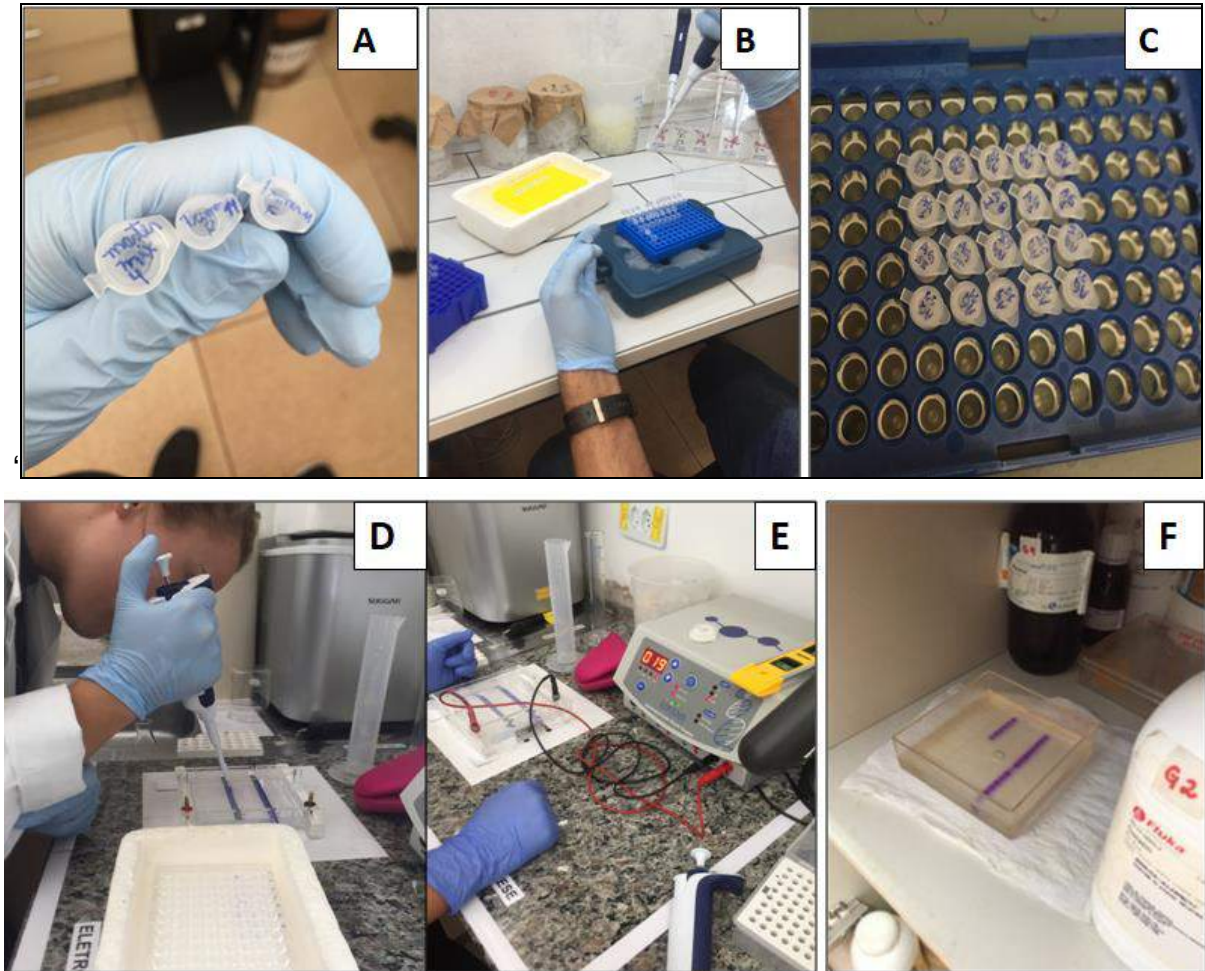


Figura 4. Método de extração de DNA e realização da PCR . Master mix e *primers* utilizados para reação (A); Preparação dos microtubos para realizar a PCR (B); Amostras colocadas no termociclador (C); Amostras homogêneas na hack com azul de bromofenol e adicionadas ao gel de agarose (D); Gel na cuba (E); Gel colocado em solução corante para revelação das bandas (F).

3. Resultados e discussão

3.1. Detecção, quantificação e determinação de níveis de infecção do nematoide da ponta branca em amostras de sementes de arroz provenientes de diferentes regiões orizícolas do Brasil.

A partir das 131 amostras de sementes de arroz analisadas (Tabela 1), detectou-se a presença de *Aphelenchoides* sp., em 21,37% delas, conforme distribuição sequencial por estado (Tabela 4). Entre as amostras onde o nematoide foi encontrado, as sementes foram provenientes de lotes do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Goiás e Tocantins.

Tabela 4. Número de espécimes de *Aphelenchoides* sp. vivos, mortos e totais encontrados/100 sementes por amostras, local, safra e sistema de cultivo de arroz irrigado.

NÚMERO DE NEMATOIDES/100 SEMENTES						
AMOSTRA	LOCAL	TIPO DE CULTIVO	SAFRA	NÚM. VIVOS	NÚM. MORTOS	TOTAL
BRS PAMPA	Capão do Leão/ RS	ARROZ IRRIGADO	2016/2017	220	270	490
BRS CATIANA	Dom Pedrito/ RS	ARROZ IRRIGADO	2017/2018	160	100	260
BRS ATALANTA	Capão do Leão/ RS	ARROZ IRRIGADO	2015/2016	200	170	370
BRS 358	Capão do Leão/ RS	ARROZ IRRIGADO	2017/2018	120	70	190
BRS PAMPEIRA	Uruguaiana/ RS	ARROZ IRRIGADO	2017/2018	110	80	190
BRS ESMERALDA	Santo Ant. de Goiás/ GO	ARROZ TERRAS ALTAS	2018/2019	50	120	170
BRS A501CL	Santo Ant. de Goiás/ GO	ARROZ TERRAS ALTAS	2018/2019	0	80	80
AN CAMBARÁ	Santo Ant. de Goiás/ GO	ARROZ TERRAS ALTAS	2018/2019	40	70	110
BRS ESMERALDA	Santo Ant. de Goiás/ GO	ARROZ TERRAS ALTAS	2018/2019	20	30	50
BRS 502	Santo Ant. de Goiás/ GO	ARROZ TERRAS ALTAS	2018/2019	20	40	60
BRS A701 CL	Goianira/ GO	ARROZ IRRIGADO	2018/2019	90	80	170
BRS A702CL	Goianira/ GO	ARROZ IRRIGADO	2018/2019	30	10	40
BRS PAMPEIRA	Goianira/ GO	ARROZ IRRIGADO	2018/2019	10	30	40
AB 131092	Goianira/ GO	ARROZ IRRIGADO	2018/2019	50	20	70
IRGA 409	Goianira/ GO	ARROZ IRRIGADO	2018/2019	10	50	60
BRS CATIANA	Lagoa da Confusão/ TO	ARROZ IRRIGADO	2018/2019	10	30	40
BRA A702CL	Lagoa da Confusão/ TO	ARROZ IRRIGADO	2018/2019	20	20	40
BRS PAMPEIRA	Lagoa da Confusão/ TO	ARROZ IRRIGADO	2018/2019	140	20	160
SCS122 MIURA	Lagoa da Confusão/ TO	ARROZ IRRIGADO	2018/2019	70	50	120
SCS 116 SATORU LT 01	Pouso Redondo/SC	ARROZ IRRIGADO	2018/2019	50	10	60
SCS 116 SATORU LT 02	Pouso Redondo/SC	ARROZ IRRIGADO	2018/2019	30	110	140
BRS TIOTAKA LT 400	Taió/ SC	ARROZ IRRIGADO	2018/2019	160	130	290
BRS TIOTAKA LT 401	Taió/ SC	ARROZ IRRIGADO	2018/2019	50	60	110
BRS TIOTAKA LT 402	Taió/ SC	ARROZ IRRIGADO	2018/2019	200	50	250
BRS TIOTAKA LT 403	Taió/ SC	ARROZ IRRIGADO	2018/2019	120	50	170
SCS 121 CL LT 735	Agronômica/SC	ARROZ IRRIGADO	2018/2019	90	80	170
SCS 121 CL LT 737	Agronômica/SC	ARROZ IRRIGADO	2018/2019	30	30	60

Não foi possível relacionar a presença ou ausência do nematoide a cultivar de arroz amostrada. Considerando-se a ocorrência de *Aphelenchoides* sp. por sistema de cultivo de uma forma geral, o nematoide foi detectado em 21% das amostras analisadas, e, entre estas, 79% eram de arroz irrigado e 21% de sequeiro. Nas amostras de arroz irrigado cuja sementes estavam infestadas pelo patógeno, 63% eram provenientes de plantio convencional e 39% de sistema de cultivo pré-germinado. Entre aquelas amostras provenientes de arroz de sequeiro infectadas com o patógeno, todas foram procedentes do estado de Goiás.

Levando-se em consideração os níveis totais de *Aphelenchoides* sp. detectados nas sementes de arroz, os valores variaram de 40 a 490 espécimes/100 sementes. Em

lotes de sementes provenientes do RS e de SC foram observados os maiores níveis, ocorrendo em média 300 (190-490) espécimes/100 sementes no RS; e, em Santa Catarina, um valor médio de 156,25 (60-290) nematoides/100 sementes. Já para a variável número de nematoides vivos, nas amostras provenientes do RS e de SC, também foram observados os níveis médios de infecção mais elevados correspondendo a 162 (110-220) e 91,25 (30-200) nematoides/100 sementes, respectivamente; seguidos de Tocantins e Goiás com 60 (10-140) e 32 (10-90) nematoides/100 sementes, respectivamente. Com base nos limiares de dano econômico estabelecidos por Huang et al. (1976), verificou-se que 60% das amostras apresentaram níveis de infecção acima de 30 nematoides vivos por 100 sementes, e deste total, 28% entre 31 e 100 nematoides; e, 32% delas, acima de 100 nematoides vivos. A análise dos dados com base nesses valores de infestação das sementes, demonstrou que as amostras provenientes do RS e de SC, da mesma forma, foram aquelas que apresentaram os maiores níveis (acima de 100 nematoides/100 sementes), destacando aquelas oriundas da cidade de Capão do Leão-RS e de Taió-SC (Tabela 5). Já as quatro amostras oriundas de Tocantins e de Goiás apresentaram, predominantemente, níveis baixos e médios.

Tabela 5. Classes de frequência do nematoide da ponta branca em sementes de arroz de diferentes Estados do Brasil conforme níveis de infestação estabelecidos por Huang et al.; (1976).

Localidade		Nº amostras	Nível de infestação por amostra			
Estado	Cidade		0	+	++	+++
RS	Capão do Leão	3	0	0	0	3
RS	Uruguaiana	1	0	0	0	1
RS	Dom Pedrito	1	0	0	0	1
SC	Pouso Redondo	2	0	0	2	0
SC	Taió	4	0	0	1	3
SC	Agronômica	2	0	1	1	0
GO	Santo Antônio do Goiás	5	1	2	2	0
GO	Goianira	5	0	3	2	0
TO	Lagoa da Confusão	4	0	2	1	1
Total		27	1	8	9	9

0 = nenhum nematoide vivo encontrado por 100 sementes; + = 1-29 nematoides vivos encontrados por 100 sementes; ++ = 30-99 nematoides vivos encontrados por 100 sementes; +++ = mais de 100 nematoides vivos encontrados por 100 sementes conforme Huang et al. (1976).

3.2. Caracterização morfométrica e morfológica de espécies de *Aphelenchoides* detectados em amostras de sementes de arroz de diferentes regiões orizícolas do Brasil.

A partir das medições dos diferentes parâmetros morfológicos e morfométricos dos espécimes de *Aphelenchoides* sp. observados, obtiveram-se as respectivas médias e variações em cada amostra analisada separadamente (Tabelas 6; Figuras 5 e 6, Apêndice 1).

Considerando-se os valores e características dos parâmetros morfométricos e morfológicos dos espécimes em estudo, identificou-se a espécie *A.besseyi* em todas as amostras onde se detectou o nematoide comparativamente a espécie tipo descrita por Christie (1942) em populações proveniente do morango e de arroz (Fortuner *et al.*, 1970). No entanto, foram observadas pequenas variações para algumas características mensuradas em trabalhos pelos referidos autores e em outros estudos realizados em diferentes regiões do globo (Apêndice 2).

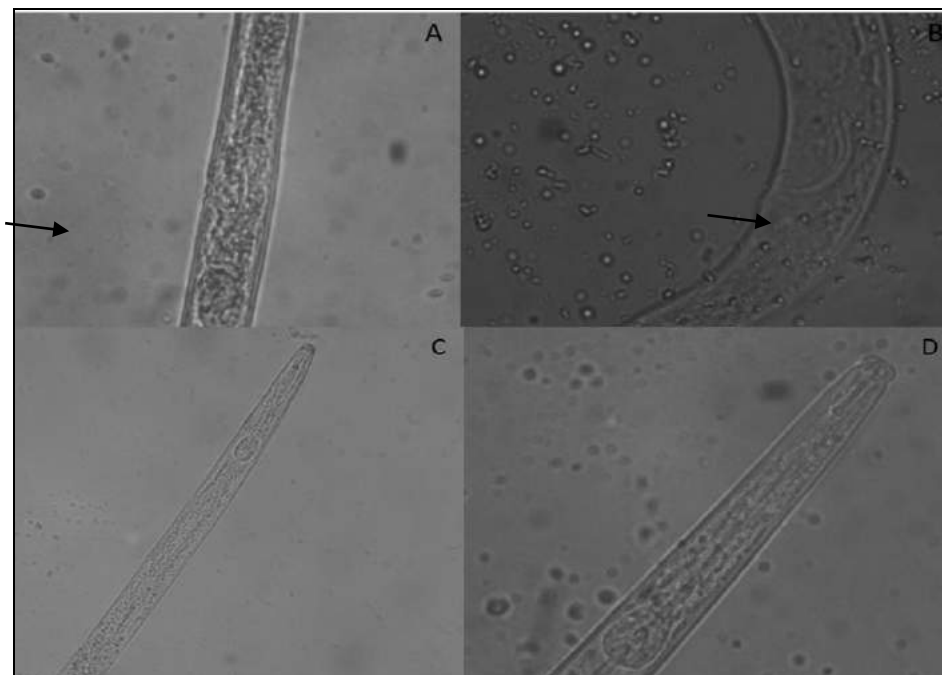


Figura 5. Morfologia do aparelho reprodutivo e digestivo de machos e fêmeas. vulva aparelho reprodutor feminino (A); espícula, aparelho reprodutor masculino (B); parte anterior do corpo com esôfago visível (C); lábios, estilete e metacarpo visíveis (D).

Todos os espécimes avaliados apresentaram esôfago retangular tipo afelencóide (Figura 5) com variação de 84-78 μ m para fêmeas e 82-71 μ m para machos.

Na extremidade da cauda, tipo conoidal, foram observados de dois a quatro mucros, normalmente divergindo em forma de estrela, tanto para machos quanto para fêmeas (Figura 6). Em trabalho conduzido por Fortuner (1970), tal curvatura da cauda dos machos de *A. besseyi* mortos ou relaxados apresentando de 2 a 4 processos terminais também foram descritos, o que condiz com os espécimes machos encontrados no trabalho (Figura 6.1). Apesar da variação verificada nas amostras avaliadas, em média, foi observado três mucros independentemente do sexo do nematoide. No entanto, em duas amostras do RS, três de GO e uma de SC, verificou-se um mucro a menos no macho; e, em três amostras provenientes de SC, tanto em machos como fêmeas, foi verificada a presença de quatro mucros. Os valores estão de acordo com aqueles estabelecidos para *A. besseyi* pelo autor referido acima além dos trabalhos de Amim (2002). Além disso, os machos apresentaram um menor comprimento das espículas, na média, em relação às variações descritas por Fournier (1970) e semelhante as descritas por Amim (2002).

Tabela 6. Parâmetros morfométricos (μm) e morfológicos de fêmeas e machos adultos de 27 populações de *Aphelenchoides besseyi* provenientes de diferentes regiões orizícolas brasileiras.

Amostra	L	St**	Esof.**	A	b	c	V%	Espícula	Mucros*
6. BRS PAMPA	♀ 663,43	12,52	81,617	38,21	8,42	21,18	68	-	3(4-2)
	♂ 606,11	12,10	78,516	41,47	8,31	17,34	-	15,12	2(4-2)
5. BRS CATIANA	707,52	11,80	81,376	44,18	8,65	21,68	68	-	3(3-2)
	545,06	11,03	80,519	42,12	8,21	19,11	-	14,78	3(4-2)
3. BRS ATALANTA	738,91	11,25	82,807	42,57	9,32	20,15	67	-	3(4-3)
	-	-	80,971	-	-	-	-	-	-
1. BRS 358	681,32	13,63	81,456	41,75	8,56	22,64	67	-	3(3-2)
	545,16	10,98	80,320	35,82	8,86	20,42	-	16,10	2(3-2)
4. BRS PAMPEIRA	747,13	12,32	80,344	43,85	9,55	19,91	67	-	3(4-2)
	589,32	13,11	71,546	35,94	9,03	20,66	-	13,83	3(4-2)
31. BRS ESMERALDA PD	701,03	11,60	82,517	39,64	8,86	20,85	70	-	3(3-2)
	542,57	11,10	79,661	33,15	9,31	20,96	-	15,00	3(4-2)
32. BRS A501CL	689,93	10,80	80,517	41,79	9,34	18,98	72	-	3(3-2)
	586,22	9,62	76,766	39,12	8,13	20,81	-	14,92	2(3-2)
34. AN CAMBARÁ	691,45	11,61	78,317	39,85	10,57	23,52	70	-	3(4-2)
	580,23	11,04	75,244	35,99	10,10	19,31	-	13,76	2(3-2)
35. BRS ESMERALDA PC	702,32	11,04	83,519	39,32	8,67	19,13	70	-	3(3-2)
	597,52	10,56	82,677	43,00	8,32	18,62	-	16,23	3(3-2)
37.. BRS 502	697,35	11,32	83,516	42,68	9,32	21,43	67	-	3(4-2)
	547,66	11,11	79,856	33,84	9,00	18,32	-	16,50	3(4-2)
41. BRS A701 CL	700,03	12,05	83,617	39,65	9,55	22,72	68	-	3(3-2)
	610,93	11,05	80,515	33,90	9,16	19,82	-	15,00	2(4-2)
42. BRS A702CL	656,52	11,89	81,434	43,08	9,32	20,88	65	-	3(4-2)

		600,89	12,02	77,608	42,61	9,61	16,51	-	13,88	3(4-2)
43.	BRS PAMPEIRA	636,77	11,89	84,003	37,68	8,51	20,62	75	-	3(3-2)
		508,33	11,24	78,107	33,16	8,67	17,90	-	14,39	3(3-2)
44.	AB 131092	608,92	12,13	82,457	35,61	8,63	18,79	78	-	3(4-3)
		576,92	10,11	80,133	39,61	8,55	16,64	-	15,68	3(4-2)
45.	BR IRGA 409	671,52	12,04	80,223	40,94	9,01	19,62	69	-	4(4-3)
		504,30	12,08	78,661	32,49	8,06	19,87	-	15,67	3(4-2)
49.	BRS CATIANA	632,45	11,32	83,451	40,63	8,57	21,32	70	-	3(4-3)
		547,83	12,02	79,133	32,99	8,04	20,10	-	14,76	3(4-3)
50.	BRA A702CL	687,72	11,52	81,034	39,55	8,92	20,99	70	-	3(4-3)
		532,83	10,31	78,100	30,44	9,32	18,77	-	17,46	2(4-2)
51.	BRS PAMPEIRA	649,58	10,68	78,108	37,25	9,52	20,61	75	-	3(4-2)
		577,12	10,11	75,664	40,93	8,52	20,00	-	17,23	3(4-2)
52.	SCS122 MIURA	655,80	11,80	87,366	37,33	9,69	20,14	68	-	4(4-3)
		591,14	12,30	82,514	34,78	8,92	20,61	-	16,35	4(4-3)
100.	SCS 116 SATORU LT 01	689,32	12,08	76,318	36,94	9,84	20,62	70	-	3(4-2)
		616,19	10,92	75,009	39,46	8,89	19,82	-	16,54	3(4-2)
101.	SCS 116 SATORU LT 02	671,90	11,45	81,667	37,11	8,34	20,32	70	-	4(4-2)
		598,25	11,28	78,987	40,73	8,31	19,35	-	15,91	4(4-2)
116.	BRS TIOTAKA LT 400	621,03	10,32	81,353	38,03	8,11	19,54	68	-	3(4-2)
		533,24	10,02	80,917	34,81	8,52	19,23	-	14,65	3(4-3)
117.	BRS TIOTAKA LT 401	689,39	11,52	82,516	41,56	10,52	18,98	69	-	3(4-3)
		587,34	11,21	79,008	41,92	8,22	19,82	-	14,89	3(4-3)
118.	BRS TIOTAKA LT 402	671,21	9,90	81,544	35,94	8,56	19,52	67	-	3(4-2)
		602,80	11,01	76,008	40,12	8,34	18,10	-	15,35	3(4-2)
119.	BRS TIOTAKA LT 403	644,10	11,52	81,617	37,66	10,10	19,72	70	-	4(4-2)
		566,98	10,91	79,663	31,13	8,62	18,54	-	14,90	4(4-2)
125.	SCS 121 CL LT 735	691,04	13,01	84,317	42,26	8,91	21,23	67	-	3(4-3)
		566,97	11,00	81,600	30,01	8,62	18,62	-	15,54	3(4-3)
126.	SCS 121 CL LT 737	689,00	12,81	82,655	43,57	8,32	21,96	69	-	3(4-3)
		601,82	11,52	80,103	42,89	8,92	20,32	-	15,11	2(4-2)
Média		677,28	11,70	82,513	39,95	9,10	20,63	69,4	-	3(3,16)
		571,68	11,14	80,509	37,01	8,92	19,21	-	15,36	3(2,86)
Varição		608-747	9,9-13,6	84-78	35,6-44,1	8,1-10,5	18,7-23,5	65-68	-	3-4
		504-616	9,6-3,1	82-71	30-42,8	8-10,1	16,5-20,9	-	13,7-17,4	2-4

^a Numeração conforme tabela 1. Os valores morfométricos referem-se ao menor e maior valor obtido nas populações de cada amostra. **Comprimento; Origem das amostras: ¹RS; ²GO; ³TO; ⁴SC. Fêmea primeira linha e macho o segundo na linha para cada amostra

Em relação ao comprimento do corpo dos espécimes mensurados, verificou-se que as fêmeas de *A. besseyi*, foram, em média, 100 µm maiores que os machos; porém, dependendo da população, essa diferença foi maior (Tabela 6) em aproximadamente metade das amostras, sendo essas diferenças comumente encontradas em estudos desde a primeira caracterização da espécie (Christie, 1942) até a última década (Jesus, 2015).

Na análise dos dados de comprimento de estilete, os valores observados estão de acordo com as descrições de Fortuner et al. (1970), Kham et al. (2012) e Jesus (2015), muito embora tal variação comparada aquela de Allen (1952) e Amim et al. (2002), seja de aproximadamente 1 a 2 μm menor, dependendo do sexo da referida espécie.

Os valores dos dados morfométricos de *a* para os machos [37,01(30,42,8)] e fêmeas [39,95(35,6-44,1)] de *A. besseyi* observados na Tabela 6 estão de acordo com aqueles de Christie et al. (1942), Allen et al. (1952), Amim et al. (2002) e Jesus et al. (2015). Em relação a '*b*', os valores observados no presente trabalho foram menores que aqueles descritos pelos autores acima citados uma vez que tal parâmetro é função da relação entre comprimento do esôfago e comprimento do corpo, cuja média do primeiro foi em média de 82,51, índice superior àqueles citados nos referidos trabalhos.

Os valores de *c* (razão entre comprimento do corpo e cauda) dos espécimes encontrados em comparação aos dados descritos para as populações de *A. besseyi* registradas no Egito, por Amim (2002) e por Christie (1942) estão de acordo conforme variação de 15,6-20,5 μm , porém quando comparados aos valores estabelecidos por Jesus (2015) e Kham et al. (2012) são maiores.

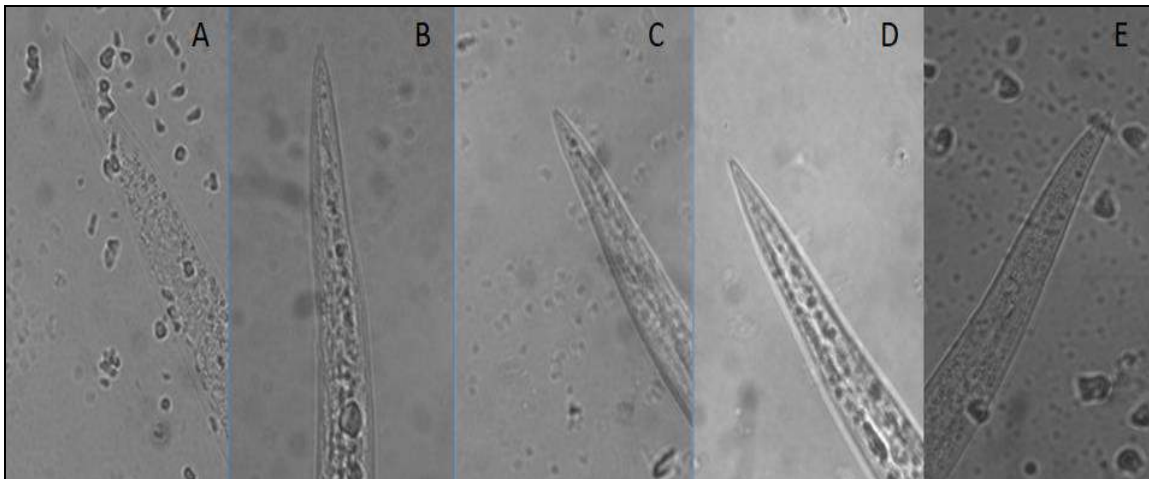


Figura 6. Micrografia da cauda conoidal de espécimes de *Aphelenchoides besseyi* provenientes de amostras de sementes de arroz. A) cauda apresentando dois mucros; B) cauda apresentando três mucros; C) cauda apresentando de três a quatro mucros; D e E) cauda apresentando quatro mucros.

Não foram observados espécimes machos na população oriunda da cultivar de arroz BRS Atalanta (Capão do Leão/RS), o que indica uma possível reprodução das fêmeas por partenogênese. Em trabalhos como, Huang *et al.*, 1979; Gokte & Mathur, 1989; Gokte-Narkhedkar *et al.*, 2001, há relatos de amostras em que também

apresentaram variação no modo de reprodução de *A. besseyi*, constando predominante a presença de fêmeas. Fatores ambientais, tais como temperatura, hospedeiro, disponibilidade de alimento e origem geográfica podem induzir extensivas variações intraespecíficas na morfologia, reprodução e morfometria em nematoides (Tarte & Mai, 1976; Doucet *et al.* 2001; Fu *et al.*, 2012; Fonderie *et al.*, 2013). No entanto, estudos genéticos, morfométricos e morfológicos com um maior número de espécimes dessa população são necessários para elucidar tal observação.

3.3. Caracterização molecular de espécimes de *Aphelenchoides* sp.

A partir da visualização dos géis de agarose, verificou-se a presença de uma única banda de aproximadamente 570pb, característica de *A. besseyi* de acordo com padrão estabelecido por Sercero (2019), confirmando, assim, a presença do nematoide da ponta branca em tem todas as amostras analisadas (Figura 6).

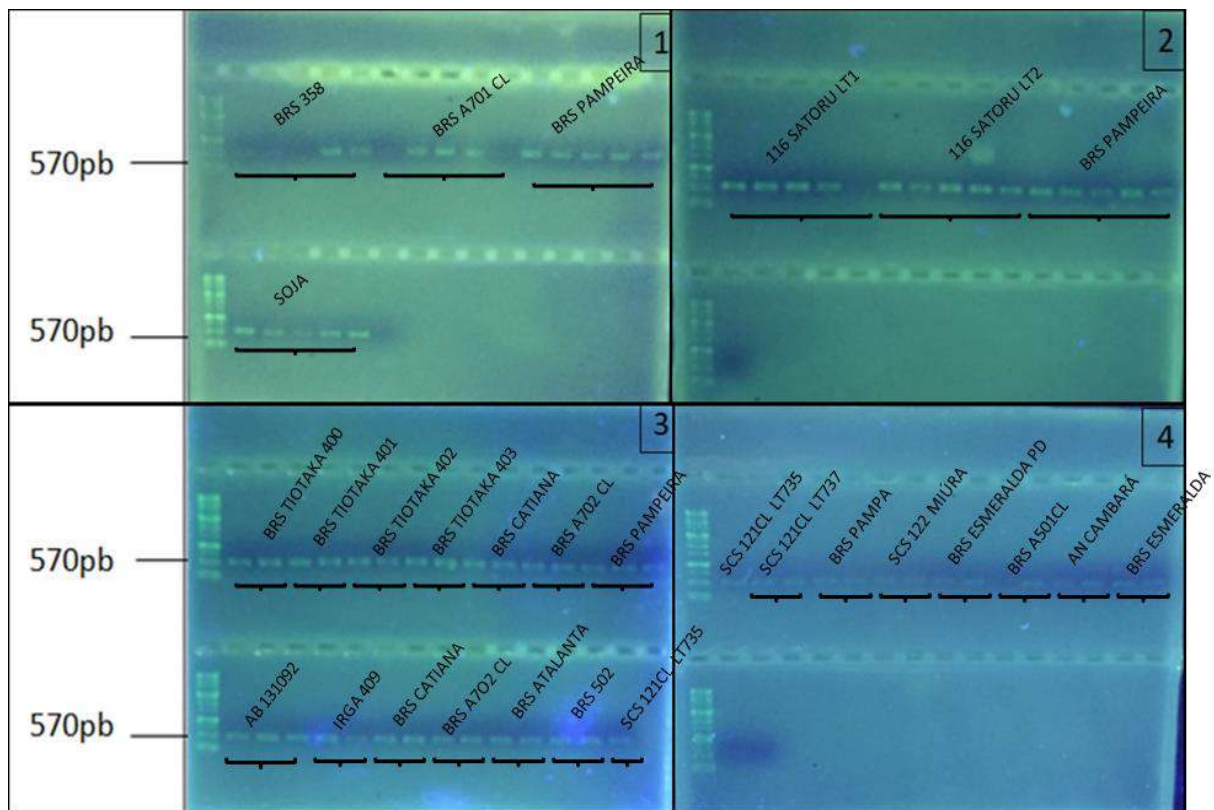


Figura 7. Produto da PCR de 27 populações de *Aphelenchoides besseyi* provenientes de sementes de arroz em géis de agarose a 1% utilizando-se o *primer* espécie-específico 11 com marcador molecular 1 Kb.

Tanto para as populações do nematoide de arroz do gel 1 (Amostras 1 a 4) e 2 (Am. 5 a 7) quanto dos géis 3 (Am. 8 a 19) e 4 (Am. 20 a 27), independentemente do número de repetições, foi evidenciada a presença da mesma

banda de 570bp obtida a partir do produto da PCR da população tipo de *A. besseyi* proveniente de soja (Gel 1), o que demonstra a eficiência desse marcador (*prime* 11) na caracterização dessa espécie para os diferentes estados/regiões onde o nematoide foi detectado em sementes de arroz.

Segundo Cheng 2013, com o desenvolvimento da biologia molecular, a tecnologia de engenharia genética foi aplicada na pesquisa do genoma de nematoides parasitas de plantas. Os métodos moleculares são amplamente utilizados para estudar a maneira eficaz e segura de identificar e prevenir nematoides parasitas de plantas. O método de PCR tem sido amplamente utilizado para a identificação de nematoides parasitários de plantas (Zijlstra et al. 2000; Adam et al. 2007; Devran e Söğüt 2009). No ano de 2016, na Turquia, Devran et al., desenvolveu um método de detecção molecular rápida para *A. besseyi* sem a remoção do nematoide dos tecidos das sementes de arroz. Já o primer desenvolvido por Sercero (2019) e utilizado nesse trabalho traz para a comunidade científica e para empresas de pesquisa a praticidade juntamente com a eficiência na identificação de *A. besseyi* em sementes, mas também em cultivares de soja que apresentem sintomas ocasionados pela presença do patógeno.

Jesus et al. (2016) e Rybarczyk-Mydlowska et al. (2012) desenvolveram protocolos de detecção por meio da técnica de PCR em tempo real quantitativo (qPCR), para espécies do gênero *Aphelenchoides* sp. Porém a implantação desses protocolos em rotinas laboratoriais, além do elevado custo das análises, em muitos casos é proibitivo para rotina. Além disso, deve-se também levar em consideração, a variabilidade genética existente entre populações do nematoide.

Atualmente, a taxonomia integrativa tem sido usada para diagnosticar espécies de diferentes patógenos em função das dificuldades tanto para a taxonomia clássica, baseada em observações morfométricas e morfológicas, assim como no uso indiscriminado de um marcador molecular que muitas vezes pode apresentar polimorfismo para outras espécies que não aquela alvo. Nesse sentido, uma caracterização não elimina a outra e sim complementa. Em vários patossistemas nematoides x plantas, o uso da taxonomia integrativa tem levado ao diagnóstico de muitas espécies até então sinonimizadas ou identificadas erroneamente. Em arroz, por exemplo, até 2017, muitas espécies de *Meloidogyne* que afetam o arroz vinham sendo sinonimizadas como *M. graminicola*. Com trabalho de Negretti et al. (2017) e Mattos et al. (2018), através da taxonomia integrativa,

pode-se separar *M. graminicola* de *M. oryzae*, assim como também sinonimizar e caracterizar variantes da primeira (Santos, 2020).

O nematoide da ponta branca do arroz está presente nas áreas de cultivo de arroz em muitos países do mundo (EPPO 2009). Os nematoides fitoparasitas são um dos organismos que apresentam maior dificuldade para serem identificados, pois apresentam muitos obstáculos em relação ao seu tamanho diminuto, que dificulta a observação de características morfológicas e morfométrica, que devem ser comparadas com chaves para diagnóstico em nível de espécie (HEYNS, 1983). Nesse sentido, a caracterização correta de uma determinada espécie é a chave para o diagnóstico correto de uma nematose e posterior proposição de manejo.

A ocorrência do nematoide da ponta branca, *A. besseyi*, embora tenha sido um problema na orizicultura brasileira há mais de 40 anos atrás, atualmente, em nossas condições, tem causado problemas pontuais na cultura, uma vez que a grande maioria das cultivares comerciais tem em sua constituição genética, resistência incorporada a tal patógeno desde meados da década de 70 quando então a cultivar americana Bluebelle foi incorporada nos cruzamentos realizados no país (Oliveira 1987). Além disso, os danos estão também estreitamente relacionados à temperatura e umidade relativa do ar elevadas (Fortuner; Williams, 1975). Somado aos fatores climáticos e genéticos, o nível de infestação das sementes com o patógeno é um dos principais fatores limitantes já no plantio. Nesse sentido, considerando-se o nível de dano em função do limiar de infestação descrito por Fortuner e Williams (1976) (≥ 30 nematoides vivos/100 sementes) e Huang et al (1976), aproximadamente 74 e 33% (nível médio e alto) das amostras avaliadas, nesse estudo, respectivamente, poderiam dar problemas em lavouras irrigadas, predominantemente, sob condições favoráveis.

Já pela análise dos dados, com base no limiar de infestação de sementes de Fukano (1962) (300 nematoides vivos/100 sementes), nenhuma das amostras avaliadas entraria nesse limite. No entanto, conforme Nunes (2013), em época de cultivo onde a umidade relativa do ar persiste durante o ciclo produtivo do arroz, elevada taxa de abortamento das flores e grande número de grãos chochos podem ocorrer em níveis menores de infestação iniciais das sementes. Contudo, limiares de danos menores para cultivares suscetíveis podem ser um fator limitante conforme relatou Fukano (1962) para as condições do Japão onde o referido autor sugere que um nível de infestação de 30 ou mais nematoide/100 sementes é suficiente para

causar prejuízos consideráveis em variedades suscetíveis, na colheita. Se o mesmo parâmetro for usado para as regiões em estudo, mais de 15% das lavouras orizícolas poderiam resultar em danos causados por *A. besseyi* no campo. Não se sabe, porém, se a relação de dano potencial e inóculo relatada naquele país (Fukano,1962) poderia ser aplicado à realidade brasileira, cujas condições climáticas, práticas culturais e variedades utilizadas são distintas.

Apesar do problema da ponta branca ser ocasional, no Brasil, o arroz tem sido rotacionado com diferentes espécies vegetais (SOSBAI 2007). No estado do Rio Grande do Sul e centro-oeste do país, as culturas mais utilizadas em rotação ou em sucessão com o arroz são o milho, a soja e o sorgo, além de algumas espécies de pastagens. A utilização dessas culturas visa a diminuir os níveis de infestação de plantas daninhas, melhorar o uso e qualidade do solo, otimizar o uso das máquinas e da mão de obra, quebrar ciclos de doenças e pragas e aumentar a rentabilidade da área (Gomes et al.; 2002, Barneche 2016). A utilização da rotação entre arroz e soja vem crescendo cada vez mais no Brasil com o intuito de diversificar a renda do produtor. Nesse sentido, a simples presença de *A. besseyi* no solo pode ser considerado como potencial de inóculo para o cultivo sequencial de soja no mesmo local, muito embora pouco se saiba sobre a patogenicidade de populações provenientes do arroz nessa cultura. Dessa maneira, faz-se necessário o estudo sobre as populações oriundas do arroz e sua patogenia na cultura da soja (Capítulo 2) com o intuito de prospectar o impacto da introdução da soja em áreas já contaminadas pelo patógeno.

4. Conclusões

Dentro das amostras de arroz recebidas oriundas de diferentes regiões do Brasil, 20,61% delas estão infectadas com *A. besseyi*, cujos níveis de nematoides vivos nas sementes variaram de 10 a 220.

Apesar de baixa, a incidência do nematoide da Ponta Branca em lotes de sementes de arroz, aqueles provenientes de lavouras de arroz irrigado foram mais frequentes que as de arroz de sequeiro; e, dentre aquelas amostras de arroz irrigado, aquelas oriundas do cultivo convencional apresentaram maior taxa de detecção.

A utilização do *primer 11* para caracterização molecular das populações estudadas permitiu a identificação de *A. besseyi* em todas as amostras, confirmando a identificação desse nematoide por caracteres morfológicos e morfométricos.

Capítulo II

Patogenicidade de populações de *Aphelenchoides besseyi* provenientes de arroz em soja.

1. Introdução

A produção de soja (*Glycine max*) está entre as atividades econômicas que, nas últimas décadas, apresentou crescimento mais expressivo no Brasil, segundo maior produtor (CONAB, 2020). Na safra 2014/15, cerca de 95.070,2 milhões de toneladas de soja foram colhidas no país em uma área de aproximadamente 31.573,0 milhões de hectares, com uma produtividade média de 3.011 kg.ha⁻¹ (Conab, 2015). Já em 2020, foi obtida uma produção recorde estimada em 120,9 milhões de toneladas, ganho de 5,1% em relação à safra 2018/19, com uma produtividade média de 3168 Kg/há e uma área plantada de 36.949,9 milhões de hectares, 3% acima da área plantada na safra 2018/19 (CONAB 2020).

A soja foi introduzida no Brasil via Estado da Bahia em meados do século 19 e, atualmente, é uma das mais importantes culturas que gera renda para o país. A soja é uma das *commodities* de maior importância para economia Brasileira, sendo o principal grão produzido e exportado. A balança comercial de fevereiro/2019, divulgada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), mostra que a exportação chegou a 6,1 milhões de toneladas de soja, superando recordes anteriores de 3,5 milhões (CONAB, 2019).

Para atingir índices consideráveis de produtividade é necessário controlar uma série de problemas fitossanitários que afetam a cultura. Diversos fatores contribuem para perdas de produção em lavouras de soja, especialmente aqueles associados à ocorrência de doenças e pragas. Nos últimos anos, os fitonematoides têm se destacado como uma das principais pragas da cultura em todo o país (SILVA, 2018).

Há mais de dez anos (temporada 2005–2006), a ocorrência da síndrome de “Soja Louca II” (Gilioli et al. 2007) surgiu no Brasil, cujos principais sintomas caracterizavam-se por um distúrbio das hastes com retenção foliar o qual atingiu níveis epidêmicos, principalmente nas regiões quentes e chuvosas dos estados do Maranhão, Tocantins, Pará e norte de Mato Grosso, causando perdas na produção de soja de até 100% (Meyer et al. 2008 ; 2009).

Diversas investigações foram estabelecidas para identificar o agente causal dessa doença. Segundo Meyer (2017), estudos relacionados a vírus, deficiências nutricionais, reação a herbicidas e associação a ácaros foram inicialmente

conduzidos e posteriormente descartados; sendo sugerida como uma possível causa, o nematoide do gênero *Aphelenchoides* com o trabalho sobre o amachamiento do feijão comum (Chaves et al. 2013). No entanto, somente em 2017 Meyer e colaboradores estabeleceram a natureza do patógeno identificado como *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 (MEYER et al., 2017). Nesse sentido, o Ministério da Agricultura reconheceu a "Soja Louca II" como uma nova doença que ameaça a cultura no Brasil uma vez que desde a safra 2005/2006, tal problema também referido como uma síndrome vinha causando reduções de até 60% na produtividade da soja, principalmente em regiões quentes e chuvosas.

Aphelenchoides besseyi é capaz de infectar a planta movendo-se internamente por seus tecidos desde a raiz, e, ao parasitar a parte aérea, pode causar o sintoma da haste verde e retenção foliar, nome adotado em referência à síndrome recentemente (FRANÇA et al.; 2019). Nesse sentido, os principais sintomas causados por este nematoide na parte aérea são a retenção foliar com embolhamento e afilamento das folhas, engrossamento dos nós e haste (caneluras), e abortamento de flores e vagens (FAVORETO et al., 2017; MEYER et al., 2017).

Os sintomas podem começar no estágio vegetativo V5-V6, porém são mais comuns a partir da floração até a época da colheita, quando as plantas doentes permanecem com os caules, pecíolos, folhas e vagens de tom verde. As plantas apresentam sintomas semelhantes a viroses, como distorções, formação de bolhas, amarração e espessamento das nervuras. As hastes permanecem verdes e às vezes são torcidas e estriadas, com nós aumentados. As vagens são distorcidas, espessadas, com necrose marrom avermelhada. Altos níveis de abortamento de flores são comuns, e, eventualmente, a proliferação de brotos pode ocorrer (MEYER et al. 2009; MEYER et al. 2010).

De acordo com Meyer et al., (2010), o elevado índice de abortamento das vagens é mais intenso no terço superior das plantas infectadas e diminui gradativamente em direção à base. Além disso, na maioria das vezes, ocorre a formação de novas inflorescências e sintomas de superbrotamento, os quais interferem no processo de maturação da planta, que se apresenta verde mesmo depois da dessecação com herbicidas. Ainda, conforme os mesmos autores, a coloração esverdeada das plantas já em final de ciclo, como nos estádios R7 e R8 (maturação plena da planta), é distribuída em reboleiras ou em linhas de semeadura

que, a campo, são fáceis de serem notadas quando comparadas com plantas não infectadas, que apresentam característica e cor típica de final de ciclo e senescência. Dessa forma, a presença de plantas verdes na área dificulta a colheita e causa o embuchamento das máquinas, afetando drasticamente a eficiência de colheita.

Segundo Meyer; Hirose (2012), até o momento não são conhecidas cultivares com resistência ou tolerância ao patógeno, sendo indicado o manejo de solo e da cultura. Dessa forma, é de extrema importância o monitoramento dos níveis populacionais do nematoide na área a fim de diminuir os danos. Para tanto, uma das alternativas de manejo da praga é a dessecação das áreas antecipada à semeadura de soja e algodão, além do controle de plantas invasoras hospedeiras de *A. besseyi*.

Nos locais onde a síndrome da haste verde ocorre, tem sido preconizada a rotação de culturas com o arroz. No entanto, pouco se sabe sobre a patogenicidade de populações do nematoide da ponta branca (*A. besseyi*) que naturalmente ocorrem em áreas tradicionalmente cultivadas com a cultura. Mesmo sendo uma realidade a sucessão de soja à cultura do arroz irrigado em ambientes de terras baixas, no RS, há mais de 10 anos (Scivittaro, 2017), suposições sobre a ocorrência da síndrome da haste verde no estado (Phytus, 2016) e a etiologia do agente fitopatogênico envolvido, não foram comprovadas. Além disso, pouco se sabe sobre o emprego da cultura do arroz em rotação com a soja em locais/regiões do país onde o problema da síndrome da haste verde ocorre. Considerando-se a presença de *A. besseyi* como fator primário à ocorrência da síndrome da haste verde na soja e que a cultura vem sendo rotacionada com arroz irrigado ou sequeiro em áreas com histórico de ponta branca, foi objetivo desse trabalho, avaliar a patogenicidade de populações de *Aphelenchoides besseyi*, provenientes de lotes de sementes de arroz de diferentes regiões orizícolas do país na cultura da soja.

2. Material e métodos

A partir de amostras de arroz infectadas com *A. besseyi* (Capítulo 1), três populações do nematoide, provenientes de lavouras dos municípios de Capão do Leão-RS (APH 1), Goianira-GO (APH 11) e Lagoa da Confusão-TO (APH 18); e, uma de soja (SII) de Ipiranga do Norte/ Mato Grosso (local com sintomas de Haste Verde), foram primeiramente multiplicadas *in vitro* no laboratório de Nematologia da

Embrapa Soja, em Londrina, Paraná, conforme metodologia de Favoretos (2011). Para tanto, 15 fêmeas e 5 machos de *A. besseyi*, extraídos das sementes de cada amostra sob microscópio estereoscópico, foram axenizados em solução de 0,01g de ampicilina com 100 mL de água esterilizada. A seguir, os espécimes foram transferidos para placas de Petry contendo colônias de *Fusarium* sp. crescidas em BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e mantidas em BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) no escuro a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 30 dias para multiplicação do nematoide e posterior uso como inóculo no estudo da patogenicidade em plantas de soja.

Em casa de vegetação, vasos de isopor de 1L contendo a mistura de solo e areia (2:1) esterilizada, foram primeiramente semeados com a cultivar de soja BRS 284, sabidamente suscetível a *A. besseyi* e a manifestação da Síndrome da Haste verde (Meyer et al.,2017). Decorrido uma semana da semeadura, vasos contendo uma única planta, foram inoculados com 600 ou 1200 espécimes de cada uma das quatro populações do nematoide utilizando-se cinco repetições, em experimento fatorial com delineamento completamente casualizado. Como testemunhas, plantas de soja da mesma cultivar receberam apenas água destilada. A inoculação foi realizada pela deposição de uma alíquota de 1000 μL contendo o inóculo em orifício aberto no solo, ao lado do colo de cada planta (Figura 8).

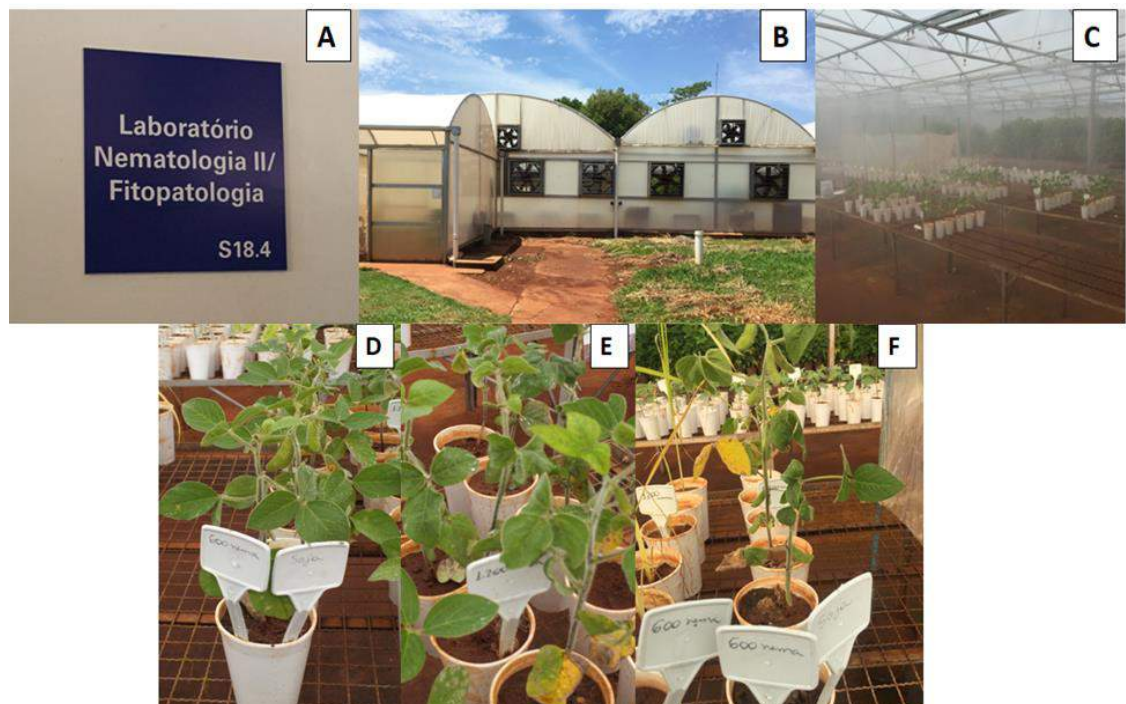


Figura 8. Avaliação da patogenicidade de populações de *A. besseyi* em soja (BRS 284) A) Laboratório de Nematologia II na Embrapa Soja; B) Casa de vegetação em que foi montado o

experimento; C) Nebulização das plantas; D, E e F) Plantas de soja inoculadas com o nematoide 50 dias após o plantio.

Os vasos contendo as plantas inoculadas ou não, foram mantidos em casa de vegetação com períodos de nebulização constantes de 15 segundos a cada meia hora e com temperatura média de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Decorridos 50 dias da inoculação, as plantas dos diferentes tratamentos foram avaliadas quanto aos sintomas da haste verde (MEYER et al. 2009; 2010) e fotografadas.

A seguir, a parte aérea de cada planta de soja foi removida do vaso, pesada individualmente; e, posteriormente, lavada e processada (Figura 9). O processo de lavagem de cada planta foi conduzido dentro de um saco plástico e repetido por cinco vezes, cuja suspensão líquida foi vertida sobre as peneiras de 20 e 500 meshes e recolhida em Becker para posteriormente transferência a tubos de ensaio, devidamente identificados. Paralelamente, após a lavagem da planta, a mesma foi processada em liquidificador com água por 30 segundos, a seguir, a respectiva suspensão foi vertida sobre as peneiras de 20 e 500 meshes e recolhida em um Becker para centrifugação em solução de sacarose (400g açúcar em 1L de água esterelizada) conforme Hussey; Barker (1973) modificado por Boneti; Ferraz (1981), cujo volume recolhido foi transferido para tubo de ensaio para posterior avaliação quanto ao número de nematoides (Figura 9).

A seguir, as suspensões lavadas e ou processada da mesma amostra, foram transferidas individualmente para tubos de ensaio, permaneceram em repouso por 24 horas, e, logo foram reduzidas para 4 ml, retirando o sobrenadante com seringa sem movimentar o fundo da suspensão (Figura 10). Com uma pipeta graduada, a suspensão de cada subamostra foi agitada, e, transferida para lâmina de *Peters* para quantificação dos nem sob microscópio estereoscópio, determinando-se assim, o número de nematoides obtidos da lavagem da planta ou processamento, população final total e fatores de reprodução do nematoide ($\text{FR} = \text{População final} / \text{população inicial}$; Oostembrink, 1966) obtidos dos processos de lavagem, processamento e total. A reação dos genótipos de soja ao nematoide foi dada pelo FR, onde valores $\text{FR} > 1$, indicou suscetibilidade e $\text{FR} < 1$, resistência do genótipo de soja testado.

Posteriormente, os valores de massa fresca da parte aérea, número de nematoides obtidos da lavagem da planta ou processamento, população final total e

fatores de reprodução do nematoide ($FR = \text{População final/população inicial}$; Oostembrink, 1966) obtidos dos processos de lavagem, processamento e total (dados transformados em raiz $x+1$), foram submetidos à ANOVA, sendo a seguir, analisada a interação entre os fatores (populações de nematoides e níveis de inóculo); cujas médias das respectivas variáveis e tratamentos foram comparadas entre si, conforme significância ou não da interação, pelo teste de Duncan a 5% através do programa SAS 9.3.



Figura 9. Lavagem e processamento das amostras: A) pré-lavagem da planta de soja; B) lavagem da planta; C) recolhimento da suspensão em Becker; D) processamento das amostras em liquidificador; E) peneiramento; e, F) recolhimento da suspensão processada em Becker para posterior avaliação do número de espécimes de *A. besseyi*/amostra.

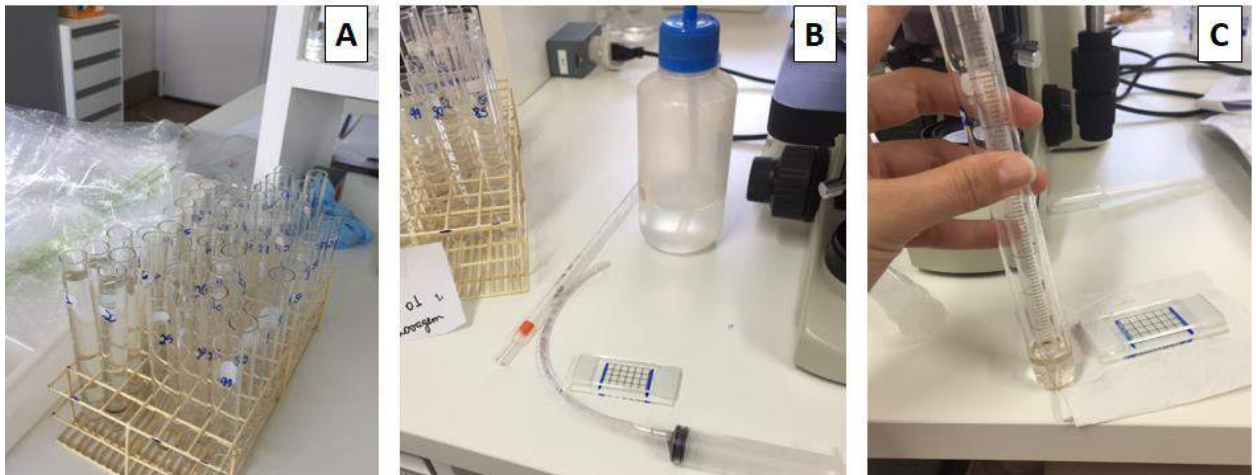


Figura 10. Contagem do número de nematoides nas amostras lavadas e processadas. A) Tubos de ensaio contendo nematoides para contagem; B) Materiais utilizados para redução da amostra e lâmina de *peters* para contagem; C) Tubo de ensaio contendo amostra reduzida a 4 ml.

3. Resultados e discussão

3.1. Avaliação dos sintomas das plantas inoculadas com *A. besseyi*

A inoculação das plantas de soja com *A. besseyi*, independentemente do nível de inóculo (600 ou 1200 espécimes/planta) e da origem da população, resultou no desenvolvimento de sintomas característicos da síndrome da haste verde como nanismo e embolhamento foliar; retorcimento e embolhamento foliar; tons de verde escuro mais intenso juntamente com embolhamento foliar em todas as plantas de soja (Figura 11a-c); ao passo que nas plantas não inoculadas, não foram observadas alterações conforme pode ser observado na Figura 11d.

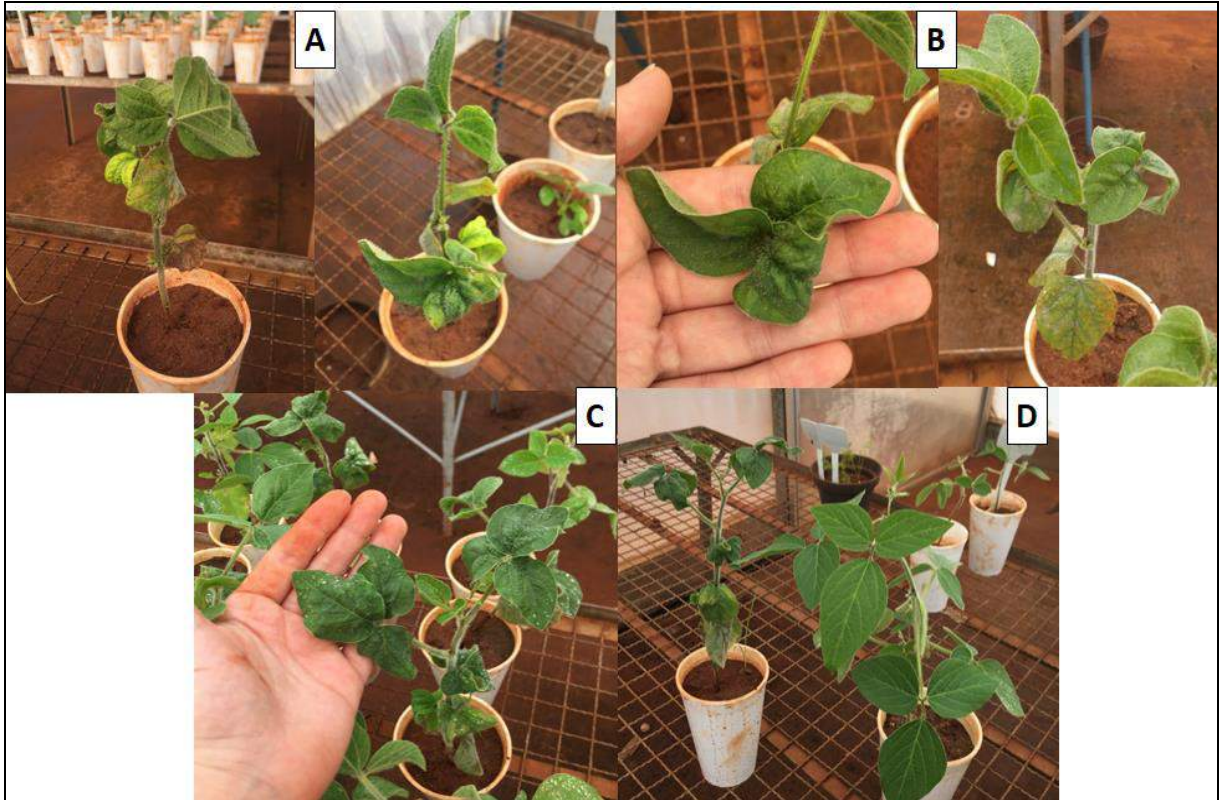


Figura 11. Sintomas de haste verde e retenção foliar em plantas de soja inoculadas com populações de *A. besseyi* oriundas do arroz: A) nanismo e embolhamento foliar; B) retorcimento e embolhamento foliar; C) tons de verde escuro mais intenso juntamente com embolhamento foliar; D) comparação de planta inoculada, com sintomas, em relação à testemunha (não inoculada).

3.2. Reprodução das populações de *A. besseyi* provenientes de arroz em soja e efeito do nematoide no desenvolvimento das plantas

De uma forma geral, verificou-se interação entre os fatores para a maioria das variáveis analisadas no presente estudo (Tabela 7). Quando avaliado o número de nematoides recuperados das plantas de soja inoculadas pelas duas formas de extração, verificou-se interação significativa entre os fatores (população e nível de inóculo) apenas para lavagem da parte aérea; já para processamento, verificou-se significância apenas para nível de inóculo. Quando considerada a população final de *A. besseyi* (lavagem + processamento da amostra) e os respectivos fatores de reprodução (FR) do nematoide obtidos em cada processo de extração e o FR total (População final=lavagem + processamento), houve interação entre os fatores ($P < 0,05$) para essas variáveis. No entanto, para massa fresca da parte aérea, o efeito foi significativo apenas para populações de *A. besseyi*.

Tabela 7. Análise fatorial das variáveis massa fresca da parte aérea (MFPA), número de espécimes de *A. besseyi* (*Ab*) obtidos na lavagem, número de nematoides obtidos no processamento, população final (lavagem + processamento), fator de reprodução 1 (Pf lavagem/Pi), fator de reprodução 2 (Pf processamento/Pi), fator de reprodução total (Pf/Pi), e nível de significância.

	MFPA	Nº <i>Ab</i> Lavagem	Nº <i>Ab</i> Processamento	PF (nº <i>Ab</i> /pl.)	FR1	FR2	FRT
População	0,001**	0,001**	0,308 ^{ns}	0,002**	0,001**	0,005**	0,034 ^{ns}
Nível de inóculo	0,015**	0,016**	0,001**	0,001**	0,001**	0,001**	0,001**
Pop.*inóculo	0,637 ^{ns}	0,006**	0,274 ^{ns}	0,050*	0,001**	0,041**	0,042*

*significativo a 5% de probabilidade; ** significativo a 1% de probabilidade; ns- não significativo.

Considerando-se o processo de lavagem na recuperação de espécimes de *A. besseyi* das plantas (Tabela 8), maior número de nematoides foram observados nas populações provenientes de arroz APH 18 e APH11 para ambos os níveis de inóculo. Já para a recuperação de *A. besseyi* pelo processamento do material, houve significância apenas para o maior nível de inóculo inicial, onde o número de nematoides obtidos das populações de arroz não diferiu entre si e foi significante superior àquela proveniente da população de soja (SII). Quando analisados os valores de população final total, dentro do menor nível de inóculo (600 *A.besseyi*/planta), as populações APH 18 e APH01 resultaram em maior número de nematoides obtidos. Em relação ao maior nível de inóculo (1200 *A.besseyi*/planta), o número de espécimes recuperados foi inferior ao número de espécimes inoculados, porém mesmo assim, duas das três populações provenientes do arroz reproduziram mais que aquela proveniente da soja a qual não diferiu de APH01.

Analisando-se os índices populacionais do nematoide para níveis de inóculo, dentro de cada população de *A. besseyi*, maiores valores foram observados com a população inicial de 600 espécimes/planta na população APH18 para amostras submetidas à lavagem ou processamento do material em liquidificador seguido de centrifugação e recuperação em solução de sacarose. Para a variável processamento, efeito significativo foi observado em APH01 e APH 18, cujos maiores valores foram obtidos com o menor nível de inóculo. Já para a variável população final (total), exceto para APH11, maiores índices populacionais foram também observados como o inóculo inicial de 600 espécimes/planta para as demais.

Tabela 8. Número de nematoides extraídos pela lavagem e processamento da parte aérea, e, população final (PF=lavagem + processamento) em plantas de soja cv (BRS 284) submetidas a dois níveis de inoculo inicial, em casa de vegetação.

Populações	N. amostra lavada**			N. amostra proces.**			PF**		
	Nível de inoculo		CV)	Nível de inoculo		CV)	Nível de inoculo		CV)
	600	1200	(%)	600	1200	(%)	600	1200	(%)
APH01	244,0 bcA*	172,0 bA	39,4	740,0 aA	371,2 abB	23,1	984,0 abA	543,2 abB	22,3
APH11	352,80 bA	374,40 aA	26,5	430,4 aA	405,2 aA	35,3	783,2 bA	779,6 aA	23,5
APH18	646,40 aA	268,80 abB	15,4	607,2 aA	268,8 abB	27,5	1253,6 aA	537,6 abB	20,1
SII	163,2 cA	167,2 bA	33,4	562,4 aA	124,0 bA	35,9	725,6 bA	291,2 bB	37,2
CV (%)	27,11	34,28		30,26	36,03		21,15	35,47	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$) comparando populações. Letras maiúsculas na linha comparam os níveis de inoculo pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$); ** valores originais, transformados em raiz $x + 1$.

A análise dos valores de FR de *A. besseyi* seguiu a mesma tendência daqueles resultados observados para população final do nematoide considerando-se ambos os níveis de inoculo (Tabela 9). Em relação ao fator de reprodução obtido pela razão entre número de nematoides obtidos pela lavagem da parte área e sobre população inicial (FR1), a população APH18 apresentou maiores taxas de multiplicação ($FR > 1,00$) em comparação aos demais tratamentos ($0,13 > FR < 0,58$) em ambos níveis de inoculo, muito embora não tenha diferido de APH01 quando testou-se 1200 espécimes inoculados por planta. Com relação ao FR obtido pela razão entre o número de nematoides por planta processada sobre população inicial (FR2), para o menor nível de inoculo, não houve diferenças significativas entre as populações ($0,71 > FR < 1,18$); porém, para o nível (1200 espécimes/planta), a população APH01 apresentou maior FR (0,77) em relação às demais ($0,16 > FR < 0,34$), as quais forma estatisticamente semelhantes.

Considerando-se o fator de reprodução total, dado pela soma dos nematoides extraídos pela lavagem e processamento (FRT), com um nível de inoculo de 600 espécimes/planta, todas as populações apresentaram valores acima de 1,00 ($1,21 > FRT < 2,09$) destacando-se a população APH18, seguida de 'APH01'. No entanto, para o maior nível de nematoides inoculados, embora as populações de *A. besseyi* provenientes do arroz não tenham diferido entre si quanto FRT (0,44-0,65), apenas a população APH11 apresentou valor significativamente superior a população da soja (FRT=0,22), conforme pode ser observado na tabela 9.

Tabela 9. Fator de Reprodução de quatro populações de *A. besseyi* levando-se em consideração a população final obtida da lavagem da parte aérea (FR1), do seu processamento (FR2) e a população final (lavagem + processamento) em plantas de soja submetidas a dois níveis de inóculo (600 ou 1200 espécimes/planta), em casa de vegetação.

Populações	FR1			FR2			FRT		
	Nível de inóculo		CV)	Nível de inóculo		CV)	Nível de inóculo		CV)
	600	1200	(%)	600	1200	(%)	600	1200	(%)
APH01 ^x	0,40 bA*	0,14 bA	39,1	1,18 aA	0,77 aA	37,2	1,63 abA	0,64 abB	28,7
APH11 ^x	0,58 bA	0,33 aB	25,2	0,71 aA	0,34 bA	36,4	1,22 bA	0,65 aB	30,9
APH18 ^x	1,07 aA	0,22 abB	15,2	1,01 aA	0,23 bB	36,0	2,09 aA	0,44 abB	35,6
SII ^y	0,26 bA	0,13 bA	58,7	1,04 aA	0,16 bB	28,3	1,21 bA	0,22 bB	22,1
CV (%)	21,32	37,12		27,20	41,32		23,08	31,45	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$) comparando populações. Letras maiúsculas na linha comparam os níveis de inóculo pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$); x- populações provenientes de arroz; y- população proveniente de soja.

De uma forma geral, pela análise das variáveis relacionadas aos valores de FR de *A. besseyi* obtidos nos dois níveis de inóculo, dentro do fator população, maior taxa de multiplicação do nematoide foi observado no menor nível de inóculo; porém, dependendo da população testada, os resultados variaram conforme tabela 4. Nesse sentido, a população do arroz APH18 e proveniente de Tocantins, apresentou os maiores valores de FR em relação aos demais tratamentos para o menor nível de inóculo de (600 nematoides por planta) independentemente do processo de recuperação que resultou em FR1, FR2 ou FRT. Para as demais populações do arroz, níveis de multiplicação mais elevados, também obtidos para o menor nível de inóculo, foram observados para APH01 e APF11 para as variáveis FR1 e FRT, respectivamente. Já para a população oriunda da soja SII, os resultados apresentaram a mesma tendência para as variáveis FR2 e FRT.

Convém ressaltar, que taxas de multiplicação maiores que um (1,01-2,09) foram observados em todas as populações testadas apenas quando a população final foi obtida pela soma dos dois processos de extração do nematoide para três das quatro populações, no menor nível de inóculo. Nesse sentido, a avaliação do FR de *A. besseyi* somente pela lavagem ou processamento da parte aérea da soja pode levar a subestimação dos resultados conforme observado nesse estudo, respectivamente (Tabela 9), muito embora maior recuperação do nematoide tenha sido observada pelo processamento das amostras (FR2) para a maioria das populações avaliadas.

Na avaliação da interferência do nematoide no desenvolvimento das plantas, verificou-se que, independentemente do nível de inoculo, todas as populações de *A. besseyi* afetaram negativamente o desenvolvimento da cultivar de soja testada em comparação a testemunha (Tabela 10), reduzindo, em média 43,82% da massa fresca da parte aérea composta de folhas e hastes o que comprovou a patogenicidade desse fitopatógenos independentemente da origem das populações.

Tabela 10. Massa fresca da parte aérea de plantas de soja cv (BRS 284) em plantas de soja submetidas ou não à inoculação com quatro diferentes populações de *A. besseyi* independentemente do nível de inóculo (600 ou 1200 espécimes/planta), em casa de vegetação.

Tratamentos	Massa fresca da parte área (g/planta)
Testemunha ¹	19,94 A*
APH01 ²	12,02 B
APH11 ²	11,15 B
APH18 ²	9,88 B
SII ³	11,76 B
CV (%)	24,97

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$); 1-plantas não inoculadas; 2- plantas inoculadas com população de *A. besseyi* proveniente de arroz; e 2- de soja.

Em relação à multiplicação desse nematoide em soja, muito provavelmente os valores de população final total se devam principalmente à recuperação de espécimes extraídos da parte aérea processada, comparativamente a lavada. De acordo com França et al. (2019) e Favoreto et al. (2018), em soja, *A. besseyi* é capaz de infectar a planta, movendo-se internamente por seus tecidos desde a raiz, e, parasitar a parte aérea; situação diferente do que ocorre com *Aphelenchoides* spp. em outros patossistemas os quais se comportam como ectoparasita; nesse sentido, a extração de nematoides pela simples lavagem dos tecidos das plantas de soja não recuperaria aqueles espécimes que estão no interior do hospedeiro conforme verificado nesse estudo.

O Fator de Reprodução em nematoides é uma importante ferramenta para determinar a suscetibilidade de uma planta ao fitonematoide em estudo (M. Oostenbrink 1960). O Fator de Reprodução se baseia na reprodução do nematoide cujo valor é dado pela relação entre a população final obtida da multiplicação do nematoide (Pf) e a população inicial (Pi) que foi inoculada na planta. São tidos como resistentes os genótipos para os quais se determinam valores de FR inferiores a 1,0

e suscetíveis aqueles com $FR \geq 1,0$ (FERRAZ; BROWN, 2016). Nesse sentido, a cultivar de soja BRS284 comportou-se como suscetível a *A. besseyi* no menor nível de inóculo a todas as populações testadas com maiores valores de FR (1,01-2,09). Entretanto, mesmo tomando-se por base, os valores de FR no maior nível de inóculo ($0,22 > FR < 0,65$), os sintomas na parte aérea da soja também foram observados nas plantas inoculadas.

Meyer *et al.* (2017a), afirmam que a soja é um bom hospedeiro para *A. besseyi* se multiplicar. Nesse sentido, Silva *et al.* (2018) e Calandrella *et al.*, (2018) avaliando a hospedabilidade de plantas de soja cvs. Potência BMX e BMX Ativa a populações de *A. besseyi* oriunda de arroz, soja e algodão, verificaram menor reprodução da população do arroz em relação as demais; ao contrário daqueles resultados verificados no presente trabalho cuja maioria das populações provenientes de arroz testadas se multiplicaram mais em soja do que aquela originária da própria cultura.

Ainda que todos isolados de *A. besseyi* tenham demonstrado sua patogenicidade em soja conferida pelos sintomas da síndrome, verificou-se diferenças quanto a agressividade relacionada à sua reprodução; onde duas das três populações do patógeno se reproduziram mais do que aquela proveniente de soja. Em outro estudo, Sturhan D (1971), verificou que espécies do gênero *Aphelenchoides* apresentaram diferenças na virulência e agressividade em hospedeiros e localidades distintas e que esta variação indica grande heterogeneidade intraespecífica o que pode levar a variação na gama de hospedeiros para espécies deste gênero. Ainda com relação a especificidade do hospedeiro, Noegel e Perry (1962) verificaram que *A. besseyi* isolado do *crisântemo* não infectou morango; e, Rigges (1991) relatou que *A. besseyi* isolado de morango não infectou arroz e vice-versa. Esses resultados demonstram que *A. besseyi* apresentou preferências por hospedeiros. Por outro lado, Yu Pc *et al.*, (2004) verificou que um isolado de morango foi capaz de parasitar plantas de arroz cujo parasitismo foi restrito a essa cultura. Dessa maneira, Isolados de *A. besseyi* provenientes de arroz podem apresentar comportamento diverso em outros hospedeiros como a soja. Conforme já discutido, tais respostas podem ser então atribuídas tanto a diferenças quanto a patogenicidade das populações do nematoide como na variabilidade de cultivares da mesma espécie também verificado em outros patossistemas (Roese *et al.* 2007; Goulart, 2008).

A implantação da cultura da soja rotacionada com arroz, em áreas e regiões que existem históricos de perdas por haste verde e retenção foliar, pode vir a ser um possível problema, considerando que as populações de *A. besseyi* oriundas do arroz afetam negativamente o desenvolvimento das plantas de soja, como visto no trabalho em questão. No capítulo 1, os lotes de arroz oriundos de regiões como Goiás e Tocantis, apresentam presença do nematoide, o que demonstra que tal patógeno está presente no campo e pode infectar e se alimentar de plantas de soja.

Na região sul, que concentra os Estados de PR, SC e RS (maiores produtores nacionais de arroz CONAB 2020), a rotação das cultas arroz e soja é utilizado com frequência pelos produtores, porém, mesmo a soja sendo implantada em campos em que há a presença do nematoide da ponta branca do arroz, não há relatos da síndrome da Soja Louca II. Acredita-se que a variação do clima e umidade da região possam influenciar a ausência de relatos da doença além do método de plantio convencional adotado para a cultura do arroz, que desfavorece a multiplicação do nematoide. Segundo Meyer e Favoretto (2019), o preparo da área para semeadura da soja pode influenciar na disseminação de doenças. Dependendo do sistema utilizado, poder-se-á propiciar condições de ambiente favoráveis ou desfavoráveis à ocorrência de doenças.

De acordo com SILVA (2018), algumas plantas daninhas como trapoeraba (*Commelina benghalensis*), agriãozinho-do-pasto (*Synedrellopsis grisebachii*), cordão-de-frade (*Leonotis nepetifolia*) e caruru (*Amaranthus viridis*) são hospedeiros do nematoide, tem sido fonte de inóculo para *A. besseyi*, mantendo o nematoide ativo nos períodos de entressafra. Nesse sentido, essas plantas podem manter e o nematoide, elucidando assim, a importância do manejo dessas espécies para evitar a multiplicação do patógeno quando a cultura principal não está no campo, e assim, prevenindo o aparecimento da doença em safras posteriores.

Além disso, na ausência de plantas hospedeiras, cultivadas ou invasoras, o nematoide da ponta branca do arroz pode sobreviver no solo alimentando-se de fungos saprófitos ou fitopatogênicos (Pederson & Quesenberry, 1998), ou em condições ambientais desfavoráveis, como baixa umidade e temperatura elevada esses nematoides conseguem cessar suas atividades entrando em anidrobiose, onde podem permanecer inativos por alguns anos (FERRAZ, et al.; 2016). As formas de sobrevivência do nematoide, seja por plantas alternativas ou dormência, dificultam as medidas de controle e implicam na sua permanência no campo por

longo período de tempo. O manejo adequado do solo, rotação com culturas não hospedeiras e dessecação de plantas alternativas, multiplicadoras do nematoide, podem ser medidas alternativas de redução do inoculo no campo.

4. Conclusões

A forma de processamento de amostras de soja infectadas com *A. besseyi* utilizada para extração dos nematoides afeta a recuperação dos espécimes.

O nível de inóculo afeta a taxa de reprodução de *A. besseyi* em soja muito embora a manifestação dos sintomas da síndrome de haste verde e retenção foliar (Soja Louca II) ocorra independentemente da população inicial do nematoide.

Populações de *A. besseyi* provenientes de arroz são patogênicas à soja em condições de casa de vegetação.

Conclusões Gerais

Diferentes populações do nematoide da ponta branca oriundas de sementes de arroz e provenientes de regiões brasileiras distintas são da espécie *Aphelenchoides besseyi*.

Mesmo não causando doenças na cultura do arroz, *A. besseyi* está presente no campo, em diversas regiões produtoras do país.

Populações de *A. besseyi* oriundas do arroz se multiplicam em soja e causam sintomas de Soja Louca II.

Áreas de arroz contaminadas com *A. besseyi* se constituem como fonte de inóculo e podem ser um fator limitante de produtividade na cultura da soja em regiões de condições climáticas favoráveis à síndrome da haste verde (soja louca II).

Referências

- ALLEN, M.W. **Taxonomic status of the bud and leaf nematodes related to *Aphelenchoides fragariae* (Ritzema Bos, 1891)**. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 19: 108-120, 1952.
- AMIN W., 2002. *Aphelenchoides besseyi* (Christie, 1942) sobre Rice: **Um novo recorde no Egito**. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5: 297-298.
- BAICHEVA O, Budurova L, Kirilova G (1998) **On the intraespecies variability and morphometric of *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857)** Filipjev, 1936. *Exp Pathol Parasitol* 1: 3-7.
- BARBOSA, W. F.; SOUSA, E. P. (2014). **Eficiência técnica e de escala da agropecuária no estado do Ceará**. *Cadernos de Ciências Sociais Aplicadas*, n. 17, p. 153-185.
- BONETTI JI; FERRAZ S. 1981. **Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro**. *Fitopatologia Brasileira* 6: 553.
- BRIDGE, J., PLOWRIGHT, R.A., PENG, D. **Nematodes parasites of rice**. In: LUC, M., SIKORA, R.A. & BRIDGE, J. (eds.). *Plant parasitic nematodes in tropical and subtropical agriculture*. Second edition. Wallingford, CAB International. p. 87-130, 2005.
- BROWN DJF, Dalmasso A, Trudgill DL, 1993. **Fruit nematode pests and soft vines. Plant parasitic nematodes in temperate agriculture.**, 427-462; 138 ref
- CABI; EPPO Data **Sheets on Quarantine Pests *Aphelenchoides besseyi***. n. 122, 4p. Disponível em: http://www.eppo.int/QUARANTINE/nematodes/Aphelenchoides_besseyi/APLOB_E_ds.pdf Acesso em: 06 de abril, 2015.
- CARES, J. E.; SANTOS, J. R. P.; TENENTE, R. C. V. **Taxonomia de nematoides de sementes, bulbos e caules – parte II**. Revisão Anual de Patologia de Plantas, v. 16, p. 39-84. 2008. Disponível em: <http://docentes.esalq.usp.br/sbn/rapp/rapp21.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2018.
- CHENG X, XIANG Y, Xie H, Xu C-L, Xie T-F, Zhang C, et al. (2013) **Molecular Characterization and Functions of Fatty Acid and Retinoid Binding Protein Gene (*Ab-far-1*) in *Aphelenchoides besseyi***. *PLoS ONE* 8(6): e66011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066011>
- CHITWOOD DJ (2003) **Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service**. *Pest Manage Sci* 59: 748–753.

CHRISTIE, J.R. **A description of *Aphelenchoides besseyi*, n. sp., the summer-dwarf nematode of strawberries, with comments on the identity of *Aphelenchoides subtenuis* (Cobb, 1926) and *Aphelenchoides hodsoni* Goodey, 1935.** Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 9(2): 82 -84, 1942.

CHRISTIE, J. 1982. **Nematodos de los vegetales: su ecología y control.** México. Editorial Limusa. 276 p.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**, v. 6, safra 2018/19, n. 7, sétimo levantamento, abr. 2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/component/k2/item/download/25774_f7f98ca710bc573075b0b3e7f6adf973>. Acesso em: 23 abr. 2019. BRASIL.

CHRISTIE, JR, 1942. **A description of *Aphelenchoides besseyi* n.sp. the dwarf summer nematode of strawberries, beginning with the identification of subtenuic *Aphelenchoides* (Cobb, 1962) and *Aphelenchoides hodsoni* (Goodey, 1935).** Proc. Helminthol. Soc. 9: 82-84.

CRALLEY EM, 1952. **Control of white end of rice.** Arkansas Farm Survey, 1: 6
CRALLEY EM, ADAIR CR, 1949. **Rice Diseases in Arkansas** em 1948. Plant Disease Reporter, 33: 257-259
EPPO, 2014. **Banco de dados PQR. Paris, França: Organização Europeia e Mediterrânea de Proteção de Plantas** (disponível online). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/6378#3B80AC01-F4A6-4366-8873-AFE73A4EFD8B>; EPPO . Bulletin, Organization Europeenne and Mediterranee for the Protection des Plantes, 11 (1): não paginado

DA-SILVA, GS, 1992. **Ponta branca e produção nacional de arroz.** Informar. Agropecuario Belo-Horizonte, 16: 57-59.

EELES RA, Warren W, Stamps A. **The PCR revolution.** Eur J Cancer. 1992;28(1):289-93.

FARIAS, F. **Atraso da semeadura no Pará pode reduzir produção em 10%.** Soja Brasil, 11 fev. 2015. Disponível em: . Acesso em: 13 ago. 2020.FAVORETO, L.; FALEIRO, V.O.; FREITAS, M.A.; BRAUWERS, L.R.; GALBIERI, R.; HOMIAK, J.A.; LOPES-CAITAR, V.R.; MARCELINO-

FAVORETO L, SANTOS JM, CALZAVARA SA, LARA LA (2011) **Estudo fitossanitário, multiplicação e taxonomia de nematoides encontrados em sementes de gramíneas forrageiras no Brasil.** Nematol Bras 35: 20–35

FAVORETO L, MEYER MC, KLEPKER K, CAMPOS LJM (2015) **Ocorrência de *Aphelenchoides* sp. em plantas de soja com sintomas de Soja Louca II.** In: 32 ° Congresso Brasileiro de Nematologia. Londrina, PR. Anais ... Campos dos Goytacazes: SBN. 81-82

FERRAZ, L.C.C.B.; BROWN, D.J.F. **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. L.C.C.B. Ferraz e D.J.F.Brown (Orgs.). Manaus: NORMA EDITORA, 2016. 251 p. Il.

FLEGG, J. J.; HOOPER, D. J. Extraction of free-living stages from soil. In: SOUTHEY, J. F. (Ed.). **Laboratory methods for working with plant and soil nematodes**. London: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1970. 148 p. (Technical Bulletin, 2)

FONSECA, J. R.; Brondani, C.; Brondani, R. P. V.; Rangel, P. H. N. **Recursos genéticos**. In: Santos, A. B. dos; Stone, L. F.; Vieira, N. R. de A. (Ed.). **A cultura do arroz no Brasil**. 2. ed., rev. e ampl. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. p. 257-288.

FORTNER, R. **On the morphology of *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 and *A. siddiqii* n. sp. (Nematoda, Aphelenchoidea)**. Journal of Helminthology, VLIX(2): 141-152, 1970.

FORTNER, R. & WILLIAMS, K.J.J. **Review of the literature on *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942, the nematode causing "whity tip" Disease in Rice**. Plant Nematology., 44:1-40, 1975.

FRANKLIN MT, SIDDIQI MR, 1972. ***Aphelenchoides besseyi***. **Descrições do CIH de nemátodes parasitas de plantas**, conjunto 1, nº 4 Gasques, J. G. *et al* (2004).. Desempenho e crescimento do agronegócio no Brasil. IPEA, Brasília, fev.

FUKANO, H. (1962). Ecological studies on white-tip disease of rice plant caused by ***Aphelenchoides besseyi* Christie** and its control. ***Bulletin of the Fukuoka Agricultural Experimental Station*** No. 18, 108 pp. (in Japanese with English summary).

GILIOLI JL, PRINCE PC, GILIOLI BL, GILIOLI AL (2007) **Quais são as causas da soja louca?** In: 29ª Reunião de Pesquisa da Soja da Região Central do Brasil. Campo Grande, MS. Currículos ... Londrina: Embrapa Soja. p 61. Embrapa Soja. Documentos 287

GOELDI, E. A. Relatório **sobre a moléstia do cefeiro na província do Rio de Janeiro**. Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro v. 8, p. 15-1 21, 1892',

GOULART, A.M.C. Aspectos gerais sobre nematóides-das-lesões-radiculares (gênero *Pratylenchus*). Planaltina, DF, Boletim de Pesquisa 219, Embrapa Cerrados, 30 p. 2008.

GOMES, Algenor da Silva [et al]. - **Rotação de culturas em área de várzea e plantio direto de arroz** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2002. 65 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 89)

GUIMARÃES, F.C.; MEYER, M.C. **First report of *Aphelenchoides besseyi* infecting aerial part of cotton plants in Brazil.** Plant Disease 2018. Available at: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PDIS-02-18-0334-PDN>

HEYNS, J. **Problems of species delimitation in the genus *Xiphinema*, with special reference to monosexual species.** Concepts in nematode systematics (ed. AR Stone, HM Platt & LF Khalil), p. 163-174, 1983.

HUANG, C. S. and Huang, S. P. (1972). **Bionomics of white-tip nematode, *Aphelenchoides besseyi*, in rice florets and developing grains.** *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 13: 1-10.

HUNT, D. J. ***Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: their systematics and bionomics.*** Wallingford, UK, CABI Publishing, 1993.

JAMALI, S., Pourjam, E., Alizadeh, A., AND Alinia, F. **Incidence and distribution of *Aphelenchoides besseyi* in rice areas in Iran.** *Journal of Agricultural Technology*, Bangkok, Thailand, v.2, n.2, p. 337-344, 2006.

JESUS, D. S.; Cares, J. E. **Gênero *Aphelenchoides*.** In: OLIVEIRA, C.M.G.; SANTOS, M.A.; SILVA E CASTRO, L.H. **Diagnose de Fitonematoides.** pp. 99-118, Campinas, 2016.

JESUS, A. M.; Wilcken, S.R.S.; Kano, C.; Grassifilho, H. **Patogenicidade de *Meloidogyne incognita* Raça 2 a Bananeira “Prata Anã” em Diferentes Substratos.** *Nematologia Brasileira*, v.33, n.1, p.69, 2009.

JESUS, Dalila Sêni de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2015. **Taxonomia integrativa de espécies de *Aphelenchoides* associadas a sementes de gramíneas forrageiras e desenvolvimento de diagnóstico baseado em PCR em tempo real.** Orientadora: Rosângela D’Arc de Lima Oliveira. Coorientadores: Claudio Marcelo Gonçalves de Oliveira e Claudine Márcia de Carvalho.

JESUS, D.S.; OLIVEIRA, C.M.G., ROBERTS, D.; BLOK, V.; NEILSON, R.; PRIOR, T.; BALBINO, H.M.; MACKENZIE, K.M. OLIVEIRA, R.D.L. 2016. **A rapid diagnostic of *Aphelenchoides besseyi* and *A. fujianensis* (Nematoda: Aphelenchoididae) based on Real-Time PCR.** *Plant Disease*, v.p.102:519-526, 2018.

KHAN, M.R.; HANDOO, Z.A.; RAO, U.; RAO, S.B.; AND PRASAD, J.S. 2012. **Observations on the foliar nematode, *Aphelenchoides besseyi*, infecting tuberoses and rice in India.** *Journal of Nematology* 44:391-398.

LIN MS, DING XF, WANG ZM, HOU FM, LIN N (2004) **Description of *Aphelenchoides besseyi* from abnormal rice with ‘small grains and erect panicles’ symptom in China.** *Rice Science* 12: 289–294.

MACHADO, A.C.Z. **Current nematode threats to Brazilian agriculture.** *Current Agricultural Science and Technology*, Santa Maria, v. 20, p. 26-35, 2014.

LOPES, Fabiane Barbosa **Ocorrência do nematoide *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 em áreas produtoras de arroz irrigado do Rio Grande do Sul** – UFRGS,2015.

LODISH H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. **DNA recombinante e genômico**. In: Biologia celular e molecular. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2002.

LLEN, MW, 1952. Status **taxonômico dos nematóides de gemas e folhas relacionados a *Aphelenchoides fragariae*** (Ritzema Bos, 1891). Helminthol. Soc., 19: 108-120.

MACHADO, A. Z.- **PRINCIPAIS PROBLEMAS NEMATOLÓGICOS EM ARROZ DE SEQUEIRO**. Anais-Palestras-e-Resumos-do-35-Congresso-Brasileiro-de-Nematologia (2018). pag 44.

MACHADO, A.C.Z. **Current nematode threats to Brazilian agriculture**. *Current Agricultural Science and Technology*, Santa Maria, v. 20, p. 26-35, 2014.

MESQUITA RA, Anzai EK, Oliveira RN, Nunes FD. **Evaluation of three methods of DNA extraction from paraffin-embedded material for the amplification of genomic DNA by means of the PCR technique**. *Pesqui Odontol Bras*. 2001;15(4):314-9.

MORALES, F; Araya, C; Hernández, J; Arroyave, J; Cuervo, M; Velasco, A; castaño, M. 1999b. **Etiología del “amachamiento” del frijol común en Costa Rica**. *Manejo Integrado de Plagas* 52:42-48

MEYER, M.C., Favoreto, L., Klepker, D. et al. **Trop. plant pathol.** (2017) 42: 403. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0167-z>

MEYER, M C;Favoreto, L.; Klepker, D.; Marcelino-Guimarães, F. C. **Soybean green stem and foliar retention syndrome caused by *Aphelenchoides óesseyi***. *Tropical Pfant Pathology*, v. 42, n. 5, p. 403-409, 2017a.

MEYER, M. C.; Figueiredo, A.; Favoreto, L. **Levantamento da ocorrência do nematoide da haste verde da soja no Brasil**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 50. 2017, Uberlândia. Anais eletrônicos... Brasília: SBF, 2017.

MEYER MC, Gilioli JL, Prince PC (2008) **Efeito de doses de herbicidas e sistemas semeadura na incidência de retenção foliar e de pressa verde, em cultivares de soja, no Maranhão e no Tocantins**. In: 30ª Reunião de Pesquisa da Soja da Região Central do Brasil. Rio Verde, GO. Londrina: Embrapa Soja. págs. 133–136. Embrapa Soja. Documentos, 304

MEYER MC, Henning AA, Almeida AMR, Godoy CV, Seixas CDS, Yorinori JT, Ferreira LP, Soares RM, Dias WP (2009) **Manejo integrado de doenças da soja em regiões climáticas**. Em: 1 ° Simpósio Sobre Manejo de Pragas. Belém, PA. Anais ... Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 1 CD-ROM

MEYER MC, Almeida AMR, Gazziero DLP, Lima D (2010) **Soja louca II: um problema de causa desconhecida**. Embrapa Soja, Londrina Embrapa Soja. Pasta, 7

NOEGEL, K. A.; PERRY, V.G. 1963. “**A foliar disease of chrysanthemum incited by the strawberry summer crimp nematode.**” Proc. Soil Crop Sci. Soc. Fla, 22nd Annual Meeting (1962), pp. 162-166.

NUNES, C. D. M. Doenças **da cultura do arroz irrigado**. Embrapa Clima Temperado, 2013, 83p. (Embrapa Clima Temperado, Documentos, n. 360). OU SH, 1985. Doenças do arroz. Wallingford, Reino Unido; CAB International, 380 pp

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, 36(2): 65-73, 2011.

OLIVEIRA, J. V. **Efeitos do nematóide *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942, em quatro cultivares de arroz irrigado**. 1987. 49f. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) –Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

OOSTENBRINK, M. (1960): Chapter 17. **The family Criconematidae**. In: Sasser, J. N. & Jenkins, W. R. (Eds.): Nematology. Fundamentals and Recent Advances with Emphasis on Plant Parasitic and Soil Forms. Chapel Hill, The University of North Carolina Press, pp. 196 – 205.

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

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Mededelingen, Van De Landbouwhogeschool, v. 66, p. 1-46, 1966.

PERINA F.J., MAXIMINIANO C., RHODE A. A., SANTOS I. A., FREIRE E. S.,

LOPES C. M. M.L, - **PRIMEIRA OCORRÊNCIA DE ATAQUE DE NEMATOIDE DE PARTE AÉREA, APHELENCHOIDES SP., EM ALGODOEIRO NO ESTADO DA BAHIA**- resumo CBA, área temática: Fitopatologia-nematologia, 2017.

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

POWERS, T. 2004. **Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes**. Annual Review of Phytopathology, 42: 367-383.

PHABHU, A.S.; Fillipi, M.C.C.; Ribeiro, A.S. **Doenças e seu controle**. In: Santos, A.B.; Stone, L.F.; Vieira, N.R.A. (Ed.). **A cultura do arroz no Brasil**. 2.ed. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA/CNPAP, 2006. p.561-590.

PHYTUS- SANTOS, Paulo S.; MADALOSSO, Marcelo Gripa. **Soja louca II é detectada em lavouras do Rio Grande do Sul**. Disponível em:

<<https://elevagro.com/materiais-didaticos/soja-louca-ii-e-detectada-em-lavouras-do-rio-grande-do-sul/>>.2016. Data de acesso: 24 de agosto de 2020.

PRASAD, J.S. et al. **Status of Rice Nematode Research in India**. 2011. In: <http://www.rkmp.co.in/content/yield-losses-by-lesion-nematode>. Acesso em: abril de 2016.

RIBEIRO PM, Querido RSM, Back-Brito GN, Mota AJ, Koga-Ito CY, Jorge AO. Research on *Candida dubliniensis* in a **Brazilian yeast collection obtained from cardiac transplant, tuberculosis**, and HIV-positive patients, and evaluation of phenotypic tests using agar screening methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011a;71(1):81–6.

RIGGES RD (1991) **Resistance-breaking races of plant parasitic nematodes**. In: Nickle WR, editor. pp. 827–854. Nova York: Marcel Dekker Inc.

ROESE, A.D.; OLIVEIRA, R.D.L.I; OLIVEIRA, D.S. Variabilidade fisiológica em populações de *Meloidogyne paranaenses*. *Fitopatol. Bras*, 32:040-043. 2007.

SAEED, M; ROESSNER, J. 1984. **Anhydrobiosis in five species of plant associated nematodes**. *Journal of Nematology* 16:119-124.

SAS INSTITUTE. Statistical analysis system: release 9.3. Cary: Statistical Analysis System Institute, 2011.

SANTOS, IZABEL OLIVEIRA Y TAVARES, MARCELO (2018): "**Eficiência técnica, alocativa e de custos na produção de arroz no Brasil**", *Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana*, (octubre 2018). En línea: <https://www.eumed.net/rev/oel/2018/10/producao-arroz-brasil.html> //hdl.handle.net/20.500.11763/oel1810producao-arroz-brasil

SANTOS, V.C.; SANTOS, P.R.A.; LIMA, I.O.; PEREIRA, V.R.F.; GONÇALVES, F.R.; CHIORDEROLI, C.A. **Desempenho de semeadora-adubadora em função da velocidade de deslocamento e do mecanismo sulcador de fertilizantes**. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.20, n.3, p.286-291, 2016.

SANTOS, P. S.; Madalosso, M.; Instituto Phytus- **CULTIVAR N 204** maio 2016 Percevejos: Batalha contínua "**Como lidar com a presença do nematoide *Aphelenchoides* sp no RS**"

SERCERO, B.C.; **Desenvolvimento de ferramenta molecular para diagnóstico de *Aphelenchoides besseyi***– Londrina, PR:2019.

SILVA, M.C.M. da, Calandrelli, a.; favoreto, I. ; **meyer, m.c.patogenicidade de populações de *aphelenchoides besseyi* christie 1942 a diferentes espécies de plantas-** 35º congresso brasileiro DE NEMATOLOGIA. Anais resumos e palestras p133

SILVEIRA SGP da, Curi SM, CD de Fernandes, Bona A de, 1977. **Ocorrência do nematoide *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942, em áreas produtoras de sementes de arroz, no estado de São Paulo.** Reunias de Nematologia, 2: 81-91

SIVAKUMAR CV, 1987. **Post-embryonic development of *Aphelenchoides besseyi* in vitro and its longevity in stored rice seeds.** Indian Journal of Nematology, 17 (1): 147-148; 1 ref

SILVEIRA, S.G.P. da & CURI, S.M. **Incidência do nematoide *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942, em sementes de arroz, no Estado de São Paulo em 1981.** s.L, Soc. Bras. Nematol., 1983. pS11-7. (Public., 7)

STURHAN D (1971) Biological race In: Zuckerman BM, Mai WF, Rohde RA, editors. **Nemátodos parasitas de plantas.** Vol. II Citogenética, interações hospedeiras parasitárias e fisiologia. Nova York: Academic Press. pp. 51–72.

SOSBAI- Arroz irrigado: **recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil / Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado;** V Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, XXVII Reunião da Cultura do Arroz Irrigado. – Pelotas: SOSBAI, 2007. 161 p., il.

TODD EH, ATKINS JG, 1958. **Doença de ponta branca de arroz.** I. Sintomas, cultura laboratorial de nemátodos e testes de patogenicidade. Fitopatologia, 48: 632-637

TOGASHI K, HOSHINO S, 2001. **Distribution pattern and mortality of the white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi* (Nematoda: Aphelenchoididae), between rice seeds.** Nematology, 3 (1): 17-24; 22 ref

TODD, E.tl. & ATKINS, 1.0. **White tip disease of se. I. Symptoms, Laboratory culture of nematodes, and pathogenicity tests.** Phytopathology, 48:632-37, 1958.

UEBAYASHI Y, AMANO T, NAKANISHI I, 1976. **Studies on the abnormal rice kernel "Kokutenmai". Mechanism of development of symptoms.** Japanese Journal of Nematology, 6: 67-72

YOSHII H, YAMAMOTO S, 1950a. **'Senchu Shingare Byo' rice nematode disease. I. Symptom and pathogenic nematode.** Faculty of Agriculture Journal, Kyushu University, 9: 209-222

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

WILLMONTT, Sheila et al., **c.i.h. descriptions of plant-parasitic nematodes. Inglaterra.** Commonwealth Institute of Helminthology. Wallingford: CAB international, nd; 1972. s.p.

APÊNDICE 1

Valores médios de parâmetros morfométricos de 27 populações de *Aphelenchoides besseyi* provenientes de sementes de arroz de diferentes regiões do Brasil.

Amostra	L	Comprimento da cauda	Estilete	Diâmetro região ânus	Diâmetro região mediana	Mucros
¹ BRS PAMPA	618,652 712,987 ^a -676,680 ^a	31,244 21,673 - 33,543	13,876 14,543-11,987	9,897 12,620-8,006	16,756 19,766-14,125	3 4-2
¹ BRS CATIANA	621,731 785,89-595,062	28,13 32,721-20,068	12,310 12,577-10,981	10,126 13,042-12,342	16,448 17,042-12,342	3 3-2
¹ BRS ATALANTA	637,764 801,705-508,056	28,019 32,874-24,963	11,254 11,661-9,153	10,960 13,171-9,836	15,336 20,829-11,381	3 4-3
¹ BRS 358	658,31 701,234-545,062	28,130 32,897-24,963	12,557 16,464-10,103	11,339 15,961-8,249	15,042 18,734-12,206	3 3-2
¹ BRS PAMPEIRA	681,776 803,780-589,381	30,876 45,714-18,521	11,347 12,592-10,619	12,034 13,719-10,011	17,316 18,841-15,613	3 3-2
² BRS ESMERALDA PD	616,684 723,683-542,574	29,132 39,801-19,304	9,985 12,379-7,330	10,566 15,196-8,107	15,543 20,986-13,118	3 4-2
² BRS A501CL	647,502 740,894-586,220	30,428 40,667-17,332	10,244 11,971-10,996	9,158 11,180-8,316	16,742 20,209-12,761	3 3-2
² AN CAMBARÁ	677,724 729,894-580,288	33,005 41,090-17,879	10,338 12,775-8,303	10,422 10,775-8,303	16,257 19,169-12,515	3 4-2
² BRS ESMERALDA PC	652,424 738,907-597,518	27,384 34,507-18,870	10,255 11,419-9,221	9,997 10,995-8,586	18,521 22,311-12,308	3 3-2
² BRS 502	686,50 723,921-547,661	36,001 38,718-19,201	11,90 13,812-10,866	11,071 11,995-9,712	15,617 18,821-12,308	3 4-2
² BRS A701CL	667,518 738,901-610,923	32,317 34,710-18,615	12,715 13,997-10,911	10,083 12,517-10,344	17,619 20,334-14,617	3 3-2
² BRS A702CL	654,315 714,211-600,891	31,017 35,432-19,887	11,879 13,313-11,283	12,886 14,617-10,500	15,689 17,320-16,619	3 4-2
² BRS PAMPEIRA*	654,369 691,317-508,331	29,615 33,403-17,661	10,861 13,713-10,840	12,338 11,982-8,998	17,831 20,891-13,717	3 3-2
² AB1310992	613,619 644,872-576,922	30,615 34,560-18,762	10,312 12,224-9,211	9,776 11,752-8,973	17,461 20,109-15,972	3 4-2
² IRGA 409	667,387 741,005-504,303	30,778 34,918-17,779	12,365 13,776-11,513	11,778 12,886-9,443	18,717 20,007-14,827	4 4-3
³ BRS CATIANA	623,902 672,726-543,826	31,512 33,817-20,172	12,521 14,141-11,817	12,321 13,001-10,614	18,512 20,109-15,612	3 4-3
³ BRS A702CL	687,002 729,518-532,817	30,445 40,668-20,613	11,861 12,774-10,003	11,348 13,041-9,373	16,778 17,887-13,817	3 4-3
² BRSPAMPEIRA	631,590 687,982-577,120	32,88 36,099-19,761	11,976 12,983-10,044	10,657 11,972-8,991	17,822 20,117-14,713	3 4-2
³ SCS122 MIURA	670,82 698,172-591,183	32,376 35,182-19,155	11,456 13,081-9,122	10,652 12,128-9,112	16,981 19,762-14,133	4 4-3
⁴ SCS SATORÚ 01	697,815 712,861-616,192	32,512 36,188-20,651	10,830 12,002-9,152	10,829 12,122-9,883	16,112 19,322-13,488	3 4-2
⁴ SCS SATORÚ 02	677,518 702,331-598,245	32,613 34,277-19,852	12,422 13,133-12,003	11,036 13,902-10,121	15,617 17,982-14,133	4 4-2

⁴ BRS TIOTAKA 400	631,919 630,982-533,235	31,519 37,733-20,109	11,013 12,332-10,837	10,109 12,342-9,024	18,322 23,235-16,376	3 4-2
⁴ BRS TIOTAKA 401	697,889 723,791-587,344	29,817 32,183-21,830	10,674 13,098-10,827	10,398 12,083-9,827	15,818 17,873-13,098	3 4-3
⁴ BRS TIOTAKA 402	657,311 698,872-602,863	33,674 37,982-20,817	9,981 10,763-9,873	10,215 12,992-9,807	16,031 19,082-14,280	3 4-2
⁴ BRS TIOTAKA 403	648,744 698,983-566,982	31,662 37,873-21,873	11,441 13,762-10,872	12,899 14,872-10,122	18,162 20,877-16,763	4 4-2
⁴ SCS122 CL 735	641,566 712,973-566,972	31,674 34,872-20,638	11,346 14,717-10,223	11,420 13,730-9,872	16,544 20,763-16,366	3 4-3
⁴ SCS122 CL 737	638,289 722,134-601,824	30,001 33,370-21,873	12,182 14,763-10,877	11,308 14,871-10,766	15,328 19,763-13,223	3 4-3
Média geral	654,103	31,020	11,447	10,904	16,774	

Amostra	Extremidade anterior até vulva	Vulva x ânus	Largura dos lábios	Largura metacorpo	Esôfago	Espícula
¹ BRS PAMPA	412,361 512,872-402,873	121,362 133,872-108,873	7,800 9,872-6,092	8,872 10,762-7,782	80,763 77,876-83,871	15,122 15,872-14,872
¹ BRS CATIANA	426,878 498,871-401,732	138,746 156,722-112,063	6,944 7,873-6,083	8,723 10,011-7,870	81,772 83,872-80,173	14,762 15,722-14,094
¹ BRS ATALANTA	456,189 498,872-402,713	141,083 163,233-130,643	8,145 9,263-7,702	9,879 11,722-7,910	82,007 83,166-80,623	Sem machos
¹ BRS 358	467,033 482,554-410,880	135,621 155,632-114,813	7,751 8,653-9,873	10,213 13,556-9,763	81,617 82,881-79,129	16,103 17,773-15,822
¹ BRS PAMPEIRA	421,003 455,980-404,121	142,344 177,131-114,005	6,321 7,872-6,003	7,962 9,881-6,779	78,230 80,612-69,454	13,827 14,863-12,783
² BRS ESMERALDA PD	471,553 510,762-454,87	130,989 166,873-121,980	6,269 7,981-6,022	8,378 9,761-6,011	81,774 83,911-78,182	15,001 17,983-13,911
² BRS A501CL	489,918 501,923-455,922	169,860 179,827-140,012	7,982 9,821-7,092	6,228 8,120-6,133	77,872 82,092-73,111	14,928 16,233-12,762
² AN CAMBARÁ	500,026 512,031-488,322	169,251 178,112-142,884	6,510 7,824-6,003	7,873 8,876-6,985	75,872 79,732-73,234	13,762 15,221-12,123
² BRS ESMERALDA PC	486,890 503,872-467,231	150,94 166,76-143,112	6,937 8,223-6,083	7,947 8,763-6,982	82,315 84,320-81,233	16,233 17,763-15,855
² BRS 502	467,033 494,284-423,126	133,621 155,653-112,476	7,751 8,653-6,973	10,213 11,736-7,074	81,617 85,152-77,264	16,503 17,873-16,872
² BRS A701CL	471,553 501,276-423,178	130,989 177,645-123,984	7,269 8,531-6,918	8,378 9,878-7,762	82,774 84,176-79,870	15,001 17,726-13,173
² BRS A702CL	425,617 466,874-400,873	133,451 159,870-120,873	8,989 9,876-6,009	8,961 9,342-6,874	82,667 83,187-76,781	13,881 15,187-12,762
² BRS PAMPEIRA*	478,549 489,873-412,833	156,718 176,182-132,872	7,503 8,813-6,002	10,310 12,653-9,762	82,131 85,662-76,903	14,389 16,763-13,002
² AB1310992	477,319 501,082-423,192	146,667 177,024-137,488	8,521 9,752-7,028	10,617 12,826-10,004	80,509 83,273-79,762	15,678 17,621-13,188
² IRGA 409	458,381 491,543-418,693	149,817 166,654-122,640	8,889 9,653-7,7635	11,315 13,445-10,654	79,987 81,221-77,276	15,667 17,726-14,122
³ BRS CATIANA*	451,377 467,762-445,640	129,633 166,543-105,523	6,996 7,434-6,083	10,833 13,155-9,765	81,328 84,355-78,633	14,761 16,653-12,455
³ BRS A702CL*	482,000 497,642-465,203	154,509 182,726-122,543	7,836 8,542-6,543	8,101 9,344-6,654	80,317 83,173-77,636	17,458 17,899-16,934

³ BRS** PAMPEIRA	486,890 512,644-450,746	150,984 167,544-148,630	6,937 7,083-6,056	7,845 8,643-7,190	76,315 79,736-74,198	17,233 17,886-16,764
³ SCS122 MIURA	443,166 480,763-422,73	132,453 171,642-119,762	7,331 8,652-6,092	8,732 10,563-6,975	83,334 88,626-80,653	16,374 18,003-15,736
⁴ SCS SATORÚ 01	423,361 454,752-418,908	138,653 166,098-121,543	6,566 7,122-6,878	7,642 9,324-7,065	75,312 77,345-74,089	16,541 17,569-14,035
⁴ SCS SATORÚ 02	421,983 488,463-412,344	155,874 178,543-133,733	6,982 8,011-6,082	8,653 9,916-7,610	77,521 82,097-78,733	15,912 17,090-15,100
⁴ BRS TIOTAKA 400	436,988 455,760-419,650	142,875 177,992-132,199	7,872 9,562-7,441	8,653 9,533-6,892	80,543 81,873-80,740	14,653 15,722-13,632
⁴ BRS TIOTAKA 401	421,342 466,876-421	161,633 179,612-154,65	7,083 8,992-6,477	7,736 8,564-7,133	81,432 83,444-78,611	14,980 16,735-13,533
⁴ BRS TIOTAKA 402	431,776 472,192-420,764	142,009 169,053-121,667	8,523 9,111-8,023	7,652 8,332-6,921	79,611 82,645-75,736	15,345 17,090-14,673
⁴ BRS TIOTAKA 403	468,900 501,543-422,653	154,673 188,876-132,440	7,433 8,653-6,766	8,983 9,653-7,987	80,987 82,441-78,356	14,987 15,400-13,509
⁴ SCS122 CL 735	432,763 469,002-410,983	166,635 173,611-145,133	7,974 8,643-7,112	9,003 9,348-8,711	83,533 85,132-80,542	15,543 16,477-13,980
⁴ SCS122 CL 737	436,763 454,012-412,983	149,625 161,543-144,621	8,006 9,322-6,872	7,861 8,972-7,128	81,635 83,154-79,100	15,110 16,522-14,342
Média Geral	453,621	147,963	7,521	8,798	82,513	15,407

APÊNDICE 2

Valores médios e variação de dados morfométricos (media e variação) de espécimes machos e fêmeas de populações de *Aphelenchoides besseyi* obtidos no presente estudo (Halfen, 2020) em comparação a outros trabalhos.

Parâmetros (μm)		Halfen (2020)		Christie (1942)		Fortuner (1970)		Amim (2002)		Kham (2012)		Jesus (2015)	
		Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
L	Méd.	677,28	571,68	-	-	0,66	0,57	0,66	0,58	0,658	58,62	0,68	0,53
	Var.	608-747	504-616	0,66-0,75	0,54-0,64	0,54-0,77	0,53-0,61	0,54-0,77	0,52-0,66	0,63-0,68	0,57-0,60	0,61-0,77	0,45-0,61
St	Méd.	11,7	11,14	-	-	11,9	11,4	10,6	9,9	12,07	11,51	11,4	11,1
	Var.	9,9-13,6	9,6-13,1	-	-	10,2-12,5	10-12,5	8,5-13	9-12	11,20-12,8	10-12	9-11	9,5-12
comp esóf.	Méd.	82,513	80,509	-	-	-	-	64,1	60,6	-	-	-	-
	Var.	84-78	82-71	64-68	63-66	-	-	60-68	55-67	-	-	-	-
a	Méd.	39,95	37,01	-	-	47,7	44,4	41,5	34,7	53,31	42,56	46,5	35,1
	Var.	35,6-44,1	30-42,8	32-42	36-39	39-53	40,7-66	36-51,2	33-41,6	42-63	40-45	33,8-59,5	32,5-42,5
b	Méd.	9,1	8,92	-	-	11,46	9,61	11,5	9,8	9,43	9,18	-	-
	Var.	8,1-10,5	8-10,1	10,21-11	8,6-8,8	9,6-13,1	8,87-10,7	9,7-12,7	8,98-10,6	8-11	8,8-10,5	-	-
c	Méd.	20,63	19,21	-	-	17,7	17,9	18	18,3	15,26	18,56	16,5	17
	Var.	18,7-23,5	16,5-20,9	17-21	15-17	13,8-20,4	16-20	15,4-20	15,5-22	13-17	17-20	14,6-19,2	12,6-20
V	Méd.	69,4	-	-	-	-	-	71,7	-	71,65	-	70,8	-
	Var.	65-68	-	68-70	-	68,7-73,6	-	69,2-74,6	-	69,7-73,8	-	68,4-73,7	-
Comp esp	Méd.	-	15,36	-	-	-	19,2	-	15,8	-	19,55	-	14,1
	Var.	-	13,7-17,4	-	15-18	-	18-21	-	15-18	-	18-20	-	12,4-17
(número)													
N. mucros	Méd.	3(3,16)	3(2,88)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Var.	2-4	2-4	-	-	-	2≤	-	-	-	-	-	-