

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Dissertação

Otimização de métodos de extração de *Ditylenchus dipsaci*, reação de genótipos de alho ao nematoide do amarelão e primeiro relato de ocorrência de *Meloidogyne ethiopica* em alho no Brasil

Giliard Sapper Correia

Pelotas, Março de 2021

Giliard Sapper Correia

Otimização de métodos de extração de *Ditylenchus dipsaci*, reação de genótipos de alho ao nematoide do amarelão e primeiro relato de ocorrência de *Meloidogyne ethiopica* em alho no Brasil

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

Orientador: Dr. Cesar Bauer Gomes
Coorientador: Dr. Jerônimo Vieira de Araújo Filho

Pelotas, Março de 2021

Resumo

Correia, Giliard Sapper. **Otimização de métodos de extração de *Ditylenchus dipsaci*; reação de genótipos de alho ao nematoide do amarelão e primeiro relato de ocorrência de *Meloidogyne ethiopica* em alho no Brasil.** 2021. 78f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

Dentre os problemas fitossanitários que afetam a cultura do alho (*Allium* spp.) no Brasil, o nematoide do amarelão, *Ditylenchus dipsaci*, é um dos mais importantes, sendo responsável por perdas econômicas em diversos estados, devido principalmente as dificuldades de manejo e às limitações encontradas, nas metodologias disponíveis na detecção e quantificação da referida praga em alho. Entre as medidas de controle, preconiza-se o uso de cultivares resistentes ou tolerantes, no entanto, informações sobre a reação do alho ao a *D. dipsaci* são escassas em condições de campo. Além disso, a eficiência dos métodos recomendados para extração e detecção de *D. dipsaci* quer em amostras de alho semente ou material verde, é bastante variável; e; outros nematoides até então não relatos em *Allium sativum* podem parasitar a cultura. Nesse contexto, foram objetivos do presente estudo: a) avaliar a eficiência de diferentes métodos de extração visando a detecção de *D. dipsaci* em amostras de alho e de solo; b) avaliar a resistência de cultivares de alho a *D. dipsaci* em condições de casa-de-vegetação e a campo; e; c) relatar a ocorrência de espécie de *Meloidogyne* em alho ocorrendo no Brasil pela primeira vez. Comparando-se diferente os métodos para extração do nematoide do amarelão do solo, Jenkins (1964) e Baermmann (1917) e suas variações, o primeiro, independentemente da densidade (440 ou 600g de sacarose/L água) foi mais eficiente na recuperação de espécimes de *D. dipsaci* do solo infestado. A origem do material vegetal (fresco ou seco) infectado utilizado para extração do nematoide afeta a percentagem de espécimes móveis e imóveis recuperados. Para material fresco, os nematoides se mantivera, ativos (móveis) até 120h após a extração independentemente do método; e, para material seco, apenas nas primeiras 24h cujo método mais eficiente foi o da placa de Petri (EPPO, 2013). Considerando-se os experimentos de casa de vegetação e campo quanto a resistência de genótipos de alho a *D. dipsaci*, 'AM-PC Farias', 'Quitéria', 'Hozan', Peruano, Chonan e Moz foram os mais resistentes; e, Araguari, AM-Erenice, Amarante, Araguari, Cateto Roxo e Gravatá, suscetíveis. Na avaliação da produtividade, em condições de campo, AM-PC Farias, AM-Erenice e Quitéria foram os mais produtivos e com menor redução do volume colhido quando cultivados em área infestada pelo nematoide comparativamente ao plantio na ausência de *D. dipsaci*. No entanto, levando-se em consideração todos os parâmetros associados a menor multiplicação e danos causados pelo nematoide e, menor impacto sobre a produtividade em área infestada AM-PC Farias, Quitéria e Hozan são os mais indicados para plantio nessas áreas. Caracterizando-se a espécie de uma população do nematoide das galhas detectada em alho no município de Cristalina-GO, identificou-se *Meloidogyne ethiopica*, cuja ocorrência na cultura é a primeira no Brasil e no mundo.

Palavras-chave: Resistência; *Allium* spp.; fitonematoides; métodos de extração e detecção.

Abstract

Among the phytosanitary problems that affect the culture of garlic (*Allium* spp.) In Brazil, the stem and bulb nematode, *Ditylenchus dipsaci*, is one of the most important, being responsible for economic losses in many states, mainly due to the management difficulties and limitations found, in the methodologies available in the detection and quantification of the referred pest in garlic. Among the control measures, the use of resistant or tolerant cultivars is recommended, however, information about the reaction of garlic to *D. dipsaci* is scarce under field conditions. In addition, the efficiency of the recommended methods for extraction and detection of *D. dipsaci*, either in samples of seed garlic or green material, is highly variable; and; other nematodes until then not reported in *Allium sativum* can parasitize the culture. In this context, the objectives of the present study were: a) to evaluate the efficiency of different extraction methods aiming at the detection of *D. dipsaci* in garlic and soil samples; b) to evaluate the resistance of garlic cultivars to *D. dipsaci* in greenhouse and field conditions; and; c) to report the occurrence of *Meloidogyne* species in garlic occurring in Brazil for the first time. Comparing different methods for extracting the nematode from yellowing soil, Jenkins (1964) and Baermmann (1917) and their variations, the first, regardless of density (400 or 600g of sucrose / L water) was more efficient in recovering specimens of *D. dipsaci* from the infested soil. The origin of the infected plant material (fresh or dry) used to extract the nematode affects the percentage of mobile and immobile specimens recovered. For fresh material, the nematodes had remained active (mobile) until 120 hours after extraction, regardless of the method; and, for dry material, only in the first 24 hours, the most efficient method was the Petri dish (EPPO, 2013) Considering the greenhouse and field experiments regarding the resistance of garlic genotypes to *D. dipsaci*, 'AM-PC Farias', 'Quitéria', 'Hozan', 'Peruano', 'Chonan' and 'Moz 114' were the most resistant; and, 'Araguari', 'AM-Erenice', 'Amarante', 'Cateto Roxo' and 'Gravatá', susceptible. In the evaluation of productivity, under field conditions, 'AM-PC Farias', 'AM-Erenice' and 'Quitéria' were the most productive and with the least reduction in the harvested volume when cultivated in an area infested by the nematode compared to planting in the absence of *D. dipsaci*. However, taking into account all parameters associated with less multiplication and damage caused by the nematode and less impact on productivity in an infested area 'AM-PC Farias', 'Quitéria' and 'Hozan' are the most suitable for planting in these areas. Characterizing the species of a root-knot nematode population detected in garlic in the county of Cristalina-GO, *Meloidogyne ethiopica* was identified, whose occurrence in culture is the first in Brazil and in the world.

Keywords: Resistance; *Allium* spp.; nematodes; extraction and detection methods.

Lista de Figuras

- Figura 1: A e B- método de extração por placa de Petri após 24 horas de incubação e, C- espécimes em microscopia de luz com aumento de 40x.....25
- Figura 2: Percentagem de espécimes ativos de *D. dipsaci* recuperados de material fresco (gráfico acima) e seco (gráfico abaixo) de alho infectado por diferentes métodos, 24, 48, 72, 96 e 120h após a instalação de cada método (FB, BM e PP)28
- Figura 3: Porcentagem de plantas com sintomas do “amarelão do alho” e mortas, avaliadas aos 101, 112 e 123 dias após o plantio. *(Moz 114 não avaliado aos 123 dias).....48
- Figura 4: Porcentagem de plantas com sintomas do “amarelão do alho” e mortas, avaliadas aos 101, 112 e 123, 133, 140, 149 e 158 dias após o plantio, até a colheita. AM–Erenice não foi avaliado aos 158 dias e Quitéria não foi avaliado aos 149 e 158 dias.....49
- Figura 5: Genótipos em condições de campo naturalmente infestado por *D. dipsaci*, A- genótipo Gravatá aos 101 dias após o plantio; B- genótipo AM-PC Farias aos 112 dias após o plantio.....50
- Figura 6: Matriz de correlação para análise dos componentes principais coletados no experimento a campo. Número de nematoides na parte aérea=Paerea; no bulbo=PlanBulbo; total na planta=Totalplanta; número de nematoides por grama de tecido na parte aérea=GramaPaerea; no bulbo=GramaBulbo; na planta=Somatecido; número de nematoides na casca por planta=CascaPlanta; por grama de tecido de casca=CascaTecido; fator de reprodução no solo=FR, incidência da doença aos 101 dias após a semeadura=Inci101; aos 112 dias=Inci112; aos 123 dias=Inci123; Percentagem de plantas com sintomas ou mortas aos 101 dias após a semeadura=Perc101; 112 dias=Perc112; 123 dias=Perc123; Área abaixo da curva de progresso da doença=AACPD; produtividade ton/ha=Prod; peso de bulbo/planta=PesoBul.....54
- Figura 7: A, B e D – Genótipo de alho da cv. BRS Hozan apresentando sintomas de galhas, coletado em Cristalina-GO (A e B) e inoculado em casa-de-vegetação (D); C – Fenótipo de esterese de *Meloidogyne ethiopica* (E3) extraídos de raízes de alho e o padrão J3 (*M. javanica*)62
- Figura 8: Cortes perineais de fêmeas de *M. ethiopica* mantidas em subcultura periódica de tomate cv. Santa Cruz, isoladas a partir de massas de

ovos de raízes de
alho.....63

Figura 9: Fotomicrografias de Juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne ethiopica* mensurados no presente estudo.....65

Figura 10: Fotomicrografia de Macho de *Meloidogyne ethiopica* mensurado no presente estudo.....66

Lista de Tabelas

- Tabela 1: Número total de espécimes de *D. dipsaci* extraídos de 2,5 g de cascas de bulbos de alho sintomáticos sob diferentes métodos.....24
- Tabela 2: Número de *D. dipsaci* ativos em diferentes períodos dentro de cada método de extração a partir de 2,5g de cascas de bulbos de alho. BM–Baermann modificado; FB–funil de Baermann; PP–placa de Petri.....26
- Tabela 3: Número total de *D. dipsaci* extraídos em 2,5g de material fresco de plantas de alho em estágio vegetativo sob diferentes métodos.....26
- Tabela 4: Número de *D. dipsaci* ativos obtidos em diferentes períodos e dentro de cada método de extração a partir de 2,5 g de tecido fresco em plantas de alho sintomáticas em estágio vegetativo. FBM – funil de Baermann modificado; FB – funil de Baermann; PP – placa de Petri.....27
- Tabela 5: Número de *D. dipsaci* ativos antes e depois da aplicação de hidróxido de sódio 1N (NaOH), em 1mL de suspensão, após o período de 120h, nos diferentes método de extração de material fresco (plantas vegetativas sintomáticas) e material seco (cascas de bulbilhos)28
- Tabela 6: Número total e ativos de *D. dipsaci*, extraídos de solo infestado por método de Jenkins sob diferentes densidades (400 e 600g de sacarose/litro de água) e, funil de Baermann sob diferentes períodos (24 e 48 horas)29
- Tabela 7: Fator de Reprodução (FR) de *D. dipsaci* em genótipos de alho e sua reação (R), em casa-de-vegetação nos anos de 2018 e 2020, considerando a população inicial total-PIT (1000 espécimes/planta) e o número de espécimes vivos-NEV (73 espécimes/planta)43
- Tabela 8: Produtividade (ton/ha) e peso (g) de bulbos por planta de genótipos de alho em experimentos conduzidos em área não infestada (2018-2019) e naturalmente infestada (2020) por *Ditylenchus dipsaci*, sob condições de campo.....45
- Tabela 9: Porcentagem de incidência de plantas com sintomas (não cumulativo) e de plantas mortas (cumulativo), na última avaliação antes da colheita e, área abaixo da curva de progresso da doença (AACPS+AACP), calculada pela porcentagem de incidência em todas as avaliações.....46

- Tabela 10: Número de espécimes de *Ditylenchus dipsaci* g tecido (N/g tec) e número de nematoides por planta (N/planta) em genótipos de alho avaliados aos 101 dias após o plantio e número de nematoides por bulbo (cascas) em experimento conduzido em área naturalmente infestada pelo nematoide.....51
- Tabela 11: População inicial e final de *D dipsaci* em 250cm³ de solo e fator de reprodução (FR) dos genótipos de alho, considerando apenas extração de solo.....52
- Tabela 12: Dados morfométricos (µm) de juvenis de segundo estágio (J2) descritos por diferentes autores [Whitehead (1968); Carneiro et al. (2004)] e realizados no presente estudo. Médias seguidas de ± desvio padrão (intervalo).....64
- Tabela 13: Dados morfométricos (µm) de machos descritos por diferentes autores [Whitehead (1968); Carneiro et al. (2004)] e realizados no presente estudo. Médias seguidas de ± desvio padrão (intervalo).....65
- Tabela 14: Número de *D. dipsaci*, independente da densidade de sacarose e, independente da sua mobilidade, recuperados pelo método de Jenkins em solo infestado artificialmente.....78
- Tabela 15: Número de *D. dipsaci*, independente do período e, independente da sua mobilidade, recuperados pelo método do funil de Baermann em solo infestado artificialmente.....78
- Tabela 16: Características morfométricas e alométricas de *D. dipsaci* proposto por Sturhan e Brzeski (1991) e observadas no presente estudo.....78

Sumário

| | |
|--|----|
| Resumo | 3 |
| Abstract | 4 |
| Lista de Figuras | 5 |
| Lista de Tabelas | 7 |
| Sumário | 9 |
| Agradecimentos | 11 |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 12 |
| 2 CAPÍTULO I - Comparação de metodologias de extração do nematoide do amarelão do alho, <i>Ditylenchus dipsaci</i> quanto a detecção, quantificação e viabilidade em material vegetativo, bulbos e no solo. | 18 |
| 2. 1 Introdução..... | 18 |
| 2. 2 Material e Métodos | 21 |
| 2.2.1 Recuperação e viabilidade de <i>D. dipsaci</i> de material vegetal e bulbos em função de métodos de extração e do período de avaliação. | 21 |
| 2.2.2 Recuperação e viabilidade de <i>D. dipsaci</i> do solo por diferentes métodos de extração..... | 23 |
| 2.2.3 Análise estatística dos dados..... | 23 |
| 2. 3 Resultados..... | 24 |
| 2.3.1 Recuperação e viabilidade de <i>D. dipsaci</i> de material vegetal e bulbos em função de métodos de extração e do período de avaliação. | 24 |
| 2.3.2 Recuperação e viabilidade de <i>D. dipsaci</i> do solo por diferentes métodos de extração..... | 29 |
| 2.4 Discussão | 29 |
| 2.5 Conclusões..... | 33 |
| 3 CAPÍTULO II - Reação de acessos de alho a <i>Ditylenchus dipsaci</i> e aspectos relacionados a produtividade em área infestada pelo nematoide. | 35 |
| 3. 1 Introdução..... | 35 |
| 3.2 Material e métodos | 38 |
| 3.2.1 Reação de acessos de alho a <i>Ditylenchus dipsaci</i> em casa de vegetação. | 38 |

| | |
|---|----|
| 3.2.2 Avaliação da produtividade e reação de acessos de alho a <i>Ditylenchus dipsaci</i> em condições de campo. | 39 |
| 3.3 Resultados..... | 43 |
| 3.3.1 Reação de acessos de alho a <i>Ditylenchus dipsaci</i> em casa de vegetação | 43 |
| 3.3.2 Avaliação da produtividade e reação de acessos de alho a <i>Ditylenchus dipsaci</i> em condições de campo. | 44 |
| 3. 4 Discussão | 54 |
| 3.5 Conclusões..... | 57 |
| 4 CAPÍTULO III - Primeiro relato de ocorrência de <i>Meloidogyne ethiopica</i> parasitando plantas de alho no Brasil..... | 59 |
| 4. 1 Introdução..... | 59 |
| 4. 2 Material e Métodos | 60 |
| 4.3 Resultados e Discussão..... | 62 |
| 4.4 Conclusão..... | 68 |
| Conclusões Gerais..... | 69 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 70 |
| ANEXO 1 | 78 |

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e saúde que me concedeu, por guiar meus passos a caminhos aos quais nunca imaginei trilhar. Por todas as pessoas que colocou em minha vida para facilitar essa árdua caminhada. Concluo essa etapa no meio de uma pandemia, que afetou o andamento não só dessa pesquisa, mas do mundo inteiro. Me sinto realizado e confiante de que dias melhores para todos virão.

Agradeço aos meus pais Daniel Correia e Maria Cleci Sapper, pela educação que me deram, pela formação do meu caráter como pessoa, pelo apoio total em minhas decisões sempre me incentivando a ir além. A minha noiva Valéria Velasque que apesar da distância, sempre me amparou nos momentos difíceis e comemora junto comigo as etapas de sucesso, como essa.

Agradeço ao meu orientador Professor Dr Cesar Bauer Gomes, que faz parte da minha formação acadêmica e pessoal. Inicialmente me aceitou com estagiário na Embrapa e a partir daí iniciou uma amizade, eu muito me ouviu e mais ainda, me aconselhou. Me puxou pra cima, me fez enxergar além, me fez ir além do que eu achava conseguir. Aos seus momentos de dedicação durante o desenvolvimento dos experimentos e da escrita, realmente me orientou.

Ao meu coorientador Professor Dr Jerônimo Viera de Araújo Filho, o qual tenho muita admiração. A cada conversa, eu saía motivado a ir em busca de mais conhecimento, seus questionamentos me induziam a isso.

Agradeço aos meus colegas Wellington da Silva, Cielo Machaca e Helena Oxley, sempre presentes e unidos. Era uma alegria chegar no laboratório e vê-los, as forças se renovavam. Pela ajuda nos experimentos, pelas risadas, almoços e lanches juntos, nos dias alegres e tristes, inseparáveis.

Não posso deixar de lembrar da minha orientadora durante a graduação, Professora Dr^a Juliane Ludwig que me incentivou a ingressar na pesquisa. É uma pessoa de bom coração e sempre buscará o melhor de seus alunos e orientados.

As demais pessoas envolvidas de alguma forma, impossibilitando a menção de todos.

INRODUÇÃO GERAL

O alho (*Allium sativum* L.), pertencente à família Alliaceae, é caracterizado pela sua morfologia, na qual apresenta túnicas membranosas conhecidas como folhas modificadas que envolvem e protegem os bulbos. Diferentes centros de origem são atribuídos ao alho cultivado atualmente no Brasil, cuja procedência é tida como originária do México, Egito e países da América do Sul (ARAÚJO et al., 2017).

A produção de alho se concentra principalmente no continente asiático, o qual detém mais de 91% da produção mundial, sendo a China o maior produtor com aproximadamente 23 milhões de toneladas (ton) por ano, enquanto que o continente americano é responsável por 2,6% da produção mundial, na qual, o Brasil é o 15º maior produtor de alho do mundo, com 131.523 ton em 11.219 hectares colhidas (FAOSTAT, 2021). A região Sudeste do Brasil é a maior produtora de alho, com 54.495 ton no ano de 2019, a segunda maior produtora é a região Centro-Oeste do país, que tem aumentado a área plantada. O Rio Grande do Sul se destaca como o quarto estado brasileiro que mais produz alho, com 15.399 ton produzidas, ficando atrás de Minas Gerais, Goiás e Santa Catarina (IBGE, 2021).

Por ter em sua composição diversas substâncias bioativas, o alho é considerado um alimento benéfico à saúde. Os bulbilhos possuem cerca de 33% de carboidratos e 6% de proteínas, são fontes de potássio e Vitamina C, além de compostos como inulina, adenosina e alicina (compostos funcionais ao organismo humano). Devido ao uso do alho como tempero na culinária, na medicina popular e na fabricação de defensivos agrícolas naturais, tem ocorrido acréscimo na produção da hortaliça no país (ARAÚJO et al., 2017).

O alho-semente pode configurar até 30% dos gastos totais com a produção total da cultura, por conseguinte, a qualidade fisiológica e sanitária devem ser os principais parâmetros a serem observados, considerando que a boa parte das pragas e doenças do alho podem ser disseminadas através dos propágulos vegetativos. Por isso, recomenda-se que a obtenção de bulbilho-semente seja de origem conhecida, assegurando a qualidade ou a produção realizada na propriedade de forma adequada (EMBRAPA, 2021).

No Brasil a produção é caracterizada pelo cultivo de dois tipos de alho, o alho nobre e seminobre. O primeiro é representado por cultivares de alho de alto valor comercial devido a uniformidade e tamanho de bulbo com menor número de bulbilhos, exigem baixa temperatura e fotoperíodo longo (13h diárias) para bulbificação. O segundo agrupa os alhos que são de cultivares mais rústicas, de tamanho menor com maior número de bulbilhos e são menos exigentes aos elementos edafoclimáticos (ARAÚJO et al., 2017; EMBRAPA, 2021). As cultivares ainda são classificadas em precoces, com duração do ciclo de 3 a 4 meses; medianas, de 5 a 6 meses e tardias de 6 ou mais (PAUIATTI, 2017).

Assim como as demais culturas, o sucesso da produção de alho está relacionado com a escolha da cultivar e da época de plantio. Na região sul do Brasil, têm-se fatores climáticos favoráveis para a produção de alho, como temperaturas abaixo de 15°C, envolvida na diferenciação das gemas axilares. O fotoperíodo longo pode interagir com a temperatura e auxiliar no processo de bulbificação, podendo ocorrer o efeito “compensatório”, onde temperaturas baixas podem exigir menor número de horas de luz/dia (PUIATTI, 2017).

O aumento da produtividade é um fator decisivo no cultivo do alho no Brasil, pois é uma cultura intolerante ao estresse hídrico, suscetível as condições ambientais (ocorrendo distúrbios fisiológicos) e ao ataque de pragas e doenças. Os fitopatógenos que acometem a cultura do alho causam problemas que a afetam negativamente, reduzindo significativamente a produção e qualidade do produto colhido. Dentre as principais doenças, destacam-se as causadas por fungos: Podridão branca (*Sclerotium cepivorum*), Mancha púrpura (*Alternaria porri*), Ferrugem (*Puccinia porri*) e Podridão basal (*Fusarium oxysporum*); por bactérias: Podridão bacteriana (*Pectobacterium catovororum* subs. *catovororum*); por vírus dos gêneros *Potyvirus*, *Allexivirus* e *Carlavirus* (MASSOLA JUNIOR et al., 2016).

Alguns gêneros e espécies de fitonematoides podem ocorrer na cultura do alho, porém sem danos significativos relatados no Brasil, estes incluem *Aphelenchoides* spp., *Mesocriconema*, *Helicotylenchus*, *Pratylenchus zaeae*, *Pratylenchus penetrans*, *Paratichodorus minor*, *Rotylenchus reniformis* e *Tylenchus* spp. No entanto, em áreas onde *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev ocorre, causa significativas perdas na produção do alho.

Ditylenchus dipsaci, conhecido como o 'nematoide do caule e dos bulbos do alho' ou 'nematoide do amarelão do alho', é uma ameaça contínua nas áreas de cultivo do país, devido a fácil disseminação por material propagativo infectado (PINHEIRO et al., 2014). No Brasil, Charchar et al. (1980) relataram *D. dipsaci* pela primeira vez nos estados de Minas Gerais e Santa Catarina, sendo detectado, posteriormente, nos estados do Rio Grande do Sul (Luz, 1982), Espírito Santo (ATHAYDE & SANTOS, 1983), Paraná (SILVA, ANTÔNIO & SANTOS, 1984) e conseqüentemente demais estados e municípios produtores do alho (TENENTE, 2006).

Existem aproximadamente 30 raças fisiológicas *D. dipsaci* relatadas de (SEINHORST, 1956). Até o momento, apenas a raça que ataca a cultura do alho foi detectada no Brasil, sendo responsável por perdas econômicas ao produtor e, demandado constante atenção das autoridades de Defesa fitossanitária, na prevenção de entrada de outras raças da espécie (FERRAZ & BROWN, 2016), uma vez que as demais raças são pragas quarentenárias para o país (PINHEIRO et al., 2014).

Ditylenchus dipsaci é um nematoide endoparasita migrador, e sua alimentação resulta em destruição do parênquima cortical, causando a degradação da lamela média da parede celular (FERRAZ & BROWN, 2016). Nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta, os juvenis de quarto estágio penetram o tecido da coroa e do bulbo, que se encontram abaixo da superfície do solo, migrando para outras partes (JOHNSON & ROBERTS, 1995). O ciclo de vida do *D. dipsaci*, pode variar 19 a 23 dias a 15°C, sendo sua reprodução por anfimixia, na qual a fêmea pode produzir de 207 a 498 ovos (HOOPER, 1972). Com isso, em uma única safra de alho o nematoide pode atingir populações elevadas em apenas uma planta (HUANG, 1992). Quando a planta inicia o processo de deterioração, o nematoide pode deslocar-se para o exterior do bulbo (WORDELL FILHO et al., 2006), e sobreviver alimentando-se de fungos presentes no solo (GONZAGA, 1995) cuja densidade populacional irá variar de acordo com as condições climáticas, características do solo e com a cultivar presente na área (PINHEIRO et al., 2014).

Os danos econômicos causados por *D. dipsaci* em várias culturas estão mais associados a solos argilosos do que a solos arenosos. Considerando o nível populacional, de *D. dipsaci* relacionado ao limiar de dano econômico na

cultura do alho é de 10 espécimes para 500g de solo seco (RESENDE et al., 2016; BIRD, ABAWI & LAMONDIA, 2018; SIKORA et al., 2018).

Essa praga entra em estado de dormência, entre as camadas secas dos bulbos de alho (HUANG, 1992), principalmente quando submetido a estresse hídrico (WORDELL FILHO et al., 2006), sendo um dos poucos nematoides que têm a capacidade de sobreviver em anidrobiose (FIELDING, 1951). Fielding (1951) obtiveram espécimes vivos de *D. dipsaci* de cabeças floríferas de *Dipsacus* sp. (Fuller's Teasel – planta nativa da Europa) que foram preservadas em estado de dessecação por 23 anos. Os danos costumam ser mais graves quando o nematoide já está presente no tecido das sementes no momento do plantio (SIKORA et al., 2018). Na ausência de hospedeiro, pode ainda sobreviver no solo saprofiticamente se alimentando de fungos (GONZAGA, 1995).

Considerando-se a condição de anidrobiose, a detecção do nematoide em material vegetal pelo método de extração de Funil de Baerman (1917) é dificultoso ou até mesmo impreciso. Esse método é usado para extração de nematoides ativos (móveis) de material vegetal, baseando-se na mobilidade, pois quando material infectado é colocado em água, os nematoides se deslocam do tecido e decantam (VAN BEZOOIJEN, 2006). Segundo Favoreto (2008), nematoides mortos ou inativos não são extraídos pelo método do Funil de Baermann e suas variações, pois demandam algum tempo para exibirem motilidade.

Quando população de *D. dipsaci* acometem a cultura do alho, há o desenvolvimento de sintomas típicos da doença, cujo sintomas no campo são, caracterizados principalmente, pelo engrossamento do pseudocaule e menor crescimento da haste da planta, amarelecimento das folhas e apodrecimento do bulbo (CHARCHAR; TENENTE & ARAGÃO, 2003). Durante a colheita, na presença de altos níveis populacionais, pode ocorrer o desprendimento e retirada apenas da parte aérea da planta (PINHEIRO et al., 2014) e ainda, os bulbos afetados, apresentam chochamento. No período de armazenamento, ocorre o amarelecimento intenso do bulbo, sintoma conhecido vulgarmente como “amarelão do alho” (CHARCHAR; TENENTE & ARAGÃO, 2003).

Os sintomas muitas vezes não são aparentes, e a ocorrência de plantas assintomáticas não indica necessariamente à ausência do nematoide nos

bulbilhos (GUBINA, 1988). Em bulbilhos atacados, o nematoide, em especial juvenis de quarto estágio e adultos, ficam alojados principalmente nos catafilos e na película de proteção, sendo o material a ser processado para fins de extração no caso de detecção de *D. dipsaci* em alho, o, não sendo encontrados no interior do órgão vegetal (FERRAZ & BROWN, 2016).

Grinberg e Gomes (2018), em levantamento a campo, diagnosticaram a presença do nematoide em amostras de alho, no extremo sul do Rio Grande do Sul, nas quais os produtores relataram perdas estimadas em 30% na safra. Porém, em condições climáticas ótimas para o desenvolvimento do nematoide (15°C a 20°C), os danos podem chegar a 100% em bulbilhos infectados (CHARCHAR, 2001).

A principal estratégia de manejo é a prevenção da entrada do *D. dipsaci* na área. Quando detectado sua presença, torna-se praticamente impossível erradicá-lo, podendo até inviabilizar o cultivo dependendo dos níveis populacionais. Para que a prevenção ocorra, é essencial a utilização de bulbilhos-sementes de alho certificados, isentos do nematoide, para plantio em solos não infestados (RESENDE et al., 2016).

Quando confirmada a presença do nematoide, mesmo em baixa população, deve-se evitar o plantio na área; utilizando rotação de culturas, com plantas não hospedeiras, por no mínimo três anos consecutivos (BECKER, 1993). O uso da termoterapia pode ser uma alternativa de manejo, porém tem pouca viabilidade de uso, devido aos problemas fisiológicos causados na semente, como também a aplicação prática em grandes quantidades (JAEHN, 1995).

Cinco nematicidas à base de abamectina (avermectina) apresentam registro no MAPA e estão disponíveis no mercado para controle de *D. dipsaci*, via aplicação por tratamento sob imersão da semente antes do plantio (AGROFIT, 2021). A utilização de produtos químicos para o controle do nematoide pode prevenir parte das perdas, porém não garante sozinho uma produção isenta da ocorrência da praga nem sua erradicação na lavoura, podendo haver então, um aumento na população (BECKER, 1990).

Outras alternativas complementares ao manejo da doença, tais como inundação da área, destruição de restos culturais, solarização e uso de variedades resistentes são medidas importantes a serem tomadas (WORDELL

FILHO et al., 2006). Apesar de algumas cultivares de alho serem altamente produtivas, normalmente são suscetíveis à raça presente no país, por isso, tem-se buscado a obtenção de cultivares tolerantes ou, preferivelmente, resistentes (FERRAZ & BROWN, 2016).

Em experimento realizado em casa-de-vegetação e câmara frigorífica, verificou-se a reação de 26 cultivares de alho a *D. dipsaci*, onde Charchar, Tenente e Aragão (2003) verificaram que sete genótipos se comportaram como resistentes, e outros seis com resistência intermediária no entanto não foram conduzidos trabalhos de campo para aferir tal reação.

Há ainda outras espécies de nematoides que representam séria ameaça à cultura, no entanto são consideradas pragas quarentenárias para o Brasil, entre elas: *Belonolaium longicaudatus*, *Ditylenchus destructor* e *Meloidogyne chitwoodi* (PINHEIRO et al., 2014).

Para nosso conhecimento, até o presente não há relatos de ocorrência do nematoide da galhas (*Meloidogyne* sp.) em alho no Brasil. Ademais, espécies de *Meloidogyne* tem sido recentemente reportadas na cultura do alho em outros países. Gupta (2018), relatou *Meloidogyne graminicola* em plantas de alho em área de sucessão com arroz na Índia, apresentando sintomas de amarelecimento e secagem da ponta e galhas na ponta das raízes.

Nesse sentido, durante a realização desse estudo, teve-se por objetivos: a) avaliar a eficiência de diferentes métodos de extração visando a detecção e quantificação de *D. dipsaci* em amostras de alho e de solo; b) avaliar a resistência de cultivares de alho a *D. dipsaci* em condições de casa-de-vegetação e a campo; e; c) relatar e caracterizar a primeira ocorrência de espécie de Nematóide das galhas (*Meloidogyne* sp.) em alho no Brasil.

2 CAPÍTULO I - Comparação de metodologias de extração do nematoide do amarelão do alho, *Ditylenchus dipsaci* quanto a detecção, quantificação e viabilidade em material vegetativo, bulbos e no solo.

2.1 Introdução

Por suas exigências climáticas, no Brasil, o alho (*Allium sativum*) tem sua produção concentrada em cerca de 90% nos estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Santa Catarina, Goiás e Bahia. O país destaca-se por ter um dos maiores consumos per-capita a nível global, o que corresponde a aproximadamente 1,5 kg/habitante/ano (RESENDE et al., 2016). A área colhida no Brasil e a produção vem aumentando nos últimos anos.

A produção de alho é limitada por uma série de fatores, dentre eles, a produtividade das cultivares, adaptação dos materiais genéticos as condições de clima e fotoperíodo, textura, pH e fertilidade do solo, e, a problemas decorrentes de pragas e doenças limitantes (RESENDE et al., 2016; NICK & BORÉM, 2017) Entre os problemas fitossanitários, doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides, acometem a cultura do alho e causam problemas que afetam negativamente a cultura, reduzindo significativamente a produção. Alguns gêneros de fitonematoides podem ocorrer na cultura do alho, causando danos severos. Entre esses, o nematoide do amarelão *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev constitui-se uma ameaça contínua nas áreas de cultivo do país, devido à fácil disseminação por material infectado pelo nematoide (PINHEIRO et al., 2014), ou ainda pela dificuldade de manejo onde está presente. Essa espécie possui um complexo de mais 30 raças biológicas conhecidas, cada uma nomeada por seu hospedeiro principal ou pela planta na qual foi detectado pela primeira vez (SCHWARTZ & MOHAN, 2008). Apesar dessa gama de raças distintas, apenas a raça cebola que também afeta a cultura do alho (*Allium* spp.) ocorre no Brasil, sendo as demais raças, pragas quarentenárias ausentes (MAPA, 2021).

Ditylenchus dipsaci tem preferência por condições climáticas amenas e úmidas, podendo completar seu ciclo de vida em 19 a 23 dias a 15 °C (SIKORA et al., 2018). O amarelão do alho é um problema recorrente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil desde seu relato na década de 1970 no estado de Santa

Catarina (PINHEIRO, 2017). A reprodução dessa espécie é por fecundação cruzada. As fêmeas ovipositam um total de 200–500 ovos internamente aos tecidos da planta atacada e, assim como os machos, vivem de 45 a 73 dias em boas condições de temperatura e umidade (SCHWARTZ & MOHAN, 2008). Consoante a isso, a população do nematoide pode aumentar drasticamente em um ciclo da cultura, variando de 50.000 nematóides por planta (SCHWARTZ & MOHAN, 2008) até uma média 3.609 nematoides por grama de tecido de alho infectado (BIRD, ABAWI & LAMONDIA, 2018).

Ditylenchus dipsaci é um nematoide endoparasita migrador que se alimenta do tecido parenquimático da planta (CABI, 2019), o que resulta dissolução da lamela média das células atacadas e a presença de grandes cavidades no interior do córtex, onde as fêmeas costumam ficar alojadas para a deposição dos ovos (FERRAZ & BROWN, 2016). Quando o nematoide ataca as plantas de alho no campo, há o desenvolvimento de sintomas típicos da doença, incluindo, principalmente, engrossamento do pseudocaule e menor crescimento da haste da planta, amarelecimento das folhas e apodrecimento dos bulbos (CHARCHAR; TENENTE & ARAGÃO, 2003) culminando com a destruição completa das plantas, acompanhada por um odor fétido característico (RESENDE et al., 2016). Após a colheita, bulbos infestados e armazenados deformações, e rachaduras (FERRAZ & BROWN, 2016), aparência esbranquiçada e textura farinácea (RESENDE et al., 2016).

Em um ataque leve da cultura, durante o estágio de bulbificação, os juvenis de quarto estágio (J4) de *D. dipsaci* migram da parte aérea para o bulbo, concentram cerca de 90% da população nas folhas de proteção (TIHOHOD, 1993; PINHEIRO, 2017), que, por desidratação do corpo (dessecação), entram em anidrobiose, e podem sobreviver em material vegetal seco armazenado por até 23 anos (FIELDING, 1951). Quando ocorre a brotação de um bulbilho infectado no solo, o nematoide migra para o ápice, que, em elevados níveis de infecções, poderão provocar a morte das plantas, causando perdas de até 100% (TIHOHOD, 1993; SIKORA et al., 2018).

Ditylenchus dipsaci pode parasitar plantas em solos pesados e leves, embora uma maior incidência pareça ocorrer em solos pesados, sobrevivendo sem plantas hospedeiras por mais de um ano (SIKORA et al., 2018) ou no solo, saprofiticamente se alimentando de fungos (GONZAGA, 1995). A sua detecção

no solo é normalmente dificultosa devido aos baixos níveis populacionais (SIKORA et al., 2018). Os níveis de dano econômico para a várias culturas, incluindo a do alho, são significativos com populações de 10 espécimes de *D. dipsaci* por 500 g de solo (RESENDE et al., 2016; BIRD, ABAWI & LAMONDIA, 2018). Já na cultura da cebola, o limiar de dano econômico é de 10 espécimes por 400g de solo (SIKORA et al., 2018).

A detecção de *D. dipsaci* em plantas sintomáticas é fácil e prática, cujo procedimento primário se dá pela imersão de partes do tecido vegetal na água, onde os estágios móveis do nematoide escapam dos tecidos dentro de duas a quatro horas e podem ser visualizados sob microscópio (EPPO, 2017). Segundo o Protocolo de diagnóstico para pragas regulamentadas do International Plant Protection Convention, *D. dipsaci* pode ser extraído de tecido vegetal de alho cortando-o em pequenos pedaços e colocando-os em um recipiente (por exemplo, placa de Petri) com água da torneira a temperatura ambiente; e, para obter uma suspensão limpa de impurezas, os pedaços podem ser colocados em uma peneira coberta com papel filtro, conforme método do prato/bandeja de Oostenbrink (1954) ou do funil de Baermann (1917), sendo o último, uma técnica de referência para a extração de nematóides do solo e de material vegetal (bulbos, raízes, cascas e sementes). (IPPC, 2016), por basear-se na mobilidade do nematoide.

Ainda, segundo o IPPC (2016), a extração de *D. dipsaci* do solo pode ser feito pelo método de Kleynhans (1997), técnica que combina peneiramento e centrifugação, muito parecida ao método de extração de solo proposto por Jenkins (1964), diferindo no tempo de centrifugação e densidade da solução de sacarose. A metodologia de Jenkins (1964) é amplamente utilizada na maioria dos laboratórios brasileiros, além de adaptações protocoladas (MACHADO, SILVA & FERRAZ, 2019). Trabalhos na literatura envolvendo métodos de extração de *D. dipsaci* em solo e material infectado, mostram que a eficiência na recuperação do nematoide parece ser variável por diversos fatores (POIRIER et al., 2019).

Dessa forma, teve-se por objetivo nesse trabalho, avaliar a eficiência de diferentes métodos de extração de *D. dipsaci* de material fresco contaminado e de bulbos secos infectados na recuperação e viabilidade de inóculo (espécimes ativos) em 24, 48, 72, 96 e 120h após a extração; e, comparar os métodos de

extração de nematoides do solo pelo funil de Baermann (1917), Baermann modificado e Jenkins (1964) sob duas concentrações de sacarose quanto ao número de nematoides recuperados totais e de indivíduos ativos (vivos).

2. 2 Material e Métodos

Os trabalhos aqui realizados serviram de base para otimizar a detecção e recuperação de espécimes ativos de *D. dipsaci* realizados nos diferentes bioensaios, para posterior avaliação da resistência de diferentes cultivares de alho (*Allium* sp.) a *D. dipsaci* em condições de casa-de-vegetação e a campo (capítulo 2). O presente estudo foi dividido em duas etapas.

2.2.1 Recuperação e viabilidade de *D. dipsaci* de material vegetal e bulbos em função de métodos de extração e do período de avaliação.

Na primeira etapa, avaliou-se a eficiência de recuperação de espécimes de *D. dipsaci* de material fresco de plantas infectadas e de bulbos secos utilizando-se três métodos de extração. Para avaliação em material fresco, selecionaram-se apenas as partes do bulbo e do pseudocaule infectadas como o nematoide, as quais foram cortadas em pedaços de ± 1 cm e homogeneizadas. Para avaliação em material seco, bulbilhos apresentando sintomas característicos da infecção pelo nematoide foram descascados, descartou-se o endosperma (folha de reserva), aproveitando-se apenas as cascas (folhas de proteção), as quais foram cortadas em pedaços de ± 1 cm e homogeneizadas.

Do material fresco e seco processado, foram separadas subamostras de 2,5g as quais foram submetidas aos métodos de extração pelo funil de Baermann (1917), Baermann modificado e placa de Petri. Para o Método do funil de Baermann (1917) - Em um funil cônico de plástico contendo na sua base um tubo de borracha de 0,5cm de diâmetro, vedado com uma pinça de Morh na extremidade, foi depositada uma peneira de tela plástica recoberta com lenço de papel (tipo facial) cujo material infectado (subamostra de 2,5g) foi colocado sobre essa, e, completou-se com água até o nível da borda do funil.

Já para o Baermann modificado, tal metodologia consistiu no mesmo procedimento descrito acima, porém, a subamostra de material infectado foi depositada diretamente sobre a peneira sem o uso do papel, e, a seguir, completou-se o volume com água ao nível da borda do funil. O terceiro método testado consistiu apenas no depósito do material vegetal uma placa de Petri de 90mm imerso em água, preenchida até a borda da placa (EPPO, 2013).

Os dois bioensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis repetições, permanecendo por 24h em sala de incubação com controle de temperatura (± 25 °C). Decorridas as 24h, para os métodos de funil de Baermann e Baermann modificado, realizou-se a coleta de uma alíquota de 50 mL da suspensão de cada repetição em tubo tipo Falcon, para posterior quantificação. Já no método de placa de Petri, o material foi vertido sobre as peneiras com abertura de malha de 60 mesh (para retenção do material) e 635 mesh (para retenção dos nematoides) para recolhimento dos nematoides, e posterior transferência de 50mL da suspensão para tubo tipo Falcon.

A quantificação do número de *D. dipsaci* totais e móveis, foi realizada com auxílio de microscópio estereoscópio. Para tanto, foram feitas três contagens da mesma repetição em uma placa de Petri com 5mL da suspensão após 24, 48, 72, 96 e 120 horas do início da incubação. Para avaliação do número de *D. dipsaci* vivos após o último período de avaliação (120 horas), 100 μ L de NaOH (Hidróxido de Sódio) 1 N, foi colocado em 1mL de suspensão do nematoide e, 30 segundos após, foi contado o número de *D. dipsaci* móveis/mL, repetindo o procedimento três vezes para cada unidade experimental, conforme metodologia de Chen e Dickson (2000).

2.2.2 Recuperação e viabilidade de *D. dipsaci* do solo por diferentes métodos de extração

Na segunda etapa desse estudo, avaliou-se a eficiência dos métodos de extração de *D. dipsaci* do solo pelas metodologias de Baermann (1917) e Jenkins (1964) na recuperação dos nematoides do solo. Ambos bioensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis repetições, em sala de incubação a $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Inicialmente, amostras de solo arenoso foram coletadas na região do distrito Quitéria (Rio Grande-RS). A seguir, o volume coletado foi autoclavado a 120°C por uma hora para garantir que não houvesse nematoides na amostra. Logo, depositou-se 250cc desse solo ($\approx 300\text{g}$) em um Becker de 250mL, infestando o mesmo, na sequência, com 10mL de uma suspensão aquosa contendo 2500 espécimes (4% ativos/móveis) de *D. dipsaci*.

Primeiramente, o solo infestado foi submetido a duas lavagens e peneiramento sobre as peneiras de 20 e 400 mesh. A seguir, a suspensão obtida foi submetida a centrifugação a 1750 rpm por 5 min e descartado o sobrenadante. Na segunda centrifugação, foram adicionadas solução de sacarose na concentração de 400g ou 600g por litro de água, por 1 min a 1750 rpm. Logo após, o sobrenadante de cada amostra foi vertido sobre peneira de 500 mesh para recuperação dos nematoides.

Já para o método do funil de Baermann, cada unidade experimental de solo foi depositada na peneira contendo papel absorvente fino sob um funil de vidro com capacidade para os 250cc de solo. Decorridos 24 horas após a instalação do funil, uma alíquota de até 50mL foi retirada de cada funil, e outra alíquota de até 50 mL, 48 horas após a instalação, procedendo-se as contagens do número de nematoides nos referidos tempos de incubação. A quantificação do número total e ativos de *D. dipsaci* foi realizada com auxílio de microscópio estereoscópio, procedendo-se a tríplice contagem em placa de Petri com capacidade de 5mL de suspensão. Para o período de 48h, o número de nematoides foi somado ao extraído no primeiro período (24h).

2.2.3 Análise estatística dos dados

Os dados referentes ao bioensaios com material vegetal (fresco e seco), expressa pelo número de nematoides totais extraídos e espécimes ativos (valores transformados em $\sqrt{x + 1}$) nos diferentes tratamentos e variações, foram submetidos a ANOVA em esquema fatorial, sendo as medias comparadas entre si pelo teste de Duncan e/ou Scott-Knott a 5%. Os dados referentes ao bioensaio com solo expressos pelo número total de nematoides e

espécimes ativas (valores transformados em $\sqrt{x+1}$), foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$), sendo as médias de cada tratamento comparadas entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Adicionalmente, dentro de cada método, foram conduzidas análises em esquema fatorial utilizando-se, também, o teste de Duncan a 5%, onde para Jenkins os fatores foram concentração de sacarose e número de nematoides recuperados; e para FB, período de recuperação e número de nematoides recuperados. Para essas análises, utilizou-se o software SAS (SAS Institute 9.4, 2011).

2. 3 Resultados

2.3.1 Recuperação e viabilidade de *D. dipsaci* de material vegetal e bulbos em função de métodos de extração e do período de avaliação.

Quando comparados os três métodos (funil de Baermann-FB, Baermann modificado-BM e placa de Petri-PP) de extração do nematoide para material seco (cascas de bulbos), para a variável números totais de *D. dipsaci* recuperados, verificou-se significância apenas para o fator métodos. Já para número de nematoide recuperados móveis, observou-se interação entre os fatores métodos e períodos de avaliação (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Número total de espécimes de *D. dipsaci* extraídos de 2,5 g de cascas de bulbos de alho sintomáticos sob diferentes métodos.

| Métodos | Número total de <i>D. dipsaci</i> |
|---------------------|--|
| Placa de Petri | 8542,6 a* |
| Baermann Modificado | 4301,1 b |
| Funil de Baermann | 2003,4 c |
| CV (%) | 29,57 |
| Períodos | Número total de <i>D. dipsaci</i> |
| 24h | 5412,7 ^{ns} |
| 48h | 5330,7 |
| 72h | 5067,2 |
| 96h | 5236,1 |
| 120h | 5147,3 |
| CV (%) | 29,57 |

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. ^{ns} não significativo a 5%.

Para número total de espécimes extraídas do material seco, independentemente do período de avaliação, recuperou-se maior quantidade de nematoides utilizando-se o método de placa de Petri (PP), seguido do Baermann Modificado (BM), conforme dados apresentados na Tabela 1. Quando analisado o número de *D. disaci* móveis dentro dos períodos de avaliação, maior numero de espécimes recuperados foi obtido quando utilizou-se o método da placa de Petri (Figura 1), 24h após a instalação, verificando-se incremento de 34 a 237 vezes comparativamente aos demais métodos testados. Já para os períodos subsequentes (48 a 120h), de uma forma geral, os nematoides permaneceram inativos, não havendo diferenças entre os métodos (Figura 2).

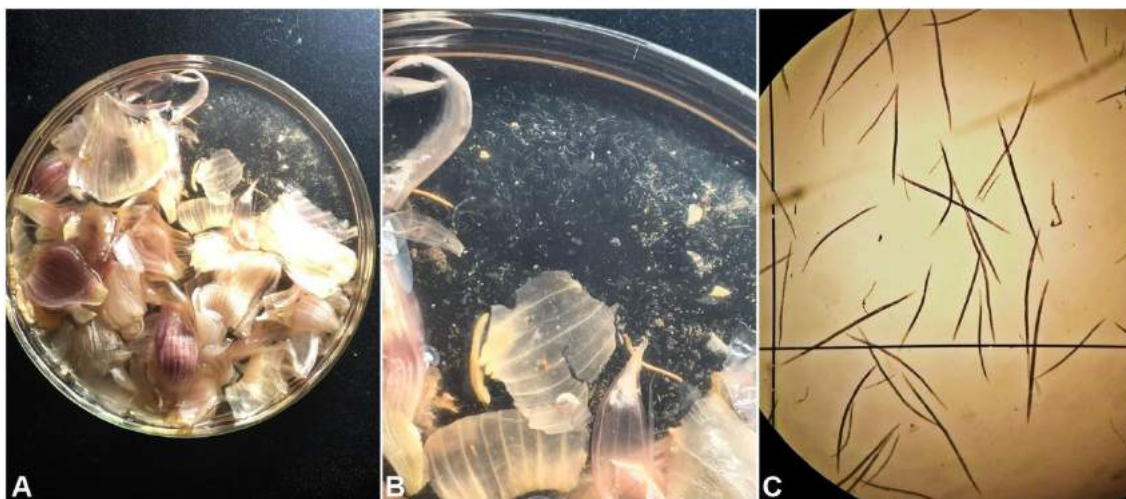


Figura 1: A e B- método de extração por placa de Petri após 24 horas de incubação e, C- espécimes em microscopia de luz com aumento de 40x.

De forma semelhante, pela análise da mesma variável dentro de cada método, maior número de espécimes de *D. dipsaci* móveis recuperados foram observados nas primeiras 24h tanto para o funil de Baermann (FB), Baermann modificado como em PP.

Tabela 2: Número de *D. dipsaci* ativos em diferentes períodos dentro de cada método de extração a partir de 2,5g de cascas de bulbos de alho. BM–Baermann modificado; FB–funil de Baermann; PP–placa de Petri.

| Métodos | Períodos (horas) | | | | | CV (%) |
|---------|------------------|--------|---------|--------|--------|--------|
| | 24h | 48h | 72h | 96h | 120h | |
| PP | 1777,5 Aa | 0,0 Ab | 13,3 Ab | 0,0 Ab | 0,0 Ab | 38,79 |
| BM | 7,5 Ba | 0,0 Ab | 0,0 Ab | 0,0 Ab | 0,0 Ab | 53,09 |
| FB | 51,7 Ba | 0,0 Ab | 0,0 Ab | 0,0 Ab | 0,0 Ab | 60,34 |
| CV (%) | 28,62 | 0,00 | 52,95 | 0,00 | 0,00 | |

*Letras iguais (dados transformados), maiúscula na coluna, minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de significância. CV (%): Obtidos pela transformação dos dados ($\sqrt{x+1}$).

Analisando-se os resultados obtidos no bioensaio conduzido com material fresco, para a variável número total de nematoides recuperados, não houve interação entre os fatores, cuja significância foi observada apenas para métodos (Tabela 3). Nesse sentido, independentemente do período de avaliação (24 a 120h), maior número de indivíduos foram recuperados utilizando-se o método de Baermann modificado.

Tabela 3: Número total de *D. dipsaci* extraídos em 2,5g de material fresco de plantas de alho em estágio vegetativo sob diferentes métodos.

| Métodos | Número total de <i>D. dipsaci</i> |
|---------------------|-----------------------------------|
| Baermann Modificado | 4599,6 a* |
| Funil de Baermann | 3414,6 b |
| Placa de Petri | 3151,2 b |
| CV (%) | 40,13 |
| Períodos | Número total de <i>D. dipsaci</i> |
| 24h | 3561,8 ^{ns} |
| 48h | 3683,0 |
| 72h | 3735,0 |
| 96h | 3773,7 |
| 120h | 3840,0 |
| CV (%) | 40,13 |

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. ^{ns} não significativo a 5%.

Ainda, na avaliação do bioensaio conduzido com material vegetal fresco, para a variável número de espécimes de *D. dipsaci* móveis, houve interação significativa entre os fatores (Tabela 4). Analisando-se o número de nematoides móveis, dentro de cada período de avaliação, embora de uma

forma geral, maior recuperação tenha sido verificada com o método PP, nos períodos de 96h e 120h após a incubação, tal método não diferiu significativamente do FB; e após 120h, não houve diferença entre os métodos.

Comparando-se os períodos de avaliação, dentro de cada método, BM e FB tiveram comportamento semelhantes entre 24 e 72h (2 a 23% recuperação), notando-se maior número de espécimes móveis de *D. dipsaci* recuperados após 96/120h e 120h, para esses métodos, respectivamente. Embora tenha sido detectado maior número e percentagem (50% recuperação) de espécimes moveis recuperados no tratamento PP, não houveram diferenças significativas nos períodos para esse método (Tabela 4; Figura 2).

Tabela 4: Número de *D. dipsaci* ativos obtidos em diferentes períodos e dentro de cada método de extração a partir de 2,5 g de tecido fresco em plantas de alho sintomáticas em estágio vegetativo. FBM – funil de Baermann modificado; FB – funil de Baermann; PP – placa de Petri.

| Métodos | Períodos (horas) | | | | | CV (%) |
|---------|------------------|---------|---------|---------|---------|--------|
| | 24h | 48h | 72h | 96h | 120h | |
| PP | 1548 Aa | 2297 Aa | 2777 Aa | 2350 Aa | 2662 Aa | 22,12 |
| FB | 802 ABb | 422 Bb | 280 Bb | 2648 Aa | 3279 Aa | 49,95 |
| BM | 515 Bb | 442 Bb | 84 Bb | 231 Bb | 2644 Aa | 39,16 |
| CV (%) | 38,22 | 31,50 | 33,41 | 39,45 | 31,57 | |

*Letras iguais (dados transformados), maiúscula na coluna, minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de significância. CV (%): Obtidos pela transformação dos dados ($\sqrt{x+1}$).

A aplicação de NaOH às suspensões das repetições de ambos experimentos ao final do ensaio (120h após o recolhimento), indicou não haver diferenças significativas para mobilidade antes ou após a aplicação nos diferentes métodos de extração. Já para material seco infectado e examinado 120h após a extração, não foi possível detectar nematoides moveis após a aplicação de NaOH (Tabela 5) o que pode estar relacionado a sua morte após as 48h da extração, conforme dados apresentados na Tabela 2.

Tabela 5: Número de *D. dipsaci* ativos antes e depois da aplicação de hidróxido de sódio 1N (NaOH), em 1mL de suspensão, após o período de 120h, nos diferentes método de extração de material fresco (plantas vegetativas sintomáticas) e material seco (cascas de bulbilhos).

| Métodos | Material fresco | | Material seco | |
|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| | Antes | Depois | Antes | Depois |
| Baermann Modificado | 57,22 ^{ns} | 68,32 ^{ns} | 0,00 ^{ns} | 0,00 ^{ns} |
| Funil de Baermann | 82,20 | 83,88 | 0,00 | 0,00 |
| Placa de Petri | 63,35 | 64,45 | 0,00 | 0,00 |
| CV (%) | 50,07 | 50,24 | - | - |

^{ns} médias não significativas pelo teste de Scott-Knott a 5%.

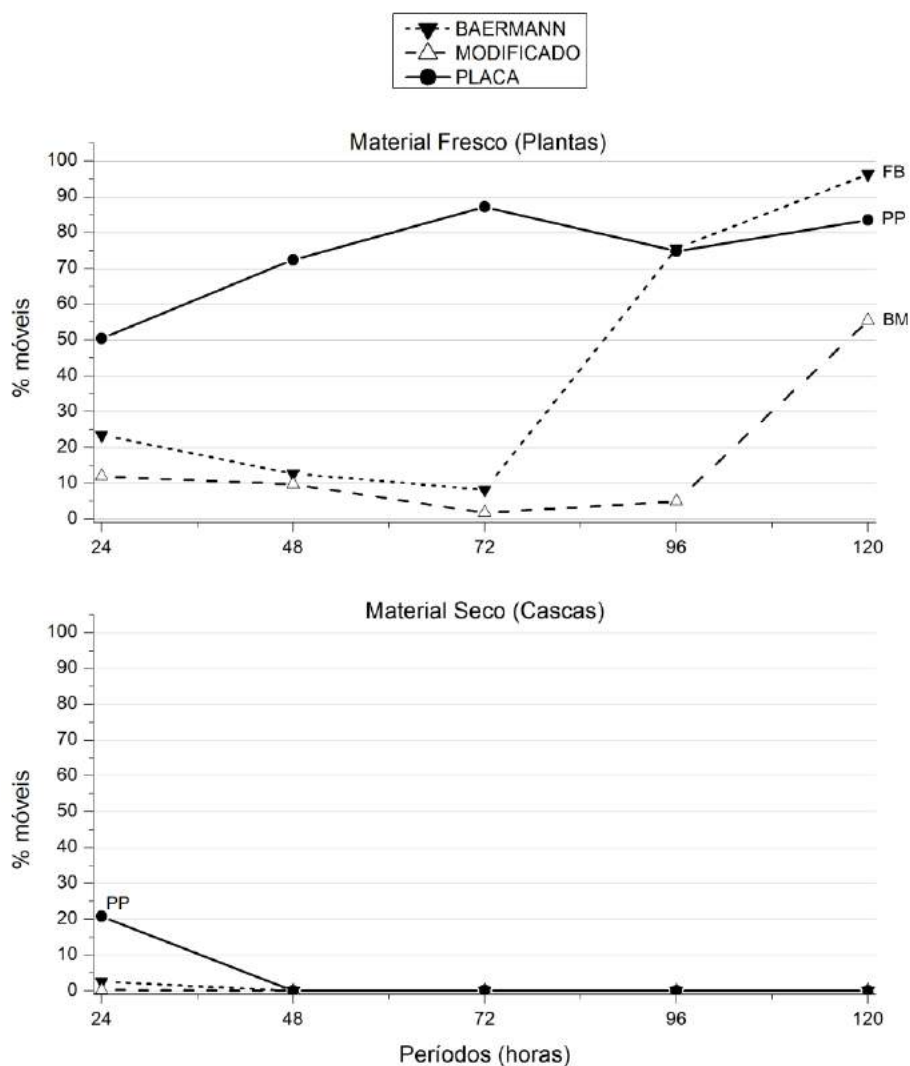


Figura 2: Percentagem de espécimes ativos de *D. dipsaci* recuperados de material fresco (gráfico acima) e seco (gráfico abaixo) de alho infectado por diferentes métodos, 24, 48, 72, 96 e 120h após a instalação de cada método (FB, BM e PP).

2.3.2 Recuperação e viabilidade de *D. dipsaci* do solo por diferentes métodos de extração

Quando comparados os quatro tratamentos conjuntamente, o emprego do método de Jenkins com concentração de 400 e 600g de sacarose resultou em maior recuperação de espécimes totais e ativos de *D. dipsaci* do solo comparativamente as extrações pelo método do funil de Baermann nos dois períodos (Tabela 6).

Tabela 6: Número total e ativos de *D. dipsaci*, extraídos de solo infestado por método de Jenkins sob diferentes densidades (400 e 600g de sacarose/litro de água) e, funil de Baermann sob diferentes períodos (24 e 48 horas).

| Método | Totais | Ativos |
|---------------|-----------|----------|
| Sacarose 400g | 568,89 a* | 346,67 a |
| Sacarose 600g | 457,78 a | 308,33 a |
| Funil 48h | 73,43 b | 73,43 b |
| Funil 24h | 70,83 b | 70,83 b |
| CV (%) | 40,22 | 49,38 |

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste Duncan a 5% de significância.

Quando analisada a recuperação de nematoides do solo dentro de cada método, para Jenkins, verificaram-se diferenças significativas para o fator número de nematoides independentemente da concentração de sacarose, onde maiores níveis de nematoides totais foram detectados em relação as formas móveis, cuja diferença foi maior que 50% (Anexo 1). No entanto, para o método do funil de Baermann, independentemente do período do período de incubação do solo para extração dos espécimes de *D. dipsaci*, o número de nematoides móveis recuperados foi o mesmo ($P>0,05$) não havendo significância para ambos os fatores (Anexo 1).

2.4 Discussão

Os diferentes resultados obtidos na extração total de nematoides em material fresco e seco, pode ser explicado por alguns fatores que influenciam as técnicas utilizadas. Nesse sentido, a maior recuperação de nematoides

totais e ativos em material seco, utilizando-se o método PP, pode estar relacionada principalmente à ausência de uma barreira física como o papel no método típico de Baermann (1917) conforme as recomendações da EPPO (2013). A passagem do nematoide pode variar muito dependendo do tipo de papel, que em caso de dúvida, testes de eficácia devem ser realizados. Viglierchio e Schmitt (1983) testaram diferentes tipos de papéis na técnica do funil de Baermann, depositando as espécimes de *D. dipsaci* diretamente no papel, contabilizando retenção de *D. dipsaci* de 5 a 35% no papel utilizado, em um período de 24 horas, não dispo de análise estatística para definir o mais eficiente, mas concluíram que o tipo de papel influencia na passagem dos nematoides.

Da mesma forma, o volume da amostra (2,5g cascas) utilizado como padrão para comparação, no bioensaio com material seco, ocupou grande parte do espaço nas peneiras, o que pode ter dificultado a mobilidade do nematoide e sua decantação. Segundo Van Bezooijen (2006) a eficiência geralmente aumenta quando a camada de detritos no filtro ou funil é fina e diminui com o tamanho da amostra. Para comprovação, um menor volume de material seco poderia ser testado sob esses métodos de extração. Já na metodologia de placa de Petri, a lavagem do material não depende exclusivamente da mobilidade, onde a extração de nematoides mortos ou inativos pode ser bem-sucedida. Favoreto (2004) também observou tal evidência para extração de sementes secas, onde os nematoides estão na sua maioria inativos e não são extraídos pelo método do funil de Baermann e suas variações.

Os menores valores aqui observados, para espécimes ativas em material seco, pode ser atribuída a menor atividade do nematoide em função do tempo de extração. Para métodos de extração baseados na mobilidade do nematoide, a taxa de recuperação aumenta em períodos de extração mais longos, além da coleta regular e a adição de água constante, que favorecem (EPPO, 2013).

Embora tenham sido observadas diferenças significativas entre os métodos para número de nematoides móveis (ativos), em material fresco infectado nos períodos de 24 a 96h, as diferenças não significativas em 120h após a extração pode ser atribuída à alguma substância do alho contida na

suspensão antes que impediu o seu movimento , antes da adição de NaOH 1N. Considerando-se que, o próprio macerado do alho é tóxico a *D. dipsaci* (VEGA, 1979; VAN BEZOOIJEN, 2006), algum composto na suspensão pode tê-los deixado inativos. Da mesma forma, o efeito do extrato de alho na redução do nematoide das galhas (*M. incognita*) em tomate foi observada por Neves et al. (2009).

Os bioensaios com material fresco e seco compartilham a premissa de que o uso do papel sob a peneira não contribui para a melhoria extração, o que pode ser considerado para o bioensaio de solo. O que está de acordo com as conclusões propostas por VIGLIERCHIO & SCHMITT (1983), onde o uso de papel para reter solo, malhas de peneiras ou tecidos usados na extração por funil pode restringir a passagem de nematoides, dependendo da espécie em estudo. *D. dipsaci*, pelo seu comprimento corporal pode ser muito afetado.

Em estudo conduzido por Poirier et al. (2019), testando-se a extração de *D. dipsaci* com bulbos ou pseudocaule e folhas de alho, os autores não observaram diferenças significativas entre os métodos de extração de Baermann (funil e bandeja) em baixa ou alta densidade populacional diferindo do método da sonicação (Tangchitsomkid et al.) que foi variável nas duas condições. Embora os autores tenham concluído que o método Baermann é preferido para a análise desses tipos de materiais, em material fresco infectados com baixo nível de fitonematoides; não houveram diferenças entre os métodos; já na avaliação em bulbos os secos, houveram diferenças entre os métodos testados quando os bulbos utilizados continham nível de inóculo mais elevado. Mesmo assim, o emprego de FB e FB modificado, nessa condição, resultou em menor número de espécimes recuperados, ratificando os resultados observados nesse estudo quando avaliou-se o número de espécimes recuperados nos bulbos por tais metodologias.

A baixa viabilidade do inóculo (número nematoides moveis) observada no material seco (cascas dos bulbos) deste estudo, pode ser atribuída tanto ao elevado índice de mortalidade em função da toxicidade da suspensão onde os nematoides estavam contidos. Muitos nematoides morrem ou são inativados devido ao acúmulo de substâncias tóxicas do material vegetal, crescimento de microrganismos, e falta de oxigênio no fundo do funil (VAN BEZOOIJEN, 2006; SIKORA et al., 2018). Quando extraídas do tecido, os nematoides devem ser

lavados em várias trocas de água estéril para remover vestígios de compostos fenólicos que os tornam inativos (PLOWRIGHT, CAUBEL & MIZEN, 2002). A 15°C, em 24 dias, menos de 10% de *D. dipsaci* sobreviveram a 0,85 ppm de O₂, enquanto que 95% sobreviveram a 7,5 ppm de O₂. Um aumento na temperatura reduz significativamente a sobrevivência nessas concentrações de O₂. Além disso a solução em que o nematoide se encontra afeta a sua sobrevivência. A solução de ureia mata os J4 após 36 horas (SIMONS, 1973). Isso explica a inativação dos nematoides durante as avaliações de mobilidade nos diferentes períodos para os métodos nos diferentes bioensaios. O que poderia ser revertido com a adição de hidroxibenzoato de metila à água para inibir o crescimento bacteriano e para evitar a falta de oxigênio, usar uma solução de peróxido de hidrogênio em vez de água ou a fazer adaptação de um spray (VAN BEZOOIJEN, 2006).

Nesse sentido, para espécimes de *D. dipsaci* extraídas de material fresco por FB e FB modificado, o emprego desses produtos pode proporcionar ou manter um maior número de indivíduos ativos por um maior tempo considerando-se os resultados aqui observados, onde, em 120h, foi possível detectar maiores quantidades de indivíduos moveis não detectados até 72-96h do início da incubação. Além disso, a concentração de solutos poderia ser revertida com a lavagem da suspensão em peneiras, porém, por outro lado, poderia resultar em perdas dos espécimes.

O maior número de espécimes de *D. dipsaci* extraídos do solo pelo método de Jenkins comparativamente ao FB (2,88%) se deve a um conjunto de vantagens, como maior eficiência de recuperação (20%), menor tempo para obtenção dos espécimes e maior qualidade de visualização da amostra pela menor concentração de impurezas conforme comparações descritas pela EPPO (2013). Em estudo conduzido por COSTA, OTOBONI e SARAIVA (2002), os autores obtiveram melhores resultados pelo método de Jenkins na recuperação dos nematóides do solo (não indicando espécie ou gênero) em comparação com o método do funil de Baermann. No entanto, em trabalho recente, Poirier et al. (2019), verificou que o emprego do FB (bandeja e funil) resultou em maior recuperação de espécimes de *D. dipsaci* que a centrifugação por densidade em diferentes tipos de solo, incluindo o arenoso. No entanto, os autores usaram um menor volume de solo (100cc) e infestaram-no com um

menor número de espécimes (200/unidade experimental), mantendo o solo sob extração dos nematoides por um período de sete dias.

Considerando-se que o movimento e a infectividade dos nematoides recuperados do solo nem sempre estão correlacionados, existe a possibilidade de que, sob o estresse das condições mais secas existentes, o nematoide pode entrar em um estágio de repouso temporário (MIYAGAWA & LEAR, 1970). Apesar de ter sido verificado diferença entre os tratamentos quanto a mobilidade dos nematoides recuperados no método de Jenkins e esse efeito não tenha sido significativo par ao funil independentemente da variação, maiores níveis de *D. dipsaci* ativos foram obtidos quando utilizou-se a extração via peneiramento e flotação centrífuga em solução de sacarose, o que demonstra a eficiência dessa técnica para detecção e recuperação do patógeno no solo em comparação ao método FB.

No entanto, segundo IPPC (2016), outros métodos que podem ser usados para a extração de *Ditylenchus* do solo incluem a técnica Cobb modificada por Flegg e o método do elutriador de Oostenbrink. Segundo EPPO (2013), o método de centrifugação desenvolvido por Caveness e Jensen (1955) também é recomendado para extração de *D. dipsaci* em solo, testado por Poirier et al. (2019). Ademais, estudos comparativos entre essas e outras metodologias de extração podem resultar na otimização da recuperação de sse patógeno, uma vez que uma das limitações de se trabalhar no patossistema *D. dipsaci* x alho, em condições de campo, está diretamente ligada aos baixos índices populacionais recuperados no solo, mesmo em áreas pesadamente infestadas.

2.5 Conclusões

A recuperação de nematoides móveis de material seco (bulbos) de alho é influenciado pelo método de extração sendo a metodologia da placa de Petri a mais eficiente; e, a viabilidade dos espécimes obtidos está relacionada ao período de avaliação, permanecendo ativos apenas nas primeiras 24h. Já para material fresco, não há diferença entre os métodos e os espécimes ativos até 120h após a extração.

A origem do material (fresco ou seco) infectado afeta a recuperação e mobilidade de *D. dipsaci*. Para material fresco boa parte da atividade é mantida até 120h após a extração; e, para material seco, apenas nas primeiras 24h.

O método de Jenkins (1964) independentemente da densidade de sacarose, é o mais indicado para extração de *D dipsaci* em solo infestado.

3 CAPÍTULO II - Reação de acessos de alho a *Ditylenchus dipsaci* e aspectos relacionados a produtividade em área infestada pelo nematoide.

3.1 Introdução

Importante condimento da culinária brasileira, o alho (*Allium* spp.) possui um consumo per-capita de 1,5Kg/habitante/ano (RESENDE et al., 2016), sendo essa demanda suprida por importação da China e Argentina, principalmente (MAPA, 2021). Sensível à fatores climáticos como fotoperíodo e temperatura, a maioria das variedades cultivadas no Brasil são exigentes em frio, onde temperaturas abaixo de 15°C é condição essencial para diferenciação das gemas. Porém, a técnica de vernalização ou frigorificação, antes do plantio, substitui a necessidade de frio a campo, possibilitando a cultivo em regiões do Brasil onde as temperaturas são mais amenas (RESENDE et al., 2016; PUIATTI, 2017).

De acordo com dados do IBGE (2021), entre as safras de 2017 a 2019, as regiões do Centro-Oeste e o Sudeste aumentaram tanto sua área plantada quanto a produção de alho, se tornando-se as principais regiões produtoras do país. As cultivares mais plantadas no país são pertencentes a espécie *Allium sativum* L. O Rio Grande do Sul se destaca como o quarto estado brasileiro que mais produz alho, com 15.399 ton produzidas (IBGE, 2021). Na região Sul, importante produtora de alho nobre, o plantio é feito a partir de maio estendendo-se até julho, onde as condições climáticas são favoráveis para a cultura (RESENDE et al., 2016; PUIATTI, 2017); no entanto, nessas áreas de produção, pode ocorrer o desenvolvimento de doenças de diferentes etiologias que afetam sensivelmente o rendimento da cultura. Entre as cultivares mais plantadas no estado, destaca-se os alhos nobres: Ito, Caçador, Quitéria, São Valentin e Chonan (*A. sativum*) e Elefante (*Allium ampeloprasum* L.), mais conhecido regionalmente como alho-macho.

Entre as doenças, O “nematoide do amarelão do alho” *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev é uma ameaça recorrente em áreas de cultivo do alho, principalmente no sul do país, onde as condições climáticas são favoráveis ao seu desenvolvimento, (15°C a 20°C) cujas perdas podem atingir 100% (CHARCHAR, 2001; PINHEIRO et al., 2014). Algumas características desse

patógeno o colocam em quinto lugar entre os 10 principais fitonematoides de importância econômica no mundo, causando problemas principalmente em regiões temperadas (JONES et al., 2013), em função de sua sobrevivência e disseminação.

Ditylenchus dipsaci sobrevive em anidrobiose (dormência) entre as camadas secas dos bulbos de alho (HUANG, 1992), cuja condição pode garantir sua sobrevivência por até 23 anos, sob dessecação (FIELDING, 1951). Assim, esses bulbos infectados servirão como inóculo para a safra seguinte na mesma área, ou, como inóculo inicial em áreas de cultivo não infestadas (PINHEIRO, 2017). Alternativamente, O nematoide sobrevive em plantas daninhas hospedeiras como macela, trevo, caruru, picão-preto, após o cultivo de alho (FONSECA et al., 1999), no solo alimentando-se de fungos (GONZAGA, 1995), ou até mesmo, nesse mesmo ambiente sem hospedeiro, por até um ano, causando danos econômicos mesmo em baixo nível populacional (SIKORA et al., 2018).

Dependendo da temperatura, o ciclo de vida do nematoide pode variar entre 19 a 23 dias, na qual a fêmea pode produzir até 500 ovos, onde todos estágios pós-embrionários de *D. dipsaci* podem infectar as plantas (HOOPER, 1972; CHITAMBAR, WESTERDAHL & SUBBOTIN, 2018). Dessa forma, em uma safra de alho o nematoide pode atingir populações elevadas em apenas uma planta (HUANG, 1992) normalmente causa sintomas típicos como engrossamento do pseudocaule e menor crescimento da haste da planta, amarelecimento das folhas e apodrecimento dos bulbos (CHARCHAR; TENENTE & ARAGÃO, 2003). Os sintomas muitas vezes não são aparentes, não indicando necessariamente a ausência do nematoide nos bulbilhos (GUBINA, 1988), uma vez que os espécimes ficam alojados entre as folhas de proteção e não no interior do órgão vegetal (FERRAZ & BROWN, 2016).

Além disso, o nematoide pode interagir com outros patógenos provocando doenças nas mais variadas culturas suscetíveis. Estudos conduzidos no Canadá por HAWN (1963), comprovam que *D. dipsaci* é transmissor de *Clavibacter michiganense* subsp. *Insidiosum*, agente causal de murcha bacteriana na alfafa (*Medicago sativa*). Também há relatos da associação de *D. dipsaci* com *Pseudomonas fluorescens*, agente causal da doença bacteriana do alho chamada de café au lait (café com leite), onde

mostrou que a bactéria penetra mais eficientemente nos tecidos da planta quando o nematoide estava presente (CAUBEL & SAMSON, 1984).

A espécie *D. dipsaci* possui 30 raças fisiológicas (SEINHORST, 1956), onde, no Brasil, ocorre apenas a raça alho (FERRAZ & BROWN, 2016), sendo as demais, quarentenárias (PINHEIRO et al., 2014), o que exige atenção permanente das autoridades de defesa para tomada de estratégias de manejo preventivas. Práticas de saneamento rigorosas e a aplicação dos regulamentos de quarentena, a fim de evitar a introdução do nematoide em campos de produção, são essenciais (BIRD, ABAWI & LAMONDIA, 2018); entre essas, o uso de sementes livres do nematoide figura como a principal etapa preventiva contra a infestação do nematoide (CHITAMBAR, WESTERDAHL & SUBBOTIN, 2018). No RS, o amarelão do alho é um problema recorrente, especialmente no extremo sul, onde prejuízos decorrentes da infestação solo e plantio intenso no mesmo local tem impactado negativamente a produção em função da suscetibilidade dos materiais cultivados no local (ARAÚJO FILHO et al., 2018; GRINBERG & GOMES, 2018).

É fundamental amostrar e analisar o solo quanto a presença de *D. dipsaci* antes do plantio (BIRD, ABAWI & LAMONDIA, 2018). Quando detectado, mesmo em baixa população, deve-se evitar o plantio na área; utilizando-se rotação de culturas com plantas não hospedeiras, por no mínimo três anos consecutivos (BECKER, 1993). O uso da termoterapia pode ser uma alternativa de manejo, porém tem pouca viabilidade de uso e aplicação prática (JAEHN, 1995). A utilização de produtos químicos para o controle do nematoide pode prevenir parte das perdas, porém não garante, sozinha, uma produção isenta da ocorrência da praga nem sua erradicação na lavoura (BECKER, 1990).

Apesar de algumas cultivares de alho serem altamente produtivas, normalmente são suscetíveis à raça presente no país, por isso, tem-se buscado, através de pesquisas, a obtenção de cultivares tolerantes ou, preferivelmente, resistentes (FERRAZ & BROWN, 2016). A utilização de materiais resistentes a *D. dipsaci* em campo, pode garantir melhor produtividade, além de reduzir o potencial de inóculo nos bulbilhos, restringindo a disseminação do nematoide para outras regiões. (CHARCHAR; TENENTE & ARAGÃO, 2003). Em alguns estudos desenvolvidos no Brasil, relatou-se

resistência de algumas cultivares de alho a *D. dipsaci*. (CHARCHAR, TENENTE E ARAGÃO, 2003; NEUSCHRANK et al., 2019; CORREIA et al., 2019). No entanto, tais estudos não foram conclusivos uma vez que a tolerância ou resistência do alho ao nematoide do amarelão não foram avaliadas em condições de campo. Nesse sentido, teve-se por objetivos nesse estudo, testar diferentes acessos de alho quanto a reação a *D. dipsaci*, em condições de casa-de-vegetação; e, a seguir, avaliar a resistência desses genótipos em condições de campo quanto à reação e evolução da doença aliado a produtividade na presença ou ausência do nematoide.

3.2 Material e métodos

O presente estudo foi conduzido nas dependências do Laboratório de Fitopatologia e nas casas-de-vegetação da Embrapa Clima Temperado de Pelotas (RS); e, os trabalhos de campo, realizados em uma propriedade familiar da localidade de Quitéria, município de Rio Grande-RS (32°2'30"S; 52°15'18"O).

3.2.1 Reação de acessos de alho a *Ditylenchus dipsaci* em casa de vegetação em 2018 e 2020.

Nos ensaios conduzidos em casa-de-vegetação, 16 genótipos de alho comercial foram avaliados por duas vezes em experimentos realizados em 2018 e 2020. Em 2018, foram testados os genótipos 'Amarante', 'Amarante Branco', 'Araguari', 'Caçador', 'Cateto Roxo', 'Catiguá', 'Chinês', 'Gravatá', 'Peruano' e 'Quitéria', provindas do Banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças, além de um genótipo de alho-macho 'Elefante' (aqui nomeado de AM-Ponte Cordeiro de Farias) provindo de uma propriedade rural de Pelotas-RS. Em 2020, foram testados os genótipos 'Amarante', 'Araguari', 'Cateto Roxo', 'Chinês Real', 'Chonan', 'Gravatá', 'Hozan', 'Moz 114', 'Peruano', 'Quitéria', provindas do Banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças e, dois genótipos de alho-macho 'AM-Ponte Cordeiro de Farias' e 'AM-Erenice' oriundos de cultivo local de Pelotas e Rio Grande-RS, respectivamente.

Para estabelecimento dos ensaios, os bulbilhos de cada genótipo de alho foram plantados individualmente em vasos plásticos de 5 litros, contendo solo arenoso esterilizado, em casa-de-vegetação. O ensaio foi conduzido em ambiente protegido a $20 \pm 5^\circ\text{C}$ em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com seis repetições.

Para ambos os experimentos (2018 e 2020), quando todas as plantas haviam emergido, os vasos foram depositados sobre espuma a base de TDI (Tolueno Dissocianato de Metila) e Polirol mantida úmida. A seguir, procedeu-se a inoculação de 1mL de uma suspensão aquosa contendo 1.000 espécimes de *D. dipsaci* em cada planta preparada a partir de alho seco infectado, buscando-se manter o máximo da suspensão entre as folhas do broto (PLOWRIGHT, CAUBEL & MIZEN, 2002). A seguir, as plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida por 15 dias na mesma condição de temperatura para garantir a infecção das plantas. Apenas para o experimento 2 (2020), foi estimado a percentagem de formas ativas (espécimes móveis) do nematoide na suspensão, sendo de 7,3%.

Decorridos 100 dias da inoculação, as plantas foram colhidas para avaliações agronômicas e nematológicas. Cada planta foi processada, separando-se o bulbo e parte aérea para posterior extração do nematoide utilizando-se a metodologia de imersão do material vegetal em placa de Petri, por 24h (Capítulo 1). A seguir, cada unidade experimental foi quantificada quanto ao número de nematoides no solo pelo método de extração de Jenkins (1964), em 250cc e extrapolada para o total contido no vaso. A contagem dos nematoides foi realizada com auxílio de microscópio estereoscópio (40x) em placa de Petri contendo 5mL da suspensão. Posteriormente as populações do solo e do material vegetal foram somadas para determinação da população final, e cálculo do fator de reprodução ($FR = \text{população final} / \text{população inicial}$) do nematoide, calculado conforme descrito por Oostenbrink (1966), onde $FR < 1,0$ indica resistência e $FR > 1,0$ suscetibilidade de cada genótipo.

3.2.2 Avaliação da produtividade e reação de acessos de alho a *Ditylenchus dipsaci* em condições de campo.

Os experimentos foram conduzidos, em condições de campo, na localidade da Quitéria (Rio Grande-RS) em solo com horizonte A franco arenoso e mal drenado, classificado como Planossolo Háplico (Unidade de Mapeamento Pelotas – SBCS). Foram avaliados 14 genótipos de alho em 3 safras consecutivas, sendo os dois primeiros ensaios conduzidos em locais livres de *D. dipsaci*, e, no último, em área infestada com o nematoide e com relato de perdas recorrentes. Em 2018, foram avaliados 10 genótipos ('Amarante', 'Amarante Branco', 'AM-Ponte Cordeiro de Farias', 'Araguari', 'Cateto Roxo', 'Catiguá', 'Chinês', 'Gravatá', 'Peruano' e 'Quitéria'); em 2019, oito ('AM-Erenice', 'AM-Ponte Cordeiro de Farias', 'Araguari', 'Cateto Roxo', 'Chonan', 'Hozan', 'Moz 114' e 'Peruano'); e, em 2020, 11 genótipos ('Amarante', 'AM-Ponte Cordeiro de Farias', 'AM-Erenice', 'Araguari', 'Cateto Roxo', 'Chonan', 'Gravatá', 'Hozan', 'Moz 114', 'Peruano' e 'Quitéria'), estimando-se após cada colheita, a produção de cada genótipo de alho.

Inicialmente, foram delimitados os canteiros com dimensões de 1,0 metro de largura por 42,0m de comprimento em experimentos conduzido em blocos ao acaso (DBC) com seis repetições (parcelas). Após o preparo de cada canteiro, foram coletadas doze amostras compostas (duas por bloco, cada uma representando seis parcelas) de 1kg de solo na camada de 0-20cm de profundidade. A extração de nematoide de solo foi processada pelo método de Jenkins (1964) utilizando-se uma subamostra de 250cc. A seguir, procedeu-se a contagem em 5mL da suspensão obtida de cada amostra em placa de Petri com auxílio de microscópio estereoscópio, determinando-se a população inicial no solo em cada parcela.

Cada parcela foi composta por 4 linhas de plantio, espaçadas em 25cm, contendo 12 plantas para os genótipos 'AM-PC Farias' e 'AM-Erenice', com espaçamento de 20cm entre plantas e, 20 plantas para os demais genótipos, com espaçamento de 10cm entre plantas.

Nos anos de 2018 e 2019, decorridos aproximadamente 100 dias após o plantio, mesmo sem sintomas da doença, 50% da plantas foram colhidas para análise de detecção do nematoide, não sendo constata a presença de *D. dipsaci*. Decorridos seis meses do plantio, os 50% restante de cada parcela foram colhidos para determinação do peso dos bulbos e produtividade. Devido a diferença do número de plantas por parcelas, para os genótipos com 12

plantas por parcela, a produtividade foi estimada por hectare considerando 144.000 plantas/ha. Já para os genótipos com 20 plantas por parcela, foi considerado uma população de 264.000 plantas/ha.

Em 2020, aos 101 dias após a semeadura, três plantas foram escolhidas aleatoriamente nas parcelas de cada genótipo para detecção e quantificação do nematoide internamente aos tecidos (pseudocaule e bulbos). Das plantas amostradas, retirou-se a raiz, separando bulbo e a parte aérea, pesando-os individualmente. Os bulbos foram pesados, cotados em pequenos pedaços, retirando uma subamostra de 20g. A parte aérea teve o mesmo processo, porém, retirou-se uma subamostra de 15g. Para extração dos nematoides, utilizou-se a metodologia de imersão do material vegetal em placa de Petri, por 24h (EPPO, 2013); estimando-se, ao final, a população total da amostra por planta e por grama de tecido. Ainda, aos 101 dias após a semeadura, procedeu-se a avaliação de incidência da doença (amarelão), contabilizando-se o número de plantas sintomáticas e mortas, sendo a seguir, calculada a percentagem em relação ao total de plantas presentes na parcela.

As avaliações de incidência, e percentagem de plantas saudas e mortas foram realizadas até a colheita de cada genótipo, individualmente (devido ao ciclo), cujos períodos de análise foram aos 101 dias após o plantio (DAP), 112, 123, 133, 140, 149 e 158 DAP dos bulbilhos-semente. O número de plantas mortas foi cumulativo a cada avaliação. A partir da tabulação dos dados de incidência, foi calculado a área abaixo da curva de progresso dos sintomas (AACPS) e de plantas mortas (AACPM) através do software GW Basic 3.20 (MAFFIA, 1986).

Ao final do ciclo de cada genótipo, as parcelas foram colhidas, os bulbos foram pesados em balança digital (0,001g), e estimou-se a produtividade por hectare, conforme descrito anteriormente. Durante a colheita foi retirado uma amostra de aproximadamente 1,0 Kg de solo de cada parcela na camada de 0-20cm de profundidade para a extração dos nematoides pelo método de Jenkins (1964) (população final) e estimativa do seu fator de reprodução em cada parcela ($FR = \text{população final} / \text{população inicial}$) onde $FR < 1,0$ indicou resistência e $FR > 1,0$ suscetibilidade (Oostenbrink, 1966).

Por fim, foi determinada a população final de *D. dipsaci* no alho curado. Todos os bulbos foram descascados, picado e homogeneizado, pesando-se o

total de casca e retirada uma amostra de 2,5 g. Os nematoides foram extraídos pelo método de placa de Petri (EPPO, 2013) e quantificados com auxílio de microscópio estereoscópio, extrapolando-se ao final, o número de nematoides pelo peso total de casca dos bulbos colhidos na parcela, determinando-se número de nematoides por planta (bulbo) e por grama de tecido.

Para confirmação da espécie do nematoide do amarelão, a partir de amostras de alho proveniente da propriedade onde os experimentos foram conduzidos, as mesmas foram processadas para extração pelo método de placa de Petri (EPPO, 2013). As análises morfológica e morfométrica foram realizada utilizando-se espécimes vivos, os quais foram fixados em formalina 1% para confecção de lâminas temporárias (uma espécime por lâmina). Cada nematoide foi fotografado com uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio de luz, nas objetivas de 10X, 20X e 40X e objetivas de imersão de 60X e 100X. Foram medidos 20 machos e 20 fêmeas utilizando-se o Software LAS Core. A partir das mensurações, foi obtido um conjunto de medidas padrão de *Ditylenchus*, permitindo a retenção combinada de caracteres, morfométricos e alométricos [L =comprimento total do corpo; St = comprimento do estilete; $a=L /$ largura máxima do corpo; $b=L /$ comprimento do esôfago; $c=L /$ comprimento da cauda; c' = comprimento da cauda / diâmetro do corpo ao nível anal; $V\% =$ distância do extremo anterior até a volta / $(L*100)$] conforme proposto por Sturhan e Brzeski (1991).

Os dados quantitativos foram submetidos a análise de componentes principais (ACP), utilizando-se para este fim uma matriz de correlação. Os dados relativos aos parâmetros das plantas, produtividade e fator de reprodução do nematoide foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). Constatando significância estatística entre os fatores, as médias de cada tratamento foram comparadas entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o software estatístico SAS versão 9.4 (SAS Institute 9.4, 2016) e SASM-agri (CANTIERI et al., 2001).

3.3 Resultados

3.3.1 Reação de acessos de alho a *Ditylenchus dipsaci* em casa de vegetação.

Considerando-se os dois ensaios conduzidos em casa-de-vegetação para avaliação da resistência de alho a *D. dipsaci*, pelo número total de nematoides inoculados, de uma maneira geral, AM-PC Farias, Quitéria, Peruano, Chinês Real, Hozan, Caçador, Catiguá, Chonan e Moz, foram resistentes; e, Amarante, Amarante Branco, Chinês, Araguari e AM-Erenice, suscetíveis ao nematoide, sendo os dois últimos aqueles que mais multiplicaram *D. dipsaci* conforme maiores valores de FR apresentados na tabela 7. Os genótipos Cateto Roxo e Gravatá, embora tenham se comportado com resistentes em 2018, na repetição do ensaio, foram suscetíveis (Tabela 7).

Quando avaliada da resistência dos genótipos de alho com base no número de nematoides inoculados vivos/móveis (ensaio de 2020), embora a reação tenha se mantido a mesma comparada com número total de espécimes inoculados, verificou-se valores de FR de 10 a 17 vezes maior (Tabela 7).

Tabela 7: Fator de Reprodução (FR) de *D. dipsaci* em genótipos de alho e sua reação (R), em de casa-de-vegetação nos anos de 2018 e 2020, considerando a população inicial total-PIT (1000 espécimes/planta) e o número de espécimes vivos-NEV (73 espécimes/planta).

| Genótipo | 2018 | | | 2020 | | |
|--------------|----------|---|----------|------|-----------|----------------|
| | FR (PIT) | R | FR (PIT) | R | FR (NEV) | R |
| Araguari | 12,402 a | S | 2,044 c | S | 22,464 b* | S ¹ |
| Amarante | 3,143 b | S | 1,067 d | S | 17,224 b | S |
| Chinês | 2,463 b | S | - | - | - | - |
| A. Branco | 2,119 b | S | - | - | - | - |
| Quitéria | 0,883 c | R | 0,008 d | R | 0,097 c | R |
| Peruano | 0,841 c | R | 0,011 d | R | 0,121 c | R |
| Cateto Roxo | 0,825 c | R | 4,209 b | S | 46,249 b | S |
| Gravatá | 0,619 c | R | 2,482 c | S | 27,271 b | S |
| Caçador | 0,525 c | R | - | - | - | - |
| Catiguá | 0,523 c | R | - | - | - | - |
| AM-PC Farias | 0,217 c | R | 0,003 d | R | 0,036 c | R |
| Chinês Real | - | - | 0,061 d | R | 0,672 c | R |
| AM-Erenice | - | - | 10,04 a | S | 110,34 a | S |
| Hozan | - | - | 0,030 d | R | 0,330 c | R |

| | | | | | |
|---------|-------|---------|---|---------|---|
| Chonan | - | 0,008 d | R | 0,093 c | R |
| Moz 114 | - | 0,003 d | R | 0,033 c | R |
| CV (%) | 34,97 | 61,87 | | 76,57 | |

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamentos Scott-Knott ao nível de 5% de significância. ¹Reação de resistência/suscetibilidade segundo Oostenbrink (1966).

3.3.2 Avaliação da produtividade e reação de acessos de alho a *Ditylenchus dipsaci* em condições de campo.

De acordo com os resultados (Tabela 8), em condições de campo, o genótipo AM-PC Farias foi o mais produtivo (≈ 15 ton/ha) e, o que apresentou o maior peso de bulbo por planta (≈ 104 g/bulbo) nos dois anos (2018-2019) avaliados em área não infestada pelo nematoide. Apesar não ter sido possível avaliar todos os genótipos quanto a produção por dois anos seguidos na área não infestada, de uma maneira geral, um segundo grupo (intermediário) com produção de 7,11 a 9,33 ton/ha e peso médio de bulbos de 26,9 a 56,3g foi formado pelas cultivares AM-Erenice, Catiguá, Chinês, Peruano, Cateto Roxo e Quitéria. E, um terceiro grupo, composto pelas cultivares Gravatá, Moz 114, Hozan e Chonan, foi o menos produtivo (1,42 a 4,47 ton/ha) e com menor peso de bulbos por planta (5,4 a 16,9g). A presença do nematoide na área no ano de 2020, reduziu em até 54% o peso dos bulbos e conseqüentemente, sua produtividade.

Na avaliação da produtividade (Tabela 8) do alho em área infestada por *D. dipsaci* (2020), o genótipo AM-PC Farias continuou sendo o mais produtivo (11,05 ton/ha), e com maior peso de bulbo por planta (58,63g) seguido de AM-Erenice com produtividade média de 5,9 ton/ha e 21,9 g/bulbo. Em um terceiro grupo foi constituído pelo genótipo Quitéria (4,3 ton/ha e 13,1 g bulbo/planta); e uma quarto grupo formado por Peruano, Cateto Roxo, Amarante, Araguari, Gravatá, Moz 114, Hozan e Chonan, o qual teve o menor rendimento (0,4 a 3,9 ton/ha e 1,1 a 9,8 g/bulbo). Comparando-se genericamente a produtividade nas áreas infestadas e não infestadas, exceto para Hozan, o menor impacto de *D. dipsaci* na redução do produto colhido foi de 24,72 a 28,80% nas cvs. de alho-macho AM-PC Farias e AM-Erenice, 39,25% em Quitéria, 15 a 50% em

Peruano, 69,22% em Cateto Roxo, 83,45% em Amarante, 77,64% em Araguari e 88,62% em Moz 114.

Tabela 8: Produtividade (ton/ha) e peso (g) de bulbos por planta de genótipos de alho em experimentos conduzidos em área não infestada (2018-2019) e naturalmente infestada (2020) por *Ditylenchus dipsaci*, sob condições de campo.

| Genótipo | 2018 | | 2019 | | 2020 | |
|--------------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|
| | Prod. | Peso | Prod. | Peso | Prod. | Peso |
| AM-PC Farias | 15,52 a | 107,79 a | 14,68 a | 101,90 a | 11,05 a | 58,63 a* |
| Catiguá | 9,33 b | 35,38 b | - | - | - | - |
| Chinês | 8,82 b | 33,43 b | - | - | - | - |
| Peruano | 7,68 b | 29,09 b | 4,59 c | 17,41 c | 3,93 c | 9,75 d |
| Cateto Roxo | 7,68 b | 29,09 b | 1,92 d | 7,28 d | 2,41 d | 6,25 d |
| Quitéria | 7,11 b | 26,94 b | - | - | 4,32 c | 13,12 c |
| A. Branco | 6,91 b | 26,19 b | - | - | - | - |
| Amarante | 6,89 b | 26,12 b | - | - | 1,14 d | 3,19 d |
| Araguari | 6,80 b | 25,77 b | 5,03 c | 19,06 c | 1,52 d | 4,49 d |
| Gravatá | 4,47 c | 16,95 c | - | - | 2,84 d | 6,20 d |
| AM-Erenice | - | - | 8,12 b | 56,31 b | 5,93 b | 21,86 b |
| Moz 114 | - | - | 3,34 d | 12,48 d | 0,38 d | 1,09 d |
| Hozan | - | - | 1,42 d | 5,38 d | 2,17 d | 6,29 d |
| Chonan | - | - | 2,48 d | 9,39 d | 1,53 d | 4,41 d |
| C.V. (%) | 27,64 | 27,07 | 27,35 | 24,45 | 41,67 | 62,06 |

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamentos Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Em função das análises realizadas nas áreas infestadas com o amarelão, as mensurações alométricas e as características morfométricas dos espécimes avaliados nesse estudo, estão dentro do intervalo proposto para a espécie de *Ditylenchus dipsaci*, conforme caracterização de Sturhan e Brzeski (1991), apresentados em (Anexo 2).

Na tabela 9, são apresentados os percentuais da plantas com sintomas da doença (amarelecimento, encurtamento e engrossamento pseudocaule, murcha e apodrecimento da planta) do amarelão do alho de mortalidade na última avaliação antes da colheita. De uma forma geral, formam formados dois grupos, o primeiro composto por Moz 114, AM-Erenice, Amarante, Araguari, Gravatá e Cateto Roxo onde verificaram-se os maiores valores de plantas sintomáticas (≈34,88%). E um segundo grupo constituído por, Hozan, AM-PC

Farias, Quitéria, Peruano e Chonan os menores percentuais de plantas sintomáticas ($\approx 5,91$).

A porcentagem de plantas mortas, acumuladas ao longo do ciclo foi igualmente proporcional a porcentagem dos sintomas, onde o mesmo grupo de genótipos apresentou maior mortalidade ($\approx 27,89\%$), e, o segundo grupo, a semelhança das plantas sintomáticas, os menores valores percentuais de plantas mortas na parcela ($\approx 6,21\%$),

Na avaliação da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), foram observados diferentes agrupamentos comparativamente aqueles dos sintomas. O maior valor de AACPD foi verificado no genótipo AM-Erenice, cujo o rápido progresso da doença foi observado a partir do 101º dia após o plantio, conforme Figuras 1 e 2. Os genótipos Amarante, Araguari, Gravatá e Cateto Roxo, apresentaram AACPD intermediária. Em um terceiro grupo, Moz 114, Hozan, AM-PC Farias, Quitéria, Peruano e Chonan apresentaram os menores valores de AACPD, o qual coincidiu com os dois agrupamentos onde foi observado os menores percentuais de plantas sintomáticas e mortas, evidenciando, portanto, os maiores valores percentuais de plantas assintomáticas ($\approx 87,87$).

Tabela 9: Porcentagem de incidência de plantas com sintomas (não cumulativo) e de plantas mortas (cumulativo), na última avaliação antes da colheita e, área abaixo da curva de progresso da doença (AACPS+AACPM), calculada pela porcentagem de incidência em todas as avaliações.

| Genótipo | Sintomas (%) | Mortas (%) | AACPD |
|-----------------|---------------------|-------------------|--------------|
| Moz 114 | 48,66 a | 19,57 a | 557,88 c* |
| AM-Erenice | 37,50 a | 33,57 a | 1.942,48 a |
| Amarante | 37,19 a | 31,65 a | 1.127,71 b |
| Araguari | 32,48 a | 31,43 a | 1.042,40 b |
| Gravatá | 29,94 a | 25,84 a | 880,62 b |
| Cateto Roxo | 23,56 a | 25,30 a | 881,63 b |
| Hozan | 13,26 b | 6,21 b | 294,51 c |
| AM-PC Farias | 9,26 b | 3,70 b | 249,07 c |
| Quitéria | 4,68 b | 11,19 b | 516,41 c |
| Peruano | 2,38 b | 5,79 b | 125,25 c |
| Chonan | 0,00 b | 4,17 b | 134,25 c |
| CV (%) | 67,8 | 87,6 | 62,2 |

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamentos Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Todos os genótipos, com exceção de Moz 114, tiveram pelo menos três avaliações do percentual de sintomas e de plantas mortas. Os resultados são apresentados em gráficos individuais para cada genótipo (Figura 3). Nos genótipos AM-PC Farias, AM-Erenice e Quitéria, devido ao ciclo mais longo, foi possível acompanhar o desenvolvimento da doença até o final do ciclo da cada um com aumento de 2 a 4 avaliações adicionais de sintomas e de plantas mortas comparativamente aos demais genótipos (Figura 4).

A taxa de evolução da doença em três avaliações a campo (Figura 3 e 4), foi menor para os genótipos AM-PC Farias, Quitéria, Peruano, Hozan e Chonan, em que a porcentagem dos sintomas em cada avaliação ficou abaixo de 13,5% e, a porcentagem de plantas mortas totais ficou abaixo de 11,2%. Desses, apenas Hozan e Chonan ficaram agrupados no intervalo dos genótipos menos produtivos.

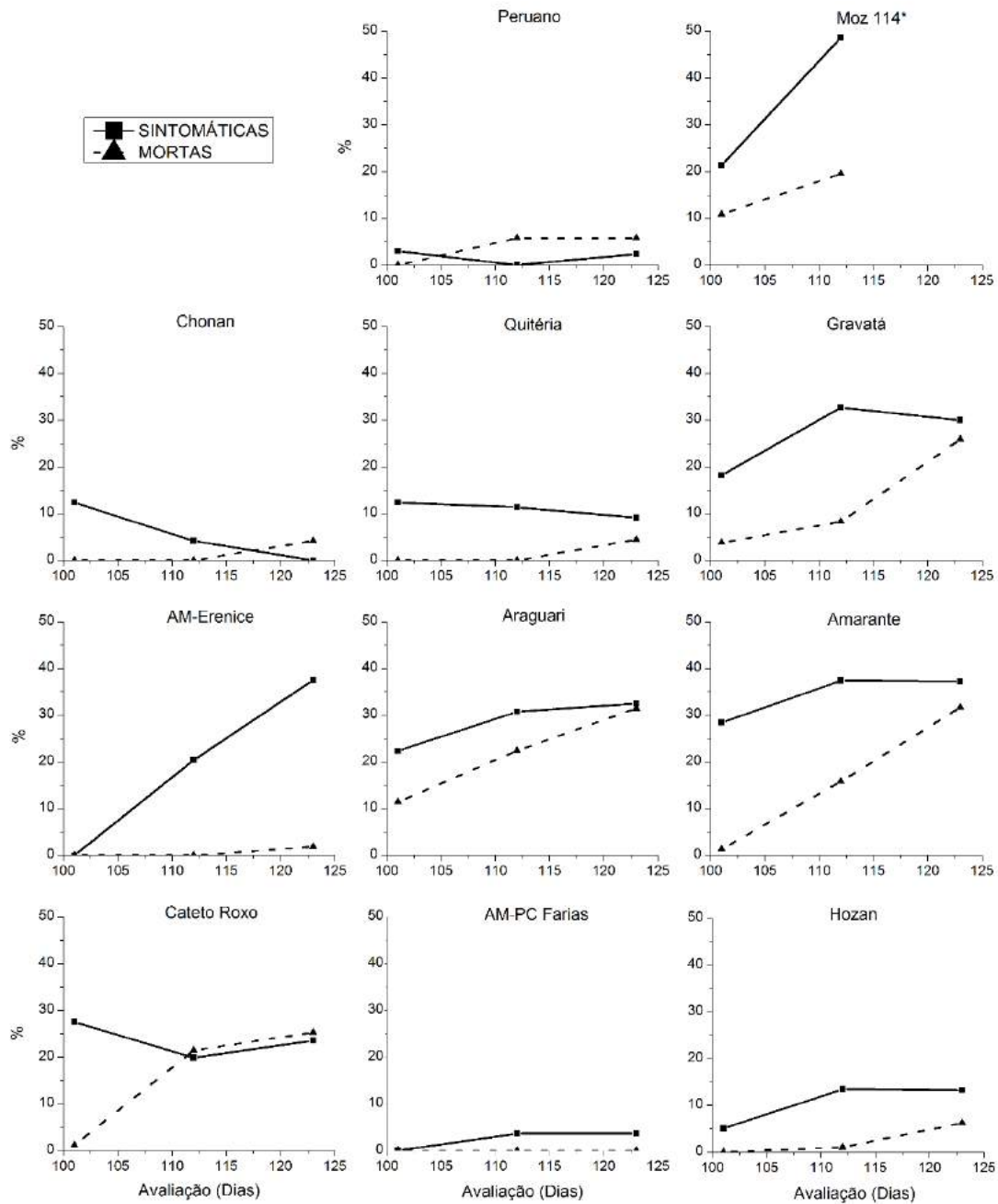


Figura 3: Porcentagem de plantas com sintomas do “amarelão do alho” e mortas, avaliadas aos 101, 112 e 123 dias após o plantio. *(Moz 114) não avaliado aos 123 dias.

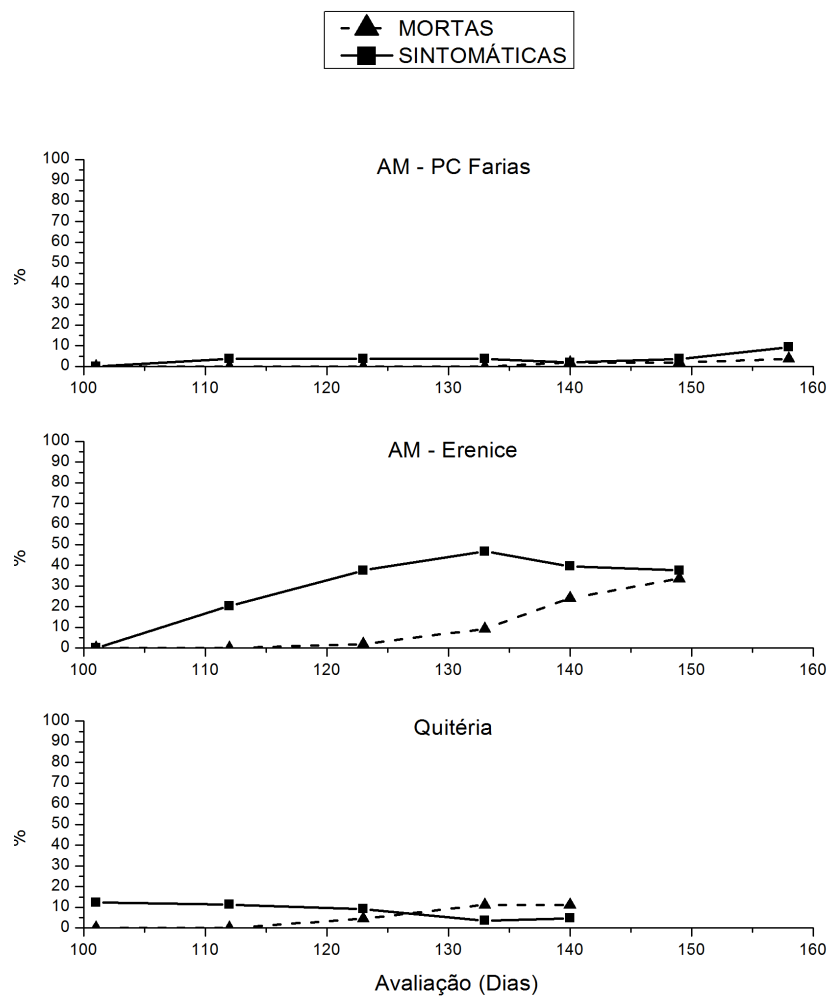


Figura 4: Porcentagem de plantas com sintomas do “amarelão do alho” e mortas, avaliadas aos 101, 112 e 123, 133, 140, 149 e 158 dias após o plantio, até a colheita. AM–Erenice não foi avaliado aos 158 dias e Quitéria não foi avaliado aos 149 e 158 dias.

O genótipo Gravatá, conforme visualizado na Figura 5, que apresentou elevados valores de número de nematoides por planta (Tabela 9), maior porcentagem de plantas sintomáticas e de plantas mortas (Figura 3 e 4) e valores intermediários de AACPD (Tabela 9), manifestou baixo rendimento por hectare (Tabela 8). Em contraponto, AM-PC Farias que apresentou baixa AACPD, incluído no grupo com menores valores percentuais de plantas sintomáticas e mortas, foi o material com maior produtividade. Na Figura 5, pode-se observar o estande desses genótipos em uma parcela representativa do experimento, em que os danos causados por *D. dipsaci* são visíveis.

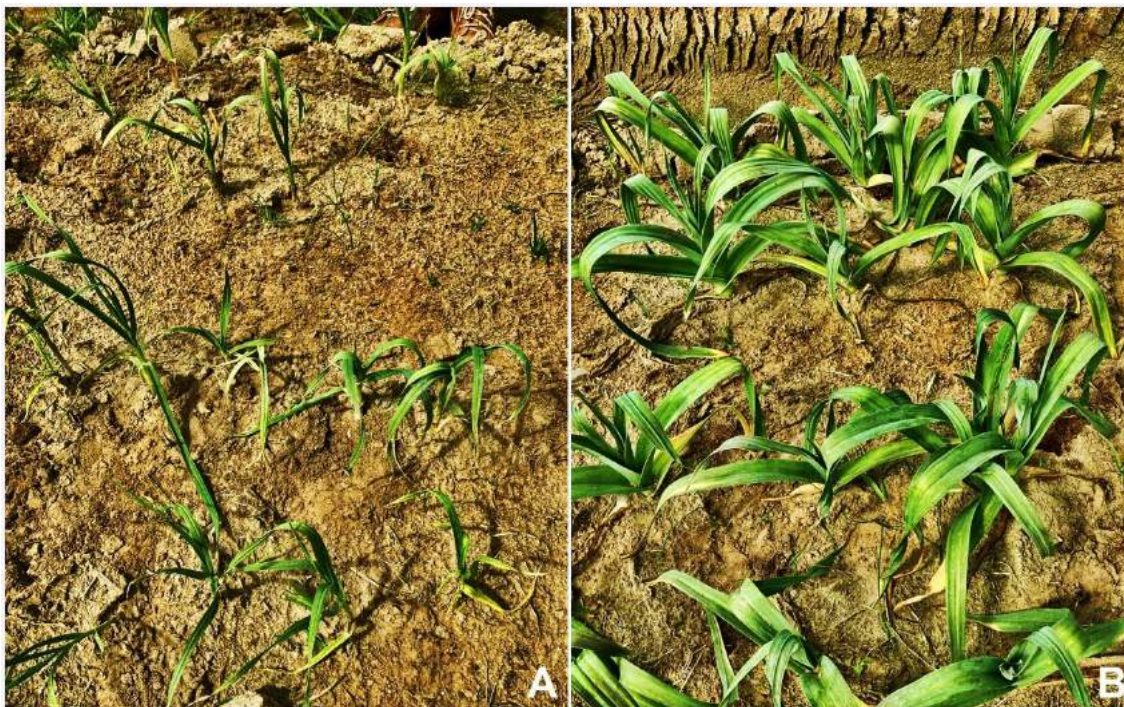


Figura 5: Genótipos em condições de campo naturalmente infestado por *D. dipsaci*, A- genótipo Gravata aos 101 dias após o plantio; B- genótipo AM-PC Farias aos 112 dias após o plantio.

Na tabela 10, são apresentados os níveis populacionais de *D. dipsaci* por grama de tecido da planta aos 101 dias após o plantio. Gravata e Moz 114 apresentaram os maiores níveis (≈ 3359 espécimes/g tecido), seguidos por um segundo grupo composto pelos genótipos Amarante, Cateto Roxo e Araguari (≈ 1576 espécimes/g tecido). Em um terceiro grupo, foram incluídos Chonan e AM-Erenice (≈ 565 espécimes/g tecido); e, um quarto grupo com menor densidade, foi formado por Quitéria, Peruano, AM-PC Farias e Hozan (≈ 25 espécimes/g tecido).

Tabela 10: Número de espécimes de *Ditylenchus dipsaci* g tecido (N/g tec) e número de nematoides por planta (N/planta) em genótipos de alho avaliados aos 101 dias após o plantio e número de nematoides por bulbo (cascas) em experimento conduzido em área naturalmente infestada pelo nematoide.

| Genótipo | N/g tec 101DAP | N/planta 101 DAP | Cascas | CV (%) |
|-----------------|-----------------------|-------------------------|---------------|---------------|
| Gravatá | 3.962,2 a** | 16.778 Aa | 8.068 Ba* | 21,44 |
| Moz 114 | 2.754,9 a | 3.893 Ab | 1.671 Ab | 34,68 |
| Amarante | 2.208,8 b | 7.456 Bb | 4.114 Aa | 49,14 |
| Cateto Roxo | 1.506,3 b | 7.740 Bb | 7.274 Aa | 28,06 |
| Araguari | 1.182,5 b | 6.342 Bb | 10.303 Aa | 33,55 |
| Chonan | 568,7 c | 1.060 Ac | 1.179 Ab | 35,27 |
| AM-Erenice | 564,7 c | 11.430 Ba | 4.575 Aa | 26,67 |
| Quitéria | 81,1 d | 361 Bd | 1.492 Ab | 46,33 |
| Peruano | 17,1 d | 120 Bd | 3.008 Ab | 61,60 |
| AM-PC Farias | 0,7 d | 10 Bd | 110 Ac | 62,67 |
| Hozan | 0,1 d | 1 Ad | 0,1 Ac | 22,62 |
| CV (%) | 39,35 | 37,61 | 55,31 | |

*Médias (transformadas em raiz x +1) seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de significância.

**Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamentos Scott-Knott ao nível de 5% de significância

Quando foram avaliados os níveis populacionais do nematoide por planta (parte aérea e bulbos) aos 101 dias após o plantio e nos bulbos (cascas) ao final do ensaio (colheita), verificou-se interação significativa entre os fatores (genótipo e período de avaliação) para ambas as variáveis (Tabela 10). Analisando-se as variáveis dentro do fator genótipo, na avaliação do número de nematoides por planta (N/planta), maior número de nematoides foi extraído dos genótipos Gravatá e AM-Erenice (14.104 espécimes/planta), seguido por Amarante, Cateto Roxo, Araguari e Moz 114. Um terceiro grupo foi formado por Chonan; e um último grupo, formado por Quitéria, Peruano, AM-PC Farias e Hozan os quais apresentaram as menores densidades (≈ 123 espécimes/planta).

Já na avaliação dos níveis populacionais de *D. dipsaci* nos bulbos, ao final do ensaio, ainda dentro do fator genótipo, em Gravatá, Amarante, Cateto Roxo, Araguari e AM-Erenice, foram encontrados os maiores níveis populacionais (≈ 6867 espécimes/bulbo), seguido por Moz 114, Chonan, Quitéria e Peruano (≈ 1836 espécimes/bulbo), e, um último grupo, composto por

AM-PC Farias e Hozan que apresentaram menores quantidades de nematoides nos bulbos (≈ 55 espécimes/bulbo) conforme a Tabela 10.

Quando se analisou os genótipos dentro dos períodos de avaliações, maiores níveis populacionais nas casacas dos bulbos, nos genótipos Moz 114, Chonan e Hozan não foram detectadas diferentes significativas entre os tratamentos; já para os genótipos Amarante, Cateto Roxo, Araguari, AM-Erenice, Quitéria, Peruano e AM-PC Farias, maiores quantidades de *D. dipsaci* foram verificadas nas cascas. Apenas em Gravatá maiores níveis populacionais foram observados no estágio vegetativo da planta.

Analisando-se as populações de *D. dipsaci* no solo, foram obtidos três agrupamentos para as variáveis população final (PF) e fator de reprodução (FR) do nematoide. (Tabela 11). As maiores populações finais e valores de FR obtidos no solo, foram observados nas parcelas cultivadas com os genótipos AM-Erenice e Cateto Roxo, onde *D. dipsaci* se multiplicou em média 150 vezes. O segundo grupo foi formado por Gravatá, Araguari e Amarante com FR médio de 98; e, um terceiro grupo constituído por Quitéria, Chonan, Peruano, AM-PC Farias, Hozan e Moz 114, foi aquele onde se observou os menores valores médios populacionais ($\approx 8,4$ espécimes/250cm³ solo/parcela) e de FR (4,5), cujo o último (Moz 114) foi o único genótipo onde o FR foi menos que 1, e assim, indicando resistência segundo a classificação de Oosrenbrink (1966).

Tabela 11: População inicial e final de *D. dipsaci* em 250cm³ de solo e fator de reprodução (FR) dos genótipos de alho, considerando apenas extração de solo.

| Genótipo | Pop. inicial | Pop. final | FR |
|-----------------|---------------------|-------------------|-----------|
| AM-Erenice | 2,4 ^{ns} | 571,39 a | 246,87 a* |
| Cateto Roxo | 1,8 | 452,83 a | 52,84 a |
| Gravatá | 1,6 | 333,50 b | 115,03 b |
| Araguari | 1,8 | 275,44 b | 91,16 b |
| Amarante | 2,2 | 153,83 b | 87,48 b |
| Quitéria | 1,6 | 21,89 c | 10,77 c |
| Chonan | 3 | 13,50 c | 5,75 c |
| Peruano | 1,8 | 9,17 c | 5,72 c |
| AM-PCF | 2,2 | 3,39 c | 2,94 c |
| Hozan | 1,6 | 2,13 c | 1,56 c |
| Moz 114 | 2,4 | 0,33 c | 0,2 c |
| CV(%) | 43,09 | 65,21 | 62,05 |

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamentos Scott-Knott ao nível de 5% de significância. ^{ns}não significativo a 5% de significância.

A partir da análise estatística multivariada de componentes principais (ACP), figura 6, foi possível reduzir a dimensionalidade dos dados obtidos no experimento a campo (2020), para todas as variáveis observadas. Cerca de 61,5% da variância dos dados foram representados em duas dimensões, onde foi possível verificar a correlação entre os autovetores, obtendo-se uma matriz apresentada na Figura 6. A matriz mostra a correlação entre as 18 variáveis, sendo positiva na cor azul e negativa na cor vermelha.

A produtividade e o peso de bulbos por planta, apresentam correlação negativa com os atributos nematoide x doença. O FR do nematoide avaliado no solo apenas, não apresenta correlação direta com as variáveis analisadas. Os níveis populacionais de nematoides (bulbo e PA) por planta e por tecido se correlacionam fortemente, pois derivam de uma mesma observação, o mesmo ocorre para as cascas, que apesar de positiva, não possuem forte correlações entre si. Quanto ao desenvolvimento da doença, a AACPD possui alta correlação com o percentual de plantas afetadas pelo nematoide, principalmente em avaliações próximas a colheita.

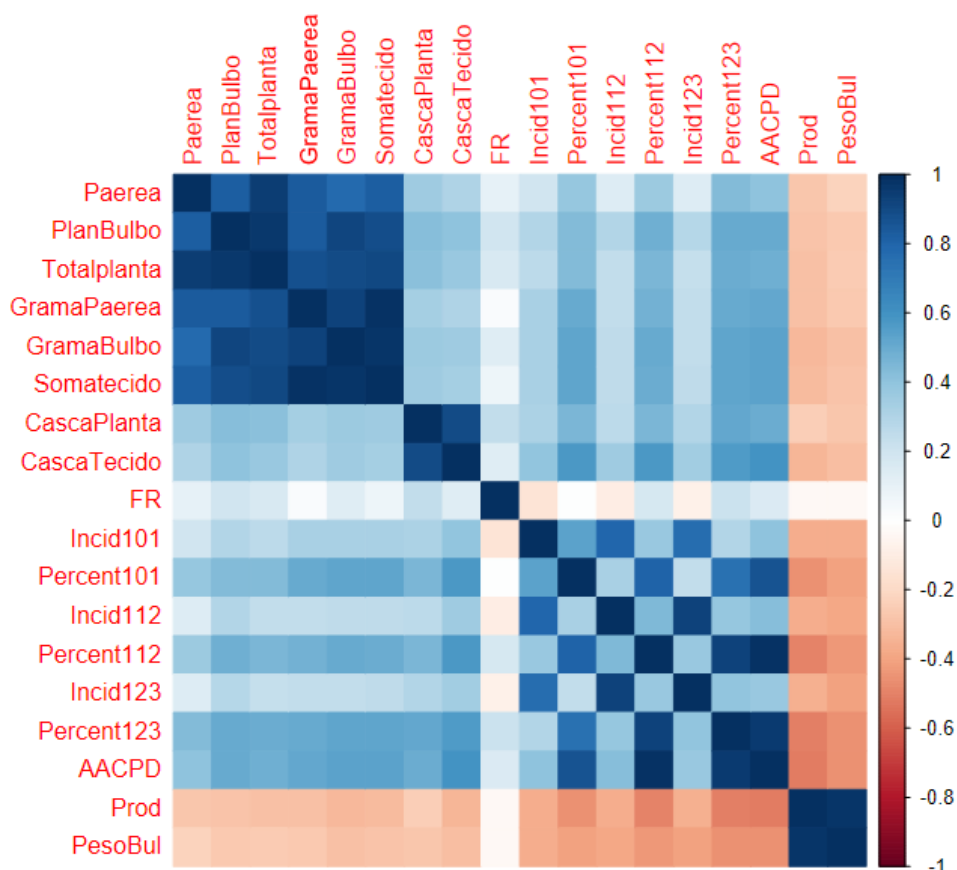


Figura 6: Matriz de correlação para análise dos componentes principais coletados no experimento a campo. Número de nematoides na parte aérea=Paerea; no bulbo=PlanBulbo; total na planta=Totalplanta; número de nematoides por grama de tecido na parte aérea=Gramapaerea; no bulbo=Gramabulbo; na planta=Somatecido; número de nematoides na casca por Planta=CascaPlanta; por grama de tecido de casca=CascaTecido; fator de reprodução no solo=FR, incidência da doença aos 101 dias após a semeadura=Inci101; aos 112 dias=Inci112; aos 123 dias=Inci123; Percentagem de plantas com sintomas ou mortas aos 101 dias após a semeadura=Perc101; 112 dias=Perc112; 123 dias=Perc123; Área abaixo da curva de progresso da doença=AACPD; produtividade ton/ha=Prod; peso de bulbo/planta=PesoBul.

3. 4 Discussão

De acordo com os resultados de reação dos genótipos de alho a *D. dipsaci*, em casa-de-vegetação, observados nesse estudo, Charchar et al. (2001) também verificaram resistência ($FR < 1,0$) de Quitéria, Peruano, Chinês Real e Hozan a *D. dipsaci* nas mesmas condições. Em outro trabalho, embora Charchar, Tenente e Aragão (2003) tenham verificado resistência genótipos

Peruan' e Hozan ao nematoide, observaram alta suscetibilidade de Chinês Real. Considerando-se os resultados aqui obtidos, para os genótipos Cateto Roxo e 'Gravatá' cuja reação foi de resistência no experimento de 2018 e suscetível em 2020, tais diferenças podem ser atribuídas a uma série de fatores como por exemplo a uniformidade de distribuição do inóculo do nematoide no momento da inoculação. Além disso, a dinâmica populacional de *D. dipsaci*, é fortemente influenciada pelas condições ambientais, principalmente umidade relativa e temperatura (PLOWRIGHT, CAUBEL & MIZEN, 2002) as quais podem variar bastante caso não sejam controladas.

Como relatado no Capítulo 1 do presente estudo, o número de espécimes ativos de *D. dipsaci* é alterada de acordo com a origem do material, seja ele seco (cascas do bulbo) ou fresco (plantas vegetativas). O número de espécimes totais (móveis e imóveis) ou móveis como população inicial (PI) inoculada nas plantas de alho em 2020, não interferiu na determinação de reação das cultivares embora tenha sido observada taxas de multiplicação em mais de dez vezes quando procedeu-se o cálculo do FR com base na população inicial de nematoides móveis. Isso sugere que poucos nematoides ativos são necessários para estabelecer uma infecção para classificar um genótipo (PLOWRIGHT, CAUBEL & MIZEN, 2002). Segundo esses autores cerca de 100 a 200 espécime de *D. dipsaci* são suficientes em experimentos de reação. No presente estudo apenas 7,3% era ativos, ou seja, de 1000 espécimes inoculadas, apenas 73 estavam móveis no momento da inoculação. Já em um estudo de Han e Cho (1980), os autores recuperaram maior nível populacional de *D. dipsaci* em alho inoculado com 50 espécimes em comparação com densidades de até 1.000 nematoides. Menores níveis de inóculo normalmente resultam em maiores valores de FR conforme verificado por SCHAFFER (2015) no patossistema batata x nematoide das galhas.

Nos ensaios de campo conduzidos em área infestada pelo nematoide do amarelão (2020), os genótipos foram extremamente afetados pelo nematoide, tanto na produtividade, quanto no peso do bulbos (Tabela 8), confirmando-se tal severidade pelos níveis populacionais de *D. dipsaci* verificados nas plantas (Tabelas 10) e no solo (Tabela 11). Com base nesses, resultados sugere-se que os genótipos com maiores densidade populacionais aos 101 dias após o plantio, também apresentaram baixa produtividade por hectare e peso de

bulbos reduzido, dentre eles: Cateto Roxo, Amarante, Araguari, Gravatá e Moz 114. O genótipo AM-Erenice, embora tenha apresentado a segunda maior produtividade, também multiplicou muito o nematoide. Esses valores se devem provavelmente por pertencer a outra espécie (*Allium ampeloprasum*) que é mesma de AM-PC Farias cujos bulbos são maiores, mantendo elevada a produção quando comparado com os demais genótipos.

O elevado número de *D. dipsaci* recuperados do tecido do alho pode ser atribuída ao tempo de geração do nematoide no hospedeiro para completar um único ciclo, sendo de 19 a 23 dias. Os genótipos que apresentaram elevada população no tecido aos 101 dias refletiram no maior desenvolvimento dos sintomas da doença e a morte de plantas, sendo eles Moz 114, AM-Erenice, Amarante, Araguari, Gravatá e Cateto Roxo. Estes tiveram alta população também nas cascas dos bulbos colhido ao final do ciclo, resultando no menor peso por bulbo e produtividade. A alimentação e o movimento de *D. dipsaci* causa danos à no parênquima e na lamela média das folhas, afetando negativamente o crescimento da planta, que tende a diminuir as taxas de absorção e movimentação de água e nutrientes. Esta redução no crescimento resulta, conseqüentemente, em pesos frescos e secos reduzidos (IVES, 2019).

A resistência de espécies de plantas a nematoides fitoparasitas pode ser vista como a capacidade do hospedeiro de interromper a reprodução do nematoide (TRUDGILL, 1991). Considerando a população inicial extraída do solo, apenas o genótipo Moz 114 teve FR menor que 1. No entanto, esse genótipo apresentou elevada população de nematoides em seus tecidos, principalmente nas cascas do bulbo após a colheita. É necessário um método padrão para calcular e relatar o FR de *D. dipsaci* e, conseqüentemente, determinar o status de hospedeiro de uma cultura ou cultivar. Isso é especialmente importante para espécies de plantas onde há uma grande população de nematoides na planta, mas uma baixa população no solo e vice-versa (IVES, 2019).

Embora Sikora et al. (2018) estabeleça o limiar de dano econômico para o alho em aproximadamente 5 espécimes/250cm³ de solo, os menores níveis populacionais detectados no experimento de campo, verificados nesse estudo, evidenciaram que elevados prejuízos podem ocorrer com níveis de 1,6 a 3

espécimes /250cm³. Segundo Ives (2019) o limiar de dano de *D. dipsaci* em aliáceas no Canadá é de aproximadamente 25 espécimes/250cm³.

Considerando-se os menores valores de FR de *D. dipsaci* obtidos em casa-de-vegetação, juntamente com os resultados a campo de índices populacionais de nematoides nas plantas, percentual de plantas com sintomas, AACPD e valores de FR do nematoide do solo, ao final do ciclo da cultura, Quitéria, Peruano, AM-PC Farias, Chinês Real, Hozan, Chonan e Moz 114 poderiam ser indicadas para plantio em área infestada por *D. dipsaci*. No entanto, considerando-se produção e baixos índices populacionais de *D. dipsaci*, apenas AM-PC Farias, Quitéria e Hozan seriam os mais indicados para plantio em locais infestados. De acordo com Starr, Cook e Bridge (2002), apesar de caracterizada como potencial de inibir a reprodução do nematoide, ao se trabalhar com resistência do hospedeiro, o rendimento deve ser a principal prioridade. Assim, esse é o primeiro estudo conduzido a nível mundial em condições de campo interrelacionando todas essas variáveis por hora discutidas no presente estudo com aplicação prática para recomendação à cadeia produtiva do alho.

Em programas de rotação de alho com outras culturas não hospedeiras do nematoide, poderiam ser usados os genótipos Chonan e Peruano, mas com os devidos cuidados em função da multiplicação do nematoide. Pois se usado com frequência os genótipos que aumentam de forma exagerada a população de *D. dipsaci*, o cultivo de alho em área infestada torna-se inviável em pouco tempo. As rotações das culturas também podem diminuir o potencial de perdas substanciais de produção e fornecer pelo menor supressão a curto prazo das densidades populacionais de nematoides (STARR, COOK & BRIDGE, 2002).

Mais pesquisas são necessárias para entender os mecanismos bioquímicos associados à suscetibilidade do alho ao *D. dipsaci*, uma vez que não há trabalhos disponíveis referentes a esse tema. Nesse sentido, estudos nessa linha podem contribuir grandemente para o melhor entendimento desse patossistema.

3.5 Conclusões

Existem genótipos de alho resistentes a *D. dipsaci* em condições de casa-de-vegetação e de campo, sendo os genótipos AM-PC Farias, Quitéria e Hozan os materiais que multiplicam menos o nematoide levando-se em consideração os níveis populacionais das plantas em desenvolvimento vegetativo, nos bulbos colhidos e no solo.

A produção de alho em área infestada pelo nematoide do amarelão é fortemente influenciada pela resistência das cultivares ao patógeno.

4 CAPÍTULO III - Primeiro relato de ocorrência de *Meloidogyne ethiopica* parasitando plantas de alho no Brasil.

4. 1 Introdução

Entre os nematoides que afetam a cultura do alho (*Allium sativum*), *Ditylenchus dipsaci*, *Aphelenchoides* spp., *Mesocriconema*, *Helicotylenchus*, *Pratylenchus zaei*, *Pratylenchus penetrans*, *Paratichodorus minor*, *Rotylenchus reniformis* e *Tylenchus* spp., são relatados no Brasil e no mundo, cujo primeiro é considerado de maior importância da cultura por causar perdas que podem chegar a 100% (CHARCHAR, 2001; MOHAMED, 2015; PINHEIRO, 2017; SIKORA et al., 2018).

Outros fitonematoides como *Belonolaimus longicaudatus*, *Ditylenchus destructor* e *Meloidogyne Chitwoodi* também são relatados e agressivos ao alho, porém, são consideradas como pragas quarentenárias ausentes para o Brasil (MAPA, 2021). Algumas espécies de nematoides de galhas como *M. incognita* são parasitas na cultura em diferentes regiões do globo, porém não há relatos sobre quantificação de perdas associadas (SIKORA et al., 2018). Adicionalmente, na Índia, Gupta e Pandey (2018) relataram o parasitismo de *M. graminicola* em plantas de alho com sintomas de amarelecimento, secagem da extremidade das folhas e galhas na ponta das raízes, cuja ocorrência foi detectada em área de cultivo de arroz previamente infestada com o nematoide.

Uma série de espécies de *Meloidogyne* tem sido relatada causando danos em hortaliças com potencial de danos em cucurbitáceas, solanáceas, brassicáceas dentre plantas de outras famílias botânicas de importância econômica no Brasil e no mundo. Nesse sentido, há ameaça crescente de espécies altamente prejudiciais para culturas vegetais, como: *M. chitwoodi*, *M. enterolobii*, *M. floridensis* e *M. ethiopica* (SIKORA et al., 2018). No Brasil, *M. enterolobii* e *M. ethiopica* estão associados a diversas hortaliças causando prejuízos econômicos, principalmente em repolho, pimentão, alface, pepino, tomate, batata, batata-doce e melão (CARNEIRO & ALMEIDA, 2005; CARNEIRO et al., 2007; CARNEIRO, 2014; MEDINA et al., 2014; BELLÉ et al., 2017a; SILVA et al., 2021).

Recentemente, uma área de produção de alho do município de Cristalina, em Goiás, exibindo plantas debilitadas com sintomas de atrofiamento e galhas nas raízes, foi detectada com danos causados pelo nematoide das galhas. Para tanto, amostras de plantas e de solo foram coletadas no local e encaminhadas à Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, para processamento, quantificação e diagnóstico bioquímico, morfológico e morfométrico da(s) espécie(s) associada(s).

4. 2 Material e Métodos

Em Agosto de 2019, plantas de alho da cultivar BRS Hozan, exibindo sintomas de atrofiamento e galhas nas raízes (Figura 7A e B), foram detectadas e coletadas em plantios comerciais do cinturão verde de Cristalina-GO (-16°46'S; -47°36'O). Amostras das plantas com sintomas, juntamente com solo foram enviados ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS). Primeiramente, parte das raízes das plantas foram processadas para quantificação de nematoides pelo método de Hussey & Barker modificado por Boneti & Ferraz (1981); e, a seguir, o solo amostrado foi processado para quantificação dos níveis populacionais dos nematoides pelo método de Jenkins (1964).

Fêmeas individuais adultas branco leitosas de *Meloidogyne*, extraídas das amostras de raízes, foram submetidas à eletroforese em placas de gel de poliacrilamida 7% (Carneiro & Almeida, 2001) para caracterização bioquímica da espécie utilizando-se a isoenzima esterase. Fêmeas de *M. javanica* (Est J3) foram incluídas como padrão para cálculo da mobilidade relativa (RM) das bandas esterásticas identificadas.

Após a caracterização bioquímica das fêmeas extraídas as respectivas massas de ovos, individuais, foram inoculadas em tomateiros (cv. Santa Cruz) e em plantas de alho (cv. BRS Hozan), mantidos em subcultura periódica em casa-de-vegetação para estudos complementares com base na morfologia de região perineal das fêmeas e, morfometria de juvenis de segundo estágio (J2) e de machos adultos. Nesse sentido, 15 fêmeas adultas foram retiradas das raízes para realização de cortes perineais em ácido láctico a 45% os quais foram montados em glicerina, de acordo com Taylor & Netscher (1974), sendo,

a seguir, foram fotografados em microscópio de luz nas objetivas de 60X e 100X, utilizando o Software LAS Core para posterior comparação com as espécies descritas na literatura.

Paralelamente, plantas de tomate infectadas com a população do nematoide, foram submetidos a borbulhamento constante em Becker com água por uma semana, recolhendo-se diariamente os machos obtidos (CARNEIRO et al., 2004). Massas de ovos retiradas das raízes foram incubadas a temperatura ambiente em água para eclosão do juvenis de segundo estágio (J2). A seguir, os machos e os J2 obtidos, foram fixados em formaldeído a 1% para confecção de lâminas temporárias e, a seguir, fotografados em microscópio nas objetivas de 40X, 60X e 100X, para mensuração dos parâmetros morfométricos, relacionados nas Tabelas 1 e 2, utilizando-se o Software LAS Core.

A partir do inóculo puro da espécie identificada, mantido em plantas de tomateiro e alho (Figura 7D), procedeu-se ao teste de patogenicidade em plantas da cultivar BRS Hozan em casa-de-vegetação a $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Vasos individuais de 3Kg contendo solo esterilizado, mantendo uma planta por vaso, foram inoculados com 5000 ovos e J2, utilizando-se oito repetições. Plantas de alho da mesma cultivar não inoculados, foram incluídas para avaliação do impacto do nematoide sobre as plantas. Plantas de tomateiro (cv. Santa Cruz), foram incluídas para verificação da viabilidade do inóculo.

Decorridos 60 dias da inoculação, as plantas serão avaliadas quanto ao peso da massa fresca total, de bulbo, da parte aérea e das raízes, diâmetro do bulbo, número de galhas. Posteriormente, as raízes de cada planta serão processadas conforme Hussey e Barker modificado por Boneti & Ferraz (1981), para contagem do número de nematoides em câmara de Peters (1mL) com auxílio de microscópio de luz, estimando-se a população final (Pf) em cada planta. O cálculo do FR será procedido pela divisão da Pf pela população inicial (Pi), onde, $\text{FR}=(\text{Pf}/\text{Pi})$ e avaliação de suscetibilidade segundo Oostenbrink (1966), onde $\text{FR}<1,0$ indica resistência e $\text{FR}>1,0$ suscetibilidade do genótipo.

4.3 Resultados e Discussão

Nas amostras coletadas a campo (Figura 7A e B), verificou-se uma média de 230 J2 do nematoide das galhas/10g de raízes, enquanto no solo a densidade foi de 46 J2/250cm³. Com base nas análises de isoenzimas das fêmeas caracterizadas bioquimicamente, foi possível identificar o fenótipo de esterase E3 (Ki3) (Rm: 0.91, 1.06, 1.20), típico de *M. ethiopica* (Figura 7C), sendo o caráter mais útil para a diferenciação de rotina de *M. ethiopica* de outras espécies de nematoide das galhas, visto que é espécie-específico (Carneiro et al., 2004).

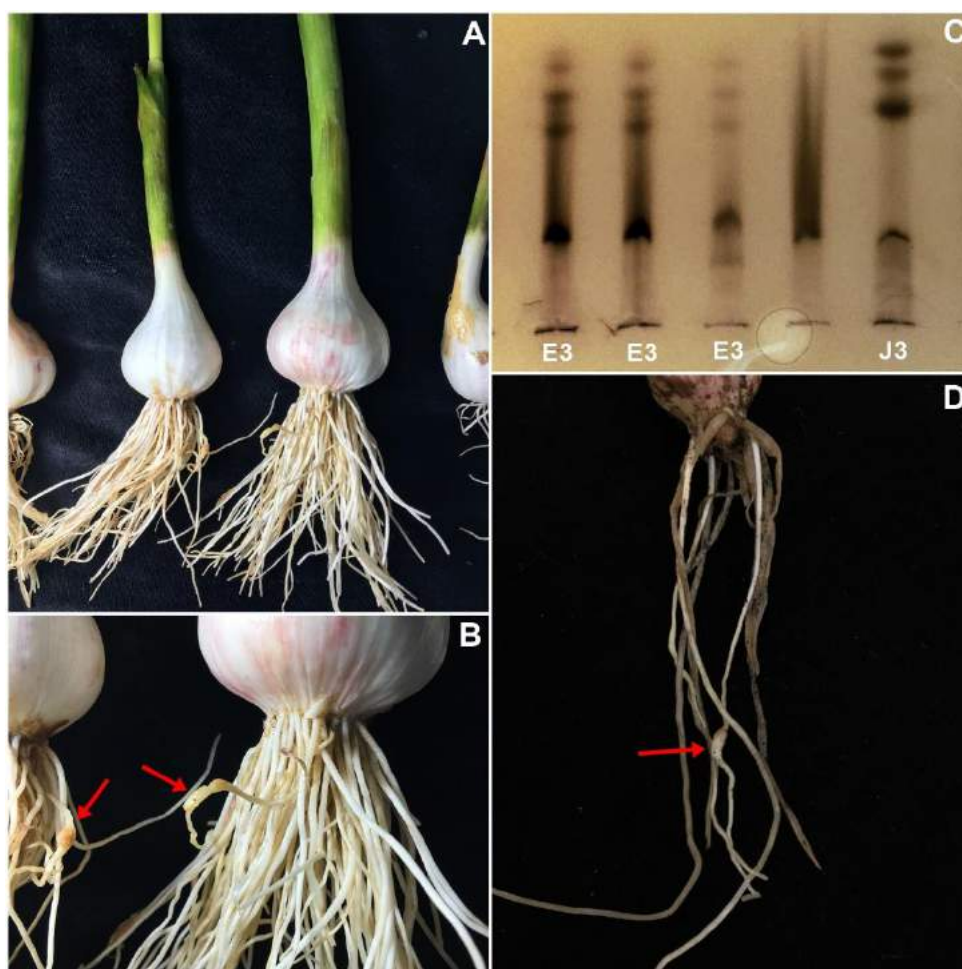


Figura 7: A, B e D – Genótipo de alho da cv. BRS Hozan apresentando sintomas de galhas, coletado em Cristalina-GO (A e B) e inoculado em casa-de-vegetação (D); C – Fenótipo de esterase de *Meloidogyne ethiopica* (E3) extraídos de raízes de alho e o padrão J3 (*M. javanica*).

De acordo com as mensurações e fotomicrografias dos corte perineais das fêmeas, verificou-se que os padrões, demonstram variações para a espécie.

De uma forma geral, os padrões perineais apresentaram arco dorsal moderadamente alto a alto, arredondado a quadrado, nunca formando "ombros", com estrias grossas, amplamente separadas, lisas a onduladas, ocasionalmente com estrias verticais curtas, apresentando variação de *M. arenaria* a *M. incognita* conforme descrito por Carneiro et al. (2004), tornando a identificação apenas por essa técnica imprecisa. No entanto, de acordo com a Figura 8, verificou-se menores distâncias entre os fasmídeos no padrão encontrado, típico de *M. ethiopica*, conforme já referido no Brasil e em outros trabalhos com populações da mesma espécie (SOMAVILLA et al., 2011; BELLÉ et al., 2017a; BELLÉ et al., 2017b).

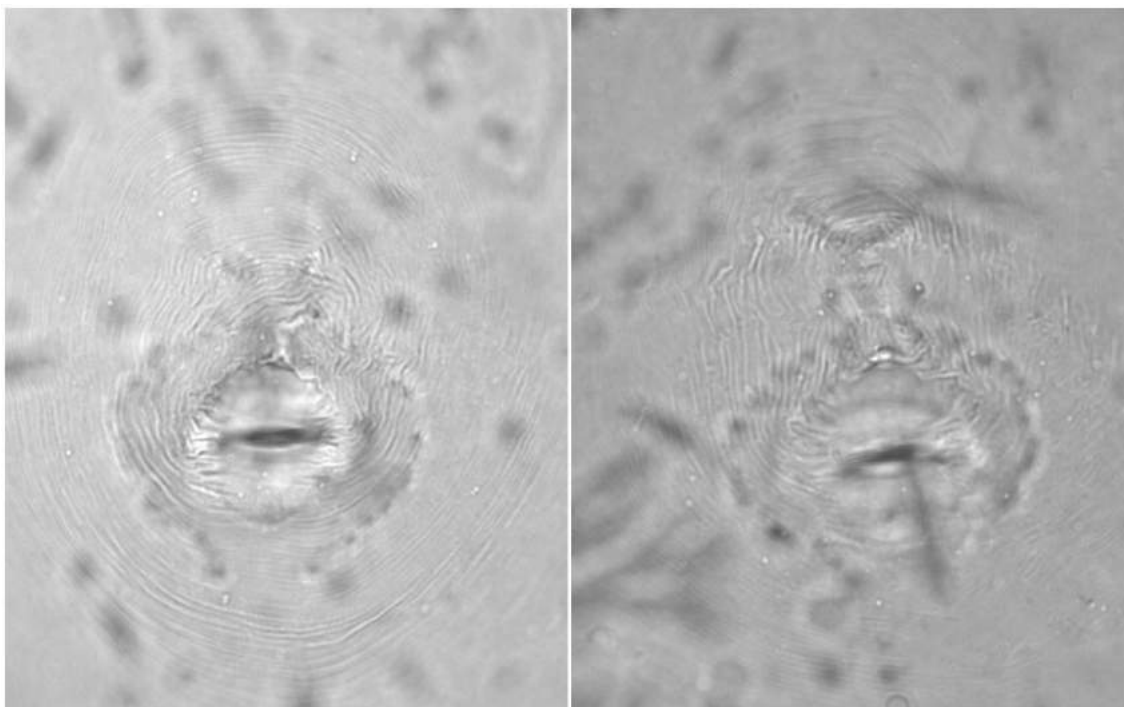


Figura 8: Cortes perineais de fêmeas de *M. ethiopica* mantidas em subcultura periódica de tomate cv. Santa Cruz, isoladas a partir de massas de ovos de raízes de alho.

Nas Tabelas 12 e 13, são apresentados os caracteres morfométricos de J2 e machos adultos de *M. ethiopica* mensurados no presente estudo, e os valores da primeira descrição de *M. ethiopica* por Whitehead (1968) e sua redescricao por Carneiro et al. (2004).

Quando comparados, os dados morfométricos e alométricos dos J2 mensurados (Tabela 12), os valores de comprimento e maior largura do corpo, estilete, DGO, comprimento da extremidade anterior ao poro excretor,

comprimento da cauda hialina e “a”, correspondem com os dados de redescrição de Carneiro et al. (2004), em exceção do comprimento da cauda ($47,6 \pm 2,6 \mu\text{m}$) que embora semelhante a descrição de Whitehead ($47 \pm 2 \mu\text{m}$), é menor que os valores observados por Carneiro ($62 \pm 0,6 \mu\text{m}$). O mesmo ocorre para os valores de “c” ($7,9 \pm 0,4 \mu\text{m}$), os quais corresponderam a descrição de Whitehead ($8,8 \pm 0,4 \mu\text{m}$), cuja ponta da cauda se apresentava finamente arredondada a pontiaguda (Figura 9). Adicionalmente, os valores de b_1 , apresentam similaridade com a descrição da espécie, não sendo apresentado no trabalho de Carneiro.

Tabela 12: Dados morfométricos (μm) de juvenis de segundo estágio (J2) descritos por diferentes autores [Whitehead (1968); Carneiro et al. (2004)] e realizados no presente estudo. Médias seguidas de \pm desvio padrão (intervalo).

| | Whitehead | Carneiro et al. | Presente estudo |
|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| N | 25 | 30 | 20 |
| Comprimento do corpo | 410 ± 12 (383-432) | 468 ± 3 (326-510) | $377,1 \pm 17,7$ (342,7-401,6) |
| Maior largura do corpo | - | $20 \pm 0,3$ (15-22) | $14,9 \pm 1,2$ (13,3-17,3) |
| Estilete | $10,0 \pm 0,5$ (9,1-10,9) | $12,2 \pm 0,1$ (11-14) | $12,1 \pm 0,7$ (10,5-13,3) |
| DGO | - | $2,6 \pm 0,1$ (2-3) | $2,8 \pm 0,2$ (2,1-3,1) |
| Extrem. ant. ao poro excretor | - | $93 \pm 0,9$ (75-106) | $73,2 \pm 5,0$ (63,1-81,3) |
| Comprimento da cauda | 47 ± 2 (41-52) | $62 \pm 0,6$ (52-72) | $47,6 \pm 2,6$ (42,8-54) |
| Comp. da cauda hialina | - | $13,5 \pm 0,2$ (12-15) | $12,9 \pm 1,4$ (10,5-14,7) |
| a | $32,2 \pm 1,3$ (29,1-34,7) | $24 \pm 0,3$ (21,3-28,2) | $25,5 \pm 2,1$ (22,5-29,1) |
| b_1 | $7,7 \pm 0,3$ (7,1-8,5) | - | $7,2 \pm 0,3$ (6,6-7,8) |
| c | $8,8 \pm 0,4$ (8,1-9,8) | $4,8 \pm 0,8$ (3,9-6,4) | $7,9 \pm 0,4$ (7,3-8,7) |

N: número de nematoides mensurados; DGO: distância entre a base do bulbo do estilete e a abertura da glândula esofagiana; a: comprimento do corpo / maior largura do corpo; b_1 : comprimento do corpo / comprimento da região anterior ao meio do bulbo mediano; c: comprimento do corpo / comprimento da cauda.

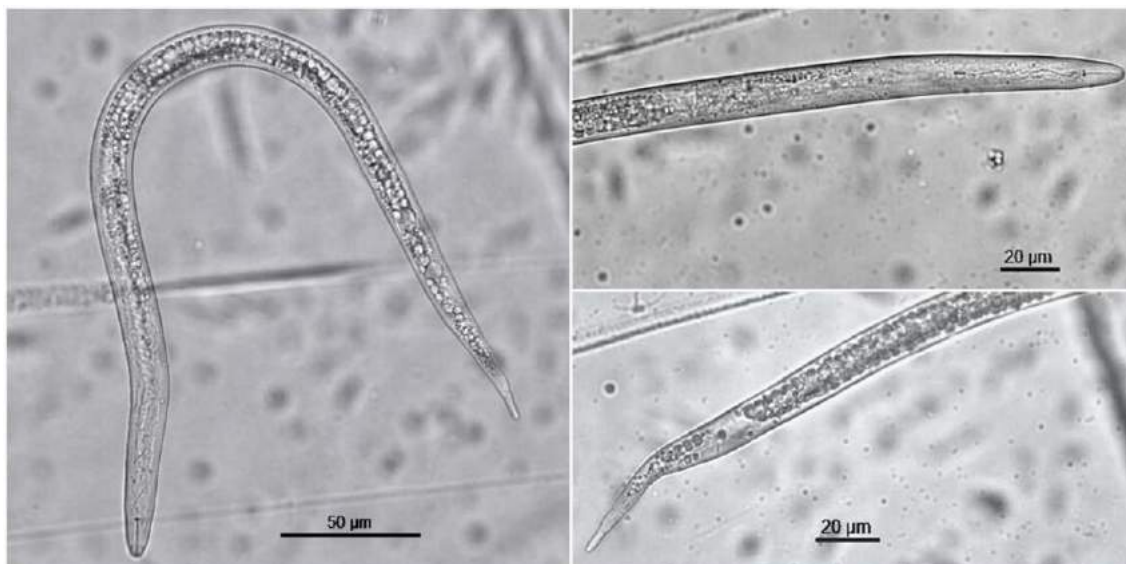


Figura 9: Fotomicrografias de Juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne ethiopica* mensurados no presente estudo.

Com relação aos dados morfométricos e alométricos dos machos (Figura 10), apresentados na Tabela 13, os valores observados estão de acordo com os descritos por Whitehead para comprimento do corpo, estilete, gubernáculo e espícula. Já para largura do bulbo do estilete ($4,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$), os valores estão um pouco acima dos observados nos trabalhos aqui comparados (média de $4,3 \mu\text{m}$ para ambos). O intervalo de “c” ($69,5\text{-}106,4 \mu\text{m}$) está relacionado com aquele observado por Carneiro ($69,5\text{-}147,2 \mu\text{m}$); no entanto, o comprimento da cauda é maior ($19,9 \mu\text{m}$) que aquele descrito por Carneiro ($13,4 \mu\text{m}$).

Tabela 13: Dados morfométricos (μm) de machos descritos por diferentes autores [Whitehead (1968); Carneiro et al. (2004)] e realizados no presente estudo. Médias seguidas de \pm desvio padrão (intervalo).

| | Whitehead | Carneiro et al. | Presente estudo |
|------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| N | 25 | 30 | 20 |
| Comprimento do corpo | 1556 ± 274 (831-2101) | 1171 ± 48 (890-1500) | $1681,7 \pm 127,7$ (1399,5-1861,7) |
| Maior largura do corpo | - | $48 \pm 0,8$ (32-59) | $43,8 \pm 4,8$ (35,5-54,3) |
| Estilete | $21,4 \pm 1,88$ (14,4-24,1) | $24,8 \pm 0,6$ (23-27) | $20,1 \pm 1,0$ (18-21,6) |
| DGO | - | $2,5 \pm 0,1$ (2-3,5) | $2,8 \pm 0,4$ (2,3-3,4) |
| Largura bulbo estilete | $4,3 \pm 0,44$ (3,6-5,0) | $4,3 \pm 0,6$ (3,5-5) | $4,9 \pm 0,3$ (4,3-5,4) |

| | | | |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Altura bulbo estilete | - | 3,3 ± 0,1 (3-4) | 3,1 ± 0,2 (2,6-3,5) |
| Gubernáculo | 9,0 ± 1,00 (7,2-10,1) | - | 8,4 ± 0,7 (7,2-9,5) |
| Espícula | 33,4 ± 2,20 (28,8-36,0) | 39 ± 0,6 (34-42) | 28,6 ± 2,1 (25,4-32,5) |
| a | 47,4 ± 7,96 (34,0-61,9) | 27,7 ± 0,8 (24,8-31) | 38,8 ± 4,1 (33,3-47,3) |
| c | 103 ± 24,6 (61-168) | 114 ± 12,2 (69,5-147,2) | 84,8 ± 8,3 (69,5-106,4) |
| Comprimento da cauda | - | 13,4 ± 0,5 (10,2-17,0) | 19,9 ± 2,1 (15,6-23,7) |
| Larg. bulbo/Altu. bulbo | - | 1,3 ± 0,2 (1,1-1,5) | 1,6 ± 0,1 (1,4-1,9) |

N: número de nematoides mensurados; DGO: distância entre a base do bulbo do estilete e a abertura da glândula esofagiana; a: comprimento do corpo / maior largura do corpo; c: comprimento do corpo / comprimento da cauda.

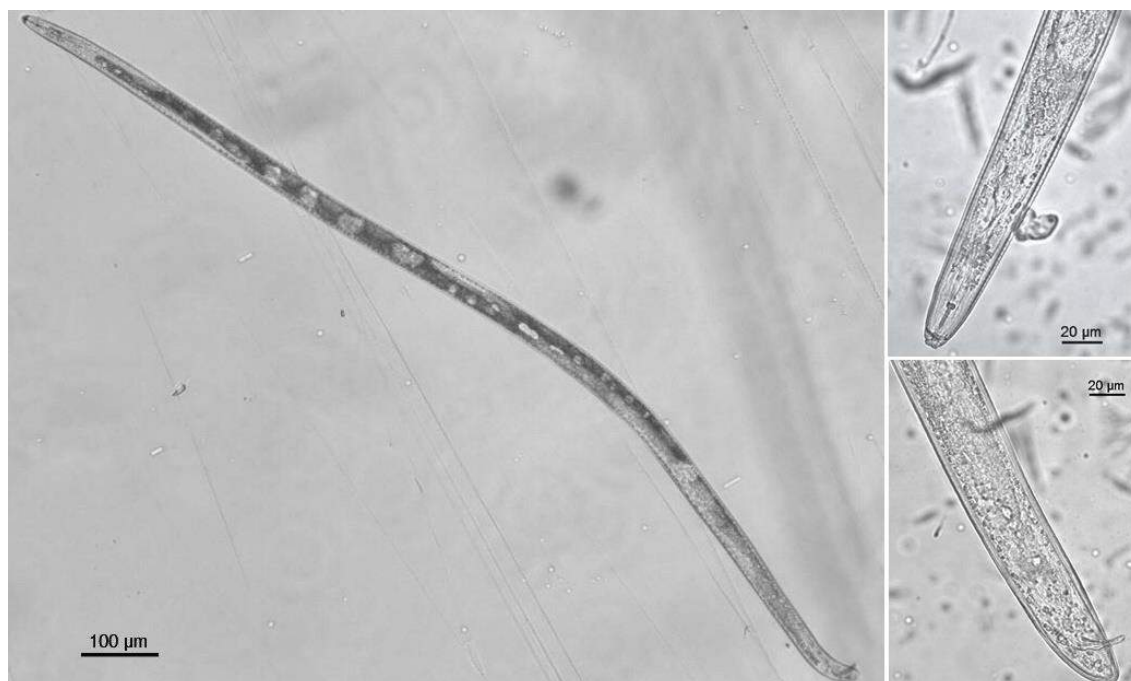


Figura 10: Fotomicrografia de Macho de *Meloidogyne ethiopica* mensurado no presente estudo.

Embora em estudo realizado por Correa et al. (2014), os autores tenham identificado um marcador SCAR-PCR espécie-específico para o diagnóstico de diferentes populações de *M. ethiopica* provenientes do Brasil e do Chile, tal técnica não foi utilizada nesse estudo uma vez que o fenótipo de esterase (E3) é espécie-específico e suficiente para a caracterização de *M. ethiopica*.

No Brasil, *M. ethiopica* foi relatado pela primeira vez em 2000 em plantas de quivi (*Actinida deliciosa*), no estado do Rio Grande do Sul, onde o fenótipo de esterase foi nomeado inicialmente de Ki3 e, logo descrito como E3 (CARNEIRO et al., 2000; CARNEIRO et al., 2004). A seguir, esse mesmo fenótipo foi relatado em diferentes estado do país e em várias culturas de importância econômica como soja (*Glycines max*) em São Paulo (CASTRO et al., 2003), cana-de-açúcar (BELLÉ et al., 2017b), feijão-comum (BELLÉ et al., 2017c), em fumo (*Nicotiana tabacum*) no Rio Grande do Sul (GOMES et al., 2005). Além relatos de sua associação com plantas daninhas como, corda-de-violão (*Ipomoea purpurea*), azedinha (*Oxalis corniculata*) e em guanxuma (*Sida rhombifolia*), no Rio Grande do Sul (GOMES et al., 2005; BELLÉ et al., 2019) e inúmeras outras que hospedam o nematoide (BELLÉ et al., 2020).

Como mencionado, *M. ethiopica* é considerado importante no Brasil em várias hortaliças, frutíferas e culturas anuais, sendo um nematoide de grande polífagia, motivo pelo qual foi inserido na lista de alerta da EPPO-2011 (para o país), assim como para o Chile e o Continente Africano (SIKORA et al., 2018). No Brasil, *M. ethiopica* ocorrem em diversas hortaliças como, tomate, yacon (CARNEIRO & ALMEIDA, 2005), batata (MEDINA et al., 2014), mandioquinha-salsa (PINHEIRO, 2017), além de poder parasitar e se multiplicar em outras hortaliças como, couve, brócolis, pepino e repolho, berinjela, abóbora e abobrinha (CARNEIRO, 2014).

Esse é o primeiro relato de *M. ethipoca* em alho no Brasil e no mundo. No entanto, para se inferir sobre a agressividade dessa espécie na cultura do alho e, prospectar medias de manejo, demanda-se a realização de trabalhos relacionados à resistência genética dos genótipos tanto em casa-de-vegetação como a campo haja vista, *M. ethipoca* ser uma espécie distribuída em diferentes regiões do país, apresentar ampla gama de hospedeiros, de ocorrência dedes clima mais ameno a quente, e, assim, adaptável as condições climáticas onde ocorre o cultivo de alho.

4.4 Conclusão

Registra-se pela primeira vez, a ocorrência do nematoide das galhas *Meloidogyne ethiopica* em alho, no Brasil.

Conclusões Gerais

A eficiência na recuperação do número de espécimes de *Ditylenchus dipsaci* de alho varia em função do material vegetal (fresco ou seco) utilizado e do método de extração utilizado e viabilidade (ativos e inativos) do nematoide está relacionada apenas ao material vegetal utilizado (fresco/plantas ou seco/bulbos).

Existem genótipos de alho resistentes ao nematoide do amarelão que em condições de campo, são menos afetados quanto a produção em áreas infestadas por *D. dipsaci*, os quais podem ser usadas em programas de manejo da praga.

A espécie do nematoide das galhas *Meloidogyne ethiopica* parasita a cultura do alho no Brasil, sendo esse o primeiro relato ao nível mundial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROFIT (2021). Sistema de agrotóxicos fitossanitários. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 09 de março de 2021.
- ARAÚJO, N. M. de et al. A Cultura. In: NICK, Carlos; BORÉM, Aloízio (Ed.). Alho: do plantio à colheita. Viçosa, MG: Ed. UFV, v., p. 9-14. 2017.
- ATHAYDE, J. T.; SANTOS, Á. F. dos. *Ditylenchus dipsaci* em alho no estado do Espírito Santo. **Comunicado técnico**, ENCAPA, n. 23, p. 1-4, nov. 1983.
- BAERMANN, G. Eine einfache methode zur auffindung von ankvlostomum (nematoden) larven in erdproben. Tijdschr. Ned. Indie, v.57, p.131-137. 1917.
- BARRETT, J. Metabolic responses to anabiosis in the fourth stage juveniles of *Ditylenchus dipsaci* (Nematoda). **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, v. 216, n. 1203, p. 159-177, 1982.
- BECKER, W. F. Controle do nematoide do alho *Ditylenchus dipsaci* em solo infestado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasilia, v.16, n. 1, p. 64-67, 1990.
- BECKER, W. F. Ocorrência do nematoide *Ditylenchus dipsaci* em cultivo de cebola em sucessão ao alho, no Planalto Catarinense. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.6, n.1, p.44-46, 1993.
- BELLÉ, C.; KASPARY, T. E.; GROTH, M. Z.; COCCO, K. L. T. *Meloidogyne ethiopica* parasitizing melon fields in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Journal of Plant Diseases and Protection**, 124(4), 393-397. 2017a.
- BELLÉ, C.; LIMA-MEDINA, I.; CARNEIRO, R. M. D. G.; GOMES, C. B. First report of *Meloidogyne ethiopica* parasitizing sugarcane in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 4, p. 635-635, 2017b.
- BELLÉ, C.; KUHN, P. R.; KASPARY, T. E.; GROTH, M. Z.; SCHMITT, J.; KULCZYNSKI, S. M. Parasitization of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Meloidogyne ethiopica* in Southern Brazil. **Plant Disease**, 101(3), 510-510. 2017c.
- BELLÉ, C.; KASPARY, T. E.; BALARDIN, R. R.; RAMOS, R. F. ANTONIOLLI, Z. I. *Meloidogyne* species associated with weeds in Rio Grande do Sul. **Planta Daninha**, v. 37, 2019.
- BELLÉ, C., RAMOS, R. F., BALARDIN, R. R., DALLA NORA, D., & KASPARY, T. E. Host weed species range of *Meloidogyne ethiopica* Whitehead (Tylenchida: Meloidogynidae) found in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, 156(3), 979-985. 2020.

- BIRD, G. W.; ABAWI, G. S.; LAMONDIA, J. A. Plant parasitic nematodes of New York, New Jersey and Pennsylvania. In: **Plant parasitic nematodes in sustainable agriculture of North America**. Springer, Cham, p. 27-55. 2018.
- BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, 6: 553, 1981.
- CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM-Agri–System for analysis and mean separation in agricultural assays using Scott Knott, Tukey and Duncan methods. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, 1(2), 18-24. 2001.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. **Nematology**, 2(6), 645-654. 2000.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 35-44, 2001.
- CARNEIRO, R. M. D. G., RANDING, O., ALMEIDA, M. R. A., GOMES, A. C. M. M. Additional information on *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968 (Tylenchida: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising kiwi fruit and grape-vine from Brazil and Chile. **Nematology** 6, 109–123. 2004.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; M. R. ALMEIDA. Registro de *Meloidogyne ethiopica* Whitehead em plantas de Yacon e Tomate no Distrito Federal do Brasil. **Nematologia Brasileira** 29:285-287. 2005.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R.; MARTINS, I.; SOUZA, J. F.; PIRES, A. Q.; TIGANO, M. S. Ocorrência de *Meloidogyne* spp. e fungos nematófagos em hortaliças no Distrito Federal, Brasil. **Nematologia Brasileira**, 32(2), 135-141. 2008.
- CARNEIRO, M. D. G. Hospedabilidade de hortaliças a *Meloidogyne ethiopica*: sugestão de manejo através de rotação de culturas. 2014. viii, 51 f, il. Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília. 2014.
- CASTRO, J. M. C.; LIMA, R.; CARNEIRO, R. M. D. C. Variabilidade isoenzimática de populações de *Meloidogyne* spp. proveniente de regiões brasileiras produtoras de soja. **Nematologia Brasileira**, v.27, n.3, p.1-12. 2003.
- CAUBEL, G.; SAMSON, R. Influence du nématode des tiges, *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Fil. dans le développement de la bacteriose" café au lait" de l'ail (*Allium sativum* L.) occasionnée par un biovar de *Pseudomonas fluorescens* Migula. **Agronomie**, 4(3), 311-313. 1984.

CHARCHAR, J. M. Metodologia para seleção de plantas com resistência a nematoides: alho/*Ditylenchus dipsaci*. **Brasília: Embrapa Hortaliças**, 4 p. il. Color, 2001.

CHARCHAR, J. M.; TENENTE, R. C. V.; ARAGÃO, F. A. S. Resistência de cultivares de alho a *Ditylenchus dipsaci*. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, v. 27, n. 2, p. 179-184, 2003.

CHARCHAR, J. M.; HUANG, C. S.; SOBRINHO MENEZES, J. A.; LOPES, C. A. Nematóide fitoparasitas associados à plantas de alho (*Allium sativum* L. e *A. ampelorasum* L.), coletados nos principais estados produtores do Brasil. **Fitopatologia Brasileira, Brasília**, v. 5, n. 1, p. 105-114, 1980.

CHEN, S.Y.; D.W. DICKSON. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, 32: 117–121. 2000.

CHITAMBAR, J. J.; WESTERDAHL, B. B.; SUBBOTIN, S. A. plant parasitic Nematodes in California Agriculture. In: **Plant Parasitic Nematodes in Sustainable Agriculture of North America**. Springer, Cham, p. 131-192. 2018.

CORREA, V. R.; MATTOS, V. S.; ALMEIDA, M. R. A.; SANTOS, M. F. A.; TIGANO, M. S.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R. M. D. G. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* and development of a species-specific SCAR marker for its diagnosis. **Plant Pathology**, v. 63, n. 2, p. 476-483, 2014.

CORREIA, G.S.; NEUSCHRANK, E.L.; MÁRQUEZ, L.A.Y.; SILVA, W.R.; HELLER, E.; GRINBERG, P.S.; PINHEIRO, J.B.; RESENDE, F.V.; MOCCELLIN, R.; GOMES, C.B. Resistência de cultivares de alho a *Ditylenchus dipsaci*. **36º Congresso Brasileiro de Nematologia**, Caldas Novas-GO. 2019.

COSTA, D. A.; OTOBONI, C. E. M.; SARAIVA, R. F. Efeito de três diferentes condições de armazenamento de amostras de campo para análise nematológica, sobre a recuperação de nematóides do solo e raízes pelas metodologias de Baermann (1917), Jenkins (1964), Coolen & D'herde (1972). **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, 1(2), 1-5. 2002.

ELLING, A. A. Major emerging problems with minor *Meloidogyne* species. **Phytopathology**, v. 103, n. 11, p. 1092-1102, 2013.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2021). Como plantar alho – Embrapa Hortaliças. Brasília-DF. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/hortaliças/alho>>. Acesso em: 11 de fevereiro de 2021.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). PM 7/87 (2) *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus dipsaci*. **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 47**, 401–419, 2017.

FAOSTAT (2021). Food and Agriculture Organization of United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>> Acesso em: 11 de fevereiro de 2021.

FAVORETO, L. **Taxonomia, interação patógeno-hospedeiro, estudo fitossanitário e denematização de sementes de gramíneas forrageiras**. 2008. xii, 53 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/102290>>. Acesso em: 03 de agosto de 2019.

FAVORETO, L. **Estudo de fitonematóides em sementes de gramíneas forrageiras**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 43 f. 2004.

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

FIELDING, M. J. Observations on the length of dormancy in certain plant-infecting nematodes, **Proceedings of Helminthological Society Washington**, Washington, US, v. 18, p. 110-112, 1951.

FONSECA, H. S.; JAEHN, A.; SILVA, M. F. A. Associação de *Ditylenchus dipsaci* com plantas daninhas colhidas após a cultura do alho. **Nematologia Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 101, 1999.

GOMES, C. B.; CARBONARI, J. J.; MEDINA, I. L.; LIMA, D. L. Levantamento de *Meloidogyne ethiopica* em viveiros de quivi no Rio Grande do Sul e registro da ocorrência em fumo (*Nicotiana tabacum*) e guanxuma (*Sida rhombifolia*). **Nematologia Brasileira**, 29 pg 111. 2005.

GONZAGA, V. Doenças causadas por nematoides em cebola. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.17, n.183, p.51-53, 1995.

GRINBERG, P.S.; GOMES, C.B. Recorrência do amarelão do alho (*Ditylenchus dipsaci*) no extremo sul do Rio Grande do Sul. **Anais 35º Congresso Brasileiro de Nematologia**, Bento Gonçalves-RS. 2018.

GUBINA, V. G. **Nematodes of plants and soils: genus *Ditylenchus***. Karashi: Saad Publications, 397 p., 1988.

GUPTA, R. C.; PANDEY, S. Root-knot nematode in garlic caused by *Meloidogyne* species: first record from Karnal district of Haryana state. **Journal of Spices and Aromatic Crops**, v. 27, n. 2, p. 158-160, 2018.

HAN, S. C.; CHO, H. J. Influence of bulb nematode, *Ditylenchus dipsaci*, on growth and yield of garlic. **Korean journal of applied entomology**, 19(3), 153-155. 1980.

HAWN, E. J. Transmission of bacterial wilt of alfalfa by *Ditylenchus dipsaci* (Kühn). **Nematologica**, 9(1), 65-68. 1963.

HOOPER, D.J. *Ditylenchus dipsaci*. C.I.H. Descriptions of plantparasitic nematodes. Set 1 No. 14, 1972.

HUANG, Shiou Pin. Nematoides que atacam olerícolas e seu controle. **Informe Agropecuário**, v. 16, n. 172, p. 31-36, 1992.

IBGE (2021). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA) – Produção Agrícola Municipal. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6588#resultado>>. Acesso em: 11 de fevereiro de 2021.

IPPC (International Plant Protection Convention). *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus dipsaci*. Annex 8 to ISPM 27 Diagnostic protocols for regulated pests. 2016.

IVES, L. **Epidemiology and Management of Stem and Bulb Nematode**. A thesis presented to The University of Guelph. Master of Science in Plant Agriculture Guelph, Ontario, Canada. 2019.

JAEHN, A. Termoterapia de alho para erradicação de *Ditylenchus dipsaci*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 19, n. 1/2, p. 93-96, 1995.

JAEHN, A.; KIMOTO, T. Amostragem de Bulbos de Alho em Campos Infestados por *Ditylenchus dipsaci*. **Nematologia Brasileira**, v. 18, 1994.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant disease reporter**, v. 48, n. 9, p. 692, 1964.

JOHNSON, A.W.; ROBERTS, P.A. Diseases caused by nematodes. In: SCHWARTZ, H.F.; MOHAN, S.K. **Compendium of onion and garlic diseases**. Minnesota: APS Press, p. 35-40. 1995.

JONES, J. T.; HAEGEMAN, A.; DANCHN, E. G. J.; GAUR, H. S.; HELDER, J.; JONES, M. G. K.; KIKUCHI, T.; MANZANILLA-LÓPEZ, R.; PALOMARES-RIUS, J. E.; WESEMAEL, W. M. L.; PERRY, R. N. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 9, p. 946-961, 2013.

LIMA, E.; MATTOS, J. K.; MOITA, A. W.; CARNEIRO, R. G.; CARNEIRO, R. M. D. G. Host status of different crops for *Meloidogyne ethiopica* control. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 3, p. 152-157, 2009.

LUZ, W. C. da. Nematoides fitoparasitas associados com trigo no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 215-217, 1982.

MACHADO, A. C. Z; SILVA, A. S.; FERRAZ, L. C. C. B. Métodos em nematologia agrícola. **Piracicaba: Sociedade Brasileira de Nematologia**, 2019.

MAFFIA, A. L. Programa para cálculo de área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) GW-BASIC 3.20. SIC 3.20 **Viçosa: Universidade Federal de Viçosa-Departamento de Fitopatologia**, 1986.

MAPA (2021) – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 39, de 01 de outubro de 2018**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-disponibiliza-listagem-atualizada-de-pragas-quarentenarias>> Acesso em: 04 de março de 2021.

MASSOLA JUNIOR N. S.; JESUS JUNIOR, W. E.; KIMATI, H. Doenças do alho e da cebola. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia Vol. 2**, Doenças de plantas cultivadas. Ouro Fino – MG, Agronômica Ceres. 5. Ed, 63-74 p., 2016.

MEDINA, I. L.; COILA, V. H. C.; GOMES, C. B.; PEREIRA, A. S.; NAZARENO, N.R.X. *Meloidogyne ethiopica* report in Parana state, Brazil, and reaction of potato cultivars to root- knot nematode. **Horticultura Brasileira** **32**, 482–485. 2014.

MIYAGAWA, S. T.; LEAR, B. Factors influencing survival of *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) in soil. **Journal of Nematology**, v. 2, n. 2, p. 139, 1970.

MOHAMED, R. M. S. Plant-parasitic nematodes associated with garlic in Yemen. **Egyptian Journal of Agronematology**, v. 14, n. 1, p. 37-44, 2015.

NICK, C.; BORÉM, A. Alho: do plantio à colheita. Viçosa, MG: Ed. UFV. 2017.

NEUSCHRANK, E.L.; CORREIA, G.S.; MÁRQUEZ, L.A.Y.; HELLER, E.; SILVA, W.R.; CALSIN, C.P.M.; OXLEY, H.N.; GRINBERG, P.S.; PINHEIRO, J.B.; RESENDE, F.V.; GOMES, C.B. Reprodução do nematoide do amarelão do alho (*Ditylenchus dipsaci*) em condições de campo. **36º Congresso Brasileiro de Nematologia**, Caldas Novas-GO. 2019.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Mendelingen Landbouwhogeschool Wageningen 66:1- 46. 1966.

PERRY, R. N. Separation of stages of *Ditylenchus dipsaci* and *D. myceliophagus* by body length. **Nematologica**, v. 22, n. 4, p. 446-450, 1976.

PERRY, R. N.; WHARTON, D. A. **Molecular and physiological basis of nematode survival**, p. 1-27, 2011.

PINHEIRO, J. B.; CARVALHO, A. D. F. de; PEREIRA, R. B.; RODRIGUES, C. da S. Nematoides na cultura do alho e cebola. Embrapa/Mapa. **Circular Técnica**, n. 130, Brasília, DF, p. 1-8. 2014.

PINHEIRO, J. B. Nematoides em hortaliças. **Embrapa Hortaliças-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2017.

- PLOWRIGHT, R. A.; CAUBEL, G.; MIZEN, K. A. *Ditylenchus* species. In: STARR, J. L., COOK, R., & BRIDGE, J. **Plant resistance to parasitic nematodes**, CABI Publishing. 107-139. 2002.
- POIRIER, S., DAUPHINAIS, N., BÉLAIR, G., GRAVEL, V., & MIMÉE, B. Validation of extraction methods for diagnosis of the stem and bulb nematode *Ditylenchus dipsaci*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 41(4), 597-602. 2019.
- PUIATTI, M. Exigências climáticas e ecofisiologia do alho. In: NICK, C.; BORÉM, A. (Ed.). Alho: do plantio à colheita. Viçosa, MG: Ed. UFV, v., p. 9-14. 2017.
- RAVICHANDRA, N. G. **Horticultural nematology**. New Dehli: Springer India, 2014.
- RESENDE, F. V.; LENITA LIMA HABER, L. L.; PINHEIRO, J. B.; SILVEIRA MELLO, A. F. Produção de alho-semente. In: NASCIMENTO, W. M.; PEREIRA, R. B.; Hortaliças de propagação vegetativa: tecnologia de multiplicação – Brasília, DF: Embrapa, 228 p. 2016.
- SANTIAGO, D.C.; HOMECHIN, M. Métodos de detecção de nematoides em sementes. **Arapongas: Midas**, 92 p, 2004.
- SCHAFER, J. T. **Nematoide das galhas (*Meloidogyne javanica*) na cultura da batata: período de cultivo e dinâmica populacional, qualidade dos tubérculos e alterações histopatológicas em diferentes genótipos**. Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade (UFPel) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS. 2015.
- SCHWARTZ, H. F.; MOHAN, S.K. Compendium of onion and garlic diseases and pests. **APS Press, St. Paul, MN**, v. 1008, p. 127, 2008.
- SEINHORST, J.W. Population studies on stem eelworms (*Ditylenchus dipsaci*). **Nematologica** 1, 159-164. 1956.
- SIKORA, R. A.; COYNE, D.; HALLMANN, J.; TIMPER, P. (Ed.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Cabi, 2018.
- SILVA, L. A. T. da; ANTÔNIO, H.; SANTOS, B. B. dos. Ocorrência do *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936 (Nematoda:Tylenchidae) em cultura do alho no Paraná, Brasil. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 29-33, 1984.
- SILVA, E. M. D.; SOUZA POLLO, A.; NASCIMENTO, D. D.; FERREIRA, R. J.; DUARTE, S. R.; FERNANDES, J. P. P.; SOARES, P. L. M. First Report of Root-Knot Nematode *Meloidogyne enterolobii* Infecting Sweetpotato in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. **Plant Disease**, (ja). 2021.

- SIMONS, W. R. **Nematode survival in relation to soil moisture**. Tese de Doutorado. Veenman. 1973.
- SOMAVILLA, L.; GOMES, C. B.; CARBONARI, J. J.; CARNEIRO, R. M. D. G. Levantamento e caracterização de espécies do nematoide das galhas em quivi no Rio Grande do Sul, Brasil. **Tropical plant pathology**, 36(2), 89-94. 2011.
- STARR, J. L.; COOK, R.; BRIDGE, J. **Plant resistance to parasitic nematodes**. CABI Publishing. 2002.
- TAYLOR, D.P.; NETSCHER, C. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Nematologica** 20, 268-269. 1974.
- TENENTE, R. C. V. *Ditylenchus dipsaci* um nematoide de importância quarentenária para importação de diversos produtos pelo Brasil. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Brasília, DF. Comunicado Técnico, 147, 12 p. 2006.
- TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Funep, 1993.
- TRUDGILL, D.L. Resistance and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. **Annual Review of Phytopathology** 29: 167-192. 1991.
- VAN BEZOOIJEN, J. **Methods and techniques for nematology**. Wageningen, The Netherlands: Wageningen University, 2006.
- VIGLIERCHIO, D. R.; SCHIMITT, R. V. On the methodology of nematode extraction from field samples: Baermann funnel modifications. **Journal of Nematology** 15: 438-444. 1983.
- WHARTON, D. A.; AALDERS, O. Desiccation stress and recovery in the anhydrobiotic nematode *Ditylenchus dipsaci* (Nematoda: Anguinidae). **European Journal of Entomology**. v. 96, n. 2, p. 199-203, 1999.
- WHITEHEAD, A.G. Taxonomy of *Meloidogyne* (Nematoda: Heteroderidae) with description of four new species. **Transactions of the Zoological Society of London** 31, 263-401. 1968.
- WORDELL FILHO J. A.; ROWE E.; GONÇALVES P. A. S.; DEBARBA J. F.; BOFF P.; THOMAZELLI L. F. Manejo Fitossanitário na Cultura da Cebola. Florianópolis: Epagri, 226 p. 2006.

ANEXO 1

Número de *D. dipsaci*, independente da densidade de sacarose e, independente da sua mobilidade, recuperados pelo método de Jenkins em solo infestado artificialmente.

| Recuperados Jenkins | Média de <i>D. dipsaci</i> |
|----------------------------|-----------------------------------|
| Totais | 510,83 a* |
| Móveis | 327,50 b |
| Sacarose / litro | - |
| 400g | 457,78 ^{ns} |
| 600g | 380,56 |
| CV (%) | 15,86 |

*Médias seguidas pela mesma letra (dados transformados), não diferem entre si pelo teste Duncan a 5% de significância. ^{ns} não significativo a 5% de significância.

Número de *D. dipsaci*, independente do período e, independente da sua mobilidade, recuperados pelo método do funil de Baermann em solo infestado artificialmente.

| Recuperados Baermann | Média de <i>D. dipsaci</i> |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| Totais | 72,13 ^{ns} |
| Móveis | 72,13 |
| Período de extração | - |
| 24h | 70,83 ^{ns} |
| 48h | 73,43 |
| CV (%) | 15,36 |

^{ns} não significativo a 5% de significância.

ANEXO 2

Características morfométricas e alométricas de *D. dipsaci* proposto por Sturhan e Brzeski (1991) e observadas no presente estudo.

| | Sturhan e Brzeski (1991) | Presente estudo | |
|---------|-------------------------------------|------------------------|--------------|
| | | Macho | Fêmea |
| n | - | 20 | 20 |
| L (mm) | 1,0 a 2,2 | 1,30 ± 0,13 | 1,24 ± 0,10 |
| St (µm) | 10 a 13 | 11,93 ± 0,66 | 11,99 ± 0,46 |
| a | 36 a 64 | 43,8 ± 4,98 | 42,04 ± 3,84 |
| b | 6,5 a 12 | 6,41 ± 0,76 | 6,48 ± 0,54 |
| c | 11 a 20 | 13 ± 1,10 | 13,06 ± 0,93 |
| c' | 3 a 6 | 4,82 ± 0,50 | 5,15 ± 0,34 |
| V(%) | 76 a 86 | - | 81,81 ± 1,16 |