

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**DISSERTAÇÃO**

**Patogenicidade de *Pratylenchus brachyurus* e  
Severidade da Murcha Bacteriana Quando Associada a  
este Nematóide em Fumo**

**Ana Rosa de Figueiredo Fernandes**

**2009**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E  
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**PATOGENICIDADE DE *Pratylenchus brachyurus* E SEVERIDADE  
DA MURCHA BACTERIANA QUANDO ASSOCIADA A ESTE  
NEMATÓIDE EM FUMO**

**ANA ROSA DE FIGUEIREDO FERNANDES**

*Sob a Orientação do Professor*  
**João Pedro Pimentel**

Dissertação submetida como  
requisito parcial para a obtenção do  
grau de **Mestre em Ciências**, no  
Curso de Pós-Graduação em  
Fitossanidade e Biotecnologia  
Aplicada, Área de Concentração em  
**Fitopatologia Aplicada**

Seropédica, RJ  
Outubro/ 2009

632.6257

F363p

T

Fernandes, Ana Rosa de Figueiredo,  
1976-

Patogenicidade de *Pratylenchus brachyurus* e severidade da murcha bacteriana quando associada a este nematóide em fumo / Ana Rosa de Figueiredo Fernandes - 2009.

44 f. : il.

Orientador: João Pedro Pimentel.

Dissertação (mestrado) -

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada.

Bibliografia: f. 41-44

1. Nematoda - Teses. 2. Fumo - Teses. 3. Pragas agrícolas - Teses. I. Pimentel, João Pedro . II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada . III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA  
APLICADA**

**ANA ROSA DE FIGUEIREDO FERNANDES**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em **Fitopatologia Aplicada**.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/ 10/ 2009

---

João Pedro Pimentel. Dr. UFRRJ  
(Orientador)

---

Daniel Vazquez Figueiredo. Dr. IST-Parabambi/ FAETEC

---

Francisco Racca Filho. Dr. UFRRJ  
(presidente)

---

Jadier de Oliveira Cunha Junior. Dr. UFRRJ

## DEDICATÓRIA

Aos meus filhos:

Gustavo

&

Rafaela,

Ofereço.

Você criança, que vive a correr,

é a promessa que vai acontecer...

é a esperança do que poderíamos ser...

é a inocência que deveríamos ter...

Você criança, de qualquer idade, vivendo entre o sonho e a realidade  
espalhem pelas ruas da cidade, suas lições de amor e de simplicidade!

Criança que brinca, corre, pula e grita

mostra ao mundo, como se deve viver

cada momento, feliz, como quem acredita

em um mundo melhor que ainda vai haver!

Você é como um raio de luz a iluminar os nossos caminhos,  
assemelhando-se ao Menino Jesus, encanta-nos com todo teu carinho!

Você é a criança, que um dia vai crescer!

É a promessa, que vai se realizar!

É a esperança da humanidade se entender!

É a realidade que o adulto precisa ver... E também aprender a ser...

(Autor desconhecido)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me permitido concluir este trabalho.

Aos meus pais: Terezinha & Jayme (*in memoriam*) que me guiaram por esse caminho.

Ao Doutor João Pedro Pimentel pela orientação e incentivo durante o desenvolvimento desse trabalho, pela transmissão de conhecimento e convivência acadêmica.

À Doutora Elen de Lima Aguiar Menezes, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, por ajudar na busca da resolução dos problemas burocráticos.

À Doutora Enia Mara de Carvalho pela colaboração na análise estatística.

À Doutora Helena Guglielmi Montano pela revisão do material provisório impresso da dissertação.

Aos Doutores Daniel Figueiredo, Francisco Racca Filho e Jadier de Oliveira Cunha Júnior, pelo aceite de participação na banca de defesa de dissertação.

A CAPES pelo fomento da pesquisa por meio de bolsa de mestrado.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia.

A todos, Doutores, professores, amigos, que de alguma forma me ajudaram a concluir este trabalho e me deram o incentivo para levá-lo adiante.

## RESUMO

Fernandes, Ana Rosa de Figueiredo. **Patogenicidade de *Pratylenchus brachyurus* e severidade da murcha bacteriana quando associada a este nematóide em fumo.** 2009. 44p Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Biologia, Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

A patogenicidade de *Pratylenchus brachyurus* em fumo Virgínia K326 foi avaliada em experimento no qual foram testadas diferentes densidades populacionais iniciais do nematóide ( $P_i = 0; 1.000; 3.000; 9.000$  e  $27.000$  ovos e larvas por planta), em oito repetições. O isolado foi multiplicado axenicamente em discos de cenoura. Ao final do experimento (85 dias), as plantas tiveram sua parte aérea pesada e medida e foi processado o sistema radicular de cada uma. O fator de reprodução foi estimado por extração dos nematóides das raízes e do solo. Necroses nas raízes das plantas foram observadas. *Pratylenchus brachyurus* causou lesões radiculares delimitadas nas raízes de fumo. Não houve morte de nenhuma planta analisada, porém a altura das plantas foi afetada e também a massa seca da parte aérea, principalmente sob a densidade populacional mais alta, de  $27.000$  nematóides por planta. O fator de reprodução foi baixo. Além disto, avaliou-se a interação entre *Pratylenchus brachyurus* e *Ralstonia solanacearum* em fumo Virgínia variedade K326 e fumo Burley variedade BY21. As plantas foram inicialmente inoculadas com o nematóide na densidade populacional de  $3.000$  ovos e larvas por planta e 15 dias após, foram inoculadas com uma amostra de solo infestado pela bactéria, na densidade populacional estimada de  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> de solo. Além da inoculação mista com *Pratylenchus brachyurus* e *Ralstonia solanacearum*, testemunhas foram inoculadas isoladamente. As plantas foram monitoradas diariamente, anotando-se a data de início e da evolução dos sintomas. Quando as plantas foram inoculadas com os *Pratylenchus brachyurus* e *Ralstonia solanacearum*, os sintomas de murcha, que são causados pela bactéria se manifestaram mais cedo e também evoluíram mais rápido, inclusive na variedade K326 que foi considerada mais tolerante. Neste caso, provavelmente a presença de *Pratylenchus brachyurus*, no sistema radicular dessas plantas, favoreceu a infecção por *Ralstonia solanacearum*, antes mesmo que os sintomas causados pelo nematóide pudessem ser observados. Este trabalho foi realizado em casa de vegetação e em laboratório.

Palavras chave: *Nicotiana tabacum*, nematóide, *Ralstonia solanacearum*.

## ABSTRACT

Fernandes, Ana Rosa de Figueiredo. **Pathogenicity of *Pratylenchus brachyurus* and severity of bacterial wilt in association with this nematode in tobacco.** 2009. 44p. Dissertation (Master of Science in Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada) Instituto de Biologia, Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

The pathogenicity of *Pratylenchus brachyurus* on tobacco (*Nicotiana tabacum*) cultivar K326 was evaluated in experiments testing different initial population densities of the nematode ( $P_i = 0; 1,000; 3,000; 9,000$  and  $27,000$  eggs and larvae per plant), in eight replications. The isolate was monoxenically multiplied on carrot discs. At the end of the experiment (70 days after inoculation), the above ground part of each plant was weighed and measured and, the respective root system was processed. The reproduction rate of *Pratylenchus brachyurus* was estimated by extracting the nematodes of the roots and of the soil. Necroses on the roots of the tobacco plants were observed. *Pratylenchus brachyurus* caused well-delimited root lesions on tobacco root. None of the analyzed plants died; however plant growth was reduced. Also, it was observed a decrease of the fresh mass of roots and of the dry top weight, mainly under the highest population density ( $27,000$  nematodes per plant). The reproduction rate was low. Besides the interaction between *Pratylenchus brachyurus* and *Ralstonia solanacearum* in two tobacco varieties, Virgínia K326 and Burley By21 was evaluated. Test plants were inoculated with the nematode in the initial population density of  $3,000$  individuals (eggs and larvae) by plant and, 15 days later, the plants were inoculated with a sample of soil infested by the bacterium, in estimated population density of  $10^6$  CFU.g<sup>-1</sup> of soil. Besides the mixed inoculation with *Pratylenchus brachyurus* and *Ralstonia solanacearum*, tobacco plants were single inoculated. The plants were monitored daily. Dates of the beginning of symptom expression were registered, as well as symptom evolution. When the plants were inoculated with *Pratylenchus brachyurus* and *Ralstonia solanacearum*, symptom of wilt that is caused by the bacterium *Ralstonia solanacearum* began earlier than in single inoculated plants, and they also evolved quicker, inclusive in the variety Virgínia K326 that was considered more tolerant. In this case, the presence of *Pratylenchus brachyurus*, in the root system of these plants, probably favored the infection by *Ralstonia solanacearum*, even before the symptoms caused by the nematodes could be detected. This study was done in greenhouse and under laboratory conditions.

Key words: *Nicotiana tabacum*, Root-Lesion, *Ralstonia solanacearum*

## LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

*	Significativo a 5% de probabilidade
**	Significativo a 1% de probabilidade
Afubra	Associação dos Fumicultores do Brasil
ASI-Rs	Amostra de solo infestada por <i>Ralstonia solanacearum</i>
CFU	Colony Forming Unit
CQCT	Convenção-Quadro para o Controle do Tabaco
d.a.i.	dias após inoculação
FR	Fator de reprodução
ISO	International Organization for Standardization (Organização Internacional de Normalização)
MIPD	Manejo integrado de pragas e doenças
NLR	Nematóide das lesões radiculares
ns	Não significativo
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	<i>Pratylenchus brachyurus</i>
Pb + Rs	<i>Pratylenchus brachyurus</i> e <i>Ralstonia solanacearum</i>
Pf	População final
Pi	População inicial
Rs	<i>Ralstonia solanacearum</i>
S/i	Plantas não inoculadas
SindiTabaco	Sindicato da Indústria do Fumo
UFC	Unidade formadora de colônia
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Importância social da fumicultura brasileira (Safrá 2006/ 2007). Fonte: AFUBRA: acessado em 20/ 09/ 2008.....	6
<b>Tabela 2.</b> Produção (Toneladas) da fumicultura mundial. Fonte: AFUBRA, acessado em 20/ 09/ 2008.....	6
<b>Tabela 3.</b> Distribuição fundiária para a fumicultura sul-brasileira em 2006/ 2007. Fonte: AFUBRA, acessado em 20/ 09/ 2008 .....	7
<b>Tabela 4.</b> Número de plantas de fumo usadas no ensaio de Interação entre <i>Pratylenchus brachyurus</i> e <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	20
<b>Tabela 5.</b> Altura de plantas de fumo, peso fresco e peso seco de parte aérea e peso fresco de raízes de plantas de fumo ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) Virgínia K326, inoculada com diferentes populações iniciais de <i>Pratylenchus brachyurus</i> e o fator de reprodução (FR) dos nematóides inoculados .....	24
<b>Tabela 6.</b> Análise de variância .....	26
<b>Tabela 7.</b> Análise de variância .....	30
<b>Tabela 8.</b> Percentual de plantas mortas e com sintomas iniciais de murcha bacteriana n dias após as inoculações com <i>pratylenchus brachyurus</i> e com <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	37
<b>Tabela 9.</b> Notas de severidade da <i>Ralstonia solanacearum</i> em plantas dos fumos Virgínia K326 e Burley By21 com sintomas de murcha bacteriana .....	38

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cadeia Produtiva do Tabaco no Brasil. Fonte: AFUBRA, acessado em 20/ 09/ 2008.....	5
<b>Figura 2.</b> Tubo tipo BPI .....	13
<b>Figura 3.</b> Discos de cenoura, em câmara de fluxo laminar, para serem inoculados com <i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	14
<b>Figura 4.</b> Calos formados em discos de cenoura (a) e <i>Pratylenchus brachyurus</i> colonizando calos de cenoura (b; c) .....	15
<b>Figura 5.</b> Raízes de fumo lavadas e enxutas em papel toalha, secando a sombra .....	17
<b>Figura 6.</b> Mudanças de fumo transplantadas em sacos plásticos.....	18
<b>Figura 7.</b> Esquema das inoculações nas variedades de fumo By21 e K326 .....	19
<b>Figura 8.</b> Plantas de fumo Virgínia K326 inoculadas com 0 (a); 1.000 (b); 3.000 (c); 9.000 (d) e 27.000 (e) ovos e larvas de <i>Pratylenchus brachyurus</i> por planta respectivamente, após 85 dias .....	25
<b>Figura 9.</b> Sintomas de lesões causadas por <i>Pratylenchus brachyurus</i> nas raízes das plantas de fumo Virgínia K326 inoculadas com o nematóide (a; b); raiz mostrando o local de onde a foto foi ampliada (c).....	28
<b>Figura 10.</b> Raízes das plantas de fumo Virgínia K326 inoculadas com 0 (a), 1.000 (b), 3.000 (c), 9.000 (d) e 27.000 (e) ovos e larvas de <i>Pratylenchus brachyurus</i> por planta respectivamente .....	29
<b>Figura 11.</b> Raiz de fumo Virgínia K326 corada, evidenciando a presença de <i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	29
<b>Figura 12.</b> Sintomas iniciais de murcha bacteriana em fumo Virgínia K326 .....	35
<b>Figura 13.</b> Mudanças de fumo By21: com sintomas de murcha bacteriana (à esquerda) e sem sintomas (à direita).....	36

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Relação entre a população inicial ( $P_i$ ) de *Pratylenchus brachyurus* e a altura média de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) Virgínia K326 aos 30, 60 e 85 dias após inoculação (d.a.i.), com dados transformados em raiz de x ..... 23
- Gráfico 2.** Relação entre a população inicial ( $P_i$ ) de *Pratylenchus brachyurus* e o diâmetro médio da base do caule de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) Virgínia K326, aos 85 dias após inoculação (d.a.i.) ..... 26
- Gráfico 3.** Relação entre a população inicial ( $P_i$ ) de *Pratylenchus brachyurus* e o peso médio seco de parte aérea de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) Virgínia K326 aos 85 dias após inoculação (d.a.i.), com dados transformados em raiz de x. .... 27
- Gráfico 4.** Relação entre a população inicial ( $P_i$ ) de *Pratylenchus brachyurus* e a população final ( $P_f$ ) de *Pratylenchus brachyurus* aos 85 dias após inoculação (d.a.i.), com dados transformados em raiz de x ..... 31
- Gráfico 5.** Relação entre a população inicial ( $P_i$ ) de *Pratylenchus brachyurus* e o fator de reprodução (FR) aos 85 dias após inoculação (d.a.i.) ..... 32
- Gráfico 6.** Índice de doenças (ID), aos 45 dias após a inoculação com ASI-Rs, calculado com base na incidência e severidade dos sintomas, em plantas de fumo variedades Burley By21 e Virgínia K326, inoculadas com ASI-Rs apenas e Pb seguida da inoculação com ASI-Rs ..... 39

## SUMÁRIO

Capa .....	i
Contra capa .....	ii
Ficha catalográfica .....	iii
Folha de aprovação .....	iv
Dedicatória .....	v
Agradecimentos .....	vi
Resumo .....	vii
Abstract .....	viii
Lista de abreviações e símbolos .....	ix
Lista de tabelas .....	x
Lista de figuras .....	xi
Lista de gráficos .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	8
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	12
3.1 Local de execução dos ensaios .....	12
3.2 Obtenção e Manutenção do Inóculo de <i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	12
3.3 Avaliação da Patogenicidade de <i>Pratylenchus brachyurus</i> em Fumo Virgínia	16
3.3.1 Condução e avaliação dos ensaios .....	16
3.4 Interação entre <i>Pratylenchus brachyurus</i> e <i>Ralstonia solanacearum</i> em Fumos Virgínia e Burley .....	17
3.4.1 Preparo de mudas de fumo .....	17
3.4.2 Preparo de inóculo de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	18

3.4.3 Inoculação de fumos Virgínia K326 e Burley21 com <i>Pratylenchus brachyurus</i> e <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	19
3.4.4 Condução e avaliação dos ensaios de inoculação .....	20
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	22
4.1 Patogenicidade de <i>Pratylenchus brachyurus</i> em fumo .....	22
4.1.1 Altura de plantas de fumo inoculadas com <i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	22
4.1.2 Parte aérea de plantas de fumo inoculadas com <i>Pratylenchus brachyurus</i> ...	25
4.1.2.1 Diâmetro da base do caule .....	25
4.1.2.2 Diâmetro do ápice .....	26
4.1.2.3 Peso de matéria fresca .....	27
4.1.2.4 Peso de matéria seca de parte aérea (PMSPA) .....	27
4.1.3 Raiz e solo de plantas de fumo inoculadas com <i>Pratylenchus brachyurus</i> ...	27
4.1.3.1 Peso de matéria fresca de raiz .....	29
4.1.3.2 População final de <i>Pratylenchus brachyurus</i> (PF) .....	30
4.1.3.3 Fator de reprodução .....	31
4.2 Interação entre <i>Pratylenchus brachyurus</i> e <i>Ralstonia solanacearum</i> em Fumos Virgínia K326 e Burley 21 .....	33
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	40
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	41

# 1 INTRODUÇÃO

*Nicotiana tabacum* L., o tabaco, pertence à família Solanaceae. É uma planta anual, herbácea, com folhas viscosas, macias, largas, grandes, inteiras, ovais, com até 60 centímetros de comprimento. As flores são róseas ou vermelhas, com um tubo branco, produzidas em panícula no pendão floral. A folha é a parte da planta de importância comercial. As folhas do fumo são usadas para a confecção de cigarros, charutos, fumo de corda, rapé e outros produtos.

No Brasil, no início do século XVI, os primeiros portugueses a desembarcarem no país já encontraram o cultivo de fumo em quase todas as tribos indígenas. Para os índios brasileiros, o fumo possuía caráter sagrado e origem mística.

Assim, rapidamente o cultivo e o comércio de fumo no Brasil colonial passou a ter importância destacada. Esta importância está marcada até os dias atuais no brasão das Armas da República, onde o fumo juntamente com o café, constituem, o coroamento deste símbolo da nacionalidade brasileira (SINDIFUMO, 2009).

O tabaco é atualmente a mais importante cultura agrícola não alimentícia do planeta e contribui substancialmente para as economias de mais de 150 países, gerando mais de 100 milhões de empregos em todo o mundo, na sua cadeia produtiva (Figura 1, Tabela 1). Os impostos e taxas sobre o tabaco são a maior fonte de receita para quase todos os governos. As indústrias do tabaco são bastante abrangentes e representam uma grande importância econômica e social dentro do contexto das agroindústrias. Até mesmo em países que não desenvolvem a industrialização do tabaco, a distribuição de seus produtos é uma importante fonte de atividade econômica.

De acordo com o levantamento oficial realizado pelo SINDIFUMO (2009), as exportações de 2008 ultrapassaram as expectativas iniciais. O Brasil continua como líder mundial em exportações de tabaco, o que vem ocorrendo desde 1993 e situando-se entre os três maiores produtores do mundo. No Brasil, os estados maiores produtores são Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Alagoas e Bahia.

Uma das características dessa cultura é proporcionar ao agricultor uma maior rentabilidade por área cultivada. As técnicas de cultivo do tabaco permitem aos agricultores a cultivar espécies alimentícias em consórcio, o que é uma grande vantagem para os pequenos produtores, que são a maioria (Tabela 3). A fumicultura garante emprego para 539 mil pessoas que vivem da agricultura familiar, além de gerar mais de 237 mil empregos sazonais na contratação de mão-de-obra, principalmente durante a colheita. Não há como negar o que representa o fumo em termos de importância econômica, financeira e social.

Contudo, o fumo traz muita polêmica, desde a implantação da cultura até o produto final. No Brasil, há uma legislação federal sobre o tabaco com leis, portarias, resoluções, medidas provisórias, decretos e instruções normativas, que criam uma série de restrições ao produto ou até proibições, em itens como proteção à saúde, restrição ao acesso de produtos derivados do tabaco, proteção aos jovens, tratamento e apoio ao fumante, publicidade e patrocínio dos produtos derivados do tabaco, disseminação de informação ao público, controle e fiscalização dos produtos derivados do tabaco, financiamento à cultura do tabaco, taxação sobre os produtos do tabaco, medidas para conter o mercado ilegal de cigarros e Convenção-Quadro para o Controle do Tabaco (CQCT).

A CQCT, tratado internacional da OMS, é a primeira tentativa global coordenada para reduzir o consumo do tabaco, sendo o primeiro tratado mundial sobre saúde pública. Este tratado entrou em vigor no dia 27 de fevereiro de 2005 e já é vigente em 160 países. O Brasil foi o 2º país a assinar a Convenção-Quadro e ratificou-a em 27 de outubro de 2005.

As principais empresas do setor procuram atender a legislação vigente e vêm realizando pesquisas com o objetivo de explorar modificações e inovações tecnológicas buscando produzir cigarros que possam oferecer um menor risco.

Por outro lado também, há uma perspectiva que esta imagem ruim do fumo como causador de impactos negativos na saúde humana possa em breve mudar, devido a possibilidade de produção de drogas anticarcinogênicas por meio da biotecnologia em plantas de fumo. A LSBC (Large Scale Biology Corporation), uma pequena empresa de biotecnologia localizada na Califórnia, possui um ambicioso projeto de produção de proteínas com fins terapêuticos, utilizando o tabaco como uma biofábrica para a produção de drogas que curam o câncer (Bórem, 2002). As plantas de fumo são largamente utilizadas como biorreatores, por serem facilmente transformadas, terem ciclo curto e produzirem grande quantidade de sementes (Ma et al., 2003).

Os tipos de fumo mais representativos no Brasil são: Estufa (Flue Cured), em que as folhas são colhidas individualmente, à medida que amadurecem no pé; Galpão (Air Cured), em que a colheita é realizada através do corte da planta toda; Oriental, que tem como característica a produção de aroma em grande quantidade nas folhas; Charuto, que é utilizado pela indústria para produção de folhas capa e enchimento para fabricação de charutos; Arapiraca, que é utilizado pela indústria de cigarrilhas e charutos de baixa qualidade; e Corda, que é cultivado no Brasil inteiro, sendo comercializado em “cordas”, rolos de fumo ou já picado pronto para o consumo (Kimati et. al., 2005).

As lavouras de fumo, desde o plantio até a última colheita, estão sujeitas ao ataque de insetos como lagarta rosca (*Agrotis ipsilon*), verme arame (*Conoderus* spp.), broca (*Faustinus cubae* e *Phyrdenus* spp.), pulga do fumo (*Epitrix* spp.), vaquinha (*Diabrotica speciosa*), tripes (*Thrips tabaci*, *Frankliniella schulzei*), pulgão (*Myzus persicae* e *Myzus nicotianae*), mandarová (*Manduca sexta paphus*), lesmas (*Vaginula* spp.), percevejo frade (*Corecoris dentriventris*), mosca minadora (*Schistomatodiplosis* sp.), à doenças conhecidas como mela ou tombamento (*Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp. e *Fusarium* spp.), alternariose (*Alternaria* spp.), cercosporiose (*Cercospora nicotianae*), mofo azul (*Peronospora tabacina*), canela preta (*Phytophthora parasitica* var *nicotianae*), mancha aureolada (*Rhizoctonia solani*), esclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*), por bactérias como podridão mole (*Erwinia* spp. e *Pseudomonas* sp.), murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), talo oco (*Pectobacterium carotovorum*), por vírus como mosaico (*Tobacco mosaic virus*), PVY (*Potato virus Y*), vira-cabeça (*Tomato spotted wilt virus*), streak (*Tobacco streak virus*), broto crespo (*Beet curly top virus*), por nematóides como meloidoginose (*Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*) e também por fatores abióticos como ozoniose, lightning.

Os danos causados por fitopatógenos às plantas de fumo podem reduzir a qualidade das folhas, que é o produto comercializado, implicando deste modo em prejuízos aos agricultores, no momento da classificação e venda do fumo. O tabaco em folha curado por exemplo, é classificado em grupos, subgrupos, classes, subclasses, tipos e subtipos, segundo o seu preparo, sua apresentação e arrumação, sua posição nas plantas, cor das folhas e sua qualidade.

Porém, os fitopatógenos presentes no solo são os que podem ocasionar doenças que provocam os maiores danos às plantas e conseqüentemente as maiores perdas na lavoura.

Dentre estes destacam-se os nematóides. A maioria deles são de vida livre. São organismos aquáticos, que vivem nas águas marinhas, águas doces e filme de água no solo, têm ampla distribuição geográfica e podem habitar diferentes ecossistemas. Os nematóides fitoparasitas na maioria das vezes têm entre 300 a 1.000 micrômetros de comprimento. Numerosas espécies de nematóides são parasitas de humanos e de animais e outras, parasitas de plantas, causando doenças em plantas em todo o mundo. O corpo do nematóide pode ser mais ou menos transparente, revestido por uma cutícula, que pode ser lisa ou marcada por

estrias, funcionando como exoesqueleto flexível e de barreira protetora contra elementos nocivos do ambiente.

O sistema reprodutivo dos nematóides é bem desenvolvido. As fêmeas podem ter um ou dois ovários, oviduto e útero, terminando com a vulva. Os machos podem ter um ou dois testículos, vaso deferente, canal ejaculador e espículos, que são órgãos de cópula, podendo estar presente a vesícula seminal. A reprodução dos nematóides fitoparasitas é por meio de ovos e pode ser por anfimixia ou por partenogênese. Em muitas espécies os machos são inexistentes ou raros.

Este minúsculo verme pode ser encontrado em várias culturas de importância comercial, causando consideráveis prejuízos (Yamashita et al., 1999). São parasitas cosmopolitas de plantas e podem explorar diversas partes do hospedeiro (Wrather et al., 2001). Hoje, a maioria das culturas de importância econômica estão tendo sérios problemas com nematóides.

O nematóide parasita de plantas, muitas vezes só é notado pelo agricultor depois de já ter causado danos à lavoura. É uma praga de solo, de tamanho microscópico, na maioria das vezes, que ataca principalmente as raízes das plantas e os sintomas na parte aérea, em geral, são discretos ou até mesmo imperceptíveis. Os mais importantes para o fumo são os “nematóides formadores de galhas” ou “root-knot nematodes”, que pertencem ao gênero *Meloidogyne*, porém os danos causados por nematóides de gêneros diferentes vêm aumentando a cada ano.

O gênero *Pratylenchus* está entre os mais importantes grupos de fitonematóides em todo o mundo, englobando mais de 60 espécies descritas (Tihohod, 1991). São conhecidos como “nematóides das lesões radiculares” ou “root-lesion nematodes” (“lesion” ou “meadow”) devido à sintomatologia nas raízes (Lordello, 1988).

No Brasil, o nematóide das lesões radiculares, posiciona-se como segundo grupo mais importante de fitonematóides à agricultura, ficando em primeiro, os causadores de galhas, do gênero *Meloidogyne* (Lordello, 1985).

As espécies mais frequentes no Brasil do nematóide das lesões radiculares são *Pratylenchus brachyurus*, *P. coffeae* e *P. zae* (Ferraz, 1999).

Os nematóides das lesões radiculares pertencem à família Pratylenchidae, possuem uma ampla gama de hospedeiros, grande distribuição geográfica e causam problemas sérios em muitos cultivos, reduzindo rendimento e qualidade. Todos os estágios larvais e os adultos são infectivos e migradores. A ação direta desses nematóides parasitando a planta ocorre devido à interação entre glicosídeos da planta e enzimas hidrolíticas do nematóide, culminando na liberação de compostos fenólicos, resultando em sintoma de necrose. Os sintomas mais discretos também ocorrem como lesões arredondadas nas raízes, fracamente coloridas que podem evoluir para grandes e escuras. A planta não se desenvolve, os ramos ficam finos, a parte aérea exibe clorose, murchamento, desfolha e manifesta sintoma de deficiência nutricional. Dentro da família temos o *Pratylenchus brachyurus* que tem as gramíneas como principais hospedeiras, além de outras como milho, cana-de-açúcar, arroz, algodão, trigo, soja, batata, café, olerícolas, ornamentais, fumo.

O grande problema do *Pratylenchus brachyurus* é a interação dele com outros fitopatógenos, podendo agravar os danos causados principalmente por *Verticillium* sp., *Fusarium* spp., *Ralstonia solanacearum*, problemas com *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora* sp. e *Pythium* spp.. Suatmadji (1986), comprovou que ferimentos causados por nematóides nas raízes servem não somente para entrada de bactérias, mas também provocam a exsudação de substâncias nutricionalmente importantes para o desenvolvimento de vários microrganismos fitopatogênicos.

É importante que o produtor adote várias técnicas e práticas de controle com o propósito de impedir ou reduzir a ação dos insetos, pragas e doenças, seguindo o manejo

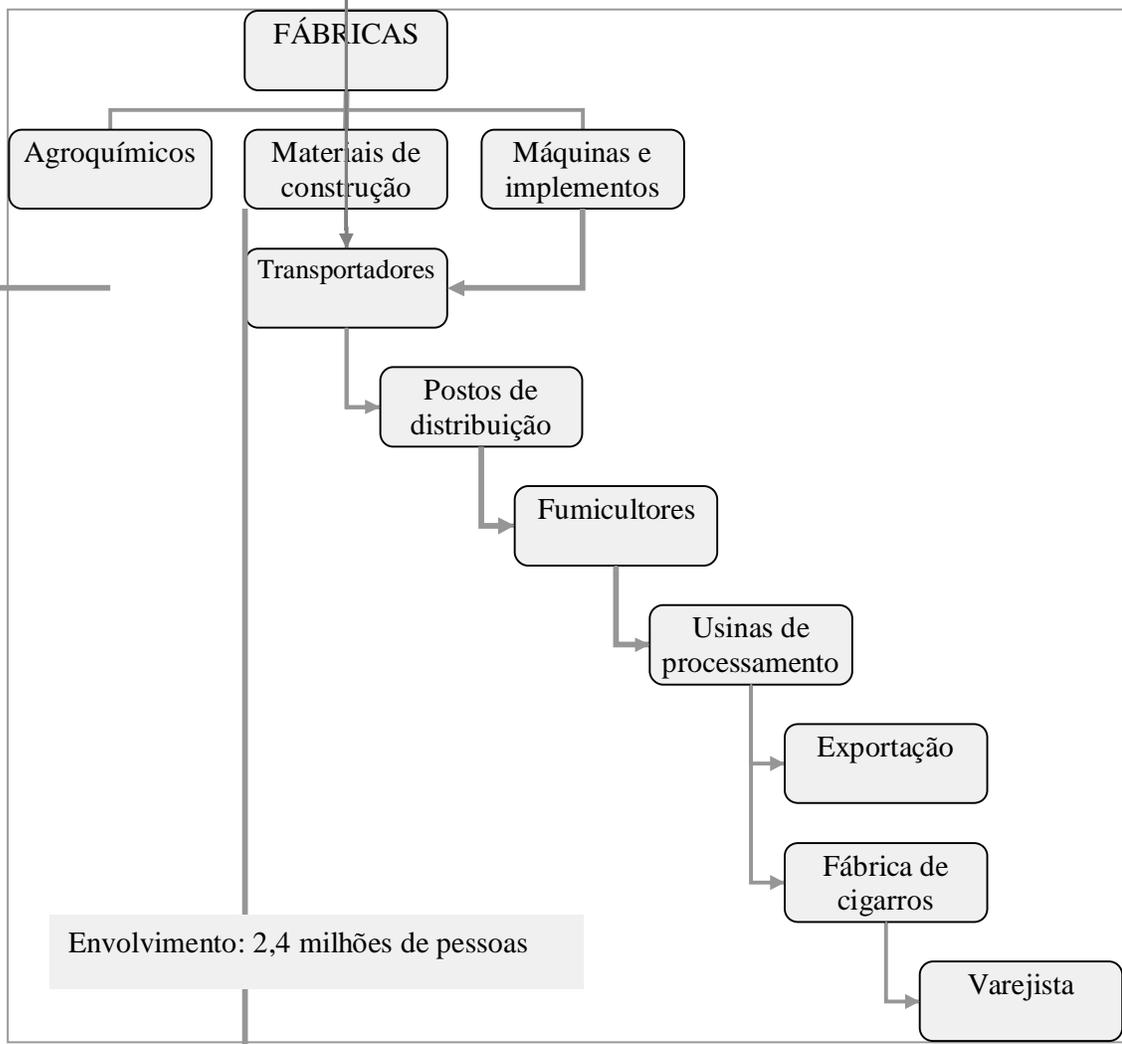
integrado de pragas e doenças (MIPD) na lavoura. A orientação de um engenheiro agrônomo capacitado é fundamental para o sucesso de qualquer tipo de controle de doenças. Uma boa orientação garante uma amostragem correta da área e assim um resultado de análise fiel ao que se tem na lavoura, para finalmente adotar medidas de controle sustentáveis para diferentes situações em diferentes áreas de cultivo. Um dos métodos mais eficientes no controle de nematóides é o uso de plantas resistentes.

A variedade de fumo Virgínia K326 oferece resistência ao nematóide das galhas *M. incognita*, pertencente ao gênero *Meloidogyne*, apresenta maior importância para a cultura do fumo - tem baixa tolerância à *Ralstonia solanacearum* e também à *Phytophthora*. A resistência não significa imunidade, ela pode diminuir ou ser quebrada totalmente de acordo com as condições em que a planta se desenvolve (estado nutricional, presença de fitopatógenos, condições ambientais adversas).

No mundo, a murcha bacteriana é a principal doença vascular de plantas, causada por *Ralstonia solanacearum*, bactéria “habitante” natural do solo, associada a um grande número de plantas cultivadas e daninhas. A doença ocorre em todas as regiões do Brasil, causando maiores problemas principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, em que predominam temperaturas e umidades elevadas, de acordo com Takatsu & Lopes (1997). Em fumo, as principais regiões produtoras atingidas estão no sul do País, nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Hoje, ainda existem poucos estudos sobre a interação entre *Pratylenchus brachyurus* e outros fitopatógenos, com a planta de fumo. Daí a necessidade de se estudar melhor essa associação entre fumo e *Pratylenchus brachyurus*, por se tratar de um nematóide bastante agressivo, polífago e pelo elevado grau de interesse econômico apresentado pela cultura do fumo.

Neste trabalho, foi avaliada a patogenicidade do nematóide *Pratylenchus brachyurus* ao fumo Virgínia K326 e a severidade da murcha bacteriana em fumos Virgínia e Burley em interação com este nematóide.



**Figura 1.** Cadeia Produtiva do Tabaco no Brasil. Fonte: AFUBRA, acessado em 20/ 09/ 2008.

**Tabela 1.** Importância social da fumicultura brasileira (Safrá 2006/ 2007). Fonte: AFUBRA: acessado em 20/ 09/ 2008.

DESCRIÇÃO	EMPREGOS		TOTAL	%
	Diretos	Indiretos		
Lavoura	925.000		925.000	38,5
Indústria	35.000		35.000	1,5
Diversos		1.440.000	1.440.000	60,0
<b>TOTAL</b>	<b>960.000</b>	<b>1.440.000</b>	<b>2.400.000</b>	<b>100</b>

**Tabela 2.** Produção (Toneladas) da fumicultura mundial. Fonte: AFUBRA, acessado em 20/ 09/ 2008.

ANO	PRODUÇÃO		
	Brasil	USA	Zimbabwe
1980	372.970	806.030	125.000
1990	447.980	737.710	139.800
2000	577.110	453.600	245.210
2001	544.780	449.750	207.250
2002	669.950	403.000	165.840
2003	635.820	403.520	79.840
2004	882.650	383.780	69.050
2005	876.430	812.800	84.540
2006	803.540	333.950	83.780
2007	792.390	429.420	87.500
Var%	112	-47	-30

ANO	EXPORTAÇÃO		
	Brasil	USA	Zimbabwe
1980	129.900	273.480	98.980
1990	198.040	223.410	122.350
2000	353.020	179.890	182.070
2001	443.900	186.300	135.020
2002	474.470	153.320	142.810
2003	477.540	160.000	90.000
2004	592.850	153.320	71.000
2005	629.630	174.920	66.010
2006	581.380	126.170	66.000
2007	710.150	124.780	65.270
Var%	447	-54	-34

**Tabela 3.** Distribuição fundiária para a fumiicultura sul-brasileira em 2006/ 2007. Fonte: AFUBRA, acessado em 20/ 09/ 2008.

HECTARES	FAMÍLIAS	%
0	38.030	20,8
De 1 a 10	67.738	37,1
De 11 a 20	48.112	26,3
De 21 a 30	18.947	10,4
De 31 a 50	7.442	4,1
Mais de 50	2.381	1,3
TOTAL	182.650	100

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A principal característica da cultura do fumo é de proporcionar ao agricultor um elevado rendimento em uma pequena área (de terra), daí a importância do setor fumageiro, principalmente para a agricultura familiar, onde numa pequena propriedade rural de até 3 hectares, é possível que se produza uma safra, que possibilita o sustento de todos os membros da família. As novidades tecnológicas utilizadas no fumo são também aplicadas na diversificação e no planejamento da pequena propriedade rural. Os produtos complementares (milho, feijão, mandioca, aves, leite) são desenvolvidos, basicamente, para subsistência, comercializando apenas os eventuais excedentes (1/3 do total) que garantem aos pequenos produtores uma receita adicional equivalente a 13% daquela obtida com fumo. Além disso, seu custo de produção é formado por mais de 50% de mão-de-obra, o que a caracteriza como uma atividade agrícola de grande efeito social. Os Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Alagoas são os principais produtores de tabaco do Brasil. No Sul do Brasil, 36,8% das famílias que se dedicam a produção do fumo têm propriedades de 1 a 10 hectares; e outros 26,7% das famílias possuem propriedades de 11 a 20 hectares. Lembrando ainda, que mais de 38 mil famílias (21% do total), não possuem terras e trabalham em regime de parceria, onde encontram uma forma digna de se integrarem ao meio rural, segundo dados levantados pela AFUBRA (2008).

Nos EUA, como em outros países, a agricultura familiar teve capacidade histórica de empreender dinamismo tecnológico em seu processo; a base familiar se integrou aos mercados, de modo a gerar volumes de vendas consideráveis, seja sem a contratação, seja com a contratação de serviço extra familiar. Assim como nos países capitalistas centrais, aqui no Brasil (destaque aos estados do Sul), desenvolve-se também uma forma de agricultura familiar dinâmica, cujo peso econômico é muito significativo, sendo, portanto, descabido associar a noção de agricultura familiar com a pequena produção, ou agricultura camponesa (Abramovay, 1998).

O Brasil é o maior exportador de fumo e o 2º maior produtor mundial, ao lado da China e da Índia, 1º e 3º produtores mundiais. Enquanto que o Brasil cresceu (em exportação e produção), países importantes (EUA, Zimbábue) tiveram desempenho negativo (AFUBRA, 2008).

Porém, a cultura do fumo traz um produto problemático. O Ministério da Saúde esteve presente na mídia para, entre outros fins, reforçar publicamente o combate ao tabagismo. Os Estados Unidos são pioneiros nas restrições à propaganda de cigarro, tendo vetado a mesma mídia eletrônica em 1969. A União Européia, por sua vez, banuiu a propaganda de cigarros da TV desde 1989. No Brasil, a propaganda de cigarros passou por uma série de restrições, principalmente em termos de horários e linguagem, antes de ser definitivamente banida da mídia brasileira em janeiro de 2003. As restrições modificaram a maneira de algumas marcas da categoria estabelecerem contato com o público e, à medida que foram aumentando, começaram a gerar inquietações na indústria e nos setores envolvidos com a propaganda do cigarro (Borges, 2001).

Os impactos de uma indústria fumageira envolveriam desde o processo de produção do fumo em folha, no qual se verifica a aplicação de agrotóxicos e seus efeitos sobre o meio ambiente e a saúde dos produtores, a queima de madeira para secagem de folhas, passando pelo beneficiamento e pela fábrica do cigarro, até o consumo dos cigarros e seus efeitos sobre a saúde e a disposição final dos resíduos e das embalagens (Souza, 2000).

Contudo, a cadeia produtiva do fumo é muito importante para a economia no Brasil e presta importante contribuição social envolvendo mais de 2,4 milhões de pessoas no processo. Com isso, ameniza o desemprego, uma das grandes preocupações mundiais (Afubra, 2008). O setor fumageiro vem demonstrando sua preocupação com a questão

ambiental, divulgando iniciativas que visam à preservação do meio ambiente e a melhoria da qualidade de vida do homem do campo e buscando a certificação ambiental através da ISO 14001<sup>1</sup>. As iniciativas que vêm sendo divulgadas estão diretamente ligadas à produção de fumo, como redução e eliminação de agrotóxicos, introdução do uso de agentes de controle biológico, uso de cultivares resistentes às principais doenças, monitoramento de resíduos de pesticidas, uso de equipamento de proteção individual (EPIs), adoção de práticas de preservação e conservação do solo e reflorestamento e preservação de matas nativas (Etges, 2001).

O fumo é cultivado como planta anual, para finalidades comerciais por mais de 97 países no mundo. A cada ano as doenças acometem mais o fumo. As doenças de fatores bióticos do fumo incluem patógenos como fungos, bactérias, viroses, nematóides, micoplasmas e plantas parasitas. A gama de hospedeiros desses organismos que atacam o fumo, podem incluir outras espécies de plantas. As doenças abióticas também são importantes e são causadas por fatores como desequilíbrio nutricional, adversidades do meio ambiente e poluição do ar (Shew & Lucas, 1990).

O parasitismo exercido por nematóides prejudicam as plantas pela ação nociva sobre o sistema radicular, os sintomas surgem em reboleiras, devido à baixa mobilidade destes organismos no solo, que podem ser confundidas com manchas ocasionadas pelo depósito de calcário na lavoura ou com deficiência de nutrientes (Kimati et al., 2005).

As doenças causadas por nematóides são conhecidas mundialmente, entre estas se encontram as causadas pelo gênero *Pratylenchus*, que é o segundo de importância para o Brasil. São conhecidos vulgarmente por ‘nematóides das lesões radiculares’ (NLR). Os NLR apresentam ampla distribuição geográfica que pode ser devido ao grande número de hospedeiras deles. São parasitos que se encontram como altamente nocivos a diversas culturas de importância econômica em vários países, causando sério problema sanitário (Lucas, 1975). Apesar disso, ainda não são bem conhecidos pela maioria dos agricultores e por grande número de técnicos envolvidos direta ou indiretamente com fitossanidade (Tihohod, 1989).

Os nematóides das lesões radiculares são endoparasitas migradores e todas as suas fases de desenvolvimento pós-emergentes do ovo são consideradas como infestantes (Christie, 1959). A reprodução na maioria das vezes ocorre na ausência dos machos. *Pratylenchus brachyurus* tem preferência por solos leves e bem drenados (Ritzinger & Costa, 2004). As plantas atacadas ficam atrofiadas e amareladas e murcham nas horas mais quentes do dia (Shew & Lucas, 1990). Nas raízes observam-se lesões necróticas, devido ao ataque às células do parênquima cortical, onde *Pratylenchus brachyurus* injeta toxinas durante o processo de alimentação. Sua movimentação na raiz também desorganiza e destrói células (Kimati et al., 2005), migrando via intracelular, se nutrindo e depositando ovos (Shurtleff & Avere, 2000), afeta a absorção e a translocação de nutrientes, alterando a fisiologia da planta. Não há formação de galhas. Todos os estádios juvenis e adultos são vermiformes, movimentando-se intensamente. Esses nematóides penetram e abandonam sucessivamente as raízes, destruindo grande número de células do córtex durante a movimentação. São facilmente reconhecíveis pela sua região labial esclerotizada, pela sobreposição das glândulas esofagianas e, quase sempre, pelo conteúdo intestinal escuro (Alves, 2008).

Os nematóides das lesões radiculares infectam diferentes culturas, especialmente gramíneas, leguminosas, solanáceas e compostas (Lucas, 1975). Em relação à lista de hospedeiros, *Pratylenchus brachyurus* pode causar danos em algodão, milho, cana-de-açúcar, soja, feijão, amendoim, café, além de outras culturas, como olerícolas, ornamentais e

---

<sup>1</sup> ISO 14001 é uma norma internacionalmente aceita que define os requisitos para estabelecer e operar um Sistema de Gestão Ambiental, que é uma estrutura desenvolvida para que uma organização possa consistentemente controlar seus impactos significativos sobre o meio ambiente e melhorar continuamente as operações e negócios (ISO, 2009).

essências florestais (Filho et al., 1995). No caso das culturas anuais, se na entressafra os nematóides tiverem acesso a plantas daninhas hospedeiras, particularmente espécies perenes, estas serão capazes de lhes assegurar a sobrevivência e reprodução, pois *Pratylenchus brachyurus* é polífago (Stradioto et al., 1983).

Existem pouquíssimos estudos no Brasil sobre patogenicidade de nematóides do gênero *Pratylenchus* em relação a várias culturas, com limiares de nível de dano (Goulart, 2008).

Nenhuma variedade de fumo que apresenta resistência contra *Pratylenchus* spp. foi desenvolvida, mas algumas variedades são mais tolerantes que outras (Shew & Lucas, 1990).

O problema se agrava quando *Pratylenchus brachyurus* infectando a planta, estabelece complexos com outros microrganismos fitopatogênicos. Podem dizimar extensas áreas produtoras em poucos anos. Esses nematóides também podem predispor a planta a estresses ambientais e ao aumento de certas doenças causadas por patógenos como *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, *Thielaviopsis basicola* (Blancard et al., 1998), *Ralstonia solanacearum* ou ainda, viroses. Em plantas de batata, o sinergismo entre *Pratylenchus brachyurus* e a murcha causada pelo fungo *Verticillium*, resulta em redução no campo com a morte prematura de plantas infectadas (Agrios, 2005). Suatmadji (1986) comprovou que ferimentos causados por nematóides servem para a entrada de bactérias e também provocam exsudação de substâncias nutricionalmente importantes para o desenvolvimento de vários microrganismos fitopatogênicos. Conforme Riedel (2003), os nematóides parasitas de plantas frequentemente são vetores de viroses. Os fungos e bactérias fitopatogênicos podem simplesmente ingressar por processo mecânico devido a ferimentos causados pelo nematóide, ou ainda, os nematóides parasitas de plantas podem predispor a hospedeira ou alterar a fisiologia da planta, alterando a resistência da mesma (Riedel, 2003).

*Ralstonia solanacearum*, é uma bactéria fitopatogênica que frequentemente é encontrada nos solos em regiões tropicais e subtropicais, associada a diversas plantas cultivadas e daninhas, causando uma grave doença vascular, a murcha bacteriana. Esse fitopatógeno de solo comumente coexiste com diferentes populações de nematóides em áreas de trópicos e subtropicais. Os ferimentos nas raízes, causados por nematóides, frequentemente explica a associação entre infecção por nematóides e infecção causada por murcha bacteriana (Debert et al., 1999). Esses ferimentos também são porta de entrada para patógenos como *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora* spp. Esses patógenos associados causam sinergismo (o dano dos dois juntos é maior do que a soma dos dois separados) da doença que cada um deles causa na hospedeira, levando à morte a planta de fumo (Duarte & Weiler, 2009).

Existem estudos sobre a interação de diferentes espécies e gêneros de nematóides. Por exemplo, a interação entre *Fusarium oxysporum* e *Meloidogyne javanica* em feijoeiro comum (Pimentel & Ferraz, 2004). Porém, ainda são poucos os trabalhos sobre a interação de *Pratylenchus brachyurus* com outros patógenos. Johnson & Nusbaum (1970) realizaram experimentos com patogenicidade e interação de *Meloidogyne incognita*, *M. hapla* e *Pratylenchus brachyurus* em quatro cultivares de fumo. As cultivares ‘Hicks’ e ‘NC 2326’ foram suscetíveis a cada nematóide e as cultivares ‘NC 95’ e ‘NC 2512’, resistentes apenas a *M. incognita*.

Debert et al (1999) mostraram que quando raízes de tomateiro eram infectadas por *Meloidogyne incognita*, reduzia a resistência à murcha bacteriana.

Ferraz (1995) avaliou os efeitos de interações entre *Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne javanica* em soja. Observou antagonismo entre as duas espécies nas infestações conjuntas, sendo *Pratylenchus brachyurus* a mais afetada, tendo sua população diminuída.

Pesquisas elucidando os mecanismos que envolvem a interação entre nematóides e outros patógenos de plantas e a interface desses mecanismos no desenvolvimento da doença vão abrir novos caminhos no controle de doenças (Riedel, 2003).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1. Local de Execução dos Ensaio

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Nematologia, Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, bem como em condições de casa de vegetação.

#### 3.2. Obtenção e Manutenção do Inóculo de *Pratylenchus brachyurus*

Amostras de solo de diferentes áreas do município de Seropédica, foram coletadas e processadas de acordo com o Método da Flutuação Centrífuga em Solução de Sacarose, de Jenkins (1964) e extraídos os nematóides.

O método baseia-se em uma primeira centrifugação com água, em que os nematóides são depositados no fundo dos tubos da centrífuga por serem mais densos que a água. Na segunda centrifugação, os nematóides por serem menos densos que a sacarose, permanecem no sobrenadante e são recolhidos com a peneira.

Para obtenção de *Pratylenchus brachyurus* em quantidade massal, os nematóides foram axenizados e mantidos em discos de cenoura, conforme O'Bannon e Taylor (1968) & Moody et al. (1973).

Raízes de cenouras, provenientes de mercados da região foram lavadas e imergidas em hipoclorito de sódio a 0,5%, por 30 minutos. Após este tratamento, lavou-se as raízes em água destilada, abundantemente. Em câmara de fluxo laminar, as cenouras foram cortadas em discos de, aproximadamente, 10 mm de espessura, mergulhadas em álcool a 95%, flambadas e transferidas individualmente para vidros previamente esterilizados. Os vidros eram fechados, com papel alumínio esterilizado, e, incubados a 25° C, em condições de escuro, para que houvesse a formação de calos (Figura 4 a).

A necessidade de grande quantidade de espécimes de nematóides para pesquisas em diversas áreas da nematologia levou ao desenvolvimento de técnicas de multiplicação de fitonematóides *in vitro*. Culturas monoxênicas de nematóides em plântulas, raízes excisadas ou calos vegetais, constituem o método tradicional para multiplicação e manutenção de fitonematóides em condições estéreis. A multiplicação desses nematóides em discos de cenoura, em condições assépticas, tem obtido resultados satisfatórios (Castro, 1986).

Com o auxílio de uma lupa e estilete, os nematóides em solução, extraídos da amostra de solo, foram coletados um a um, transferindo-os para recipientes tipo BPI (Figura 2) contendo água autoclavada. Para a axenização dos nematóides, eles foram novamente coletados e transferidos para tubos tipo BPI para tratamento com o antibiótico ampicilina (0,1% p/v) por 15 minutos e lavados, 3 vezes em água autoclavada. Para isto, retirou-se o excesso de antibiótico com o auxílio de uma micropipeta e adicionou-se água autoclavada, aguardando por 5 minutos, seguido da retirada do excesso de água e recolocando-se novamente água autoclavada, repetindo este procedimento por três vezes.

Para a inoculação das cenouras com *P. brachyurus*, para a formação do primeiro inóculo, os nematóides axenizados foram coletados individualmente e transferidos para os discos de cenoura previamente preparados e já acondicionados em frascos de vidro por 10 a 15 dias (Figura 3). Tomou-se o cuidado de transferir apenas fêmeas grávidas para a extremidade superior do disco de cenoura. Ao final do procedimento, o material foi levado para incubação em estufa a 25° C no escuro, por um período de 3 meses, até a renovação do inóculo.

Após três meses os discos de cenoura contendo os nematóides (Figura 4b, c) foram processados em liquidificador com água, por 15 segundos. O material foi vertido em peneiras de 60 e 500 meshes e o material dela recolhido, foi colocado em funil de Baermann modificado (Baermann, 1917; Hopper, 1970) e obtinha-se a suspensão contendo ovos, larvas e adultos de *P. brachyurus*.

Para a renovação do inóculo, os nematóides extraídos dos discos de cenoura foram coletados e transferidos para tubos tipo BPI (30 indivíduos/ tubo), onde receberam o tratamento de axenização conforme descrito anteriormente. Com o auxílio de uma micropipeta, os nematóides axenizados foram transferidos para a extremidade superior dos discos de cenoura previamente preparados e já acondicionados em frascos de vidro por 10 a 15 dias. Ao final do procedimento, o material foi levado para incubação em estufa a 25° C, no escuro.

O inóculo também foi mantido em mudas de quiabo, considerada uma boa hospedeira (Inomoto et al., 2004) que foram inoculadas e mantida em ambiente de casa de vegetação. Os discos de cenoura inoculados permaneceram viáveis (com nematóides ativos) por até quatro meses. A renovação do inóculo era feita a cada dois meses, antes que este perdesse a viabilidade.

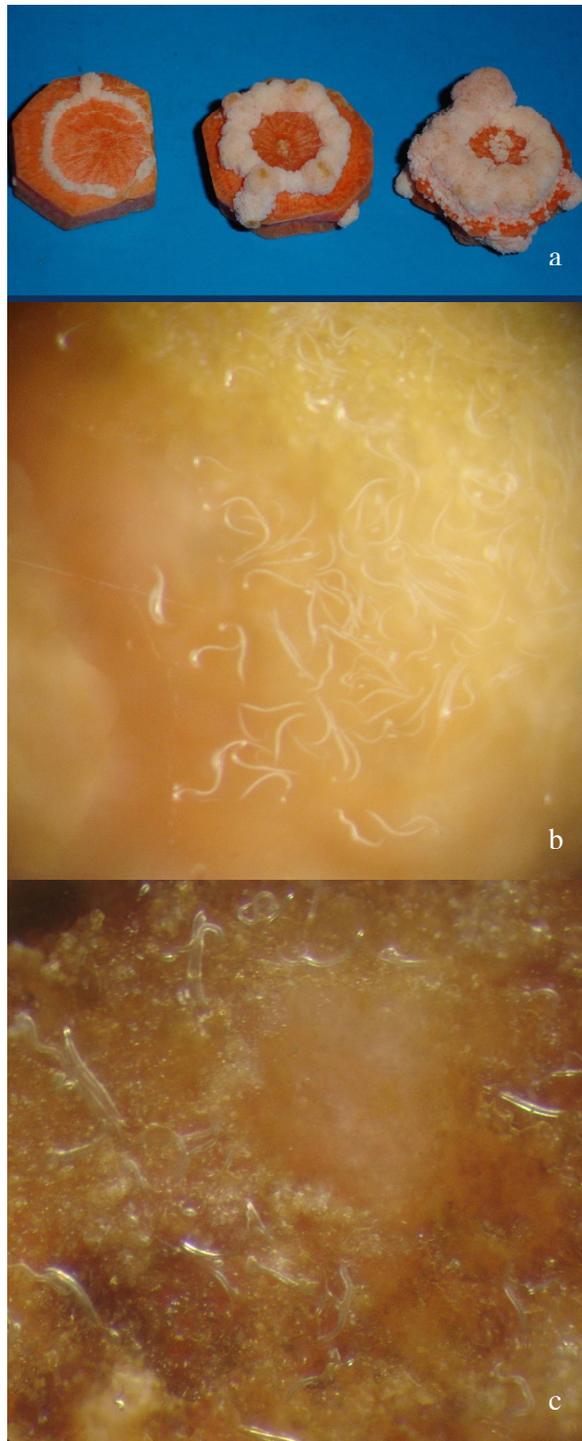
As culturas foram mantidas por um período médio de dois meses, sem a necessidade de subculturas (Koshi e Sosamma, 1981; O'Bannon e Taylor, 1968).



**Figura 2.** Tubo tipo BPI.



**Figura 3.** Discos de cenoura, em câmara de fluxo laminar, para serem inoculados com *Pratylenchus brachyurus*.



**Figura 4.** Calos formados em discos de cenoura (a) e *Pratylenchus brachyurus* colonizando calos de cenoura (b, c).

### **3.3. Avaliação da Patogenicidade de *Pratylenchus brachyurus* em Fumo Virgínia K326.**

Durante a condução do ensaio, as médias de temperaturas mínima e máxima, foram 16° C e 28,5° C, respectivamente.

As sementes de fumo Virgínia K326 foram semeadas diretamente em substrato comercial e mantidas em ambiente de casa de vegetação. As mudas após recém emergidas, foram selecionadas conforme a uniformidade e transplantadas para vasos plásticos de meio Litro de volume, contendo uma mistura de areia e terra previamente autoclavadas, na proporção 50% cada. Quando as mudas atingiram quatro pares de folhas definitivas, foram inoculadas com diferentes números de espécimes de nematóides para cada planta. Uma suspensão contendo ovos, larvas e adultos de *Pratylenchus brachyurus* foi diluída de acordo com o nível populacional desejado, a um volume de 5 mL.

O inóculo foi testado em diferentes níveis de população inicial:

Pb1 = zero (testemunha sem inoculação);

Pb2 = 1.000 espécimes/ planta/ vaso;

Pb3 = 3.000 espécimes/ planta/ vaso;

Pb4 = 9.000 espécimes/ planta/ vaso;

Pb5 = 27.000 espécimes/ planta/ vaso.

Cada densidade populacional foi testada em oito plantas de fumo K326. O substrato foi perfurado criando-se 4 orifícios, distanciados a 2 cm do caule da planta. Com o auxílio de um pipetador automático, o inóculo foi depositado nos orifícios que logo após foram fechados com o substrato do próprio vaso.

Além disto, foram inoculadas mais oito plantas de fumo, da mesma variedade, com 5.000 espécimes/ planta/ vaso, com o objetivo de se proceder a coloração dos nematóides no interior do tecido radicular. Usou-se o método da Fucsina ácida (Byrd et al., 1983).

#### **3.3.1. Condução e avaliação dos ensaios**

Os tratamentos foram arranados em blocos ao acaso, com oito repetições.

Durante o ensaio, as plantas foram medidas em três períodos diferentes após as inoculações: aos trinta dias, aos sessenta dias e aos oitenta e cinco dias, final do ensaio.

As plantas de fumo foram mantidas em ambiente de casa de vegetação, irrigadas e adubadas com uréia.

Aos oitenta e cinco dias após as inoculações (final do ensaio) as mudas foram desenvasadas e o sistema radicular foi separado da parte aérea, com o auxílio de uma tesoura de poda. As raízes foram lavadas, enxutas em papel toalha para a retirada do excesso de água e colocadas para secar por trinta minutos, à sombra (Figura 5), obtendo-se o peso de matéria fresca dos sistemas radiculares. A seguir, as raízes foram processadas pelo método de Coolen e D'Herde (1972) e delas foram extraídos os nematóides para se determinar a densidade populacional presente. A parte aérea das plantas foi acondicionada

em sacos de papel e mantida em estufa, a 65°C, para secagem até se obter valores constantes de peso, que é o peso da matéria seca.

O substrato de cada recipiente foi homogeneizado e processado pelo método Jenkins (1964) para se determinar a densidade populacional do nematóide presente e o fator de reprodução (FR) que foi determinado pela divisão da população final (Pf no substrato + Pf nas raízes) pela população inicial (Pi).

Foram feitas correlações entre o número de espécimes inoculadas, número final de espécimes e dano às plantas.

O programa estatístico utilizado para as avaliações foi o SISVAR e para testar a homogeneidade dos dados foi usado o teste Shapiro-Wilk que está disponível no mesmo programa. Nos casos em que não ocorreu normalidade dos erros, os dados foram previamente transformados em raiz de x, antes de serem submetidos à análise de variância.



**Figura 5.** Raízes de fumo lavadas e enxutas em papel toalha, secando a sombra.

### **3.4. Interação entre *Pratylenchus brachyurus* e *Ralstonia solanacearum* em Fumos Virgínia K326 e Burley By21**

Durante a condução do ensaio as médias de temperaturas mínima e máxima, foram 16° C e 19,5° C, respectivamente.

#### **3.4.1. Preparo das mudas de fumo**

As variedades de fumo escolhidas para este ensaio pertencem a dois grupos de fumo distintos ([www.sinditabaco.com.br/](http://www.sinditabaco.com.br/)):

- Tabaco de Estufa: São aqueles cujas folhas são submetidas à cura em estufas com temperatura e umidade controladas (flue cured). Incluem-se neste grupo todas as

cultivares da variedade Virgínia. Atualmente, os fumos Virgínia representam 84% do volume produzido no Brasil.

- Tabaco de Galpão: As plantas de fumo são curadas em galpões ventilados naturalmente, levando cerca de 40 dias para completar o processo de cura. A variedade Burley, está incluída neste grupo e participa atualmente com 14% do total produzido no Brasil.

As sementes de fumo Virgínia K326 e fumo Burley By21 foram semeadas diretamente em substrato comercial e mantidas em ambiente de casa de vegetação. As mudas após recém emergidas, foram selecionadas conforme a uniformidade e transplantadas para sacos plásticos de um Litro de volume contendo uma mistura de areia e terra previamente autoclavadas, na proporção de 50% cada (Figura 6).



**Figura 6.** Mudanças de fumo transplantadas em sacos plásticos.

### 3.4.2 Preparo do inóculo de *Ralstonia solanacearum*

Uma amostra de solo infestada naturalmente pela bactéria *R. solanacearum* foi destorroada e exposta ao ar para secagem. Um grama da amostra de solo seco foi diluída em tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina estéril de NaCl a 0,85%. A seguir, foi feita uma diluição seriada, retirando-se 1 mL de solução do tubo contendo a diluição da amostra de solo e transferindo-a para outro tubo contendo 9 mL de solução salina, e assim sucessivamente até a diluição de  $10^{-9}$ . As concentrações analisadas foram de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ . Em seguida, foram retiradas alíquotas de 0,3 mL de cada tubo de ensaio, e plaqueada em placas de Petri, contendo meio de cultura de Kelman. Para cada tratamento foram feitas três repetições.

As placas de Petri foram acondicionadas em estufa incubadora, a uma temperatura de 27° C, onde permaneceram por 72 horas. Decorrido esse período, as placas foram levadas para a contagem de colônias, *R. solanacearum*. Estimou-se então a densidade populacional da bactéria por grama de solo seco.

A amostra de solo seco, sabidamente estimada quanto à concentração da bactéria, foi separada em volumes de 50 mL, que foram usados como inóculo, correspondendo a  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> de solo.

### 3.4.3. Inoculação de fumos Virgínia K326 e Burley By21 com *Pratylenchus brachyurus* e *Ralstonia solanacearum*

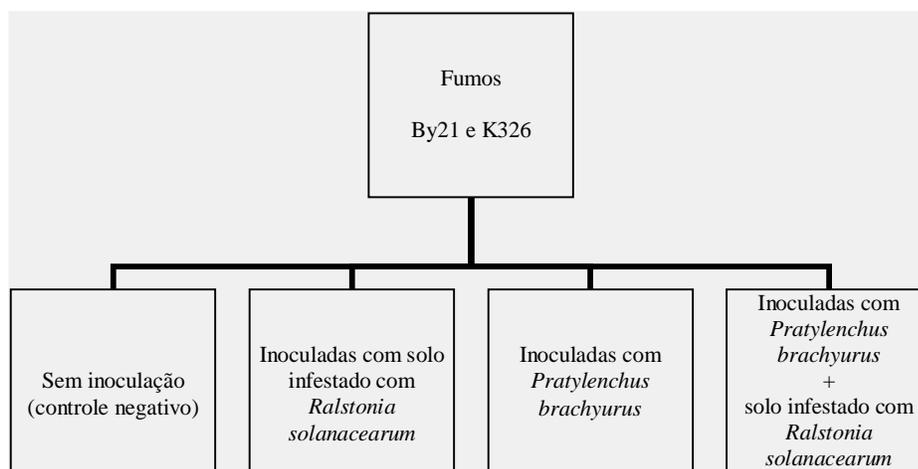
Quando as mudas de fumo atingiram quatro pares de folhas definitivas, dezesseis mudas de cada variedade foram inoculadas com uma suspensão contendo ovos e larvas de *Pratylenchus brachyurus*, com um nível populacional de 3.000 ovos e larvas/ planta/ vaso. O substrato foi perfurado criando-se 4 orifícios, distanciados a 2 cm do caule da planta. Com o auxílio de um pipetador automático, o inóculo foi depositado nos orifícios que logo após foram fechados com o substrato do próprio vaso.

Dezesseis mudas de cada variedade consistiram no controle negativo (para *Pratylenchus brachyurus*) do ensaio de inoculação, tendo sido inoculadas com água destilada.

Após quinze dias, foram inoculadas dezesseis mudas com uma amostra de solo (naturalmente infestada por *Ralstonia solanacearum*) originária de uma lavoura de fumo, que apresentava murcha bacteriana por *Ralstonia solanacearum*. Dessas mudas, oito haviam sido inoculadas previamente com *Pratylenchus brachyurus*. No momento da inoculação, de cada vaso foram retirados 100 mL de solo, tomando-se o cuidado para não danificar o sistema radicular das mudas. Então, 50 mL da amostra de solo infestado por *Ralstonia solanacearum* (ASI-Rs) foi colocada no vaso e a seguir, mais 50 mL do solo inicialmente retirado, desprezando-se os outros 50 mL de solo.

As mudas utilizadas como controle negativo (para *Ralstonia solanacearum*) do ensaio receberam substrato previamente autoclavado, ao invés da amostra de solo infestada com a bactéria.

Deste modo, as mudas dos fumos Virgínia K326 e Burley By21, foram inoculadas isoladamente, apenas com o *Pratylenchus brachyurus* ou apenas com a *Ralstonia solanacearum*, inoculadas em conjunto, ambas receberam os inóculos tanto do nematóide quanto da bactéria, e ainda, permaneceram mudas sem inoculações com os patógenos, que foram utilizadas como controle negativo (Figura 7; Tabela 4).



**Figura 7.** Esquema das inoculações nas variedades de fumo By21 e K326.

**Tabela 4.** Número de plantas de fumo usadas no ensaio de Interação entre *Pratylenchus brachyurus* e *Ralstonia solanacearum*.

variedade	S/i	Pb	Rs	Pb + Rs	N
Virgínia K326	16	16	16	16	64
Burley By21	16	16	16	16	64

N: Número total de plantas de cada variedade

Pb: Plantas inoculadas por *Pratylenchus brachyurus*

Pb + RS: Plantas inoculadas com *Pratylenchus brachyurus* e *Ralstonia solanacearum*

RS: Plantas inoculadas por *Ralstonia solanacearum*

S/i: Plantas não inoculadas

#### 3.4.4. Condução e avaliação dos ensaios de inoculação

As plantas foram mantidas em ambiente de casa de vegetação, irrigadas e adubadas com uréia.

A avaliação das plantas foi desde os primeiros sintomas, anotando-se a data do início dos mesmos até a morte, quando ocorreu, ou até 70 dias após as inoculações. As plantas que apresentavam sintomas de murcha foram avaliadas por isolamento da bactéria em meio de cultura de Kelman e também por inoculação com palito em plantas sadias suscetíveis e reprodução dos sintomas.

Para a técnica da inoculação com palito, usou-se palitos comuns de madeira previamente esterilizados. Os palitos foram imersos em suspensão de inóculo oriunda da planta infectada e introduzidos no ponto de inserção da folha com o caule de uma planta sadia. Conseguindo-se assim, introduzir o patógeno profundamente nos tecidos (Romeiro, 2001).

Independente da manifestação de sintomas aparentes externos, todas as mudas foram analisadas. Cada muda teve seu caule cortado a partir da epiderme, retirando-se parte do córtex até expor o cilindro central, na região do sistema condutor. Foi retirada uma seção com um corte vertical e o fragmento analisado em teste de exsudação em gota. Este procedimento foi repetido por diversas vezes, até chegar a uma conclusão quanto à presença ou ausência da bactéria.

Para avaliar os sintomas e estimar a severidade da doença foi empregada uma escala de notas:

0- ausência de sinais e sintomas da doença;

1- sinais da doença ou 10% das folhas com sintoma de murcha;

2- folhas apresentado sintomas de murcha e amarelecimento acima de 10%;

- 3- folhas apresentando sintomas de murcha, amarelecimento, necrose e/ ou morte da planta.

O índice de doença (ID) foi avaliado com 45 dias após a inoculação com a bactéria, constituindo um importante instrumento para avaliar a intensidade da doença (murcha bacteriana), refletindo a severidade.

O ID foi calculado de acordo com McKinney (1923), utilizando-se os dados de severidade da doença (estimada com o auxílio de notas), pela seguinte fórmula:

$$ID = \sum ( f . v ) . 100 / ( n . x )$$

Em que:

ID = Índice de doença

f = frequência

v = Nota observada

n = Número total de plantas avaliadas

x = Grau máximo de infecção

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Patogenicidade de *Pratylenchus brachyurus* em fumo

Conforme os resultados apresentados na tabela 5, com o incremento de densidades populacional de *Pratylenchus brachyurus* inoculadas em plantas de fumo Virgínia variedade K326, houve um significativo efeito em diferentes variáveis analisadas.

Os resultados evidenciaram efeitos do parasitismo exercido pelo nematóide sobre as variáveis: altura, o diâmetro da base do caule, o peso de matéria seca da parte aérea das plantas, a população final e o fator de reprodução dos nematóides. Isto sugere que *P. brachyurus* é patogênico ao fumo Virgínia K326, já que foram verificados danos às plantas nas densidades populacionais a partir de 1.000 ovos e larvas/ planta.

Plantas infectadas por NLR podem apresentar sintomas parecidos com plantas infectadas pelos “nematóides das galhas radiculares”. As plantas ficam atrofiadas, se mostram amareladas, iniciando também uma necrose e murcham nas horas mais quentes do dia. A qualidade é marcadamente reduzida. Em contraste com o nematóide das galhas, as raízes das plantas infectadas não apresentam galhas (Shew & Lucas, 1990).

Um grande número de nematóides infectando as raízes resulta na aparência de “barba por fazer”, o sistema radicular fica reduzido (Shew & Lucas, 1990). Em severas infestações por *Pratylenchus* pode ocorrer morte da planta (Shurtleff & Avere, 2000).

As lesões necróticas observadas nas raízes são devido ao ataque às células do parênquima cortical (Kimat et al., 2005),

Neste trabalho, a redução no crescimento das plantas pôde ser correlacionada com o aumento do número de nematóides inoculados nas raízes. As plantas se mostraram atrofiadas e murcharam nas horas mais quentes do dia. Já as raízes, não apresentaram diferença significativa quanto ao peso de matéria fresca e também não foi possível observar a aparência de “barba por fazer” (Figura 10), mas apresentaram necroses nas raízes inoculadas (Figuras 9). Não houve morte de nenhuma planta de fumo neste ensaio. É possível que devido ao tamanho reduzido do recipiente, as raízes tenham ficado limitadas em relação ao formato e volume.

Os resultados apresentados por Johnson & Nusbaum (1970) mostraram redução na altura das plantas de fumo variedades “NC95” e “NC 2512”. Porém, o peso de parte aérea das plantas não diferiu significativamente.

#### 4.1.1 Altura de plantas de fumo inoculadas com *Pratylenchus brachyurus*

A análise de regressão evidenciou que o modelo linear foi o que melhor explicou o efeito negativo devido à inoculação das plantas com Pi crescentes do nematóide (Gráfico 1).

Foi verificado na análise de regressão uma significância a 5% de probabilidade no Teste F, com o qual se obteve a seguinte equação para a variável ‘altura aos 30 dias após inoculação’:

$$Y = 0,0001X + 17,403;$$

Onde Y é a variável ‘altura de plantas’ e X é a ‘densidade populacional inicial’ (número de nematóides inoculados por planta). Com isso, estima-se qual é a densidade populacional necessária para ocasionar determinado dano na altura de plantas.

Para a variável ‘altura aos 60 dias após inoculação’, a análise de regressão foi significativa a 1% de probabilidade e a equação obtida foi a seguinte:

$$Y = 0,0003X + 24,114;$$

Onde Y é a variável ‘altura de plantas’ e X é a ‘densidade populacional inicial’ (número de nematóides inoculados por planta).

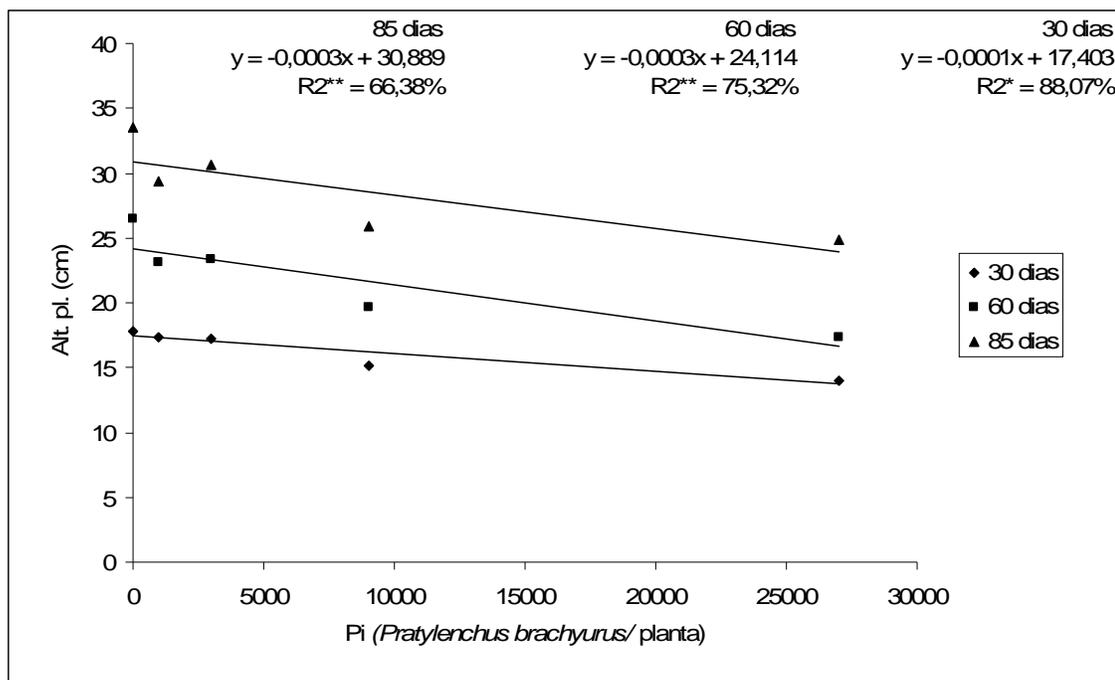
Para a variável ‘altura aos 85 dias após inoculação’, a análise de regressão foi significativa a 1% de probabilidade e a equação obtida foi a seguinte:

$$Y = 0,0003X + 30,889;$$

Onde Y é a variável ‘altura de plantas’ e X é a ‘densidade populacional inicial’ (número de nematóides inoculados por planta).

Quanto à variável ‘Altura de plantas aos 30, 60 e 85 dias’, fica evidente o decréscimo no crescimento com o aumento da densidade populacional inoculada nas plantas de fumo (Gráfico 1 e Figura 8).

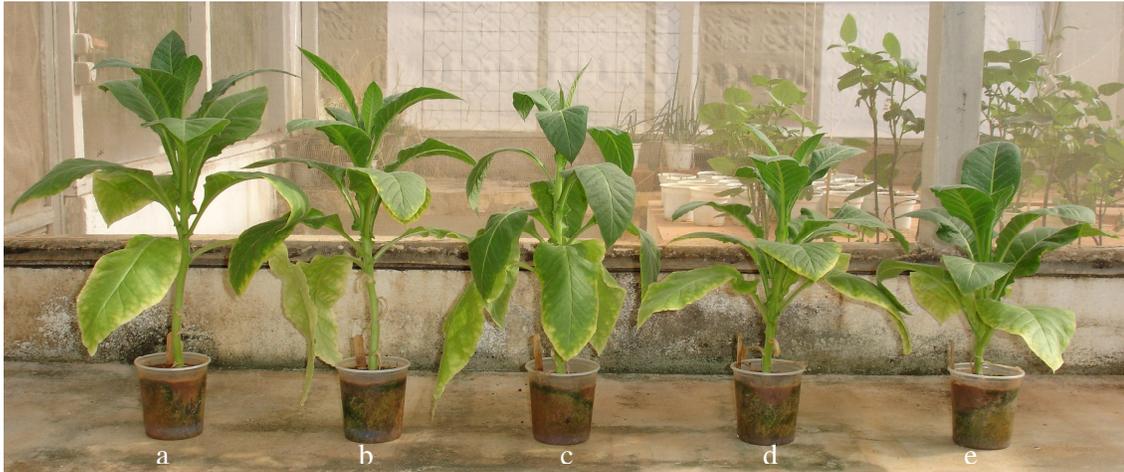
Efeitos negativos de *P. brachyurus* no crescimento de plantas de fumo Virgínia variedade K326 sob condições de casa de vegetação foram observados (Figura 8) a partir da densidade populacional de 1.000 nematóides por planta, aumentando progressivamente com o incremento da densidade populacional inoculada (3.000, 9.000 e 27.000 nematóides por planta). Na tabela 5, comparando as plantas testemunhas não inoculadas, com as plantas que receberam a densidade populacional de 27.000 nematóides por planta, verifica-se um atraso no crescimento destas últimas em torno de 1 mês.



**Gráfico 1.** Relação entre a população inicial (Pi) de *Pratylenchus brachyurus* e a altura média de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) Virgínia K326 aos 30, 60 e 85 dias após inoculação (d.a.i.), com dados transformados em raiz de x.

**Tabela 5.** Altura de plantas de fumo, diâmetro do caule, peso fresco e peso seco de parte aérea e peso fresco de raízes de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) Virgínia K326, inoculada com diferentes populações iniciais de *Pratylenchus brachyurus* e o fator de reprodução (FR) dos nematóides inoculados.

Tratamento (Pi de Pb/ planta)	Altura das plantas (cm)			Diâmetro do caule (cm)		Parte aérea (g)		Raízes (g)	FR
	30 dias	60 dias	85 dias	Base	Ápice	Peso fresco	Peso seco	Peso fresco	
<b>0</b>	17,35	25,78	32,71	1,16	0,53	68,78	16,47	55,32	0
<b>1.000</b>	17,5	23,28	29,64	1,58	0,61	61,19	15,39	38,88	4,10
<b>3.000</b>	16,28	22,07	29,00	1,13	0,49	62,99	15,67	38,62	2,93
<b>9.000</b>	15,19	19,06	25,87	1,09	0,52	54,41	15,07	40,65	1,27
<b>27.000</b>	14,29	17,64	25,21	1,06	0,49	59,93	14,74	37,95	0,6



**Figura 8.** Plantas de fumo Virgínia K326 inoculadas com 0 (a); 1.000 (b); 3.000 (c); 9.000 (d) e 27.000 (e) ovos e larvas de *Pratylenchus brachyurus* por planta respectivamente, após 85 dias.

#### 4.1.2 Parte aérea de plantas de fumo inoculadas com *Pratylenchus brachyurus*

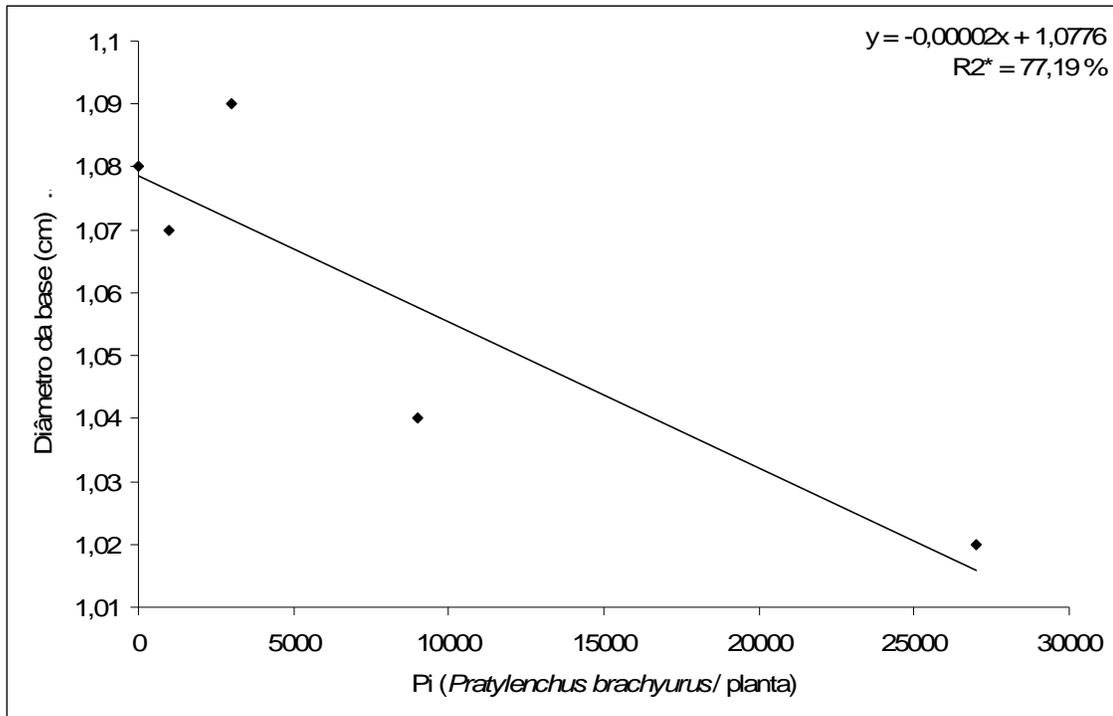
##### 4.1.2.1 Diâmetro da base do caule

Houve diferença significativa entre os tratamentos quanto à variável ‘diâmetro da base’. Na análise de regressão realizada para comparar a população inicial de *P. brachyurus*, observou-se redução linear no diâmetro da base do caule com o aumento da população inicial de 0 a 27.000 ovos e larvas de nematóide.

O Teste F foi significativo a 5% de probabilidade (Gráfico 2), com a obtenção da seguinte equação:

$$Y = 0,0002X + 1,0776;$$

Onde Y é a variável ‘diâmetro da base’ e X é a densidade populacional inicial (número de nematóides inoculados por planta).



**Gráfico 2.** Relação entre a população inicial (Pi) de *Pratylenchus brachyurus* e o diâmetro médio da base do caule de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) Virgínia K326, aos 85 dias após inoculação (d.a.i.).

#### 4.1.2.2 Diâmetro do ápice

A variável analisada ‘diâmetro do ápice’ não foi significativa (Tabela 6). No presente estudo, a inoculação de *Pratylenchus brachyurus* nas diferentes densidades populacionais adotadas, em plantas de fumo ‘Virgínia K326’, não afetou o diâmetro do ápice nestas plantas.

**Tabela 6.** Análise de variância.

Fator de variação	Quadrado médio			
	Diâmetro da base †	Diâmetro do ápice †	Peso de matéria fresca †	Peso de matéria seca †
Inóculo inicial	0,0059 *	0,0069 ns	0,7174 ns	0,1297 *
Bloco	0,0037 ns	0,0049 ns	0,6693 ns	0,0949 *
Erro	0,0021	0,0063	0,3832	0,0387
CV (%)	4,36	10,95	7,76	4,99

† Dados transformados em raiz de x

\* Teste F significativo a 5 % de probabilidade

ns = Teste F não significativo

#### 4.1.2.3 Peso de matéria fresca

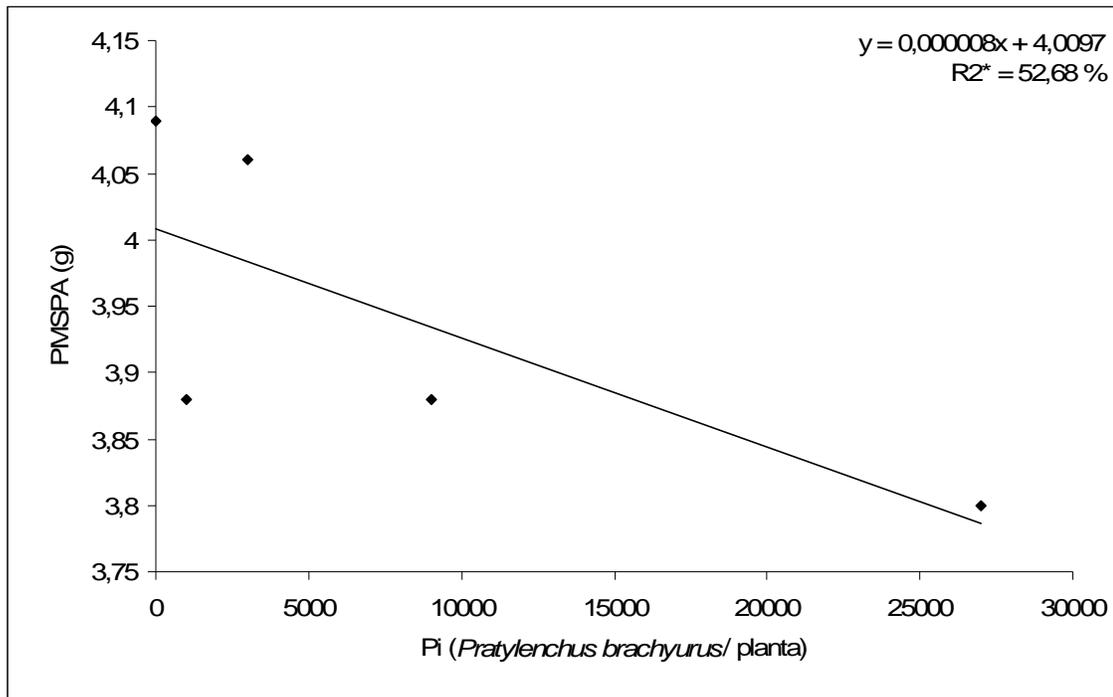
A variável ‘peso de matéria fresca’ analisada não foi significativa (Tabela 6).

#### 4.1.2.4 Peso de matéria seca de parte aérea (PMSPA)

Para a variável ‘peso de matéria seca de parte aérea’, houve reduzido acúmulo de matéria seca de acordo com o incremento de densidade populacional inoculada. O Teste F foi significativo a 5% de probabilidade (Gráfico 3), tendo sido obtida a seguinte equação:

$$Y = 0,000008X + 4,0097;$$

Onde Y é a variável ‘peso de matéria seca de parte aérea’ e X é a densidade populacional inicial (número de nematóides inoculados por planta).



**Gráfico 3.** Relação entre a população inicial (Pi) de *Pratylenchus brachyurus* e o peso médio seco de parte aérea de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) Virgínia K326 aos 85 dias após inoculação (d.a.i.), com dados transformados em raiz de x.

#### 4.1.3 Raiz e solo de plantas de fumo inoculadas com *Pratylenchus brachyurus*

Nas condições em que o ensaio se desenvolveu, os fatores de reprodução do nematóide obtidos foram baixos, principalmente quando foram inoculados 9.000 e 27.000 ovos e larvas por planta (Tabela 5), evidenciando pouca reprodução de *P. brachyurus* em fumo Virgínia variedade K326. O tamanho do recipiente adotado poderia ser uma das razões

para explicar os baixos valores dos fatores de reprodução observados neste ensaio. O desenvolvimento do sistema radicular das plantas pode ter ficado reduzido, com isso, prejudicou a penetração e a multiplicação dos nematóides, já que poderia haver uma competição por sítios de alimentação.

Observou-se necrose nas raízes infectadas (Figura 9a, b, c), que é o resultado da migração intracelular de *P. brachyurus* e morte de células (Shew & Lucas, 1990; Shurtleff & Avere, 2000; Kimati et al., 2005). Por outro lado, nas raízes das plantas não inoculadas não foram observadas necroses e nem nematóides.

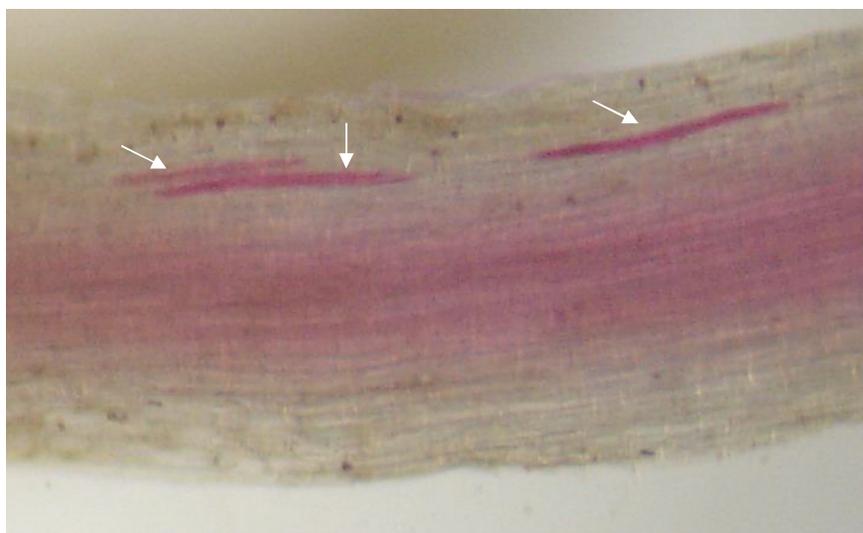
Com o uso do método da Fucsina ácida (Byrd et al., 1983), foi possível evidenciar a presença de *P. brachyurus* infectando células do parênquima nas raízes de fumo Virgínia variedade K326 (Figura 11).



**Figura 9.** Sintomas de lesões causadas por *Pratylenchus brachyurus* nas raízes das plantas de fumo Virgínia K326 (a; b); raiz mostrando o local de onde a foto foi ampliada (c).



**Figura 10.** Raízes das plantas de fumo Virgínia K326 inoculadas com 0 (a), 1.000 (b), 3.000 (c), 9.000 (d) e 27.000 (e) ovos e larvas de *Pratylenchus brachyurus* por planta respectivamente.



**Figura 11.** Raiz de fumo Virgínia K326 corada, evidenciando a presença de *Pratylenchus brachyurus*.

#### 4.1.3.1 Peso de matéria fresca de raiz

A variável ‘peso de matéria fresca de raiz’ não foi significativa. Nota-se que o coeficiente de variação foi alto para esta variável. Nenhuma das densidades inoculadas afetou significativamente o peso de matéria fresca das raízes, embora as raízes estivessem lesionadas pelo nematóide (Tabela 7).

**Tabela 7.** Análise de variância.

Fator de variação	Quadrado médio	
	Peso de matéria fresca	PF nematóide <sup>†</sup>
Inóculo inicial	464,0327 ns	19531,9276 **
Bloco	521,499 *	194,3587 ns
Erro	205,7384	106,0134
CV (%)	33,48	13,16

<sup>†</sup>Dados transformados em raiz de x

\*\* Teste F significativo a 1% de probabilidade

\* Teste F significativo a 5 % de probabilidade

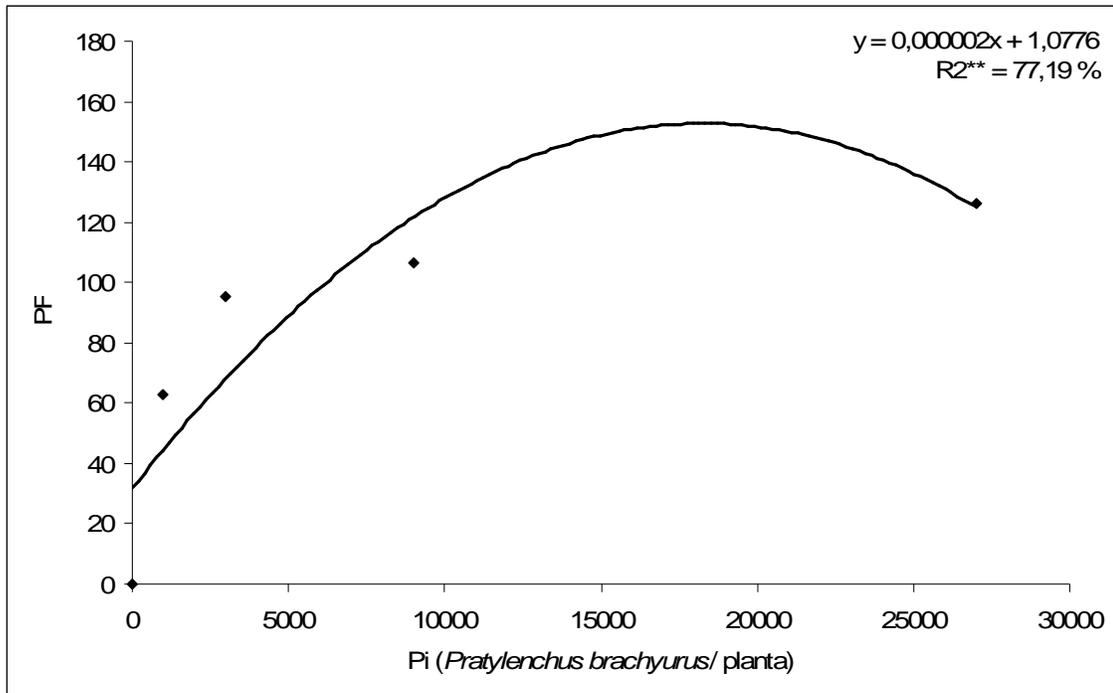
ns = Teste F não significativo

#### **4.1.3.2 População final de *Pratylenchus brachyurus* (PF)**

Para a variável ‘população final de nematóides’, o Teste F foi significativo a 1% de probabilidade (Gráfico 4) e foi obtida a seguinte equação:

$$Y = 0,000002X + 1,0776;$$

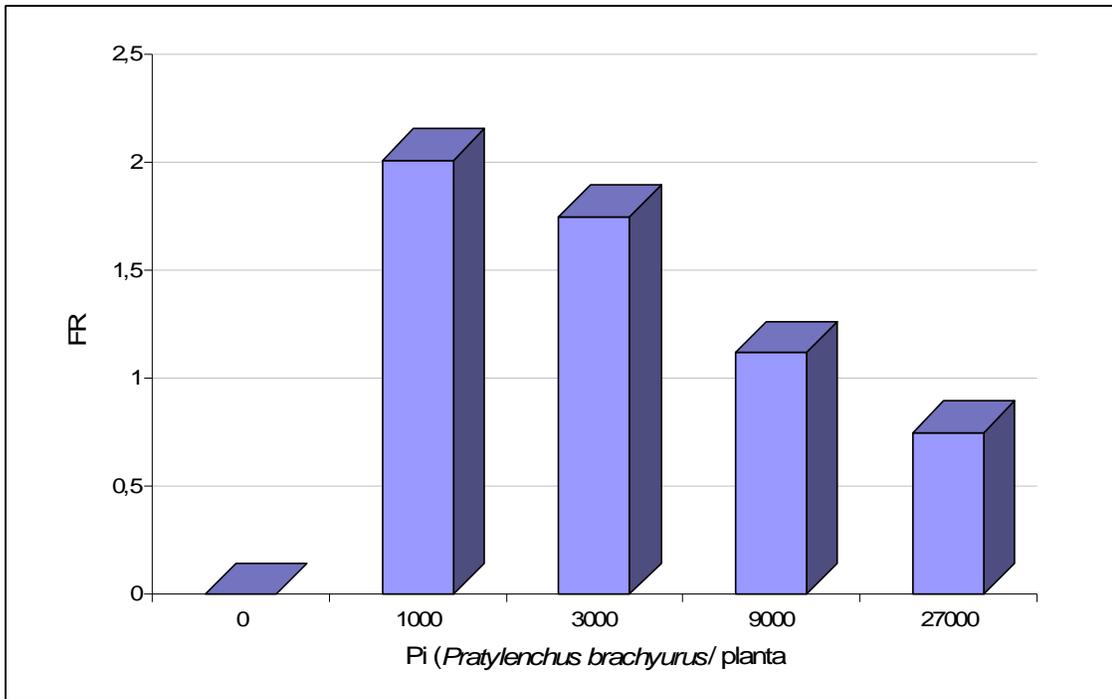
Onde Y é a variável ‘população final de nematóides’ e X é a densidade populacional inicial (número de nematóides inoculados por planta).



**Gráfico 4.** Relação entre a população inicial (Pi) de *Pratylenchus brachyurus* e a população final (Pf) de *Pratylenchus brachyurus* aos 85 dias após inoculação (d.a.i.), com dados transformados em raiz de x.

#### 4.1.3.3 Fator de reprodução

O crescimento populacional de *P. brachyurus* foi menor conforme o aumento da densidade populacional inoculada (Gráfico 5). Isto pode ser atribuído ao excessivo número de nematóides competindo por limitados sítios de alimentação.



**Gráfico 5.** Relação entre a população inicial (Pi) de *Pratylenchus brachyurus* e o fator de reprodução (FR) aos 85 dias após inoculação (d.a.i.)

#### 4.2 Interação entre *Pratylenchus brachyurus* e *Ralstonia solanacearum* em fumos Virgínia K326 e Burley21.

Nas plantas inoculadas com a amostra de solo infestada com a bactéria *Ralstonia solanacearum* (ASI-Rs), a doença murcha bacteriana, que é causada pela bactéria, foi detectada nas duas variedades, tanto em plantas inoculadas apenas com a bactéria quanto em plantas inoculadas previamente com o nematóide, *Pratylenchus brachyurus*.

As plantas doentes iniciaram a murchar unilateralmente, característico de sintomas iniciais de murcha bacteriana em fumo (Figuras 12 e 13), sugerindo uma infecção por *Ralstonia solanacearum*. Quando analisadas em teste de exudação em gota, a partir de fragmentos de tecido vascular, foi observado intenso exsudado bacteriano, com motilidade característica de bactéria lofotríquia. Com auxílio de uma alça, foi coletada pequena quantidade da suspensão formada a partir da exsudação em gota e, estriada em meio de cultura de Kelman. As bactérias isoladas neste meio de cultura cresceram formando cultura pura. As colônias têm aspecto branco leitosas a opacas com bordas irregulares e ligeiramente translúcidas.

No 5º dia a contar da inoculação das mudas com ASI-Rs, as plantas já demonstravam sintomas iniciais da murcha bacteriana. Sendo que 100% das plantas das duas variedades que foram inoculadas previamente com o nematóide e receberam a inoculação com ASI-Rs iniciaram a murchar nesta data.

Na variedade By21, apenas 37,5% das plantas inoculadas exclusivamente com a ASI-Rs, iniciaram a murcha nesta data (5º dia após a com ASI-Rs) e no 15º dia, 100% das plantas apresentaram este sintoma.

Na variedade K326, em plantas inoculadas exclusivamente com a ASI-Rs, a murcha teve início ao 10º dia após a inoculação, com apenas 12,5% das plantas apresentando este sintoma inicial. Ao final do experimento, no 45º dia após a inoculação com ASI-Rs, 6,25% das plantas da variedade K326 não apresentaram sintomas de murcha. Mesmo assim, estas plantas foram analisadas e chegou-se a conclusão que não apresentavam murcha bacteriana.

Por outro lado, as mudas das variedades K326 e By21 que serviram de testemunhas recebendo apenas água destilada e substrato autoclavado, permaneceram sadias, não exibindo quaisquer sintomas ou sinais de murcha bacteriana, até sessenta dias, quando terminou o ensaio. Conforme esperado, também não foi detectada a murcha bacteriana nas plantas inoculadas apenas com o nematóide.

Nas mudas que foram inoculadas tanto com *P. brachyurus* quanto com a ASI-Rs o índice de doença, que foi obtido com base na incidência e severidade dos sintomas da murcha bacteriana, aumentou significativamente na variedade de fumo Virgínia K326, refletindo o incremento na severidade da doença quando comparado com as mudas desta variedade inoculadas apenas com ASI-Rs.

Os resultados permitiram concluir que quando as mudas eram inoculadas previamente com *P. brachyurus*, ficavam mais suscetíveis à murcha bacteriana. Deste modo, sugere-se que quando se tem a presença de *P. brachyurus* infectando plantas de fumo com determinada tolerância à infecção por *R. solanacearum*, esta pode ser diminuída, tornando a planta mais suscetível à murcha bacteriana, nas condições em que o ensaio se desenvolveu.

Os ferimentos nas raízes causados por nematóides explica a associação entre infecção por nematóides e infecção causada por murcha bacteriana (Debert et al., 1999). Os ferimentos causados pelos nematóides inoculados serviram de porta de entrada para *R. solanacearum* nas raízes das plantas de fumo. Segundo Riedel (2003), os mecanismos que atuam nessas interações são altamente desconhecidos.

A planta de fumo pode chegar à morte devido a associação do nematóide com outros fitopatógenos (o dano dos dois juntos é maior do que a soma dos dois separados) (Duarte & Weiler, 2009). Neste trabalho, a interação entre *P. brachyurus* e *R. solanacearum* resultou em sinergismo, potencializou a evolução da doença murcha bacteriana em fumos Virgínia K326 e Burley 21.

As plantas mostraram incremento na severidade da doença murcha bacteriana na presença de *P. brachyurus*, principalmente na variedade K326 (Tabelas 8, 9 e Gráfico 6). O aumento na severidade da murcha bacteriana causada por *R. solanacearum* em interação com *Meloidogyne* foi constatada por Cadet et al. (1986) e em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), quando a bactéria foi inoculada simultaneamente com *Meloidogyne arenaria* (Salgado et al., 2007).



**Figura 12.** Sintomas iniciais de murcha bacteriana em fumo Virgínia K326.



**Figura 13.** Mudanças de fumo By21: com sintomas de murcha bacteriana (à esquerda) e sem sintomas (à direita).

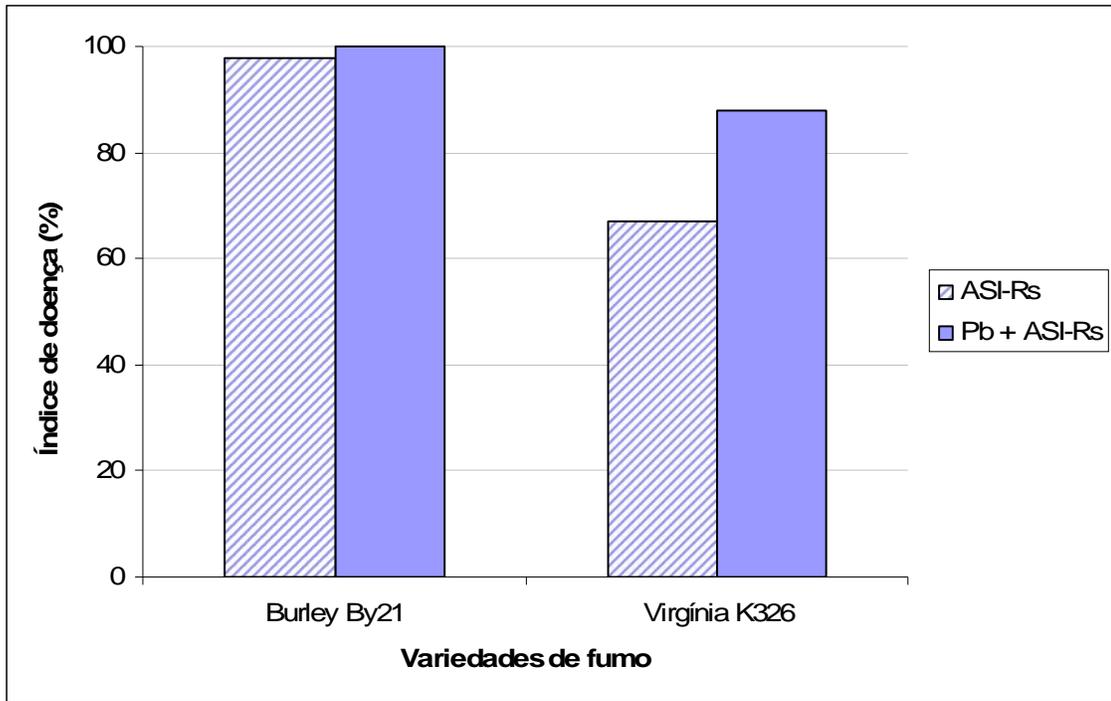
**Tabela 8.** Percentual de plantas mortas e com sintomas iniciais de murcha bacteriana n dias após as inoculações com *Pratylenchus brachyurus* e com *Ralstonia solanacearum*.

Dias após a inoculação com Pb	Dias após a inoculação com ASI-Rs	Tratamentos							
		S/i		Pb		Rs		Pb + Rs	
		By21	K326	By21	K326	By21	K326	By21	K326
<b>Inoculação</b>	<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>15</b>	<b>Inoculação</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>20</b>	<b>5</b>	0	0	0	0	37,5	0	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>25</b>	<b>10</b>	0	0	0	0	75	12,5	x	x
<b>30</b>	<b>15</b>	0	0	0	0	<b>100</b>	93,75	x	x
<b>60</b>	<b>45</b>	0	0	0	0	x	93,75	x	x
<b>Ausência de sintomas e sinais de murcha bacteriana</b>		100	100	100	100	0	6,25	0	0

ASI-Rs      Amostra de solo infestada por *Ralstonia solanacearum*  
Pb            Plantas inoculadas por *Pratylenchus brachyurus*  
Pb + Rs      Plantas inoculadas com *Pratylenchus brachyurus* e *Ralstonia solanacearum*  
Rs            Plantas inoculadas por *Ralstonia solanacearum*  
S/i            Plantas não inoculadas

**Tabela 9.** Notas de severidade da *Ralstonia solanacearum* em plantas dos fumos Virgínia K326 e Burley By21 com sintomas de murcha bacteriana.

<b>Tratamentos</b>	<b>Variedade</b>	<b>Notas</b>
<b>S/i</b>	<b>By21</b>	0
	<b>K326</b>	0
<b>Pb</b>	<b>By21</b>	0
	<b>K326</b>	0
<b>Rs</b>	<b>By21</b>	3
	<b>K326</b>	2
<b>Pb + Rs</b>	<b>By21</b>	3
	<b>K326</b>	3



**Gráfico 6.** Índice de doenças (ID), aos 45 dias após a inoculação com ASI-Rs, calculado com base na incidência e severidade dos sintomas, em plantas de fumo variedades Burley By21 e Virgínia K326, inoculadas com ASI-Rs apenas e Pb seguida da inoculação com ASI-Rs.

## 5 CONCLUSÕES

*Pratylenchus brachyurus* foi patogênico ao fumo Virgínia K326, em condições de casa de vegetação, com base nos danos causados em diferentes variáveis analisadas como a altura das plantas, o diâmetro da base do caule, o peso de matéria seca da parte aérea das plantas, a população final e o fator de reprodução dos nematóides. A parte aérea das plantas de fumo Virgínia K326, que é a parte de interesse comercial foi prejudicada em volume e peso, devido à infecção por *Pratylenchus brachyurus*. Isto significa que o nematóide das lesões radiculares quando infecta esta variedade de fumo tem um potencial de causar prejuízo aos agricultores, já que o valor pago pelo tabaco está diretamente relacionado à qualidade do mesmo, que é definida na etapa de classificação do fumo, junto às empresas compradoras do produto.

O nematóide *Pratylenchus brachyurus* aumentou a severidade e incidência da doença murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, quando inoculados em conjunto, em mudas de fumos Virgínia K326 e Burley By21 analisadas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAMOVAY, R. Paradigmas do capitalismo agrário em questão. 2. ed. São Paulo/Campinas: Hucitec/ Unicamp, 1998, 275 p.
2. AFUBRA. Associação dos Fumicultores do Brasil, site da Internet [HTTP://www.afubra.com.br](http://www.afubra.com.br), acessado em 20/09/2008.
3. AGRIOS, G. N. Plant Pathology. Lesion nematodes: *Pratylenchus*. Department of Plant Pathology, University of Florida, Fifth Edition, 2005. 922p.
4. BÓREM, A. Tabaco fitoterápico? Jornal da ANBio, Associação Nacional de Biossegurança, RJ, Ano1, nº5, 2002.
5. ALVES, T. C. U. Reação de cultivares de soja ao nematóide das lesões radiculares, *Pratylenchus brachyurus*. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Programa de Pós-graduação em Agricultura Tropical, 41p., 2008.
6. BAERMANN, G. Eine einfache Methode Zur Auffindung Von Ankvlostomum (nematoden) Larven in Erdproben. Tijdschr. Ned. –Indie, v. 57, p. 131-137, 1917.
7. BERGAMIM FILHO, A., KIMATI, H. & AMORIM, L. Manual de Fitopatologia, 3.ed, Cap. 8, São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. 919p. 2v.: il.
8. BLANCARD, D.; CAILLETEAU, B. & ANO, G. Maladies du Tabac. Observer, identifier, lutter, 1998. 280p.
9. BONETI, J. I. S. & FERRAZ, S. Modificações do método de Hussey & Barker para a extração de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, DF, p. 553, 1981.
10. BORGES, A. A morte do produto. Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Ciências da Comunicação, Campo Grande/ MS, setembro 2001.
11. BYRD JR., D. W., KIRKPATRICK, T. & BARKER, K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. Journal of Nematology, vol. 15: p. 142-143, 1983.
12. CADET, P., PRIOR, P. & STEVA, H. 1986. Influence de *Meloidogyne incognita* sur La sensibilité de deux cultivars de tomate a *Pseudomonas solanacearum* (E. F. Smith) Dan lês Antilles Françaises. L’Agronomie Tropicale, vol. 44: p. 263-268.
13. CASTRO, M. E. A. Multiplicação “in vitro” de *Pratylenchus brachyurus*, *Pratylenchus zea*, *Radopholus similis* e *Tylenchorhynchus* sp. Viçosa, UFV. Tese (M. S.), 62p., 1986.
14. CHRISTIE, J. R. Plant nematodes. Their Bionomics and Control. Agricultural Experiment Station. University of Florida. Gainesville, 1959.

15. COOLEN, W. A. & D'HERDE, C. J. A method from the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. State Agricultural Research Centre, 1972, 77p.
16. DEBERT P.; QUENEHERVE.; DARRASSE A.; PRIORP. Increased susceptibility to bacterial wilt in tomatoes by nematode galling and the role of the Mi gene in resistance to nematodes and bacterial wilt. Plant Pathology, vol. 48, n° 3, p. 408-414, 1999.
17. DUARTE, V. & WEILER, C. A. Associação de nematóides com outros patógenos. Cultivar Hortaliças e Frutas, edição 19, abril de 2009.
18. ETGES, V. E. A região no contexto da globalização: o caso do Vale do Rio Pardo. Vale do Rio Pardo: reconhecendo a região. Santa Cruz do Sul: EDUNISC: p. 351-365, 2001.
19. FERRAZ, L. C. B. Interações entre *Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne javanica* em soja. Scientia Agrícola (Piracicaba, Braz.) vol. 52, n. 2 Piracicaba May/ Aug. 1995.
20. FERRAZ, L. C. B. Gênero *Pratylenchus* – os nematóides das lesões radiculares. In: R. A. P. P. – Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo, v.7, p.157-195, 1999.
21. GOULART, A. M. C. Aspectos gerais sobre nematóides-das-lesões-radiculares (gênero *Pratylenchus*). Embrapa Cerrados, Planaltina-DF, 2008. 30p.
22. HOPPER, D. J. Culturing nematodes. In: Southey, J. F., ed. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. London, Min. Agric. Fish and Food Her Majesty's Stationery Office, 1970a, P. 96-114.
23. HUSSEY, R. S. & BARKER, K. R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. Including a new technique. Plant Disease Reporter, vol. 57: p. 1025-1028, 1973.
24. INOMOTO, M. M., SILVA, R. A. & PIMENTEL, J. P. Patogenicidade de *Pratylenchus brachyurus* e *P. coffeae* em quiabeiro. Fitopatologia Brasileira, Fortaleza, v. 29, n. 5, p. 551-554, 2004.
25. INOMOTO, M. M.; GOULART, A. M. C.; MACHADO, A. C. Z. & MONTEIRO, A. R. Effect of population densities of *Pratylenchus brachyurus* on the growth of cotton plants. Fitopatologia Brasileira, v.26, n.2, Brasília, 2001.
26. ISO. International Organization for Standardization. International Standards for Business, Government and Society, site da Internet [HTTP://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_ics/catalogue\\_detail\\_ics.htm?csnumber=31807](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_ics/catalogue_detail_ics.htm?csnumber=31807), acessado em 30/ 08/ 2009.
27. JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter 48(9): 692, 1964.
28. JOHNSON, A. W. & NUSBAUM, C. J. Interactions between *Meloidogyne incognita*, *M. hapla*, and *Pratylenchus brachyurus* in Tobacco. J Nematol. October; vol. 2 : p. 334-340, 1970.

29. KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. Manual de Fitopatologia, Volume 2, Doenças das Plantas Cultivadas, 4ª edição, 2005. 663p. 2v.: il.
30. KOSHY, P. K. & SOSAMMA, V. K. Culturing of burrowing nematodes, *Radopholus similis* on carrot discs. Indian Journal of Nematology, 10 (2): 247-249, 1981.
31. LORDELLO, L. G. E. Nematóide das plantas cultivadas. 6ª Ed. Editora Nobel: São Paulo, 1968, 314p.
32. LORDELLO, L. G. E. Nematóides das plantas cultivadas. São Paulo: Nobel, 1985, 314p.
33. LUCAS, G. B. Diseases of Tobacco. Third Edition. Biological Consulting Associates. Box 5726. North Carolina, 1975. 990p.
34. MA, J. K.; DRAKE, P. M. W.; CHRISTOU, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. Nature, 4, p. 794-805, 2003.
35. MCKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. Journal of Agricultural Research V6, p. 195-218. 1923.
36. MOODY, E. H.; LOWNSBERY, B. F. & AHMED, J. M. Culture of the root-lesion nematode *Pratylenchus vulvus* on carrot disks, Journal of Nematology, 5 (5): 225-226, 1973.
37. O'BANNON, J. H. & TAYLOR, A. L. Migratory endoparasitic nematodes reared on carrot discs. Phytopathology, 58 (3): 385, 1968.
38. PIMENTEL, J. P. & FERRAZ, L. C. C. B. Efeito de níveis de inóculo de *Meloidogyne javanica*, associado ou não a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*, sobre o crescimento do feijoeiro. Nematologia Brasileira, vol. 28 (2): p. 173-179, 2004.
39. RIEDEL, R. M. Interactions of plant-parasitic nematodes with soil-borne plant pathogens. Section 3. Interactions between plant pest and disease organisms and their antagonists. Proceedings of a Workshop on Interactions Between Soil-Inhabiting Invertebrates and Microorganisms in Relation to Plant Growth. Department of Plant Pathology, The Ohio State University, 2021 Coffey Road, Columbus, OH 43210 U.S.A. Agriculture, Ecosystems & Environment, volume 24, Issues 1-3, Pages 281-292, 2003.
40. RITZINGER, C. H. S. & COSTA, D. C. Nematóides das lesões (*Pratylenchus brachyurus*) em abacaxizeiro. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, número 31, Dezembro, 2004.
41. ROMEIRO, R. S. Métodos em bacteriologia de plantas. Inoculação de bactérias fitopatogênicas em plantas. Viçosa: UFV, 2001. 279p.: Il.
42. SALGADO, R. G., MARINGONI, A. C. & WILCKEN, R. S. Não-interação patogênica entre *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flavicumfaciens* e *Meloidogyne incognita* raça 2 em feijoeiro. UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,

- Faculdade de Ciências Agrônômicas, Departamento de Produção Vegetal, Botucatu, SP, 2007.
43. SHEW, D. & LUCAS, G. B. Compendium of tobacco diseases. Department of Plant Pathology. North Carolina State University. Raleigh, NC, 1990.
  44. SHURTLEFF, M. C. & AVERE, C. W. Diagnosing Plant Diseases Caused by Nematodes. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, 2000. 187p.
  45. SINDIFUMO. Sindicato da Indústria do Fumo. //www.sinditabaco.com.br/, Acessado em janeiro de 2009.
  46. SOUZA, R. S. de. Entendendo a questão ambiental: temas de economia, política e gestão do meio ambiente. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2000.
  47. STRADIOTO, M. F.; FERRAZ, L. C. C. B. & PITELLI, R. A. Dinâmica populacional de *Pratylenchus brachyurus* em cultura de milho (*Zea mays* L.) infestada com plantas daninhas. UNESP, Jaboticabal, S. P., 1983.
  48. SUATMADJI, R.W. 1986. Complex diseases involving nematodes and *Pseudomonas solanacearum* in potatoes in the tropics and subtropics. In: PERSLEY, G.J. (Ed). Bacterial Wilt Diseases in Ásia and the South Pacific. INTERNATIONAL WORKSHOP HELD AT PCARRD, XIII, Los Baños (Filipinas). ACIAR Proceeding 1985, p. 120-125.
  49. TAKATSU, A. & LOPES, C. A. Murcha bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. Horticultura Brasileira. Brasília, v. 15, p. 170-177, 1997.
  50. TIHOHOD, D. Controle de nematóides parasitos de algodoeiro através de sequência de culturas e avaliação de métodos de amostragem e extração, 1991. 117f. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal-SP.
  51. TIHOHOD, D. Nematologia Agrícola, Volume I. Departamento de Entomologia e Nematologia. FCAV-UNESP, Jaboticabal, S. P., 1989. 80 p.
  52. WRATHER, J.A., ANDERSON, T.R., ARSYAD, D.M., TAN, Y., PLOPER, L.D., PORTAPUGLIA, A., RAM, H.H. & YORINORI, J.T. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998. Can. J. Plant Pathol. 23, 115-121, 2001.
  53. YAMASHITA, O. M., SILVA, J. F. V., DIAS, W. P. & GOULART, A. M. C. Reação de genótipos de soja tipo alimento ao nematóide de cisto da soja, *Heterodera glycines* e ao nematóide de galha, *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira, vol.23, n.1, p.17-24, 1999.