

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

Izabelle Scheffer Romagna

**FITONEMATOIDES ASSOCIADOS A NOGUEIRA-PECÃ NO RIO
GRANDE DO SUL E CORRELAÇÃO COM OS ATRIBUTOS DO SOLO**

Santa Maria, RS
2022

Izabelle Scheffer Romagna

**FITONEMATOIDES ASSOCIADOS A NOGUEIRA-PECÃ NO RIO GRANDE DO
SUL E CORRELAÇÃO COM OS ATRIBUTOS DO SOLO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título **Mestre em Ciência do Solo**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Zaida Inês Antonioli
Coorientados: Prof. Dr. Jansen Rodrigo Pereira Santos

Santa Maria, RS
2022

Romagna, Isabelle Scheffer
Fitonematoides associados a noqueira-pecã no Rio
Grande do Sul e correlação com os atributos do solo /
Isabelle Scheffer Romagna.- 2022.
56 p.; 30 cm

Orientadora: Zaida Inês Antonioli
Coorientador: Jansen Rodrigo Pereira Santos
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Ciência do Solo, RS, 2022

1. Nematoides 2. Barton 3. Mesocriconema 4.
Suscetibilidade I. Antonioli, Zaida Inês II. Santos,
Jansen Rodrigo Pereira III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, IZABELLE SCHEFFER ROMAGNA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Izabelle Scheffer Romagna

**FITONEMATOIDES ASSOCIADOS A NOGUEIRA-PECÃ NO RIO GRANDE DO
SUL E CORRELAÇÃO COM OS ATRIBUTOS DO SOLO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciência do Solo**

Aprovada em 24 de junho de 2022.

Zaida Inês Antonioli, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Emanuele Junges, Dr. (IFFar)

Joice Aline Freiberg, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2022

À Nilda Scheffer Carneiro, *in memoriam*, minha amada avó.

AGRADECIMENTOS

Para que fosse possível a concretização do mestrado o apoio da minha família foi fundamental. Agradeço a minha mãe Elisângela, minha tia Caroline e meu namorado Bruno por toda dedicação, carinho e apoio à minha trajetória acadêmico profissional. Nunca medindo esforços para me amparar possibilitando-me atingir minhas metas e ser uma pessoa realizada.

Agradeço a minha avó Nilda, *in memoriam*, pelo amor, doçura e apoio em todos os momentos da minha vida. Com certeza a força para lutar pelos meus sonhos é inspirada na sua história de vida.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Lisiane, Joice, Valéria, Rodrigo, Lucas, Igor, Leonardo e Antônio por todo apoio na execução das tarefas, nas disciplinas e momentos de descontração. Com certeza o apoio, amizade e companhia de vocês foi fundamental, tornando os dias mais leves e alegres. Vocês foram a minha família construída no período do mestrado.

A minha amiga e colega Nariane, por toda força dada durante essa trajetória. Obrigada pelo ombro amigo, pelos conselhos, conversas em que dividíamos anseios, pelos almoços, trabalhos em dupla, estudos... Sua amizade e companhia foi luz para os dias nublados e mais brilho nos dias de sol.

À professora Zaida Inês Antonioli por me orientar desde o período de estágio até o final do mestrado, dedicando muito tempo em correções de trabalhos, ensinamentos, sanando minhas dúvidas e preocupações, mostrando-se disposta a ajudar sempre que precisei. Além disso, mostrar um apoio incondicional em momentos difíceis.

Ao professor Jansen Rodrigo Pereira Santos por aceitar ser meu co-orientador dedicando atenção e tempo na construção do projeto de pesquisa, no ensinamento sobre identificação e taxonomia de nematoides e sempre ter se mostrado disposto a sanar minhas dúvidas e preocupações.

À professora Emanuele, por acompanhar toda minha trajetória desde o primeiro dia da graduação até hoje, me orientando, ensinando e apoiando em todos os momentos.

À Universidade Federal de Santa Maria, ao Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq por oportunizar a realização do mestrado.

A todos o meu muito obrigada.

Primeiro, lembre-se de olhar para as estrelas e não para seus pés. Segundo, nunca desista do seu trabalho. O trabalho dá a você significado e propósito para a vida. Terceiro, se você tiver a sorte de encontrar o amor, lembre-se que está lá e não o jogue fora.

Stephen Hawking

Não tentes ser bem sucedido, tenta antes ser um homem de valor.

Albert Einstein

RESUMO

FITONEMATOIDES ASSOCIADOS A NOGUEIRA-PECÃ NO RIO GRANDE DO SUL E CORRELAÇÃO COM OS ATRIBUTOS DO SOLO

AUTOR: Izabelle Scheffer Romagna

ORIENTADOR: Prof. Dr. Zaida Inês Antonioli

COORDINADOR: Prof. Dr. Jansen Rodrigo Pereira Santos

O Rio Grande do Sul é o maior produtor de noqueira-pecã do país. Essa cultura vem adquirindo espaço em pequenas e médias propriedades em razão da sua lucratividade, longevidade e possibilidade de diversificação de renda. Por se tratar de uma cultura relativamente nova no país, estudos relacionados a nematoides são escassos, embora muito discutido e estudado em outros países produtores. Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo (1) caracterizar gêneros fitoparasitas presentes em solos cultivados com noqueira-pecã, em diferentes regiões produtoras no estado do Rio Grande do Sul, e (2) avaliar a suscetibilidade da noqueira-pecã, cultivar Barton, ao fitonematoide *Mesocriconema xenoplax* (Raski, 1952). Para o estudo I, realizou-se o levantamento dos gêneros de fitonematoides presentes nos solos e nas raízes de noqueira-pecã de doze pomares, localizados em oito municípios do estado (Cachoeira do Sul, Santa Maria, Bento Gonçalves, Catuípe, Ijuí, Anta Gorda, Pantano Grande e Encruzilhada do Sul). Após a coleta, as amostras foram submetidas a análise nematológica e análise do solo. Os gêneros pertencentes à família Criconeematidae foram identificados a nível de espécie por meio de análises morfológicas e morfométricas. A partir da análise nematológica encontrou-se oito gêneros fitoparasitas (*Mesocriconema*, *Criconemoides*, *Discocriconemella*, *Xiphinema*, *Tylenchus*, *Pratylenchus*, *Helicotylenchus* e *Aphelenchoides*), sendo que os gêneros *Mesocriconema* e *Helicotylenchus* foram os mais frequentes e abundantes. Identificou-se as espécies *M. xenoplax*, *Mesocriconema ornatum*, *Criconemoides ixhaphozi* e *Discocriconemella degrissei*. As densidades populacionais dos gêneros *Mesocriconema* e *Criconemoides* apresentaram correlação forte, evidenciando que a mediada que algumas condições favorecem o aumento da densidade de um gênero o mesmo ocorre com o outro. Não foi observada supressão populacional de uma população em detrimento da outra. Além disso, o gênero *Mesocriconema* apresentou correlação negativa com a maioria dos atributos do solo, sugerindo que esses atributos não interferem em sua frequência populacional. Devido a maior frequência do gênero *Mesocriconema* nos pomares analisados, desenvolveu-se o estudo II, no qual mudas de noqueira-pecã, cultivar Barton, foram inoculadas com *M. xenoplax*. Foram avaliados: altura da planta (cm), comprimento da raiz principal (cm), massa fresca do sistema radicular (g), diâmetro do caule (mm), número de nematoides no solo e nas raízes das plantas inoculadas e o fator de reprodução. As mudas de noqueira-pecã, cultivar Barton, foram suscetíveis ao nematoide *M. xenoplax* em condições de casa de vegetação, após 180 dias de inoculação. A presença deste nematoide ocasionou redução da altura, diâmetro do caule, massa fresca e comprimento do sistema radicular das plantas, assim como sintomas acentuados de murcha, clorose e necrose nas mudas. Diante desses resultados, sugere-se o desenvolvimento de novas pesquisas sobre as suscetibilidades das cultivares de noqueira-pecã utilizadas no estado, bem como a caracterização genética dos gêneros associados à cultura.

Palavras-chaves: Nematoides. Barton. *Mesocriconema*. Suscetibilidade.

ABSTRACT

PHYTONEMATIDS ASSOCIATED WITH PECANS IN RIO GRANDE DO SUL AND CORRELATION WITH SOIL ATTRIBUTES

AUTHOR: Izabelle Scheffer Romagna
ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Zaida Inês Antonioli
COORIENTADOR: Prof. Dr. Jansen Rodrigo Pereira Santos

Rio Grande do Sul is the largest pecan producer in the country. This crop is gaining space on small and medium farms because of its profitability, longevity, and possibility of income diversification. Because it is a relatively new crop in the country, studies related to nematodes are scarce, although much discussed and studied in other producing countries. Thus, the present study aimed (1) to characterize phytoparasite genera present in soils cultivated with pecan walnut, in different producing regions in the state of Rio Grande do Sul, and (2) to evaluate the susceptibility of pecan walnut, cultivar Barton, to the phytonematode *Mesocriconema xenoplax* (Raski, 1952). For study I, a survey of phytonematode genera present in soils and roots of pecan nuts from twelve orchards, located in eight municipalities of the state (Cachoeira do Sul, Santa Maria, Bento Gonçalves, Catuípe, Ijuí, Anta Gorda, Pantano Grande and Encruzilhada do Sul) was carried out. After collection, the samples were submitted to nematode analysis and soil analysis. The genera belonging to the family Criconematidae were identified to species level by morphological and morphometric analysis. From the nematode analysis eight phytoparasitic genera were found (*Mesocriconema*, *Criconemoides*, *Discocriconemella*, *Xiphinema*, *Tylenchus*, *Pratylenchus*, *Helicotylenchus* and *Aphelenchoides*), whereby *Mesocriconema* and *Helicotylenchus* were the most frequent and abundant. The species *M. xenoplax*, *Mesocriconema ornatum*, *Criconemoides ixhaphozi* and *Discocriconemella degrissei* were identified. The population densities of *Mesocriconema* and *Criconemoides* showed a strong correlation, showing that as certain conditions favor an increase in the density of one genus, so does the other. No population suppression of one population was observed at the expense of the other. In addition, *Mesocriconema* showed a negative correlation with most soil attributes, suggesting that these attributes do not interfere with its population frequency. Due to the higher frequency of the genus *Mesocriconema* in the analyzed orchards, study II was developed, where pecan walnut seedlings, cultivar Barton, were inoculated with *M. xenoplax*. The following were evaluated: plant height (cm), main root length (cm), root system fresh mass (g), stem diameter (mm), number of nematodes in the soil and roots of inoculated plants and the reproduction factor. Pecan walnut seedlings, cultivar Barton, were susceptible to the nematode *M. xenoplax* under greenhouse conditions after 180 days of inoculation. The presence of this nematode resulted in reduced height, stem diameter, fresh mass and length of the root system of the plants, as well as marked symptoms of wilting, chlorosis and necrosis in the seedlings. In view of these results, we suggest the development of further research on the susceptibility of pecan cultivars used in the state, as well as the genetic characterization of genera associated with the culture.

Keywords: Nematode. Barton. *Mesocriconema*. Susceptibility.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1** - Frequência relativa por amostra (%) de gêneros de fitonematoides presentes em solos cultivados com noqueira-pecã, em oito municípios do Rio Grande do Sul..... 19
- Figura 2** - Fotomicrografia de *Mesocriconema xenoplax* em microscópio óptico: (A) parte anterior do corpo (100x), (B) parte posterior do corpo (100x) e (C) comprimento total do corpo (20x). 23
- Figura 3** - Fotomicrografia de *Mesocriconema ornatum* em microscópio óptico: (A) parte anterior do corpo (100x), (B) parte posterior do corpo (100x) e (C) comprimento total do corpo (20x). 25
- Figura 4** - Fotomicrografia de *Criconemoides ixhaphozi* em microscópio óptico: (A) parte anterior do corpo (100x), (B) parte posterior do corpo (100x) e (C) comprimento total do corpo (40x). 26
- Figura 5** - Análise dos Componentes Principais (PCA) entre a densidade de nematoides parasitas de solo e as propriedades químicas do solo de pomares de noqueira-pecã no estado do Rio Grande do Sul, Brasil..... 28

CAPÍTULO II

- Figura 1** - Altura da parte aérea (APA), em centímetros e diâmetro do caule (DC), em milímetros, de mudas de noqueira-pecã inoculadas com *Mesocriconema xenoplax* (CN) e não inoculadas (SN), no período de 180 dias, em casa de vegetação..... 38
- Figura 2** - Comprimento do sistema radicular (A), em centímetros (cm) e massa fresca do sistema radicular (B), em gramas (g) de mudas de noqueira-pecã na presença e ausência de *Mesocriconema xenoplax* após 180 dias de inoculação..... 40
- Figura 3** - Mudas de noqueira-pecã na presença e ausência do fitonematoide *Mesocriconema xenoplax*. Após 180 dias em casa de vegetação, as mudas inoculadas com *M. xenoplax* apresentaram sintomas acentuados de clorose, seguido de necrose do tecido foliar..... 41

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Código de amostras coletadas em solos cultivados com noqueira-pecã, no estado do Rio Grande do Sul e seus respectivos municípios..... 16

Tabela 2 - Densidades populacionais de fitonematoides por amostra observados em solos cultivados com noqueira-pecã em oito municípios do Rio Grande do Sul.....20

Tabela 3 - Correlação (r Spearman) entre a frequência de gêneros de nematoides fitoparasitas encontrados em pomares de noqueira-pecã no estado do Rio Grande do Sul.29

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Número total de nematoides na raiz, número total de nematoides no solo e fator de reprodução (FR) de *Mesocriconema xenoplax* em mudas de noqueira-pecã (cultivar. Barton) após 180 dias de inoculação.....41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	12
2	CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO DE FITONEMATOIDES EM SOLOS CULTIVADOS COM NOGUEIRA-PECÃ NO RIO GRANDE DO SUL	15
2.1	INTRODUÇÃO	15
2.2	METODOLOGIA	16
2.2.1	Coleta de solo nos pomares de noqueira-pecã	16
2.2.2	Análise química e física do solo	17
2.2.3	Análise nematológica	17
2.2.5	Análise estatística	18
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
2.3	CONCLUSÃO	31
2.4	REFERÊNCIAS	31
3	CAPÍTULO 2 – COMPORTAMENTO DE MUDAS DE NOGUEIRA-PECÃ NA PRESENÇA DE <i>Mesocriconema xenoplax</i> (Raski, 1952)	35
3.1	INTRODUÇÃO	35
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.2.1	Ensaio em casa de vegetação	35
3.2.2	Avaliações morfológicas e nematológicas nas mudas de noqueira-pecã	36
3.2.3	Análise estatística	37
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
3.5	REFERÊNCIAS	42
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
	REFERÊNCIAS	46
	APÊNDICE A – Material Suplementar Capítulo 1	48
	APÊNDICE B - Obtenção de inoculo e análise molecular de nematoides da família Criconematidae	51

1 INTRODUÇÃO GERAL

A noqueira-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch], pertencente à família Juglandaceae, é uma espécie arbórea que ocorre naturalmente no sul dos Estados Unidos e norte do México. A produção desta planta é focada na comercialização dos frutos, que possuem grande interesse comercial e econômico para consumo humano. No Brasil, sua exploração comercial teve início em 1960-1970, nos estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul (RASEIRA, 1990). Atualmente, o Rio Grande do Sul é o estado com maior destaque, em razão do aumento de área plantada, com o equivalente a 9500 hectares, o que representa 70% da área total nacional (PRÓ-PECÃ, 2020). A intensificação da produção de noqueira-pecã neste estado, é em função desta cultura apresentar-se como uma alternativa de diversificação de renda dentro da propriedade, da longevidade produtiva, além de possibilitar sistemas de integração com animais. Além disso, há um grande potencial para a atividade da truficultura que está iniciando no estado (SULZBACHER et al., 2019; FREIBERG, 2022).

A expressão do potencial produtivo da noqueira-pecã pode ser acometida por fatores bióticos, que causam doenças na cultura. Dentre esses fatores, os nematoides parasitas de plantas (fitonematoides) merecem atenção, por se tratar de organismos microscópicos, de difícil diagnóstico e identificação. Os fitonematoides são habitantes naturais do solo, que se associam às plantas superiores, para retirar de seu hospedeiro os nutrientes necessários para sua sobrevivência e reprodução. O resultado dessa associação nematoide/planta hospedeira gera uma série de reações na planta, as quais resultam em perdas significativas na produção. Os prejuízos relatados para esses parasitas no agronegócio mundial chegam a 157 bilhões de dólares (SINGH; HODDA; ASH, 2013). No Brasil, a Associação Brasileira de Nematologia (SBN), relatou que os fitonematoides causaram perdas aproximadas de 35 bilhões de reais por ano, nos mais diversos cultivos agrícolas (SBN, 2017).

Estudos relacionados com a população de gêneros de fitonematoides em solos cultivados com noqueira-pecã, no Brasil e no estado do Rio Grande do Sul ainda são escassos e de difícil acesso. No entanto, desde o século XIX já havia relatos de fitonematoides do gênero *Meloidogyne* em noqueira-pecã nos Estados Unidos e na África do Sul (NYCZEPIR, 2013). O primeiro relato de parasitismo por *Meloidogyne partityla* em noqueira-pecã foi em 1986 (KLEYNHANS, 1986). As mudas de noqueira-pecã infectadas por *M. partityla* apresentam sintomas como áreas irregulares de crescimento atrofiado, amarelecimento de folhas, galhos mortos no dossel superior e galhas nas raízes principais e secundárias (BRITO et al., 2006). A utilização de cultivares menos suscetíveis à infecção por fitonematoides é uma das alternativas

para reduzir os danos causados nas plantas de noqueira-pecã. Nesse sentido, Pinochet et al. (1993) testaram a suscetibilidade de oito cultivares de noqueira-pecã à *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) e *Pratylenchus vulnus* (Allen e Jansen, 1951). Os autores verificaram que a cultivar Candy apresentou o maior nível de parasitismo para *M. javanica* (940 nematoides por grama de raiz) e Cape Fear obteve maior nível de parasitismo para *P. vulnus* (2610 nematoides por grama de raiz).

Além dos fitonematoides pertencentes aos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus*, existem outros gêneros de nematoides parasitas de plantas que causam problemas em espécies perenes e são potenciais patógenos para a noqueira-pecã. O *Mesocriconema xenoplax* (Raski, 1952) é um fitonematoide ectoparasita, com preferência marcante por espécies vegetais lenhosas, perenes, como pinheiros e outras essências florestais, videira, noqueira, ameixeira e em especial pessegueiro (LOOF; DE GRISSE, 1989). Na Itália, existem relatos de que a espécie perene de noqueira-comum (*Juglans regia* L.) têm apresentado danos graves causados por *M. xenoplax*, com sintomas de desenvolvimento e crescimento reduzido, extensas áreas necróticas nas raízes e lesões no floema (CIANCIO; GRASSO, 1997).

Pelo fato do solo ser o habitat dos nematoides parasitas de plantas, o mesmo interfere diretamente sobre o ciclo de vida desses organismos. As intervenções são mediadas através dos aspectos químicos, físicos, biológicos e manejo adotado. Sabe-se que fitonematoides movimentam-se pelo solo, em pequenas distâncias, por filmes de água até encontrar a extremidade de um sistema radicular. Neste sentido, a textura do solo entra como um dos fatores físicos mais importantes para o sucesso no ciclo de vida desses organismos. Solos mais argilosos, com melhor arranjo de microagregados, atingem a capacidade de campo mais rapidamente, dificultando a movimentação dos nematoides, enquanto solos mais arenosos, que possuem alta macroporosidade tendem a favorecer o movimento de água no solo, e conseqüentemente o movimento do nematoide (TIHOHOD, 1993). O pH do solo também pode afetar sua sobrevivência. Embora exista intervalos de tolerância para cada espécie, a maioria dos fitonematoides apresenta uma faixa ótima de pH entre 5,5 e 6,0 (MASSAROTO; YAMASHITA, 2011). Em relação aos teores de nutrientes no solo, sabe-se que plantas bem nutridas apresentam maior tolerância aos danos causados pelos fitonematoides (MELAKEBERHAN et al., 1997). Contudo, quanto melhor a planta se desenvolver devido uma boa disponibilidade de nutrientes, e maior for seu sistema radicular, maior será a multiplicação dos fitonematoides em um hospedeiro suscetível. Além disso, algumas espécies apresentam correlação direta com a disponibilidade de determinados nutrientes, evidenciando uma área de pesquisa com potencial a ser melhor explorado.

Apesar dos relatos de ocorrência e danos de gêneros fitoparasitas associados a noqueira-pecã em outros países, o conhecimento sobre fitonematoides nas condições de clima e solo das principais regiões produtoras do Rio Grande do Sul – Brasil ainda não é bem investigado. A caracterização de gêneros fitoparasitas presentes no solo é fundamental para a definição de outros estudos como por exemplo, a reação de diferentes cultivares na presença de determinados gêneros, o comportamento do ciclo juvenil da cultura na presença de fitonematoides, a maior suscetibilidade à doenças de solo pela exposição da raiz com a infecção e possíveis perdas na produtividade, entre outros. Diante disso, objetivou-se nesse trabalho (1) caracterizar gêneros fitoparasitas presentes em solos cultivados com noqueira-pecã em diferentes regiões produtoras no estado do Rio Grande do Sul e (2) avaliar a suscetibilidade da noqueira-pecã, cultivar Barton, ao fitonematoide *Mesocriconema xenoplax* (Raski, 1952).

2 CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO DE FITONEMATOIDES EM SOLOS CULTIVADOS COM NOGUEIRA-PECÃ NO RIO GRANDE DO SUL¹

2.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a pecanicultura expandiu-se de forma significativa no Rio Grande do Sul, colocando o estado em primeiro lugar no ranking brasileiro de produção de noz-pecã (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch (Juglandaceae) (Barros et al., 2018). A expansão dessa cultura no estado é reflexo da excelente remuneração que a atividade oferece e da possibilidade de diversificação de renda dentro da propriedade. Desta forma, as pesquisas associadas a esta cultura se intensificaram voltando-se principalmente à adaptabilidade de cultivares e à resistência as principais doenças de sintomas visíveis, como antracnose e sarna da noqueira-pecã (Terabe et al., 2008; Martins et al., 2018; Crosa et al., 2020;). No entanto, dados e pesquisas relacionadas a ocorrência de fitonematoides associados a essa cultura no Brasil ainda são inexistentes.

As áreas agrícolas atualmente ocupadas por pomares de noqueira-pecã, no passado, em sua grande maioria, eram utilizadas para pastagens, com diversas gramíneas e/ou campo nativo. Muitas dessas áreas encontravam-se abandonadas ou em situação de degradação (Otiz & Camargo, 2005). Assim, naturalmente poderiam estar com altos índices populacionais de fitonematoides, uma vez que podem estar sob uma situação de desequilíbrio ecológico.

Além disso, é possível que as mudas de pomares pioneiros no país, oriundas de outros países, em especial os Estados Unidos, possam ter sido introduzidas no Brasil com a presença de nematóides. Nos Estados Unidos, por exemplo, são comuns os relatos de fitonematoides parasitando a noqueira-pecã e causando danos nas plantas, principalmente o gênero *Meloidogyne* (Hendrix & Powell, 1968; Carithers, 1978; Johnson, 1986). Dentro deste gênero, a espécie *Meloidogyne partityla* parece apresentar especificidade em hospedar a noqueira-pecã, e sua infecção é associada a doença “*mouse ear disorder*” (Nyczepir et al., 2004). Portanto, as mudas oriundas dos Estados Unidos estabelecidas em pomares pioneiros no Brasil, possuíam um alto potencial de introdução de *Meloidogyne* em áreas hipoteticamente isentas deste patógeno. Também, outros gêneros comumente reportados em solos do Rio Grande do Sul já foram reportados hospedando a noqueira-pecã, tais como *Pratylenchus* no sudeste dos Estados Unidos (Pinhochet, 1993) e *Mesocriconema* na Itália (BRITO et al., 2006).

¹ Artigo submetido para a revista European Journal of Plant Pathology. As referências estão conforme normas dessa revista.

Os danos causados por fitonematoides podem atacar de maneira distinta o sistema produtivo. Podendo ocorrer de forma direta, quando relacionado com o processo de infecção, ou indireta, quando expõe o sistema radicular da planta à infecção por outros patógenos. Considerando que, há várias possibilidades de entrada de fitonematoides em pomares de noqueira-pecã no Brasil, e a representatividade do Rio Grande do Sul na produção de noz pecã estudos sobre a caracterização desses organismos tornam-se necessários. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo caracterizar as populações de fitonematoides, além de verificar a associação de gêneros de fitonematoides com propriedades do solo e a correlação entre os gêneros presentes em solos cultivados com noqueira-pecã no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Coleta de solo nos pomares de noqueira-pecã

A coleta de solo foi realizada em 12 propriedades distribuídas em oito municípios do Rio Grande do Sul (Tabela 1). As coletas procederam-se em uma área amostral de aproximadamente 0,5 hectares, amostrando-se 12 árvores por pomar, com a distribuição de duas plantas por fileira, próximo a projeção da copa e a uma profundidade de 0-20 cm (Material Suplementar). As árvores da bordadura foram eliminadas da coleta. Cada amostra foi composta por duas subamostras, homogeneizadas formando a amostra de trabalho, e identificadas com o número conforme ordem de coleta. Aproximadamente um kg de solo mais raízes foi amostrado, os quais foram armazenados a 4°C até seu processamento.

Tabela 1 - Código de amostras coletadas em solos cultivados com noqueira-pecã, no estado do Rio Grande do Sul e seus respectivos municípios.

<i>Código da amostra</i>	Município	Coordenadas Geográficas
<i>NP1</i>	Cachoeira do Sul	30°02'21"S 52°53'38"W
<i>NP2</i>	Santa Maria	29°41'02"S 53°48'25"W

NP3	Bento Gonçalves	29°10'26"S 51°31'7"W
NP4	Catuípe	28°15'41"S 54°0'9"W
NP5	Ijuí	28°23'16"S 53°54'53"W
NP6	Anta Gorda	28°57'31"S 51°59'45"W
NP7	Santa Maria	29°41'02"S 53°48'25"W
NP8	Cachoeira do Sul	30°02'21"S 52°53'38"W
NP9	Cachoeira do Sul	30°02'21"S 52°53'38"W
NP10	Cachoeira do Sul	30°02'21"S 52°53'38"W
NP11	Pantano Grande	30°11'25"S 52°22'24"W
NP12	Encruzilhada do Sul	30°31'37"S 52°31'6"W

2.2.2 Análise química e física do solo

Uma amostra de solo composta, formada a partir das amostras de solo de cada pomar de noqueira-pecã, foi destinada para avaliação de propriedades químicas do solo. Foram analisados o percentual de argila (densímetro), pH em H₂O (água 1:1), os teores disponíveis de P e K (Mehlich-1), Al³⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺ trocáveis (KCl 1 mol L⁻¹), Cu and Zn (HCl 0.1 M), and S [Ca(H₂PO₄)], boro (H₂O) e matéria orgânica do solo conforme o método Walkley-Black. All soil chemical analyses were performed according to Tedesco et al., (1995).

2.2.3 Análise nematológica

O processamento das amostras de solo para a análise nematológica foi realizada conforme a metodologia descrita por Jenkins (1964). Após extração dos nematoides do solo

pelo método de flotação centrífuga em solução de sacarose, os nematoides foram mortos em banho maria em uma temperatura de 54°C, durante cinco minutos, e fixados em solução Golden 2X (formalina: glicerina: água a 16:4:80) para sua conservação. Sob microscópio óptico, em uma câmara de Peters, foram contabilizados o número de espécimes por gênero de fitonematoides presentes em cada amostra. Para a identificação de nematoides pertencentes a família Criconematidae, utilizou-se a chave taxonômica proposta por Geraert (2010) e para os demais gêneros a chave taxonômica de Ferraz (2012).

2.2.3.1 Análises morfológicas e morfométricas de gêneros pertencentes à família Criconematidae

Análises morfológicas e morfométricas foram realizadas para confirmar a identificação em nível de gênero dos nematoides anelados, pertencentes à família Criconematidae, e partir dessa determinação realizar a classificação a nível de espécie. Para tanto, as amostras foram infiltradas (Cares & Huang, 2008), seguido da confecção de lâminas permanentes para observação em microscópio de estruturas morfológicas e mensuração morfométrica. Utilizou-se as chaves de identificação taxonômica a nível de gênero e de espécie proposta por Geraert (2010). As observações e mensurações foram realizadas com objetivas de 10x, 20x e 40x, e objetiva de imersão de 100x, através do Software LAZ EZ (Leica, Germany), que também foi utilizado para micrografias. Pelo menos dez espécimes de cada amostra foram analisados, e os parâmetros utilizados nas medições foram: EST - comprimento do estilete (μm); L - comprimento total do corpo (μm); R - número total de anéis do corpo; Rex - número do anel onde está localizado o poro excretor; RV - número do anel localizado na vulva; RVan - número do anel localizado no ânus; VL/VB - distância da vulva até a extremidade do corpo dividido pela largura do corpo onde a vulva está localizada.

2.2.5 Análise estatística

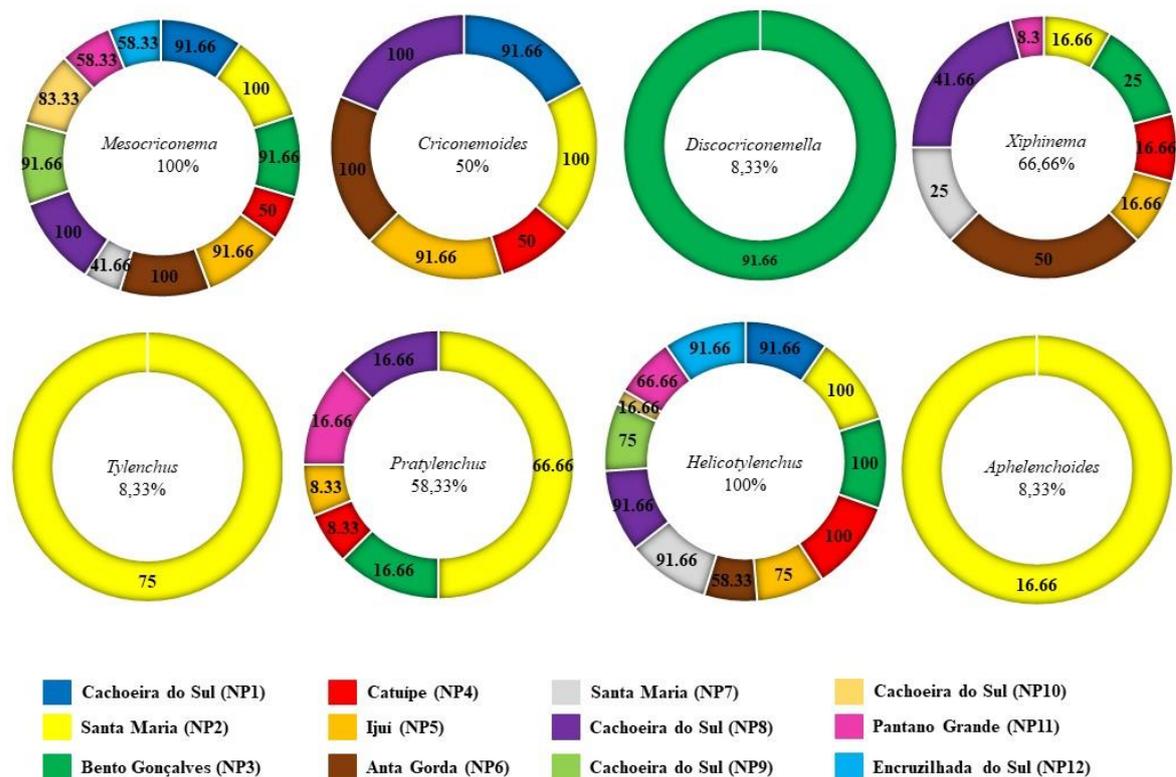
Após o levantamento e identificação de gêneros fitoparasitas presentes nas principais regiões produtoras de noqueira-pecã do Rio Grande do Sul, os dados obtidos foram utilizados para calcular a frequência relativa (%) e a densidade populacional (nematoides 200cm^{-3} de solo) de gêneros fitonematoides. Os dados morfométricos foram submetidos à análise descritiva, por meio da média e desvio padrão. A densidade populacional dos gêneros de fitonematoides encontrados e as propriedades químicas e físicas solo foram submetidos a Análise dos Componentes Principais (PCA). Os dados de frequência por gênero foram submetidos a análise

de correlação de Spearman. A interpretação dessa relação seguiu o proposto por Rumsey (2016), sendo: $r > 0,30$ correlação fraca; $r > 0,50$ correlação moderada; $r > 0,7$ correlação forte. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio de Software R Studio (R Core Team, 2021).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Oito gêneros de nematoides parasitas de plantas (*Mesocriconema*, *Criconemoides*, *Discocriconemella*, *Xiphinema*, *Tylenchus*, *Pratylenchus*, *Helicotylenchus* e *Aphelenchoides*) foram observados entre os doze locais amostrados no estado do Rio Grande do Sul. Dos gêneros encontrados, *Mesocriconema* e *Helicotylenchus* estiveram presentes em todas os locais coletados (Figura 1). Na sequência, os gêneros *Pratylenchus* e *Xiphinema* foram os mais frequentes seguidos de *Criconemoides* e *Discocriconemella*. Os gêneros menos frequentes foram *Aphelenchoides* e *Tylenchus*. A densidade populacional entre os diferentes locais avaliados foi variável, entre local e entre os gêneros (Tabela 2). O gênero *Helicotylenchus* apresentou como densidade máxima 1707 nematoides 200cm^{-3} de solo, no município de Santa Maria, e densidade média de 384 nematoides 200cm^{-3} de solo. Os valores encontrados de densidade máxima e densidade média para este gênero foram os maiores observados neste estudo.

Figura 1 - Frequência relativa por amostra (%) de gêneros de fitonematoides presentes em solos cultivados com noqueira-pecã, em oito municípios do Rio Grande do Sul.



*Valores indicados por cores, dentro do círculo, referem-se ao percentual de frequência de cada município, obtido através das dozes amostras coletadas por local. Valores percentuais localizados no meio do círculo, refere-se à frequência obtida dentro dos locais coletados (doze locais localizados em oito municípios).

Tabela 2 - Densidades populacionais de fitonematoides por amostra observados em solos cultivados com noqueira-pecã em oito municípios do Rio Grande do Sul.

Município	Densidade (nematoides 200cm ⁻³ de solo)							
	<i>Meso</i> ^[1]	<i>Cricos</i>	<i>Discoa</i>	<i>Xiphi</i>	<i>Tyle</i>	<i>Praty</i>	<i>Heli</i>	<i>Aphe</i>
Cachoeira do Sul	208	77	0	0	0	0	122	0
Santa Maria	160	99	0	5	188	83	1707	3
Bento Gonçalves	53	0	175	17	0	7	458	0
Catuípe	10	26	0	7	0	3	598	0
Ijuí	123	86	0	72	0	2	140	0
Anta Gorda	99	10	0	167	0	10	67	0
Santa Maria	53	0	0	13	0	0	128	0
Cachoeira do Sul	473	53	0	10	0	7	243	0
Cachoeira do Sul	225	0	0	0	0	0	50	0
Cachoeira do Sul	72	0	0	0	0	0	8	0

Pantano Grande	87	0	0	2	0	5	48	0
Encruzilhada do Sul	52	0	0	0	0	0	1033	0
Densidade média	134	29	15	24	16	10	384	0

*A densidade populacional foi determinada pela média ponderada obtida entre as doze amostras coletadas por local. A densidade média foi obtida através da média ponderada englobando os valores dos doze locais amostrados. ^[1] *Meso*: *Mesocriconema*; *Crico*: *Criconemoide*; *Disco*: *Discocriconemella*; *Xiphi*: *Xiphinema*; *Tyle*: *Tylenchus*; *Praty*: *Pratylenchus*; *Heli*: *Helicotylenchus*; *Aphe*: *Aphelenchoides*.

O segundo gênero com valor de densidade média foi o *Mesocriconema* (134 nematoides 200cm⁻³ de solo), no entanto, sua densidade máxima foi a segunda maior (473 nematoides 200cm⁻³ de solo, no município de Cachoeira do Sul). *Criconemoide* foi o terceiro maior em relação a densidade média, com densidade máxima de 99 nematoides 200cm⁻³ de solo. Embora o gênero *Tylenchus* tenha apresentado baixa frequência (8,33%), nas amostras onde verificou-se esse nematoide, sua densidade máxima foi a terceira maior (188 nematoides 200cm⁻³ de solo, município de Santa Maria) seguido do gênero *Discocriconemella* (175 nematoides/200cm³ de solo, município de Bento Gonçalves). *Pratylenchus* e *Aphelenchoides* apresentaram os menores valores de densidade máxima (83 e 3 nematoides 200cm⁻³ de solo, respectivamente) (Tabela 2).

A variação observada entre as amostras do mesmo local, e entre os diferentes locais, tanto para os dados de frequência como para os dados de densidade, são comumente encontrados para esse tipo de organismo, uma vez que possuem baixa mobilidade no solo e acabam concentrando-se em reboleiras dentro de uma área (Ansari & Khan, 2012, Lima et al., 2013, Brait et al., 2020). Apesar disso, este estudo permite selecionar os grupos mais frequentes e populosos nos solos cultivados com noqueira-pecã no estado do Rio Grande do Sul. Esse conhecimento é inédito para a cultura e os resultados poderão nortear futuras investigações sobre a relação desses grupos de organismos com a cultura.

O gênero *Helicotylenchus* é reportado em outros levantamentos com culturas perenes, hortaliças anuais e campos nativos. Os nematoides pertencentes a este gênero são amplamente distribuídos por todo território brasileiro, no entanto, são raros os estudos que abordem a patogenicidade destes nematoides em culturas perenes, como a noqueira-pecã (Divers et al., 2019, Riascos-Ortiz et al., 2020). O *Xiphinema* é um ectoparasita reportado em diversas culturas perenes como maçã, pêssigo e videira (Nyczepir & Lamberti, 2001; Vanzyl et al., 2011; Lone et al., 2012). Os danos mais relevantes causados por representantes deste gênero estão relacionados a transmissão de vírus fitopatogênicos (Decraemer & Robbins, 2007). No Arkansas, *Xiphinema americanum* já foi relatado na noqueira-pecã, através de levantamentos

populacionais (Weimin & Robbins, 2010), todavia pouco se sabe dos danos que esses nematoides podem causar para a cultura.

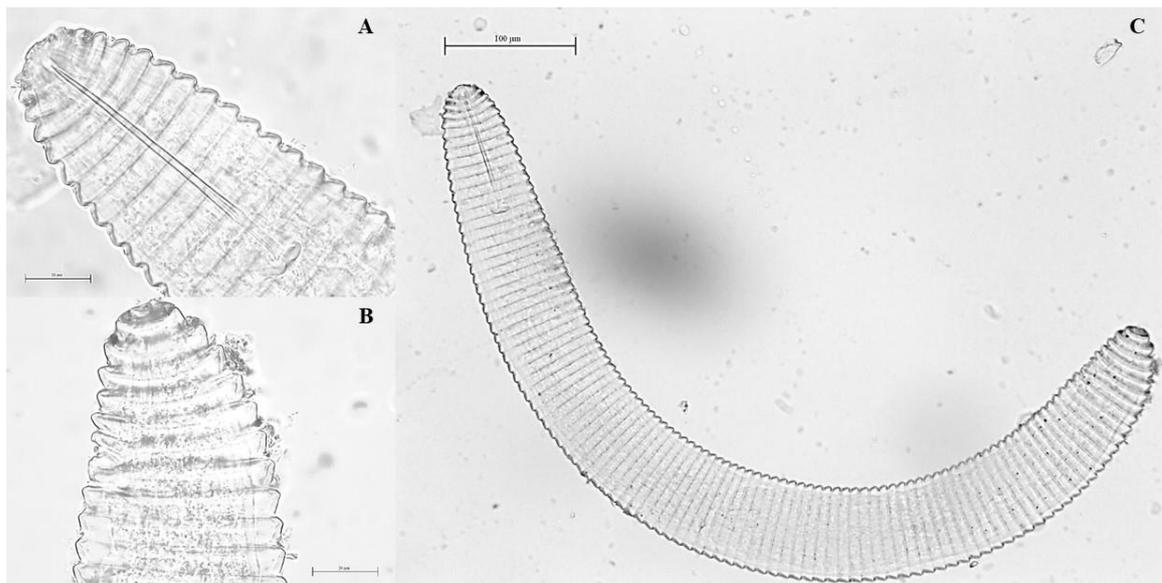
Uma espécie do gênero *Pratylenchus*, o *Pratylenchus vulnus*, já foi reportada em noqueira-pecã e noqueira-comum, causando lesões no sistema radicular de plantas jovens (Allen & Jansen, 1951; Leslie & McGranahan, 2014). *Aphelenchoides*, por sua vez, é um parasita de plantas ornamentais, morango, cogumelo, alho, arroz, amendoim, soja, entre outros (Singh et al., 2013). Contudo, a frequência e densidade populacional deste gênero foi extremamente baixa neste estudo, sendo pouco provável que esse nematoide possa causar danos na cultura. Além disso, várias espécies do gênero *Aphelenchoides*, na ausência de plantas hospedeiras, podem sobreviver no solo alimentando-se de fungos (Pederson & Quesenberry, 1998).

Os nematoides pertencentes à família Criconematidae foram classificados a nível de espécie, devido ao potencial que possuem em parasitar plantas perenes lenhosas. A família Criconematidae é morfologicamente conhecida pela presença de anelações grossas em sua cutícula, tratando-se de profundas incisuras transversais distantes uma das outras (Cares & Huang, 2001). O número de anéis e a presença de várias ornamentações como escamas, espinhos, franjas, placas, crenações entre outras, são características utilizadas para distinguir as espécies taxonomicamente. A partir das análises morfológicas e morfométricas, observou-se a presença de duas subfamílias (Geraert, 2010): Macroposthoniinae (Skarbilovich, 1959) dos gêneros *Mesocriconema* e *Criconemoides* e, Discocriconemellinae (Williams, 1981) do gênero *Discocriconemella*. A primeira subfamília é caracterizada pela presença de uma cutícula lisa, vulva aberta ou fechada, sendo que a cutícula dos juvenis, geralmente, não difere das fêmeas, apenas apresentando um número maior de crenações. Já a segunda subfamília, possui a característica principal de anéis bem desenvolvidos na região da cabeça, em sua grande maioria em forma de disco (Geraert, 2010).

Duas espécies foram identificadas dentro do gênero *Mesocriconema*, *Mesocriconema xenoplax* e *Mesocriconema ornatum*, uma espécie do gênero *Criconemoides* (*Criconemoides ixhaphozi*) e uma espécie do gênero *Discocriconemella* (*Discocriconemella degrissei*). O gênero *Mesocriconema* é frequentemente relatado na literatura como *Criconemoides* (Raski, 1952). No entanto, neste estudo os dois gêneros são classificados distintamente. *Mesocriconema* é caracterizado pelas fêmeas apresentarem vulva aberta, enquanto, *Criconemoides* apresenta a vulva fechada. Já *Discocriconemella* possui a cabeça em forma de disco, sem lobos submedianos.

Nematoides pertencentes ao gênero *Mesocriconema* identificados neste estudo morfometricamente e morfologicamente, se relacionaram com os dados publicados por Geraert (2010) (Figura 2, Material Suplementar). O seu diagnóstico é dado pela presença de anéis retosos, margens lisas, irregulares ou crenadas, sem apêndices posteriores. O primeiro anel da cabeça raramente é separado, no entanto, observa-se ele mais largo que o segundo. Lobos submedianos presentes, vulva aberta, lábio vulvar anterior ornamentado. O corpo pós-vulvar geralmente curto, apresentando terminal redondo ou truncado, raramente agudo. Este gênero parasita uma ampla gama de hospedeiros, com preferência marcante por culturas perenes, incluindo a noqueira (Loff & De Grise, 1989). Seus danos são relacionados diretamente com o parasitismo e com a maior suscetibilidade da planta a demais patógenos do solo, devido ao ferimento radicular.

Figura 2 - Fotomicrografia de *Mesocriconema xenoplax* em microscópio óptico: (A) parte anterior do corpo (100x), (B) parte posterior do corpo (100x) e (C) comprimento total do corpo (20x).



Fonte: A autora.

A espécie *M. xenoplax*, observada em todos os locais amostrados, possui características como estilete robusto, vagina sempre sinusoidal, lábio vulvar variável geralmente com duas projeções pontiagudas, corpo pós-vulvar cônica a arredondada. Na África do Sul o *M. xenoplax* é frequentemente relatado em noqueiras, associado a sintomas de estresse na planta, como por exemplo raquitismo (Kleynhans, 1986). Nyczepir e Wood (2008) verificaram que a inoculação de *M. xenoplax* em mudas de noqueira-pecã, reduziu o crescimento do sistema radicular da

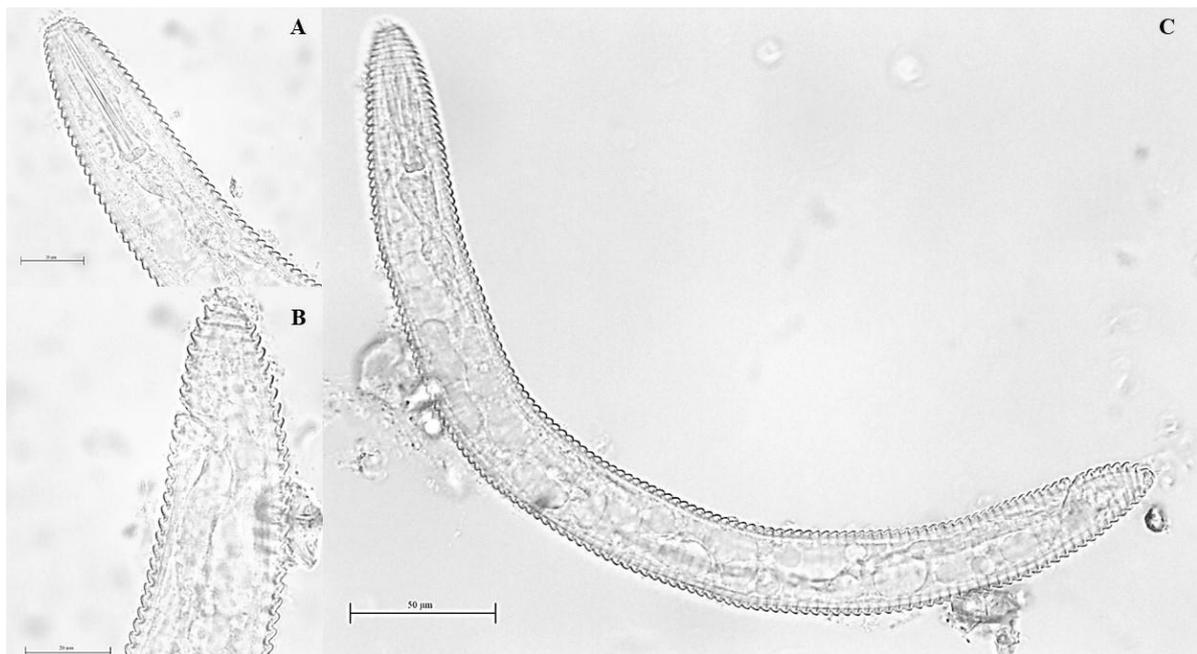
planta após 37 meses. Ao que se sabe, essa é a primeira vez que *M. xenoplax* é reportado em solos cultivados com noqueira-pecã no Brasil. Esses dados, emitem um alerta para demanda de mais estudos que investiguem a relação de *M. xenoplax* com essa cultura, visto que esse nematoide está amplamente distribuído nos locais amostrados.

Assim, existe uma lacuna no conhecimento sobre os danos que esse organismo pode causar a curto e longo prazo, sua relação com as cultivares utilizadas no Brasil e com as especificidades edafoclimáticas deste país. Também é estudado como a presença de *M. xenoplax* interfere na população de *M. partityla*, e na doença popularmente chamada de “*mouse-ear*”. Sabe-se que os sintomas dessa doença estão relacionados a distúrbios nutricionais de níquel (Ni) e que são intensificados na presença desses nematoides. No Brasil *M. partityla* ainda não foi relatado, no entanto, outras espécies do gênero *Meloidogyne* são comumente encontradas em diversas culturas. Nyczepir e Wood (2008), testaram a relação de ambos nematoides na incidência da doença “orelha de rato” e constataram que na coinfeção desses nematoides, *M. partityla* reduz a população de *M. xenoplax*. Porém ao testarem *M. xenoplax* de forma isolada, perceberam uma redução do desenvolvimento radicular da planta. No entanto, ainda são necessários mais estudos para explicar de forma concisa a real relação desses nematoides com a “*mouse-ear*”. Vale ressaltar que na literatura, os danos mais frequentes relatados com nematoides nesta cultura, são com *M. partityla*, uma espécie, ao que parece, com especificidade em hospedar a noqueira-pecã. No entanto, neste estudo não foi possível verificar a presença de nenhuma espécie de nematoide pertencente ao gênero *Meloidogyne*.

A espécie *M. ornatum* também foi identificada neste trabalho (Figura 3, Material Suplementar), no entanto, ocorreu de forma isolada, sendo observada apenas em um local de coleta (município Pantano Grande). O *M. ornatum* é caracterizado morfológicamente pela presença de um contorno arredondado na cabeça, disco labial elevado e conspícuo. O retalho anterior vulvar forma dois pontos distintos, com contorno pontiagudo da aba anterior da vulva, e o término da cauda é arredondada, quase truncada. Em espécies florestais, existem estudos evidenciando problemas na cultura do mirtilo (*Vaccinium myrtillus*, L.), devido à presença de alta densidade populacional de *M. ornatum*. O crescimento deficiente da planta, a mortalidade e o declínio prematuro do pomar de mirtilo são sintomas aparentes e comumente denominados de “*Blueberry replant disease*” (BRD) (Jagdale et al., 2013). No amendoim esse nematoide é frequentemente relatado causando lesões necróticas no sistema radicular e nos frutos (BOYLE, 1950). Com o avanço da doença, as plantas tornam-se atrofiadas e cloróticas, provocando a doença popularmente conhecida como “*peanut yellows*”. A espécie de gramados domésticos (*Eremochloa ophiuroides*, (Munro) Hack), também é acometida por *M. ornatum*, que retarda

seu crescimento a partir de 60 nematoides 100cm^{-3} de solo (Ratanaworabhan & Smart, 1970). Apesar de relatos deste nematoide parasitar outras culturas, ainda não se sabe o potencial que a noqueira-pecã possui em hospedar esse parasita.

Figura 3 - Fotomicrografia de *Mesocriconema ornatum* em microscópio óptico: (A) parte anterior do corpo (100x), (B) parte posterior do corpo (100x) e (C) comprimento total do corpo (20x).

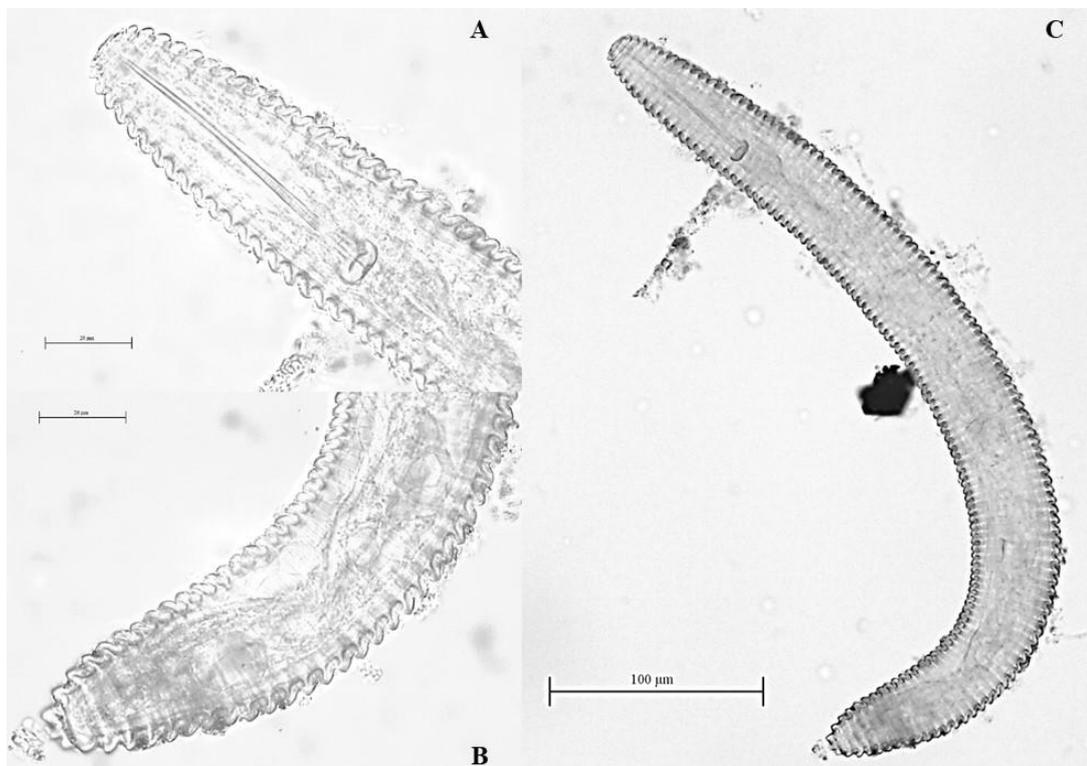


Fonte: A autora.

O nematoide *C. ixhaphozi* foi identificado em seis dos doze locais amostrados, sendo a única espécie identificada dentro deste gênero (Figura 4, Material Suplementar). Exemplos pertencentes ao gênero *Criconemoides* não apresentam placa labial, vulva fechada, lábio anterior geralmente não saliente e nem ornamentado. O corpo pós-vulvar é curto, conóide ou cilíndrico, com terminal arredondado, conóide ou agudo. A espécie *C. ixhaphozi* apresenta cauda cônica, quase toda reta e anéis lisos. Na literatura, encontra-se relatos desta espécie presente em pântanos na província costeira da África do Sul (Schoeman et al., 2007). Os relatos deste nematoide, são escassos, e pouco se sabe sobre a sua interação com plantas cultivadas comercialmente. Contudo, vários trabalhos têm descrito a patogenicidade de *Criconemoides* em diferentes espécies de plantas cultivadas, pois ao se observar de forma mais detalhada, verifica-se que atualmente, esse nematoide é classificado taxonomicamente como *Mesocriconema*, com base em características morfológicas e morfométricas. Neste sentido, devido as várias alterações de classificação taxonômica de integrantes pertencentes à família Criconematidae,

torna-se inconsistente utilizar dados publicados que relacionam a patogenicidade de *Criconemoides*, visto que, a maioria deles se referem ao atual *Mesocriconema*. Desta forma, evidencia-se que estudos investigativos com este gênero, em diversos hospedeiros, são necessários para entender de forma cientificamente segura a patogenicidade de *Criconemoides*.

Figura 4 - Fotomicrografia de *Criconemoides ixhaphozi* em microscópio óptico: (A) parte anterior do corpo (100x), (B) parte posterior do corpo (100x) e (C) comprimento total do corpo (40x).



Fonte: A autora.

O nematoide *D. degrissei* foi identificado em um dos pomares amostrados (Bento Gonçalves). Os dados morfológicos e morfométricos (Material Suplementar) coincidem com as medidas propostas por Geraert (2010). *D. degrissei* é caracterizado pela presença de anéis corpo com margens posteriores lisas, e o disco da cabeça é emarginado dorsal, ventralmente e lateralmente, resultando em um formato quadrilobado. O poro excretor localiza-se logo atrás da base da faringe, a vulva é fechada, e a vagina sigmoide. A cauda é arredondada finalizando em dois lóbulos (Geraert, 2010). No Brasil, esse nematoide já foi relato em pastagens de braquiária (Silva et al., 2008), e na cultura do café (Rashid et al., 1989). No entanto, seu parasitismo ainda é pouco conhecido e explorado na literatura.

Com base nos dados obtidos neste estudo, e a importância que a noqueira-pecã representa para o estado do Rio Grande do Sul, estudos envolvendo os gêneros/espécies encontrados nos solos dos pomares amostrados são necessários para entender melhor a capacidade da cultura em hospedar esses fitonematoides. Ressalta-se que a interação desses organismos com seu hospedeiro pode ocorrer de maneiras distintas. Os danos podem ser mais evidentes em fase de muda, ou ainda, necessita de anos para que seja possível observar declínio no pomar. Em razão da noqueira-pecã ser uma cultura perene, necessita-se de um período mais longo de pesquisa para obter respostas bem fundamentadas sobre os fitonematoides. Por isso, estes resultados representam o passo inicial para novos estudos, podendo-se futuramente construir conhecimento sólido de cunho científico da relação desta cultura com nematoides parasitas de plantas.

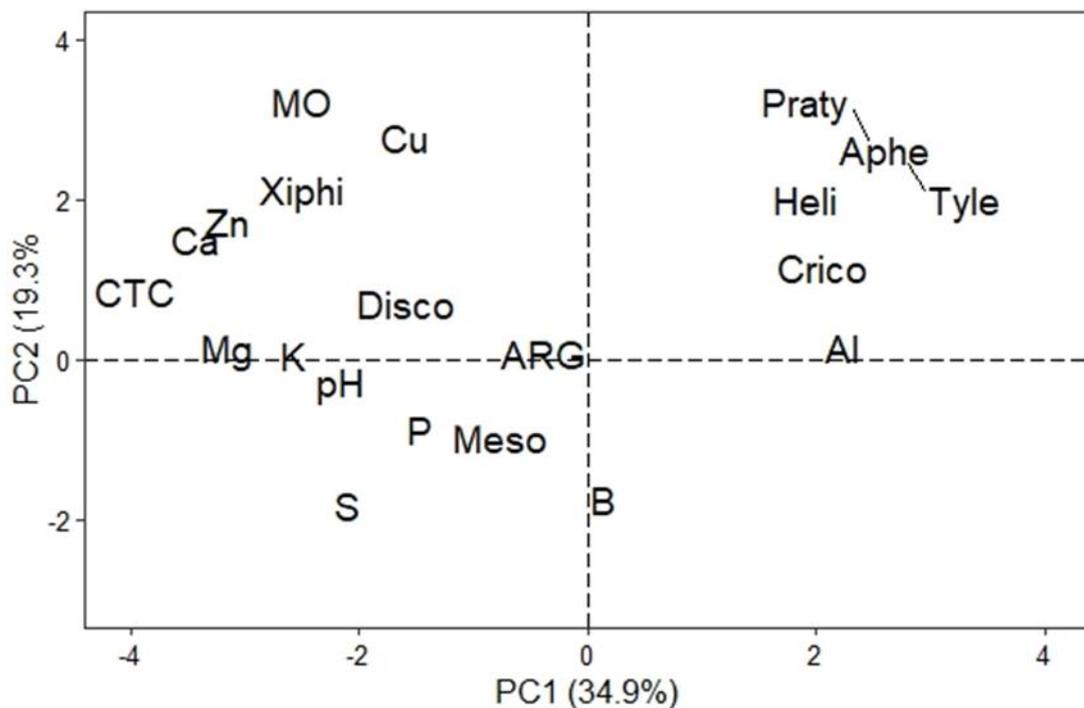
Além disso, ressalta-se que os ciclos agrícolas interferem diretamente na diversidade de nematoides presentes em uma determinada área, pois estes necessitam de alimento (planta hospedeira) para completarem seu ciclo de vida, e devem ser capazes de mover-se livremente pela solução do solo, em busca de seus hospedeiros. Desta forma, a textura, a umidade e os demais atributos do solo, junto com a disponibilidade de alimento são aspectos críticos na determinação de populações de comunidades de nematoides (Nisa et al., 2021).

Ao relacionar os atributos do solo com a densidade dos gêneros de fitonematoides, observou-se que a análise dos componentes principais (PCA) explicou 54,2% da variabilidade total dos dois principais componentes, onde o primeiro componente (PC1) representou 34,9% da variação total e o segundo componente (PC2) 19,3% (Figura 5). Observa-se que os gêneros *Discocriconemella* e *Xiphinema* estão associados positivamente com a matéria orgânica (MO), capacidade de troca de cátions (CTC), teor de argila (ARG), cobre (Cu), zinco (Zn), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e potássio (K). No entanto, estes os gêneros apresentam-se negativamente relacionados ao pH, fósforo (P) e enxofre (S), enquanto o gênero *Mesocriconema* (Meso) apresenta-se relacionado positivamente com tais atributos do solo. *Pratylenchus*, *Helicotylenchus*, *Tylenchus*, *Criconemoides* e *Aphelenchoides* apresentam correlação positiva com alumínio (Al). Essas associações positivas e negativas nos permitem avaliar como as mudanças nas características do solo podem favorecer ou desfavorecer a densidade populacional de determinado gênero.

Alguns gêneros de nematoides, parecem não se correlacionar com os atributos do solo, podendo apresentar densidades populacionais altas mesmo em situações desfavoráveis para a maioria das plantas, como por exemplo, a correlação alta positiva encontrada entre os gêneros *Pratylenchus*, *Helicotylenchus*, *Tylenchus*, *Criconemoides* e *Aphelenchoides* com Al, um

elemento altamente tóxico para as plantas. O *Mesocriconema*, nematoide mais frequentemente encontrado neste estudo, apresentou correlação negativa com a maioria dos atributos químicos do solo (MO, ARG, CTC, Ca, Mg, Zn, Cu), sugerindo com que os nematoides deste gênero se desenvolvam bem mesmo em situações de solos quimicamente pobres.

Figura 5 - Análise dos Componentes Principais (PCA) entre a densidade de nematoides parasitas de solo e as propriedades químicas do solo de pomares de noqueira-pecã no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.



Mesocriconema (Meso), *Criconemoides* (Crico), *Discocriconemella* (Disco), *Xiphinema* (Xiphe), *Tylenchus* (Tyle), *Pratylenchus* (Praty), *Helicotylenchus* (Heli) e *Aphelenchoides* (Aphe), CTC (Capacidade de Troca de Cátions), pH (Potencial de Hidrogênio), ARG (Argila), Al (Alumínio), B (Boro), S (Enxofre), P (Fósforo), K (Potássio), Mg (Magnésio), Ca (Cálcio), Zn (Zinco), MO (Matéria Orgânica) Cu (Cobre).

A correlação de Spearman foi significativa ($r=7,0$) entre os gêneros *Criconemoides* e *Mesocriconema*, e *Aphelenchoides* e *Tylenchus*. Foi moderada ($r=0,5$ a $0,6$) para *Pratylenchus* e *Mesocriconema*, e *Xiphinema* e *Pratylenchus*. Para as demais correlações, todas apresentaram $r \leq 0,30$ (Tabela 2). Em termos biológicos, toda correlação de Spearman com r positivo e ≥ 7 indica que os gêneros em comparação possuem suas populações aumentadas em sincronia. O

contrário é observado quando o r é negativo, indicando que à medida que um gênero aumenta sua população o outro é suprimido.

Tabela 3 - Correlação (r Spearman) entre a frequência de gêneros de nematoides fitoparasitas encontrados em pomares de nogueira-pecã no estado do Rio Grande do Sul.

Genêros	<i>Meso</i>	<i>Crico</i>	<i>Disco</i>	<i>Xiphi</i>	<i>Tyle</i>	<i>Praty</i>	<i>Heli</i>	<i>Aphe</i>
<i>Meso</i> ^[1]	1.0	0.7	-0.1	0.3	0.4	0.6	0.0	0.4
<i>Crico</i>	0.7	1.0	-0.4	0.5	0.4	0.5	0.1	0.4
<i>Disco</i>	-0.1	-0.4	1.0	0.0	-0.1	0.0	0.4	-0.1
<i>Xiphi</i>	0.3	0.5	0.0	1.0	0.0	0.6	0.2	0.0
<i>Tyle</i>	0.4	0.4	-0.1	0.0	1.0	0.5	0.4	1.0
<i>Praty</i>	0.6	0.5	0.0	0.6	0.5	1.0	0.3	0.5
<i>Heli</i>	0.0	0.1	0.4	0.2	0.4	0.3	1.0	0.4
<i>Aphe</i>	0.4	0.4	-0.1	0.0	1.0	0.5	0.4	1.0

^[1] *Meso*: *Mesocriconema*; *Crico*: *Criconemoides*; *Disco*: *Discocriconemella*; *Xiphi*: *Xiphinema*; *Tyle*: *Tylenchus*; *Praty*: *Pratylenchus*; *Heli*: *Helicotylenchus*; *Aphe*: *Aphelenchoides*.

Como citado anteriormente, os estudos relacionando diferentes gêneros pertencentes à família Criconematidae são escassos e algumas vezes controversos, principalmente em função da chave taxonômica ter sido alterada várias vezes e haver divergências entre os cientistas da área. A correlação forte e positiva encontrada entre *Mesocriconema* e *Criconemoides* afirmar que à medida que o ambiente favorece o aumento da frequência populacional de *Mesocriconema*, o mesmo ocorre com *Criconemoides*, da mesma maneira que condições não ideais irão reduzir a frequência populacional de ambos os gêneros desta família.

Alguns estudos correlacionam a frequência populacional de *Mesocriconema* positivamente com o aumento da altitude. Em um estudo com videiras no Sul do Brasil, Divers et al., (2019) relata que o gênero *Mesocriconema* (principalmente *M. xenoplax*), possui uma forte relação com a altitude, sugerindo uma tendência da frequência e densidade aumentarem até 700 m de altitude. Nyczepir e Wood (2008), relatam que a densidade de *M. xenoplax* é relacionada com a presença de *Meloidogyne partityla*, onde a população de *Mesocriconema* é suprimida na presença de *M. partityla*. Os autores explicam que essa supressão pode estar relacionada a redução ou alteração dos locais de alimentação, uma vez que se trata de gêneros com modelo de parasitismo distinto, ectoparasita migratório (*M. xenoplax*) e endoparasita sedentário (*M. partityla*).

Outro grupo encontrado com forte relação positiva ($r = 1$) foram os gêneros *Aphelenchoides* e *Tylenchus*. Em estudos com manga, *Tylenchus* é associado com a presença dos gêneros parasitas *Hemicriconemoides*, *Helicotylenchus*, *Pratylenchus* e *Meloidogyne* (Kumar and Khan, 2015). Já *Aphelenchoides* spp. é relacionado com a presença de *Meloidogyne*, *Helicotylenchus*, *Criconemoides* e *Tylenchorhynchus* em lavouras de arroz, no Equador (Gilces et al., 2016).

A correlação moderada positiva ($r = 0,6$) encontrada entre *Mesocriconema* e *Pratylenchus*, é observada em estudos com a cultura da noqueira-pecã em outros países. Jagdale et al., (2021) observaram a presença de ambos os gêneros em um levantamento em diferentes regiões produtoras da Geórgia. Neste estudo, o aumento da densidade populacional de *Pratylenchus* foi altamente relacionada com solos franco-arenosos, enquanto *Mesocriconema* foi frequentemente relatado nos diferentes solos avaliados nas regiões. No local de coleta onde ocorreu maior densidade de *Pratylenchus*, o solo apresentava 22% de argila e menos de 15% de areia, caracterizando uma textura tipo 3, mais siltosa, corroborando com Jagdale et al. (2021)

Os gêneros *Pratylenchus* e *Xiphinema* também apresentaram correlação positiva moderada ($r = 0,6$). Esses gêneros são frequentemente relatados juntos em pomares de maçã, sendo considerados patógenos potenciais para esta cultura (Askaryy et al., 2012). Em pessegueiro *Pratylenchus* e *Xiphinema*, juntamente com *Mesocriconema*, compõe o grupo de nematoides mais danosos para a cultura. Em um estudo desenvolvido no sul de Illinois, *Xiphinema* é reportado em pomares de pessegueiro junto com *Pratylenchus*, sendo que a população de *Xiphinema* é maior quando comparada à de *Pratylenchus* (Walters et al., 2008).

Considerando a capacidade de supressão, sabe-se que a presença de dois ou mais gêneros de nematoides parasitas de plantas pode suprimir a população de algum outro gênero. Cada gênero, possui uma maneira distinta de vida alimentar, fazendo com que, de alguma maneira, a competição direta ou indireta por locais de alimentação na rizosfera da planta promova uma perturbação por parte do gênero mais agressivo. Assim, a alimentação e a reprodução do gênero menos agressivo são prejudicadas. No presente estudo, não foi observado a supressão significativa de nenhum gênero ($r \geq -7,0$), no entanto, na literatura vários dos gêneros reportados nesta pesquisa possuem capacidade competitiva baixa, tendo suas populações suprimidas na presença de gêneros e espécies de nematoides mais competitivos, como por exemplo *Meloidogyne* spp. (Herman et al., 1988).

A caracterização das populações de nematoides fitoparasitas em pomares de noqueira-pecã no estado do Rio Grande do Sul, é um estudo pioneiro. Ressalta-se que no período em que foram realizadas as coletas de solo, vários municípios encontravam-se sob déficit hídrico,

situação que pode ter interferido nas densidades e na frequência de gêneros e, conseqüentemente, na dinâmica da comunidade de nematoides. Contudo, os resultados sobre a caracterização dos nematoides e sua relação com atributos do solo e outros gêneros da nematofauna, são importantes para guiar novos estudos visando a compreensão da relação destes gêneros com a noqueira-pecã sob condições de situação hídrica mais favorável para esses organismos e acultura, assim como sob condições distintas de manejo do solo e da cultura em questão.

2.3 CONCLUSÃO

A partir da coleta de solo nos principais locais produtores de noz-pecã do Rio Grande do Sul contatou-se a ocorrência dos gêneros *Mesocriconema*, *Criconemoides*, *Discocriconemella*, *Xiphinema*, *Tylenchus*, *Pratylenchus*, *Helicotylenchus* e *Aphelenchoides*.

Os gêneros *Discocriconemella* e *Xiphinema* estiveram associados positivamente com a matéria orgânica, capacidade de troca de cátions, teor de argila, cobre, zinco, cálcio, magnésio e potássio. *Pratylenchus*, *Helicotylenchus*, *Tylenchus*, *Criconemoides* e *Aphelenchoides* apresentam correlação positiva com alumínio. O *Mesocriconema*, nematoide mais frequentemente encontrado neste estudo, apresentou correlação negativa com a maioria dos atributos químicos do solo. Correlação significativa forte foi observada entre os gêneros *Criconemoides* e *Mesocriconema*, e *Aphelenchoides* e *Tylenchus*.

No apêndice A estão encontradas as informações referentes ao Material Suplementar, do Capítulo 1, enviado para a European Journal of Plant Pathology.

2.4 REFERÊNCIAS

- Allen, M. W., & Jensen, H. J. (1951). *Pratylenchus vulnus*, new species (Nematoda Pratylenchinae), a parasite of trees and vines in California. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 18(1), 47-50.
- Ansari, R. A., & TA, K. (2012). Diversity and community structure of phytonematodes associated with guava in and around Aligarh, Uttar Pradesh, India. *BioScience Trends*, 5(3), 202-204.
- Askary, T. H., Banday, S. A., Iqbal, U., Khan, A. A., Mir, M., Waliullah, M., & Shah, I. (2012). Plant parasitic nematode diversity in pome, stone and nut fruits. In *Agroecology and strategies for climate change* (pp. 237-268). Springer, Dordrecht.

- BARROS, J. D., HAMANN, J., BILHARVA, M., MARCO, R. D., Martins, C. R., Hamann, J. J., ... & MARTINS, C. R. (2018). Cultivares de noqueira-pecã no Brasil.
- Brait, V. H. A. H., Carneiro, L. C., & Ferreira, P. A. (2020). Nematode survey of plantain orchards in Jataí and Perolândia–Goiás state, BRAZIL. *Brazilian Journal of Agriculture* v, 95(3), 202-210.
- Brito, J. A., Kaur, R., Dickson, D. W., Rich, J. R., & Halsey, L. A. (2006). The pecan root-knot nematode, *Meloidogyne partityla* Kleynhans, 1986. *Nematology Circular*, 222.
- CARES, J. E., HUANG, S. P. (2000). Taxonomia de fitonematoides: chave sistemática simplificada para gêneros – Parte II. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 8, 185-223.
- Cares, J. E., Huang, S. P. (2008). Soil nematodes. In: F. M. S. Moreira, E. J. Huising, D. E. Bignall (EdS.). *A handbook of tropical soil biology: sampling and characterization of below-ground biodiversity*. London: Earthscan, (pp. 97-106).
- Carithers, P. A. P. (1978). Investigations of a *Meloidogyne* species isolated from pecan (Doctoral dissertation, University of Georgia).
- Crosa, C. F. R., MARCO, R. D., de Souza, R. S., & Martins, C. R. (2020). Tecnologia de produção de noz-pecã no sul do Brasil. *Revista Científica Rural*, 22(2), 249-262.
- Deborah, J. R. (2016). *Statistics for dummies*. John wiley.
- Decraemer, W., Robbins, R. T. (2007). The who, ad where of Longidoridae and Trichodoridae. *The Journal of Nematology*, 39(4). 295-297.
- Divers, M., Gomes, C. B., Neto, A. C. M., Medina, I. L., Nondillo, A., Bellpe, C., Filho, J. V. A. (2019). Diversity of plant-parasitic nematodes pasitising grapes in Southern Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 44, 401-408.
- FERRAZ, L. C. C. B. (2012). Chaves para identificação de gêneros de fitonematoides assinalados no Brasil.
- Geraert, E. (2010). *The Criconematidae of the world: identification of the family Criconematidae (Nematoda)*. Academia press.
- Gilces, C. T., Santillan, D. N., & Velasco, L. (2016). Plant-parasitic nematodes associated with rice in Ecuador. *Nematropica*, 46(1), 45-53.
- Hendrix, F. F., & Powell, W. M. (1968). Nematode and Pythium species associated with feeder root necrosis of pecan trees in Georgia. *Plant Disease Reporter*, 52, 334-335..
- Herman, M., Hussey, R. S., & Boerma, H. R. (1988). Interactions between *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus brachyurus* on soybean. *Journal of Nematology*, 20(1), 79.
- Jagdale, G. B., Brenneman, T. B., Severns, P. M., & Shapiro-Ilan, D. (2021). Differences in distribution and community structure of plant-parasitic nematodes in pecan orchards between two ecoregions of Georgia. *Journal of Nematology*, 53(1), 1-14.
- Jagdale, G. B., Holladay, T., Brannen, P. M., Cline, W. O., Agudelo, P., Nyczepir, A. P., & Noe, J. P. (2013). Incidence and pathogenicity of plant-parasitic nematodes associated with blueberry (*Vaccinium* spp.) replant disease in Georgia and North Carolina. *Journal of nematology*, 45(2), 92.

- Jenkins, W. R. B. (1964). A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant disease reporter*, 48(9).
- Johnson, J. D. (1988). Current status of root knot nematodes on pecans and their control. In *Proceedings... annual conference-Texas Pecan Growers Association (USA)*.
- Kleynmans, K. P. N. (1986). *Meloidogyne partityla* sp. nov. from pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Kpch) in the Transvaal Lowveld (Nematoda: Meloidogynidae). *Phytophylactica*, 18(3), 103-106.
- Kumar, H. K., & Khan, R. M. (2015). Community Analysis of Plant Parasitic Nematodes Associated with Mango Orchards in Four Districts of Uttar Pradesh, India. *Indian Journal of Nematology*, 45(1), 43-47.
- Leslie, C. A., & McGranahan, G. H. (2013, July). The California walnut improvement program: scion breeding and rootstock development. In *VII International Walnut Symposium 1050* (pp. 81-88).
- Lima, R. D. S., Muniz, M., CASTRO, J. D. C., de OLIVEIRA, E. R. L., de Oliveira, P. G., de Siqueira, K. M. S., ... & da Costa, J. G. (2013). Frequencies and population densities of the major phytonematodes associated with banana in the State of Alagoas, Brazil.
- Lone, G. M., Zaki, F. A., & Waliullah, M. I. S. (2012). Report of *Xiphinema index* Thorne and Allen, 1950 (Dorylaimida: Longidoroidea) Associated with Neglected Apple Orchards of Baramulla, Kashmir, India. *Indian Journal of Nematology*, 42(1), 71-74.
- Loof, P. A. A., De Grisse, A. (1989). Taxonomic and nomenclatorial observations on the genus *Criconemella*. Refereed Article in a Scientific Jornal, 54, 53-74.
- Martins, C. R., Conte, A., Fronza, D., Alba, J. M. F., Hamann, J. J., Bilharva, M. G., Malgarim, M. B., Farias, R. M., De Marco, R., Reis, T. S. (2018). Situação e perspectiva da nogueira-pecã no Brasil. Pelotas: *Documentos Embrapa Clima Temperado*, 462.
- Nisa, R. U., Tantray, A. Y., Kouser, N., Allie, K. A., Wani, S. M., Alamri, S. A., ... & Shah, A. A. (2021). Influence of ecological and edaphic factors on biodiversity of soil nematodes. *Saudi journal of biological sciences*, 28(5), 3049-3059.
- Nyczepir, A. P., & Lamberti, F. (2001). First record of *Xiphinema pacificum* from a peach orchard in Georgia. *Plant Disease*, 85(10), 1119-1119.
- Nyczepir, A. P., & Wood, B. W. (2008). Interaction of concurrent populations of *Meloidogyne partityla* and *Mesocriconema xenoplax* on pecan. *Journal of nematology*, 40(3), 221.
- Nyczepir, A., Reilly, C. C., & Wood, B. W. (2004). Incidence and association of *Meloidogyne partityla* with Mouse-Ear disorders of pecan in Georgia. *Journal of Nematology*, 36(3), 338.
- Nyczepir, A. P., & Wood, B. W. (2008). Interaction of concurrent populations of *Meloidogyne partityla* and *Mesocriconema xenoplax* on pecan. *Journal of Nematology*, 40(3), 221.
- Ortiz, E. R. N., Camargo, L. E. A. (2005). Doenças da nogueira pecan (*Carya llioensis*). In: H. Kimati et al. (Org.). *Manual de fitopatologia*. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2, 501-506.
- Pederson, G. A., & Quesenberry, K. H. (1998). Clovers and other forage legumes. *Plant and nematode interactions*, 36, 399-425.

- Pinochet, J., Rodriguez-Kabana, R., Marull, J., & McGawley, E. F. (1993). *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus vulnus* on pecan (*Carya illinoensis*). *Fundamental and Applied Nematology*, 16(1), 73-77.
- R Core Team. (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Rashid, F., Geraert, E., & Sharma, R. D. (1986). Criconematidae (Nemata) from Brazil. *Nematologica*, 32(4), 374-397.
- Ratanaworabhan, S. A. W. A. R. T., & Smart Jr, G. C. (1970). The ring nematode, *Criconemoides ornatus*, on peach and centipede grass. *Journal of Nematology*, 2(3), 204.
- Riascos-Ortiz, D., Mosquera-Espinosa, A. T., De Agudelo, F. V., de Oliveira, C. M. G., & Muñoz-Florez, J. E. (2020). An integrative approach to the study of (Nematoda: Hoplolaimidae) Colombian and Brazilian populations associated with crops. *Journal of Nematology*.
- Shoeman, A. D., Klein, H., van der Berg, A., Milar, I., van der Merwe, M., Saayman, T., Marais, P., van Nikerk, E. (2007). Ring nematode species from KwaZulu-Natal wetlands. *Plant Protection News*, 74.
- Silva, R. A., Oliveira, C. M., & Inomoto, M. M. (2008). Fauna de fitonematóides em áreas preservadas e cultivadas da floresta amazônica no Estado de Mato Grosso. *Tropical Plant Pathology*, 33, 204-211.
- Singh, S. K., Hodda, M., & Ash, G. J. (2013). Plant-parasitic nematodes of potential phytosanitary importance, their main hosts and reported yield losses. *Eppo Bulletin*, 43(2), 334-374.
- Tedesco, M. J., Gianello, C., Bissani, C. A., Bohnen, H., & Volkweiss, S. J. (1995). *Análises de solo, plantas e outros materiais* (Vol. 5, p. 174). Porto Alegre: UFRGS.
- Terabe, N. I., Martins, C. M., & Homechin, M. (2008). Microrganismos associados a frutos de diferentes cultivares de noz Pecan. *Ciência e Agrotecnologia*, 32, 659-662.
- Van Zyl, S., Vivier, M. A., & Walker, M. A. (2012). *Xiphinema index* and its Relationship to Grapevines: A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 33(1), 21-32.
- Walters, S. A., Bond, J. P., Russell, J. B., Taylor, B. H., & Handoo, Z. A. (2008). Incidence and influence of plant-parasitic nematodes in southern Illinois peach orchards. *Nematropica*, 63-74.
- Weimin, Y. E., & RT, R. (2010). Morphology and taxonomy of *Xiphinema* (Nematoda: Longidoridae) occurring in Arkansas, USA. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 32(5), 928-945.

3 CAPÍTULO 2 – COMPORTAMENTO DE MUDAS DE NOGUEIRA-PECÃ NA PRESENÇA DE *Mesocriconema xenoplax* (Raski, 1952)

3.1 INTRODUÇÃO

Mesocriconema xenoplax (Raski, 1952) é um fitonematóide frequentemente associado com espécies perenes arbóreas, como videira, ameixeira, pessegueiro e pinheiros. No Brasil, seu primeiro registro foi na década de 1980, nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo (RASEIRA, 1990). Seu dano está relacionado ao desvio de nutrientes da planta, a transmissão de outras doenças e a exposição do sistema radicular aos patógenos do solo, comprometendo a produção (PINKERTON et al., 2004). Atualmente, as pesquisas com esse nematóide estão relacionadas, principalmente, com a cultura do pessegueiro, devido aos altos prejuízos causados pela síndrome da morte precoce do pessegueiro (MAYER; UENO, 2021).

Todavia, esse nematóide pode estar associado ao cultivo de outras plantas, como a noqueira-pecã (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch (Juglandaceae)). O cultivo e a comercialização de noz-pecã no Rio Grande do Sul estão em ascensão (BARROS et al., 2018), com isso, há uma demanda crescente por estudos visando a longevidade dos pomares. Estudos anteriores já relataram a presença dos gêneros de *Meloidogyne* (NYCZEPIR, 1993), *Pratylenchus* (PINOCHET et al., 1993) e *Mesocriconema* (CIANCIO; GRASSO, 1997) em pomares de noqueira-pecã. Dentro do gênero *Mesocriconema* a espécie mais reportada é *Mesocriconema xenoplax*.

No Brasil, as pesquisas com fitonematóides em noqueira-pecã são recentes (ROMAGNA, 2022, no prelo) e têm confirmado a presença e uma alta frequência do *Mesocriconema xenoplax* em pomares. Portanto, há uma necessidade de se conhecer o comportamento de mudas de noqueira-pecã na presença deste fitonematóide a fim de garantir o plantio de mudas saudáveis que garantiram a longevidade produtiva. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a suscetibilidade da noqueira-pecã, cultivar Barton, ao fitonematóide *M. xenoplax*.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Ensaio em casa de vegetação

Sementes de noqueira-pecã da cultivar Barton, cedidas para fins de pesquisa pela Empresa Paralelo 30 (<http://pecã.com.br/>), foram submetidas a quebra de dormência pela técnica de estratificação à frio (4°C) durante 90 dias (POLETTTO et al., 2015). Após o período de quebra de dormência, as sementes foram esterilizadas com hipoclorito (1%) e mantidas por 20 minutos em álcool 70% e, posteriormente foram escarificadas com lixa para madeira n° 3. As sementes foram transferidas para bandejas plásticas contendo areia autoclavada (duas horas) e permaneceram em casa de vegetação (25° C ± 2° C) até a emissão de três folhas. Após a obtenção das mudas, 20 dessas foram transplantadas para vasos de três litros contendo uma mistura de 50% substrato comercial esterilizado (MecPlant), 25% argissolo autoclavado e 25% areia autoclavada (duas horas). A mistura final do substrato utilizado foi encaminhada para análise de solo. A partir dos resultados, foi planejado a aplicação de solução nutritiva, conforme as recomendações para a cultura no Manual de Adubação e Calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CQFS RS/SC, 2016).

Decorridos trinta dias do transplante das mudas, dez mudas de noqueira-pecã foram inoculadas com uma solução concentrada com mil espécimes de *M. xenoplax* por vaso. A solução de 10 mL foi aplicada próxima ao caule da planta, em três orifícios abertos a 2,5 cm de profundidade. Outras dez mudas foram mantidas como controle na casa de vegetação, sem ser inoculadas. O experimento foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), composto por dois tratamentos (mudas inoculadas com *M. xenoplax* e mudas não inoculadas) e dez repetições, totalizando 20 plantas. Durante a condução do experimento, foi obtido o inóculo e análise molecular de nematoides da família Criconematidae (APÊNDICE B).

3.2.2 Avaliações morfológicas e nematológicas nas mudas de noqueira-pecã

No momento da inoculação, todas as plantas foram caracterizadas de acordo com o comprimento da parte aérea da planta (cm), partindo-se da base do caule até o ponto de crescimento, e diâmetro do caule (mm) com o auxílio de um paquímetro digital. As mesmas análises foram realizadas a cada trinta dias, até o encerramento do ensaio. Ao completar 180 dias do momento da inoculação, o ensaio foi finalizado procedendo-se as seguintes análises: altura da planta (cm), comprimento da raiz principal (cm), massa fresca do sistema radicular (g) e diâmetro do caule (mm).

Posteriormente, as mudas foram encaminhadas para laboratório para a extração de nematoides do sistema radicular (COOLEN; D'HERDE, 1972) e do solo (JENKINS, 1964). Após a extração, as amostras foram submetidas ao banho maria à 54°C durante dez minutos,

com o objetivo de ocasionar a morte dos nematoides sem danificá-los. Durante 24 horas as amostras foram mantidas em decantação, reduzidas à 10 mL, e preservadas com a adição de 10 mL de solução Golden 2X. A contagem de nematoides por grama de raiz e por 200 cm³ de solo, foi realizada sob microscópio óptico, com auxílio de uma câmara de Peters. Ao final, foi determinado o Fator de Reprodução (FR) (OOSTENBRINK, 1966) através da seguinte fórmula:

$$FR = PF:PI$$

Onde:

FR: fator de reprodução

PF: população final de nematoides

PI: população inicial de nematoides.

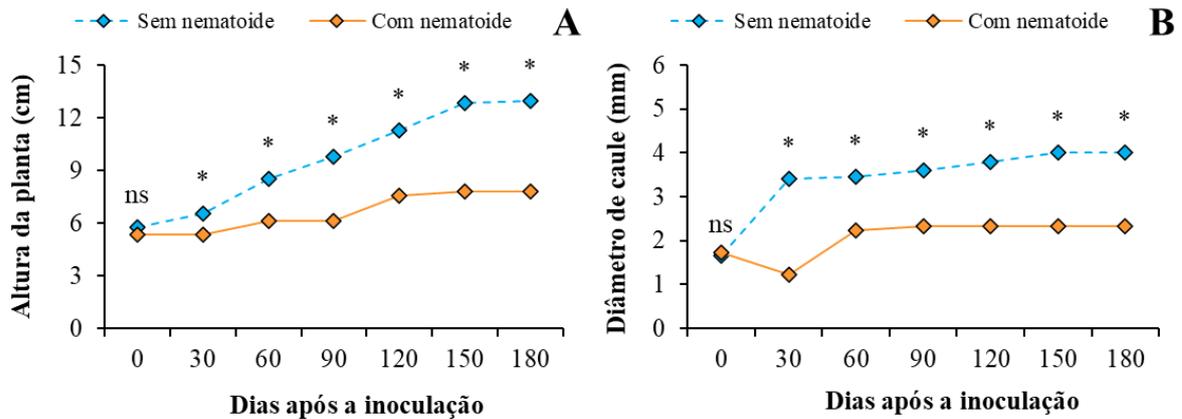
3.2.3 Análise estatística

Os valores das variáveis avaliadas foram submetidos ao Teste de Student para comparação das médias, utilizando a função `t.test` do software R Software R Studio (R Core Team, 2021).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença do fitonematoide *M. xenoplax* prejudicou de forma significativa o desenvolvimento das mudas de nogueira-pecã durante o período avaliado. A variável altura de parte aérea (APA) foi prejudicada a partir dos trinta dias decorridos da inoculação, reduzindo cerca de 18,9% em relação a plantas sem a presença do nematoide (Figura 1). Esse efeito também foi observado no decorrer do ensaio, atingindo, aos 180 dias, uma redução de 39,6% na APA.

Figura 6 - Altura da parte aérea (APA), em centímetros e diâmetro do caule (DC), em milímetros, de mudas de nogueira-pecã inoculadas com *Mesocriconema xenoplax* (CN) e não inoculadas (SN), no período de 180 dias, em casa de vegetação.



*ns: médias não significativas pelo teste T a 5%.

No estágio de muda, plantas florestais perenes como a nogueira-pecã, tendem a apresentar maior suscetibilidade à infecção por nematoides, uma vez que seu sistema radicular é mais fino e sensível, facilitando a alimentação do patógeno. Além disso, a redução da APA também pode estar relacionada ao desvio de nutrientes, que seriam utilizados para o crescimento da planta, mas são direcionados para a alimentação do nematoide, gerando uma série de estresses na planta. Em outras culturas como a ameixeira e o pessegueiro, *M. xenoplax* é tem sido reportado por afetar o estabelecimento e crescimento de plantas novas (PINKERTON et al., 2005). Síndromes de mortes de plantas ao final do período de quebra de dormência também são associadas a presença de *M. xenoplax*, que têm causadocausaprejuízos severos em culturas como pessegueiro, ameixeira, amendoeira, damasqueiro, nectarineira e umezeiro (ROSSI, 2022).

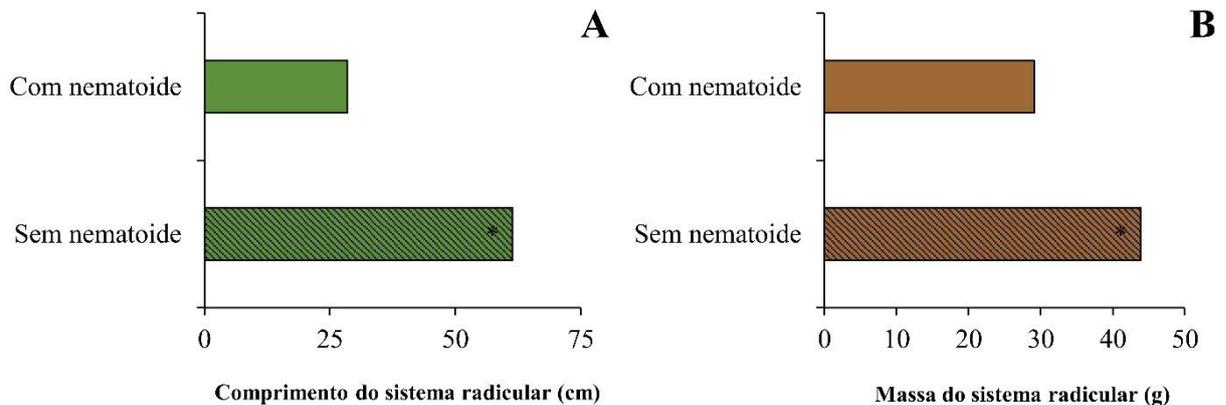
O diâmetro de caule (DC) também foi afetado pela presença de *M. xenoplax*, que ocasionou redução no diâmetro das mudas a partir dos sessenta dias (Figura 1). Aos sessenta dias, a redução observada foi de 34,9%, crescendo de forma linear até os 180 dias, no qual atingiu um decréscimo de 42,0% quando comparada com mudas isentas do patógeno. Estudos investigando o efeito de *M. xenoplax* em mudas de nogueira-pecã cv. Desirable, observaram redução no diâmetro do caule (16,74% em relação a testemunha) a partir de 32 meses (NYCZEPIR; WOOD, 2008). Em culturas perenes, o *M. xenoplax* é caracterizado como ectoparasita migrador, induzindo alterações celulares na região radicular que causam

destruição, atrofiamento e morte das raízes, incapacitando as plantas a suportarem estresses (GOMES; CAMPOS, 2003).

Vários estudos, principalmente na cultura do pessegueiro, apontam que a presença deste nematoide também é capaz de ocasionar alterações bioquímicas nas plantas, como a redução do ácido indolacético e reduções nas atividades das enzimas peroxidase e polifenoloxidase (NYCZEPIR; LEWIS, 1984; CARNEIRO et al., 1998; GOMES et al., 2000). O ácido indolacético (AIA) é uma auxina em sua forma natural, que atua no alongamento e expansão celular, promovendo crescimento de raízes e caules (MELO, 2002). Estudos com pessegueiro, relatam que esse hormônio é reduzido no sistema radicular de plantas na presença de *M. xenoplax*, causando flutuações anormais do AIA nos ramos. Tais flutuações ocasionam maior suscetibilidade das plantas ao frio, interferindo na quebra de dormência das mesmas. A peroxidase é uma enzima que participa de diversos processos fisiológicos da planta, como lignificação, formação de componentes da parede celular, catabolismo de auxinas, senescência, proteção contra patógenos e estresses abióticos (NASCIMENTO; BARRIGOSI, 2014). Já a enzima polifenoloxidase é importante para a redução ao ataque de patógenos, devido a sua atividade em produzir quantidades significativas de produtos tóxicos, oriundos da oxidação de compostos fenólicos (ALVARENGA, 2012). Desta maneira, as alterações bioquímicas decorrentes do ataque por *M. xenoplax*, gera uma série de distúrbios na planta, que prejudicam seu desenvolvimento e aumentam a suscetibilidade do sistema de defesa aos demais patógenos e à adversidades abióticas.

O comprimento e a massa fresca do sistema radicular das mudas de noqueira-pecã inoculadas e não inoculadas com *M. xenoplax* apresentou diferença estatística para ambas as variáveis (Figura 2). Os sistemas radiculares das plantas apresentaram em média 60 cm de comprimento na ausência do patógeno, enquanto que na presença de *M. xenoplax* as raízes apresentaram 30 cm de comprimento, verificando-se um decréscimo de 47,64%. Para a variável massa fresca do sistema radicular, as mudas com ausência do nematoide apresentaram, em média 43,85 g, enquanto que as raízes das mudas com presença do patógeno obtiveram um peso médio de 29,75 g, representando um decréscimo de 32,16% na massa fresca de raízes.

Figura 7 - Comprimento do sistema radicular (A), em centímetros (cm) e massa fresca do sistema radicular (B), em gramas (g) de mudas de noqueira-pecã na presença e ausência de *Mesocriconema xenoplax* após 180 dias de inoculação.



Esses dados demonstram que *M. xenoplax* é potencialmente danoso para o desenvolvimento do sistema radicular da planta, impedindo que a planta desenvolva de maneira plena. Mesmo que a noqueira-pecã seja uma cultura caracterizada por apresentar um sistema radicular tenro e robusto, *M. xenoplax* foi capaz de prejudicar seu crescimento, além disso, ao final do ensaio as plantas que estavam na presença deste patógeno, apresentaram sintomas como murchamento e necrose de folhas. Estudos associados a presença deste nematoide com esses sintomas são comuns nas culturas de pessegueiro, videira, ameixeira entre outros. No entanto, torna-se conveniente investigar de maneira mais específica a associação do *M. xenoplax* a esses sintomas na cultura da noqueira-pecã.

Ao calcular o fator de reprodução (FR) do nematoide aos 180 dias após a inoculação, as mudas de noqueira-pecã apresentaram $FR > 1$ (Tabela 1). Os dados indicam que o nematoide *M. xenoplax* afeta o crescimento e desenvolvimento de mudas de noqueira-pecã. As amostras provenientes do sistema radicular das mudas de noqueira-pencan, apresentaram número de nematoides inferior quando comparado as amostras de solo. Esses valores, são em razão da característica do hábito alimentar deste nematoide, ectoparasita, que acessa o sistema radicular da planta para se alimentar e retorna ao solo. Na presença do nematoide, as mudas tiveram seu desenvolvimento comprometido, quando comparadas com mudas não inoculadas. Além disso, visualmente as plantas começaram a apresentar sintomas de clorose, evoluindo para a necrose das folhas (Figura 3) sintoma também observado por Nyczepir et al., (2004) em mudas de noqueira-pecã infectadas por outros nematoides.

Tabela 4 - Número total de nematoides na raiz, número total de nematoides no solo e fator de reprodução (FR) de *Mesocriconema xenoplax* em mudas de nogueira-pecã (cultivar. Barton) após 180 dias de inoculação.

Muda	Nematoides da raiz	Nematoides do solo	Fator de Reprodução*
#1	343	19920	20
#2	129	34320	34
#3	52	21600	22
#4	194	22560	23
#5	725	54720	55
#6	305	35520	36
#7	269	21120	21
#8	154	18720	19
#9	237	21360	22
#10	237	36000	36
Média	264	28584	29

*FR = Pf/Pi, sendo “Pf” população final de nematoides (nematoides totais da raiz + nematoides totais do solo), “Pi” população inicial de nematoides.

Figura 8 - Mudanças de nogueira-pecã na presença e ausência do fitonematoide *Mesocriconema xenoplax*. Após 180 dias em casa de vegetação, as mudas inoculadas com *M. xenoplax* apresentaram sintomas acentuados de clorose, seguido de necrose do tecido foliar.



- 1: Mudanças sem a presença de *Mesocriconema xenoplax*.
 2: Mudanças com *Mesocriconema xenoplax*.

3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As mudas de noqueira-pecã da cultivar Barton são suscetíveis ($FR \geq 1$) ao nematoide *M. xenoplax* em condições de casa de vegetação. Mudas na presença deste nematoide apresentam sintomas acentuados de murcha, clorose e necrose. Recomenda-se estudos com outras cultivares de noqueira-pecã, visto que existe uma variabilidade genética muito grande na planta, em razão de ser uma planta monoica, com presença do fenômeno de dicogamia. Desta forma, os pomares apresentam mais de uma cultivar, justamente para que ocorra a liberação do pólen pelas cultivares polinizadoras no mesmo período em que a cultivar principal esteja com as inflorescências pistiladas receptivas. Além disso, essa polinização é realizada pelo vento, fazendo com que não se tenha um controle absoluto sobre a fecundação. Outro aspecto importante, refere-se aos dados terem sido obtidos sob situações de solo, temperatura e umidade ideais para a cultura e para o desenvolvimento do *M. xenoplax*. Sendo assim, é importante que além de investigar a reação em outras cultivares de noqueira-pecã, busque-se por informações para as condições edafoclimáticas dos pomares comerciais, bem como dos campos de produção de mudas.

3.5 REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, Taciana Caroline et al. Polifenoloxidase: uma enzima intrigante. **Ciência & Tecnologia**, v. 3, n. 1, 2011.
- CARNEIRO, Regina M. D. G.; CAMPOS, Angela D.; PEREIRA, José Francisco. M.; RASEIRA, Maria do Carmo B. Avaliação de porta-enxertos de *Prunus* quanto a suscetibilidade ao nematoide anelado e ao conteúdo de enzimas fenol oxidases. **Nematologia Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 32-38, 1998.
- CIANCIO, Aurelio; GRASSO, Gaetano. Endomigratory feeding behaviour of *Mesocriconema xenoplax* parasitizing walnut (*Juglans regia* L.). **Fundamental and applied nematology**, v. 21, n. 1, p. 63-68, 1997.
- COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: State Nematology and Entomology Research Station, 1972. 77 p.
- CQFS RS/SC. Manual de calagem e adubação para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Núcleo Regional Sul. Comissão de Química e Fertilidade do Solo – RS/SC, 2016, 376 p.
- GOMES, C. B.; CAMPOS, A. D. Nematoides. In: RASEIRA, M. C. B.; CENTELLASQUESADA, A. **Pêssego: Produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 115-122 (Frutas do Brasil, 49). 2003.

GOMES, C.B.; CAMPOS, A.D.; ALMEIDA, M.R.A. Ocorrência de *Mesocriconema xenoplax* e *Meloidogyne javanica* associados à morte precoce de ameixeiras e à redução da atividade de enzimas fenol oxidases. **Nematologia Brasileira**, v.24, n.2, 249-252, 2000.

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

MAYER, Newton Alex; UENO, Bernardo. Peach Tree Short Life in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Agrociencia Uruguay**, v. 25, n. NE1, p. e395-e395, 2021.

MELO, N. F. Introdução aos hormônios e reguladores de crescimento vegetal. **Embrapa Semi-Árido**, Petrolina, PE, 2022.

NASCIMENTO, J. B.; BARRIGOSI, J. A. F. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. **Agrarian Academy**, v. 1, n. 1, p. 234, 2014.

NYCZEPIR, A. P.; LEWIS, S. A. The influence of *Macropostonia xenoplax* Raski on indol-3 acetic acid (IAA) and abscisic acid (ABA) in peach. **Journal of nematology**, v. 12, n. 4, p. 234, 1984.

NYCZEPIR, A. P.; REILLY, C. C; WOOD, B. W. Incidence and association of *Meloidogyne partityla* with mouse-ear disorders of pecã in Georgia. **Journal of Nematology**, v. 36, p. 338, 2004.

NYCZEPIR, A. P.; RILEY, M. B.; SHARPE, R. R. Dynamics f concomitante populations of *Meloidogyne incognita* and *Criconemella xenoplax* on peach. **Journal of Nematology**, v. 25, p. 659-665, 1993.

NYCZEPIR, A. P.; WOOD, B. W. Interaction of concurrent populations of *Meloidogyne partityla* and *Mesocriconema xenoplax* on Pecã. **Journal of Nematology**, v. 40, n. 3, p. 221-225, 2008.

OOSTENBRINK, R. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mededeelingen der Landbouw-Hoogeschool* 66:1-46.

PINKERTON, J. N. et al. Effects of *Mesocriconema xenoplax* on *Vitis vinifera* and associated mycorrhizal fungi. **Journal of Nematology**, v. 36, n. 3, p. 193, 2004.

PINKERTON, J. N.; VASCONCELOS, M. C.; SAMPAIO, T. L.; SHAFFER, R. G. Reaction of grape rootstocks to ring nematode *Mesocriconema xenoplax*. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 56, n. 4, p. 377-385, 2005.

PINOCHET, J. *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus vulnus* on pecã (*Carya illinoensis*). **Fundamental and Applied Nematology**, v. 16, n. 1, p. 73-77, 1993. ISSN: 1164-5571/93/01/73 05.

POLETTI, T.; MUNIZ, M. F. B.; POLETTI, I.; BAGGIOTTO, C. Métodos de supressão de dormência da semente de noqueira-pecã *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. **Revista Árovere**, v. 19, n. 6, p. 1111-118, 2015.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>. 2021.

RASEIRA, A. A cultura da noqueira pecã (*Carya ilinoensis*). Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**, 1990. 3p. (Embrapa Clima Temperado. Comunicado Técnico, 63).

ROMAGNA, Izabelle Scheffer. **Fitonematoides associados a noqueira-pecã no Rio Grande do Sul e correlação com os atributos do solo**. 2022. NO PRELO.

ROSSI, C.E. Levantamento, reprodução e patogenicidade de nematoides a fruteiras de clima subtropical e temperado. Tese de Doutorado, ESALQ: Piracicaba, São Paulo. 114p.2002.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na cultura da noqueira-pecã, baseado em análise de doze locais do Estado do Rio Grande do Sul, foi encontrado os gêneros de nematoides *Mesocriconema*, *Criconemoides*, *Discocriconemella*, *Xiphinema*, *Tylenchus*, *Pratylenchus*, *Helicotylenchus* e *Aphelenchoides*.

Os gêneros de nematoides *Mesocriconema* e *Helicotylenchus* são os mais frequentes, seguidos por *Xiphinema*, *Pratylenchus* e *Criconemoides*, em pomares de noqueira-pecã (doze) no estado do Rio Grande do Sul. Os gêneros *Discocriconemella*, *Tylenchus* e *Aphelenchoides* ocorrem com menor frequência nesta cultura.

O gênero *Mesocriconema* apresenta correlação negativa a maioria dos atributos do solo avaliados (MO, ARG, CTC, Ca, Mg, Zn, Cu).

Não é observada supressão populacional por nenhum dos gêneros encontrados ($r \geq -7$) nos pomares de noqueira-pecã estudados.

A frequência e densidade populacional de fitonematoides variou entre os municípios, no entanto o gênero *Mesocriconema* esteve presente em todos, com densidade maior observada no município de Cachoeira do Sul.

Mudas de noqueira-pecã da cultivar Barton são suscetíveis ($FR \geq 1$) ao nematoide *M. xenoplax* em condições de casa de vegetação. Mudanças na presença deste nematoide apresentam sintomas acentuados de murcha, clorose e necrose.

Estudos futuros investigando um número maior de pomares no estado são importantes para uma caracterização mais ampla. Além disso, pesquisas envolvendo diferentes materiais genéticos são fundamentais para a compreensão da suscetibilidade das cultivares utilizadas no estado, bem como a caracterização genética dos gêneros associados à noqueira-pecã.

REFERÊNCIAS

- BRITO, J. A. et al. The pecan root-knot nematode, *Meloidogyne partityla* Kleynhans, 1986. **Nematology Circular**, v. 222, 2006.
- CIANCIO, Aurelio; GRASSO, Gaetano. Endomigratory feeding behaviour of *Mesocriconema xenoplax* parasitizing walnut (*Juglans regia* L.). **Fundamental and applied nematology**, v. 21, n. 1, p. 63-68, 1998.
- FREIBERG, Joice Aline. Potential of truffles in pecã and edible ectomycorrhizal fungi in forestry plantations. 2022. 131 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2022.
- KLEYNMANS, K. P. N. *Meloidogyne partityla* sp. nov. from pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Kpch] in the Transvaal Lowveld (Nematoda: Meloidogynidae). **Phytophylactica**, v. 18, n. 3, p. 103-106, 1986.
- LOOF, PA A.; DE GRISSE, A. Taxonomic and nomenclatorial observations on the genus *Criconemella* de Grisse & Loof, 1965 sensu Luc & Raski, 1981 (*Criconematidae*). **Mededelingen van de Faculteit landbouwwetenschappen. Rijksuniversiteit Gent**, v. 54, n. 1, p. 53-74, 1989.
- MASSAROTO, J. A.; YAMASHITA, O. M. Propriedades do relacionadas à inundação para o controle de fitonematoides. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 9, n. 1, p. 153-163, 2011.
- MELAKEBERHAN, Haddish; BIRD, George W.; GORE, Rebecca. Impact of plant nutrition on *Pratylenchus penetrans* infection of *Prunus avium* rootstocks. **Journal of Nematology**, v. 29, n. 3, p. 381, 1997.
- NYCZEPIR, A. P. Field performance of pecan rootstocks for resistance to *Meloidogyne partityla* in the southeastern United States. **Nematropica**, p. 63-67, 2013.
- PINOCHET, J. et al. *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus vulnus* on pecan (*Carya Illinoensis*). **Fundamental and Applied Nematology**, v. 16, n. 1, p. 73-77, 1993.
- PRÓ-PECÃ. Noz pecã no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural, 2020. Disponível em: <https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/202003/09152147-nota-tecnica-noz-peca-2020.pdf> Acesso em: 17 de março de 2021.
- RASEIRA, A. A cultura da noqueira pecã (*Carya ilinoensis*). Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**, 1990. 3p. (Embrapa Clima Temperado. Comunicado Técnico, 63).
- SBN – Sociedade Brasileira de Nematologia. Disponível em: <http://nematologia.com.br/#>. Acesso em: 16 de abril de 2020.

SINGH, Sunil K.; HODDA, Mike; ASH, Gavin J. Plant-parasitic nematodes of potential phytosanitary importance, their main hosts and reported yield losses. **Eppo Bulletin**, v. 43, n. 2, p. 334-374, 2013.

SULZBACHER, Marcelo Aloisio et al. Fungos ectomicorrízicos em plantações de noqueira-pecã e o potencial da truficultura no Brasil. **Ciência Florestal**, v. 29, p. 975-987, 2019.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1993. 372 p.

APÊNDICE A – Material Suplementar Capítulo 1

Figura 1: Croqui representativo da distribuição de coletas.

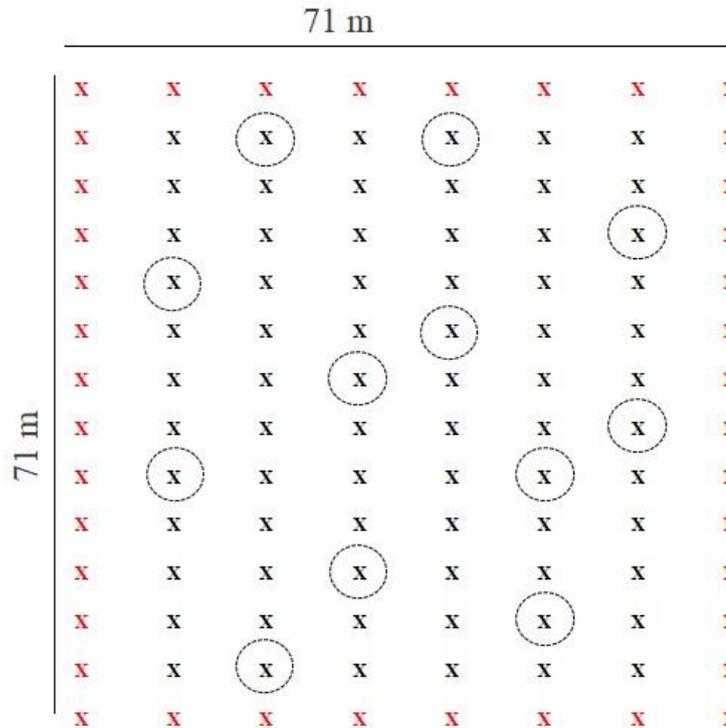


Tabela 1: Características morfométricas de espécies do nematoide *M. xenoplax* (n=64) e *M. ornatum* (n=10) identificados em solos cultivados com noqueira-pecã no estado do Rio Grande do Sul, e comparativo com as características descritas por Geraert (2010) para ambas as espécies.

Variáveis	Espécie de <i>Mesocriconema</i>					
	<i>M. xenoplax</i>	SD ¹	Geraert (2010)	<i>M. ornatum</i>	SD	Geraert (2010)
L (µm)	622	70	400-750	395	52	330-520
EST (µm)	88	5	54-87	50	5	44-56
R	99	5	77-114	101	15	78-94
Rex	28	2	26-30	25	1	25-27
RV	6	1	6-11	7	1	7-9
Ran	3	1	4-7	4	0	5-8
Rvan	3	1	0-4	3	1	0-2
VL/VB	1	0	07-1.3	1	0	0.7-1.2

¹ SD = Desvio padrão.

n= número de indivíduos mensurados.

L= tamanho total do corpo, EST= tamanho do estilete, R= número de anéis do corpo, Rex= anel onde localiza-se o poro excretor, RV= anel onde localiza-se a vagina, Ran= anel onde localiza-se o ânus, Rvan= número de anéis entre a vagina e o ânus, VL/VB= distância da vulva até a extremidade do corpo dividido pela largura do corpo onde a vulva está localizada.

Tabela 2: Características morfometrias de nematoides *Criconemoides ixhaphozi* (n = 36) identificados em solos cultivados com noqueira-pecã no estado do Rio Grande do Sul, e comparativo com as características descritas por Geraert (2010) para a espécie.

Variáveis	<i>Criconemoides ixhaphozi</i>	Desvio padrão	Geraert (2010)
L	397	66	340-620
EST	48	5	40-49
R	108	3	106-128
Rex	35	4	29-38
RV	11	2	9-14
Ran	7	1	7-10
Rvan	4	3	1-4
VL/VB	1	1	1-1.6

*n= número de indivíduos mensurados. L= tamanho total do corpo, EST= tamanho do estilete, R= número de anéis do corpo, Rex= anel onde localiza-se o poro excretor, RV= anel onde localiza-se a vagina, Ran= anel onde localiza-se o ânus, Rvan= número de anéis entre a vagina e o ânus, VL/VB= distância da vulva até a extremidade do corpo dividido pela largura do corpo onde a vulva está localizada.

Tabela 3: Características morfometrias de nematoides *Criconemoides ixhaphozi* (n = 36) identificados em solos cultivados com noqueira-pecã no estado do Rio Grande do Sul, e comparativo com as características descritas por Geraert (2010) para a espécie.

Variáveis	<i>Criconemoides ixhaphozi</i>	Desvio padrão	Geraert (2010)
L	397	66	340-620
EST	48	5	40-49
R	108	3	106-128
Rex	35	4	29-38
RV	11	2	9-14
Ran	7	1	7-10
Rvan	4	3	1-4
VL/VB	1	1	1-1.6

*n= número de indivíduos mensurados. L= tamanho total do corpo, EST= tamanho do estilete, R= número de anéis do corpo, Rex= anel onde localiza-se o poro excretor, RV= anel onde localiza-se a vagina, Ran= anel onde localiza-se o ânus, Rvan= número de anéis entre a vagina e o ânus, VL/VB= distância da vulva até a extremidade do corpo dividido pela largura do corpo onde a vulva está localizada.

Tabela 4: Características morfométricas de nematoides *Discocriconemella degrissei* (n = 20) identificados em solos cultivados com noqueira-pecã no estado do Rio Grande do Sul, e comparativo com as características descritas por Geraert (2010) para a espécie.

Variáveis	<i>Discocriconemella degrissei</i>	Desvio padrão	Geraert (2010)
-----------	------------------------------------	---------------	----------------

L	363	58	250-390
EST	56	5	56-68
R	82	5	71-82
Rex	27	3	21-29
RV	7	1	6-11
Ran	4	1	3-6
Rvan	3	0	2-4
VL/VB	1	0	0.7-1.1

*n= número de indivíduos mensurados. L= tamanho total do corpo, EST= tamanho do estilete, R= número de anéis do corpo, Rex= anel onde localiza-se o poro excretor, RV= anel onde localiza-se a vagina, Ran= anel onde localiza-se o ânus, Rvan= número de anéis entre a vagina e o ânus, VL/VB= distância da vulva até a extremidade do corpo dividido pela largura do corpo onde a vulva está localizada.

APÊNDICE B - Obtenção de inóculo e análise molecular de nematoides da família Criconematidae

Para a confirmação das espécies da família Criconematidae, espécimes desses nematoides – identificados por meio da análise morfológica e morfométrica como pertencentes à família, e, foram inoculados em plantas de cravo (*Dianthus caryophyllus*, L.). As plantas de cravo foram mantidas em casa de vegetação, e posteriormente, os nematoides foram extraídos do solo próximo do sistema radicular da planta, conforme metodologia proposta por Jenkins (1964). Após a extração, procedeu-se a pesca de indivíduos com auxílio de uma agulha de pescagem esterilizada, sob estereomicroscópio.

Dez juvenis e fêmeas foram selecionados manualmente, sob microscópio, e transferidos para tubos Eppendorf contendo 10 µL de água esterilizada, para extração de DNA, amplificação do DNA (PCR) e sequenciamento. O DNA foi extraído para sequenciamento dos segmentos D2 e D3 do RNA ribossomal 28S, seguindo Subbotin et al. (2005). Para tanto, a solução de nematoides foi incubada a 56°C em tampão de lise e 100 µg ml⁻¹ de proteinase K por uma hora. Após a incubação, o DNA foi extraído conforme instruções do fabricante do kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). A amplificação do DNA (PCR) seguiu as condições descritas por Inácio et al. (2016), para o par de *primers* D2A (5'-ACAAGTACCGTGGGGAAAGTTG-3') e D3B (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3') (DE LEY et al., 1999). Os produtos da amplificação do DNA (aPCR) foram purificados com kit IAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden-Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente as sequências de DNA foram encaminhadas para sequenciamento.

O protocolo descrito acima não foi eficiente para identificação molecular dos nematoides. Portanto, testaram-se outros cinco métodos de extração de DNA de nematoides. Para cada método utilizou-se nematoides congelados e também, nematoides extraídos dos vasos de multiplicação (casa de vegetação). Os métodos são especificados a seguir:

Método 1 – Kit DNeasy: foi utilizado o protocolo fornecido pelo DNeasy Blood & Tissue Kit, com adaptação do tempo de incubação de 16 horas a 56 °C.

Método 2 – “Overnight” (MACHADO et al., 2019):

1. Adicionar 20 µl de NaOH (0,25 M) em microtubo de 0,2 mL;
2. Adicionar o nematoide no respectivo tubo;

3. Agitar e centrifugar por 1 minuto a 1500 RPM e incubar a 25°C por período “*overnight*” (durante a noite, aproximadamente 12 horas);
4. Incubar a 99 °C por 3 minutos;
5. Adicionar 10 µl de HCl (0,25 M) + 5 µl de tris-HCl pH 8,0 (0,5 M) + 5 µl de Triton X-100 (2%);
6. Agitar, centrifugar por 1 minuto a 1500 RPM e incubar a 99°C por 3 minutos;
7. Resfriar a 4°C;
8. Seguir com o PCR.

Método 3 – “*Overnight*” purificado pré-PCR: utilizou-se do mesmo protocolo descrito no item anterior, no entanto, as amostras foram purificadas antes da realização do PCR. Para purificação utilizou-se o kit DNA Genelute PCR Clean-Up Kit, conforme as orientações do fabricante.

Método 4 – *Worm Lysis Buffer (WLB)* adaptado:

1. Adicionar 20 µl de buffer (do DNeasy Blood & Tissue Kit) em microtubos tipo Eppendorf e adicionar o nematoide ao tubo.
2. Congelar os tubos por 10-15 min (utilizou-se tempo de 12 min);
3. Após o congelamento, adicional 1 µl de enzima de proteinase k.
4. Antes de utilizar o DNA extraído, realizar a centrifugação a 14.000 rpm por 1’.
5. Seguir com a amplificação do DNA (PCR).

Método 5 – *WLB* purificado pré-PCR: utilizou-se o mesmo protocolo descrito no item anterior. No entanto, as amostras foram purificadas antes da amplificação do DNA. Para a purificação utilizou-se o kit DNA Genelute PCR Clean-Up Kit, conforme as orientações do fabricante.

Para a amplificação do DNA (PCR) foi utilizado o Kit Gene DireX em amostras não purificadas e o Kit da Sinapse para as amostras purificadas, conforme a Tabela 1.

A PCR foi realizada em um termociclador automatizado (Applied Biosystems™ 2720 *Thermal Cycler*) com desnaturação inicial de 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 92 °C por 2 min (desnaturação), 55 °C por 1 min (anelamento), 72 °C por 1 min (alongamento) e extensão final a 72 °C por 1 min. Cada reação incluiu um controle negativo sem DNA.

Tabela 1 – Protocolo com as quantidades de reagentes utilizadas na amplificação do DNA.

Solução	Quantidade (µl)
Água	11
DNTP	2,5
Primer D3B ²	1
Primer D2A ³	1
Buffer	2,5
MgCl ₂	1,5
Taq	0,5
DNA	5,0
Volume final	25

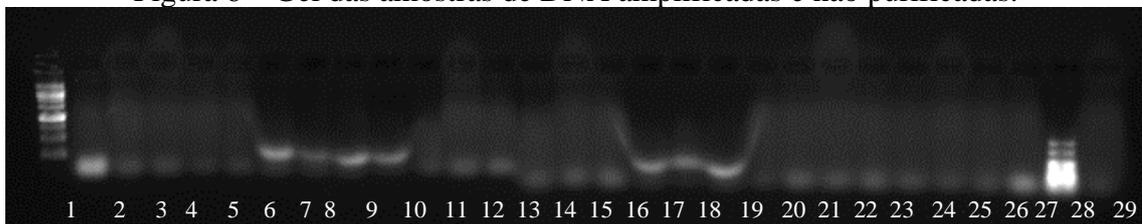
¹ Sequência (5' – 3'): TCGGAAGGAACCAGCTACTA

² Sequencia (5' – 3'): ACAAGTACCTGGGAAAGTTG

Fonte: A autora.

Para julgar a qualidade de uma corrida de PCR, os produtos foram visualizados sob luz UV após a eletroforese em gel de agarose, a 90 volts por 60 min (Figura 1). As amostras foram codificadas conforme a Tabela 2.

Figura 6 – Gel das amostras de DNA amplificadas e não purificadas.



Código das amostras conforme tabela 1. 50pb e 1kb: marcadores de peso molecular; CN: controle negativo. 1: Marcador 1kb, 2: controle negativo, 3: 10c, 4: 10, 5: 9, 6: 9, 7: 6, 8: 5; 9: 5; 10: 4, 11: 2C, 12: 1, 13:1, 14:8, 15:7, 16: 7, 17: 4, 18:3, 19: 3, 20: 2C, 21: 2, 22: 2, 23: 1, 24: 1, 25: 2C, 26: 2, 27: 2, 28: Marcador 50pb, 29: 2

Fonte: A autora.

Nas amostras 3, 4, 4+, 5 e 6 foi possível visualizar a separação dos fragmentos de DNA em gel de eletroforese. Todas estas amostras foram extraídas pelo método WLB. O restante do material extraído das amostras 5, 6, 9 e 10 (identificadas com a letra “p” após código de cada amostra) foi purificado para testar se a realização de purificação pré-PCR poderia favorecer a concentração do DNA e posteriormente sua amplificação.

Tabela 2 – Código utilizado para cada amostra, conforme o protocolo de extração de DNA utilizado e tipo de amostra contendo os nematoides.

Protocolo	Amostras com nematoides congelados	Amostras com nematoides “frescos”	Amostra composta de nematoides “frescos”
DNeasy Blood & Tissue Kit	1	2	2C
WLB	3	4	-
WLB c/ purificação pré- PCR	5	6	-
<i>Overnight</i>	7	8	-
<i>Overnight</i> c/ purificação pré-PCR	9	10	10C

O protocolo de extração “DNeasy Blood & Tissue Kit” sugere, em sua última etapa, eluir o DNA em 200 µl de Buffer AE. Para amostras eluídas em 150 µl, utilizou-se o símbolo “*” após o código da amostra. Quando foi utilizado 10 µl de DNA na PCR, utilizou-se o símbolo “+” após o código da amostra.

Fonte: A autora.

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose após decorridos 30 (a) e 60 min (b).



Código das amostras conforme Tabela 2. 50pb e 1kb: marcadores de peso molecular; CN: controle negativo. 1: Marcador 50 pb, 2: CN, 3: CN, 4: 10, 5: 9, 6: 9, 7:9, 8: 6, 9: 5, 10: 2, 11: 1, 12: 3; 13: 7, 14: 4, 15: CN, 16: CN, 17: 10, 18:9, 19: 9, 20:6, 21:5, 22:5, 23: Marcador 1kb.

Fonte: A autora.

Para as amostras “3” foi realizado mais um PCR, com objetivo de aumentar a quantidade de DNA. Posteriormente, as amostras do primeiro e do segundo PCR foram unidas. Para o segundo PCR foi utilizado o Kit da Sinapse.

Para as amostras purificadas antes da reação do PCR não se obteve sucesso, ou seja, não foram visualizadas bandas que indicassem a presença de fragmentos de DNA no gel de agarose. Por fim, as amostras 3, 4, 4+, 5 e 6 foram purificadas por meio do Kit de purificação

EasyPure[®] PCR Purification Kit (TransGen Biotech Co., LTD) e a qualidade e quantidade de DNA proveniente de PCR foram verificadas em NanoDrop (Thermo Scientific™ NanoDrop Lite).

Para o sequenciamento foram enviadas as amostras 5 e 6, uma vez que foram as únicas que apresentaram quantidade suficiente de DNA conforme exigido pela empresa de sequenciamento. No entanto, não se obteve sucesso no sequenciamento das amostras de DNA.