

# Patogenicidade de *Pratylenchus coffeae* em Plântulas de Cafeeiro cv. Mundo Novo\*

Roberto K. Kubo<sup>1</sup>, Rosângela A. Silva<sup>2</sup>, Melissa D. Tomazini<sup>2</sup>, Cláudio M. G. Oliveira<sup>1</sup>, Paulo Mazzafera<sup>3</sup> & Mário M. Inomoto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Nematologia, Centro Experimental do Instituto Biológico, Cx. Postal 70, 13001-970, Campinas, SP, fax: (19) 3251-0327, e-mail: [kubo@biologico.br](mailto:kubo@biologico.br); <sup>2</sup>Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Cx. Postal 9, 13418-900, Piracicaba, SP; Departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Cx. Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP

(Aceito para publicação em 18/09/2002)

Autor para correspondência: Roberto Kazuhiro Kubo

KUBO, R.K., SILVA, R.A., TOMAZINI, M.D., OLIVEIRA, C.M.G., MAZZAFERA, P. & INOMOTO, M.M. Patogenicidade de *Pratylenchus coffeae* em plântulas de cafeeiro cv. Mundo Novo. *Fitopatologia Brasileira* 28:041-048. 2002.

## RESUMO

A patogenicidade de dois isolados de *Pratylenchus coffeae* do Brasil sobre plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica*) cv. Mundo Novo foi avaliada em dois experimentos de casa de vegetação. No primeiro experimento, avaliou-se o efeito de densidades populacionais iniciais ( $P_i = 0, 333, 1.000, 3.000$  e  $9.000$  nematóides por planta) de um isolado de *P. coffeae* proveniente de Marília (hospedeiro: cafeeiro). Os valores das variáveis foram ajustados pelo modelo não linear de Seinhorst  $Y = m + (1-m) \cdot Z^{P_i-T}$ . Ao final do experimento (270 dias após a inoculação), todas as plantas que receberam  $P_i = 9.000$  e a maioria das que receberam  $P_i = 3.000$  haviam morrido. Verificou-se acentuado efeito de *P. coffeae* sobre a fotossíntese a partir da  $P_i = 1.000$  e sobre o crescimento do cafeeiro a partir da  $P_i = 333$ . No segundo experimento, comparou-se a patogenicidade de dois isolados de *P.*

*coffeae* [de Marília e Rio de Janeiro (hospedeiro: *Aglaonema* sp.)] sobre plântulas de cafeeiro com dois pares de folhas verdadeiras, utilizando-se a  $P_i = 8.000$  nematóides por planta. Ambos os isolados reduziram a fotossíntese, mas o isolado de Marília causou intenso escurecimento das raízes, clorose foliar e menor tamanho das raízes e parte aérea. O crescimento populacional de ambos os isolados foi baixo, comprovando que o cafeeiro não é um bom hospedeiro desses isolados. Os resultados deste experimento demonstraram diferença na patogenicidade entre os isolados testados, confirmando trabalhos anteriores que verificavam que eles apresentam diferenças morfológicas e quanto à preferência por hospedeiros.

**Palavras-chave adicionais:** Brasil, *Coffea arabica*, fotossíntese, nematóide das lesões, relações parasito-hospedeiro.

## ABSTRACT

### Pathogenicity of *Pratylenchus coffeae* on seedlings of coffee cv. Mundo Novo

The pathogenicity of two isolates of *Pratylenchus coffeae* from Brazil on coffee (*Coffea arabica*) seedlings cv. Mundo Novo was evaluated in two greenhouse experiments. In the first, the effect of initial population densities ( $P_i = 0; 333; 1,000; 3,000$  and  $9,000$  nematodes per plant) was studied using an isolate of *P. coffeae* from Marília, SP, Brazil (host: coffee). The data were adjusted for the Seinhorst non linear model  $Y = m + (1-m) \cdot Z^{P_i-T}$ . At the end of the experiment (270 days after inoculation), all plants infested with 9000 nematodes and most of those infested with 3000 were dead. Growth and photosynthesis were reduced, starting at 333 and 1000

nematodes, respectively. In the second experiment, two isolates of *P. coffeae* from Marília and Rio de Janeiro (host: *Aglaonema* sp.) were compared with respect to their pathogenicity, inoculating  $P_i = 8,000$  nematodes per plant in coffee seedlings with two pairs of true leaves. Although photosynthesis was similarly reduced by both isolates, the Marília isolate caused intense darkening of the roots, leaf chlorosis and stronger reduction of root and shoot growth. In both experiments, multiplication factors of the isolates were low, indicating that coffee is a poor host for both isolates of *P. coffeae*. The differential pathogenicity observed in the second experiment supports previous results in the literature showing differences between these isolates concerning morphological features and host ranges.

## INTRODUÇÃO

O nematóide das lesões radiculares do cafeeiro [*Pratylenchus coffeae* (Zimmermann, 1898) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941] é uma espécie bastante

prejudicial a essa planta em vários países produtores, principalmente em Barbados, Congo, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Índia, Jamaica, Madagascar, Malásia, Martinica e Filipinas (Campos *et al.*, 1990; Villain *et al.*, 2000). No Brasil, foi relatado pela primeira vez no cafeeiro (*Coffea arabica* L.) por Monteiro & Lordello (1974), em Marília, SP, mas a importância para a cafeicultura brasileira ainda não está estabelecida. Embora seja espécie comum no Brasil, a ocorrência em cafeeiro, hospedeiro típico, é muito pequena,

\* Financiado pela FAPESP (processo no. 2000/01644-9) e PNP&D/Café (subprojeto 01.1998.155.07). Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor e da Dissertação de Mestrado da segunda autora (bolsista da FAPESP, processo no. 1998/04253-9).

tendo sido registrada em apenas uma dentre 218 amostras coletadas em cafezais do estado de São Paulo (Gonçalves *et al.*, 1978). Na Guatemala, Villain *et al.* (2000) observaram, em condições de campo, alta susceptibilidade e mortalidade de plantas de cafeeiro a *Pratylenchus* spp. (*P. coffeae* e outras espécies não nomeadas). Banana (*Musa* spp.), citros (*Citrus* spp.), graviola (*Annona muricata* L.) e cará (*Dioscorea cayennensis* L. var. *rotundata* Poir.) são algumas das outras culturas prejudicadas por *P. coffeae* (Duncan & Cohn, 1990; Gowen & Quénehervé, 1990; Moura & Monteiro, 1995; Moura *et al.*, 1999).

Estudos recentes evidenciam a existência de diferenças morfológicas e moleculares entre diversos isolados de *P. coffeae* provenientes de diferentes países (Duncan *et al.*, 1999). No Brasil, dois deles foram estudados por Silva & Inomoto (no prelo) em relação às plantas hospedeiras. Um foi coletado em raízes de cafeeiro na cidade de Marília, SP, e o outro de raízes de *Aglaonema* sp. (ornamental da família Araceae) na cidade do Rio de Janeiro. Embora citros, bananeira e cafeeiro figurem entre as principais plantas hospedeiras de *P. coffeae*, limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck) e banana cv. Nanicão (*Musa acuminata* Colla grupo AAA) mostraram-se imunes ao nematóide e cafeeiro Catuaí Vermelho foi hospedeiro pouco favorável de ambos os isolados, em experimentos em casa de vegetação. Apesar de o cafeeiro ser o hospedeiro típico de *P. coffeae* e de o isolado de Marília ter sido coletado em raízes dessa planta exibindo sintomas típicos de pratilencose, ou seja, necrose radicular, outras plantas mostraram-se melhores hospedeiras desse isolado que o próprio cafeeiro. O isolado de Marília foi nomeado como K<sub>5</sub> e o do Rio de Janeiro como M<sub>2</sub> (Duncan *et al.*, 1999).

A espécie atualmente chamada *P. coffeae* parece abrigar biótipos que, além de variações morfológicas e moleculares, diferem em relação aos seus hospedeiros. Como, além disso, há poucos estudos em condições controladas estimando os danos causados por *P. coffeae* do café, julgou-se importante reavaliar a importância desse nematóide como patógeno dessa cultura. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar, em casa de vegetação, o efeito de diferentes densidades populacionais de um dos isolados *P. coffeae* acima citados (de Marília) na fotossíntese e no crescimento de plântulas de cafeeiro cv. Mundo Novo, bem como comparar os dois isolados acima citados em relação à sua patogenicidade ao cafeeiro.

## MATERIAL E MÉTODOS

O inóculo inicial de *P. coffeae* utilizado nos experimentos foi obtido em 1998 de raízes de cafeeiro em Marília, e de raízes de *Aglaonema* sp. na cidade do Rio de Janeiro. O primeiro material foi coletado no mesmo local em que foi feito o encontro dessa espécie por Monteiro & Lordello (1974). As raízes de ambas as plantas exibiam sintomas típicos de infecção por *Pratylenchus* spp. A identificação dos exemplares foi feita a partir de lâminas temporárias, examinadas sob

microscópio óptico, e baseada em características morfológicas (Loof, 1978).

Para produção de culturas puras de *P. coffeae*, exemplares do nematóide foram superficialmente esterilizados em ampicilina a 0,1% e transferidos individualmente para recipientes de vidro contendo calos de alfafa (*Medicago sativa* L.), produzidos segundo o método de Riedel *et al.* (1973). Obtiveram-se 30 culturas de *P. coffeae* proveniente de Marília e 15 culturas do material proveniente do Rio de Janeiro, e cada uma das culturas foi originária de uma única fêmea. Essas culturas formaram os dois isolados utilizados nesses experimentos, K<sub>5</sub> e M<sub>2</sub> respectivamente, segundo a terminologia utilizada por Duncan *et al.* (1999). Os isolados foram mantidos em laboratório através de repicagens periódicas para novos calos de alfafa. Por ocasião da inoculação, os nematóides foram extraídos de calos de alfafa após 45-90 dias da repicagem, pelo método do funil de Baermann, modificado para recipiente raso (Southey, 1986). A suspensão aquosa resultante, constituída de juvenis e adultos de *P. coffeae*, foi utilizada como inóculo.

Plântulas de cafeeiro cv. Mundo Novo foram obtidas de sementes germinadas em caixas contendo areia esterilizada em autoclave, e mantidas em casa de vegetação. Ao atingir o estágio de orelha de onça, ou seja, quando os cotilédones estão totalmente expandidos, cada plântula teve a raiz podada, deixando-se 7 cm da raiz principal, e transplantada individualmente para recipientes plásticos de 500 ml de capacidade, contendo 450 ml de solo esterilizado com brometo de metila (150 ml de CH<sub>4</sub>Br/1.000 l de solo). Para manter as plantas em boas condições agrônômicas, as mesmas receberam, sempre que houve necessidade, solução nutritiva completa e tratamentos fitossanitários convencionais.

Em ambos os experimentos, foi avaliada a capacidade fotossintética das plantas através da medição da fluorescência da clorofila sob condições não saturadas de luz, por meio do aparelho "Photosynthesis Yield Analyzer MINI-PAM (Heinz Walz GmabH)". As medições foram feitas utilizando-se folhas completamente expandidas, e expostas à luz solar, entre 9:50 e 10:10 h da manhã, quando a radiação luminosa era de 900 a 1.000 mol. m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Para a comparação das capacidades fotossintéticas utilizou-se o parâmetro rendimento (*yield*). Este parâmetro fornece o rendimento quântico da conversão efetiva da energia fotoquímica na fotossíntese. Sendo a fonte de luz estável, tal como ocorre em condições de campo, o parâmetro rendimento reflete a eficiência geral do processo fotossintético.

### Experimento 1. Efeito de densidades populacionais do isolado de Marília (K<sub>5</sub>) na fotossíntese e no crescimento

Os cafeeiros receberam cinco densidades populacionais de *P. coffeae*: 0 (plantas testemunhas), 333, 1.000, 3.000 e 9.000 nematóides por planta. Cada densidade correspondeu a um tratamento quantitativo e teve 12 repetições. As inoculações foram feitas em duas etapas: a primeira inoculação aos 30 dias após o transplante, com 2/3 da dose total utilizada, e a segunda, 34 dias após a primeira. Na primeira inoculação,

para a densidade mais alta, a suspensão contendo os nematóides foi ajustada inicialmente para 3.000 nematóides por ml e cada plântula recebeu 6.000 nematóides, através da pipetagem de 2 ml da suspensão em dois pequenos orifícios do solo, próximo às raízes, sobre pequeno pedaço de lenço de papel, visando minimizar a percolação do inóculo. Para as outras densidades, as suspensões foram ajustadas para, respectivamente, 1.000, 333, 111 nematóides por ml e o procedimento para inoculação foi idêntico àquela utilizada na maior dose. Plantas não infestadas receberam apenas água destilada. A seguir, todas as plantas foram mantidas à sombra, no laboratório, por 12 h após a inoculação, para evitar possíveis danos aos nematóides causados pelo calor, e posteriormente transferidas para a casa de vegetação. Mais tarde, aos 34 dias após a primeira inoculação (d.a.i.), foi realizada a segunda inoculação, com 1/3 da dose, perfazendo o total do inóculo planejado. O procedimento utilizado foi semelhante ao realizado na primeira inoculação.

Cento e trinta e cinco d.a.i., os cafeeiros foram transferidos da casa de vegetação em que estavam, no Instituto Biológico, em Campinas, SP, para outra, na ESALQ/USP, em Piracicaba, SP, que apresentava melhor controle do sistema de refrigeração. Cento e cinquenta dias após a inoculação, os cafeeiros foram transferidos para vasos plásticos de 2,1 l, em que foram colocados mais 1,3 l de solo esterilizado com brometo de metila.

O rendimento fotossintético das plantas foi avaliado aos 208 d.a.i. e 244 d.a.i. A avaliação final do experimento foi feita aos 252 d.a.i., baseada nas seguintes variáveis: altura das plantas, peso fresco das raízes, peso seco da parte aérea e crescimento populacional do nematóide. Além disso, haviam sido feitas outras leituras da altura das plantas aos 188 e 230 d.a.i. A população final do nematóide (Pf) foi estimada em todas as parcelas do experimento pela contagem dos nematóides extraídos das raízes e do solo contido nos vasos, pelos métodos de Coolen & D'Herde (1972) e Jenkins (1964), respectivamente, e o crescimento populacional foi calculado dividindo-se esse valor em cada parcela pela população inicial inoculada (Pi).

Os dados de crescimento obtidos (altura de plantas, peso seco da parte aérea e peso fresco das raízes) e de rendimento da fotossíntese foram analisados de acordo com o modelo não linear proposto por Seinhorst, que, segundo Oliveira *et al.* (1999), fundamenta-se na seguinte equação:

$$Y = m + (1-m) \cdot Z^{Pi \cdot T}$$

em que, **Y** é a razão entre a variável estimada para crescimento da planta numa densidade populacional inicial do nematóide (**Pi**) dividida pelo valor obtido na testemunha, ou seja, em plantas conduzidas na ausência de nematóides; **m** é o rendimento mínimo da planta obtido sob altas densidades populacionais do nematóide; **Z** é uma constante menor que 1 ( $Z < 1$ ); **Pi** é densidade populacional inicial do nematóide, normalmente maior ou igual a **T** ( $Pi \geq T$ ); e **T** é o limite de

tolerância, ou seja, a densidade populacional mínima de nematóides capaz de influenciar o crescimento da planta. Para execução das análises foi utilizado o programa SeinFit, versão DOS, desenvolvido por Viaene *et al.* (1997).

## Experimento 2. Efeito dos dois isolados na fotossíntese e no crescimento de plantas de cafeeiros

Este experimento foi realizado seguindo o delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos [plantas não infestadas (testemunha), infestadas com o isolado de Marília (K<sub>5</sub>) e infestadas com o isolado do Rio de Janeiro (M<sub>2</sub>)] e 28 repetições. O inóculo foi ajustado para 4.000 nematóides por ml, e cada repetição recebeu 8.000 nematóides contidos em 2 ml de suspensão, distribuídos em dois orifícios no solo próximo às plantas 80 dias após o transplante. Na ocasião, os cafeeiros apresentavam dois pares de folhas verdadeiras. Plantas não infestadas receberam somente água destilada. Depois da inoculação, as plantas infestadas e não infestadas foram mantidas em ambiente sombreado durante 12 h, para prevenir o estresse provocado pelo calor, e então foram transferidos para a casa de vegetação.

As avaliações do efeito da infecção dos nematóides sobre a fotossíntese e o crescimento das plantas iniciaram-se aos 158 d.a.i. Três variáveis de crescimento foram medidas: altura de plantas (28 repetições), peso fresco das raízes (14 repetições) e peso seco da parte aérea (14 repetições). O procedimento para as avaliações foi idêntico ao descrito para o primeiro experimento. Oito plantas de café infestadas com o isolado de Marília e uma planta de café infestada com o isolado do Rio de Janeiro morreram durante o experimento, provavelmente devido aos danos causados pelo nematóide. As plantas restantes foram transferidas para recipientes maiores, contendo 1,3 l de solo esterilizado, para observar a progressão dos danos provocados pelo nematóide.

A população final do nematóide (Pf) foi estimada em oito repetições de cada tratamento, pela contagem dos nematóides extraídos das raízes e do solo contido nos vasos, pelos métodos de Coolen & D'Herde (1972) e Jenkins (1964), respectivamente, e o crescimento populacional foi calculado dividindo-se esse valor em cada parcela pela população inicial inoculada (Pi).

As repetições remanescentes foram mantidas em casa de vegetação por mais 101 dias (261 d.a.i.), quando se fez a avaliação final, de maneira idêntica à descrita para o experimento anterior. Os dados da fotossíntese e crescimento foram analisados sem transformação usando o sistema SANEST (Departamento de Matemática e Estatística, ESALQ/USP, Piracicaba, SP). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey. Os crescimentos populacionais dos isolados foram comparados usando o teste de Wilcoxon (Campos, 1983).

*Voucher specimens* de cada isolado (K<sub>5</sub>/ESALQ/1999 e M<sub>2</sub>/ESALQ/1999) foram depositados na Coleção da Nematologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP, Piracicaba, Brasil.

## RESULTADOS

### Experimento 1

Todos os cafeeiros infestados com 9.000 nematóides morreram antes do final do experimento, e somente três cafeeiros infestados com 3.000 nematóides sobreviveram para a avaliação final. Apenas duas plantas infestadas com 1.000 nematóides morreram e nenhuma perda foi observada entre as plantas infestadas com 333 nematóides ou as testemunhas. O aumento populacional de  $K_5$  foi considerável na densidade de 333 nematóides ( $Pf/Pi = 10,1$ ), mas cada vez menor conforme a dose de inóculo utilizada crescia. Houve decréscimo populacional na dose de 3.000 (0,27).

As alturas médias dos cafeeiros na última avaliação para a testemunha e nas densidades populacionais de 333, 1.000 e 3.000 nematóides foram, respectivamente, 30,13; 12,08; 8,55 e 8,12 cm. A equação  $Y = 0,277 + (0,723) \cdot 0,995^{Pi-0}$ , (Figura 1), foi a que melhor ajustou a relação entre altura das plantas e a densidade populacional de *P. coffeae*. Interpretando a equação obtida, o valor T igual a zero indica que a cv. Mundo Novo não apresentou tolerância ao ataque do nematóide, e a altura das plantas foi influenciada negativamente desde a mais baixa população inicial. Ainda, de acordo com a mesma equação, o valor da altura relativa mínima (m) foi igual a 0,277, indicando, numa escala percentual, que somente 27,7% da altura média das plantas dessa cultivar escapou do efeito do ataque do nematóide, ou então, de outra maneira, o nematóide das lesões radiculares promoveu reduções médias de 72,3%. Os dados das duas primeiras avaliações de altura foram proporcionais à da última, razão pela qual somente esta foi analisada.

As raízes das testemunhas apresentavam-se com coloração normal, na última avaliação, mas as dos cafeeiros

infestados, mesmo com a dose mais baixa (333 nematóides), estavam bastante necrosadas. As médias obtidas de peso fresco das raízes (g) para a testemunha e as densidades de 333, 1.000 e 3.000 nematóides foram, respectivamente, 9,94; 2,28; 0,75 e 0,45. Para a variável peso fresco das raízes, a equação obtida foi  $Y = 0,114 + (0,886) \cdot 0,936^{Pi-300}$ . Segundo essa equação, o limite de tolerância foi igual a 300 para o cafeeiro estudado, evidenciando a capacidade do nematóide em causar danos no sistema radicular a partir da  $Pi = 300$  nematóides por planta. O rendimento mínimo (valor m) foi igual a 0,114 para o cafeeiro, ou seja, o nematóide causou redução do sistema radicular de até 88,6%, comprovando o efeito altamente danoso de *P. coffeae* no desenvolvimento do sistema radicular.

Os valores médios obtidos para peso seco da parte aérea (g) para testemunha e as densidades de 333, 1.000 e 3.000 nematóides foram, respectivamente, 4,54; 0,92; 0,22 e 0,09. A equação  $Y = 0,038 + (0,962) \cdot 0,995^{Pi-0}$  foi a que melhor mostrou o ajuste para os dados obtidos (Figura 1). O limite de tolerância (T) foi igual a zero, indicando que esta cultivar sofreu reduções de peso seco da parte aérea mesmo na menor população inicial de *P. coffeae*. O valor calculado para o parâmetro m foi igual a 0,038, indicando reduções de até 96,2% na massa de material seco da parte aérea nos níveis mais altos de inóculo.

Os valores médios obtidos para rendimento da fotossíntese na primeira (208 d.a.i.) e na segunda avaliação (244 d.a.i.) para a testemunha e as densidades populacionais de 333, 1.000 e 3.000 nematóides foram, respectivamente, 0,0105; 0,108; 0,084 e 0,074; e 0,102; 0,098; 0,075 e 0,025. A equação  $Y = 0,709 + (0,291) \cdot 0,989^{Pi-900}$  foi obtida para a primeira avaliação (Figura 2). O limite de tolerância foi igual a 900, indicando que as reduções no rendimento da fotossíntese ocorreram somente a partir de uma população inicial de 900 nematóides. O valor calculado para o parâmetro

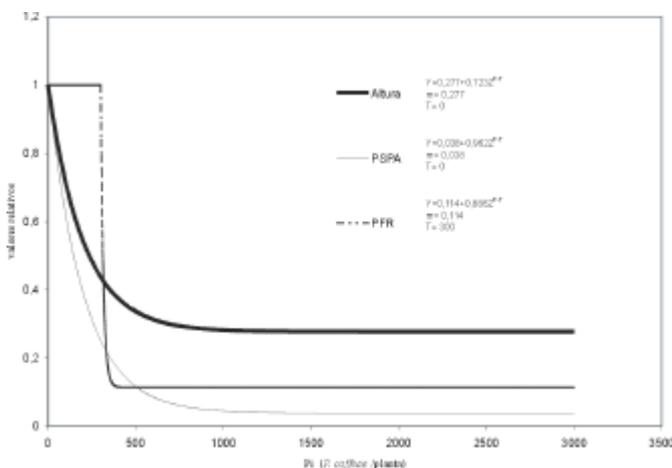


FIG. 1 - Relações entre a população inicial ( $Pi$ ) de *Pratylenchus coffeae* e os valores relativos de altura, peso seco da parte aérea (PSPA) e peso fresco das raízes (PFR) de cafeeiro (*Coffea arabica*) cv. Mundo Novo aos 252 dias após a inoculação (d.a.i.).

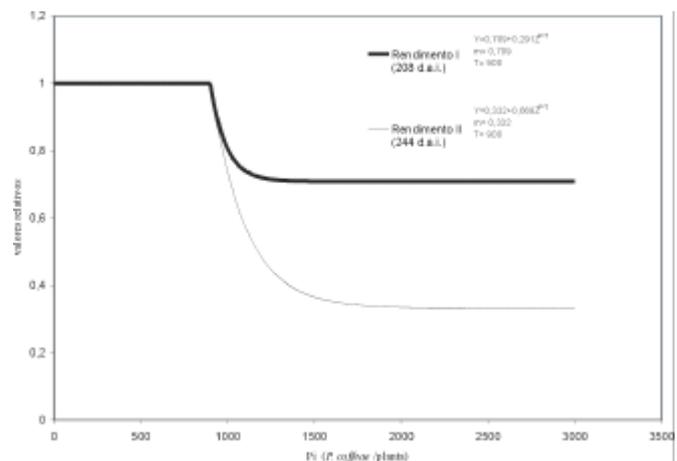


FIG. 2 - Relações entre a população inicial ( $Pi$ ) de *Pratylenchus coffeae* e os valores relativos do rendimento da fotossíntese de cafeeiro (*Coffea arabica*) cv. Mundo Novo aos 208 e 244 dias após a inoculação (d.a.i.).

m foi igual a 0,709, indicando que na população inicial mais alta houve redução de rendimento da fotossíntese de 29,1%. A equação que melhor se ajustou na segunda avaliação foi  $Y = 0,332 + (0,668) \cdot 0,995^{Pi - 900}$  (Figura 2). Nota-se que os valores limite de tolerância seguiram a mesma tendência em ambas as equações, porém a partir de 900 nematóides os efeitos foram mais drástico nas plantas da segunda avaliação, atingindo reduções do rendimento de até 66,8% (valor  $m = 0,332$ ).

Visualmente, os danos foram evidentes e proporcionais às densidades de inóculo, na parte aérea dos cafeeiros (Figuras 3 e 4).

## Experimento 2

Ambos os isolados de *P. coffeae* causaram danos severos nas raízes do cafeeiro cv. Mundo Novo (Tabelas 1 e 2). Raízes de plantas infestadas com *P. coffeae* provenientes do Rio de Janeiro ( $M_2$ ) exibiram raízes secundárias escurecidas, principalmente próximo à raiz principal, e menos radículas que plantas não infestadas. O efeito de *P. coffeae* proveniente de Marília ( $K_5$ ) foi mais drástico. Na maioria das plantas infestadas, a raiz principal foi quase completamente destruída, e raízes secundárias saudáveis foram produzidas somente na região proximal, geralmente menos danificadas. Em algumas plantas infestadas com  $K_5$ , mesmo a região proximal da raiz principal foi severamente danificada, e as poucas raízes secundárias produzidas mostravam-se acastanhadas. As raízes das plantas infestadas eram muito menores que as das não infestadas e várias plantas morreram (até o final do experimento, nove plantas com  $K_5$  e uma com  $M_2$ ). Além disso, os cafeeiros com  $K_5$  exibiam às épocas das avaliações intensas cloroses foliares. Apesar dos danos

observados, houve uma redução da população de nematóides durante o experimento (Tabelas 1 e 2).

A fotossíntese e o crescimento das plantas foram afetados por *P. coffeae*. De maneira geral, o rendimento da fotossíntese na primeira avaliação (158 dias após a inoculação) foi mais elevado que o segundo (194 dias) (Tabelas 1 e 2). Ambos os isolados reduziram o rendimento de fotossíntese em relação à testemunha na primeira avaliação, mas não houve diferença entre as plantas infestadas e as testemunhas na segunda avaliação. Os valores médios de altura das plantas e peso seco da parte aérea das plantas infestadas com  $K_5$  foram menores que das infestadas com  $M_2$ , e nestas tais valores foram menores que os observados nas plantas não infestadas (Tabelas 1 e 2).

## DISCUSSÃO

Os efeitos danosos do isolado de Marília de *P. coffeae* ( $K_5$ ) sobre o cafeeiro cv. Mundo Novo puderam ser comprovados, em primeiro lugar, pelo grande número de plantas que morreram no experimento 1. Isso pode ter sido provocado, além dos danos devidos aos nematóides, pelo estresse causado pelas altas temperaturas nos primeiros meses do período experimental (outubro de 1999 a fevereiro de 2000) e pela deficiente refrigeração na casa de vegetação de Campinas. Ainda assim, é evidente que o principal responsável pela mortalidade foi *P. coffeae*, pois foi nula nas testemunhas e nas plantas com 333 nematóides, e nas demais plantas foi proporcional às densidades populacionais iniciais. Embora não tenha ocorrido perda de plantas na  $Pi = 333$ , houve uma redução drástica do peso fresco das raízes e do peso seco da parte aérea, quando comparada com a testemunha. Esse efeito também pode ser atribuído em parte ao estresse sofrido pelos



FIG. 3 - Efeito de densidades populacionais do isolado de Marília ( $K_5$ ) de *Pratylenchus coffeae* na parte aérea de cafeeiro (*Coffea arabica*) cv. Mundo Novo, aos 244 dias após a inoculação (experimento 1).



FIG. 4 - Efeito de densidades populacionais do isolado de Marília ( $K_5$ ) de *Pratylenchus coffeae* na parte aérea de cafeeiro (*Coffea arabica*) cv. Mundo Novo, aos 244 dias após a inoculação (experimento 1).

**TABELA 1 - Efeito de isolados de Marília (K<sub>5</sub>) e Rio de Janeiro (M<sub>2</sub>) de *Pratylenchus coffeae* sobre crescimento e rendimento da fotossíntese em cafeeiros (*Coffea arabica*) cv. Mundo Novo, e aumento populacional (Pf/Pi) desses isolados 139 dias após a inoculação (experimento 2)**

Tratamento	Altura das plantas (cm) <sup>1,4</sup>	Peso fresco das raízes (g) <sup>2,4</sup>	Peso seco da parte aérea (g) <sup>2,4</sup>	Rendimento (yield) <sup>1,4</sup>	Pf/Pi <sup>3,5</sup>
K <sub>5</sub>	8,4 a	0,6 a	0,2 a	93,7 a	0,37 b
M <sub>2</sub>	9,9 b	1,7 b	0,5 b	113,0 a	0,11 a
Testemunha	17,9 c	3,8 b	1,6 c	157,3 b	-

<sup>1</sup>Médias de 20 e 27 plantas infetadas com K<sub>5</sub> e M<sub>2</sub>, respectivamente, e 28 plantas testemunhas.

<sup>2</sup>Médias de dez e 15 plantas infetadas com K<sub>5</sub> e M<sub>2</sub>, e 17 plantas testemunhas.

<sup>3</sup>Médias de oito repetições.

<sup>4</sup>Diferentes letras dentro das colunas indicam significância estatística pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).

<sup>5</sup>Diferentes letras indicam significância pelo teste de Wilcoxon (P ≤ 0,05).

**TABELA 2 - Efeito de isolados de Marília (K<sub>5</sub>) e Rio de Janeiro (M<sub>2</sub>) de *Pratylenchus coffeae* sobre o crescimento e fotossíntese em cafeeiros (*Coffea arabica*) cv. Mundo Novo, e aumento populacional (Pf/Pi) dos isolados 270 dias após a inoculação (experimento 2)**

Tratamento	Altura das plantas (cm) <sup>1</sup>	Peso fresco das raízes (g) <sup>1</sup>	Peso seco da parte aérea (g) <sup>1</sup>	Rendimento (yield) <sup>1</sup>	Pf/Pi <sup>2</sup>
K <sub>5</sub>	11,1 a	2,1 a	0,7 a	63,0 a	0,43 b
M <sub>2</sub>	22,9 b	9,0 b	2,9 b	62,6 a	0,06 a
Testemunha	40,9 c	27,4 c	10,5 c	75,0 a	-

<sup>1</sup>Médias de nove e 12 plantas infetadas com K<sub>5</sub> e M<sub>2</sub>, respectivamente, e 11 plantas testemunhas; diferentes letras dentro das colunas indicam significância estatística pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).

<sup>2</sup>Médias de seis repetições; diferentes letras dentro das colunas indicam significância estatística no teste de Wilcoxon (P ≤ 0,042).

cafeeiros durante o período que permaneceram em Campinas, mas é oportuno observar que as plantas não infestadas recuperaram-se quando foram transferidas para outra casa de vegetação, enquanto que as infestadas mantiveram-se muito debilitadas. Os danos observados nas raízes infestadas com *P. coffeae* podem ser atribuídos principalmente à ação direta dos fitonematóides destruindo as raízes e, provavelmente, ao favorecimento da colonização secundária por microorganismos saprófitos, levando ao apodrecimento.

No experimento 1, o decréscimo populacional na Pi de 3.000 pode ser atribuído ao excessivo número de nematóides para uma reduzida quantidade de sítios de alimentação, esta por sua vez provocada pela própria atividade do nematóide no sentido de debilitar as raízes, concordando com relatos anteriores (Di Vitto *et al.*, 1986). Reduções nas populações de K<sub>5</sub> e M<sub>2</sub> foram igualmente observadas no experimento 2, no qual a população inicial foi muito alta (Pi = 8.000).

Os resultados do experimento 2 mostram que ambos os isolados de *P. coffeae* são prejudiciais ao cafeeiro cv. Mundo Novo, mas K<sub>5</sub> é mais patogênico que M<sub>2</sub>. Além de reduzir mais intensamente o crescimento dos cafeeiros, K<sub>5</sub> foi mais destrutivo às raízes que M<sub>2</sub>. Clorose foliar foi observada apenas nas plantas com K<sub>5</sub> e também mais plantas morreram durante o ensaio com este isolado (nove de K<sub>5</sub> vs. uma de M<sub>2</sub>). Diferenças entre esses isolados já foram apontadas anteriormente; embora classificados como *P. coffeae* segundo

os conceitos vigentes, as diferenças morfológicas verificadas entre K<sub>5</sub> e M<sub>2</sub> sugerem que pertençam a raças ou mesmo espécies distintas entre si (Duncan *et al.*, 1999). Estudando esses isolados em relação às plantas hospedeiras, Silva & Inomoto (no prelo) verificaram que podem ser diferenciados através de alface (*Lactuca sativa* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), gergelim (*Sesamum indicum* L.), milheto (*Pennisetum glaucum* R. Br.), milho (*Zea mays* L.), pimentão (*Capsicum annum* L.) e quiabo (*Abelmoschus esculentus* Moench.), demonstrando que as diferenças entre K<sub>5</sub> e M<sub>2</sub> apontadas por Duncan *et al.* (1999) podem estar relacionadas a diferentes preferências em relação às plantas hospedeiras. Os resultados do experimento 2 demonstram outra diferença existente entre K<sub>5</sub> e M<sub>2</sub>, que é a patogenicidade ao cafeeiro, sendo maior no primeiro isolado. É digno de nota que embora relatado em condições de campo como causando extensivas necroses em raízes de cafeeiro, *P. coffeae* não causou sintomas semelhantes em trabalhos anteriores de casa de vegetação. Segundo Salas & Echanti (1961), o crescimento de raízes e parte aérea de plântulas de cafeeiros cv. Bourbon foi reduzida por um isolado de *P. coffeae* da Costa Rica, mas não se observou necrose radicular. Em outro trabalho, conduzido no Brasil, um isolado de *P. coffeae* proveniente de *Calocasia esculenta* Schott, também estudado por Duncan *et al.* (1999), que denominaram-no M<sub>1</sub> e agruparam-no juntamente com M<sub>2</sub>, pela semelhança morfológica entre os dois, diminuiu o crescimento das raízes e da parte aérea de cafeeiro cv. Mundo

Novo, mas não causou lesões visíveis nas raízes. Segundo os autores, o provável contraste desses resultados com àqueles observados no campo deve-se à ocorrência de sinergismo entre *P. coffeae* e fungos ou bactérias presentes no solo dos cafezais, resultando em infecções secundárias (Inomoto *et al.*, 1998). Os resultados do presente estudo sugerem que K<sub>5</sub> é mais patogênico para cafeeiro que os isolados usados em trabalhos anteriores, pois causam danos mesmo sob reduzidas densidades populacionais. O outro isolado estudado (M<sub>2</sub>) pode deprimir o crescimento de cafeeiro quando presente em elevada quantidade, como demonstrado no experimento 2. Provavelmente esse isolado tenha um comportamento semelhante a M<sub>1</sub>, causando danos no campo somente a longo prazo e em ação conjunta com fungos e bactérias oportunistas do solo, conforme haviam especulado Inomoto *et al.* (1998).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que *P. coffeae* diminuiu a atividade fotossintética do cafeeiro, pelo menor rendimento quântico durante a conversão de energia no processo fotoquímico da fotossíntese. Além disso, houve efeito indireto, pelo menor crescimento das plantas e conseqüente diminuição da área fotossintética. Pouco se conhece sobre o efeito dos nematóides das lesões na fotossíntese de plantas, e os poucos trabalhos a respeito foram conduzidos durante períodos curtos, menores que 50 dias. Além disso, não há registros sobre trabalhos relacionando *Pratylenchus* spp. e fotossíntese em cafeeiro. Kotcon & Loria (1986) estudaram o efeito de *P. penetrans* (Cobb, 1917) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 sobre a taxa de transpiração no tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e não puderam detectar nenhuma diferença significativa. A fotossíntese depende da taxa de transpiração, pois esta é intimamente relacionada com a abertura dos estômatos, e, portanto, com a liberação de CO<sub>2</sub> pelas folhas. Saeed *et al.* (1998) verificaram que esse mesmo nematóide não afetou a taxa fotossintética da batata (*Solanum tuberosum* L.). No entanto, Anwar (1995) mostrou que a infecção de tomate por 3.000 *P. scribneri* Steiner, 1943 levou à diminuição da fotossíntese em folhas expandidas, e que os teores de glicose, amido e sacarose foram menores nas plantas infetadas. O efeito da infecção do nematóide foi visível somente após o florescimento, que aparentemente representou um estresse adicional.

Embora a importância de *P. coffeae* e *Pratylenchus* spp. como patógenos do cafeeiro seja reconhecida em outros países produtores de café, principalmente na Índia e nos países da América Central (Schieber & Grullon, 1969; Villain *et al.*, 2000), tal fato ainda não acontece no Brasil, apesar de ser uma espécie comum no país. É provável que no Brasil ocorram diferentes populações de *P. coffeae*, e somente algumas, como o material representado pelo isolado K<sub>5</sub>, sejam altamente patogênicas ao cafeeiro, causando danos mesmo sob baixas densidades populacionais. Outras, à semelhança do material representado por M<sub>2</sub>, apresentam um baixo potencial de dano, pois se reproduzem muito lentamente no cafeeiro e aparentemente causam danos apenas sob elevadas

densidades populacionais. No entanto, o cafeeiro por se tratar de cultura perene, mantida por vários anos no campo, tais densidades podem ser atingidas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Wallace Gonçalves, do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), pelas sementes de café, e ao Dr. Gilberto José de Moraes, da ESALQ/USP, pelas sugestões durante a elaboração do manuscrito.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANWAR, S. Influence of *Meloidogyne incognita*, *Paratrichodorus minor*, and *Pratylenchus scribneri* on root-shoot growth and carbohydrate partitioning tomato. Pakistan Journal of Zoology 27:105-113. 1995.
- CAMPOS, H. Estatística Experimental Não-paramétrica. Piracicaba. Departamento de Matemática e Estatística/ESALQ. 1983.
- CAMPOS, V.P., SIVAPALAN, P. & GNANAPRAGASAM, N.C. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: Luc, M., Sikora R.A. & Bridge, J. (Eds.) Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. Wallingford, UK. CAB International. 1990. pp.387-430.
- COOLEN, W.A. & J. D'HERDE, C.J. A Method for the Quantitative Extraction of Nematodes from Plant Tissue. Ghent, Belgium. State Nematology and Entomology Research Station. 1972.
- DI VITO, M., GRECO, N. & CARELLA, A. Effect of *Meloidogyne incognita* and importance of the inoculum on the yield of eggplant. Journal of Nematology 18:487-490. 1986.
- DUNCAN, L.W. & COHN, E. Nematode parasites of citrus. In: Luc, M., Sikora R.A. & Bridge, J. (Eds.) Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. Wallingford, UK. CAB International. 1990. pp.321-346.
- DUNCAN, L.W., INSERRA, R.N., THOMAS, W.K., DUNN, D., MUSTIKA, I., FRISSE, L.M., MENDES, M.L., MORRIS, K. & D. T. KAPLAN, D.T. Molecular and morphological analyses of isolates of *Pratylenchus coffeae* and closely related species. Nematropica 29:61-80. 1999.
- GONÇALVES, W., TOMAZIELLO, R.A., MORAES, M.V., FERNANDES, J.A.R., COSTA, A. M., CORSI, T., JUNQUEIRA, C.A., & LACERDA, L.A.O. Estimativas de danos ocasionados pelos nematóides do cafeeiro. VI Congresso de Pesquisa Cafeeira, Ribeirão Preto, SP, 1978. pp.182-186.
- GOWEN, S. & QUÉNÉHERVÉ, P. Nematode parasites of banana and abaca. In: Luc, M., Sikora R.A. & Bridge, J. (Eds.) Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. Wallingford, UK. CAB International. 1990. pp.431-460.
- INOMOTO, M.M., OLIVEIRA, C.M.G., MAZZAFERA, P. & GONÇALVES, W. Effects of *Pratylenchus brachyurus* and *P. coffeae* on seedlings of *Coffea arabica*. Journal of Nematology 30:362-367. 1998.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter 48:692. 1964.
- KOTCON, J.B. & LORIA, R. Influence of *Pratylenchus penetrans* on plant growth and water relations in potato. Journal of

- Nematology 18:385-392. 1986.
- LOOF, P.A.A. The Genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Pratylenchida): a Review of its Anatomy, Morphology, Distribution, Systematics and Identification. Uppsala, Sweden. Swedish University of Agricultural Sciences Research Information Centre. 1978.
- MONTEIRO, A.R. & LORDELLO, L.G.E. Encontro do nematóide *Pratylenchus coffeae* atacando cafeeiro em São Paulo. Revista de Agricultura 49:164. 1974.
- MOURA, R.M., GUIMARÃES, L.M., PEDROSA, E.M.R. & ASANO, S. Estudos sobre a origem da morte súbita da gravioleira. Nematologia Brasileira 23:62-68. 1999.
- MOURA, R.M. & MONTEIRO, A. R. *Pratylenchus coffeae* on yams in Brazil. Fitopatologia Brasileira 20:256. 1995. (Resumo).
- OLIVEIRA, C.M.G., INOMOTO, M.M., VIEIRA, A.M.C. & MONTEIRO, A.R. Efeito de densidades populacionais de *Pratylenchus brachyurus* no crescimento de plântulas de *Coffeae arabica* cv. Mundo Novo e *C. canephora* cv. Apoatã. Nematropica 29:215-221.1999.
- RIEDEL, R.M., FORTER, J.G. & MAI, W.F. A simplified medium for monoxenic culture of *Pratylenchus penetrans* and *Ditylenchus dipsaci*. Journal of Nematology 5:71-72. 1973.
- SAEED, I.A.M., MACGUIDWIN, A.E. & ROUSE, D.I. Effect of initial nematode population density on the interaction of *Pratylenchus penetrans* and *Verticillium dahliae* on "Russet Burbank" potato. Journal of Nematology 30:100-107. 1998.
- SALAS, L.A. & ECHANDI, E. Nematodos parasitos en plantaciones de café de Costa Rica. Café 3:21-24. 1961.
- SCHIEBER, E. & GRULLON, L. El problema de nemátodos que atacan al café (*Coffea arabica*) en la Republica Dominicana. Turrialba 19:513-517. 1969.
- SILVA, R.A. & INOMOTO, M.M. Host-range characterization of two *Pratylenchus coffeae* from Brazil. Journal of Nematology (no prelo).
- SOUTHEY, J.F. Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes. London. Her Majesty's Stationery Office. 1986.
- VIAENE, N.M., SIMOENS, P. & ABAWI, G.S. SeinFit, a computer program for the estimation of the Seinhorst equation. Journal of Nematology 29:474-477. 1997.
- VILLAIN, L., MOLINA, A., SIERRA, S., DECAZY, B. & SARAH, J.L. Effect of grafting and nematicide treatments on damage by root-lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) to *Coffea arabica* L. in Guatemala. Nematropica 30:87-100. 2000.