

ANGELO MIGUEL SANTIN

**CONTROLE BIOLÓGICO DA PLANTA INVASORA**  
*Miconia calvenscens* **POR UMA NOVA**  
**ESPÉCIE DE *Ditylenchus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S235c  
2008

Santin, Angelo Miguel, 1980-

Controle biológico da planta invasora *Miconia calvescens*  
por uma nova espécie de *Ditylenchus* / Ângelo Miguel Santin.  
– Viçosa, MG, 2008.  
xii, 80f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Rosangela D'Arc de Lima Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Miconia calvescens* - Controle biológico.  
2. *Ditylenchus*. 3. Controle biológico. 4. Fitopatologia -  
Aspectos epidemiológicos. I. Universidade Federal de Viçosa.  
II. Título.

CDD 22.ed. 583.76

ANGELO MIGUEL SANTIN

**CONTROLE BIOLÓGICO DA PLANTA INVASORA**  
***Miconia calvenscens* POR UMA NOVA**  
**ESPÉCIE DE *Ditylenchus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de abril de 2008.

---

Prof. Robert Weingart Barreto  
(Co-orientador)

---

Prof. Luiz Antonio Maffia  
(Co-orientador)

---

Dr. Dartanhã José Soares

---

Prof. Silamar Ferraz

---

Prof<sup>ª</sup> Rosângela D'Arc de Lima Oliveira  
(Orientadora)

Aos meus pais, Valdir e Lourdes.

À minha namorada, Nadia.

À minha irmã, Carla.

Ao meu irmão, Fernando e família.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do Programa de Pós-Graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Aos professores Rosângela D'Arc de Lima Oliveira, Robert Weingart Barreto e Luiz Antonio Maffia, pela orientação, pela dedicação, pelos ensinamentos e pela amizade.

À professora Aristéa Alves Azevedo, pelas sugestões e informações necessárias à realização deste trabalho.

À Dalila Ceni, pela dedicação e pelo companheirismo na realização dos trabalhos.

Ao Dr. Dartanhã José Soares, pelas sugestões e informações necessárias à correção deste trabalho.

Aos servidores Célio e Eloi, pela ajuda e pelas informações.

Aos colegas Roseli, Rodrigo, Naylor, Renata, Patrícia, Douglas, Aline, Déborah, Henrique, Davi, Bruno, Elizangela, Marcelo, Geraldo, Flávio, Fabiano e Rodrigo.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

ANGELO MIGUEL SANTIN, filho de Valdir Antonio Santin e Lourdes Santin, nasceu em 6 de dezembro de 1980, em Faxinal dos Guedes, Estado de Santa Catarina.

Em 2000, iniciou o Curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em 25 de julho de 2005.

Em maio de 2006, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, em nível de Mestrado, concentrando seus estudos na área de Nematologia.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	7
CAPÍTULO 1.....	10
GAMA DE HOSPEDEIROS DE <i>Ditylenchus gallaeformans</i> sp. n., POTENCIAL AGENTE DE BIOCONTROLE DE <i>Miconia calvescens</i> (MELASTOMATACEAE).....	10
1. INTRODUÇÃO .....	10
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	12
2.1. Determinação indireta da gama de hospedeiros de <i>Ditylenchus</i> <i>gallaeformans</i> .....	12
2.2. Determinação da gama de hospedeiro por meio de inoculações .....	15
2.3. Verificação da infectividade de <i>Ditylenchus gallaeformans</i> a <i>Miconia</i> <i>calvescens</i> do biótipo do Havaí em condições de campo.....	16
3. RESULTADOS .....	17
3.1. Determinação indireta da gama de hospedeiros de <i>Ditylenchus</i> <i>gallaeformans</i> .....	

	<b>Página</b>
3.2. Determinação da gama de hospedeiro por meio de inoculações artificiais .....	17
3.2.1. Descrição dos sintomas por espécie.....	19
3.3. Verificação da infectividade de <i>Ditylenchus gallaeformans</i> a <i>Miconia calvescens</i> do biótipo do Havaí em condições de campo	23
4. DISCUSSÃO .....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	28
CAPÍTULO 2.....	30
HISTOPATOLOGIA DE GALHAS INDUZIDAS POR <i>Ditylenchus gallaeformans</i> sp. n. EM FOLHAS DE <i>Miconia ibaguensis</i>	30
1. INTRODUÇÃO .....	30
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	32
2.1. Coleta e processamento do material coletado no campo .....	32
2.2. Histopatologia de folhas de <i>M. ibaguensis</i> inoculadas com <i>Ditylenchus gallaeformans</i> .....	33
3. RESULTADOS .....	34
3.1. Cronologia do desenvolvimento das galhas em tecidos inoculados artificialmente.....	37
4. DISCUSSÃO .....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43
CAPÍTULO 3.....	45
ASPECTOS BIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS DE <i>Ditylenchus gallaeformans</i> sp. n., POTENCIAL AGENTE DE BIOCONTROLE DE <i>Miconia calvescens</i> (MELASTOMATACEAE) .....	45
1. INTRODUÇÃO .....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	47
2.1. Ciclo de vida de <i>Ditylenchus gallaeformans</i> .....	47
2.1.1. Período de emبریogenesis .....	47
2.1.2. Período de desenvolvimento pós-emبریogenesis .....	48

	<b>Página</b>
2.2. Verificação do estágio de anidrobiose de <i>Ditylenchus gallaeformans</i> .....	49
2.2.1. Verificação do estágio de anidrobiose de <i>Ditylenchus gallaeformans</i> em galhas secas encontradas no campo .....	49
2.2.2. Sobrevivência de <i>Ditylenchus gallaeformans</i> em tecidos vegetais campo.....	49
2.3. Dinâmica temporal da população de <i>Ditylenchus gallaeformans</i> em plantas de <i>Miconia ibaguensis</i> .....	50
3. RESULTADOS .....	51
3.1. Determinação da duração do ciclo de vida de <i>D. gallaeformans</i> .....	51
3.1.1. Período de embriogênese .....	51
3.1.2. Período de desenvolvimento pós-embriogênico .....	52
3.2. Verificação do estágio de anidrobiose de <i>Ditylenchus gallaeformans</i> .....	52
3.2.1. Verificação do estágio de anidrobiose de <i>Ditylenchus gallaeformans</i> em galhas secas encontradas no campo .....	52
3.2.2. Sobrevivência de <i>Ditylenchus gallaeformans</i> em tecidos vegetais ....	53
3.3. Dinâmica temporal da população de <i>Ditylenchus gallaeformans</i> em plantas de <i>Miconia ibaguensis</i> .....	54
4. DISCUSSÃO .....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
CAPÍTULO 4.....	62
DANOS CAUSADOS POR <i>Ditylenchus gallaeformans</i> sp. n., EM PLANTAS DE <i>Miconia calvescens</i> (MELASTOMATACEAE) .....	62
1. INTRODUÇÃO .....	62
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	64
2.1. Métodos de inoculação de <i>Ditylenchus gallaeformans</i> .....	64
2.2. Impacto da aplicação de concentrações crescentes de inóculo de <i>Ditylenchus gallaeformans</i> em plantas de <i>Miconia calvescens</i> .....	65
2.3. Análise estatística .....	65
3. RESULTADOS .....	68
3.1. Métodos de inoculação de <i>Ditylenchus gallaeformans</i> .....	68

	<b>Página</b>
3.2. Impacto da aplicação de concentrações crescentes de inóculo de <i>Ditylenchus gallaeformans</i> em plantas de <i>Miconia calvescens</i> .....	
4. DISCUSSÃO .....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	77
CONCLUSÕES GERAIS.....	79

## RESUMO

SANTIN, Angelo Miguel, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2008.  
**Controle biológico da planta invasora *Miconia calvescens* por uma nova espécie de *Ditylenchus*.** Orientadora: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira. Co-orientadores: Robert Weingart Barreto e Luiz Antonio Maffia.

Levantamentos exploratórios de fitopatógenos associados à *Miconia calvescens* para uso em controle biológico apontaram o nematóide *Ditylenchus gallaeformans*, agente causal de galhas e deformações em tecidos aéreos de melastomátáceas, como tendo potencial para este fim. Considerando a interação de melastomátáceas com este nematóide, objetivou-se estudar os aspectos biológicos e ecológicos da nova espécie; a histopatologia das galhas induzidas em seus hospedeiros; a gama de hospedeiros; e o impacto do nematóide em plantas de *M. calvescens*. A gama de hospedeiros de *D. gallaeformans* ficou restrita às plantas da família Melastomataceae e as do gênero *Miconia* foram consideradas as mais suscetíveis. *D. gallaeformans* foi patogênico à *M. calvescens*, tanto do biótipo do Havaí quanto do Brasil. *D. gallaeformans* apresentou o hábito típico de um ectoparasita migrador, com duração média do ciclo de vida desde ovo unicelular até a fase de fêmeas reprodutivas de 19 dias. Foi verificada a presença do estágio de repouso na fase de juvenil de quarto estágio (J4) quando os nematóides se encontram em anidrobiose, o que garantiu ao nematóide sobreviver em material vegetal desidratado por até seis meses. A população de nematóides em Viçosa, MG, foi maior nos períodos de temperaturas mais elevadas; entretanto, a densidade populacional não se correlacionou com as variáveis climáticas. As galhas foliares formadas por

*D. gallaeformans* foram originadas da hiperplasia de células do meristema fundamental nos primórdios foliares. As galhas apresentaram cavidades centrais habitadas pelos nematóides e com ligação ao ambiente externo. Estas cavidades apresentaram, em seu entorno, camadas de células com conteúdo celular denso, responsável pelo fornecimento de alimento para os nematóides. O método de inoculação mais eficiente foi a deposição da suspensão de nematóides nos primórdios foliares. Houve correlação positiva entre incidência, severidade e população de nematóides em plantas inoculadas com diferentes concentrações de inóculo de *D. gallaeformans*. O terceiro par de folhas, emitido após a inoculação, apresentou alta correlação com a incidência e a severidade, sendo considerado o ponto ideal para avaliação destas variáveis. Houve redução no desenvolvimento de plantas de *M. calvescens* com o aumento da concentração de inóculo de *D. gallaeformans*. Concluiu-se que *D. gallaeformans* é específico para a família Melastomataceae, com potencial para o controle biológico de *M. calvescens*, em vista dos danos causados às plantas.

## ABSTRACT

SANTIN, Angelo Miguel, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, april, 2008.  
**Biological control of the invasive weed *Miconia calvescens* using a new species of *Ditylenchus*.** Adviser: Rosângela D’Arc de Lima Oliveira. Co-advisers: Robert Weingart Barreto and Luiz Antonio Maffia.

Exploratory assessments of phytopathogens associated with *Miconia calvescens* to be used for biological control have pointed the nematode *Ditylenchus gallaeformans*, a causal agent of galls and deformations in aerial tissues of Melastomataceae as being potentially fit for such purpose. The description of the new species with the proposition of the name *D. gallaeformans* is in submission phase for the publication. Considering the interaction of Melastomataceae with this nematode, the aim of this work was to study the biological and ecological aspects of the new species; galls histopathology induced in their hosts; host range; and the impact of the nematodes on plants of *M. calvescens*. *D. gallaeformans* host range was restricted to the plants of the family Melastomataceae with those of the genus *Miconia* being considered the most susceptible. *D. gallaeformans* was pathogenic to *M. calvescens*, both the Hawaii and Brazil biotypes. *D. gallaeformans* presented the typical habit of a migrant ectoparasite with life cycle mean duration of 19 days, from unicellular egg formation to the reproductive female phase. Rest stage at the fourth stage juvenile phase (J4), was verified, when the nematodes are in anhydrobiosis, what guarantees their survival in dehydrated plant material for up to 6 months. The nematode population in Viçosa, MG increased in the periods of higher temperatures; however, population density did not

correlate with the climatic variables. The foliar galls formed by *D. gallaeformans* originated from hyperplasia of the fundamental meristem cells in the leaf primordia. The galls presented central cavities housing the nematodes and connected to the external environment. These cavities were surrounded by layers of dense cells responsible for supplying food to the nematodes. The most efficient inoculation method was the deposition of nematode suspension on the leaf primordia. A positive correlation was found among incidence, severity, and nematode population in plants inoculated at different concentrations of *D. gallaeformans* inoculum. The third leaf pair emitted after inoculation presented high correlation with incidence and severity, being considered the ideal point for evaluation of these variables. There was a decrease in the development of plants of *M. calvescens* with increased concentration of the inoculum of *D. gallaeformans*. It was concluded that *D. gallaeformans* is specific for the family Melastomataceae, with potential for the biological control of *M. calvescens*, in view of the damages caused to the plants.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A disseminação antrópica de plantas involuntárias ou deliberadas tem aumentado assustadoramente em todos os continentes; muitas se tornaram indesejáveis, daninhas e, ou, invasoras. Algumas se multiplicaram de forma explosiva e promoveram invasões biológicas, que resultaram em alterações ambientais graves em novos ecossistemas, inclusive ameaçando de extinção espécies nativas de plantas e animais (PEDROSA-MACEDO, 2004). O potencial de espécies exóticas em modificar sistemas naturais é tão significativo que as plantas invasoras exóticas são atualmente consideradas como a segunda causa mundial de perda de diversidade biológica (IUCN, 2000).

Dessa forma, a contaminação biológica está sendo equiparada às mudanças climáticas e à ocupação do solo como um dos mais importantes agentes de mudança global de causa antrópica (ZILLER *et al.*, 2004).

As invasões biológicas de origem vegetal envolvem plantas exóticas que se distribuem naturalmente, sem auxílio direto de pessoas, em ambiente natural ou seminatural, alterando a composição, a estrutura ou os processos do ecossistema. A partir desta definição, as plantas invasoras de áreas altamente perturbadas pelo homem são excluídas da lista de plantas envolvidas em invasões biológicas (CRONK e FULLER, 1995).

*Miconia calvescens* é nativa dos neotrópicos, mas, na região que compreende o sul do México, Guatemala, Belize, Costa Rica e Equador, ocorre um biótipo que pode atingir entre 12 e 15 m de altura, apresenta folhas grandes de até 1 m, com face adaxial

verde-escuro e face abaxial violeta, sendo este biótipo o responsável pelas invasões biológicas nos arquipélagos do Pacífico (MEDEIROS *et al.*, 1997). No Brasil ocorre um biótipo diferente, com 3 a 4 m de altura, folhas menores entre 30 e 40 cm e com as duas faces verdes. O nome *M. calvescens* foi originalmente proposto para o biótipo que ocorre no Brasil, mas, apesar das evidentes diferenças entre os dois biótipos, as autoridades no gênero insistem em considerá-las co-específicas.

Entre os ecossistemas mais suscetíveis e vulneráveis às invasões biológicas estão os encontrados nas ilhas oceânicas. Por causa de uma serie de fatores únicos encontrados nestes locais, as ilhas oceânicas apresentam baixo número de espécies nativas, resultado do isolamento geográfico. Nestes locais, normalmente não há duas espécies nativas competindo por um mesmo nicho ecológico, o que leva a uma fraca capacidade de competição; além disso, os baixos níveis de fluxo de genes, devido à pouca variabilidade genética dentro das populações, as tornam mais sensíveis a mudanças ambientais. Espécies exóticas, adaptadas a estes ambientes e livres de seus inimigos naturais, apresentam nítida vantagem sobre as espécies nativas destes ecossistemas (CRONK e FULLER, 1995).

*Miconia calvescens* é reconhecida hoje como uma das plantas invasoras mais ameaçadoras no Haváí (MEDEIROS *et al.*, 1997; MEYER, 1998), pois apresenta todos os atributos de uma espécie invasiva agressiva, inclusive crescimento rápido, tolerância ao sombreamento, que permite sua germinação e permanência a baixos níveis de luz. Quando ocorre uma abertura no dossel, aumenta consideravelmente sua taxa de crescimento, o que a faz sobressair em relação às espécies nativas (MEYER, 1998). Outro fator importante para seu sucesso como invasora é a alta taxa de produção e a dispersão de sementes, começando a florescer e frutificar por volta dos 4 a 5 anos de idade. Chega a florescer e frutificar duas a três vezes por ano, produzindo até 3 milhões de sementes por planta a cada ciclo. Sua dispersão no Haváí é feita com muita eficiência por pássaros, podendo ocorrer também pela sola de sapatos humanos e pelos de mamíferos (MEDEIROS *et al.*, 1997). Meyer (1994) observou que as sementes permanecem viáveis no solo por mais de dois anos, formando um considerável banco de sementes, que ao receber as condições favoráveis para germinação formam áreas com altas densidades de plantas. Este fato inviabiliza o controle por herbicidas, pois ao aplicá-los ocorre aumento na taxa de radiação solar que atinge o solo, provocando o aparecimento de áreas muito densas de *M. calvescens*, agravando a situação (MEDEIROS *et al.*, 1997).

Em 1937, *M. calvescens* foi introduzida como planta ornamental no Taiti, e hoje está distribuída em 65 % dos 1.045 km<sup>2</sup> da ilha. Destes, 25 % ocorre de forma densa, afetando diretamente o ecossistema da ilha ao provocar sombreamento excessivo, o que as espécies nativas não toleram. Desta forma, ela se sobressai em relação às espécies nativas (MEDEIROS *et al.*, 1997). As estimativas são de que no Taiti existam de 70 a 100 espécies vegetais, das quais 35 a 45 são espécies endêmicas da Polinésia Francesa e estão diretamente ameaçadas pela invasão de *M. calvescens* (MEYER, 1996).

No Havaí, esta espécie foi introduzida por volta de 1961, como planta ornamental, e desde 1992 está presente na lista de plantas invasoras nocivas ao arquipélago. Está atualmente distribuída nas ilhas do Havaí, Maui, Oahu, e Kauai, no Arquipélago Havaiano (MEYER, 1996). Nestes locais, uma série de medidas foi tomada visando a sua erradicação. Entre 1993 e 1995, cerca de 20 mil plantas foram destruídas manualmente, porém, a grande capacidade de regeneração, graças ao considerável banco de sementes, inviabilizou esta estratégia. Em áreas de difícil acesso, tentativas de controle por pulverização aérea fracassaram, pois não houve mortalidade total das plantas, além do favorecimento da germinação do banco de sementes (LOOPE, 1997).

A remoção física e o controle químico obtiveram sucesso na contenção da sua expansão para novas áreas, porém, o controle completo e duradouro requer a introdução de agentes patogênicos por meio de controle biológico clássico (MEDEIROS *et al.*, 1997). O controle biológico é um meio natural de controlar as pragas, pois utiliza seus inimigos naturais sem os inconvenientes causados pelos agrotóxicos, mas exige estudos aprofundados antes de ser empregado, para que sua introdução não cause desequilíbrios ambientais. Wikler (2004), referindo-se aos insetos, afirma que

para um agente de controle biológico ter sucesso, é importante que ele se adapte ao ambiente, tenha grande capacidade de busca da planta-alvo, capacidade própria de dispersar-se entre as plantas-alvo e reaja rapidamente às mudanças na população da planta invasora.

Os agentes de controle biológico são partes ou a íntegra da solução para as invasões biológicas, porém, nem sempre são baratos nem fáceis de serem encontrados, mas os seus efeitos são duradouros e não-poluentes (PEDROSA-MACEDO, 2004).

Segundo Andréas e Goeden (1969), a utilização do controle biológico clássico aplicado a plantas invasoras não visa a sua completa erradicação, mas a redução e estabilização em longo prazo de sua densidade a níveis que não causem danos. O

método clássico ou inoculativo de controle biológico de plantas invasoras envolve a busca e seleção de patógenos (inimigo natural) da planta-alvo no seu centro de origem e a sua introdução na nova área de distribuição da planta que se encontra livre de seus inimigos naturais, visando restabelecer o equilíbrio (BARRETO, 2004).

Desde 1995, após o estabelecimento de um convênio entre a FUNARBE (Fundação Arthur Bernardes) da Universidade Federal de Viçosa e o RCUH (*Research Corporation of the University of Hawaii*) da Universidade do Havaí tem-se estudado uma série de fitopatógenos e insetos associados à *M. calvescens* no Brasil e em outros países da América do Sul e Central. Em 1997, o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *miconiae*, detectado no Estado de Minas Gerais, após avaliação e demonstração de grande potencial para o biocontrole de *M. calvescens*, foi introduzido no Havaí, tornando-se o primeiro exemplo de fungo fitopatogênico brasileiro a ser introduzido no exterior para o controle biológico clássico de uma planta invasora (BARRETO *et al.*, 2001). Outros organismos mostraram-se promissores para a utilização no controle biológico desta planta, como o fungo *Coccolliella miconiae* (SEIXAS, 2002). Em 2005, uma nova espécie de nematóide, pertencente ao gênero *Ditylenchus*, foi constatada causando deformações foliares, galhas e formação de filódios sobre folhas, hastes e inflorescências de *M. calvescens* e outras melastomatáceas, apresentando grande potencial para ser utilizado como agente de biocontrole de melastomatáceas (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Todos os nematóides estudados como possíveis agentes de controle biológico de plantas, pertencem à família Anguinidae e apresentam como característica comum a capacidade de induzir em seus hospedeiros deformações e galhas nos tecidos aéreos de seus hospedeiros (PARKER, 1991). Os principais gêneros da família Anguinidae que atacam tecidos aéreos de plantas são: *Anguina*, *Subanguina* e *Ditylenchus*.

A planta *Acroptilon repens* L. (Asteraceae) em seu ambiente nativo no sul da Rússia é parasitada pelo nematóide *Subanguina picridis*, que induz a formação de galhas nos talos e nas folhas, causando redução no crescimento e na produção de sementes (WATSON, 1986). As folhas e os talos atacados sofrem hiperplasia e hipertrofia, formando galhas que variam de 5-12 mm. O nematóide vive em uma cavidade formada na região central da galha, rodeada de células, com muito conteúdo celular, usado para alimentação do nematóide. Nota-se a presença de muitos feixes vasculares, que se direcionam para da galha. Quando as plantas entram em processo de senescência, os juvenis de segundo estágio entram em estado de dormência

(criptobiose/anidrobiose) induzido pela desidratação do corpo. Desta forma, sobreviverão até a próxima estação, quando iniciarão um novo ciclo da doença (WATSON, 1986). Esta espécie foi introduzida nos Estados Unidos e no Canadá e se tornou uma das principais invasoras nestes países (WATSON, 1986). Por causa da severidade dos danos provocados, o nematóide *S. picridis* apresenta-se como um agente de grande potencial para ser usado no controle biológico de *knapweed* russo, pois, sua gama de hospedeiros é restrita a espécies da tribo Cynareae da família Asteraceae (KRALL, 1991).

Brzeski (1981), após revisar a família Anguinidae, propôs a inclusão do gênero *Ditylenchus*, com 81 espécies válidas. A maioria das espécies vive no solo como parasitas de plantas ou alimentando-se de micélio de fungos, entre as espécies fitopatogênicas, algumas apresentam relações muito específicas com suas plantas hospedeiras, podendo ser utilizadas no biocontrole de plantas (STURHAN e BRZESKI, 1991).

Seixas *et al.* (2004) detectaram a presença de *Ditylenchus drepanocercus* Goodey, agente causal da mancha-angular em *M. calvescens*, durante buscas por agentes de biocontrole desta espécie de melastomatácea no Brasil. Esse nematóide apresenta alto nível de especificidade com seus hospedeiros (STURHAN e BRZESKI, 1991). *D. drepanocercus* é um endoparasita migrador que vive alojado no parênquima lacunoso, provoca hipertrofia das células que aumentam até 13 vezes em tamanho. Este nematóide não tem muita resistência à dessecação. As lesões ocorrem apenas nas folhas, principalmente nas mais velhas e na superfície abaxial. As lesões são angulares e delimitadas pelas nervuras; inicialmente, são de coloração amarela progredindo até a necrose do tecido, tamanho entre 1 e 5 cm, podendo coalescer, atingindo grandes proporções do limbo foliar. A severidade da doença no campo é afetada pela temperatura e umidade (SEIXAS, 2002). As semelhanças nas condições climáticas entre Brasil e Havaí, onde *M. calvescens* é invasora e a limitada gama de hospedeiros, sugerem algum potencial deste nematóide como agente de biocontrole desta invasora (SEIXAS *et al.*, 2004).

Outra espécie, o nematóide *D. phyllobius* Brzeski, 1991 (= *Anguillulina phyllobia* (Thorne, 1934), = *Nothanguina phyllobia* (Thorne, 1934), = *Orrina phyllobia* (Thorne, 1934)) apresenta grande potencial para o biocontrole da invasora *Solanum elaeagnifolium* (Solanaceae) (ROBINSON *et al.*, 1979), uma vez que apresenta alto grau de especificidade em relação a seu hospedeiro (SKINNER *et al.*, 1980). O ciclo de

vida deste nematóide depende da emergência de juvenis infecciosos de quarto estágio, sobreviventes em galhas de folhas caídas no solo (ROBINSON, 1985). Durante períodos de alta umidade relativa (UR) e temperaturas amenas, os juvenis saem do estágio de quiescência e escalam o hospedeiro até atingirem os tecidos aéreos da região apical, penetrando e desenvolvendo-se ativamente (ROBINSON *et al.*, 1978). A atividade de movimentação dos juvenis infecciosos é afetada pela temperatura e umidade relativa do ar, sendo a temperatura ótima encontrada por volta de 25 °C, e quanto maior a UR mais rápida é a movimentação do nematóide, permitindo que ele atinja a região apical rapidamente, com menor risco de dessecação (ROBINSON *et al.*, 1981; 1984). Os juvenis infectam o limbo e o pecíolo de folhas jovens no ápice do broto, provocando hipertrofia e hiperplasia do parênquima cortical e vascular e formam uma região de confluência entre limbo, pecíolo e talo, que resultarão em galhas com volume de até 25 cm<sup>3</sup>. As galhas imaturas possuem coloração verde-clara e formato irregular, sendo observadas, primeiramente, na superfície abaxial da folha; já galhas maduras são de formato esférico, com uma cavidade central formada por espaços intercelulares, onde se encontram fileiras de células com tamanho maior que o normal com vacúolos grandes, indicando que grande quantidade de energia da planta é usada pelo nematóide (SKINNER *et al.*, 1980).

Apesar das três espécies citadas acima como possíveis agentes de controle biológico de plantas, não há nenhum registro de sua efetiva introdução como agente de controle biológico para as suas plantas-alvo.

Este trabalho teve por objetivo estudar os aspectos biológicos e ecológicos de *D. gallaeformans*, a histopatologia das galhas induzidas em seus hospedeiros, a gama de hospedeiros e o impacto do nematóide em plantas de *M. calvescens*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREAS, L. A.; GOEDEN, R. D. Biological control of weeds. In: PROCEEDINGS OF THE AAAS SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL. Boston: Massachussets, 1969. 511 p.

BARRETO, R. W.; SEIXAS, C. D. S.; KILLGORE, E. *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *miconiae*: o primeiro fungo fitopatogênico brasileiro a ser introduzido no exterior para o controle biológico clássico de uma planta invasora: (*Miconia calvescens*). In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 7., 2001. Poços de Caldas. **Livro de Resumos**, Poços de Caldas, 2001. p.109.

BARRETO, R. W. Uso de agentes patogênicos no controle biológico de plantas invasoras. In: PEDROSA-MACEDO, J. H.; BREDOW, E. A. **Princípios e rudimentos do controle biológico de plantas**, 2004. p. 143-160.

BRZESKI, M. W. The genera of Anguinidae (nematoda, Tylenchida). **Revue Nematologie**, v. 4, p. 23-34, 1981.

CRONK, Q. C. B.; FULLER, J. L. **Plant invaders** – The threat to natural ecosystems. London: Chapman e Hall, 1995. 239 p.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE – IUCN. **100 of the World's Worst Invasive Alien Species**. Auckland invasive species specialist group, 2000. Disponível em: <<http://www.iucn.org/>>.

LOOPE, L. L. *Miconia calvescens* D.C. **HNIS Report for Miconia calvescens**. A product of the Hawaiian Ecosystems at Risk Project, 1997. 8 p.

MEDEIROS, A. C.; LOOPE, L. L.; MCELVANEY, S. Status, ecology, and management of the invasive plant, *Miconia calvescens* DC (Melastomataceae) in the Hawaiian Islands. **Bishop Museum Occasional Papers**, v. 48, p. 23-36, 1997.

MEYER, J. Y. **Mecanismos d'invasión de *Miconia calvescens* en Polynesie Français.** Ph.D. Thesis. L'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc. Montpellier, France, 1994.

MEYER, J. Y. Status of *Miconia calvescens* (Melastomataceae), a dominant invasive tree in the Society Islands (French Polynesia). **Pacific Science**, v. 50, n. 1, p. 66-76, 1996.

MEYER, J. Y. Observations on the reproductive biology of *Miconia calvescens* DC. (Melastomataceae) an alien invasive tree on the islands of Tahiti (South Pacific Ocean). **Biotropica**, v. 30, n. 4, p. 609-624, 1998.

OLIVEIRA, R. D. L.; BARRETO, R. W.; SANTIN, A. M. A new species of *Ditylenchus* causing galls on the invasive weed *Miconia calvecens*. In: ANNUAL MEETING OF THE ORGANIZATION OF NEMATOLOGIST OF TROPICAL AMERICA (ONTA), 37., 2005, Viña Del Mar, Chile. **Resumos**, Viña Del Mar, Chile, 2005. 90 p.

PARKER, P. E. **Nematodes as biological control agents of weeds.** Microbial Control of Weeds. New York: Chapman Hall, 1991. p. 58-68.

PEDROSA-MACEDO, J. H. Princípios e rudimentos do controle biológico de plantas. In: PEDROSA-MACEDO, J. H.; BREDOW, E. A. **Princípios e rudimentos do controle biológico de plantas/coletânea**, 2004. p. 115-128.

ROBINSON, A. F. Observations of molting and population development by *Orrina phyllobia*. **Journal of Nematology**, v. 17, p. 239-241, 1985.

ROBINSON, A. F.; ORR, C. C.; HEINTZ, C. E. Some factors affecting survival of desiccation by infective juveniles of *Orrina phyllobia*. **Journal of Nematology**, v. 16, p. 86-91, 1984.

ROBINSON, A. F.; ORR, C. C.; HEINTZ, C. E. Effects of oxygen and temperature on the activity and survival of *Nothanguina phyllobia*. **Journal of Nematology**, v. 13, p. 528-535, 1981.

ROBINSON, A. F.; ORR, C. C.; ABERNATHY, J. R. Behavioral response of *Nothanguino phyllobio* to selected plant species. **Journal of Nematology**, v. 11, p. 73-77, 1979.

ROBINSON, A. F.; ORR, C. C.; ABERNATHY, J. R. Distribution of *Nothanguina phyllobia* and its potential as a biological control agent for silver-leaf nightshade. **Journal of Nematology**, v. 10, n. 4, p. 362-367, 1978.

SEIXAS, C. D. S. **Controle biológico de *Miconia calvescens* (Melastomatácea) com fitopatógenos.** 2002. 123 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

SEIXAS, C. D. S.; BARRETO, R. W.; FREITAS, L. G. *Ditylenchus drepanocercus* (Nematoda), a potential biological control agent for *Miconia calvescens* (Melastomatácea): host-specificity and epidemiology. **Biological Control**, v. 31, n. 1, p. 29-37, 2004.

- SEIXAS, C. D. S.; BARRETO, W. R.; FREITAS, L. G.; MONTEIRO, F. T.; OLIVEIRA, R. D. L. *Ditylenchus drepanocercus* rediscovered in the neotropics causing angular leaf spots on *Miconia calvescens*. **Journal of Nematology**, v. 36, n. 4, p. 481-486, 2004.
- SKINNER, J. A.; ORR, C. C.; ROBINSON, A. F. Histopathogenesis of the galls induced by *Nothanguina phyllobia* in *Solanum elaeagnifolium*. **Journal of Nematology**, v. 12, n. 2, p. 142-150, 1980.
- STURHAN, D.; BRZESKI, M. W. Stem and bulb nematodes, *ditylenchus* spp. In: NICKLE, W. R. (Ed.) **Manual of Agricultural Nematology**. New York, 1991. p.423-459.
- WATSON, A. K. Biology of *Subanguina picridis*, a potential biological control agent of Russian Knapweed. **Journal of Nematology**, v. 18, n. 2, p. 154-158, 1986.
- WATSON A. K. Host range of, and plant reaction to, *Subanguina picridis*. **Journal of Nematology**, v. 18, n. 1, p. 112-120, 1986.
- WIKLER, C. Princípios e rudimentos do controle biológico de plantas. In: PEDROSA-MACEDO, J. H.; BREDOW, E. A. (Ed.) **Princípios e rudimentos do controle biológico de plantas/coletânea**, 2004. Cap. 7, p. 115-128.
- ZILLER, S. R.; ZENNI, R. D.; NETO, J. G. J. H. Invasões biológicas: introdução, impactos e espécies exóticas no Brasil. In: PEDROSA-MACEDO, J. H.; BREDOW, E. A. (Ed.) **Princípios e rudimentos do controle biológico de plantas/coletânea**, 2004. Cap.3, p. 17-41.

## CAPÍTULO 1

### **GAMA DE HOSPEDEIROS DE *Ditylenchus gallaeformans* sp. n., POTENCIAL AGENTE DE BIOCONTROLE DE *Miconia calvescens* (MELASTOMATACEAE)**

#### **1. INTRODUÇÃO**

*Miconia calvescens* DC (Melastomataceae) é nativa desde o sul do México ao sul do Brasil e norte da Argentina (MEDEIROS *et al.*, 1997). É reconhecida hoje como uma das plantas invasoras mais ameaçadoras dos ecossistemas florestais do Havaí e Polinésia Francesa, onde foi introduzida para uso ornamental (MEYER, 1994; MEDEIROS *et al.*, 1997). *M. calvescens* apresenta todos os atributos de uma espécie invasora agressiva, como crescimento rápido, tolerância ao sombreamento, que permite sua germinação e permanência em baixos níveis de luz, alta taxa de produção e dispersão de sementes (MEYER, 1998). Para casos de invasões biológicas como estes, a medida que se apresenta mais viável para o seu controle é a introdução de inimigos naturais, por meio de controle biológico clássico (MEDEIROS *et al.*, 1997).

Em 2005, uma nova espécie de nematóide pertencente ao gênero *Ditylenchus* foi constatada causando deformações foliares e galhas sobre folhas, hastes e inflorescências de *M. calvescens* e outras melastomatáceas na região de Viçosa, MG. Esta espécie apresenta aparente potencial para ser utilizada como agente de biocontrole de melastomatáceas (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Entre as várias etapas do processo de estudo de viabilidade de um agente de controle biológico, uma das mais importantes é a verificação de sua gama de hospedeiros. Somente depois de determinada a especificidade do agente de biocontrole é possível a sua liberação, pois agentes inespecíficos são inadequados para introduções em ambientes exóticos (SIMBERLOFF e STILING, 1996).

Os procedimentos mais utilizados para verificação da especificidade são com base em Wapshere (1974) e consistem na formação de um conjunto de espécies de plantas-teste selecionadas em função de sua relação filogenética com a planta-alvo. Estas plantas são expostas ao potencial agente de biocontrole em condições controladas. Watson (1986) estudou a gama de hospedeiros de *Subanguina picridis* (Kirjanova) Brzeski um nematóide investigado como potencial agente de biocontrole de *Acroptilon repens* (L.) DC., pelo método citado acima, inoculando plantas de 66 espécies pertencentes a 34 famílias em condições controladas, com suspensão de nematóides. Desta lista de plantas-teste, o nematóide infectou apenas sete espécies pertencentes a duas subtribos da família Asteraceae. Mais tarde, foi verificado, no entanto, que muitas outras espécies de plantas podiam ser infectadas por este nematóide (PARKER, 1991), por causa da pouca representatividade das espécies de plantas usadas no teste centrífugo-filogenético.

Outra forma de avaliar a especificidade de um agente de controle biológico é por meio da utilização do método indireto de avaliação, descrito por Seixas (2002). Neste método são selecionadas espécies de plantas pertencentes a diversos gêneros e famílias com ênfase nas espécies mais próximas filogeneticamente da planta-alvo, no entorno de plantas-alvo infestadas pelo agente, em condições naturais de campo favoráveis ao desenvolvimento da doença. Parte-se da pressuposição de que qualquer outra planta presente na mesma área estiver constantemente exposta ao possível ataque do patógeno e se a infecção não ocorrer, é por que estas plantas não são hospedeiras do agente.

Neste capítulo, objetivou-se determinar a gama de hospedeiros de *D. gallaeformans*, pelos dois métodos, direto e indireto, e a verificação da capacidade do nematóide infectar naturalmente em condições de campo plantas de *M. calvescens* do biótipo existente no Haváí.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Determinação indireta da gama de hospedeiros de *Ditylenchus gallaeformans*

Amostras de 102 espécies de plantas pertencentes a 58 famílias (Quadro 1), foram coletadas em três áreas: duas no Município de Viçosa, MG: na Dendrologia (*campus* da UFV) e outra próxima à Vila dos Cristais, em 16.3.2006, e uma na área no Município de Guaraciaba, MG, em 28.10.2006. Nestes locais, há abundante ocorrência de *D. gallaeformans* atacando espécies de melastomatáceas. Na coleta das amostras, foi dada preferência às plantas vizinhas às plantas de *Miconia* spp. claramente infectadas pelo nematóide; isto é, apresentando as galhas típicas. As amostras foram coletadas preferencialmente de indivíduos que apresentavam anormalidades na parte aérea, que poderiam representar sintomas de doença, particularmente de materiais com galhas. As plantas foram identificadas, quando possível, ainda no campo, e quando isso não foi possível, certa quantidade do material vegetal foi encaminhada para o Departamento de Biologia Vegetal, no laboratório de Botânica para identificação. No laboratório de Nematologia, do Departamento de Fitopatologia, subamostras de cada espécie previamente identificada foram selecionadas e cortadas em pequenos fragmentos, imersas em água em copos de vidro de 100 mL, e com o auxílio de bombas de ar foram deixadas sob borbulhamento contínuo. Após 24 horas, a suspensão foi passada em peneiras de 20 e 500 mesh. A suspensão de cada amostra recolhida da peneira de 500 mesh foi observada em microscópio estereoscópico para detecção da presença de nematóide e posterior identificação em microscópio de luz.

Quadro 1 – Plantas avaliadas no teste de especificidade indireta de *D. gallaeformans*

Divisão Magnoliophyta			
Classe Magnoliopsida			
Ordem	Família	Espécie	Coleta*
Myrtales	Melastomataceae	<i>Leandra</i> sp.	C
		<i>Clidemia hirta</i> D. Don	C/D/G
		<i>Tibouchina granulosa</i> (Desr.) Cogn.	C/D
		<i>Tibouchina herbacea</i> (DC). Cogn.	G
		<i>Miconia calvescens</i> DC.	C/G
		<i>Miconia</i> sp. 1	G
		<i>Miconia</i> sp. 2	C
		<i>Miconia albicans</i> Steud.	C/D/G
		<i>Miconia cinnamomifolia</i> Triana	C/D
		<i>Miconia ibaguensis</i> Triana	C/D/G
	<i>Miconia latecrenata</i> Naudin	C/D	
	Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i> L.	C/G
		<i>Eugenia uniflora</i> L.	C
<i>Eucalyptus</i> sp.		D	
Lythraceae	Não identificada	C	
Malpighiales	Malpighiaceae	<i>Lophanthera lactescens</i> Ducke	C
	Clusiaceae	<i>Vismia brasiliensis</i> Choisy	C/G
	Phyllanthaceae	<i>Phyllanthus</i> sp.	D
	Passifloraceae	<i>Passiflora</i> sp.	G
		<i>Passiflora edulis</i> Sims	C
Fabales	Fabaceae	<i>Desmodium</i> sp.	C/D
		<i>Piptadenia</i> sp.	G
	Polygalaceae	<i>Diclidanthera</i> sp.	C
Euphorbiales	Euphorbiaceae	<i>Joaneria</i> sp.	G
		<i>Manihot esculenta</i> Crantz	C
		<i>Croton floribundus</i> Spreng	D/G
		<i>Croton</i> sp.	C
		<i>Mabea</i> sp.	C/G
Linales	Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum</i> sp.	G
		<i>Erythroxylum pelleterianum</i> A. St.-Hil.	C
Sapindales	Meliaceae	<i>Trichilia pallida</i> Sw.	D
		<i>Toona</i> sp.	D
		<i>Guarea macrophylla</i> Vahl	G
	Rutaceae	<i>Citrus</i> sp.	C
		<i>Zanthoxylum</i> sp.	D
	Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	C/G
	Sapindaceae	<i>Paullinia</i> sp.	D
<i>Cardiospermum</i> sp.		C	
Geraniales	Balsaminaceae	<i>Impatiens walleriana</i> Hook.f.	D
Rosales	Rosaceae	<i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.	C
		<i>Rubus rosifolius</i> Stokes	C
Apiales	Umbelliferae	<i>Centella</i> sp.	G
		<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	C
Laurales	Lauraceae	<i>Nectandra rigida</i> (Kunth ) Nees	D
		<i>Persea americana</i> Mill.	C
	Monitiniaceae	<i>Siparuna guianensis</i> Aubl.	G
Ranunculales	Menispermaceae	Não identificada	D
Magnoliales	Annonaceae	<i>Malmea</i> sp.	C
Piperales	Piperaceae	<i>Piper</i> sp.	D
		<i>Piper aduncum</i> L.	C/G
		<i>Pothomorphe umbellata</i> (L.) Miq.	C

Continua...

Quadro 1, Cont.

<b>Divisão Magnoliophyta</b>			
<b>Classe Magnoliopsida</b>			
Ordem	Família	Espécie	Coleta*
Urticales	Moraceae	<i>Ficus</i> sp.	D
	Urticaceae	<i>Urtica</i> sp.	D
	Cecropiaceae	<i>Cecropia</i> sp.	C/D/G
Malvales	Malvaceae	<i>Pavonia communis</i> A. St.-Hil.	C
		<i>Sida</i> sp.	D/G
	Tiliaceae	<i>Luehea grandiflora</i> Mart.	C
		<i>Luehea</i> sp.	G
Violales	Curcubitaceae	<i>Cucurbita</i> sp.	C
Solanales	Solanaceae	<i>Solanum</i> sp.	C
		<i>Solanum cernuum</i> Vell.	G
	Convolvulaceae	<i>Ipomoea</i> sp.	C
		<i>Ipomoea cairica</i> ( L. ) Sweet	C
Gentianales	Apocynaceae	<i>Peschiera laeta</i> Miers	C
Lamiales	Verbenaceae	<i>Lantana camara</i> L.	C/G
	Boraginaceae	<i>Borago</i> sp.	G
	Gesneriaceae	<i>Sinningia</i> sp.	C
	Lamiaceae	<i>Schizonepeta</i> sp.	C
	Plantaginaceae	<i>Plantago</i> sp.	C
Rubiales	Rubiaceae	<i>Coffea arabica</i> L.	C/D
		<i>Spermacoce latifolia</i> Aubl.	C
		<i>Psychotria</i> sp.	G
		<i>Richardia brasiliensis</i> Gomes	C
Scrophulariales	Acanthaceae	<i>Thunbergia alata</i> Bojer ex Sims	G
		<i>Hypoestes sanguinolenta</i> Hook.	D
	Bignoneaceae	<i>Tabebuia</i> sp.(1)	G
		<i>Tabebuia</i> sp.(2)	D
		<i>Macfadyena unguiscati</i> (L.)	D
Asterales	Asteraceae	<i>Mikania</i> sp.	C
		<i>Chromolaena odorata</i> L.	C
		<i>Baccharis</i> sp.	G
		<i>Vernonia</i> sp.	C
Caryophyllales	Amaranthaceae	<i>Gomphrena</i> sp.	C
<b>Classe Liliopsida</b>			
Alismatales	Araceae	<i>Xanthosoma sagittifolium</i> K.Koch	C
Subclasse Commelinidae			
Commelinales	Commelinaceae	<i>Commelina benghalensis</i> Wall	G/C
Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe</i> sp.	C
Poales	Bromeliaceae	<i>Tillandsia</i> sp.	D
	Cyperaceae	<i>Fimbristylis</i> sp.	D
	Poaceae	<i>Panicum maximum</i> Nees	G
		<i>Melinis minutiflora</i> P.Beauv.	C
		<i>Imperata brasiliensis</i> Trin.	G
Zingiberales	Maranthaceae	<i>Calathea</i> sp.	D
	Heliconiaceae	<i>Heliconia</i> sp.	C
	Musaceae	<i>Musa</i> sp.	C
Orchidales	Orchidaceae	<i>Oeceoclades maculata</i> L.	D
Liliales	Smilacaceae	<i>Smilax</i> sp.	D
Asparagales	Hypoxidaceae	<i>Hypoxis decumbens</i> L.	C
	Ruscaceae	<i>Sansevieria</i> sp.	D

Continua...

Quadro 1, Cont.

Divisão Cycadophyta			
Classe Cycadopsida			
Ordem	Família	Espécie	Coleta*
Cycadales	Cycadaceae	<i>Cycas</i> sp.	D
Divisão Pteridophyta			
Classe Pteridopsida			
Filicales	Gleicheniaceae	<i>Gleichenia</i> sp.	C
	Schizaeaceae	<i>Anemia phyllitidis</i> (L.) Sw	C
Divisão Lycopodiophyta			
Classe Selaginellopsida			
Lycopodiales	Selaginellaceae	<i>Selaginella</i> sp.	G

\* Local da coleta: C = Cristais, Viçosa, MG; D = Dendrologia, *Campus* da UFV, Viçosa, MG; G = Guaraciaba, MG.

## 2.2. Determinação da gama de hospedeiro por meio de inoculações

O inóculo foi obtido de folhas e inflorescências coletadas em plantas de *M. Ibaguensis*, naturalmente infectadas no campo. As galhas foram retiradas, levadas ao laboratório e trituradas por 20 s no liquidificador; posteriormente, foram passadas em peneiras de 60 e 500 mesh, para separar os nematóides dos restos vegetais. A suspensão obtida da peneira de 500 mesh foi deixada no funil de Baermann por 24 horas, para separar os nematóides vivos dos mortos. A suspensão recolhida do funil de Baermann foi calibrada para 1.500 nematóides/mL, com auxílio da câmara de Peters.

Foram testadas 39 espécies, com ênfase em espécies relacionadas filogeneticamente com a família Melastomataceae, seguindo-se o método centrífugo-filogenético de Wapshere (1974) e incluindo de importância econômica (Quadro 2).

Cada planta foi inoculada com 2 mL da suspensão contendo os nematóides. A inoculação foi realizada pela deposição da suspensão de nematóides sobre pedaços de algodão nos primórdios foliares, com auxílio de uma pipeta. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida a 25 °C, por 48 horas e fotoperíodo de 12 horas em câmaras de crescimento. Posteriormente, foram transferidas para casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, recebendo os tratamentos culturais necessários ao bom desenvolvimento.

Semanalmente, durante um período de 120 dias após a inoculação, foi observado o desenvolvimento dos sintomas nas plantas. Após este período, a área acima do ponto de inoculação foi cortada e acomodada em sacos plásticos, devidamente identificados e separados por espécie. As amostras referentes a cada espécie foram examinadas no

laboratório e as áreas que continham possíveis sintomas da presença do nematóide, como deformações e galhas foliares, foram recortadas e pesadas. Nas espécies em que não houve o desenvolvimento de sintomas, foi retirada, aleatoriamente, uma amostra representativa da parte aérea da planta e, posteriormente, realizou-se a extração, como descrito no item 1. Após a extração, as suspensões referentes a cada amostra foram examinadas em microscópio estereoscópico para verificação da presença de nematóides. Nas amostras em que se verificou a presença de nematóides foi realizada a montagem de lâminas para identificação dos nematóides em microscópio de luz e, posteriormente, foi realizada a sua contagem com auxílio da câmara de Peters. Após a determinação do número total de nematóides, por amostra, foi calculado o fator de reprodução (FR = população final/população inicial), segundo Oostenbrink (1966).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 39 tratamentos representados por cada espécie e quatro repetições. A unidade experimental foi composta por uma planta com um ponto de inoculação. Os dados da população de nematóides foram transformados em  $(\sqrt{x + 1})$ ; aplicada a análise de variância e o teste de médias (Tukey, a 5 %).

### **2.3. Verificação da infectividade de *Ditylenchus gallaeformans* a *Miconia calvescens* do biótipo do Havaí em condições de campo**

Na tentativa de testar a infectividade de populações de *D. Gallaeformans* em condições naturais de ocorrência do nematóide, em plantas de *M. Calvescens* do biótipo procedente do Havaí, 50 mudas com desenvolvimento entre o terceiro e quarto par de folhas foram plantadas sob a área de projeção da copa de plantas de *Miconia* spp., naturalmente infectadas por *D. gallaeformans*. Foram utilizadas duas áreas: uma no bairro Cristais, em Viçosa, MG, e outra em Guaraciaba, MG. Durante o período de um ano em que as plantas estiveram no campo foi observado o desenvolvimento dos sintomas. Após o término das atividades, todas as mudas foram destruídas.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Determinação indireta da gama de hospedeiros de *Ditylenchus gallaeformans*

Dentre as 58 famílias representadas neste estudo, *D. gallaeformans* foi encontrado parasitando apenas plantas pertencentes à família Melastomataceae. Nos três locais de estudo, as espécies hospedeiras pertenciam aos gêneros *Miconia* (cinco espécies) e *Clidemia* (uma espécie). Em Viçosa, no bairro Cristais, o nematóide foi encontrado infectando as espécies *M. albicans* e *M. ibaguensis*; na Dendrologia, foi encontrado nas espécies *M. albicans*, *M. ibaguensis* e *M. Latecrenata*; e no Município de Guaraciaba, foi encontrado infectando as espécies *C. capitellata*, *M. ibaguensis*, *M. calvescens* e *M. albicans*.

#### 3.2. Determinação da gama de hospedeiro por meio de inoculações artificiais

Entre as 39 espécies testadas, 11 apresentaram sintomas de galhas e, ou, deformações na parte aérea, porém em apenas seis houve a confirmação da presença do nematóide, todas pertencentes à família Melastomataeae (Quadro 2).

Quadro 2 – Lista de plantas inoculadas com *D. gallaeformans* e os respectivos resultados

Ordem	Família	Espécie	S	P
Myrtales	Lythraceae	<i>Punica granatum</i> L.	-	-
	Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i> L.	-	-
		<i>Syzygium</i> sp.	-	-
		<i>Myrciaria</i> sp.	-	-
		<i>Marlierea</i> sp.	-	-
		<i>Eugenia</i> sp.	-	-
		<i>Eucaliptus</i> sp.	-	-
	Combretaceae	<i>Terminalia catappa</i> L.	-	-
	Melastomataceae	<i>Clidemia hirta</i> D. Don	-	-
		<i>Clidemia capitellata</i> D. Don	+	+
		<i>Clidemia</i> sp.	-	-
		<i>Leandra lacunosa</i> Cogn.	+	+
		<i>Leandra</i> sp. (1)	+	-
		<i>Leandra</i> sp. (2)	-	-
		<i>Miconia albicans</i> (SW.) Steud.	+	-
		<i>Miconia corallina</i> Spring.	+	-
		<i>Miconia prasina</i> DC.	+	+
		<i>Miconia ibaguensis</i> Triana	+	+
		<i>Miconia latecrenata</i> Naudin	+	-
		<i>Miconia cinnamomifolia</i> Naudin	+	-
		<i>Miconia calvescens</i> DC.	+	+
		<i>Miconia</i> sp. (1)	-	-
		<i>Miconia</i> sp. (2)	+	+
<i>Tibouchina moricandiana</i> Baill.		-	-	
<i>Tibouchina granulosa</i> Cogn.	-	-		
<i>Tibouchina</i> sp.	-	-		
<i>Schizocentrum</i> sp.	-	-		
<i>Dodonaea</i> sp.	-	-		
Fabales	Fabaceae	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	-	-
Rosales	Rosaceae	<i>Fragaria</i> sp.	-	-
Violales	Cucurbitaceae	<i>Cucurbita</i> sp.	-	-
Euphorbiales	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia heterophylla</i> L.	-	-
Brassicales	Brassicaceae	<i>Brassica oleracea</i> L.	-	-
Malvales	Malvaceae	<i>Hibiscus</i> sp.	-	-
Geraniales	Geraniaceae	<i>Geranium</i> sp.	-	-
Sapindales	Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	-	-
	Rutaceae	<i>Citrus</i> sp.	-	-
Rubiales	Rubiaceae	<i>Coffea arábica</i> L.	-	-
Solanales	Solanaceae	<i>Capsicum</i> sp.	-	-

Desenvolvimento de sintomas (S) e presença de *Ditylenchus gallaeformans* (P) em plantas inoculadas artificialmente em casa de vegetação.

(+) presença e (-) ausência.

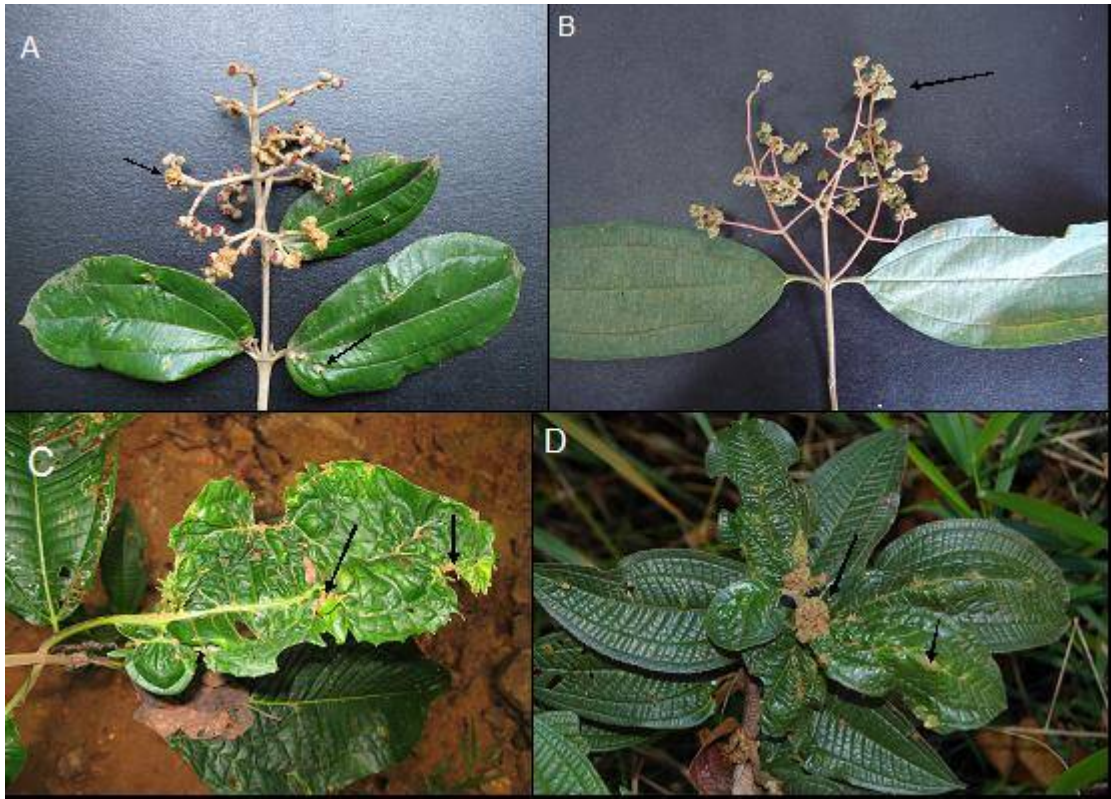


Figura 1 – Sintomas causados por *Ditylenchus gallaeformans* em plantas coletadas no campo. A = *Miconia albicans*; B = *Miconia latecrenata*; C = *Miconia calvescens*; e D = *Miconia ibaguensis*. Nas fotos A e B, as setas indicam galhas em folhas e inflorescências; e nas fotos C e D, as setas indicam galhas folhares.

### 3.2.1. Descrição dos sintomas por espécie

*Clidemia capitellata*: apresentou período latente de 35 dias, desenvolveu sintomas em duas das quatro plantas inoculadas, mas não apresentou a formação típica de galhas. Desenvolveu deformações no limbo foliar, que provocaram a fusão das nervuras. As regiões deformadas eram planas, de coloração verde-clara, que se desatacavam do restante do limbo foliar.

*Leandra lacunosa*: apresentou período latente de 30 dias e desenvolveu sintomas em três das quatro plantas inoculadas. As galhas se desenvolveram apenas ao longo da nervura central, apresentando tamanho muito menor se comparado aos de outros hospedeiros, com diâmetro entre 1 e 2 mm e levemente levantadas em relação ao limbo foliar. As galhas eram difíceis de serem percebidas, pois tinham a mesma coloração do restante da folha, porém diferenciavam-se pelo aumento de pilosidade na região das galhas em relação ao restante da folha.

*Miconia prasina*: apresentou período latente de 25 dias e desenvolveu os sintomas nas quatro repetições. As galhas desenvolveram-se por todo limbo foliar, distribuídas pelas duas superfícies. Inicialmente, as galhas apresentaram-se como pequenos pontos de colorações mais claras que o restante do limbo foliar e, em seu entorno as folhas desenvolveram coloração marrom, que permaneceu com o desenvolvimento da galha. Os sintomas foram muito severos neste hospedeiro, provocando fortes deformações no limbo foliar e a paralisando completamente o desenvolvimento da gema apical (Figura 2).



Figura 2 – Sintomas de galhas causadas por *Ditylenchus gallaeformans* em *Miconia prasina*. A = detalhe da coloração marrom no entorno das galhas; e B = detalhe da deformação total da região apical do ramo aos 120 dias após a inoculação.

*Miconia ibaguensis*: apresentou período latente de 28 dias e desenvolveu os sintomas nas quatro repetições. As galhas desenvolveram-se por todo limbo foliar distribuídos pelas duas superfícies. Inicialmente, as galhas surgiam na região das nervuras das folhas em expansão como pequenos pontos de coloração clara, devido ao acúmulo de tricomas hialinos no local (Figura 3A). Com o desenvolvimento da folha, as galhas iam surgindo por toda a sua extensão e aumentavam consideravelmente de volume. Os sintomas neste hospedeiro eram mais severos do que nos outros e resultaram na deformação total da região apical (Figura 3B).

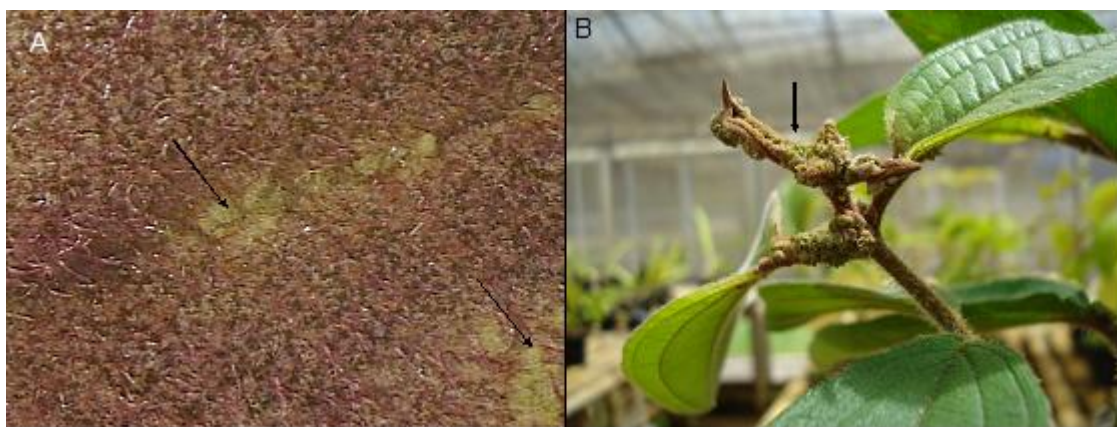


Figura 3 – Sintomas das galhas causadas por *Ditylenchus gallaeformans* em *Miconia ibaguensis*. A = detalhe dos sintomas iniciais com pilosidade densa de coloração branca no início dos sintomas aos 28 dias após a inoculação; e B = detalhe dos sintomas severos com deformação completa da região apical do ramo aos 120 dias após a inoculação.

*Miconia calvescens*: apresentou período latente de 32 dias. Os sintomas manifestaram-se em três das quatro repetições. As galhas desenvolveram-se por todo limbo foliar, porém apenas na superfície adaxial da folha. Neste hospedeiro, nos momentos iniciais do desenvolvimento dos sintomas, as galhas eram de coloração clara, como observado nos outros hospedeiros, mas com a evolução dos sintomas, elas adquiriam tons avermelhados. Foi comum neste hospedeiro ocorrer distorção generalizada do limbo foliar com a formação de expansões filiformes de até 3 cm de altura, porém a galhas eram pequenas e encontradas nas reentrâncias formadas por estas expansões (Figura 4).

*Miconia* sp. (2): o período latente foi de 28 dias. Os sintomas manifestaram-se nas quatro repetições. As galhas desenvolveram-se semelhantes às da *M. calvescens*, porém, não houve formação de expansões filiformes.

As espécies do gênero *Miconia* foram as que apresentaram maior fator de reprodução, com destaque para as espécies *M. ibaguensis* e *M. prasina*, que tiveram fator de reprodução maior que 1, com 2,15 e 1,45 respectivamente. *M. calvescens* apresentou fator de reprodução de 0,83 e *Miconia* sp. 0,71. *C. capitellata* e *L. lacunosa* tiveram fator de reprodução baixo com 0,15 e 0,08, respectivamente (Tabela 1).

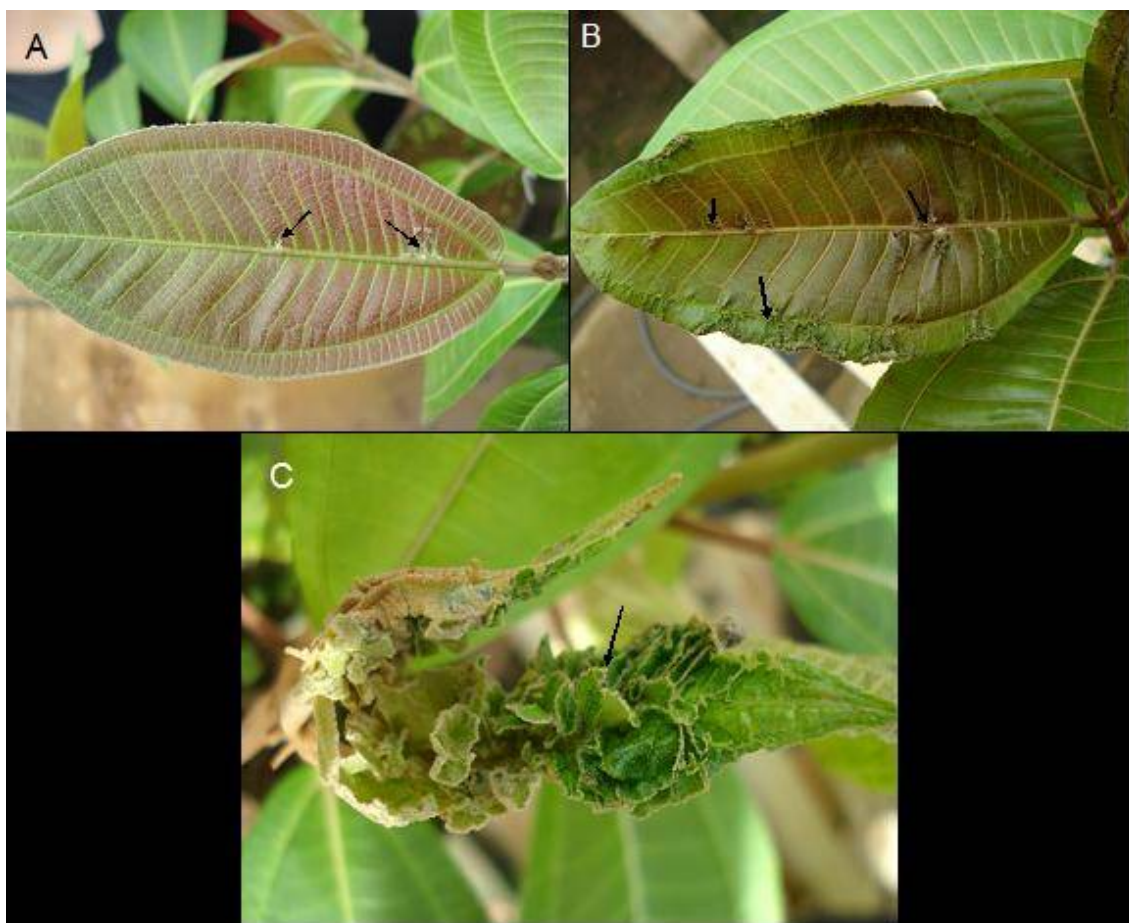


Figura 4 – Sintomas das galhas causadas por *Ditylenchus gallaeformans* em *Miconia calvescens*. A = detalhe da coloração clara na fase inicial dos sintomas; B = detalhe das galhas aos 120 dias após a inoculação; e C = detalhe das expansões filiformes formadas no limbo foliar.

Tabela 1 – Número médio de nematóides por planta inoculada com *Ditylenchus gallaeformans* e fator de reprodução (FR)

Espécie	Nº Nematóide	FR
<i>Miconia ibaguensis</i>	6.840 a	2,15
<i>Miconia prasina</i>	4.360 ab	1,45
<i>Miconia calvescens</i>	2.490 b	0,83
<i>Miconia</i> sp. (2)	2.120 bc	0,71
<i>Clidemia capitellata</i>	460 cd	0,15
<i>Leandra lacunosa</i>	230 d	0,08

Média de quatro repetições. Para a análise estatística os dados foram transformados em  $\sqrt{x+1}$ . Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV = 27,83%.

### 3.3. Verificação da infectividade de *Ditylenchus gallaeformans* a *Miconia calvenscens* do biótipo do Havaí em condições de campo

As plantas de *M. calvenscens*, biótipo do Havaí, foram infectadas naturalmente por *D. gallaeformans* e desenvolveram os sintomas de galhas semelhantes aos observados no biótipo do Brasil (Figura 5). Os sintomas foram observados nas plantas cultivadas nos Municípios de Viçosa e Guaraciaba, MG, e a presença do nematóide foi confirmada nas plantas com sintomas das duas localidades, pela extração e observação dos nematóides em microscópio de luz.

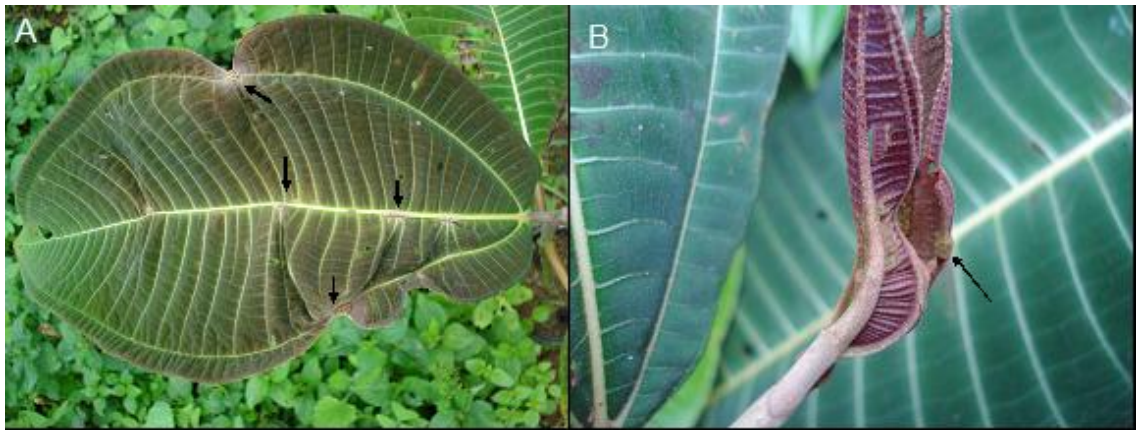


Figura 5 – Sintomas de galhas provocadas pela infecção natural de *Ditylenchus gallaeformans* em plantas de *Miconia calvenscens* biótipo do Havaí, cultivadas no campo. A = folhas adultas; e B = primórdio foliar. Setas indicam os pontos de formação das galhas

#### 4. DISCUSSÃO

A introdução de agentes exóticos para o controle biológico requer muita atenção, pois este estará livre e poderá causar impacto em plantas de importância agrônômica e na flora nativa (PARKER, 1991). Os estudos de gama de hospedeiros são fundamentais para obtenção de agentes de biocontrole seguros e para introdução em áreas onde não ocorre naturalmente. Mais de 500 angiospermas, entre mono e dicotiledôneas, são conhecidas como hospedeiras de nematóides do gênero *Ditylenchus*, porém algumas espécies do gênero apresentam alto grau de especificidade com seus hospedeiros, como pode-se observar com *D. drepanocercus* e *D. phyllobius* (ROBINSON *et al.*, 1979; SEIXAS *et al.*, 2004).

Pelos resultados encontrados nos testes de especificidade, *D. gallaeformans* é específico para a família Melasomataceae. Sua ocorrência foi restrita a três gêneros desta família: *Miconia*, *Leandra* e *Clidemia*. Possivelmente, estas espécies apresentam características que permitam a formação de um micro-clima na região dos meristemas apicais, favorável ao estabelecimento dos nematóides nesses locais, e mantendo-os protegidos pelo período de tempo necessário para o desenvolvimento das galhas. Os nematóides, de maneira geral, dependem de condições adequadas para ocasionar infecções, sendo a umidade considerada o fator mais importante nos momentos iniciais da infecção, pois permite que os nematóides se movimentem pela superfície dos tecidos foliares e mantenham-se hidratados, evitando que ocorra precocemente a sua morte pela dessecação do corpo (STURHAN e BRZESKI, 1991).

Além dos hospedeiros encontrados no teste indireto de hospedeiros, outros cinco foram identificados: *Leandra lacunosa* Cogn. e *Miconia corallina* Spring. procedentes da Estação Ecológica do Tripuí, em Ouro Preto, MG; *Miconia waltherii* Naudin, procedente da Reserva Ecológica do Caraça em Santa Bárbara, MG; e *Leandra aurea* Cogn. e *Leandra* sp., procedentes do Município de Macaé de Cima, RJ. Todos hospedeiros apresentaram os sintomas característicos da infecção causada por *D. gallaeformans* em folhas e inflorescências e os nematóides obtidos das extrações não apresentaram diferenças morfológicas em relação aos encontrados nos outros hospedeiros.

Entre os seus hospedeiros está a planta-alvo, *M. calvescens*. Seixas *et al.* (2004) verificaram que *D. drepanocercus* foi capaz de infectar apenas plantas de *M. calvescens* do biótipo existente no Brasil e não infectou as do biótipo existente no Havaí, sugerindo a existência especialização fisiológica no patossistema. Isto não foi observado para *D. gallaeformans*, que demonstrou capacidade de reproduzir-se em plantas dos dois biótipos, tanto em inoculações artificiais como em condições naturais, em plantas sentinelas cultivadas no campo. Esta observação é reforçada pelo fato do inóculo utilizado nos testes em condições controladas ser obtido de plantas de *M. ibaguensis*, e este se mostrou capaz de reproduzir-se nos diferentes hospedeiros. O desenvolvimento dos sintomas no campo em plantas do biótipo do Havaí mostra que *D. gallaeformans* é capaz de reproduzir-se neste hospedeiro e poderá disseminar-se espontaneamente por áreas infestadas por *M. calvescens*, no caso de uma possível introdução para o controle biológico desta invasora.

Há evidências de que a disseminação de *D. gallaeformans*, de plantas naturalmente infectadas para as plantas de *M. calvescens* do biótipo do Havaí, tenha ocorrido pela água de chuva. Em recipientes instalados sob a projeção da copa dos hospedeiros naturalmente infectados, para coleta da água de chuva, foi verificada a presença do nematóide na água recolhida, o que indica que a chuva tem papel importante na disseminação e redistribuição do nematóide entre os ramos de uma mesma planta.

*D. gallaeformans* encontra-se amplamente disseminado pela região sudeste do Brasil, sendo encontrado em áreas naturais de Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro e de Minas Gerais e em áreas de Cerrado e Campos Rupestres no Estado de Minas Gerais; além disto, foi relatado também na Costa Rica (DIETRICH, 2006). A ampla distribuição parece ser comum para nematóides do gênero *Ditylenchus*. Robinson

*et al.* (1978) verificaram que *D. phyllobius*, potencial agente de biocontrole de *Solanum elaeagnifolium*, apresentava-se amplamente distribuído na América do Norte e somente parasitando este hospedeiro, *D. drepanocercus* foi relatado no Brasil, na América Central e na Índia (SEIXAS *et al.*, 2004) e *D. dipsaci* está mundialmente distribuído principalmente em regiões temperadas e subtropicais (STURHAN e BRZESKI, 1991). A distribuição de *D. gallaeformans* por ambientes com características ecológicas e climáticas bem diferentes indica que o nematóide possui ampla capacidade de adaptação as diferentes condições de ambiente, o que aumenta as chances de sucesso no caso de uma futura introdução no Havaí. As condições climáticas observadas no Havaí são semelhantes às observadas em regiões tropicais do Brasil (SEIXAS, 2002).

*D. gallaeformans* foi mais severo tanto no campo como em casa de vegetação e em plantas do gênero *Miconia* provocando galhas foliares que paralisaram completamente o desenvolvimento da região apical dos ramos. Isto foi observado pelos resultados obtidos no teste de gama de hospedeiros entre as plantas da família Melastomataceae. As que desenvolveram os sintomas severos e apresentaram maior taxa de reprodução do nematóide foram as do gênero *Miconia*. No campo foi comum observar a ocorrência de galhas em inflorescências, o que reduziu drasticamente a frutificação. Orr *et al.* (1975) observaram que *D. phyllobius* reduziu em 75% a taxa de frutificação de *S. elaeagnifolium*. Este é um fato relevante, pois a alta taxa de produção de sementes é uma das principais características responsáveis pela dificuldade de controle das melastomatáceas em áreas onde elas são invasoras (MEYER, 1994; MEDEIROS *et al.*, 1997).

O nematóide *Subanguina picridis* Brzeski foi estudado como agente de biocontrole de *Acroptilon repens* (L) DC. importante invasora nos Estados Unidos e no Canadá. Nos testes de gama de hospedeiros, o nematóide mostrou-se capaz de infectar outras plantas da família Asteraceae além da planta-alvo, mas, mesmo assim, os estudos continuaram por que a planta-alvo foi a única considerada altamente suscetível (WATSON, 1986). A gama de hospedeiros de *D. gallaeformans* estendeu-se além da planta-alvo, sendo encontrado em outros dez hospedeiros, todos da família Melastomataceae. Este resultado poderia inviabilizar a sua utilização para o controle biológico, porém, como no Havaí não há ocorrência espécies de Melastomataceae, a sua introdução seria possível, mas em outras ilhas do Pacífico há ocorrência de membros desta família ameaçados de extinção (KAISER, 2006). Isso requer muita atenção no

caso da introdução para não promover a entrada de outra espécie-problema nas ilhas do Pacífico.

Estes resultados permitem concluir que a gama de hospedeiros de *D. gallaeformans* foi restrita a plantas da família Melastomataceae e aos gêneros *Miconia*, *Leandra* e *Clidemia*. O gênero *Miconia* mostrou-se como o mais suscetível. *D. gallaeformans* foi capaz de infectar e desenvolver os sintomas em plantas de *M. calvescens* tanto no biótipo encontrado no Brasil como no do Havaí. O desenvolvimento dos sintomas foi semelhante em todos os hospedeiros e o período latente foi aproximadamente de 30 dias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DIETRICH, A. **Evaluation of pathogens from Costa Rica for biological control of *Miconia calvenscens* in Hawaii.** 2006. 115 f. Diplomarbeit im Studiengang Biologie Leibniz Universität Hannover, Universidad de Costa Rica, Escuela de Biología, San Pedro, San José, Costa Rica.

KAISER, B. A. Economic impacts of non-indigenous species: *Miconia* and the Hawaiian economy. **Euphytica**, v. 148, p. 135-150, 2006.

MEDEIROS, A. C.; LOOPE, L. L.; MCELVANEY, S. Status, ecology, and management of the invasive plant, *Miconia calvenscens* DC (Melastomataceae) in the Hawaiian Islands. Records of the Hawaii Biological Survey for 1996. **Bishop Museum Occasional Papers**, v. 48, p. 23-36, 1997.

MEYER, J. Y. **Mecanismos d'invasion de *Miconia calvenscens* en Polynesie Français.** Ph.D. Thesis. L'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc. Montpellier, France, 1994.

MEYER, J. Y. Observations on the reproductive biology of *Miconia calvenscens* DC. (Melastomataceae), an alien invasive tree on the islands of Tahiti (South Pacific Ocean). **Biotropica**, v. 30, n. 4, p. 609-624, 1998.

OLIVEIRA, R. D. L.; BARRETO, R. W.; SANTIN, A. M. A new species of *Ditylenchus* causing galls on the invasive weed *Miconia calvenscens*. In: ANNUAL MEETING OF THE ORGANIZATION OF NEMATOLOGIST OF TROPICAL AMERICA (ONTA), 37., 2005. Viña Del Mar, Chile. **Resumos**, Viña Del Mar, Chile, 2005. 90 p.

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

- ORR, C. C.; ABERNATHY, J. R.; HUDSPETH, E. B. *Nothanguina phyllobia*, a nematode parasite of silver-leaf nightshade. **Plant Disease Reporter**, v. 59, p. 416-418, 1975.
- PARKER, P. E. **Nematodes as biological control agents of weeds**. New York: Chapman Hall, 1991. p. 58-68.
- ROBINSON, A. F.; ORR, C. C.; ABERNATHY, J. R. Distribution of *Nothanguina phyllobia* and its potential as a biological control agent for silver-leaf nightshade. **Journal of Nematology**, v. 10, n. 4, p. 362-367, 1978.
- ROBINSON, A. F.; ORR, C. C.; ABERNATHY, J. R. Behavioral response of *Nothanguina phyllobia* to selected plant species. **Journal of Nematology**, v. 11, n. 1, p. 73-77, 1979.
- SEIXAS, C. D. S. **Controle biológico de *Miconia calvescens* (Melastomataceae) com fitopatógenos**. 2002. 123 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.
- SEIXAS, C. D. S.; BARRETO, R. W.; FREITAS, L. G. *Ditylenchus drepanocercus* (Nematoda), a potential biological control agent for *Miconia calvescens* (Melastomataceae): host-specificity and epidemiology. **Biological Control**, v. 31, n. 1 p. 29-37, 2004.
- SIMBERLOFF, D.; STILING, P. Risks of species introduced for biological control. **Biological Conservation**, v. 78, p. 185-192, 1996.
- STURHAN, D.; BRZESKI, M. W. Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus spp.* In NICKLE, W. R. (Ed.). **Manual of agricultural Nematology**. New York, 1991. p. 423-459.
- WAPSHERE, A. J. A strategy for evaluating the safety of organisms for biological weed control. **Ann. App. Biol.**, v. 77, p. 201-211, 1974.
- WATSON A. K. Host range of, and plant reaction to, *Subanguina picridis*. **Journal of Nematology**, v. 18, n. 1, p. 112-120, 1986.

## CAPÍTULO 2

### HISTOPATOLOGIA DE GALHAS INDUZIDAS POR *Ditylenchus gallaeformans* sp. n. EM FOLHAS DE *Miconia ibaguensis*

#### 1. INTRODUÇÃO

*Miconia ibaguensis* Triana, membro da família Melastomataceae, é nativa do Brasil e encontrada em regiões de Cerrado e Mata Atlântica. As folhas das Melastomataceae são geralmente pilosas, opostas ou opostas-cruzadas e pecioladas, com lâminas inteiras, lanceoladas, ovaladas ou oblongas e com margens lisas ou serradas. Os tricomas, de formas variadas e complexas, constituem importante auxílio na identificação dos gêneros e das espécies dessa família, sendo rara a ocorrência de tricomas simples. A epiderme, muitas vezes, é composta por células mucilaginosas e é freqüente a presença de hipoderme (REIS *et al.*, 2005).

Nematóides membros da família Anguinidae, estudados como possíveis agentes de controle biológico de plantas apresentam como característica comum a capacidade de induzir em seus hospedeiros deformações e galhas nos tecidos aéreos (PARKER, 1991). Entre estes se destacam *Anguina amsinckia* (Steiner e Scott) Thorne, responsável pelo desenvolvimento de galhas em folhas e inflorescências de *Amsinckia intermedia* Fischer e Meyer (PANTONE, 1987), *Subanguina picridis* (Kirjanova) Brzeski, que forma galhas em folhas de membros da família Asteraceae (WATSON, 1986) e *Ditylenchus phyllobius* (Thorne) Brzeski, formador de galhas em folhas e inflorescências de *Solanum alaeagnifolium* L. (ORR *et al.*, 1975). As galhas formadas pelos nematóides

descritos acima, apresentam como características comuns a formação de uma cavidade central onde se alojam os nematóides; estas cavidades são rodeadas por células nutritivas da qual o nematóide obtém alimento, e é comum em todos os casos, o desenvolvimento vasto dos tecidos vasculares no entorno das cavidades e a formação das galhas em tecidos meristemáticos (GODFREY, 1940; ORR *et al.*, 1975; WATSON, 1986). Galhas foliares, formadas por nematóides, são caracterizadas por apresentarem hipertrofia e proliferação desordenadas de células do mesofilo e apresentam cavidades centrais onde os nematóides se alojam (MANI, 1964).

A formação de galhas representa uma reação da planta diante da invasão de um agente biótico, caracterizando uma extrema especialização entre os dois organismos. No caso de galhas formadas por nematóides, o desenvolvimento destas traz certos benefícios para o parasita, pois servem de abrigo, fornecem alimento e, em alguns casos, auxiliam na dispersão para novas áreas (PARKER, 1991).

Em 2005 foi observada em Viçosa, MG, a ocorrência de galhas em folhas e inflorescências de melastomatáceas, com destaque para *M. ibaguensis* devido à severidade e abundância dos sintomas sobre este hospedeiro. Em estudos posteriores ficou determinado que *Ditylenchus gallaeformans* sp. n. era o agente etiológico destas galhas.

Em virtude da falta de informações sobre o processo de formação das galhas provocadas por *D. gallaeformans*, este trabalho foi realizado com o objetivo de esclarecer os detalhes da interação nematóide-planta e descrever as alterações na anatomia de folhas de *M. ibaguensis* provocadas pelo ataque deste nematóide.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Coleta e processamento do material coletado no campo

O trabalho de campo envolveu a coleta de folhas de *M. ibaguensis* com galhas em diversos estádios de desenvolvimento, em áreas de ocorrência natural do nematóide no Município de Viçosa, MG. As amostras foram levadas ao laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Amostras da região mediana de folhas saudáveis e contendo galhas foram fixadas em FAA 50 % por 24 h e estocadas em álcool 70 %. Para confecção de lâminas permanentes foram utilizadas as técnicas usuais para inclusão em parafina, utilizando-se a série butílica terciária para desidratação (JOHANSEN, 1940). Na última transferência para álcool butílico terciário puro foi adicionado igual volume de parafina fundida. Após 12 horas, este volume foi substituído por parafina pura e deixado em estufa a 68 °C. Em seguida, as amostras foram emblocadas em formas apropriadas, com uma mistura de parafina (92 %) e cera de abelha fundida (8 %). Foram obtidos cortes transversais das galhas com 15 µm de espessura em micrótomo rotatório. Os cortes foram corados em fucsina básica 1%, em solução alcoólica (50 %), por 20 minutos e, em seguida, em azul de astra em solução de ácido tartárico 2 % por 15 minutos (KRAUS e ARDIUM, 1997). As lâminas foram montadas com permount, observadas e documentadas em microscópio de luz.

## **2.2. Histopatologia de folhas de *M. ibaguensis* inoculadas com *Ditylenchus gallaeformans***

Mudas de *M. ibaguensis* com aproximadamente 30 cm de altura obtidas por meio de multiplicação seminífera, foram inoculadas com 10.000 nematóides (adultos e juvenis), obtidos de plantas naturalmente infectadas. A inoculação foi realizada na região apical utilizando a técnica de deposição sobre pedaços de algodão. As mudas foram mantidas em câmara úmida por 48 h a 25 °C. Após este período, foram transferidas para casa de vegetação. As avaliações foram realizadas a cada cinco dias, a partir da data de inoculação. Do quinto ao 20<sup>o</sup> dia, a região amostrada foi o meristema apical e do 25<sup>o</sup> ao 35<sup>o</sup> dia, as amostras foram coletadas das folhas jovens em expansão. Para cada período de avaliação, foram coletadas amostras de plantas sadias no mesmo estágio de desenvolvimento para realizar as comparações anatômicas. As amostras foram fixadas, estocadas e incluídas em parafina, como descrito no item 1, porém nas fases em que foi utilizada a estufa, as amostras foram mantidas sob vácuo. Foram obtidos cortes longitudinais dos primórdios foliares e transversais das folhas jovens, com 15 µm de espessura, obtidos em micrótomo rotatório. Os cortes foram corados conforme descrito no item 1.

### 3. RESULTADOS

As características anatômicas das galhas provenientes de plantas coletadas no campo e das inoculadas em condições controladas foram semelhantes e, portanto, os resultados serão apresentados em conjunto.

Anatomia de folhas sadias: a epiderme é formada por uma única camada de células em ambas as faces, sendo as células da face adaxial maiores que as da face abaxial e variavam de quadradas a retangulares, nos cortes transversais. A cutícula era, em geral, mais espessa na face adaxial. Foi observada a presença de tricomas ramificados classificados como “tricomas estrelados pedunculados” e emergências formadas, por células epidérmicas e parenquimáticas. O parênquima lacunoso apresentava arranjo compacto com poucos espaços intercelulares e ocupava aproximadamente 70 % da espessura do mesofilo; já o parênquima paliçádico ocupava aproximadamente 30 % da espessura do mesofilo. Constantemente era observada a presença de drusas nas células do mesofilo. O sistema vascular, na nervura central, apresentava-se em forma de arco constituído por uma unidade maior, em forma de arco aberto e por duas ou três unidades menores, formando feixes bicolaterais (Figura 1), enquanto os feixes vasculares de menor porte eram colaterais.

Os nematóides em nenhum momento foram observados dentro dos tecidos foliares; sempre estavam localizados em criptas formadas pelo desenvolvimento desordenado do meristema fundamental, que sofria intensa hiperplasia; porém, não foi observada hipertrofia de células (Figura 2(A e B)). Raramente, foi observada a presença de meristemas de cicatrização nas galhas.

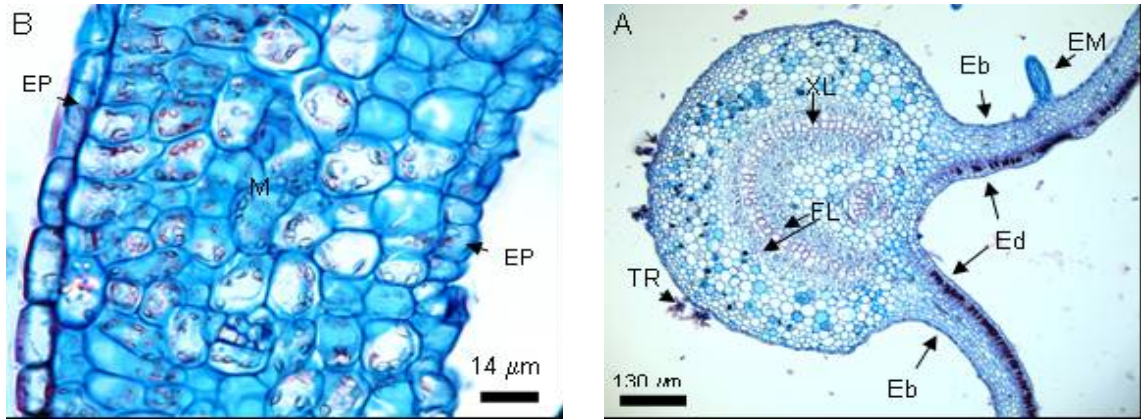


Figura 1 – Seções transversais de folhas adultas sadias de *Miconia ibaguensis*. A = região mediana da folha com destaque para nervura central; B = lâmina foliar; EP = epiderme; Eb = epiderme abaxial; Ed = epiderme adaxial; TR = tricoma; FL = floema; XL = xilema; EM = emergência; e M = mesofilo.

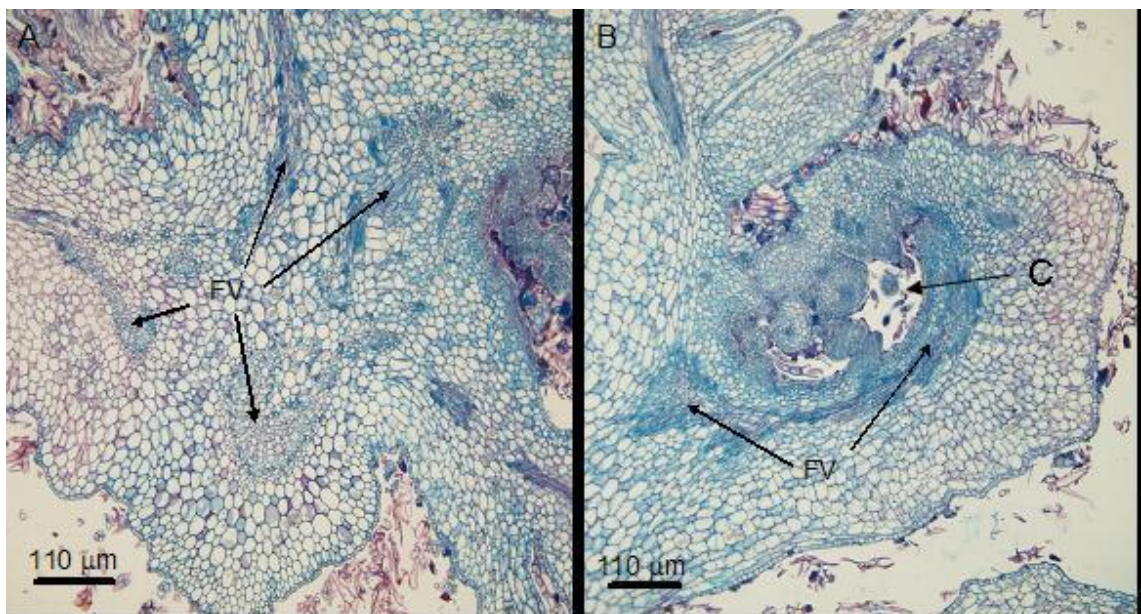


Figura 2 – Seções transversais de galhas adultas em folhas de *Miconia ibaguensis*, infectadas por *Ditylenchus gallaeformans*. A = intensa desorganização dos tecidos vasculares na região da nervura central; B = extensa vascularização no entorno das criptas; FV = feixes vasculares; e C = criptas.

As galhas apresentavam vasto desenvolvimento do sistema vascular, que se encontrava desorganizado quando comparado ao de folhas sadias, sofrendo redirecionamento para o centro das galhas (Figura 2(A e B)). As galhas apresentavam desenvolvimento contínuo, e em uma mesma galha eram observadas regiões de tecido velho e novo.

Em uma única galha eram observadas várias criptas que possuem aberturas para o ambiente externo, e no seu entorno as células mostravam-se densas, com muito conteúdo celular e com aspecto meristemático; as criptas apresentam no seu interior substâncias coradas de azul, misturadas a nematóides e micélio fúngico (Figura 3).

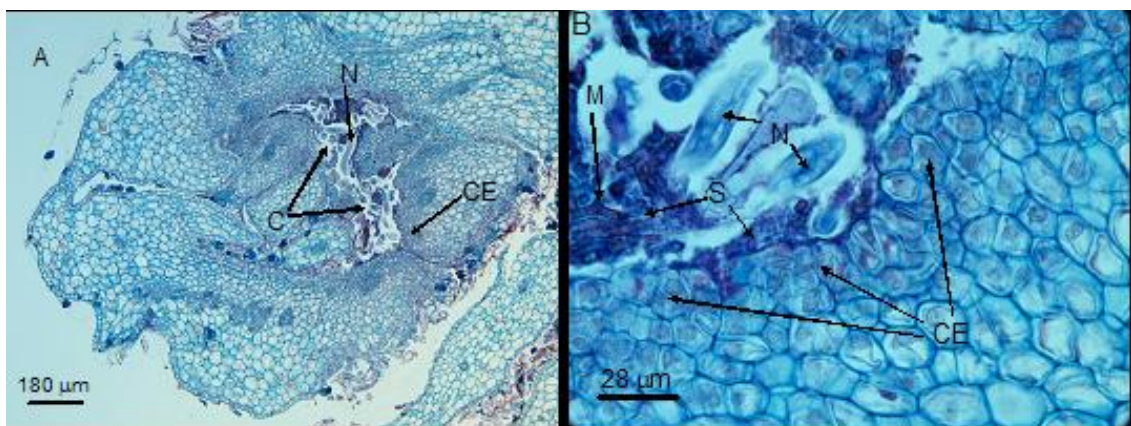


Figura 3 – Seções transversais de galhas adultas em folhas de *Miconia ibaguensis*, infectadas por *Ditylenchus gallaeformans*. A = aspecto geral da galha mostrando as células ao redor das criptas com muito conteúdo celular; B = detalhe das células do entorno das criptas e da substância encontrada no interior das criptas com a presença de micélio; N = nematóide; C = cripta; CE = células do entorno das criptas; M = micélio fúngico; e S = substâncias coradas de azul no interior das criptas.

Nas galhas de folhas adultas havia aumento no número de tricomas multicelulares, quando comparado com tecidos sadios. Também foi observada a formação de tricomas glandulares pluricelulares, não identificados em folhas sadias (Figura 4).

As galhas desenvolveram-se nas duas superfícies da folha, em qualquer parte do limbo foliar e também nos pecíolos, porém, a maior ocorrência era na região das nervuras, causando inclusive, em alguns casos, a fusão destas.

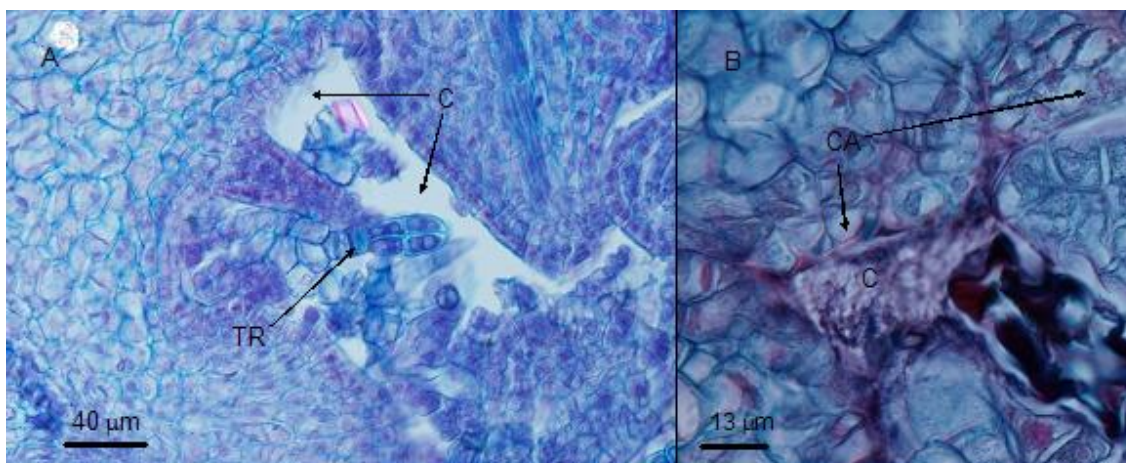


Figura 4 – Seções transversais de galhas adultas em folhas de *Miconia ibaguensis*, infectadas por *Ditylenchus gallaeformans*. A = detalhe do tricoma secretor encontrado no interior das criptas; B = detalhe de células não coloridas na borda das criptas, indicando a formação do meristema de cicatrização; TR = tricoma; C = cripta; e CA = camada de abscisão.

### 3.1. Cronologia do desenvolvimento das galhas em tecidos inoculados artificialmente

No quinto e décimo dias após a inoculação os nematóides eram observados dispersos pela região apical do ramo, nos espaços existentes entre as folhas primordiais misturados aos tricomas. Não foi observada nenhuma alteração nos tecidos (Figura 5 (A)).

No 15<sup>o</sup> dia já foram observadas alterações no meristema fundamental dos primórdios foliares. As células começaram a se multiplicar desordenadamente formando invaginações. Foi observada grande concentração dos nematóides em locais próximos às alterações ocorridas no meristema apical (Figura 5(B) e Figura 6).

A formação primária das galhas com as criptas foi observada no 20<sup>o</sup> dia. Essas são originadas das invaginações provocadas pelo desenvolvimento irregular das células do meristema fundamental. Havia sempre grande quantidade de nematóides com presença também de ovos no interior das criptas. As células do entorno destas cavidades apresentavam conteúdo celular denso (Figura 5(C)).

No 25<sup>o</sup> dia os primórdios foliares começaram a se expandir e, neste momento, as galhas já estavam completamente formadas, o que permitia observá-las a olho nu. Nos cortes era possível observar a formação característica das galhas, com as criptas bem desenvolvidas e com a presença de nematóides no seu interior. As células no entorno das criptas apresentam muito conteúdo celular e isso não foi observado em

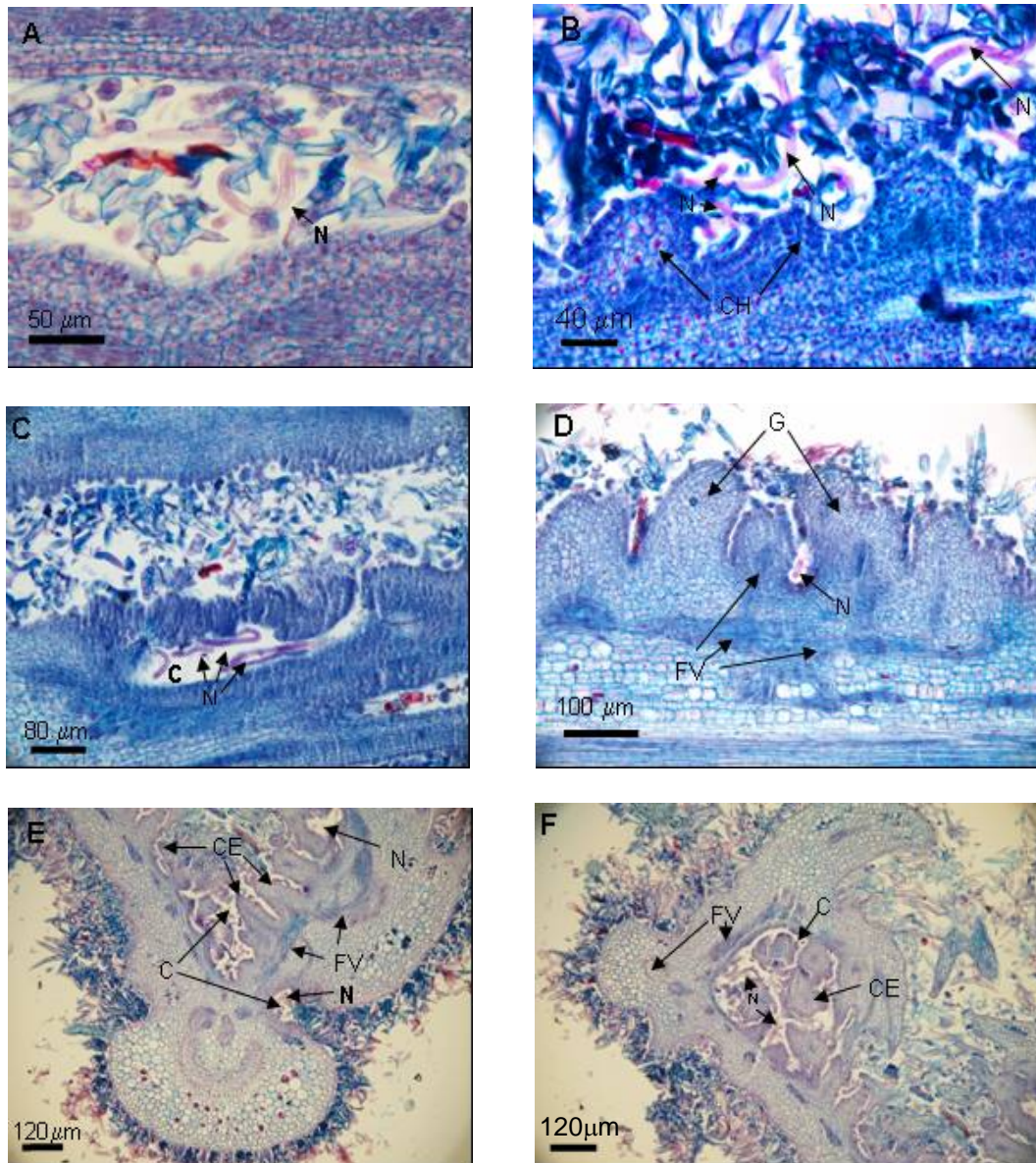


Figura 5 – Desenvolvimento cronológico das galhas em folhas de *Miconia ibaguensis* parasitadas por *Ditylenchus gallaeformans*. A = seção longitudinal do primórdio foliar, mostrando o nematóide entre os tricomas aos cinco dias após a inoculação (DAI); B = seção longitudinal na região do primórdio foliar mostrando o mesofilo sofrendo hiperplasia no início do desenvolvimento das galhas, aos 15 DAI; C = seção longitudinal na região do primórdio foliar mostrando a formação típica da galha com cavidades centrais onde os nematóides se concentram aos 20 DAI; D = seção transversal das folhas em início de expansão, mostrando as galhas em estágio avançado de desenvolvimento com criptas habitadas pelos nematóides, e com desenvolvimento dos feixes vasculares no entorno das criptas, aos 25 DAI; E e F = seção transversal da folha completamente deformada pelo nematóide; as células do entorno das criptas apresentam muito conteúdo celular e feixes vasculares bem desenvolvidos, aos 30 e 35 DAI, respectivamente; C = criptas; N = nematóide; CE = células do entorno das criptas; FV = feixes vasculares; G = galha; e CH = células sofrendo hiperplasia.

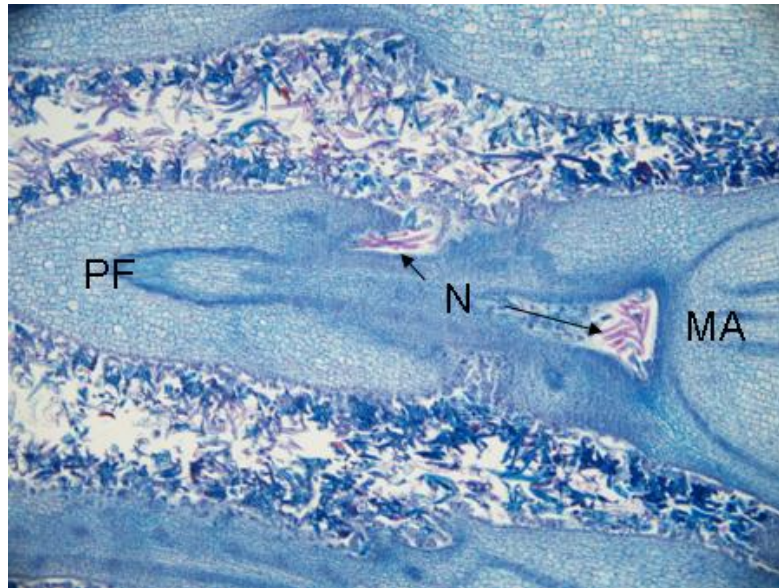


Figura 6 – Corte longitudinal do meristema apical de *Miconia ibaguensis* parasitadas por *Ditylenchus gallaeformans*. Detalhe da concentração dos nematóides, no meristema apical, aos 15 dias após a inoculação. MA = meristema apical; N = nematóide; e PF = primórdio foliar.

regiões da galha distantes dos pontos onde estavam concentrados os nematóides (Figura 5(D)).

No 30<sup>o</sup> e 35<sup>o</sup> dias, as folhas já estavam expandidas e as galhas adquiriam grandes proporções, podendo cobrir completamente o limbo foliar. A população do nematóide nas criptas já estava bem estabelecida com muitos indivíduos. No interior das criptas foi observado o acúmulo de substâncias densamente coloridas de azul e, em menor intensidade, de vermelho. O limbo foliar apresentava-se completamente deformado, sendo observada a formação inicial de expansões filiformes. Os tecidos vasculares tinham seu padrão de distribuição alterado e eram fortemente direcionados para a região da galha, concentrando-se no entorno das criptas, onde eram observadas as células com muito conteúdo celular (Figura 5(E e F)).

## 4. DISCUSSÃO

Os sintomas observados em folhas de *M. ibaguensis* seguem os mesmos padrões observados em outras espécies hospedeiras (Capítulo 1); portanto, é possível que as alterações ocorridas na anatomia foliar sejam similares em todos os hospedeiros conhecidos deste nematóide.

É comum em nematóides causadores de galhas aéreas que o desenvolvimento inicial da galha dependa da penetração dos nematóides nos tecidos do meristema fundamental, originando uma cavidade central que abrigará os nematóides por alterações no padrão de diferenciação das folhas. As células desta região sofrem hiperplasia e, em alguns casos, hipertrofia, resultando na formação das galhas (WATSON *et al.*, 1979; SKINNER *et al.*, 1980; WATSON, 1986).

*D. gallaeformans* não apresentou esta característica de penetração nos tecidos. Ao que tudo indica ele se apresenta como um ectoparasita migrador, pois, em nenhum momento foi observada a sua penetração nos tecidos para induzir a formação das galhas. No momento inicial da infecção, os nematóides acumulavam-se na região entre os primórdios foliares, protegidos pelos tricomas aí existentes; nestes locais ocorre a formação de um microclima que, provavelmente, é ideal para migração e estabelecimento inicial, além de protegê-los do dessecamento (GODFREY, 1940).

O acúmulo progressivo dos nematóides em um mesmo local induziu a multiplicação desordenada das células do meristema fundamental, que resultava no desenvolvimento anormal dos tecidos foliares e na formação das galhas com cavidades habitadas pelos nematóides. Vários autores consideram que a hiperplasia nas células do

meristema fundamental em plantas atacadas por nematóides de parte aérea, seja provocada pelo aumento da concentração de auxinas nos tecidos próximos aos locais infectados pelos nematóides, como uma forma de resposta enzimática da planta aos danos provocados por este ataque (VIGLIERCHIO, 1971; HARRIS e SHORTHOUSE, 1996).

Ao que tudo indica nos primórdios foliares *D. gallaeformans* encontra a proteção contra a dessecação por um período de tempo suficiente para formação das galhas, que é, de aproximadamente, 20 dias; além de os tecidos meristemáticos dos primórdios foliares serem mais propícios a este tipo de alterações (GOODEY, 1932; FAWCETT, 1938; GODFREY, 1940; NORTON e SASS, 1966). Estes fatores foram determinantes para o desenvolvimento da doença nos primórdios foliares.

Em galhas foliares induzidas por *D. phyllobius*, *S. picridis* e *A. Amsinckia*, as cavidades centrais onde se alojam os nematóides não apresentavam ligações com o ambiente externo (SKINNER *et al.*, 1980; WATSON, 1986; PANTONE, 1987). Porém, as cavidades formadas em galhas incitadas por *D. gallaeformans* apresentavam ligação com o meio externo, o que possibilita rápida saída do nematóide destes locais, quando necessária sua migração para novos sítios de infecção.

Foi observado que as células do entorno das criptas onde estavam localizados os nematóides apresentavam grande quantidade de conteúdo celular, indicando intensa atividade celular nestes locais (SKINNER *et al.*, 1980; HARRIS e SHORTHOUSE, 1996). Acredita-se, também, que esteja ocorrendo acúmulo de substâncias nutritivas, como observado por Watson (1986), em folhas de *Acroptilon repens* atacadas por *S. picridis*; as células que circundavam as cavidades onde estavam localizados os nematóides também exibiam conteúdo celular denso, resultante do acúmulo de fotoassimilados e da proliferação de mitocôndrias e ribossomos, sugerindo que estas eram as células nutritivas usadas para a transferência de alimentos entre a planta e o nematóide. Fenômeno semelhante foi observado em galhas foliares de *Solanum alaeagnifolium* infectadas por *D. phyllobius* (SKINNER *et al.*, 1980). Isso é comum também nas galhas formadas por insetos (HARRIS e SHORTHOUSE, 1996).

O acúmulo dos tricomas nas galhas, principalmente nas criptas onde se alojavam os nematóides, pode contribuir com a manutenção da umidade nestes locais, favorecendo a formação de um microclima úmido. Harris e Shorthouse (1996) observaram que em galhas incitadas por *S. picridis* ocorre incremento de 1,8 vez nas taxas de transpiração no interior das galhas quando comparada com as taxas de tecidos

sadios. Isto reforça a idéia de que os nematóides galhadores de tecidos aéreos necessitam que as cavidades onde habitam mantenham-se constantemente úmidas, o que evita a sua dessecação.

Foram raras as observações de células necrosadas, indicando que o nematóide não destrói as células ao alimentar-se; isto foi também relatado nas espécies de nematóides citadas anteriormente (SKINNER *et al.*, 1980; WATSON, 1986).

No interior de criptas, encontradas nas galhas incitadas por *D. gallaeformans*, ocorre o acúmulo de substâncias desconhecidas, mas foi também observada a presença de tricomas secretores, que não eram vistos em tecidos sadios. É possível que estas substâncias sejam nutritivas por apresentarem grandes quantidades de micélio fúngico, porém é necessário que estudos histoquímicos posteriores sejam realizados para desvendar sua natureza e função na interação nematóide x hospedeiros. Não há relatos na literatura de nematóides galhadores de tecidos aéreos induzindo tanto a formação de tricomas especiais secretores como a secreção de substâncias no interior das galhas.

A significativa biomassa das galhas e a extensa vascularização no entorno das criptas sugerem que ocorra grande translocação de fotoassimilados para suprir a demanda alimentar do nematóide e o desenvolvimento das galhas, resultando em forte dreno para a planta, impondo-lhe grande desvantagem competitiva no ambiente natural, como observado por Harris e Shorthouse (1996). Ainda, de acordo com estes autores, a efetividade de insetos e nematóides indutores de galhas aéreas no controle biológico de plantas invasoras é devido à grande desvantagem competitiva imposta às plantas hospedeiras, provocada pelo desvio de fotoassimilados para a região das galhas, visando suprir a demanda alimentar dos nematóides e insetos.

Os resultados obtidos permitem concluir que *D. gallaeformans* é um ectoparasita migrador. As galhas têm origem da hiperplasia de células do meristema fundamental dos primórdios foliares. Não há hipertrofia de células e nem a formação de células especiais de alimentação. A formação de galhas só é possível pela infecção dos nematóides nos primórdios foliares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FAWCETT, S. G. M. A disease of australian grass *Microlaena stipoides* R. Br. caused by a nematode, *Anguillulina microlaena* n. sp. **Journal Helminthol.**, v. 16, p. 17-32, 1938.

GODFREY, G. H. Ecological specialization in the stem and bulb infesting nematode, *Ditylenchus dipsaci* var. *amsinckiae*. **Phytopathology**, v. 30, p. 41-54, 1940.

GOODEY, T. Observations on *Anguillulina millefolii* Goodey, 1932, from galls on the leaves of yarrow, *Achillea millefolium* L. **Journal Helminthol.**, v. 14, p. 93-108, 1932.

HARRIS, P.; SHORTHOUSE, J. D. Effectiveness of galls inducers in weed biological control. **The Canadian Entomologist**, v. 128, p. 1021-1055, 1996.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw-Hill Book Co. Inc., 1940. 523 p.

KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198 p.

MANI, M. S. **Ecology of plant galls**. The Auge: Junk Publishers, 1964. 434 p.

NORTON, D. C.; SASS, J. E. Pathological changes in *Agropyron smithii* induced by *Anguina agropyronilloris*. **Phytopathology**, v. 56, p.769-771, 1966.

ORR, C. C.; ABERNATHY, J. R.; HUDSPETH, E. B. *Nothanguina phyllobia*, a nematode parasite of silver-leaf nightshade. **Plant Disease Reporter**, v. 59, p. 416-418, 1975.

PANTONE, D. J. Host range of *Anguina amsinckiae* within the genus *Amsinckia*. **Revue Nématologie**, v. 10, n.1, p. 117-119, 1987.

PARKER, P. E. Nematodes as biological control agents of weeds. **Microbial control of weeds**. New York: Chapman Hall, 1991. p. 58-68.

REIS, C.; BIERAS, A. C.; SAJO, M. G. Anatomia foliar de Melastomataceae do cerrado do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 3, p. 451-466, 2005.

SKINNER, J. A.; ORR, C. C.; ROBINSON, A. F. Histopathogenesis of the galls induced by *Nothanguina phyllobia* in *Solanum elaeagnifolium*. **Journal of Nematology**, v.12, n.2, p.142-150, 1980.

VIGLIERCHIO, D. R. Nematode and other pathogens in auxin related plant-growth disorders. **The Botanical Review**, v. 37, n. 1, p. 1-21, 1971.

WATSON A. K. Host range of, and plant reaction to, *Subanguina picridis*. **Journal of Nematology**, v. 18, n. 1, p. 112-120, 1986.

WATSON, A. K. Biology of *Subanguina picridis*, a potential biological control agent of Russian Knapweed. **Journal of Nematology**, v. 18, n. 2, p. 154-158, 1986.

WATSON, A. K.; SHORTHOUSE, J. D. Gall formation on *Cirsium arvense* by *Ditylenchus dipsaci*. **Journal of Nematology**, v. 11, n. 1, p. 17-22, 1979.

## CAPÍTULO 3

### **ASPECTOS BIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS DE *Ditylenchus gallaeformans* sp. n., POTENCIAL AGENTE DE BIOCONTROLE DE *Miconia calvescens* (MELASTOMATACEAE)**

#### **1. INTRODUÇÃO**

O uso de nematóides como agentes de biocontrole não é um conceito novo, pois estes são muito usados para o controle biológico de insetos. Entretanto, há alguns poucos exemplos de estudos envolvendo o uso de fitonematóides no controle biológico de plantas (PARKER, 1991), mas nenhum exemplo prático desta aplicação.

Os nematóides avaliados para o controle biológico de plantas invasoras são membros da família Anguinidae (PARKER, 1991) e são conhecidos por apresentarem a habilidade de induzir galhas e deformações, em folhas e inflorescências de mono e dicotiledôneas (GOODEY, 1965). As galhas formadas por membros da família Anguinidae são caracterizadas pela pronunciada hipertrofia, proliferação das células do mesofilo e a presença de uma cavidade central onde se alojam os nematóides (MANI, 1964). Uma importante característica observada nos membros dessa família é a habilidade de sobreviver à desidratação, fenômeno denominado anidrobiose, que ocorre graças à existência de um estágio de repouso no ciclo de vida (PARKER, 1991).

De maneira geral, o ciclo de vida nos nematóides varia de cinco dias, no mínimo, a um ano ou mais, e são influenciados, primariamente, pela temperatura e qualidade do substrato (NORTON e NIBLACK, 1991). O ciclo de vida de nematóides do gênero *Ditylenchus* é relativamente curto, em *D. dipsaci*, variando de 17 a 23 dias

em temperaturas entre 15 e 22 °C (YUKSEL, 1960). Em *D. destructor*, o ciclo de vida varia de 20 a 26 dias em temperaturas entre 20 e 25 °C e em *D. myceliophagus* é de 26 dias à temperatura de 18 °C (STURHAM e BRZESKI, 1991).

Em 2005, uma nova espécie de nematóide pertencente ao gênero *Ditylenchus* foi constatada na região de Viçosa, MG, causando deformações foliares e galhas sobre folhas, hastes e inflorescências de melastomatóceas. A severidade dos sintomas observados em seus hospedeiros sugeria que esta nova espécie teria grande potencial para ser utilizado como agente de biocontrole de melastomatóceas invasoras (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Entre seus hospedeiros está *Miconia calvescens* DC (Melastomataceae), planta nativa da América do Sul e Central e importante invasora de ilhas do Pacífico (MEYER, 1994; MEDEIROS *et al.*, 1997). Esta espécie apresenta todos os atributos de uma espécie invasora agressiva, como crescimento rápido, tolerância ao sombreamento, que permite sua germinação e permanência em baixos níveis de luz, alta taxa de produção e dispersão de sementes (MEYER, 1998). Considera-se, hoje, que a medida mais viável para o seu controle é a introdução de inimigos naturais em programas de controle biológico clássico (MEDEIROS *et al.*, 1997; KAISER, 2006).

Visando avaliar a possível utilização de *D. gallaeformans* no controle biológico de *M. calvescens* uma série de questões foi levantada em relação à sua biologia, cujas características são únicas na relação com seus hospedeiros. Assim, nesse trabalho buscou-se estudar os aspectos biológicos e ecológicos do ciclo vida de *D. gallaeformans*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Ciclo de vida de *Ditylenchus gallaeformans*

#### 2.1.1. Período de embriogênese

Os ovos utilizados no experimento foram obtidos de galhas foliares de plantas de *Miconia ibaguensis* Triana naturalmente infectadas. As galhas coletadas foram levadas ao laboratório, onde se realizou a extração, por meio da trituração em liquidificador por 20 s. A suspensão obtida foi passada pelas peneiras de 200 e 500 mesh para separar os ovos dos nematóides e dos restos vegetais. A suspensão de ovos recolhida foi a que passou pela peneira de 500 mesh. Esta suspensão foi separada em duas alíquotas; a primeira para mensurar os ovos em microscópio de luz e a segunda para analisar a embriogênese. Com o auxílio de uma micropipeta, os ovos foram succionados individualmente e transferidos para uma lâmina escavada, contendo solução de sulfato de estreptomicina 50 ppm (OLIVEIRA e FERRAZ, 1985). Sob microscópio de luz foram selecionados ovos com uma ou duas células, os quais foram depositados, individualmente, sobre lâminas escavadas contendo gotículas da mesma solução utilizada na seleção dos ovos. As lâminas foram seladas com lamínulas contendo nos bordos uma camada de vaselina para impedir a evaporação. As lâminas foram mantidas em incubadoras a 25 °C no escuro, dentro de gerbox com espuma umedecida, formando uma câmara úmida.

As observações foram realizadas a cada 24 horas, desde o início do processo até a eclosão dos juvenis de segundo estágio.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com 20 repetições; a unidade experimental foi formada por uma lâmina com um ovo.

### **2.1.2. Período de desenvolvimento pós-embriogênico**

Ovos coletados como no ensaio anterior foram deixados em câmara de eclosão por 48 horas, para obter juvenis de segundo estágio (J2). Os J2 foram inoculados em mudas de *M. ibaguensis* com aproximadamente 30 cm de altura, obtidas por meio de multiplicação seminífera. Cada planta recebeu 800 nematóides, depositados na região apical utilizando a técnica de deposição sobre pedaços de algodão. As mudas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas, a 25° C, em câmara de crescimento e, posteriormente, transferidas para casa de vegetação.

A cada 48 horas, durante 14 dias, as regiões apicais de três plantas foram coletadas e cortadas em pequenos fragmentos, mantidos sob borbulhamento contínuo. Após 6 horas, a suspensão foi passada pela peneira de 60 mesh, para reter os restos vegetais. Os nematóides recolhidos foram mortos em banho-maria e transferidos para BPI contendo solução Carnoy (10 % de ácido acético glacial, 60 % de etanol absoluto e 30 % de clorofórmio). Após 20 minutos, os ovos foram transferidos para uma solução de orceína acética 1 % por 1 hora. Em seguida, as lâminas foram montadas em ácido acético 45 % (HIRSCHMANN, 1962), visando evidenciar o sistema reprodutivo dos juvenis e adultos, para observação em microscópio de luz.

Para determinação dos estádios foi realizada mensuração prévia do comprimento e diâmetro do corpo de dez juvenis, para cada estágio de desenvolvimento, extraídos de galhas coletadas no campo. A separação dos nematóides nos estádios de J2, J3 e J4 foi realizada com base no desenvolvimento do sistema reprodutivo de *D. dipsaci*, segundo Yuksel (1960).

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos (sete datas de avaliação) e três repetições; a unidade experimental era formada por uma planta com uma gema apical inoculada.

## **2.2. Verificação do estágio de anidrobiose de *Ditylenchus gallaeformans***

### **2.2.1. Verificação do estágio de anidrobiose de *Ditylenchus gallaeformans* em galhas secas encontradas no campo**

Galhas secas, encontradas junto ao solo e presas às plantas de *M. ibaguensis* no campo, foram coletadas e trazidas para o laboratório. A extração e fixação dos nematóides em estágio de anidrobiose foram realizadas seguindo a metodologia descrita por Freckman *et al.* (1977). As galhas secas foram imersas em solução de formaldeído a 5 % e imediatamente trituradas em liquidificador por 30 s. A suspensão obtida foi passada pelas peneiras de 60 e 500 mesh, para separar os nematóides dos restos vegetais. A suspensão recolhida da peneira de 500 mesh foi mantida no mesmo fixativo. Foram confeccionadas lâminas com os nematóides, para observação em microscópio de luz.

### **2.2.2. Sobrevivência de *Ditylenchus gallaeformans* em tecidos vegetais campo**

Galhas frescas de inflorescências de *M. ibaguensis*, naturalmente infectadas por *D. gallaeformans*, foram selecionadas no campo e levadas ao laboratório para pesagem. Cada amostra de 3 g de galha foi depositada separadamente em sacos de papel e mantida à temperatura ambiente.

Para extração dos nematóides, o material vegetal de cada amostra foi deixado imerso em água sob borbulhamento contínuo por 24 horas. Posteriormente, a suspensão foi passada nas peneiras de 20 e 500 mesh para separar os nematóides dos restos vegetais. A contagem dos nematóides recuperados da última peneira foi realizada com o auxílio da câmara de Peters em microscópio de luz.

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com nove tratamentos (datas de avaliação) e quatro repetições; a unidade experimental era composta por uma amostra com 3 g de galha. Foi avaliado o número total de nematóides por amostras. As avaliações iniciaram com o material fresco imediatamente após a coleta e prosseguiram por 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após o armazenamento.

### **2.3. Dinâmica temporal da população de *Ditylenchus gallaeformans* em plantas de *Miconia ibaguensis***

Para realização deste experimento foi selecionada uma área de ocorrência natural de plantas de *M. ibaguensis* infectadas por *D. gallaeformans*, próxima ao bairro Cristais, em Viçosa, MG. Foram selecionadas cinco plantas e, mensalmente, foram coletadas amostras de galhas procedentes de folhas e inflorescências e uma amostra de tecido sadio de cada planta. No laboratório foi realizada a pesagem e a separação de 1 g de cada tecido vegetal a ser analisado. Para extração dos nematóides, cada amostra foi cortada em pequenos fragmentos e deixada imersa em água sob borbulhamento contínuo por 24 horas. Posteriormente, cada suspensão foi passada através das peneiras de 20 e 500 mesh para separar os nematóides dos restos vegetais. Os nematóides retidos na peneira de 500 mesh foram recolhidos e, em seguida, realizada a sua contagem com auxílio da câmara de Peters, em microscópio de luz. Amostras de 1 g referente a cada material analisado foram colocadas em sacos de papel e levada à estufa por 72 horas, à 60 °C, para determinação do peso da matéria seca. Os dados climáticos foram obtidos na estação meteorológica da UFV.

Os dados foram submetidos à análise de correlação de Pearson no programa SAS (Versão 9.0).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Determinação da duração do ciclo de vida de *D. gallaeformans*

##### 3.1.1. Período de embriogênese

Os ovos em estágio inicial de desenvolvimento apresentaram forma de bastonetes, variando de reto a levemente curvos, medindo, em média, 54 x 24  $\mu\text{m}$  (49-61 x 18-25  $\mu\text{m}$ , n = 50). Os ovos em estágio de uma ou duas células apresentavam protoplasto com muitos grânulos esferoidais envoltos por uma membrana.

Na primeira observação, 24 horas após a montagem das lâminas, os ovos apresentavam-se em fase de divisão celular, variando de quatro a dez células. Às 48 horas foi possível observar ovos ainda em divisão celular com muitas células difíceis de serem contabilizadas e outros em estágio de blástula. A maioria dos ovos estava entre o estágio de blástula e gástrula às 72 horas, porém, poucos apresentavam o desenvolvimento embrionário. Em 96 horas já foi possível observar os embriões em formação, com algumas regiões apresentando contorno do corpo definido, com aspecto granuloso e escuro. Entre 120 e 144 horas, os juvenis de primeiro estágio estavam caracterizados e era possível observar o contorno suave do esôfago na junção com o intestino e o bulbo mediano ainda pouco desenvolvido. A região anterior do corpo apresentava-se mais hialina que a posterior e o estilete não era visível. Entre 144 e 192 horas, já ocorrera a primeira ecdise e foram observados os juvenis de segundo estágio já

apresentando o estilete esclerotizado, esôfago bem diferenciado e o corpo finamente anelado com cauda afilada. Neste período, os J2 movimentavam-se ativamente no interior do ovo, tocando a casca com o estilete. A primeira eclosão foi observada em 192 horas e a última com 240 horas, à de 25 °C.

### **3.1.2. Período de desenvolvimento pós-embriogênico**

Os juvenis de segundo estágio apresentaram comprimento médio do corpo de 211  $\mu\text{m}$  (191 – 244  $\mu\text{m}$ ) e diâmetro médio de 11,2  $\mu\text{m}$  (9,4 – 12,6  $\mu\text{m}$ ); os de terceiro estágio apresentaram comprimento médio do corpo de 301  $\mu\text{m}$  (270 – 357  $\mu\text{m}$ ) e diâmetro médio de 13,1  $\mu\text{m}$  (11,4 – 14,1  $\mu\text{m}$ ); e os de quarto estágio apresentaram comprimento médio do corpo de 433  $\mu\text{m}$  (385 – 472  $\mu\text{m}$ ) e diâmetro médio de 16,5  $\mu\text{m}$  (14,7 – 18,6  $\mu\text{m}$ ).

Os J2 levaram de dois a quatro dias para realizarem a segunda ecdise, dando origem aos juvenis de terceiro estágio (J3). Os J3 atingiram a fase de juvenis de quarto estágio (J4) aos seis a oito dias, e os J4 levaram de oito a 12 dias para realizarem a quarta ecdise, originando os adultos. A relação média observada entre machos e fêmeas na população foi de 1:5 respectivamente. No 14<sup>o</sup> dia foi observada a presença de fêmeas grávidas.

## **3.2. Verificação do estágio de anidrobiose de *Ditylenchus gallaeformans***

### **3.2.1. Verificação do estágio de anidrobiose de *Ditylenchus gallaeformans* em galhas secas encontradas no campo**

Nas amostras de galhas secas coletados no campo (Figura 1) foram encontrados nematóides em estágio de repouso (anidrobiose). Os nematóides encontravam-se em forma de espiral e individualizado. O estágio de vida em que os nematóides encontravam-se nas amostras analisadas eram juvenis de quarto estágio, já apresentando as estruturas reprodutivas bem desenvolvidas e os primórdios genitais, como observado na (Figura 2(A)). Eram nítidos os efeitos provocados pela desidratação do corpo, sendo possível visualizá-lo com aspecto plasmolizado (Figura 2(B)).



Figura 1 – Galhas secas senescentes encontradas no campo em plantas de *Miconia ibaguensis*, infectadas por *Ditylenchus gallaeformans*.

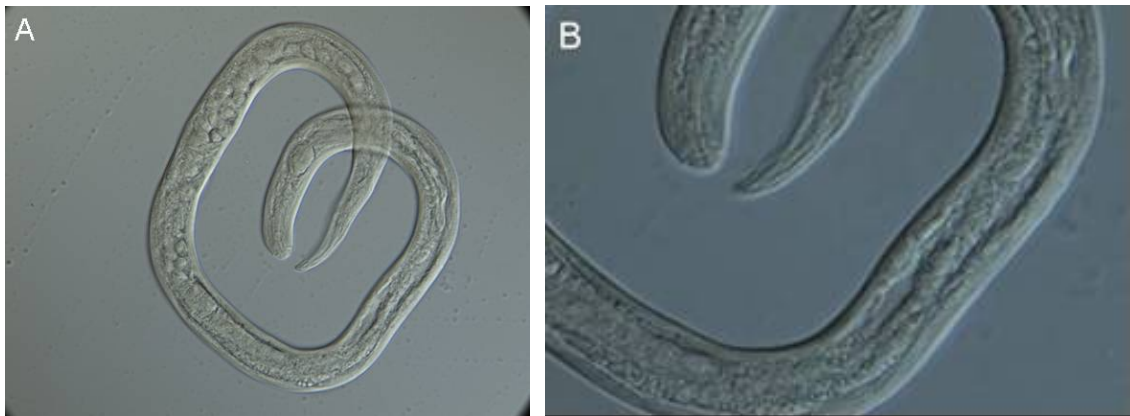


Figura 2 – A = juvenil de quarto estágio de *Ditylenchus gallaeformans* em anidrobiose, encontrado em galhas secas no campo; e B = detalhe do corpo com aspecto plasmolizado, provocado pela desidratação do corpo.

### 3.2.2. Sobrevivência de *Ditylenchus gallaeformans* em tecidos vegetais

A população de *D. gallaeformans* decaiu rapidamente até o 30<sup>o</sup> dia. A partir deste momento até os 180 dias de armazenamento a população manteve-se praticamente constante (Figura 3). A população média inicial foi de 4.600 nematóides/amostra e chegou ao final do período de armazenamento aos 180 dias 21 vezes menor, com 223 nematóides/amostra. Nessas amostras foi observada a presença de adultos e juvenis de quarto estágio (J4).

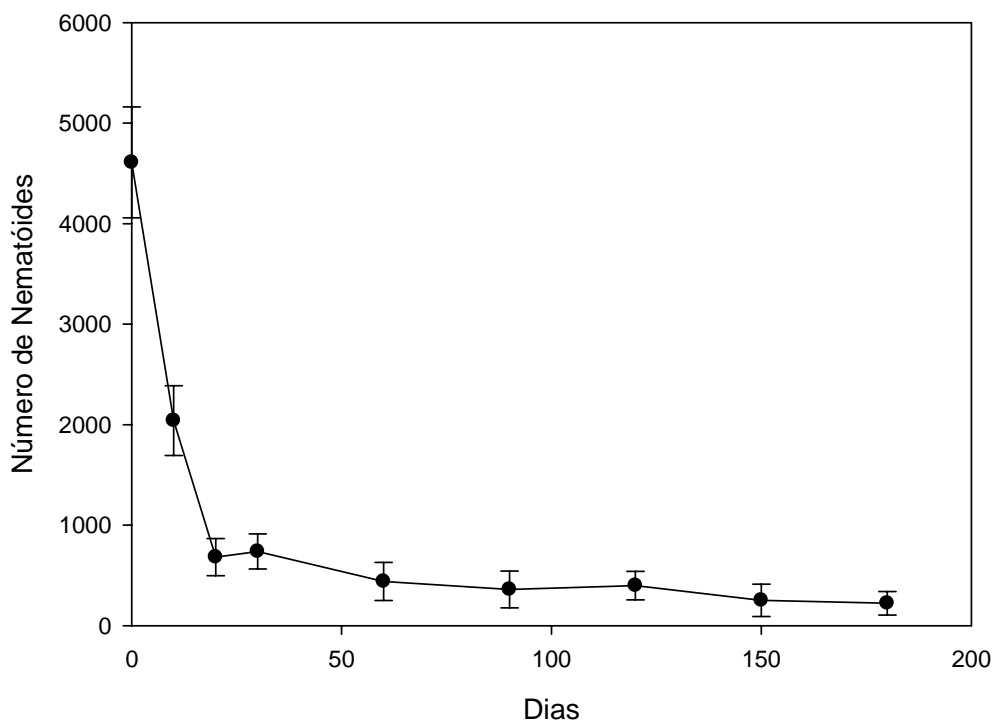


Figura 3 – Evolução da população de *Ditylenchus gallaeformans* em tecidos de *Miconia ibaguensis* mantidos em temperatura ambiente ao longo de 180 dias.

### 3.3. Dinâmica temporal da população de *Ditylenchus gallaeformans* em plantas de *Miconia ibaguensis*

A flutuação populacional foi observada durante o período de 16 meses (de setembro de 2006 a dezembro de 2007). A doença ocorreu durante todo o período de avaliação. Houve mesma tendência de comportamento da população quanto ao número de nematóides presentes nas folhas e inflorescências de *M. ibaguensis* durante o período avaliado (Figura 4). Nos períodos de temperatura mais elevada houve tendência de a população manter-se maior que nos períodos de temperatura mais baixa, tanto em galhas de folhas como nas de inflorescências (Figuras 4 e 6), porém, na maioria das avaliações o número médio de nematóides nas galhas de inflorescências foi superior ao observado em galhas foliares (Figura 4). O pico populacional nas galhas de inflorescências ocorreu em dezembro de 2007, com 14.717 indivíduos por grama de galha em massa seca, e em julho de 2007 foi observada a menor população com 1.815 indivíduos por grama de galha em massa seca (Figura 4). Nas galhas foliares o pico populacional ocorreu em novembro de 2007, com 11.560 indivíduos por grama de galha em massa seca, e em julho de 2007 foi observada a menor população com 2.750 indivíduos

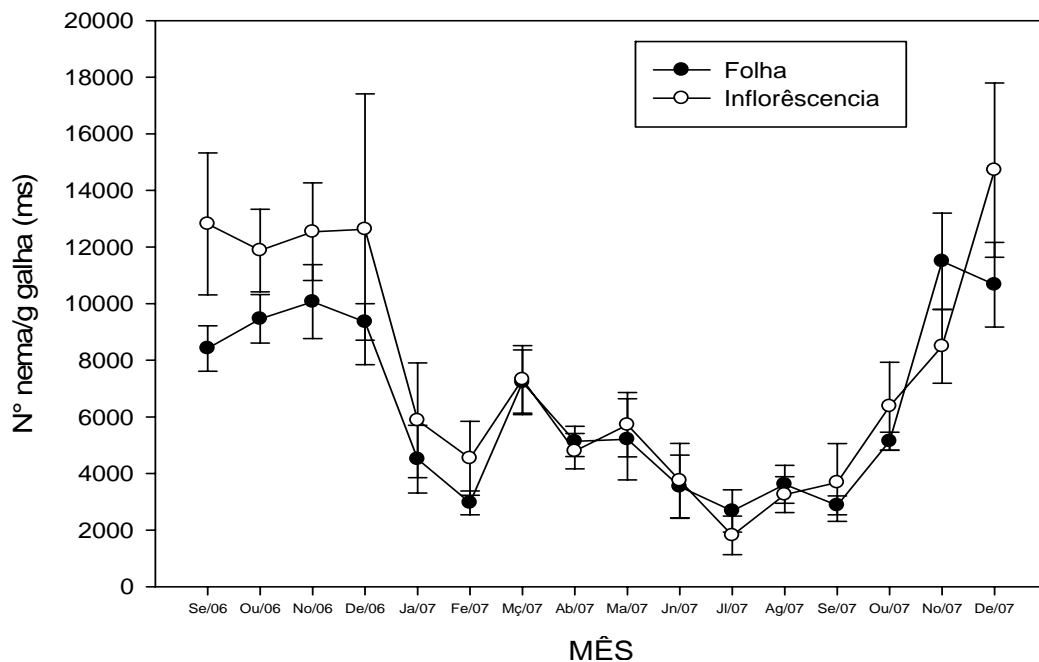


Figura 4 – Flutuação populacional de *Ditylenchus gallaeformans* em galhas foliares e de inflorescências de *Miconia ibaguensis*, no período de setembro de 2006 a dezembro de 2007. Barras verticais indicam o erro padrão (n = 5).

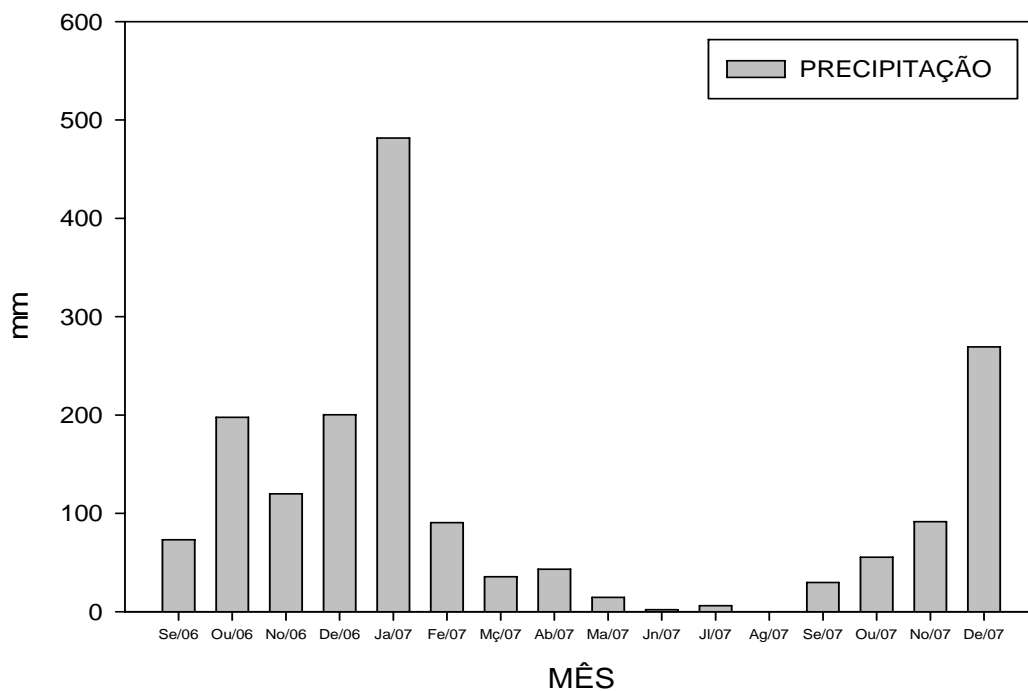


Figura 5 – Precipitação mensal acumulada, observada na região de Viçosa, MG, no período de setembro de 2006 a dezembro de 2007.

por grama de galha em massa seca (Figura 4). Foi observado que em janeiro de 2007 houve queda brusca na população (Figura 4), que até então vinha mantendo-se constante; paralelamente, foi observado que este mesmo mês apresentou maior precipitação mensal acumulada durante o período avaliado (Figura 5).

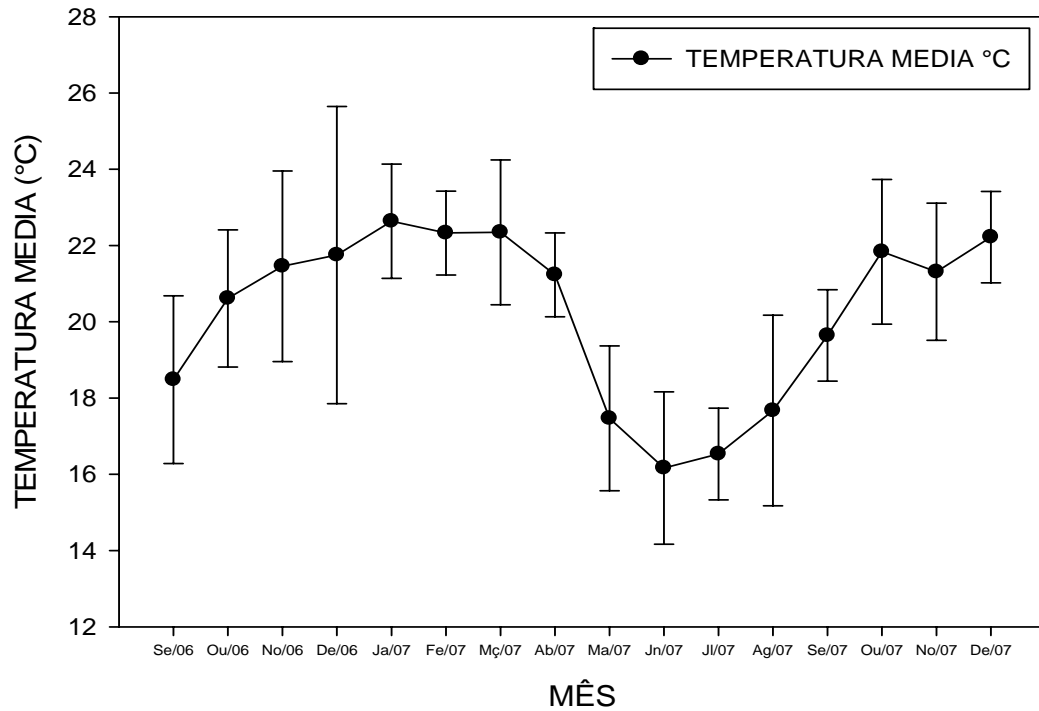


Figura 6 – Temperatura média, observadas na região de Viçosa, MG, no período de setembro de 2006 a dezembro de 2007.

Pela análise de correlação de Pearson não se detectou correlação entre os fatores climáticos e a população do nematóide durante o período avaliado.

#### 4. DISCUSSÃO

O tempo médio para que ocorra a eclosão dos ovos de *D. gallaeformans* foi de nove dias à temperatura de 25 °C. O período médio para desenvolvimento dos juvenis de segundo estágio até as fases adultas foi de dez dias; com mais quatro dias foram observadas fêmeas grávidas, com os ovos bem desenvolvidos no interior do útero. Em *D. dipsaci*, o período requerido pelas fêmeas após a quarta ecdise até a postura dos ovos varia de três a sete dias (YUKSEL, 1960). Se o período de gestação da fêmea fosse em média de cinco dias, o tempo necessário para o ciclo completo de *D. gallaeformans*, seria de aproximadamente 25 dias, o que permitiria desenvolvimento de 14 gerações no período de um ano.

A relação observada após a formação dos estádios adultos entre machos e fêmeas foi 1:5; isso também foi observado nas populações de campo, o que indica que a reprodução deste nematóide é cruzada. Essa relação é comum em espécies que apresentam machos e este tipo de reprodução (NORTON e NIBLACK, 1991), o que garante variabilidade dentro das populações.

Com a relação à fase infectiva de *D. gallaeformans* não foi feita nenhuma tentativa de estudar a interação “nematóide x planta” em cada fase do ciclo de vida. Mas, em vista dos resultados obtidos, é possível que todos os estádios móveis de J2 a adulto tenham potencial para desenvolver a doença, pois em extrações realizadas com meristemas apicais, 24 horas após a inoculação, foi verificada a presença de todos os estádios do ciclo de vida; isso indica que qualquer estágio pode se estabelecer nos locais de infecção, porém não é possível afirmar que em todas as fases do ciclo de vida os

nematóides alimentem-se de tecidos da planta e, desta forma, possam induzir a formação das galhas. Em *D. dipsaci*, *D. destructor* e *D. phyllobius* todas as fases do ciclo de vida são infectivas, mas os juvenis de quarto estágio são os mais importantes por causa da grande mobilidade e capacidade de desenvolverem anidrobiose (ROBINSON *et al.*, 1978; ROBINSON *et al.*, 1984; STURHAM e BRZESKI, 1991).

A ocorrência de anidrobiose é muito comum em nematóides que atacam órgãos aéreos de plantas (PARKER, 1991). A verificação de nematóides em estágio de anidrobiose representa uma característica de grande importância no ciclo da doença, pois é nesta fase que os nematóides são disseminados em longas distâncias. Orr *et al.* (1975), ao estudarem o ciclo de vida de *D. phyllobius*, observaram que galhas foliares secas de material senescente continham juvenis pré-infectivos em estado de anidrobiose, que ao encontrarem condições de umidade favoráveis, emergiam das galhas secas e deslocavam-se externamente até a região meristemática dos hospedeiros e ali desenvolviam novos ciclos da doença. Este ciclo, ao que tudo indica, também ocorre com *D. gallaeformans*, pois uma grande quantidade de galhas secas, oriundas de material senescente de plantas infectadas no campo, foi encontrada presa às plantas e no solo. Estas galhas secas contêm os nematóides em estado de anidrobiose. Provavelmente, ao ocorrer períodos longos de alta umidade os nematóides se reidratam e saíam das galhas secas à procura de novos hospedeiros. Essas folhas secas são facilmente levadas pelo vento, o que favorece a disseminação dos nematóides em longas distâncias. Isso também foi verificado por diversos autores em *Subanguina picridis*, *Anguillina millefolii* e *D. phyllobius*, todos nematóides de parte aérea (GOODEY, 1932; ORR *et al.*, 1975; WATSON, 1986). A disseminação em longas distâncias representa uma grande vantagem competitiva para o nematóide, pois permite a exploração de novas áreas (ORR *et al.*, 1975), e em casos de introduções visando o controle biológico de plantas, a disseminação em longas distâncias é muito importante, pois permitirá que o nematóide se estabeleça em qualquer local que a planta-alvo estiver, independentemente de ação antrópica.

A capacidade de desenvolver a anidrobiose em membros da família Anguinidae permite que estes nematóides permaneçam por longos períodos em repouso nos tecidos infectados (SIVACAMUR, 1982). *D. gallaeformans* apresenta a capacidade de entrar em estado de anidrobiose, o que permite a sua sobrevivência em material vegetal desidratado; isso pode ser muito útil, principalmente para transportar o nematóide por longas distâncias e por períodos prolongados de tempo, como no caso de introduções

para o controle biológico de plantas. Não foi possível verificar se os nematóides permanecem infectivos após períodos prolongados de preservação, mas acredita-se que isto não afete a capacidade de infecção, visto que a anidrobiose é um fenômeno natural observado no ciclo de vida dos nematóides. Em *D. phyllobius* é possível obtê-los infectivos em material vegetal desidratado, após um período 24 horas de imersão em água (SKINNER *et al.*, 1980).

*D. gallaeformans* possui muita agilidade para locomover-se. Foi possível fazer tal observação ao se manter folhas contendo galhas em câmara úmida por algumas horas. Ao examinar estes materiais em microscópio estereoscópico os nematóides foram observados locomovendo-se com extrema agilidade e em grande número na superfície das folhas.

A população do nematóide oscilou bastante ao longo do ano, sendo que os menores valores foram observados nos períodos de temperaturas mais baixas e, ou, com maior precipitação mensal, embora nenhuma correlação tenha sido detectada pelas análises estatísticas. As maiores densidades foram observadas nos períodos quando as temperaturas eram mais altas. Era esperado que houvesse relação da população, principalmente com a temperatura, que é considerada entre os fatores abióticos que governam o tamanho das populações dos nematóides a mais importante (NORTON e NIBLACK, 1991). Segundo SEIXAS (2002), o fato de não se observar correlação entre a população de *D. drepanocercus* e as variáveis climáticas, é devido à coevolução com seu hospedeiro em condições naturais que implica na existência de equilíbrio entre eles.

De maneira geral, a população mostrou-se superior nas galhas de inflorescências do que nas encontradas em folhas, possivelmente isso se deve ao fato de as inflorescências serem um dreno nutricional muito mais forte do que as folhas, implicando em maior translocação de fotoassimilados para essa região. Com mais alimento ocorre maior desenvolvimento da população; era nítido que as galhas de inflorescências atingiam tamanhos superiores aos observados nas folhas.

Os resultados obtidos permitem concluir que *D. gallaeformans* apresentou estágio de repouso no ciclo de vida (anidrobiose) na fase de juvenil de quarto estágio (J4) e que é possível a sua sobrevivência em material vegetal infectado por longos períodos. A duração do ciclo de vida desde o ovo unicelular até a fase de fêmea reprodutiva foi de 19 dias em média. A população no campo não foi afetada pelos fatores climáticos durante o período avaliado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FRECKMAN, D.; KAPLAN, W. D. T.; VAN GUNDY, S. D. A comparison of techniques for extraction and study of anhydrobiotic nematodes from dry soils. **Journal of Nematology**, v. 9, n. 2, p. 176-181, 1977.
- GOODEY, J. B. *Ditylenchus* and *Anguina*. **Plant Nematology**, London, p. 47-58, 1965.
- GOODEY, T. Observations on *Anguillina millefolii* Goodey, 1932, from galls on the leaves of yarrow, *Achillea millefolium* L. **Journal Heliminthol.**, v. 14, p. 93-108, 1932.
- KAISER, B. A. Economic impacts of non-indigenous species: *Miconia* and the Hawaiian economy. **Euphytica**, v. 148, p. 135–150, 2006.
- MANI, M. S. **Ecology of plant galls**. The Auge: Junk Publishers, 1964. 434 p.
- MEDEIROS, A. C.; LOOPE, L. L.; MCELVANEY, S. Status, ecology, and management of the invasive plant, *Miconia calvescens* DC (Melastomataceae) in the Hawaiian islands. **Records of the Hawaii Biological Survey for 1996**, Bishop Museum Occasional Papers, v. 48, p. 23-36, 1997.
- MEYER, J. Y. **Mecanismos d'invasion de *Miconia calvescens* en Polynesie Français**. Ph.D. Thesis. L'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc. Montpellier, France, 1994.
- MEYER, J. Y. Observations on the reproductive biology of *Miconia calvescens* DC. (Melastomataceae), an alien invasive tree on the islands of Tahiti (South Pacific Ocean). **Biotropica**, v. 30, n. 4, p. 609-624, 1998.
- NORTON, D. N.; NIBLACK, T. L. Biology and ecology of nematodes. In: NICKLE, W. R. (Ed.) **Manual of agricultural nematology**. New York, 1991. p.47-72.
- OLIVEIRA, R. D. L.; BARRETO, R. W.; SANTIN, A. M. A new species of *Ditylenchus* causing galls on the invasive weed *Miconia calvescens*. In: ANNUAL

MEETING OF THE ORGANIZATION OF NEMATOLOGIST OF TROPICAL AMERICA (ONTA), 37., 2005. Viña Del Mar, Chile. **Resumos...** Viña Del Mar, Chile, 2005. 90 p.

OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S. Biologia de *Meloidogine exígua*. I Desenvolvimento embriogenico e efeito da temperatura na embriogenise. **Revista Ceres**, v. 32, n. 5, p. 339-348, 1985.

ORR, C. C.; ABERNATHY, J. R.; HUDSPETH, E. B. *Nothanguina phyllobia*, a nematode parasite of silver-leaf nightshade. **Plant Disease Reporter**, v. 59, p. 416-418, 1975.

PARKER, P. E. Nematodes as biological control agents of weeds. **Microbial control of weeds**. New York: Chapman Hall, 1991. p.58-68.

ROBINSON, A. F.; ORR, C. C.; ABERNATHY, J. R. Distribution of *Nothanguina phyllobia* and its potential as a biological control agent for silver-leaf Nightshade, **Journal of Nematology**, v. 10, n. 4, p. 362-367, 1978.

ROBINSON, A. F.; ORR, C. C.; HEINTZ, C. E. Some factors affecting survival of desiccation by infective juveniles of *Orrina phyllobia*. **Journal of Nematology**, v.16, p. 86-91, 1984.

SEIXAS, C. D. S. **Controle biológico de *Miconia calvescens* (Melastomataceae) com fitopatógenos**. 2002. 123 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) –Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

SIVAKAMUR, C. V. Longevity of *Orrina phyllobia* in leaf galls of *Solanum elaeagnifolium*. **Nematologica**, v. 28, p. 126-127, 1982.

SKINNER, J. A.; ORR, C. C.; ROBINSON, A. F. Histopathogenesis of the galls induced by *Nothanguina phyllobia* in *Solanum elaeagnifolium*. **Journal of Nematology**, v. 12, n. 2, p. 142-150, 1980.

STURHAN, D.; BRZESKI, M. W. Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus spp.* In: NICKLE, W. R. (Ed.) **Manual of Agricultural Nematology**. New York, 1991.p. 423-459.

WATSON, A. K. Biology of *Subanguina picridis*, a potential biological control agent of Russian Knapweed. **Journal of Nematology**, v. 18, n. 2, p. 154-158, 1986.

YUKSEL, H. S. Observations on the life cycle of *Ditylenchus dipsaci* on onion seedlings. **Nematologica**, v. 5, n. 4, p. 289-296, 1960.

## CAPÍTULO 4

### DANOS CAUSADOS POR *Ditylenchus gallaeformans* sp. n., EM PLANTAS DE *Miconia calvescens* (MELASTOMATACEAE)

#### 1. INTRODUÇÃO

*Miconia calvescens* DC (Melastomataceae) é nativa desde o sul do México ao sul do Brasil e norte da Argentina. Fora primeiramente cultivada como planta ornamental na Europa e Ásia por volta do início século XIX e, por volta de 1960, foi introduzida no arquipélago do Havaí (MEDEIROS *et al.*, 1997). A planta adaptou-se muito bem as condições climáticas encontradas nas ilhas do arquipélago e rapidamente disseminou-se, pondo em risco toda a frágil biodiversidade encontrada em ilhas oceânicas (KAISER, 2006). Atualmente, está distribuída pelas quatro principais ilhas do arquipélago e por causa de sua característica agressiva é denominada de “câncer verde” (TAVARES e SANTOS, 2002). Entre as medidas de controle, a que apresenta como melhor alternativa é a introdução de agentes patogênicos por meio de controle biológico clássico (MEDEIROS *et al.*, 1997).

Em 2005, uma nova espécie de nematóide pertencente ao gênero *Ditylenchus* foi constatada em Minas Gerais, causando deformações foliares e galhas sobre folhas, hastes e inflorescências de *M. calvescens* e outras melastomatáceas (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Esta espécie parece apresentar grande potencial para ser utilizado como agente de biocontrole de *M. calvescens*, em virtude da severidade dos danos causados às plantas em condições naturais.

Os organismos capazes de induzir a formação de galhas são considerados efetivos agentes de biocontrole de plantas invasoras, por induzirem a planta a carrear nutrientes de tecidos sadios para as galhas. As galhas atuam como drenos no metabolismo da planta e, conseqüentemente, observa-se redução na dominância das plantas-alvos no ambiente natural após a introdução deste tipo de agente (HARRIS e SHORTHOUSE, 1996). Um exemplo disso são as plantas de *Solanum elaeagnifolium* L. que, quando infectadas por *Ditylenchus phyllobius* (Thorne) Brzeski, apresentam desfolha de até 50 % e redução no desenvolvimento. Tal infecção resulta, também, em um grande número de frutos abortados, o que reduziu a produção de sementes em 75 % (ORR *et al.*, 1975). Em outra invasora, *Acroptilon repens* (L.) DC., inoculada via solo, o porcentual de plantas que desenvolveram galhas na parte aérea chegou a 90%, culminando com a morte de 20 % destas (IVANOVA, 1966).

Os nematóides de parte aérea são inoculados de formas variadas. *D. phyllobius* pode ser inoculado pela aspersão da suspensão de nematóides na parte aérea das plantas (ORR *et al.*, 1975), ou pela incorporação superficial de galhas frescas contendo os nematóides no solo. Neste caso, para que a inoculação tenha sucesso é requerido um período mínimo de 20 horas de umidade elevada após a inoculação (PARKER, 1991). *S. picridis* pode ser inoculado espalhando galhas contendo os nematóides no solo próximo às plantas hospedeiras (IVANOVA, 1966). *D. drepanocercus* Goodey só desenvolveu sintomas em folhas adultas de *M. calvescens* pela deposição da suspensão sobre locais com ferimentos provocados artificialmente nas folhas (SEIXAS, 2002).

Neste capítulo, objetivou-se determinar o método mais adequado de inoculação de *D. gallaeformans* e o dano causado por diferentes níveis de inóculo de *D. gallaeformans* em plantas de *M. calvescens*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Métodos de inoculação de *Ditylenchus gallaeformans*

Usaram-se mudas de *M. calvescens*, obtidas por multiplicação seminífera, com aproximadamente 30 cm de altura. O inóculo foi obtido diretamente de plantas de *M. ibaguensis* naturalmente infectadas. A suspensão com 1.500 nematóides/mL foi obtida pela metodologia descrita no Capítulo 1, item 2. Cada planta foi inoculada com 2 mL da suspensão. Foram testadas cinco formas de inoculação: pulverização da suspensão em toda parte aérea da planta, deposição da suspensão sobre pedaços de algodão distribuídos em folhas adultas, nos primórdios foliares e na axila das folhas, e a aplicação da suspensão no solo. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em duas condições de umidade: câmara de nevoeiro a 26 °C e câmara úmida a 25 °C, por 48 horas; posteriormente, foram transferidas para casa de vegetação. O ensaio foi montado em esquema fatorial 6 x 2 (seis formas de aplicação e dois regimes de umidade), com quatro repetições. A unidade experimental foi constituída por um vaso com uma planta. Aos 120 dias após a inoculação, registrou-se o número total de plantas com sintomas (incidência), e a confirmação da presença dos nematóides. Nesse caso, realizou-se a extração dos nematóides da parte aérea da planta, conforme descrito anteriormente.

## **2.2. Impacto da aplicação de concentrações crescentes de inóculo de *Ditylenchus gallaeformans* em plantas de *Miconia calvescens***

Usaram-se plantas de *M. calvescens* com aproximadamente um ano, provenientes de reprodução seminífera. Efetuou-se poda drástica e, após 60 dias, selecionaram-se dois ramos por planta, com aproximadamente 20 cm de altura. O inóculo foi obtido conforme descrito no Capítulo 1. A inoculação foi realizada pela deposição de 2 mL das suspensões de nematóides sobre pedaços de algodão junto aos primórdios foliares de cada ramo, com auxílio de uma pipeta. Após a inoculação, as plantas foram mantidas por 48 horas em câmara úmida a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas em câmaras de crescimento. Posteriormente, foram transferidas para casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia, onde receberam os tratos culturais necessários ao seu desenvolvimento.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com seis concentrações de inóculo (0, 250, 500, 1.000, 2.000 e 4.000) e cinco repetições. A unidade experimental foi constituída por uma planta com dois ramos.

Foram realizadas seis avaliações com intervalos de 30 dias até os seis meses após a inoculação. Durante este período, avaliou-se a incidência, a severidade e o número de pares de folhas emitidas após a inoculação.

Para avaliar a severidade, desenvolveu-se uma escala diagramática, com diferentes níveis de intensidade dos sintomas típicos, das galhas e deformações do limbo foliar, no intervalo de 1 a 100 % (Figura1). Nas avaliações, determinou-se a severidade em cada entrenó emitido após a inoculação, com a média da severidade nas duas folhas de cada entre nó.

Aos seis meses, cortou-se o ramo acima do ponto de inoculação. Em cada ramo, a região deformada foi recortada, pesada e submetida à extração e contagem dos nematóides, conforme descrito no Capítulo 1. Nos ramos assintomáticos, retirou-se uma amostra representativa, semelhante à área infectada para realizar a extração.

## **2.3. Análise estatística**

Na análise estatística, empregou-se o programa estatístico SAS 9.0. Os valores de severidade, incidência, nematóides/g tecido doente, severidade no par de folhas três,

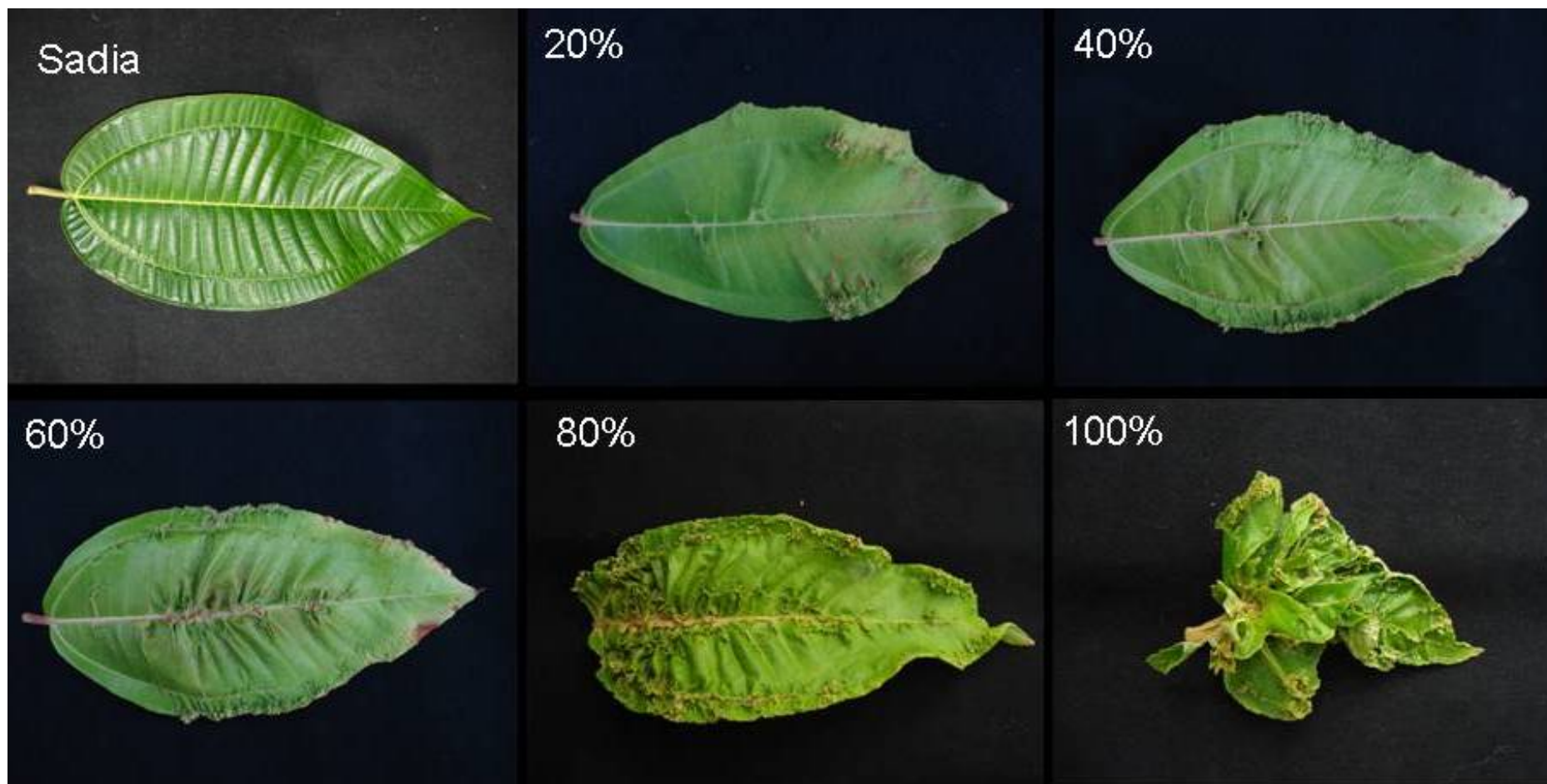


Figura 1 – Diferentes percentuais de severidade apresentados em folhas de *M. calvescens*, inoculadas com *D. gallaeformans*, no ensaio com níveis de inóculo. Fotos exemplificando alguns dos percentuais da área foliar deformada pela infecção do nematóide, utilizados na escala diagramática para avaliação de severidade.

total de folhas emitidas e total de folhas doentes, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e correlação de Pearson.

Efetuiu-se análise de regressão linear dos valores das variáveis descritas acima. Os modelos de regressão foram selecionados com base no coeficiente de determinação e na normalidade e homogeneidade dos resíduos.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Métodos de inoculação de *Ditylenchus gallaeformans***

Entre os métodos testados obteve-se maior incidência com a deposição da suspensão de nematóides sobre pedaços de algodão no primórdio foliar, mantido em câmara úmida. Houve desenvolvimento de sintomas em todos os pontos de inoculação, e confirmou-se a presença do nematóide em todas as repetições deste tratamento. Com a deposição da suspensão de nematóides no primórdio foliar e a pulverização da suspensão de nematóides em plantas mantidas em câmara de nevoeiro obtiveram-se resultados semelhantes, com 75 % de incidência dos sintomas e dos nematóides. Na pulverização da suspensão na planta mantida em câmara úmida obteve-se 50 % de incidência dos sintomas e dos nematóides. Nos demais tratamentos não houve desenvolvimento dos sintomas.

#### **3.2. Impacto da aplicação de concentrações crescentes de inóculo de *Ditylenchus gallaeformans* em plantas de *Miconia calvescens***

Os primeiros sintomas da doença foram observados na primeira avaliação nas plantas inoculadas com o maior nível de inóculo, e na segunda e terceira avaliações nos tratamentos com níveis mais baixos de inóculo. As galhas desenvolveram-se por todo limbo foliar, porém apenas na superfície adaxial da folha. O início de desenvolvimento dos sintomas coincidiu com o período de expansão das folhas novas. Este período foi

decisivo na determinação da área foliar afetada, pois após a expansão das folhas não foram observados novos pontos de infecção, apenas ocorreu aumento de volume das galhas. Inicialmente, as galhas eram vistas como pequenos pontos de coloração clara, e com a evolução dos sintomas, elas adquirem tons avermelhados. Foi comum ocorrer distorção generalizada do limbo foliar com a formação de filódios de até 3 cm de altura, e no nível mais alto de inóculo chegou a ocorrer a paralisação completa do desenvolvimento da região apical dos ramos. As galhas em *M. calvescens* não atingem grandes proporções como em outros hospedeiros, mas são mais numerosas e comumente encontradas nas reentrâncias formadas pelos filódios.

A severidade máxima observada individualmente nas folhas foi de 100% e o valor mínimo foi de 1%, e os valores concentraram-se na faixa de 1 a 20% (Figura 2).

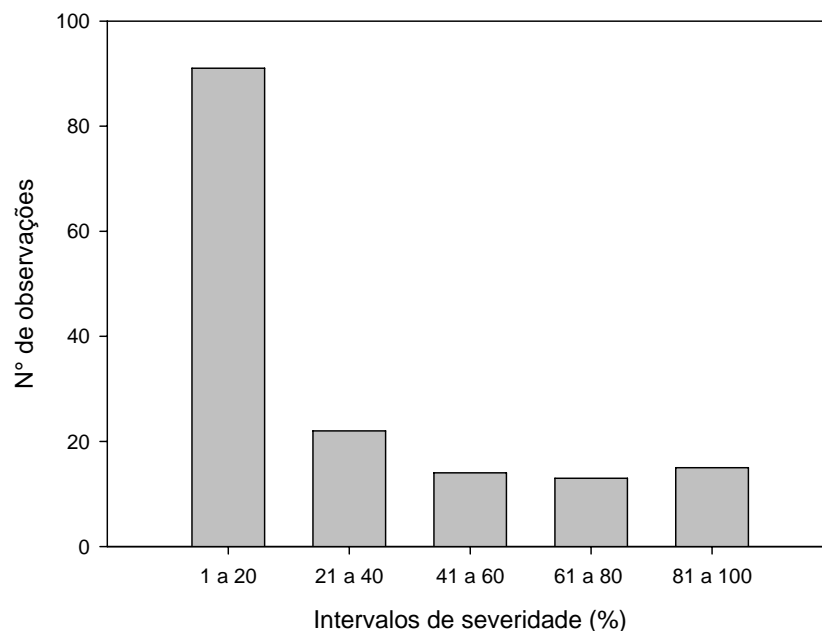


Figura 2 – Frequência observada da severidade dos sintomas em plantas de *Miconia calvescens* inoculadas com diferentes concentrações de inóculo de *Ditylenchus gallaeformans*, durante as avaliações.

Detectou-se efeito significativo ( $P < 0,01$ ) das diferentes concentrações de inóculo, em relação à severidade, incidência, taxa de desenvolvimento da planta e a população de nematóides.

Detectou-se correlação positiva entre severidade, incidência e a população final de nematóides (Tabela 1). Por outro lado, estas variáveis correlacionaram-se negativamente com o crescimento da planta, medida pelo número de folhas emitidas após a inoculação (Tabela 1).

Tabela 1 – Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis estudadas aos 180 dias após a inoculação

	TOTFOL	TFOLS	SEV3	INC	SEV
NNGTD	-0,58	0,70	0,80	0,76	0,85
TOTFOL		- 0,59	- 0,63	- 0,64	- 0,60
TFOLS			0,76	0,99	0,75
SEV3				0,84	0,95
INC					0,83

NNGTD = número de nematóides/grama de tecido doente; TOTFOL = número de pares de folhas emitidas; TFOLS = número de pares de folhas com sintoma; SEV3 = severidade no terceiro par de folhas; INC = incidência; SEV = severidade. Para todas as correlações,  $P < 0,001$ .

A severidade e a incidência foram correlacionadas ( $r = 0,83$ ,  $p < 0,001$ ). A maior severidade média (23,7 %) foi na maior concentração de inóculo, nas demais concentrações de inóculo, a severidade não ultrapassou 5 %. (Figura 3). A severidade aumentou até a terceira avaliação (90 dias após a inoculação). Após este período ela manteve-se praticamente constante, pois após a emissão do quarto par de folhas, não houve desenvolvimento dos sintomas nos pares de folhas seguintes. Portanto, com a avaliação da severidade após 120 dias da inoculação obtêm-se resultados semelhantes. Como a avaliação da população foi realizada somente após os 180 dias, os gráficos das regressões foram todos com base nesta data de avaliação.

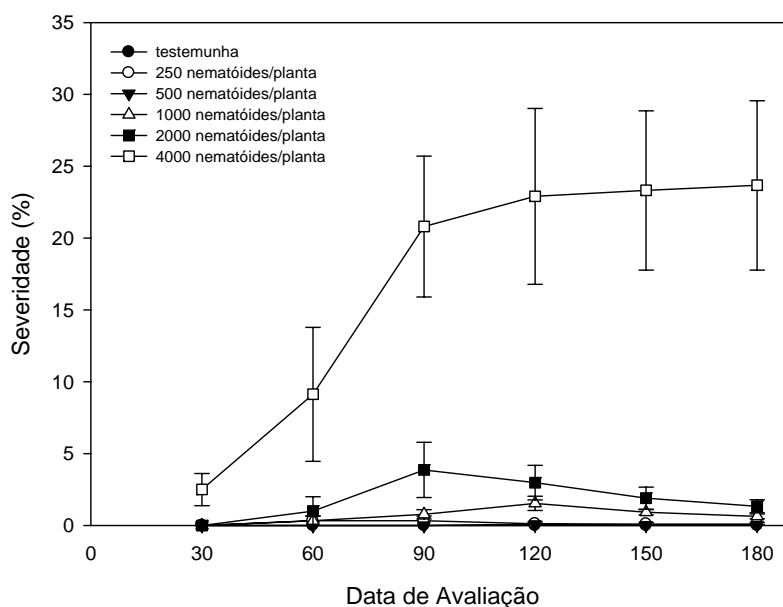


Figura 3 – Severidade (%) obtida com as diferentes concentrações de inóculo de *Ditylenchus gallaeformans*, em plantas de *Miconia calvescens*, ao longo dos seis meses de avaliações. Barras verticais representam o erro padrão da média. Média de cinco repetições.

A incidência aumentou linearmente com o aumento das concentrações de inóculo (Figura 4). A maior incidência, 59,8 % de folhas com sintomas emitidas após a inoculação, ocorreu nas plantas inoculadas com a suspensão de 4.000 nematóides, porém, em todas as concentrações de inóculo ocorreu o desenvolvimento dos sintomas.

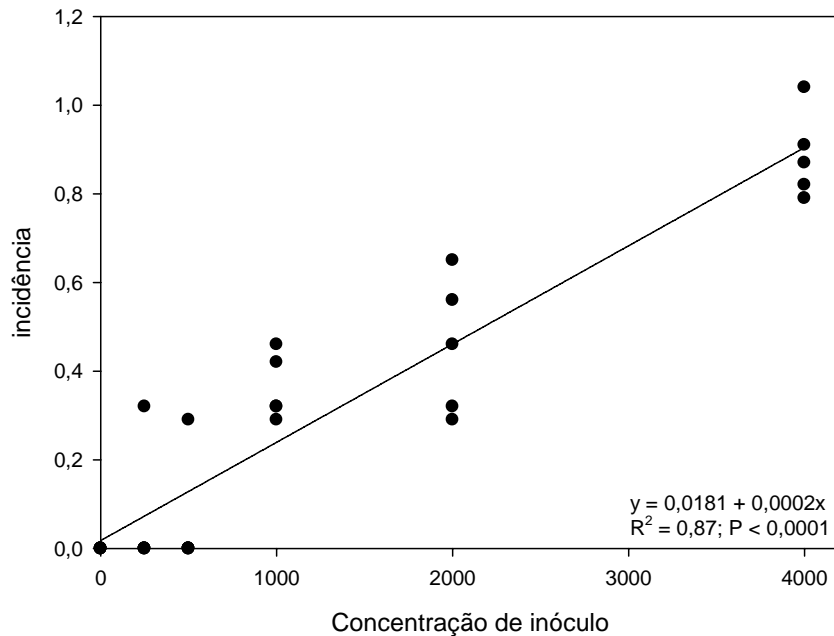


Figura 4 – Incidência dos sintomas de *Ditylenchus gallaeformans* em folhas de *Miconia calvescens*, inoculadas com diferentes concentrações de inóculo, aos 180 dias após a inoculação. Os valores de incidência (%) foram transformados para  $\text{arc sen} (\sqrt{(\text{inc})}/100)$ .

Os maiores valores de incidência e severidade entre os pares de folhas emitidos após a inoculação ocorreram no terceiro par de folhas. A incidência média para todos os tratamentos no terceiro par de folhas foi de 46 % e no maior nível de inóculo foi de 100 %. A severidade média entre todos os tratamentos no terceiro par de folhas foi de 5,98 % e no maior nível de inóculo foi de 50,4 % (Figura 5). O coeficiente de correlação de Pearson (r) entre o terceiro par de folhas e a severidade foi de 0,95 e com a incidência foi de 0,83. Assim, a intensidade de doença no terceiro par de folhas emitido após a inoculação correlaciona-se com a intensidade de doença em toda a planta, sendo, portanto, o ponto que melhor representa o desenvolvimento dos sintomas pelas plantas.

Com o aumento da concentração de inóculo, o crescimento das plantas medido pelo número de folhas emitidas, reduziu, enquanto o número de folhas com sintomas aumentou (Figura 6). No maior nível de inoculo, o número médio de pares de folhas emitidos após a inoculação foi de 4,4 e enquanto na testemunha foi de 5,5.

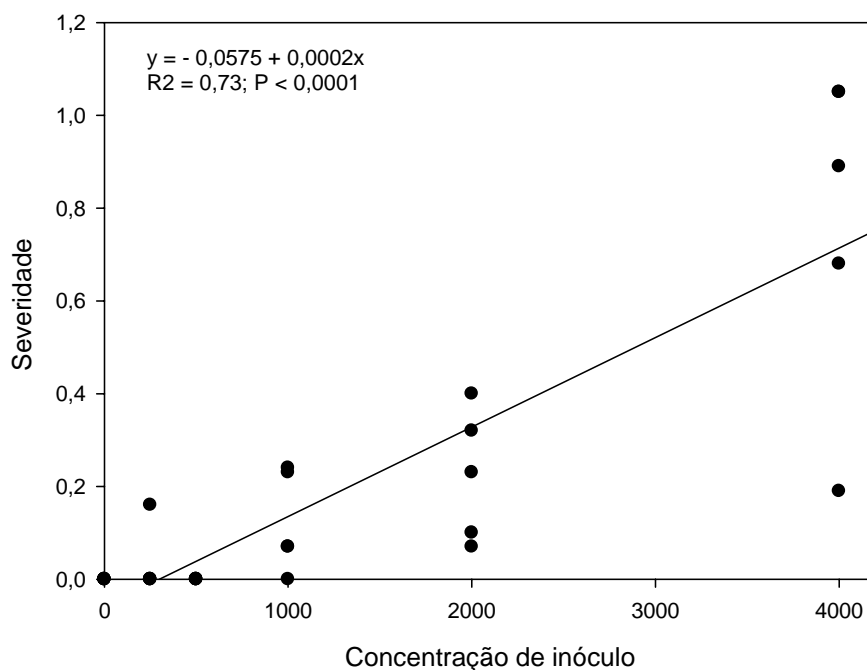


Figura 5 – Severidade no terceiro par de folhas de *Miconia calvescens*, emitido após a inoculação, com diferentes níveis de inóculo, aos 180 dias após a inoculação. Os valores de severidade (%) foram transformados para  $\text{arc sen } \sqrt{(\text{inc})/100}$ .

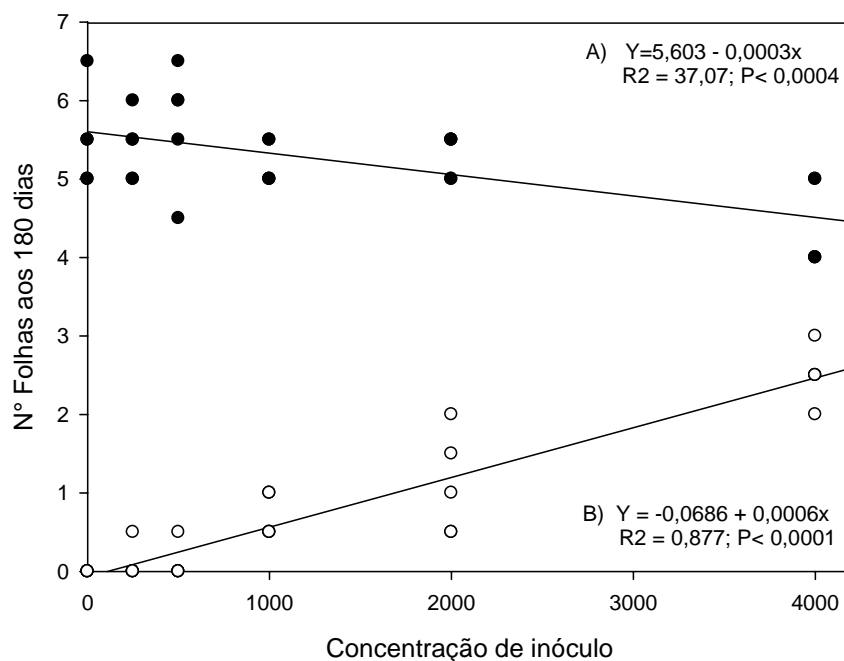


Figura 6 – Relação inversa entre o número de folhas emitidas (A) e o número de folhas com sintoma (B), em plantas de *Miconia calvescens*, aos 180 dias após a inoculação de *Ditylenchus gallaeformans*.

A população de nematóides nas galhas foi influenciada pela concentração de inóculo. O aumento nos níveis de inóculo acarretou em aumento linear no número de nematóides por grama de galha (Figura 7).

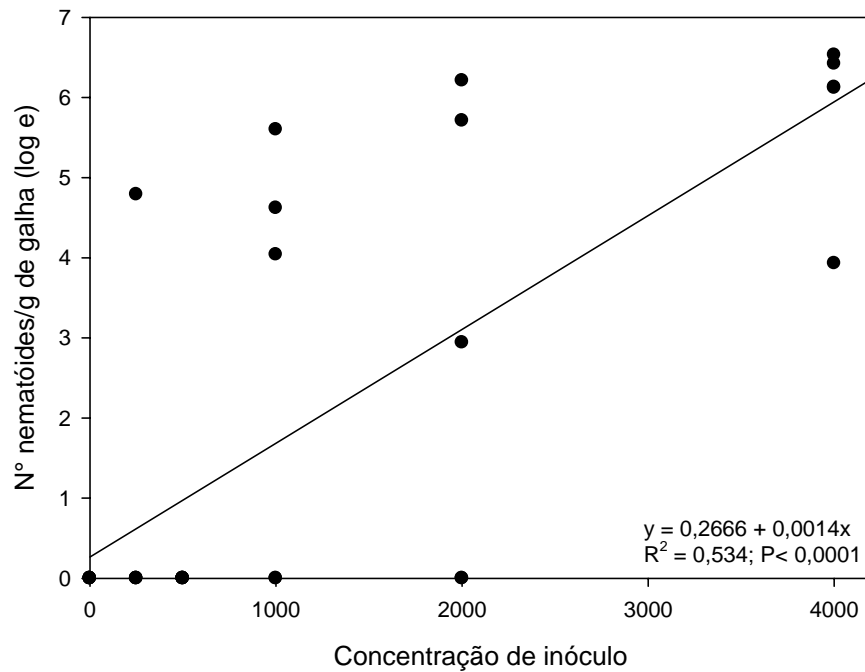


Figura 7 – População de *Ditylenchus gallaeformans* por grama de tecido doente, em plantas de *Miconia calvescens* inoculadas com diferentes níveis de inóculo, aos 180 dias após a inoculação.

## 4. DISCUSSÃO

Em geral, os nematóides de parte aérea são capazes de induzir, em seus hospedeiros, deformações nas folhas e inflorescências a partir da infecção da região meristemática (GODFREY, 1940; ORR *et al.*, 1975; WATSON, 1986). A inoculação de *D. gallaeformans* na região apical dos ramos foi mais eficiente do que em locais distantes desta região, talvez por possibilitar que um número maior de nematóides atinja os sítios de infecção localizados nos primórdios foliares (Capítulo 2). Nestes locais, os nematóides encontram proteção contra a dessecação, por um período de tempo necessário para formação das galhas. Em virtude da conformação dos primórdios foliares é possível a formação de um microclima com umidade elevada, que o protege da dessecação. Este microclima não é formado nas folhas adultas já expandidas, não permitindo que o nematóide se estabeleça nestes locais. Além disto, o tipo de alteração provocada por *D. gallaeformans* é mais propício de ocorrer em regiões meristemáticas encontradas nos primórdios foliares e nos primórdios florais (GODFREY, 1940; SKINNER *et al.*, 1980).

O método de inoculação por deposição da suspensão de nematóides no primórdio foliar mostrou-se mais eficiente em condições controladas. Mas, quando se pensa em aplicações no campo em caso de introduções para o controle biológico, este método impõe uma série de dificuldades, tendo vista que as plantas de *M. calvenscens* podem atingir mais de 10 m de altura, além da necessidade da formação de câmaras úmidas. Em relação a estas dificuldades, o método de pulverização da suspensão de nematóides pode ser considerado de execução mais fácil, porém, é necessária muita

atenção com as condições climáticas, pois este método exigiria um período prolongado de umidade elevada. Parker (1991) relatou que a inoculação de *D. phyllobius* no campo por meio da incorporação superficial de galhas frescas necessita de um período mínimo de 20 horas de umidade elevada após a inoculação.

O desenvolvimento dos sintomas ocorreu em todos os níveis de inóculo testados, mas em níveis abaixo de 1.000 nematóides por planta, a incidência foi muito baixa. À medida que se aumentaram as concentrações de inóculo, a incidência aumentou linearmente, chegando a 100% das plantas, apresentando sintomas quando foram inoculadas com 4.000 nematóides. Acredita-se que sob concentrações elevadas de inóculo um número maior de nematóides se estabeleça nos locais de infecção localizados nos primórdios foliares, o que resulta em maior incidência e severidade da doença. Resultados similares foram observados por Seinhorst (1956) para *D. dipsaci*, onde aumentos da concentração de inóculo inicial resultaram em aumentos dos índices de doença.

A população final de nematóides aumentou linearmente à medida que aumentaram as concentrações de inóculo, indicando que qualquer incremento no inóculo inicial acarreta um incremento na população. Isso leva a crer que níveis maiores de inóculo inicial resultariam em porcentuais maiores de severidade, visto que estas variáveis são muito correlacionadas.

À medida que se aumentaram as concentrações de inóculo houve aumento na incidência de folhas com sintomas e, inversamente, houve diminuição do número de folhas emitidas, caracterizando redução no desenvolvimento das plantas. Isto, possivelmente, se deve ao fato de as galhas serem consideradas um dreno forte de nutrientes, necessários para atender a demanda nutricional dos nematóides ali presentes. Ao induzir a planta a carrear fotoassimilados de outros pontos de crescimento para as galhas, o desenvolvimento normal das plantas fica retardado (HARRIS e SHORTHOUSE, 1996). Este é um fato importante, pois indica que este nematóide pode ser muito efetivo no controle biológico de *M. calvescens*.

No terceiro par de folhas ocorreram os maiores índices de incidência e severidade entre todos os pares de folhas emitidos após a inoculação, e apresentou alta correlação ( $r$ ) com a incidência e severidade observados em toda a planta, o que indica que é o ponto ideal para avaliações destas variáveis. O terceiro par de folhas é emitido em média aos 90 dias após a inoculação, o que reduziria o período de avaliação para futuros experimentos.

A incidência e severidade estiveram muito correlacionadas. Portanto, a avaliação de qualquer uma destas variáveis fornece resultados similares e consistentes. Considerando que a incidência é de mensuração mais fácil e rápida, é a variável ideal para avaliar os danos provocados por *D. gallaeformans* em *M. calvescens*.

Com base nos dados apresentados, conclui-se que o método ideal de inoculação de *D. gallaeformans* é a deposição da suspensão de nematóides nos primórdios foliares, mas considerando a sua aplicação no campo como agente de biocontrole a pulverização da suspensão de nematóides é mais prática. A correlação positiva entre incidência, severidade e população de nematóides simplifica os estudos da interação entre *D. gallaeformans* e *M. Calvescens*, pois a variável incidência é mais fácil de ser avaliada e permite obter informações com alto grau de segurança. O uso do terceiro par de folhas emitido após a inoculação reduz o tempo de avaliação. Os danos provocados as plantas de *M. calvescens* inoculadas com *D. gallaeformans* comprovam o potencial deste nematóide como agente de biocontrole.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GODFREY, G. H. Ecological specialization in the stem and bulb infesting nematode, *Ditylenchus dipsaci* var. *amsinckiae*. **Phytopathology**, v. 30, p. 41-54, 1940.

HARRIS, P.; SHORTHOUSE, J.D. Effectiveness of galls inducers in weed biological control. **The Canadian Entomologist**, v. 128, p. 1021-1055, 1996.

IVANOVA, T. S. Biological control of mountain bluet (*Acroptilon picris* C.A.M.). (In Russian) **Izvestiya Akademii Nauk Tadzhikskoi SSR**, v. 2, p. 51-63, 1966.

KAISER, B. A. Economic impacts of non-indigenous species: *Miconia* and the Hawaiian economy. **Euphytica**, v. 148, p. 135-150, 2006.

MEDEIROS, A. C.; LOOPE, L. L.; MCELVANEY, S. Status, ecology, and management of the invasive plant, *Miconia calvescens* DC (Melastomataceae) in the Hawaiian Islands. Records of the Hawaii Biological Survey for 1996. **Bishop Museum Occasional Papers**, v. 48, p. 23-36, 1997.

OLIVEIRA, R. D. L.; BARRETO, R. W.; SANTIN, A. M. A new species of *Ditylenchus* causing galls on the invasive weed *Miconia calvescens*. In: ANNUAL MEETING OF THE ORGANIZATION OF NEMATOLOGIST OF TROPICAL AMERICA (ONTA), 37., 2005. Viña Del Mar, Chile. **Resumos**, Viña Del Mar, Chile, 2005. 90 p.

ORR, C. C.; ABERNATHY, J. R.; HUDSPETH, E. B. *Nothanguina phyllobia*, a nematode parasite of silver-leaf nightshade. **Plant Disease Reporter**, v. 59, p. 416-418, 1975.

PARKER, P. E. Nematodes as biological control agents of weeds. **Microbial Control of Weeds**. New York: Chapman Hall, 1991. p. 58-68.

SEINHORST, J. W. Population studies on stem eelworms (*Ditylenchus dipsaci*). **Nematologica**, v. 1, n. 2, p. 159-164, 1956.

SEIXAS, C. D. S. **Controle biológico de *Miconia calvescens* (Melastomataceae) com fitopatógenos.** 2002. 123 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

SKINNER, J. A.; ORR, C. C.; ROBINSON, A. F. Histopathogenesis of the galls induced by *Nothanguina phyllobia* in *Solanum elaeagnifolium*. **Journal of Nematology**, v. 12, n. 2, p. 142-150, 1980.

TAVARES, K.; SANTOS, G. **Big island invasive species committee emergency environmental workforce hilo.** April 15, 2002, Hilo, HI: Operation Miconia, 2002. (Final Report).

WATSON, A. K. Biology of *Subanguina picridis*, a potential biological control agent of Russian Knapweed. **Journal of Nematology**, v. 18, n. 2, p. 154-158, 1986.

## CONCLUSÕES GERAIS

1. A gama de hospedeiros de *D. gallaeformans* foi restrita a plantas da família Melastomataceae, aos gêneros *Miconia*, *Leandra* e *Clidemia*; entre estes, o gênero *Miconia* foi o mais suscetível.

2. O nematóide infectou e induziu sintomas em plantas de *M. calvescens* tanto no biótipo encontrado no Brasil como no do Havaí.

3. *D. gallaeformans* tem hábito de parasitismo de um ectoparasita migrador.

4. As galhas foliares induzidas pelo nematóide têm origem na hiperplasia de células do meristema fundamental nos primórdios foliares.

5. A formação das galhas, sob condições de inoculação, só foi possível pela infecção dos nematóides nos primórdios foliares.

6. *D. gallaeformans* apresentou estágio de repouso no ciclo de vida (anidrobiose), na fase de juvenil de quarto estágio (J4) e a sua sobrevivência em material vegetal infectado por longos períodos foi observada.

7. A duração do ciclo de vida desde o ovo unicelular até a fase de fêmea reprodutiva foi em média de 19 dias.

8. A população no campo não foi afetada pelos fatores climáticos durante o período avaliado.

9. O método ideal de inoculação de *D. gallaeformans* foi a deposição da suspensão de nematóides nos primórdios foliares, mas considerando a sua aplicação no campo como agente de biocontrole, a pulverização é a mais prática, mesmo sendo menos eficiente.

10. A correlação positiva entre incidência, severidade e população de nematóides simplifica os estudos da interação entre *D. gallaeformans* e *M. Calvescens*, pois a variável incidência é mais fácil de ser avaliada e permite obter informações com alto grau de segurança.

11. Os impactos provocados por *D. gallaeformans* sobre plantas de *M. calvescens* comprovam o potencial deste nematóide como agente de biocontrole.