

Artigos

Falha na adaptabilidade (<i>fitness</i>) de <i>Meloidogyne incognita</i> ao cafeeiro. – Oliveira, D.S., R.D.L. Oliveira, D.G. Silva & R.V. Silva	207
Caracterização da variabilidade genética de populações do nematoide de cisto da soja coletadas na região de Jataí (GO). – Figueiredo, A., R.O. França & M.A. Santos	212
Diagnose de <i>Aphelenchoides fragariae</i> e <i>Pratylenchus</i> spp. através da aplicação da tecnologia do código de barras do DNA. – Oliveira, C.M.G., A.C.Z. Machado, R.K. Kubo, & R. Harakava	218
Expressão de Genes Envolvidos na Resistência da Soja a <i>Meloidogyne javanica</i> . – Morales, A.M.A.P, E.G.M. Lemos, R. Fuganti, S.R.R. Marin, F.C. Marcelino, J.F.V. Silva, A.A. Pereira & A.L. Nepomuceno	226
Reação de espécies de plantas daninhas a <i>Meloidogyne incognita</i> raças 1 e 3, a <i>M. javanica</i> e a <i>M. paranaensis</i> . – Mônico A.P.A., R.G. Carneiro, W.M. Kranz, J.C. Gomes, A. Scherer & D.C. Santiago	235

Comunicações Científicas

Avaliação comparativa da agressividade de <i>Meloidogyne javanica</i> e <i>M. incognita</i> à variedade SP 911049 de cana-de-açúcar. – Barbosa, B.F.F., J.M.dos Santos, P.L.M. Soares & J.C. Barbosa	243
Reação de <i>Coffea</i> spp. a <i>Meloidogyne mayaguensis</i> . – Alves, G.C.S., E.J. de Almeida & J.M. dos Santos	248
Reação de diferentes frutíferas a <i>Meloidogyne ethiopica</i> . – Somavilla, L., C.B. Gomes, L.E.C. Antunes, R.P. de Oliveira & R.M.D.G. Carneiro	252
Screening of cherry tomato genotypes for resistance to <i>Meloidogyne incognita</i> and <i>M. javanica</i> . – Belan, L.L., S.O. Fonseca, F.R. Alves, W.C. Jesus Júnior, F.P. Matta, P.D.S. Cabral, L.K.C. Rabello & A.A.Rodrigues.....	256
Utilização de produtos alternativos no manejo de nematoides da cana-de-açúcar no estado de Pernambuco. – Chaves, A., S.R.V.L. Maranhão, L.M.P. Guimarães, E.M.R. Pedrosa & M. K. R.S. Oliveira	260

Articles

Failure of fitness of *Meloidogyne incognita* to coffee plants. – Oliveira, D.S., R.D.L. Oliveira, D.G. Silva & R.V. Silva 207

Characterization of the genetic variability in populations of the soybean cyst nematode collected in the region of Jataí (GO), Brazil. – Figueiredo, A., R.O. França & M.A. Santos 212

Aphelenchoides fragariae and *Pratylenchus* spp. diagnosis through application of DNA barcode technology. – Oliveira, C.M.G., A.C.Z. Machado, R.K. Kubo, & R. Harakava 218

Expression of genes related to resistance of soybean to *Meloidogyne javanica*. – Morales, A.M.A.P, E.G.M. Lemos, R. Fuganti, S.R.R. Marin, F.C. Marcelino, J.F.V. Silva, A.A. Pereira & A.L. Nepomuceno 226

Reaction of weed species to *Meloidogyne incognita* races 1 and 3, *M. javanica* and *M. paranaensis*. – Mônico A.P.A., R.G. Carneiro, W.M. Kranz, J.C. Gomes, A. Scherer & D.C. Santiago 235

Brief Communications (*: with text in English)

Evaluation of comparative aggressiveness of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* on sugarcane variety SP 911049. – Barbosa, B.F.F., J.M.dos Santos, P.L.M. Soares & J.C. Barbosa 243

Reaction of *Coffea* spp. to *Meloidogyne mayaguensis*. – Alves, G.C.S., E.J. de Almeida & J.M. dos Santos 248

Reaction of different fruit crops to *Meloidogyne ethiopica*. – Somavilla, L., C.B. Gomes, L.E.C. Antunes, R.P. de Oliveira & R.M.D.G. Carneiro 252

* Screening of cherry tomato genotypes for resistance to *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. – Belan, L.L., S.O. Fonseca, F.R. Alves, W.C. Jesus Júnior, F.P. Matta, P.D.S. Cabral, L.K.C. Rabello & A.A.Rodrigues..... 256

Use of alternative products in the management of sugarcane nematodes in Pernambuco State, Brazil. – Chaves, A., S.R.V.L. Maranhão, L.M.P. Guimarães, E.M.R. Pedrosa & M. K. R.S. Oliveira 260

Falha na Adaptabilidade (*Fitness*) de *Meloidogyne incognita* ao Cafeeiro*

Dagoberto S. Oliveira¹, Rosângela D.L. Oliveira^{2**}, Débora G. Silva² & Rodrigo V. Silva²

*Parte da Tese de Doutorado em Fitopatologia do primeiro autor, Universidade Federal de Viçosa (MG) Brasil.

¹Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Ceará, Av. Bezerra de Menezes, 1820, 60325-901 Fortaleza (CE) Brasil.

²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa (MG) Brasil.

**Autora para correspondência: rdlima@ufv.br

Recebido para publicação em 28 / 05 / 2008. Aceito em 25 / 05 / 2009

Editado por Mário Inamoto

Resumo - Oliveira, D.S., R.D.L. Oliveira, D.G. Silva & R.V. Silva. 2009. Falha na adaptabilidade (*fitness*) de *Meloidogyne incognita* ao cafeeiro.

No Brasil, *Meloidogyne incognita* é considerada uma das espécies de fitonematoides mais prejudiciais ao cafeeiro, mas uma população mantida em tomateiro por dois anos mostrou reduzida reprodução em cafeeiro. Não se sabe se essa capacidade adaptativa ocorreria da mesma forma e ao mesmo tempo para outras populações desse nematoide. Avaliar quando outras populações de *M. incognita* oriundas de cafeeiro começam a perder a habilidade reprodutiva ou *fitness* depois de sucessivas gerações em outro hospedeiro foi o objetivo desse trabalho. Duas populações (raças 1 e 2) de *M. incognita* patogênicas ao cafeeiro foram multiplicadas sucessivamente em tomateiro e cafeeiro por 30 meses, para avaliação trimestral de sua capacidade reprodutiva em cafeeiro. No primeiro ano, não houve alteração da reprodução das populações independentemente do hospedeiro no qual foram mantidas. Após 450 dias em tomateiro, a população da raça 1 apresentou redução de 80 % na capacidade reprodutiva em cafeeiro, mas para a raça 2 foram necessários 540 dias. A redução média da capacidade reprodutiva em cafeeiro, a partir de 15 meses para a raça 1 e 18 meses para a raça 2, foi de 92 % e se manteve similar até os 30 meses de multiplicação em tomateiro. Assim, indivíduos patogênicos ao cafeeiro continuaram presentes, embora em baixa proporção, até a última avaliação. Houve diferença entre as populações apenas aos 450 dias de multiplicação em tomateiro, quando o FR foi de 2,34 e 6,17, respectivamente para as raças 1 e 2. Variação na capacidade adaptativa ou *fitness* de populações de *M. incognita* foi confirmada e a redução na capacidade de parasitar o cafeeiro iniciou-se logo após o primeiro ano.

Palavras-chaves: adaptabilidade, *Coffea arabica*, *fitness*, nematoide-das-galhas, seletividade.

Summary - Oliveira, D.S., R.D.L. Oliveira, D.G. Silva & R.V. Silva. 2009. Failure of fitness of *Meloidogyne incognita* to coffee plants.

In Brazil, *Meloidogyne incognita* is considered one of the most aggressive nematode species to coffee, but a population maintained for two years on tomato has exhibited reduced reproduction on coffee. The point is if this fitness would occur in a same way and at the same time for other populations. The aim of this work was to evaluate when other populations of *M. incognita* collected from coffee plants start to lose reproductive fitness after successive generations on tomato. Two *M. incognita* populations (races 1 and 2), both pathogenic to coffee, were successively multiplied on tomato or coffee during 30 months, in order to evaluate their reproduction on coffee every 90 days. In the first year, the reproduction of both populations showed no change, independent of the host. During the 450 days of multiplication on tomato, the race 1 presented reduction about 80 % in reproductive fitness on coffee, but 540 days were necessary for the race 2. After 15 months for race 1 and 18 months for race 2, the mean reduction of the reproductive ability on coffee was about 92 % and persisted until the end of the assay. Thus, specimens pathogenic to the coffee were present in low ratio until the last evaluation. There was difference between the races only on the 450 days of multiplication on tomato, when the reproduction

factor (RF) was 2.34 and 6.17 to the races 1 and 2, respectively. Variation on reproductive fitness of *M. incognita* populations was confirmed and the reduction in the ability of parasitizing coffee plants has started just after the first year.

Key words: adaptability, *Coffea arabica*, fitness, root-knot nematodes, selectivity.

Introdução

Termos como patogenicidade, virulência, *fitness*, dentre outros, não são de consenso entre pesquisadores quanto ao significado e à utilização na caracterização da interação planta-patógeno. Além disso, em determinados casos específicos, faltam denominações apropriadas para classificar essa interação. No presente trabalho, esses termos serão utilizados de acordo com os conceitos clássicos da patologia de plantas e já usados para fitonematoides por Trudgill (1991) e Castagnone-Sereno *et al.* (2007). Um microrganismo é dito patogênico quando é capaz de causar doença num hospedeiro (Trudgill, 1991) e é virulento quando é capaz de induzir uma resposta suscetível na planta hospedeira que possui um determinado gene de resistência (Shaner *et al.*, 1992). *Fitness* é definido como a habilidade de um organismo sobreviver e reproduzir em seu hospedeiro, ou seja, capacidade de passar os seus genes para a próxima geração, e é considerado um fator chave para a coevolução de um patossistema (Holliday, 2001).

Meloidogyne incognita é considerada uma das espécies de nematoides das galhas mais prejudiciais ao cafeeiro (*Coffea* spp.). Sua elevada capacidade reprodutiva, ampla gama de hospedeiros (Roberts, 1995), alta persistência no solo (Rebel *et al.*, 1976), existência de raças fisiológicas (Hartman & Sasser, 1985) e o hábito de infectar a raiz principal do cafeeiro (Lordello & Mello Filho, 1970) dificultam o seu controle. A reprodução de *M. incognita* ocorre por partenogênese mitótica obrigatória, o que teoricamente deveria manter forte estabilidade genética. Contudo, grande variabilidade genética é observada nessa espécie, o que reflete na habilidade de reprodução em espécies vegetais distintas (Triantaphyllou, 1987). A identificação da variabilidade em *M. incognita* culminou com a detecção de quatro raças fisiológicas (Hartmann & Sasser, 1985), contudo as raças não revelaram toda a variação fisiológica dessa espécie. Triantaphyllou (1987) sugeriu que mutações em indivíduos de *M. incognita*

estivessem envolvidas na mudança de fenótipo de avirulência para o de virulência a tomateiro com gene *Mi*. Estudos foram intensificados após a constatação da capacidade de populações suplantarem a resistência conferida pelo gene *Mi* em tomateiro (Roberts, 1995; Williamson, 1998). De acordo com a resposta de tomateiros resistentes, as populações de *M. incognita* puderam ser divididas em três grupos: **(i)** populações avirulentas que são incapazes de se reproduzir em tomateiros com gene *Mi*, mesmo quando submetidas a pressão de seleção por esse gene (Castagnone-Sereno *et al.*, 1994); **(ii)** populações avirulentas que, ao serem submetidas à pressão pelo gene *Mi*, tornam-se virulentas (Semblat *et al.*, 2000); e **(iii)** populações designadas “naturalmente virulentas”, que se reproduzem em tomateiro portador do gene em proporções equivalentes às cultivares suscetíveis (Roberts, 1995). Vale salientar que nenhuma relação foi observada entre esses três grupos e as raças propostas pelo “International Meloidogyne Project”.

Populações de *M. incognita* incapazes de infectar o cafeeiro (*C. arabica*) são amplamente disseminadas em Minas Gerais (MG) e foram relatadas por Oliveira *et al.* (2002). Esses autores avaliaram a penetração e reprodução de populações selecionadas nas quatro raças de *M. incognita* nas cultivares Catuaí e Mundo Novo. Apesar de ter ocorrido penetração de juvenis de segundo estágio nas raízes dos cafeeiros, nenhuma reprodução foi observada, mesmo quando 100.000 ovos por planta foram inoculados. Populações de *M. incognita* infectivas ao cafeeiro também já foram detectadas no sul de Minas Gerais e no Triângulo Mineiro, mas não eram populações nativas, uma vez que foram introduzidas com mudas infectadas oriundas de locais sabidamente contaminados com esse nematoide (Campos & Melles, 1982; Guerra Neto & D’Antônio, 1984).

O cafeeiro é cultivado em MG desde o século XIX e nenhum biótipo de *M. incognita* foi selecionado devido à pressão exercida pelo cultivo contínuo desse

hospedeiro, mas o contrário já foi observado em condições controladas. Por outro lado, Carneiro & Jorge (2001) relataram significativa redução na capacidade reprodutiva de *M. incognita* e *M. paranaensis* em cafeeiro após dois anos de multiplicação em tomateiro. O questionamento é se a capacidade reprodutiva do nematoide se reduziria antes desse período e se ocorreria da mesma forma com outras populações. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo verificar a partir de quando populações de *M. incognita* oriundas de cafeeiro começam a perder a habilidade reprodutiva (*fitness*) depois de sucessivas gerações em tomateiro.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (MG). Foram utilizadas mudas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* ‘Santa Cruz Kada’), mudas de cafeeiro (*C. arabica* ‘Catuaí Vermelho IAC 44’) e duas populações de *M. incognita* coletadas em cafeeiro no Estado de São Paulo, que foram denominadas população de ‘tomateiro’ e de ‘cafeeiro’, conforme manutenção nesses hospedeiros. As duas populações exibiram os fenótipos EST I1 e MDH N1 (Davis, 1964; Ornstein, 1964) e amplificaram o mesmo fragmento Scar-Café de DNA de 399 pb (Randig *et al.*, 2002). Fisiologicamente foram caracterizadas como raças 1 e 2, confirmando a identidade do patógeno como de *M. incognita* (Hartman & Sasser, 1985).

Os ovos de *M. incognita* foram extraídos segundo

o método de Boneti & Ferraz (1981). Foram inoculados 10 ml por planta, por meio de suspensão calibrada para 1.000 ovos por ml de água. O inóculo de cada população foi multiplicado em mudas de cafeeiro ou tomateiro; no caso dos tomateiros, as plantas foram substituídas a cada seis meses. Em intervalos de 90 dias, durante 30 meses, extraíram-se ovos de cada hospedeiro e estes foram inoculados em cafeeiros com dois pares de folhas completamente desenvolvidas. As avaliações foram realizadas a cada 90 dias após a inoculação, pela quantificação do número de ovos por sistema radicular de cafeeiro. Essa variável foi utilizada para a determinação do fator de reprodução (FR) conforme Oostenbrink (1966). O experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 10 (quatro populações e dez épocas de avaliação), com dez repetições por tratamento. Os dados foram transformados em \sqrt{x} e submetidos à análise de variância; as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade; essa análise foi realizada com auxílio do programa SAEG versão 9.1 (SAEG, 2007).

Resultados e Discussão

Interação significativa ($P \leq 0,05$) foi observada entre população do nematoide e época de avaliação. As populações de *M. incognita*, raças 1 e 2, quando multiplicadas em cafeeiro, mantiveram a habilidade reprodutiva, mas a perderam após sucessivas gerações em tomateiro (Tabela 1). Foram necessários 450 dias de multiplicação em tomateiro para redução

Tabela 1 - Valores médios do número de ovos (NO) e fator de reprodução (FR) de populações de *Meloidogyne incognita* em sistema radicular de cafeeiro, após multiplicação contínua do inóculo por 90 a 900 dias em cafeeiro ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ ou tomateiro ‘Santa Cruz Kada’, em casa de vegetação.

		Tempo de multiplicação (dias)									
		90	180	270	360	450	540	630	720	810	900
Cafeeiro											
Raça 1	NO	114.400 Aa	81.680 Aa	66.620 Aa	83.400 Aa	126.400 Aa	78.120 Aa	103.180 Aa	97.260 Aa	81.360 Aa	105.940 Aa
	FR	11,44	8,17	6,66	8,34	12,64	7,81	10,32	9,73	8,14	10,59
Raça 2	NO	91.200 Aa	108.960 Aa	51.680 Aa	58.480 Aa	114.400 Aa	94.900 Aa	87.200 Aa	105.300 Aa	74.890 Aa	76.250 Aa
	FR	9,12	10,90	5,17	5,85	11,44	9,49	8,72	10,53	7,49	7,63
Tomateiro											
Raça 1	NO	82.530 Aa	72.600 Aa	74.320 Aa	53.450 Aa	23.450 Bb	16.380 Bb	3.920 Bb	5.540 Bb	2.720 Bb	7.120 Bb
	FR	8,25	7,26	7,43	5,34	2,35	1,64	0,39	0,55	0,27	0,71
Raça 2	NO	137.500 Aa	98.530 Aa	65.430 Aa	71.620 Aa	61.740 Aa	24.460 Bb	4.207 Bb	3.800 Bb	6.900 Bb	8.960 Bb
	FR	13,75	9,85	6,54	7,16	6,17	2,45	0,42	0,38	0,69	0,90

¹Média de dez repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

significativa ($P \leq 0,05$) - aproximadamente 72 % na produção de ovos pela população de tomateiro da raça 1; a redução atingiu 95 % aos 630 dias, mantendo nível similar de redução até 900 dias. Já para a raça 2, redução significativa ($P \leq 0,05$) de 82 % ocorreu aos 540 dias, atingindo 97 % aos 630 dias.

No primeiro ano de avaliação, não houve alteração na capacidade reprodutiva das populações, independentemente do hospedeiro no qual foram mantidas, e os FR variaram de 5,17 a 13,75. A partir de 630 dias de cultivo, os FR das populações de tomateiro foram inferiores a 1. Merece ser destacado o fato de que o cafeeiro 'Catuaí' seria classificado como mau hospedeiro ($FR < 1$), segundo critério de Seinhorst (1967) citado por Moura (1997), se avaliado a partir de inóculo mantido 630 dias em tomateiro. Na verdade, essa cultivar é sabidamente boa hospedeira de *M. incognita*, razão pela qual é utilizada como padrão de suscetibilidade em avaliações de fontes de resistência em cafeeiro.

O fenômeno de seletividade do hospedeiro, com redução da capacidade reprodutiva, já foi verificado em populações de *M. incognita* a diferentes hospedeiros. No entanto, a maioria dos trabalhos foi realizada em hospedeiros que possuíam genes de resistência. Por exemplo, Roberts *et al.* (1995) multiplicaram populações de *M. incognita* virulentas ao feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) resistente (gene *Rk*) por 20 gerações em tomateiro. Após esse período verificaram diminuição de 82 % no FR em caupi. Recentemente, Roese *et al.* (2007) observaram, em raízes de cafeeiros, que a reprodução de populações de *M. paranaensis* coletadas e multiplicadas em soja foi inferior àquelas coletadas e mantidas em cafeeiro.

Populações de *M. incognita* raça 2 e *M. paranaensis* oriundas de cafeeiro foram multiplicadas durante dois anos em tomateiro por Carneiro & Jorge (2001). Após esse período, as populações foram inoculadas em mudas de cafeeiro e verificou-se redução significativa na reprodução dos nematoides, observação confirmada no presente estudo. Segundo Carneiro & Jorge (2001), essas populações são polimórficas nos *loci* de virulência, de maneira que reinoculações sucessivas em tomateiro selecionaram ao longo do tempo indivíduos patogênicos a essa planta, mas não patogênicos ao cafeeiro. Isto sugere

que a manutenção da virulência ao cafeeiro tenha um custo na adaptabilidade ou *fitness*, ocorrendo eliminação de indivíduos virulentos ao cafeeiro se as populações são multiplicadas em tomateiro ou outro hospedeiro. O mecanismo pelo qual esse fenômeno ocorre não é conhecido, mas possivelmente perdas e rearranjos de segmentos cromossômicos, níveis de poliploidia, elementos transponíveis e mutações influenciem na virulência e na adaptabilidade, e conseqüentemente, na gama de hospedeiros (Roberts, 1995; Castagnone-Sereno *et al.*, 2007).

No presente estudo foram necessárias de 15 a 18 gerações em tomateiro para que as populações de *M. incognita* perdessem significativamente a capacidade reprodutiva em cafeeiro. Indivíduos com habilidade de infectar o cafeeiro continuaram presentes, porém em baixa proporção, até a última avaliação (30 meses).

Da mesma forma, a seleção para virulência em populações de *M. incognita* acarretou prejuízos na sua adaptabilidade ao tomateiro suscetível (sem gene *Mi*). Castagnone-Sereno *et al.* (1992) verificaram que populações de *M. incognita*, virulentas a tomateiro resistente (com gene *Mi*) e selecionadas em condições controladas, tiveram sua capacidade de reprodução diminuída em plantas de pimentão (*Capsicum annuum*) e tomateiro suscetível. Os autores especularam que tal mudança poderia ser o resultado de uma possível perda de cromossomo(s), fato conhecido em patógenos que tiveram sua gama de hospedeiros reduzida.

Os resultados do presente estudo são importantes para orientar programas de melhoramento que visam à seleção de cafeeiros resistentes a *Meloidogyne* spp. A avaliação dos genótipos de cafeeiro é feita com inóculo proveniente de tomateiro, porém o ideal seria a utilização de inóculo proveniente do próprio cafeeiro. Como alternativa, sugere-se que as populações sejam mantidas por poucas gerações em tomateiro (cerca de um ano).

Literatura Citada

- BONETI, J.I.S. & S. FERRAZ. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, 6 (3): 553.
- CAMPOS, V.P. & C.C.A. MELLES. 1982. Ocorrência e distribuição de espécies de *Meloidogyne* em cafezais dos

- Campos das Vertentes e do Sul de Minas. Nematologia Brasileira, 11: 233.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & C.L. JORGE. 2001. Seletividade fisiológica de populações de *Meloidogyne incognita* e *M. paranaensis* quando multiplicadas durante sucessivas gerações em tomateiro e cafeeiros. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, II, Vitória. Resumos, p. 1.205-1.209.
- CASTAGNONE-SERENO, P., M. BONGIOVANNI & A. DALMASSO. 1992. Differential expression of root-knot resistance genes in tomato and pepper: evidence with virulent and avirulent near-isogenic lineages. *Annals of Applied Biology*, 120 (3): 487-492.
- CASTAGNONE-SERENO, P., E. WAJNBERG, M. BONGIOVANNI, F. LEROY & A. DALMASSO. 1994. Reproduction of virulent isolates of *Meloidogyne incognita* on susceptible and *Mi*-resistant tomato. *Journal of Nematology*, 26 (3): 324-328.
- CASTAGNONE-SERENO, P., M. BONGIOVANNI & E. WAJNBERG. 2007. Selection and parasite evolution: a reproductive fitness cost associated with virulence in the parthenogenetic nematode *Meloidogyne incognita*. *Evolutionary Ecology*, 21: 259-270.
- CASWELL, E.P. & P.A. ROBERTS. 1987. Nematode population genetics. In: VEECH, J.A. & D. DICKSON (ed). *Vistas on Nematology*. Society of Nematologists, Hyattsville (MD) EUA, p. 390-397.
- DAVIS, B.J. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121: 404-427.
- GUERRA NETO, E.G. & A.M. D'ANTÔNIO. 1984. Nematóides parasitas em lavouras cafeeiras do sul de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA CAFEIEIRA, XI, Londrina. Resumos, p. 171.
- HARTMAN, K.M. & J.N. SASSER. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: BARKER, K.R., C.C. CARTER & J.N. SASSER (ed). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. North Carolina State University, Raleigh, p. 69-77.
- HOLLIDAY P. 2001. *A Dictionary of Plant Pathology*. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- LORDELLO, L.G.E & A.T. MELLO FILHO. 1970. Mais um nematóide ataca o cafeeiro. *Revista de Agricultura*, 45: 102.
- MOURA, R.M. 1997. O gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose - parte II. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 5: 281-315.
- OLIVEIRA, D.S., R.D.L. OLIVEIRA, R.V. SILVA & A.A. PEREIRA. 2002. Ausência de genes de virulência em raças de *Meloidogyne incognita* ao cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 27 (Supl.): 193.
- OOSTENBRINK, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mendedeligen Landbouwhogeschool Wageningen*, 66:1- 46.
- ORNSTEIN, L. 1964. Disc electrophoresis - I. Background and theory. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121: 321-349.
- RANDIG, O., M. BONGIOVANNI, R.M.D.G. CARNEIRO & P. CASTAGNO-SERENO. 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome*, 45: 862.
- REBEL, E.K., A. JAEHN & A.S. VIANNA. 1976. Testes de sobrevivência do nematóide *Meloidogyne incognita* em solo, na ausência de plantas hospedeiras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, IV, Caxambu. Resumos, p. 85.
- ROBERTS, P.A. 1995. Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 33: 199-221.
- ROESE, A.D., R.D.L. OLIVEIRA & D.S. OLIVEIRA. 2007. Variabilidade fisiológica em populações de *Meloidogyne paranaensis*. *Fitopatologia Brasileira*, 32 (1): 40-43.
- SAEG. 2007. Sistema para Análises Estatísticas - Versão 9.1. Fundação Arthur Bernardes – Universidade Federal de Viçosa (MG).
- SEMBLAT, J.P., M. BONGIOVANNI, E. WAJNBERG, A. DALMASSO & P. ABAD. 2000. Virulence and molecular diversity of parthenogenetic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. *Heredity*, 84 (1): 81-89.
- SHANER, G., E.L. STROMBERG, G.H. LACY, K.R. BARKER & T.P. PIRONE. 1992. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annual Review of Phytopathology*, 30: 47-66.
- TRIANANTAPHYLLOU, A.C. 1987. Genetics of nematode parasitism on plants. In: VEECH, J.A. & D. DICKSON (ed). *Vistas on Nematology*. Society of Nematologists, Hyattsville (MD) EUA, p. 354-363.
- TRUDGILL, D.L. 1991. Resistance to and tolerance of plant-parasitic nematodes in plants. *Annual Reviews of Phytopathology*, 29: 167-192.
- WILLIAMSON, V.M. 1998. Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 277-293.

Caracterização da Variabilidade Genética de Populações do Nematóide de Cisto da Soja Coletadas na Região de Jataí (GO)

Adriana Figueiredo*, Reinaldo de O. França & Maria A. dos Santos

Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, C. Postal 3037, 38400-902 Uberlândia (MG) Brasil.

*Autora para correspondência: figueiredo@agro.ufu.br

Recebido para publicação em 06 / 10 / 2008. Aceito em 02 / 06 / 2009

Editado por Mário Inomoto

Resumo – Figueiredo, A., R.O. França & M.A. Santos. 2009. Caracterização da variabilidade genética de populações do nematóide de cisto da soja coletadas na região de Jataí (GO).

O nematóide de cisto da soja (NCS) limita a expansão e a produtividade de áreas plantadas com soja; a caracterização de tipo e raça do NCS (*Heterodera glycines*) é fundamental para a elaboração de estratégias de manejo. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar em raças e tipos populações do NCS coletadas na região de Jataí (GO), com base na reação de linhas de soja diferenciadoras. O inóculo foi preparado a partir de cada uma das sete populações do NCS coletadas na região de Jataí (GO) e calibrado para conter 4.000 ovos em 10 ml. A avaliação da população final de nematoides (número de cistos no solo e de fêmeas na raiz) ocorreu aos 35 dias após a inoculação. As reações dos genótipos de soja foram determinadas com base no índice de fêmeas (IF). Foram encontradas quatro raças (3, 5, 6 e 15) e cinco HG *type* (0; 2.7; 2.3.5.7; 6; 7). A presença de mais de uma raça ou HG *type* implica dificuldades para o desenvolvimento e a utilização de cultivares resistentes ao NCS na região estudada.

Palavras-chaves: *Glycine max*, *Heterodera glycines*, tipo, raça, nematóide-de-cisto-da-soja.

Summary - Figueiredo, A., R.O. França & M.A. Santos. 2009. Characterization of the genetic variability in populations of soybean cyst nematode collected in the region of Jataí (GO).

The damage caused by the soybean cyst nematode (SCN) limits the expansion of the soybean crop, and additionally reduces the yield of soybean in Brazil. The characterization of type and race of SCN (*Heterodera glycines*) is needed in order to establish management measures. This work aimed to characterize the races and the types of SCN in the region of Jataí (GO) by differentiator hosts. The inoculum was prepared from each of the seven populations of the NCS from the region of Jataí (GO) through the centrifuge technique of flotation in solution of sucrose, and was calibrated to contain 4,000 eggs of *H. glycines* in 10 ml. The assessment of the population (number of cysts in the soil and females in the roots) occurred 35 days after inoculation. The reactions of the differentiator hosts were determined based on the rate of females (IF). The IF was used to characterize the race and HG type. The results showed the occurrence of four races (3, 5, 6 and 15) and five HG types (0; 2.7; 2.3.5.7; 6; 7). The presence of various races or types demonstrated that obtaining resistant cultivars to SCN will be a difficult task.

Key words: *Glycine max*, *Heterodera glycines*, type, race, soybean cyst nematode.

Introdução

A soja [*Glycine max* (Linnaeus, 1735) Merrill, 1917] é a oleaginosa mais importante sob cultivo extensivo no Brasil. Participa da economia de pequenas, médias e grandes empresas e é o produto agrícola mais

importante na pauta das exportações brasileiras (Bulbovas *et al.*, 2007). Paralelamente à expansão da sojicultura no Brasil, também houve aumento dos problemas fitossanitários relativos à cultura. Dentre estes, destaca-se o nematóide de cisto da soja (NCS),

Heterodera glycines Ichinohe, 1952, pelo seu grande potencial em causar prejuízos à cultura e pelas suas enormes capacidades de disseminação e sobrevivência no solo (Silva *et al.*, 1999). Nas áreas em que o NCS ocorre, o cultivo de soja torna-se antieconômico sem a adoção de medidas de controle (Valle *et al.*, 1996).

As populações de *H. glycines* no campo são geneticamente variáveis. Esta variabilidade genética é demonstrada pela habilidade diferenciada das populações do nematóide com relação à capacidade de reproduzir em determinados genótipos de soja conhecidos como linhas diferenciadoras. Para a identificação das variabilidades inter e intraespecífica das populações de nematoides, têm sido usadas basicamente quatro tipos de análises complementares: a análise morfológica (Castagnone-Sereno, 1992; Manso & Tenente, 1994); o uso de hospedeiros diferenciadores conjugados ou não com a análise morfológica (Manso & Tenente, 1994); a análise proteica, englobando eletroforese das proteínas totais ou de uma proteína específica (Williamson, 1991); e por fim a análise sorológica, fundamentada pelos testes de imunodifusão e de ELISA (Manso & Tenente, 1994; Williamson, 1991).

Um dos primeiros indicativos da existência de variabilidade genética dentro das populações do NCS foi percebido por Ross & Brim (1957), ao testarem toda a coleção de soja disponível no banco de germoplasma americano. Com base nos resultados, os autores instalaram uma série de experimentos, em áreas naturalmente infestadas, com o objetivo de caracterizar esta variabilidade. Foram estudadas duas populações do NCS, uma no Estado do Tennessee (TCN) e outra na Carolina do Norte (NCN), e dois genótipos de soja, a cultivar Lee e a introdução de planta PI 88788. A PI88788 comportou-se como resistente tanto para a população da NCN quanto para a TCN, enquanto a cultivar Lee foi suscetível às duas populações. Dessa forma os autores caracterizaram a existência de diferenças fisiológicas entre populações de NCS.

Ross (1962), também com o propósito de estudar a capacidade diferenciada de determinadas populações de NCS de se reproduzirem diferentemente em certos genótipos de soja, concluiu que no campo as populações de NCS são constituídas

por indivíduos de diferentes raças, com predominância de uma delas. Golden *et al.* (1970) propuseram que as raças poderiam ser distinguidas com a combinação das cultivares Pickett, Peking e Lee e das linhagens PI 90763 e PI 88788, para comporem o teste de hospedeiros diferenciadores. A cultivar Lee foi escolhida como padrão de suscetibilidade em função dos resultados obtidos por Ross & Brim (1957). Dessa forma Golden *et al.* (1970) publicaram esquema com a caracterização das quatro raças até então existentes nos EUA. De 1970 a 1988, apenas duas raças adicionais foram descritas (Riggs & Schmitt, 1988).

Niblack (1992) e Rao-Arelli *al.* (1992) mostraram que, aumentando o número de cultivares de soja como diferenciadoras e/ou usando outras espécies hospedeiras, aumentar-se-ia o número potencial de raças que poderiam ser identificadas. Entretanto Riggs & Schmitt (1988) preferiram propor a expansão completa do sistema desenvolvido por Golden *et al.* (1970), chegando a 16 raças.

O sistema de Golden *et al.* (1970) tem sido alvo de críticas e sugestões foram apresentadas no sentido de aprimorá-lo (Riggs *et al.*, 1988; Young, 1989; Riggs & Schmitt, 1988; Riggs & Schmitt, 1991). O esquema expandido de Riggs & Schmitt (1988) foi aceito e é amplamente utilizado em todo o mundo. Entretanto, Niblack *et al.* (2002) criticaram a utilização do termo raça e sugeriram que as populações do NCS sejam classificadas em tipos (*HG types*). Esse sistema apresenta vantagens, como a eliminação da cultivar Pickett (que compartilha genes de resistência com 'Peking') e a inclusão de outras fontes de resistência como diferenciadoras, mas também desvantagens, como a falta de correspondência entre os *HG type* e as raça de NCS. Para superar esta dificuldade, seria interessante que a população do NCS fosse caracterizada em raça e também *HG type*. Para a utilização do esquema de Niblack *et al.* (2002) no Brasil, seria válida a inclusão de 'Hartwig' na posição número 8, haja vista que já foram encontradas no país duas populações com habilidade de parasitar esta cultivar (Dias *et al.*, 1998; Dias *et al.*, 1999).

Rocha *et al.* (2004), estudando o efeito do tempo de avaliação na caracterização de raças e tipos de *H. glycines*, observaram influência desse fator na caracterização de raça e tipo, demonstrando a

necessidade de padronização na duração do tempo experimental.

Dada a importância do conhecimento da variabilidade genética do NCS em uma determinada região, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de se adicionar mais informações sobre o assunto na região de Jataí (GO).

Material e Métodos

Obtenção das populações de *H. glycines*. Para a coleta das amostras de solo infestado com o NCS, a região de Goiás englobando os municípios de Jataí, Perolândia e Serranópolis, foi subdividida em 17 microrregiões. Cada uma das 17 microrregiões, compreendendo área de aproximadamente 200.000 ha de soja, foram denominadas de áreas 1 (oito amostras), 2 (14 amostras), 3 (11 amostras), 4 (29 amostras), 5 (21 amostras), 7 (22 amostras), 8 (21 amostras), 9 (23 amostras), 10 (22 amostras), 11 (22 amostras), 12 (nove amostras), 13 (24 amostras), 14 (quatro amostras), 15/16 (31 amostras), 17 (23 amostras), 18 (14 amostras) e 20 (duas amostras). As amostras foram coletadas em reboleiras e na área total da lavoura, em toda a região previamente estabelecida. Para isto, as propriedades foram divididas em talhões. Em cada talhão, realizou-se o caminhamento em zigzag e coletaram-se, por meio de trado e à profundidade de 20 a 30 cm, de 10 a 15 amostras simples (500 g de solo e 10 g de raízes de soja). As amostras simples de cada uma das 17 áreas foram reunidas e, após serem devidamente homogeneizadas, foi retirada uma amostra composta (1.000 g de solo e 10 a 50 g de raízes). Esta foi acondicionada em saco plástico previamente identificado, quanto ao local (incluindo as coordenadas geográficas - GPS), data de coleta, cultivar de soja e nomes do proprietário e da propriedade. Todas as amostras compostas foram enviadas ao Laboratório de Nematologia Agrícola da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, em Uberlândia (MG), onde foram processadas para a extração e caracterização das populações de fitonematoides. Das 309 amostras coletadas, 299 foram positivas para *H. glycines*, com quantidades variáveis de cistos. Por apresentarem número mais elevado de cistos viáveis (Tabela 1), as áreas 2, 4, 5, 10, 12, 17 e 20 foram selecionadas para a execução

dos testes, visando identificar a raça (Golden et al., 1970) e classificar a população do NCS em tipos (Niblack et al., 2002).

Obtenção do inóculo. O inóculo (suspensão de ovos) foi preparado a partir de cada uma das sete populações de *H. glycines* (Tabela 1). Para a extração dos cistos, cada amostra composta foi processada pela técnica do peneiramento e do papel de filtro: **(1)** após a amostra ser homogeneizada, alíquota de 150 cm³ de solo foi retirada e transferida para recipiente plástico contendo aproximadamente 2 l de água; **(2)** desmanchados manualmente os torrões, a suspensão permaneceu em repouso por 15 segundos, para ser vertida em peneira de 20 *mesh* sobreposta a outra de 100 *mesh*; **(3)** o resíduo retido na peneira de 20 *mesh* foi descartado, enquanto que o da peneira de 100 *mesh* foi macerado na própria peneira, por meio do atrito com o fundo de um tubo de ensaio, para rompimento dos cistos e a consequente liberação dos ovos; **(4)** os ovos foram recolhidos em peneira de 500 *mesh* colocada embaixo da peneira de 100 *mesh*; **(5)** da peneira de 500 *mesh*, os ovos foram transferidos para tubos de centrifuga, com o auxílio de pisseta contendo solução de sacarose (454 g de açúcar dissolvido em 1 l de água); **(6)** após a centrifugação (2.000 rpm durante 1 minuto), o sobrenadante foi vertido em peneira de 500 *mesh* e o precipitado descartado; **(7)** lavado o excesso de sacarose, os ovos foram transferidos em solução aquosa para béquer; **(8)** os ovos foram quantificados com o auxílio de microscópio óptico e câmara de Peters, e ajustou-se a concentração da suspensão para 400 ovos / ml.

Instalação e condução dos ensaios. Todos os sete ensaios foram conduzidos em casa de vegetação da UFU, entre os meses de junho a setembro de 2007. Neste período, as médias das temperaturas mínimas e máximas diárias ficaram em 15,8 e 26,7 °C, no solo dentro do tubete. Para a obtenção das mudas de soja, 25 sementes das linhas indicadoras sugeridas por Niblack et al. (2002) - Peking, PI 88788, PI 90763, PI 437654, PI 209332, PI 89772 e PI 548316 -, além de Pickett (diferenciadora de raças proposta por Golden et al. (1970), mas ausente no esquema de Niblack et al. (2002), 'Hartwig' (diferenciadora de raças proposta por Dias et al., 1998) e Lee 74 (padrão de suscetibilidade) foram colocadas para germinar em

Tabela 1 - Caracterização das populações do NCS estudadas.

Área	Município	Cultivar	Coordenadas		Altitude (m)	Cistos de <i>H. glycines</i> / 100 cm ³ de solo	
			x	y		CV ¹	CT ²
2	Jataí	CD 217	18° 00' 18,4"	52° 03' 00"	849	661	1.038
4	Serranópolis	Anta	18° 09' 48,5"	51° 53' 83,7"	810	470	550
5	Jataí	M-Soy 6101	18° 06' 26"	51° 53' 21,9"	835	719	819
10	Perolândia	M-Soy 6101	17° 35' 39,1"	52° 14' 6,5"	887	866	993
12	Jataí	M-Soy 6101	17° 54' 10"	51° 37' 49,7"	809	479	615
17	Jataí	M-Soy 6101	17° 23' 28"	51° 54' 01"	980	548	566
20	Jataí	Vencedora	18° 03' 46,3"	51° 37' 10,9"	657	771	905

¹Cistos viáveis.²Cistos totais.

caixas do tipo *gerbox*, forradas com papel de filtro umedecido com água destilada e deionizada. As caixas *gerbox* foram mantidas em estufa BOD com temperatura regulada para 25 °C, por período de 5 a 7 dias. Emitida a radícula, sete plântulas de cada um dos genótipos foram transplantadas (uma planta por recipiente) para tubetes plásticos (5 cm de diâmetro x 25 cm de comprimento), contendo 200 cm³ de substrato (solo e areia na proporção de 1:2), fumigado previamente com brometo de metila (40 cm³ / m³ de substrato). A inoculação ocorreu aos dois dias após o transplante, distribuindo-se 10 ml da suspensão de ovos (400 ovos / ml) em três orifícios com 2 cm de profundidade, abertos a 2 cm do colo de cada plântula. Para melhor controle da temperatura, os tubetes foram mantidos parcialmente enterrados em sacos de polietileno contendo areia. As plantas foram irrigadas diariamente, ou de acordo com a necessidade, e fertilizadas semanalmente, mediante a aplicação no solo de solução nutritiva. A avaliação foi realizada aos 35 dias após a inoculação.

Avaliação. Na avaliação, o sistema radicular de cada uma das plantas foi separado do solo e submetido à lavagem sob jato forte de água, em peneira de 20 *mesh* sobreposta a outra de 100 *mesh*, para a liberação das fêmeas do nematóide produzidas no período. O material retido na peneira de 20 *mesh* foi descartado, enquanto o resíduo (impurezas menores e as fêmeas e cistos do nematóide) da peneira de 100 *mesh* foi transferido em suspensão aquosa para béquer. Com o objetivo de eliminar o excesso de água, a suspensão foi vertida em funil contendo papel de filtro dobrado em forma de cone. Em seguida, o papel foi

examinado ao microscópio estereoscópico, para a detecção e quantificação das fêmeas e cistos presentes.

Após a retirada da planta de soja, o solo do tubete também foi submetido à extração de fêmeas e cistos. A metodologia foi a mesma adotada para a extração de cistos, quando do preparo do inóculo. Os procedimentos para a quantificação das fêmeas e cistos encontrados no solo foram semelhantes aos adotados quando da extração destas estruturas a partir do sistema radicular. Assim, o número total de fêmeas e cistos produzidos em uma determinada planta resultou do somatório das estruturas encontradas no sistema radicular e no solo do respectivo tubete.

Tanto na identificação das raças quanto na classificação das populações do NCS em tipos (*HG type*), as reações dos genótipos diferenciadores foram determinadas com base no índice de fêmeas (IF), como proposto por Golden *et al.* (1970). IF = (número médio de fêmeas na diferenciadora / número médio de fêmeas em Lee 74) x 100. As diferenciadoras com IF < 10 % foram classificadas como resistentes (-). Ao contrário, aquelas com IF ≥ 10 % foram tidas como suscetíveis (+). A designação das raças foi realizada adotando-se o esquema expandido de Riggs & Schmitt (1988) e as sugestões de Dias *et al.* (1998), com relação ao parasitismo em 'Hartwig'. Para a classificação das populações do NCS em tipos, foi utilizado o esquema de Niblack *et al.* (2002), listando a cultivar Hartwig na posição 8.

Resultados e Discussão

As sete populações do NCS estudadas puderam ser classificadas em cinco tipos e quatro raças (Tabela

1). Foram detectados os *HG type* 0 (áreas 4, 5 e 17), 2.7 (área 10), 2.3.5.7 (área 2), 6 (área 17) e 7 (área 20) e as raças 3 (áreas 5, 12 e 17), 5 (área 10), 6 (áreas 4 e 20) e 15 (área 2). Existiu equivalência de resultados entre tipos e raças nas áreas 5 e 17, onde o tipo 0 correspondeu à raça 3. A mesma equivalência não pode ser confirmada para as áreas 4, onde o tipo 0 foi equivalente à raça 6; esse comportamento pode ser explicado pelo fato de não existir equivalência entre a raça 6 com nenhum tipo, pois o que define a raça 6 é IF > 10 % apenas na diferenciadora ‘Pickett’, que não está presente no sistema de caracterização em tipos.

Para os outros resultados, não houve equivalência entre tipo e raça, pois na caracterização dos tipos 6; 7; 2.7 e 2.3.5.7 estão presentes diferenciadoras que não participam da caracterização em raças, sendo impossível alguma correlação de resultados.

Das dezesseis raças previstas pelo sistema de Riggs & Schmitt (1988), as raças 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10 e 14 já foram identificadas no Brasil, além de 4⁺ e 14⁺, que diferem das raças 4 e 14 clássicas por terem habilidade em parasitar ‘Hartwig’ (Dias *et al.*, 2007). Noel *et al.* (1994), estudando 15 populações do NCS provenientes de diferentes estados brasileiros, encontraram as raças 4, 10 e 14 no Mato Grosso do Sul, as raças 3 e 14 em Goiás e a raça 3 em Minas Gerais. A raça 10, obtida por Noel *et al.* (1994) para o Mato Grosso do Sul, não foi confirmada por Wain & Silva (1996).

Considerando-se o conjunto das raças do NCS identificadas nas sete áreas amostradas (Tabela 2), é possível afirmar que no sudoeste goiano há predomínio das raças 3 e 6. Levantamentos anteriores, realizados na região por outros autores, também

acenam para uma maior frequência destas duas raças (Baumgratz *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2006). Atualmente, cerca de 40 cultivares de soja resistentes ao NCS já estão disponíveis no Brasil. Entretanto, para Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, estados onde ocorrem várias raças do NCS, existe carência de cultivares resistentes, dada a predominância de material resistente às raças 1 e/ou 3. No caso da raça 3, ainda não existe material resistente adaptado para todas as regiões de cultivo.

Apesar da limitação do alcance dos presentes resultados, em termos de número de amostras, área de abrangência e período de coleta, é lícito afirmar que, devido à presença de vários tipos ou raças de NCS, a obtenção de novas cultivares de soja para a região será tarefa de difícil execução.

Literatura Citada

BAUMGRATZ, C., H.D. CAMPOS, L.H.C. SILVA, J.R. CAMPOS, D.L. NEVES & K.J.T. NASCIMENTO. 2005. Levantamento de raças do nematóide *Heterodera glycines* no Sudoeste Goiano. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, XXXVIII, Brasília. Resumos, p. 697.

BULBOVAS, P., S.R. de SOUZA, R. M. de MORAES, F. LUIZÃO & P. ARTAXO. 2007. Plântulas de soja ‘Tracajá’ expostas ao ozônio sob condições controladas. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 42 (5): 641-646.

CASTAGNONE-SERENO, P. 1992. Evolution of molecular biology techniques in nematodes nuclear DNA characterization: results and prospects for identification and phylogeny. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, XVI, Lavras. Resumos, p. 8-9.

DIAS, W.P., J.F.V. SILVA, R.A.S. KIIHL, D.M. HIROMOTO & R.V. ABDELNOOR. 1998. Quebra da resistência da cv. Hartwig por população de campo do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*). Pesquisa Agropecuária Brasileira, 33: 971-973.

Tabela 2 – Números médios de fêmeas (NMF) em ‘Lee 74’, índices de fêmeas (IF) com as respectivas reações das linhas diferenciadoras e raças e *HG type* do NCS encontrados na região de Jataí (GO). Médias de sete repetições.

Área	Lee 74 ³	Índices de Fêmeas (IF) ¹										Raças	<i>HG type</i>
		Pickett	Peking	PI 88788	PI 90763	PI 437654	PI 209332	PI 89772	PI 548316	Hartwig			
2	67,5	48,5 (+)	3,3 (-)	14,8 (+)	16,0 (+)	0,3 (-)	14,3 (+)	4,2 (-)	12,6 (+)	0,0 (-)	15	2.3.5.7	
4	103,0	12,3 (+)	0,8 (-)	1,2 (-)	2,5 (-)	0,0 (-)	3,3 (-)	7,1 (-)	5,7 (-)	0,0 (-)	6	0 (zero)	
5	146,3	6,8 (-)	5,6 (-)	0,5 (-)	0,3 (-)	0,3 (-)	1,8 (-)	0,2 (-)	3,3 (-)	0,0 (-)	3	0 (zero)	
10	60,7	118,3 (+)	2,5 (-)	12,1 (+)	7,7 (-)	0,0 (-)	9,1 (-)	2,5 (-)	12,6 (+)	0,0 (-)	5	2.7	
12	53,0	8,5 (-)	0,9 (-)	6,9 (-)	2,2 (-)	1,9 (-)	5,3 (-)	19,2 (+)	6,9 (-)	4,7 (-)	3	6	
17	130,5	0,6 (-)	0,4 (-)	0,1 (-)	0,8 (-)	0,3 (-)	0,1 (-)	1,2 (-)	0,6 (-)	0,1 (-)	3	0 (zero)	
20	51,2	24,4 (+)	2,3 (-)	0,6 (-)	7,5 (-)	0,0 (-)	5,5 (-)	1,6 (-)	12,1 (+)	5,2 (-)	6	7	

¹IF = [número médio de fêmeas na diferenciadora]/(número médio de fêmeas na cultivar Lee 74) × 100, onde IF ≥ 10% = suscetível (+);

IF < 10%= resistente (-).

³Número médio de fêmeas na cultivar Lee 74 (padrão de suscetibilidade).

- DIAS, W.P., J.F.V. SILVA, D.M. HIROMOTO & R.A.S. KIIHL. 1999. Ocorrência de uma segunda população do nematóide de cisto da soja (NCS) “quebrando” a resistência da cv. Hartwig no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, I, Londrina (PR). p.462.
- DIAS, W.P., N.R. RIBEIRO, I.O.N. LOPES, A. GARCIA, G.E.S. CARNEIRO & J.F.V. SILVA. 2007. Manejo de nematóide na cultura da soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, XXVII, Goiânia. Resumos. p. 145.
- GOLDEN, A.M., J.M. EPPS, R.D. RIGGS, L.A. DUCLOS, J.A. FOX & R.L. BERNARD. 1970. Terminology and identity of intraspecific forms of the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). Plant Disease Reporter, 54 (7): 544-546.
- JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter, 48 (9): 692-692.
- MANSO, E. C. & R.V. TENENTE. 1994. Extração e identificação de fitonematóides. In: LUZ, W.C. (ed). Revisão Anual de Patologia de Plantas. Gráfica UPF, Passo Fundo (RS), p. 265-291.
- NIBLACK, T. L. The race concept. 1992. In: RIGGS, R.D. & J.A. WRATHER. (ed). Biology and Management of the Soybean Cyst Nematode. APS Press, Saint Paul - EUA, p. 73-85.
- NIBLACK, T.L., P.R. ARELLI, G.R. NOEL, C.H. OPPERMAN, J.H. ORF, D.P. SCHMITT, J.G. SHANNON & G.L. TYLKA. 2002. A revised classification scheme for genetically diverse population of *Heterodera glycines*. Annual Review of Phytopathology, 34 (4): 279-288.
- NOEL, G.R., M.L. MENDES & C.C. MACHADO. 1994. Distribution of *Heterodera glycines* races in Brazil. Nematropica, 24 (1): 63-68.
- RIBEIRO, G.C., H.D. CAMPOS, J.R.C. SILVA, L.H.C.P. SILVA & J. NUNES JÚNIOR. 2006. Distribuição de raças de *Heterodera glycines* no Estado de Goiás, safra 2005/2006. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, XXXIX, Salvador. Resumos, p. 722.
- RIGGS, R.D. & D.P. SCHMITT. 1988. Complete characterization of the race scheme for *Heterodera glycines*. Journal of Nematology, 20 (3): 392-395.
- RIGGS, R.D. & D.P. SCHMITT. 1991. Optimization of the *Heterodera glycines* race test procedure. Journal of Nematology, 23 (2): 149-154.
- RIGGS, R.D., D.P. SCHMITT & G.R. NOEL. 1988. Variability in races tests with *Heterodera glycines*. Journal of Nematology, 20 (4): 565-572.
- RAO-ARELLI, A. P., S.C. ANAND & J.A. WRATHER. 1992. Soybean resistance to cyst nematode race 3 is conditioned by an additional dominant gene. Crop Science, 32 (5): 862-864.
- ROCHA, M.R., T. ANDERSON & T. WELACKY. 2004. Effect of harvest timing on *Heterodera glycines* race and HG Type characterization. Nematologia Brasileira, 28 (2): 167-171.
- ROSS, J. P. 1962. Physiological strain of *Heterodera glycines*. Plant Disease Reporter, 46 (11): 766-769.
- ROSS, J. P. & C.A. BRIM. 1957. Resistance of soybeans to the soybean cyst nematode as determined by a double-row method. Plant Disease Reporter, 41: 923-924.
- SILVA, J.A.L. da, T. SEDIYAMA & R.D.L. OLIVEIRA. 1999. Avaliação da reação da variedade de soja MG/BR-Renascença às raças 3, 4, 6 e 10 do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe, 1952). Nematologia Brasileira, 23 (2): 24-33.
- VALLE, L.A.C., S. FERRAZ, W.P. DIAS & D.A. TEIXEIRA. 1996. Controle do nematóide de cisto da soja, *Heterodera glycines* Ichinohe, com gramíneas forrageiras. Nematologia Brasileira, 20 (1): 1-11.
- WAIN, A.L. & J.F.V. SILVA. 1996. Levantamento de raças de *Heterodera glycines* no Brasil. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, XVIII, Uberlândia. Resumos, p 98.
- WILLIAMSON, V.M. 1991. Molecular techniques for nematodes species identification. In: NICKLE, W.R. (ed). Manual of Agricultural Nematology. Marcel Dekker, New York, p. 107-123.
- YOUNG, L.D. 1989. Use of statistics in race determination tests. Journal of Nematology, 21 (4): 544-546.

Diagnose de *Aphelenchoides fragariae* e *Pratylenchus* spp. pela Aplicação da Tecnologia do Código de Barras do DNA

Claudio Marcelo G. de Oliveira^{1*}, Andressa C.Z. Machado¹, Roberto K. Kubo¹ & Ricardo Harakava²

¹Laboratório de Nematologia, Centro Experimental Central do Instituto Biológico, Campinas, (SP) Brasil.

²Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Vegetal, Instituto Biológico, São Paulo (SP) Brasil.

*Autor para correspondência: marcelo@biologico.sp.gov.br

Recebido para publicação em 9 / 01 / 2009. Aceito em 03 / 06 / 2009

Editado por Rosângela Oliveira

Resumo – Oliveira, C.M.G., A.C.Z. Machado, R.K. Kubo, & R. Harakava. 2009. Diagnose de *Aphelenchoides fragariae* e *Pratylenchus* spp. através da aplicação da tecnologia do código de barras do DNA.

O objetivo do presente trabalho foi demonstrar a utilidade da técnica do código de barras do DNA na diagnose de três espécies de nematoides de importância quarentenária. O DNA genômico foi extraído de dez espécimes de *Aphelenchoides* sp. isolados de folhas de lírio e de um único espécime de *Pratylenchus* spp. oriundos de batata semente ou raízes de lírio. Através do uso de PCR, amplificou-se o terço final da região 18S do DNA ribossômico (rDNA) de *Aphelenchoides* e a região D2 / D3 rDNA das populações de *Pratylenchus*. Os fragmentos de DNA amplificados de cada população foram purificados e sequenciados diretamente em ambas as direções. A seguir, as sequências consenso de *Pratylenchus* spp. e *Aphelenchoides* sp. foram comparadas às sequências de outras espécies de nematoides depositadas no banco de dados (GenBank) para a identificação da porcentagem de similaridade. O uso da técnica do código de barras mostrou-se eficiente na identificação de *Pratylenchus penetrans* detectado em tubérculos de batata semente, *P. crenatus* proveniente de raízes de lírio e *Aphelenchoides fragariae* oriundo de folhas de lírio.

Palavras-chaves: *Aphelenchoides fragariae*, diagnose molecular, identificação de nematoide, *Pratylenchus crenatus*, *Pratylenchus penetrans*

Summary - Oliveira, C.M.G., A.C.Z. Machado, R.K. Kubo, & R. Harakava. 2009. *Aphelenchoides fragariae* and *Pratylenchus* spp. diagnosis through application of DNA barcode technology.

The objective of the present work was to demonstrate the usefulness of DNA barcode methodology to diagnose three nematode species of quarantine importance. The genomic DNA was extracted from ten specimens of *Aphelenchoides* sp. isolated from *Lillium* leaves and one individual *Pratylenchus* spp. from potato seed or *Lillium* roots. The final 3'-end of 18S ribosomal DNA (rDNA) of *Aphelenchoides* sp. and D2 / D3 region of rDNA of both *Pratylenchus* populations were amplified by PCR. Purified DNA fragments were sequenced directly in both directions using each primer pair. Thereafter the consensus sequences of *Pratylenchus* spp. and *Aphelenchoides* sp. were compared with other nematode species sequences deposited in the on line data base (GenBank) to identification of percentage of similarity. The use of DNA barcodes technology provided an accurate identification of the plant-parasitic nematode *Pratylenchus penetrans* from potato seeds, *P. crenatus* from *Lillium* roots and *Aphelenchoides fragariae* from *Lillium* leaves.

Key words: *Aphelenchoides fragariae*, molecular diagnostic, nematode identification, *Pratylenchus crenatus*, *Pratylenchus penetrans*

Introdução

Os nematoides estão entre os organismos mais difíceis de serem identificados, seja pelo tamanho diminuto ou dificuldade de observação de características-chaves para o diagnóstico em microscopia óptica convencional (Heyns, 1983). Em se tratando de diagnóstico para elaboração de laudos de análise fitossanitária oficial, o fato é agravado pela ausência de fêmeas nas amostras enviadas aos laboratórios. Ressalta-se que essas são necessárias para a identificação específica precisa, a qual se baseia em caracteres morfológicos de adultos do sexo feminino. Quando se trata de material importado, em face das condições de transporte e armazenamento, os nematoides presentes nas amostras muitas vezes chegam ao laboratório danificados, com a morfologia alterada devido à anidrobiose, sem condições para a segura identificação específica. Para resolver tal questão, pode-se lançar mão de técnicas baseadas na análise do DNA do organismo. As técnicas biomoleculares, como PCR-RFLP, RAPD e o uso de *primers* específicos têm sido úteis no diagnóstico de algumas espécies de nematoides (Waeyenberge *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2004). Além dessas, uma técnica bastante segura, mas que ainda não se encontra em uso rotineiro em laboratórios de diagnose de nematoides, é o código de barras do DNA (DNA *barcode*).

O uso do código de barras do DNA para identificação de organismos foi proposto em duas conferências realizadas no laboratório de Cold Spring Harbor (EUA), em 2003 (Powers, 2004). O princípio do uso do código de barras genético seria o de que, em um pequeno trecho do genoma do organismo, específico para cada espécie, geralmente o DNA mitocondrial ou DNA ribossômico, existiria variação suficiente para separar as espécies que habitam o planeta atualmente, inclusive os nematoides parasitos de plantas (Powers, 2004).

Recentemente, o Laboratório de Nematologia do

Centro Experimental Central do Instituto Biológico, em Campinas (SP), analisando amostras de batata semente e plantas de lírio enviadas pelo serviço de sanidade vegetal do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) e por produtores de lírio (*Lilium* spp.) do município de Holambra, SP, deparou-se com duas situações em que a taxonomia tradicional não era suficiente para a segura identificação específica, seja pela dificuldade de observação de características diagnósticas ou pelo estado de deformação em que se encontravam os exemplares. Como ambas as culturas podem carregar espécies de nematoides que causam severas perdas, mas que ainda não estão presentes no Brasil, a identificação específica dos nematoides presentes nas amostras era de suma importância para o serviço quarentenário do país. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo demonstrar a utilidade da técnica do código de barras do DNA para a diagnose de três espécies de nematoides importantes em termos quarentenários para o país. De acordo com Subbotin *et al.* (2008), para nematoides do gênero *Pratylenchus*, a região genômica mais estudada é a expansão D2 / D3, situada no 28S DNA ribossômico (rDNA); já para o gênero *Aphelenchoides*, após consulta ao Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), o maior número de informações disponíveis diz respeito à região 18S, também do rDNA. Portanto, procedeu-se ao estudo de tais regiões com o objetivo de elucidar a identificação das espécies presentes nos lotes de batata semente e lírio em análise.

Material e Métodos

Os lotes de batata semente (*Solanum tuberosum*), oriundos do Canadá, e de lírio (*Lilium* sp.) híbrido Oriental Jet Set, oriundos da Holanda, foram enviados ao Laboratório de Nematologia para análise da presença de nematoides parasitos para as culturas ou de espécies quarentenárias para o Brasil (Tabela 1). Os nematoides presentes nos tubérculos de batata e

Tabela 1 – Populações de nematoides incluídas no presente estudo, com respectivas origens e datas de detecção.

Código	Nematoide ¹	Procedência	Planta hospedeira	Data da coleta
CM02/08	<i>Aphelenchoides fragariae</i>	Holanda	Folhas de lírio híbrido oriental 'Jet Set'	05/05/2008
CM03/08	<i>Pratylenchus crenatus</i>	Holanda	Raízes de lírio híbrido oriental 'Jet Set'	05/05/2008
NEMA15/08	<i>Pratylenchus penetrans</i>	Canadá	Tubérculos de batata 'Atlantic'	16/01/2008

¹Identificação final baseada na aplicação do código de barras do DNA

nas raízes, bulbos e folhas de lírio foram extraídos pelo método de Coolen & D'Herde (1972). Nos lotes de batata semente, constatou-se a presença de uma espécie de nematoide parasito de plantas cuja identificação foi impossível, em virtude da ausência de fêmeas com morfologia normal, já que os poucos indivíduos presentes na amostra NEMA15/08 estavam muito danificados. No entanto, a partir de algumas características dos exemplares recuperados das amostras, como o formato do estilete, suspeitou-se tratar-se de uma espécie do gênero *Pratylenchus*. Em relação ao lírio, tanto as raízes como as folhas apresentaram nematoides fitoparasitos, na sua maioria ainda no estágio juvenil, sendo que os exemplares pertenciam, com base nas características da região anterior, provavelmente, aos gêneros *Pratylenchus* (CM03/08) e *Aphelenchoides* (CM02/08), respectivamente. Não foram detectados nematoides fitoparasitos nos bulbos de lírio.

Extração do DNA. Para a extração do DNA genômico foi utilizado o método da proteinase-K (WLB: *Worm Lysis Buffer*), segundo Williams *et al.* (1994). Separadamente, um único indivíduo do gênero *Pratylenchus* (um único juvenil com a morfologia alterada, para o caso das populações NEMA 15/08 e CM03/08) e dez indivíduos do gênero *Aphelenchoides*, extraídos dos tubérculos de batata, das raízes e folhas de lírio, respectivamente, foram selecionados, seccionados em três partes (com auxílio de uma agulha) em uma gota de 15 μ l WLB e colocados em tubos de microcentrífuga, sendo incubados a -20 °C por 15 min. Posteriormente, os tubos foram incubados a 60 °C por 1 hora, 95 °C por 15 minutos e resfriados a 4 °C.

Reação de PCR. Foi utilizado um *kit* de PCR tipo *pureTaq Read-To-Go Bead* (Amersham Pharmacia Biotech). Em um tubo de microcentrífuga de 0,5 cm³ foi adicionada uma esfera do *kit* de PCR, que contém os seguintes reagentes necessários para a reação: 2,5 U *puReTaq*, 200 μ M de cada dNTP, 10 μ M Tris-HCl, 50 μ M KCl e 1,5 μ M MgCl₂, quando dissolvida em 17,5 μ l de água milli-Q. Em seguida, foram adicionados 5 μ l de DNA genômico, 1 μ l de cada par de *primers*: região D2 / D3 de *Pratylenchus* sp. [D2A 5' – ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG – 3';

D2B 5' – TCGGAAGGAACCAGCTAC TA – 3', conforme Al-Banna *et al.* (2004)]; e o terço final da região 18S de *Aphelenchoides* sp. [F02 5' GGAAGGGCACCACCAGGAGTGG 3'; R81 5' – TGATCCWKCYGCAGGTTCAC – 3', conforme Oliveira *et al.* (2004)], num volume final de 25 μ l de reação. Esta mistura foi levada ao termociclador pré-aquecido a 94 °C. As condições de amplificação utilizadas para a região D2 / D3 encontram-se em Al-Banna *et al.* (2004) e para a região 18S, em Oliveira *et al.* (2004).

Após a amplificação do DNA, 5 μ l do produto da PCR foram utilizados para eletroforese em tampão 1X TAE (Sambrook *et al.*, 1989) em gel de agarose a 0,8 % com 0,003 % de brometo de etídio (0,02 μ g / ml). O resultado da amplificação foi comparado com o marcador molecular 100 *Base-Pair Ladder* (Amersham). O gel foi visualizado num transiluminador de luz UV e fotografado. A seguir, os fragmentos foram purificados por meio do kit Wizard® PCR Preps DNA *Purification System* (Promega)

Sequenciamento do DNA. Os sequenciamentos obtidos no presente trabalho foram realizados no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, SP. O sequenciamento dos fragmentos amplificados das regiões D2 / D3 e do terço final da 18S foi feito utilizando o *kit* Big Dye Terminator (Applied Biosystems). Para cada reação, foi preparada uma mistura contendo 2 μ l de reagente Big Dye, 3,2 mmol do *primer* para o sentido anverso ou para o sentido reverso, 3,0 μ l do produto previamente amplificado contendo aproximadamente 400 ng de DNA e 2,0 ml de água. A reação para sequenciamento foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante (Applied Biosystems). Foi feita nova purificação do produto amplificado por precipitação com isopropanol em microtubos. Após a desnaturação das amostras a 95 °C por 3 minutos, foi realizada eletroforese em aparelho ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystem).

As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com auxílio do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* com a finalidade de identificar polimorfismo nas sequências nucleotídicas. As

sequências consenso de *Pratylenchus* spp. e *Aphelenchoides* sp. foram comparadas às sequências de outras espécies de nematoides depositadas no banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a identificação de similaridade utilizando-se o programa BLASTN 2.2.19+ (Zhang *et al.* 2000).

Resultados e Discussão

O sequenciamento das regiões D2 / D3 de *Pratylenchus* spp. e do terço final da 18S de *Aphelenchoides* sp. forneceu duas sequências para cada uma das espécies, uma no sentido anverso e outra no sentido reverso. Após alinhamento das sequências anversa e reversa para cada espécie, obteve-se uma sequência consenso correspondente às regiões D2 / D3 com 275 pares de bases (pb) para NEMA 15/08 e 277 pb para CM03/08, enquanto que a sequência consenso da região 18S da população CM02/08 apresentou-se com 580 pb. Essas sequências foram individualmente confrontadas aos dados existentes no banco de dados GenBank, para a identificação de similaridade com sequências de outras espécies de nematoides. Baseando-se nessa comparação, concluiu-se que o nematoide da amostra de tubérculos de batata NEMA 15/08 tratava-se de *Pratylenchus penetrans*

(Cobb, 1917) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941, pois foram encontrados 100 % de bases idênticas entre as sequências em análise com as sequências desse organismo provenientes de uma população dos EUA (Tabela 2). Em relação à espécie de *Pratylenchus* presente na amostra de raiz de lírio (CM 03/08), os resultados evidenciaram que tratava-se de *Pratylenchus crenatus* Loof, 1960, uma vez que apresentou alto grau de similaridade, variando de 97 a 99 %, com duas populações dessa espécie, uma dos EUA e outra do Reino Unido (Tabela 3). Trata-se de nematoide quarentenário, considerado praga A1 no Brasil. Vale salientar que os lírios, após constatação da espécie presente nas raízes, foram destruídos por tratamento térmico [vapor produzido por caldeira (120 °C)].

No que tange à diagnose do nematoide foliar de lírio (CM02/08), através da comparação das sequências, concluiu-se que se tratava de *Aphelenchoides fragariae* (Ritzema Bos, 1890) Christie, 1932, uma vez que apresentou similaridade de 100 % com duas populações dessa espécie provenientes da Bélgica e do Japão (Tabela 4).

Em relação à importância dessas três espécies para o serviço quarentenário brasileiro, *P. penetrans* foi relatado anteriormente no Brasil infestando alho,

Tabela 2 – Comparação da sequência da região D2 / D3 da população NEMA 15/08 com as sequências de outras espécies de nematoides depositadas no banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a identificação de similaridade (% de identidade genética).

Espécie	% de identidade	Código de acesso no GenBank
<i>Pratylenchus penetrans</i> , EUA	100	EU130863.1
<i>Pratylenchus penetrans</i> , França	99	AM231937.1
<i>Pratylenchus fallax</i>	96	AF264181.1
<i>Pratylenchus convallariae</i>	96	AF196351.1
<i>Pratylenchus arlingtoni</i>	95	AF307328.1
<i>Pratylenchus dunensis</i>	94	AM231949.1
<i>Pratylenchus vulnus</i>	89	EU130886.1
<i>Pratylenchus pinguicaudatus</i>	92	AJ545014.1
<i>Pratylenchus thornei</i>	89	EU130877.1
<i>Pratylenchus musicola</i>	89	U47555.1
<i>Pratylenchus scribneri</i>	88	EU130865.1
<i>Pratylenchus coffeae</i>	88	EU130850.1
<i>Pratylenchus agilis</i>	88	EU130841.1
<i>Pratylenchus hexincisus</i>	88	DQ498833.1
<i>Pratylenchus teres</i>	88	AF196353.1
<i>Pratylenchus pratensis</i>	88	AM231932.1
<i>Pratylenchus loosi</i>	88	EF446997.1
<i>Pratylenchus mediterraneus</i>	88	AJ545022.1
<i>Pratylenchus pseudocoffeae</i>	88	AF170444.1

Tabela 3 – Comparação da sequência da região D2 / D3 da população CM 03/08 com as sequências de outras espécies de nematoides depositadas no banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a identificação de similaridade (% de identidade genética).

Espécie	% de identidade	Código de acesso no GenBank
<i>Pratylenchus crenatus</i> , Reino Unido	99	EU130853.1
<i>Pratylenchus crenatus</i> , EUA	97	U47549.1
<i>Pratylenchus vulnus</i>	91	EU130886.1
<i>Pratylenchus scribneri</i>	90	DQ498830.1
<i>Pratylenchus hippeastris</i>	90	DQ498829.1
<i>Pratylenchus coffeae</i>	90	AF170443.1
<i>Pratylenchus loosi</i>	90	AF170438.1
<i>Pratylenchus musicola</i>	89	U47555.1
<i>Pratylenchus hexincisus</i>	89	U47554.1
<i>Pratylenchus</i> sp.	89	EU130898.1
<i>Pratylenchus agilis</i>	89	EU130841.1
<i>Pratylenchus pseudocoffeae</i>	89	AF170444.1
<i>Pratylenchus teres</i>	88	AF196353.1
<i>Pratylenchus</i> sp.	88	EU130899.1
<i>Pratylenchus gutierrezii</i>	88	AF170440.1
<i>Pratylenchus brachyurus</i>	88	U47553.1
<i>Pratylenchus neglectus</i>	88	AJ545027.1
<i>Pratylenchus pratensis</i>	88	AM231932.1
<i>Pratylenchus thornei</i>	88	EU130877.1
<i>Pratylenchus gutierrezii</i>	88	AF170442.1
<i>Pratylenchus brzeskii</i>	88	AM231914.1
<i>Pratylenchus zaeae</i>	88	AF303950.1

Tabela 4 – Comparação da sequência da região 18S da população CM 02/08 com as sequências de outras espécies de nematoides depositadas no banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a identificação de similaridade (% de identidade genética).

Espécie	% de identidade	Código de acesso no GenBank
<i>Aphelenchoides fragariae</i> , Bélgica	100	AJ966475.1
<i>Aphelenchoides fragariae</i> , Japão	100	AB067755.1
<i>Aphelenchoides</i> sp.	97	AY284647.1
<i>Aphelenchoides blastophorus</i>	97	AY284644.1
<i>Aphelenchoides</i> sp.	96	FJ040412.1
<i>Aphelenchoides</i> sp.	96	AY284646.1
<i>Aphelenchoides</i> sp.	96	FJ040411.1
<i>Aphelenchoides saprophilus</i>	94	FJ040408.1
<i>Aphelenchoides bicaudatus</i>	94	AY284643.1
<i>Aphelenchoides</i> cf. <i>bicaudatus</i>	91	FJ040407.1
<i>Aphelenchoides</i> cf. <i>obtusus</i>	96	AY911888.1
<i>Aphelenchoides clarus</i>	93	AY911887.1
<i>Aphelenchoides besseyi</i>	89	AY508035.1
<i>Aphelenchoides stammeri</i>	88	AB368535.1
<i>Aphelenchoides</i> sp.	93	DQ901550.1
<i>Aphelenchoides</i> sp.	91	DQ901552.1
<i>Aphelenchoides ritzemabosi</i>	87	DQ901554.1
<i>Aphelenchoides</i> SP.	92	DQ901553.1
<i>Aphelenchoides</i> cf. <i>besseyi</i>	87	AY911886.1

mandioquinha-salsa, crisântemo, capim-colchão, ervilha, soja e alcachofra; em batata, com base em literatura pertinente, há apenas um relato da

ocorrência dessa espécie em baixa frequência em áreas comerciais da região sul do país (Charchar, 1997), provavelmente introduzida com batata semente

devido à sua localização restrita. Nos países em que esse nematoide ocorre parasitando batata, inclusive no Canadá, as perdas são significantes e seu controle é responsável por aumentos de produção de até 46 % (Olthof, 1989). Se disseminado no país pela batata semente, esse nematoide poderia causar sérios problemas à bataticultura nacional. Exemplo semelhante foi relatado por Monteiro *et al.* (1987) quando, inadvertidamente, tubérculos de batata provenientes da Holanda foram introduzidos no Brasil veiculando espécies nocivas de nematoides, como *Pratylenchus neglectus* (Rensch, 1924) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941.

Em relação aos nematoides presentes em lírio, *A. fragariae* já foi relatado associado a plantas ornamentais no Brasil, parasitando *Asplenium nidus* e *Dryopteris castor variegata* (Oliveira, 2001). Siddiqi (1975) destaca que essa espécie está distribuída tanto em países de clima temperado como tropical, sendo que mais de 250 plantas em 47 famílias botânicas são relatadas como hospedeiras desse nematoide, inclusive plantas de lírio cultivadas na Holanda, Dinamarca e Estados Unidos.

A espécie quarentenária A1 *P. crenatus* encontra-se amplamente distribuída em diversos países europeus. Na Holanda, por exemplo, já foi detectada em cultivos de batata (Castillo & Vovlas, 2007). Nos Estados Unidos também ocorre parasitando batata nos estados de Maine, Nova Iorque e Ohio (Castillo & Vovlas, 2007); além disso, há relato de que *P. crenatus* ocorre na Califórnia associado a lírio (*Lilium longiflorum* var. *eximium*) (Norton *et al.*, 1984, citado por Merrifield, 2000).

Cabe ressaltar que nas três ocorrências relatadas no presente trabalho, o MAPA foi comunicado para execução das medidas fitossanitárias cabíveis. Os serviços quarentenários mostram-se, portanto, essenciais para a identificação específica de nematoides em *commodities* agrícolas que cruzam barreiras intercontinentais, muitas vezes carregando consigo espécies ainda não presentes ou de localização restrita para o país de destino da carga ou material vegetal. Tais serviços identificam dezenas de espécies de nematoides diariamente, em todo o mundo, em diversas espécies vegetais que são exportadas e/ou

importadas. Para algumas espécies, como os nematoides de cisto da batata (*Globodera rostochiensis* e *G. pallida*) ou das galhas (*Meloidogyne chitwoodi*), um único indivíduo presente na amostra leva à rejeição de todo o lote de batata semente importado (Powers, 2004). Esse único indivíduo pode estar presente junto a outras espécies não alvo, mas semelhantes morfológicamente. Nesse sentido, a técnica utilizada para identificação da espécie presente necessita ser precisa e bastante confiável para auxiliar o difícil serviço da quarentena.

Idealmente, para a segura identificação de nematoides é necessária a integração entre os dados morfológicos e moleculares (De Ley & Blaxter, 2002). Entretanto, a maioria dos trabalhos, seja para fins de diagnose ou para estudos filogenéticos, ainda separa essas duas vertentes (Coomans *et al.*, 2001; Neilson *et al.*, 2004). Poucos exemplos existem em que ambas as técnicas foram utilizadas, entre eles os de Oliveira *et al.* (2004 e 2006). No primeiro caso, através de PCR-RFLP e sequenciamento das regiões 18S e ITS-1, aliados a análises morfológica e morfométrica, os autores rejeitaram as hipóteses de que *Xiphidurus yepesara* e *X. parthenus* seriam sinonímias (Chaves *et al.*, 1999) ou subespécies (Decraemer *et al.*, 1996), recomendando as descrições originais de Monteiro (1976) e Monteiro *et al.* (1981). Analisando as relações filogenéticas e morfológicas entre espécies de *Xiphinema*, Oliveira *et al.* (2006) concluíram que *X. krugi* é um complexo de espécies e propuseram uma análise do status taxonômico dessa espécie e de suas sinonímias *X. denoudeni* e *X. loosi*.

No presente trabalho, ficou evidente a necessidade de se utilizar ambas as técnicas, uma vez que a região do genoma a ser estudada depende grandemente do gênero de nematoide em questão, para que o maior número de informações possível esteja disponível no banco de dados GenBank.

Portanto, o avanço científico pela aplicação da tecnologia do código de barras do DNA, utilizada na presente situação, inédita para a Nematologia Brasileira, foi de grande préstimo, não só ao serviço de quarentena do Brasil, mas também aos produtores de batata e lírio do país, impedindo a infestação de áreas indenes com espécies de nematoides de difícil controle. Paradoxalmente, entretanto, mostrou-se a

necessidade de integração entre a taxonomia clássica e técnicas avançadas de diagnose, como já alertado por Lee (2004). Em conclusão, as técnicas moleculares não devem ser consideradas de maneira isolada, como propôs Tautz *et al.* (2003), mas como ferramenta de auxílio para a segura e correta identificação da espécie.

Literatura Citada

- AL-BANNA, L., A.T. PLOEG, V.M. WILLIAMSON & I. KALOSHIAN. 2004. Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. *Journal of Nematology*, 36 (2): 142-146.
- CASTILLO, P. & N. VOVLAS. 2007. *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management. Brill, Leiden – Holanda e Boston - EUA, 530 p.
- CHARCHAR, J.M. 1997. Nematóides associados à cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.) nas principais regiões de produção do Brasil. *Nematologia Brasileira*, 21 (2): 49-60.
- CHAVES, E., I. OLMOS DE CASELLA & E. CASELLA. 1999. Description of two populations of *Xiphidurus yepesara* Monteiro, 1976 (Nematoda: Longidoridae) from Uruguay. *Nematology*, 1: 753-756.
- COOLEN, W.A. & C.J. D'HERDE. 1972. A Method for the Quantitative Extraction of Nematodes from Plant Tissue. *State of Nematology and Entomology Research Station, Ghent - Bélgica*, 77 p.
- COOMANS, A., R. HUYS, J. HEYNS & M. LUC. 2001. Character analysis, phylogeny and biogeography of the genus *Xiphinema* Cobb, 1973 (Nematoda: Longidoridae). *Annales du Musée Royal de l'Afrique Centrale (Zoologie)*, 287, 239 p.
- DECRAEMER, W., M. LUC, M.E. DOUCET & A. COOMANS. 1996. Study of the genus *Xiphidurus* Monteiro, 1976 (Nematoda: Longidoridae). *Fundamental and Applied Nematology*, 19: 207-225.
- DE LEY, P. & M.L. BLAXTER. 2002. Systematic position and phylogeny. In: LEE, D.L. (ed). *The Biology of Nematodes*. Taylor and Francis, London - UK, p. 1-30.
- HEYNS, J. 1983. Problems of species delimitation in the genus *Xiphinema*, with special reference to monosexual species. In: STONE, A.R., H.M. PLATT & L.F. KHALIL, L.F. (ed). *Concepts in Nematode Systematics*. Systematics Association & Academic Press, London - UK, p. 163-174.
- LEE, M.S.Y. 2004. The molecularisation of taxonomy. *Invertebrate Systematics*, 18: 1-6.
- MERRIFIELD, K. Oregon State University Extension Plant Pathology Nematode Testing Service Annual Report, 2000.
- MONTEIRO, A.R. 1976. *Xiphidurus yepesara* n.g., n.s. (Nemata: Longidoridae) from Brazil. *Nematologia Mediterrânea*, 4: 1-6.
- MONTEIRO, A.R., L.G.E. LORDELLO & K. NAKASONO. 1981. *Xiphidurus parthenus* n. sp. (Nemata: Longidoridae) from Brazil. *Revista de Agricultura*, 56: 93-97.
- MONTEIRO, A.R., L.C.C.B. FERRAZ & C.H.W. FLECHTMANN. 1987. Nematóides fitoparasitos em tubérculos de batata importados para consumo. *Nematologia Brasileira*, 11: 01.
- NEILSON, R., W. YE, C.M.G. OLIVEIRA, J. HUBSCHEN, R. T. ROBBINS, D. F. J. BROWN & A. L. SZALANSKI. 2004. Phylogenetic relationships of Longidoridae species (Nematoda: Dorylaimida) from North America inferred from 18S rDNA sequence data. *Helminthologia*, 41: 209-215.
- OLIVEIRA, C.M.G. 2001. Nematóides parasitos de plantas. In: IMENES, S. L. & ALEXANDRE, M. A. V. (ed). *Pragas e Doenças em Plantas Ornamentais (CD-ROM)*. Instituto Biológico, São Paulo, p. 38-47.
- OLIVEIRA, C.M.G., J. HUBSCHEN, D.J.F. BROWN, L.C.C.B. FERRAZ, F. WRIGHT & R. NEILSON. 2004. Phylogenetic relationships among *Xiphinema* and *Xiphidurus* nematode species from Brazil inferred from 18S rDNA sequences. *Journal of Nematology*, 36: 153-159.
- OLIVEIRA, C.M.G., L.C.C.B. FERRAZ & R. NEILSON. 2006. *Xiphinema krugj*, species complex or complex of cryptic species? *Journal of Nematology*, 38: 418-428.
- OLTHOF, T.H.A. 1989. Effects of fumigants and systemic pesticides on *Pratylenchus penetrans* and potato yield. *Journal of Nematology*, 21 (Supl.): 645-649.
- POWERS, T. 2004. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 367-383.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH & T. MANIATIS. 1989. Composition of the electrophoresis buffer. In: FORD, N.; NOLAN, C.; FERGUSON, M. & OCKLER, M. (ed). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York - EUA, p. 66-67.
- SIDDIQI, M.R. 1975. *Aphelenchoides fragariae*. C. I. H. Descriptions of plant-parasitic nematodes. Set 5, n. 74. Commonwealth Institute of Parasitology - CAB International.
- SUBBOTIN S.A, E.J. RAGSDALE, T. MULLENS, P.A. ROBERTS, M. MUNDO-OCAMPO & J.A. BALDWIN. 2008. A phylogenetic framework for root lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda): Evidence from 18S and D2-D3 expansion segments of 28S ribosomal RNA genes and morphological characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48:491-505.
- TAUTZ, D., P. ARCTANDER, A. MINELLI, R.H. THOMAS & A.P. VOGLER. 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 70-74.
- WAEYENBERGE, L., A. RYSS, M. MOENS, J.

- PINOCHE T & T.C. VRAIN. 2000. Molecular characterization of 18 *Pratylenchus* species using rDNA restriction fragment length polymorphism. *Nematology*, 2: 135-142.
- WILLIAMS, B.D., B. SCHRANK, C. HUYNH, R. SHOWNKEEN & R.H. WATERSTON. 1994. A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. *Genetics*, 131: 609-624.
- ZHANG, Z., S. SCHWARTZ, L. WAGNER & W. MILLER. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7 (1-2): 203-14.

Expressão de Genes Envolvidos na Resistência da Soja a *Meloidogyne javanica*

Aguida M.A.P. Morales¹, Eliana G.M. Lemos¹, Renata Fuganti², Silvana R.R. Marin², Francismar C. Marcelino², João Flávio V. Silva^{2*}, Alan Alves Pereira² & Alexandre L. Nepomuceno²

¹Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista (FCAV – UNESP), 14884-900 Jaboticabal (SP) Brasil.

²Embrapa Soja, C. Postal 1061, 86001-970 Londrina (PR) Brasil.

*Autor para correspondência: veloso@cnpmc.embrapa.br

Recebido para publicação em 12 / 02 / 2009. Aceito em 22 / 08 / 2009

Editado por Guilherme Asmus

Resumo - Morales, A.M.A.P, E.G.M. Lemos, R. Fuganti, S.R.R. Marin, F.C. Marcelino, J.F.V. Silva, A.A. Pereira & A.L. Nepomuceno. 2009. Expressão de Genes Envolvidos na Resistência da Soja a *Meloidogyne javanica*.

Este trabalho teve como objetivo analisar a expressão de genes de soja envolvidos na resistência ao nematoide de galhas *Meloidogyne javanica* utilizando a técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR). Foram avaliadas raízes de soja de genótipos resistente (PI 595099) e suscetível (cultivar BRS 133), inoculadas e não inoculadas com J₂, bem como linhagens resultantes deste cruzamento. Após um, três e seis dias da inoculação, as raízes foram coletadas e seguiu-se a extração do RNA total e síntese do cDNA. As amostras de cDNA foram juntadas em *bulks* dos tempos de coleta de cada indivíduo. As reações para quantificação do nível de expressão relativa foram conduzidas em triplicatas, utilizando o gene RNAr 18S como normalizador, previamente validado para este ensaio. De acordo com os resultados, os genes que codificam as proteínas chalcona sintase (*chs*), xiloglucana endotransglicosilase (*xet*), de resistência a *Heterodera schachtii* (*hs1pro-1*) e sulfotransferase hidroxisteroide *preferring* 2 (*stb-2*) foram diferencialmente expressos, aumentando os níveis de expressão nas plantas de soja inoculadas com o patógeno quando comparadas com aquelas não inoculadas, tanto nos materiais resistentes e suscetíveis da população, exceto para o gene *xet*, em um indivíduo (266-S) da população suscetível, e para o gene *chs*, em um indivíduo de ambas as populações (259-S e JF 7056). Em contrapartida, a análise dos parentais utilizados no cruzamento revelou aumento nos níveis de expressão para os genes avaliados apenas no parental resistente. Tal resultado indica uma provável segregação de caracteres de efeitos maior e menor na população oriunda deste cruzamento. Os maiores níveis de expressão foram observados nos genótipos resistentes, destacando-se a população JF 7002, com aumento de até 85 vezes na expressão do gene *xet* em presença do nematoide. Os resultados obtidos pela técnica de RT-qPCR permitiram quantificar os níveis de expressão dos genes identificados como diferencialmente expressos pela técnica de microarranjo de DNA, ratificando os resultados com relação ao aumento ou redução na expressão dos mesmos.

Palavras-chaves: soja, nematoides-das-galhas, PCR em tempo real.

Summary - Morales, A.M.A.P, E.G.M. Lemos, R. Fuganti, S.R.R. Marin, F.C. Marcelino, J.F.V. Silva, A.A. Pereira & A.L. Nepomuceno. 2009. Expression of genes related to resistance to *Meloidogyne javanica* in soybean.

The objective of this work was to analyze the expression of soybean genes involved in the resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* using the Real Time PCR (RT-qPCR) technique. Soybean roots inoculated and not inoculated with the nematode were evaluated. Resistant (genotype PI 595099) and susceptible (cultivar BRS 133) soybean lineages and resulting individuals of this crossing were inoculated with J₂. Roots were

collected after one, three and six days after inoculation. The Total RNA was extracted and cDNA synthesis was made. The cDNA samples were joined in bulks of time of collection for each plant. The reactions for quantification of the level of relative expression were made in triplicates, and the RNAr 18S gene was used for normalization, previously validated for this trial. The results showed the genes that codify the proteins chalcone synthase (*chs*), xyloglucan endotransglycosylase (*xet*), the resistance protein to *Heterodera schachtii* (*hs1pro-1*) and sulfotransferase hidroxysteroid preferring 2 (*stb-2*) were differentially expressed, increasing the levels of expression in the soybean plants inoculated with the pathogen when compared with the plants not inoculated, in both resistant and susceptible materials of the population, with the exception of one susceptible plant (266-S) for the gene *xet* and one plant for both susceptible and resistant materials (259-S and JF 7056) for the gene *chs*. Conversely, the analysis of the parental used in the crossing revealed increase in the genes expression levels just in the resistant genotype, indicating a probable segregation of characters with major and minor effects. The highest expression levels were observed in the resistant genotypes, standing out the population JF 7002, increasing 85 times the gene *xet* expression. The results obtained by the RT-qPCR allowed quantifying the expression levels of the identified genes as differentially expressed by the technique of microarray.

Key words: soybean, root-knot nematode, real time PCR.

Introdução

A identificação de genes diferencialmente expressos em soja (*Glycine max*) parasitada pelo nematoide *Meloidogyne javanica* e que possam ser utilizados em estratégias de melhoramento genético e biotecnologia, é desejável para o aprimoramento e a obtenção de cultivares resistentes. Wendland *et al.* (2004) identificaram, por meio da técnica de microarranjos de DNA, genes que são diferencialmente expressos em genótipos de soja inoculados e não inoculados com *M. javanica*. Entre estes genes estão o *chs* (nº. de acesso no *GenBank* CA851897), que codifica uma enzima chave na biossíntese dos fenilpropanóides (fitoalexinas); o *xet* (nº. de acesso no *GenBank* AI495154), que codifica a enzima xiloglucana endotransglicosilase, catalisadora da quebra intramolecular de polímeros de xiloglucanas; o *hs1pro-1* (nº. de acesso no *GenBank* AF280812), responsável pela resistência da beterraba-açucareira (*Beta vulgaris*) ao nematoide *Heterodera schachtii*, e o gene *stb-2* (nº. de acesso no *GenBank* BF008742), que codifica a enzima sulfotransferase hidroxisteroide preferring 2, envolvida na reação de hipersensibilidade em plantas. Segundo os autores, tais genes tiveram suas expressões induzidas somente em plantas de soja resistentes e inoculadas com o nematoide.

O objetivo deste trabalho foi confirmar a expressão diferencial em soja dos genes *chs*, *xet*, *hs1pro-1*, *stb-2*, previamente identificados por Wendland *et*

al. (2004), bem como determinar os níveis de expressão dos mesmos por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), técnica que apresenta maior sensibilidade e precisão para quantificação de alterações nos níveis de expressão de genes individuais.

Material e Métodos

Para a obtenção do inóculo (suspensão de J₂), uma população pura de *M. javanica* foi multiplicada em plantas de soja da cultivar Embrapa 20 (Doko RC), mantidas em casa de vegetação da Embrapa Soja, em Londrina (PR). Para a extração dos ovos do nematoide, raízes com galhas foram coletadas dos vasos, lavadas para eliminação do solo aderente e trituradas em liquidificador, em presença de hipoclorito de sódio 0,5 %, como proposto por Boneti & Ferraz (1981). Em seguida, a suspensão de ovos foi colocada em câmara de eclosão, mantida em temperatura de 26 °C. Durante três dias, a cada 24 horas, os J₂ foram recolhidos e armazenados em geladeira. Decorrido este período, os J₂ foram quantificados com o auxílio de câmara de Peters e microscópio óptico, e preparou-se uma suspensão contendo 680 J₂ / ml.

Sementes dos parentais (PI 595099 e BRS 133), de três linhagens resistentes (JF 7056, JF 7002, JF 7027) e de três linhagens suscetíveis (266-S, 256-S, 259-S) foram colocadas para germinar em areia, dez sementes

por genótipo. Após sete dias, plântulas com radículas maiores que 2 cm foram transferidas (uma por recipiente) para tubetes plásticos contendo areia. Em metade dos tubetes (40 tubetes), simultaneamente ao transplântio, cada planta foi inoculada com 680 J₂. Após um, três e seis dias, raízes de plantas de todos os genótipos, inoculados e não inoculados, foram retiradas dos tubetes, lavadas e cortadas próximo à região meristemática. Na sequência, estas raízes foram armazenadas em ultrafreezer (-80 °C), até o momento da extração de RNA total. Para efeito de comprovação do sucesso da infecção, no momento das coletas, uma amostra de raízes de plantas inoculadas de cada um dos genótipos foi separada e colorida com solução corante, preparada com 3,5 g de fucsina ácida + 250 ml de ácido acético glacial + 750 ml de água destilada (adaptado de Byrd *et al.*, 1983).

Para a extração de RNA total, foi utilizada a metodologia descrita por Chomczynski & Sacchi (1987) e utilizado o reagente trizol (Reagent, Life Technologies Cat 15596-026). Extraído o RNA,

procedeu-se à síntese de cDNA com o auxílio de *primers* oligo dT. Os cDNAs oriundos das três épocas de coletas de raízes foram reunidos, respeitando-se os diferentes tratamentos (Tabela 1). Em cada tratamento foram juntadas em *bulk* cDNA proveniente de três plantas de cada genótipo, um por tempo de coleta. Uma curva de eficiência foi feita com diferentes concentrações de cDNA para todos os pares de *primers*, *chs* F / R, *xet* F / R, *hs1pro-1* F / R, *stb-2* F / R (Tabela 2), a fim de determinar a eficiência de cada sistema de quantificação, de modo a garantir que não ocorra diferenças na eficiência dos alvos e o normalizador. A reação foi incubada por 50 °C por 2 minutos e seguida por 95 °C por 2 minutos. A ciclagem foi em 45 ciclos com temperaturas de desnaturação 95 °C por 15 segundos, anelamento a 62 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. As reações de RTq-PCR foram preparadas em triplicatas. Os genes alvos e o normalizador foram amplificados em diferentes tubos, mas na mesma placa de reação, sendo utilizado o sistema SYBR Green. Todas as análises de expressão gênica foram

Tabela 1 - Relação dos materiais usados para junção dos cDNAs para avaliação dos níveis de expressão gênica por RT-qPCR.

Tratamento	Genótipo de soja
Parental 1	'BRS 133' inoculada
Parental 2	'BRS 133' não inoculada
Parental 3	'PI 595099' inoculada
Parental 4	'PI 595099' não inoculada
População 1	'266-S' inoculada
População 2	'266-S' não inoculada
População 3	'256-S' inoculada
População 4	'256-S não inoculada
População 5	'259-S' inoculada
População 6	'259-S' não inoculada
População 7	'JF 7027' inoculada
População 8	'JF 7027' não inoculada
População 9	'JF 7002' inoculada
População 10	'JF 7002' não inoculada
População 11	'JF 7056 inoculada
População 12	'JF 7056' não inoculada'

Tabela 2 - Sequências dos *primers forward* e *reverse* utilizadas para amplificação dos genes quantificados pela técnica de RT-qPCR.

Gene	Primer forward	Primer reverse
<i>Chs</i>	5'CAGGCACAAAGGGCAGAAG3'	5'GGTTTGGTGGGTTTGCAGTT3'
<i>stb-2</i>	5'CTATGGGAGTCACAACCTTTACACA3'	5'GGCCTTGAACATGCGTGAT3'
<i>hs1pro-1</i>	5'TCACGCCGCACCTTCTGT3'	5'TGAGTTGAGGAAGACGGAGATAGTAG3'
<i>xet</i>	5'GACCTCTGGCTCTGGATTTTCG3'	5'AGGAATGAGTACTTGTTTGGA3'

feitas utilizando-se o programa *Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems). Como calibrador, foi utilizada a amostra não inoculada de cada genótipo para comparação do padrão de expressão dos genes antes e após a inoculação.

Resultados e Discussão

A presença de juvenis do nematoide corados pela fucsina ácida no interior das raízes confirma que a inoculação foi eficiente para ambos os genótipos, resistentes e suscetíveis, nas três datas de coleta (Figura 1).

A análise do nível de expressão no parental resistente revelou a expressão diferencial dos genes *xet*, *bs1pro-1* e *chs*. Os aumentos de expressão verificados foram de 3,78, 2,54 e 1,29 vezes, respectivamente. Para o gene *stb-2*, a inoculação não resultou em expressão diferencial no parental resistente (Figura 2). No parental suscetível, em todos os genes estudados praticamente não houve alteração nos níveis de mRNA em função da inoculação do nematoide. Ocorreu apenas uma ligeira redução. Tais resultados indicam um padrão diferencial de expressão destes genes entre os parentais resistentes e suscetíveis.

A análise dos mesmos genes, realizada em linhagens oriundas do cruzamento BRS 133 \times PI 595099 mostrou que entre os indivíduos resistentes da população, todos apresentaram aumento nos níveis de expressão na presença do patógeno, exceto o indivíduo JF 7056 quando avaliado a expressão do

gene *chs*. Para este gene, a inoculação no indivíduo JF 7056 resultou em uma leve redução do nível de expressão (Figura 3). Entre os indivíduos resistentes, o que mais se destacou foi JF 7002. Este apresentou, após a inoculação, os maiores níveis de expressão para todos os quatro genes testados, atingindo um aumento na expressão de até 85 vezes do gene *xet*. Esta observação faz sentido, uma vez que nos estudos de Silva *et al.* (2002), utilizando este genótipo, quando inoculado com *M. javanica* apresentou o menor número de galhas por planta. Segundo estes autores, esta característica pode indicar maior nível de resistência ao nematoide. Outro interessante dado referente a esta população foi conduzido por Fuganti *et al.* (2009), que demonstraram em ensaios *in vitro* a correlação da resposta de resistência destes indivíduos com a expressão de um marcador gênico 176 Soy HSP, localizado na região promotora do gene Gmhsp 17.6-L, que codifica uma proteína de choque térmico de baixo peso molecular presente na soja. Os mesmos autores demonstraram que os níveis de mRNA nos diferentes indivíduos oriundos deste cruzamento correlacionavam-se com o número de repetições AT dentro da região promotora identificada, sendo que os maiores níveis de expressão do gene Gmhsp 17.6-L, foram obtidos no indivíduo JF 7002, justamente o que apresentou o maior tamanho de repetições AT (33), comparado com os indivíduos suscetíveis.

Nas populações suscetíveis também foi observado aumento nos níveis de expressão dos genes avaliados,

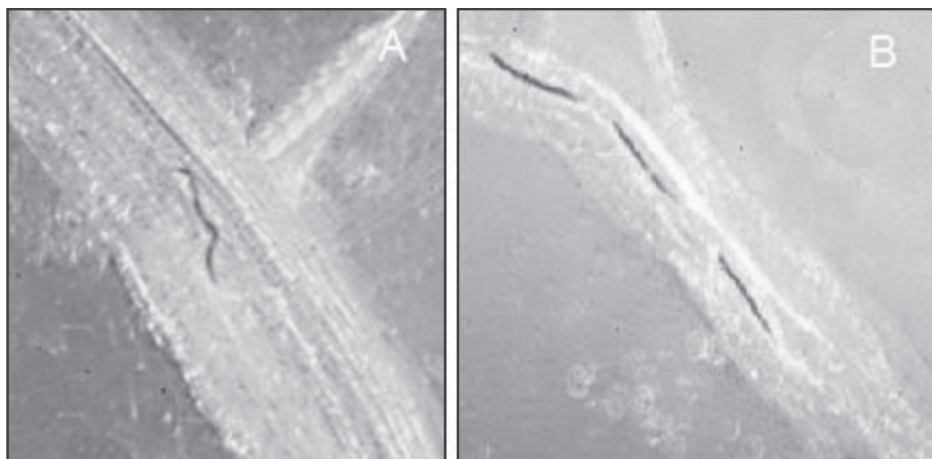


Figura 1 - J₂ de *M. javanica* corado com fucsina ácida, no interior de raízes de plantas de soja inoculadas: **A)** parental resistente (PI 595099), **B)** parental suscetível (BRS 133).

exceto para o gene *xet*, no indivíduo (266-S) da população suscetível, e para o gene *chs*, no indivíduo 259-S. Tal resultado indica uma provável segregação de caracteres de efeitos maior e menor na população oriunda deste cruzamento.

Os genes *chs*, *xet*, *sth-2* e *hs1pro-1* estão provavelmente associados a processos de resposta da planta à infecção pelo nematoide como, por exemplo, a síntese de fitoalexinas, o espessamento de parede celular, patogenicidade e resistência a patógenos. Jammes *et al.* (2005) verificaram, por meio da técnica de microarranjos de DNA, que esses genes de resposta da planta à infecção também são diferencialmente expressos em raízes de soja inoculadas com *Meloidogyne incognita*.

O gene *chs* codifica a enzima chalcona sintase, que é chave na rota da biossíntese de fenilpropanóides,

como as fitoalexinas, compostos antimicrobianos de baixo peso molecular sintetizados e acumulados nas plantas expostas a microrganismos, a certos patógenos ou outros estresses abióticos (Dixon & Paiva, 1995). A síntese destes compostos também foi observada em reposta à penetração de nematoides (Huang, 1985). No presente trabalho, a inoculação com *M. javanica* resultou em aumento de expressão do gene *chs* em ambos, parental resistente e populações resistentes JF 7002 e JF 7027.

O gene *sth-2* participa da reação de hipersensibilidade em plantas e faz parte de uma classe distinta de proteínas relacionadas à patogenicidade (Matton & Brisson, 1989). A hipersensibilidade é caracterizada pela morte rápida das células dos tecidos infectados da planta, em resposta a ataques de patógenos. A necrose resultante localiza o patógeno

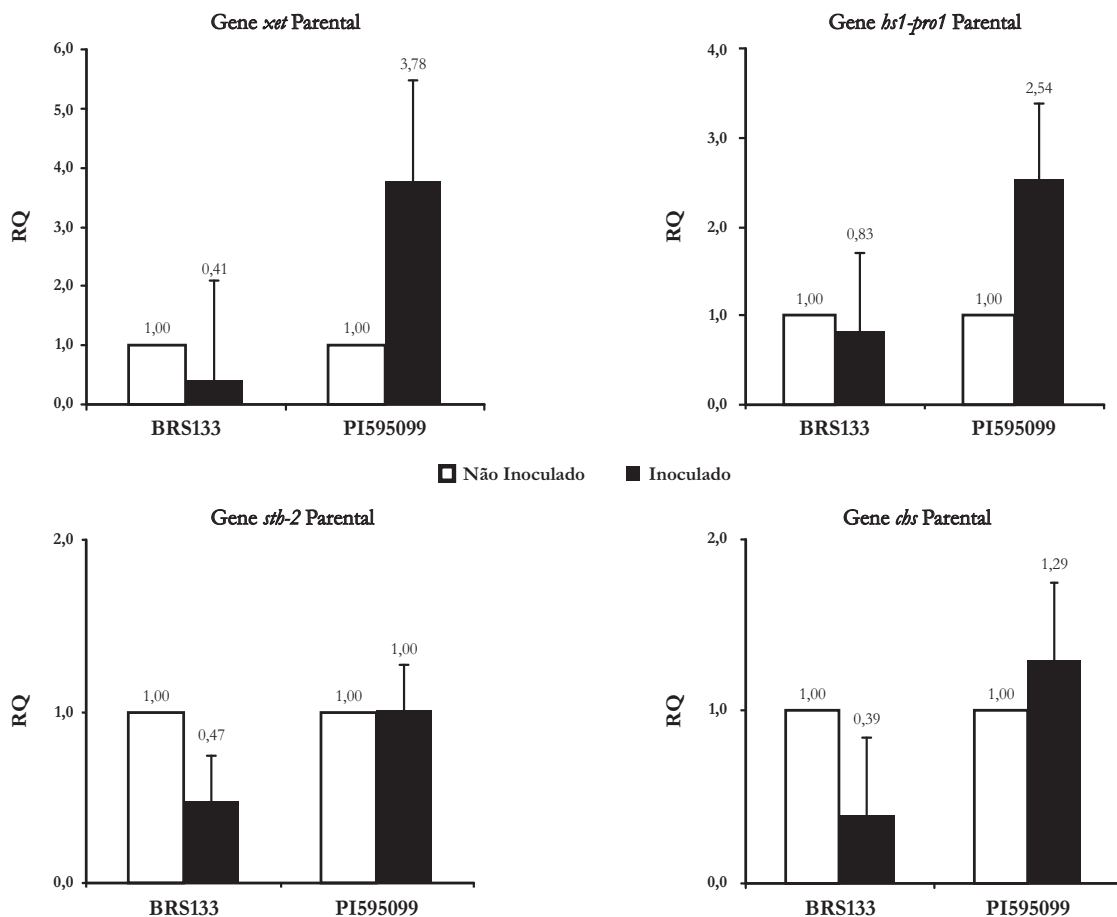


Figura 2 – Níveis de expressão dos genes *xet*, *chs* e *sth-2* em indivíduos dos parentais suscetível e resistente, inoculado e não-inoculado com *M. javanica*. A barra indica o erro padrão.

invasor e previne o seu desenvolvimento. Embora a reação de hipersensibilidade já tenha sido bastante estudada em doenças causadas por fungos, vírus e bactérias, ela é pouco entendida no caso de nematoides. Entretanto, no caso de nematoides do gênero *Meloidogyne*, já está provado que a mesma está intimamente relacionada com a resistência das plantas (Huang, 1985). No presente trabalho, a inoculação de *M. javanica* nos indivíduos da população resultou em aumento do nível de expressão do gene *stb-2* em todos os genótipos de soja resistentes estudados. Na análise da população segregante, utilizando os indivíduos não inoculados como calibrador, a linhagem JF 7002 teve a expressão do gene *stb-2* aumentada em 23,08 vezes. A expressão do gene *stb-2* também pode ser observada em todos os indivíduos suscetíveis, sendo que no 259-S atingiu até 18 vezes mais que no controle,

não inoculado, superior aos genótipos resistentes, exceto em JF 7002. Tal observação pode ser explicada pelo fato da proteína *STH-2* não ser um componente direto da primeira linha de defesa de plantas contra patógenos, mas sim uma resposta secundária à infecção. Esta proteína poderia ser requerida para a reestruturação de componentes celulares, ou para o retorno ao metabolismo normal da planta, quando o desenvolvimento do patógeno fosse interrompido, características essas não encontradas em genótipos resistentes (Constabel & Brisson, 1992). Vale ressaltar ainda que muitos genes relacionados às respostas de defesa em plantas são ativados tanto em genótipos resistentes como suscetíveis, no entanto a diferença está relacionada ao tempo de ativação dos mesmos, sendo mais rápida nos resistentes, ou seja, em interações

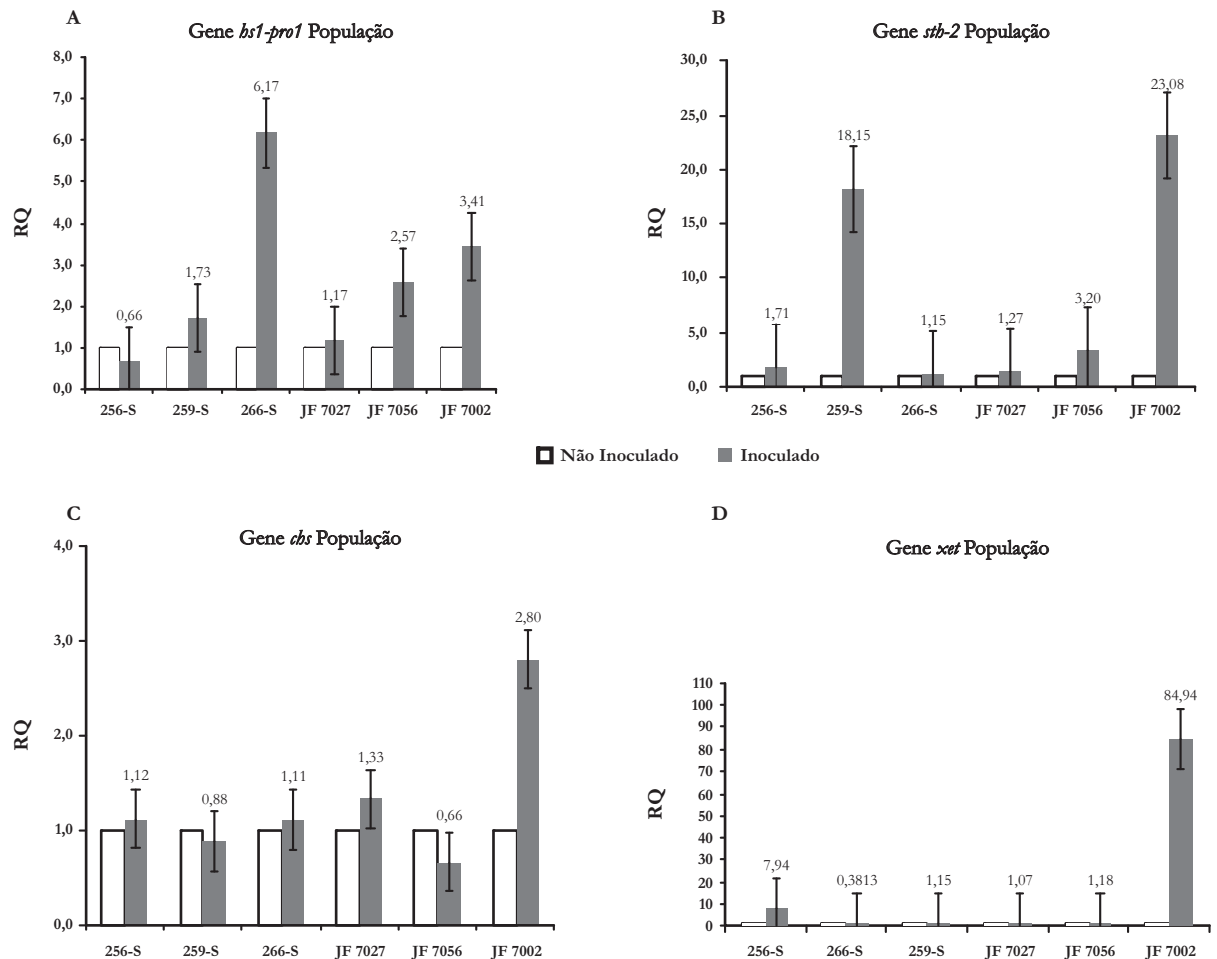


Figura 3 – Níveis de expressão dos genes *xet*, *chs* e *stb-2* em indivíduos das populações suscetível e resistente, inoculados e não-inoculados com *M. javanica*. **A)** *bs1-pro-1*, **B)** *stb-2*, **C)** *chs*, **D)** *xet*. A barra indica o erro padrão.

incompatíveis. Tal fato foi observado em genótipos de soja resistentes e suscetíveis inoculados o fungo da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) em análises de microarranjos avaliando desde as horas iniciais até dias após a inoculação (van de Mortel *et al.*, 2007).

O gene *xet* codifica a enzima xiloglucana endotransglicosilase, envolvida em processos de modificação da parede celular das plantas, incluindo a síntese e a degradação de compostos. Esta enzima permite a expansão da célula sem danificar sua estrutura, provavelmente, por alterar a estrutura da parede pela adição de novos polímeros de xiloglucanas (Campbell & Braam, 1999). A análise de expressão do gene nos parentais mostrou que o *xet* teve sua expressão aumentada 3,76 vezes nos indivíduos resistentes inoculados. Na análise da população segregante, utilizando os indivíduos não inoculados como calibrador, a linhagem JF 7002 teve a expressão do gene *xet* aumentada 84,94 vezes. Este aumento na expressão do gene sugere que a enzima XET está relacionada com o mecanismo de defesa das plantas deste genótipo à infecção de *M. javanica*. Possivelmente, o aumento da expressão do gene acarreta em aumento a espessura da parede celular da planta, impedindo que o nematoide consiga se estabelecer adequadamente. Outros estudos também mostram que o gene *xet* é expresso em genótipos de soja (Khan *et al.*, 2004) e *Arabidopsis* (Jammes *et al.*, 2005), quando esses são inoculados com nematoides.

O aumento da atividade da enzima XET também foi detectado seis horas após a inoculação com cuscuta (*Cuscuta reflexa*) em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). A XET foi induzida durante a fase inicial da interação e o ferimento não influenciou na expressão da enzima. Este resultado sugere que esta enzima tem um papel importante na reação de defesa em interações incompatíveis como em cuscuta-tomateiro (Albert *et al.*, 2004).

O *hs1pro-1* é um gene de resistência (R) encontrado em beterraba-açucareira, específico para conferir resistência ao nematoide de cisto (*H. schachtii*). O *hs1pro-1* pertence a uma classe de genes de resistência (R), em que a proteína codificada apresenta regiões ricas em leucina e um domínio transmembrana (Thurau *et al.*, 2003). Em raízes de beterraba resistentes ao nematoide, esta proteína promove a necrose celular

no local de infecção, rompe as células de alimentação do nematoide e promove a degradação do síncito e a consequente morte dos juvenis (Holtmann *et al.*, 2000). No entanto, nenhuma similaridade foi encontrada em bancos de dados de genes de seqüências conhecidas, de modo que sua função específica permanece desconhecida (Thurau *et al.*, 2003).

No presente trabalho, no parental resistente inoculado com *M. javanica* foi verificado um aumento de 2,54 vezes no nível de expressão do gene *hs1pro-1*. Todos os indivíduos resistentes da população segregante, quando inoculados, também apresentaram aumento no nível de expressão. Este aumento na expressão do gene *hs1pro-1* nos genótipos resistentes inoculados, sugere que o mesmo pode estar envolvido na degeneração das células gigantes, como acontece com os síncitos em plantas de beterraba-açucareira resistentes a *H. schachtii*. Os gêneros *Heterodera* e *Meloidogyne* fazem parte de mesma família (Tihohod, 1993). O baixo nível de expressão do gene *hs1pro-1* nos genótipos resistentes não inoculados pode ser explicado pela necessidade da planta em reconhecer o nematoide, para então iniciar a reação de resistência. Por outro lado, o aumento na expressão do gene também nas populações suscetíveis 259-S e 266-S contraria tal raciocínio. Por se tratar de um gene de resistência, a explicação para aumento nos níveis de expressão detectados nos indivíduos suscetíveis, sendo que em 266-S foi superior a todos os resistentes (6,17), poderia ser a inespecificidade do sistema de detecção, visto que genes R apresentam diversos domínios conservados, ou ainda a ocorrência de algum tipo de regulação gênica pós-transcricional, não avaliada neste trabalho.

Thurau *et al.* (2003) estudaram a regulação transcricional do gene *hs1pro-1* em resposta a vários estresses. Seus resultados demonstraram que a expressão do gene somente ocorre depois da infecção do nematoide. Segundo os autores, a ativação é transcricional e tecido específica, ou seja, restrita ao sítio de alimentação do nematoide. Thurau *et al.* (2003) também observaram que estresses abióticos não são capazes de induzir a expressão do gene *hs1pro-1*.

A ativação transcricional tecido específico do gene

hs1pro-1 provavelmente aumenta a quantidade da proteína *HS1PRO-1* dentro das células de alimentação do nematoide, induzindo a resistência da planta. Esta hipótese é apoiada por observações citológicas em raízes de beterraba onde J_2 de *H. schachtlii* puderam invadir as raízes, ir para o cilindro vascular, iniciar a formação do sincício, porém este não se desenvolveu devido à formação de agregações na membrana e se degenerou. Consequentemente, ocorreu a morte dos juvenis (Holtmann *et al.*, 2000). Explorar o papel da proteína *HS1PRO-1* com relação à formação dessas agregações na membrana é um passo fundamental para se poder entender a função do gene *hs1pro-1* na resistência de plantas a nematoides.

A confirmação da expressão diferencial dos genes aqui estudados e a sua ligação com mecanismo de defesa contra o ataque de *M. javanica* poderá permitir o uso desses genes como marcadores moleculares em programas de melhoramento que busquem genótipos mais resistentes. Vislumbra-se testar tais genes utilizando ferramentas de engenharia genética, através de superexpressão ou inativação dos mesmos, a fim de confirmar seu envolvimento com os fenótipos de resistência e suscetibilidade avaliados, a fim de compreender melhor as respostas moleculares a este patógeno. A manipulação de genes responsivos a estresses bióticos, como observados neste trabalho, pode ser uma estratégia interessante na geração de resistência em diferentes espécies vegetais hospedeiras. Análises futuras serão feitas comparando os níveis de expressão nos tempos individuais, um, três e seis dias após a inoculação, a fim de verificar a variação temporal na expressão gênica dos genes estudados.

Literatura Citada

- ALBERT, M., M. WERNER, P. PROKSCH, P.C. FRY & R. KALDENHOFF. 2004. The cell wall-modifying xyloglucan endotransglycosylase / hydrolase LeXTH1 is expressed during the defence reaction of tomato against the plant parasite *Cuscuta reflexa*. *Plant Biology*, 4: 402-407.
- BYRD, J.R.D.W., J.E. KIRKPATRICK & K.R. BARKER. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, 15 (1): 142-143.
- BONETTI, J.I.S. & FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6 (3): 553.
- CAMPBELL, P. & J. BRAAM. 1999. Xyloglucan endotransglycosylases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. *Trends in Plant Science*, 4: 361-366.
- CHOMCZYNSKI, P. & N. SACCHI. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162: 156-159.
- CONSTABEL, C.P. & N. BRISSON. 1992. The defense-related sth-2 gene product of potato shows race-specific accumulation after inoculation with low concentrations of *Phytophthora infestans* zoospores. *Planta*, 188: 289-295.
- DIXON, R.A. & N.L. PAIVA. 1995. Stress induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7: 1085-1097.
- FUGANTI, R., M.F.P.S. MACHADO, V.S. LOPES, J.F.V. SILVA, C.A.A. ARIAS, S.R.R. MARIN, E. BINNECK, R.V. ABDELNOOR, F.C. MARCELINO & A.L. NEPOMUCENO. 2009. Promoter region analysis of a glycine max small heat-shock protein gene (*Gmhsp17.6-1*) in soybean plants resistant and susceptible to *Meloidogyne javanica*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GENÉTICA MOLECULAR DE PLANTAS, II, Búzios (RJ). Anais, p. 95.
- HOLTMANN, B., M. KLEINE & F.M.W. GRUNDER. 2000. Ultrastructure and anatomy of nematode induced syncytia in roots of susceptible and resistant sugar beet. *Protoplasma*, 211: 39-50.
- HUANG, J.S. 1985. Mechanisms of resistance to root-knot nematodes. In: SASSER, J.N. & C.C. CARTER (ed). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Biology and Control, Raleigh (NC) EUA, p. 11-17.
- JAMMES, F., P. LECOMTE, J. ALMEIDA-ENGLER, F. BITTON, M.L. MARTÍN-MAGNIETTE, J.P. RENOU, P. ABAD & B. FAVERY. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 44: 447-458.
- KHAN, R., N. ALKHAROUF, H. BEARD, M. MACDONALD, I. CHOUKHA, S. MEYER, J. GREFFENSTETTE, H. KNAP & B. MATTHEWS. 2004. Microarray analysis of gene expressions in soybeans roots susceptible to the soybean cyst nematode two days post invasion. *Journal of Nematology*, 36(3): 241-248.
- MATTON, D.P. & N. BRISSON. 1989. Cloning, expression, and sequence conservation of pathogenesis-related gene transcripts of potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2(6): 325-331.
- SILVA, J.F.V., G.E.S. CARNEIRO, J.T. YORINORI, A.M.R. ALMEIDA, C.A.A. ARIAS, R.A.S. KIHHL, L.A. ALMEIDA, E. OLIVEIRA, C.G. LIMA, I.C. SCHÖBER, G. GOULART, G.M.G. AGLIOLIERI, J.I. GOMES, N.V. SOUZA & L.C. BENATO. 2002. Contribuição ao Desenvolvimento de Linhagens de Soja com Resistência a Patógenos. Embrapa Soja, Londrina, 43 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento).

- THURAU, T., S. KIFLE, C. JUNG & D. CAI. 2003. The promoter of the nematode resistance gene *hs1pro-1* activates a nematode-responsive and feeding site-specific gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 52: 643-660.
- TIHOHOD, D. 1993. *Nematologia Agrícola Aplicada*. FUNEP, Jaboticabal (SP), 372 p.
- VAN DE MORTEL, M., RECKNOR, J. C., GRAHAM, M. A., NETTLETON, D., DITTMAN, J. D., NELSON, R. T., GODOY, C. V., ABDELNOOR, R. V., ALMEIDA, A. M. R., BAUM, T. J., WHITHAM, S. A. 2007. Distinct biphasic mRNA changes in response to Asian soybean rust infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20: 887-899.
- WENDLAND, A., A.L. NEPOMUCENO, J.F.V. SILVA, J.O.M. MENTEN, E. BINNECK, S.R.R. MARIN, C.A. SILVEIRA, A.M.R. MORALES, R.F. TRAVENSOLO, L.C. ALVES, T. LOPES & E.G.M. LEMOS. 2004. Genetic expression of soybeans: *Meloidogyne javanica* interaction revealed by analyses of microarrays. In: *World Soybean Research Conference, VII, Foz do Iguaçu (PR)*. Anais, p. 320.

Reação de Espécies de Plantas Daninhas a *Meloidogyne incognita* Raças 1 e 3, a *M. javanica* e a *M. paranaensis*

Ana Paula do A. Mônaco^{1*}, Rui G. Carneiro², Walter M. Kranz², José Carlos Gomes²,
Alexandra Scherer¹ & Débora C. Santiago¹

¹Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid - BR 445 km 380, C. Postal 6001,
86051-990 Londrina (PR) Brasil.

²Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR, Rodovia Celso Garcia Cid - BR 445 km 375, C. Postal 481,
86047-902 Londrina (PR) Brasil.

*Autora para correspondência: anapaulamonaco@yahoo.com.br

Recebido para publicação em 26 / 01 / 2009. Aceito em 22 / 08 / 2009

Editado por Guilherme Asmus

Resumo - Mônaco A.P.A., R.G. Carneiro, W.M. Kranz, J.C. Gomes, A. Scherer & D.C. Santiago. 2009. Reação de espécies de plantas daninhas a *Meloidogyne incognita* raças 1 e 3, a *M. javanica* e a *M. paranaensis*.

Os nematóides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) estão amplamente distribuídos em lavouras de diversas espécies anuais e perenes no Brasil, causando grandes perdas para os produtores e para a economia do país. As plantas daninhas que crescem junto às lavouras podem multiplicar o inóculo de nematoides e garantir a manutenção de altas densidades populacionais desses organismos patogênicos no solo. Com o objetivo de conhecer a reprodução dos nematoides *Meloidogyne incognita* raças 1 e 3, *M. javanica* e *M. paranaensis* em plantas daninhas, avaliaram-se 60 espécies em casa de vegetação do Instituto Agronômico do Paraná. Para tanto, plântulas de cada uma das espécies foram individualmente inoculadas com suspensão de 5.000 ovos e juvenis de segundo estágio (J₂) de cada nematoide e mantidas por 60 dias. Após esse período, procedeu-se à extração e contagem de ovos e J₂ dos sistemas radiculares, e os fatores de reprodução (FR = população final / população inicial) foram estimados. As espécies vegetais com FR médio menor que 1,0 foram consideradas resistentes, com FR médio maior ou igual a 1,0 suscetíveis e iguais a zero, imunes. Tomateiros 'Rutgers' foram utilizados como testemunhas da viabilidade dos inóculos. Cinquenta e sete espécies foram avaliadas para *M. incognita* raça 1, sendo que 42,10 % das plantas comportaram-se como resistentes, 40,35 % suscetíveis e 17,54 % imunes. Quanto a *M. incognita* raça 3, foram avaliadas 54 plantas daninhas e observou-se que 35,18 % foram resistentes, 46,29 % suscetíveis e 18,51 % imunes. Cinquenta e cinco espécies foram avaliadas para *M. javanica*, sendo que 27,27 % foram resistentes, 56,36 % suscetíveis e 16,36 % imunes. Quarenta e sete plantas foram avaliadas para *M. paranaensis*, sendo que 40,42 % foram imunes, 36,17 % suscetíveis e 23,40 % resistentes.

Palavras-chaves – plantas invasoras, reprodução, resistência, suscetibilidade, nematoide-das-galhas.

Summary – Mônaco A.P.A., R.G. Carneiro, W.M. Kranz, J.C. Gomes, A. Scherer & D.C. Santiago. 2009. Reaction of weed species to *Meloidogyne incognita* races 1 and 3, *M. javanica* and *M. paranaensis*.

Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) are widely distributed in Brazilian crops causing severe losses to producers and to the economy of the country. Weeds that grow close to the cash crops can multiply the inoculum of nematodes and guarantee the maintenance of high density populations of these pathogenic organisms. Aiming to assess the reproduction of *Meloidogyne incognita* races 1 and 3, *M. javanica* and *M. paranaensis*, 60 species of weeds were studied. Three experiments were carried out in completely randomized design with ten repetitions in greenhouses at Instituto Agronômico do Paraná. Seedlings of each weed were individually inoculated with 5,000 eggs and second stage juveniles (J₂) and maintained in greenhouses for 60 days. After this period, the eggs and J₂ were extracted and counted and the reproduction factors (RF = final population /

initial population) were estimated. Weed species with average RF < 1.0 were considered resistant, with average RF > 1.0, susceptible, and RF = 0, immune. Plants of tomato 'Rutgers' were used to test the inoculum viability. Fifty-seven species were evaluated for *M. incognita* race 1, with 42.10 % of the plants considered resistant, 40.35 % susceptible and 17.54 % immune to the nematode. For *M. incognita* race 3, 54 weeds were evaluated and it was observed that 35.18 % of the species were resistant, 46.29 % susceptible and 18.51 % immune. Fifty-five plants species were evaluated for *M. javanica*, with 27.27 % resistant, 56.36 % susceptible and 16.36 % immune. Forty-seven species were evaluated for *M. paranaensis*, with 40.42 % considered immune, 36.17 % susceptible and 23.40 % resistant.

Key words – weeds, reproduction, resistance, susceptibility, root-knot nematodes.

Introdução

Plantas daninhas são aquelas que crescem espontaneamente em solos agrícolas ou em outras áreas de interesse do homem onde são indesejáveis (Voll, 2005). As plantas daninhas constituem sério problema na produção de culturas econômicas, podendo afetá-las diretamente pela competição por luz, umidade, espaço, água e nutrientes e, indiretamente, por multiplicarem o inóculo e garantir a manutenção de organismos patogênicos (Ferraz *et al.*, 1983; Voll, 2005). Em áreas infestadas com nematoides, os prejuízos causados por plantas daninhas aumentam, uma vez que muitas são hospedeiras naturais desses parasitos, abrigando-os na ausência de plantas cultivadas e dificultando tanto o controle do patógeno, como o manejo das lavouras infestadas (Lordello *et al.*, 1988).

Segundo Sasser (1980), um dos maiores obstáculos à produção de alimentos no mundo é o parasitismo por nematoides de galhas (*Meloidogyne*). Eles apresentam ampla distribuição geográfica, com ocorrência registrada em quase todos os países do mundo, atacam extensa gama de plantas hospedeiras, interagem com fungos, bactérias, vírus e outros nematoides nas doenças do tipo complexas, e ainda são de difícil controle.

No Brasil, a capacidade de plantas daninhas hospedarem as espécies *M. incognita*, *M. javanica* ou *M. paranaensis*, foi demonstrada por Ferraz (1961), Lordello (1969), Rebel *et al.* (1974), Huang & Cupertino (1976), Zem (1977), Ponte *et al.* (1977), Antonio & Lehman (1978), Ferraz *et al.* (1978), Ponte *et al.* (1981), Ponte *et al.* (1982), Ferraz *et al.* (1982), Brito & Ferraz (1987), Lordello *et al.* (1988), Silva & Carneiro (1992), Mauch & Ferraz (1996), Asmus &

Andrade (1997), Lordello *et al.* (1998), Dias *et al.* (1998), Werlang & Santos (2000), Roesse & Oliveira (2004), Asmus *et al.* (2005) e Mônaco (2008). Entretanto, poucas das plantas daninhas avaliadas nesses trabalhos foram testadas frente a todos os principais nematoides do gênero *Meloidogyne* que ocorrem no Estado do Paraná.

O objetivo deste estudo foi estimar as taxas de reprodução dos nematoides *M. incognita* raças 1 e 3, *M. javanica* e *M. paranaensis* em diferentes espécies de plantas daninhas coletadas no Estado do Paraná.

Material e Métodos

As reações aos nematoides *Meloidogyne incognita* raças 1 e 3, *M. javanica* e *M. paranaensis* foram avaliadas em 57, 54, 55 e 47 espécies de plantas daninhas (Tabela 1). Os experimentos foram desenvolvidos em casa-de-vegetação do Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, em Londrina (PR), em delineamento experimental inteiramente casualizado com dez repetições. As sementes das plantas daninhas foram coletadas em diferentes lavouras nos municípios paranaenses de Umuarama, Xambê, Miraselva, Centenário do Sul, Rolândia e Londrina e colocadas para germinar em substrato contido em vasos plásticos de 500 cm³. O substrato usado nos experimentos foi constituído de uma mistura de areia e terra na proporção 2:1 desinfestada por autoclavagem por duas horas em temperatura de 120 °C. Duas semanas após a emergência, as mudas foram transplantadas manualmente para outros vasos contendo o substrato já citado, mantendo-se uma planta por vaso.

Para a identificação das espécies das plantas daninhas coletadas no campo procedeu-se a herborização segundo recomendações do Instituto de

Tabela 1 – Espécies de plantas daninhas avaliadas a *Meloidogyne incognita* raça 1 e 3, *M. javanica* e a *M. paranaensis*.

Nome vulgar	Nome científico
Amendoim-bravo	<i>Euphorbia heterophylla</i> L.
Ançarinha-branca	<i>Chenopodium album</i> L.
Anserina-rendada	<i>Chenopodium carinatum</i> R.Br.
Apaga-fogo	<i>Alternanthera tenella</i> Colla
Beldroega-graúda	<i>Talinum triangulare</i> (Jacq.) Willd
Borragem-crista-de-galo	<i>Heliotropium transalpinum</i> Vell.
Botão-de-ouro	<i>Siegesbeckia orientalis</i> L.
Buva-do-chile	<i>Conyza primulifolia</i> (Lam.) Cuatrec. & Lourteig
Capim-amargoso	<i>Digitaria insularis</i> (L.) Mez ex Ekman
Capim-arroz	<i>Echinochloa colonum</i> (L.) Link.
Capim-barbicha-de-alemão	<i>Eragrostis pilosa</i> (L.) P. Beauv.
Capim-braquiária	<i>Brachiaria decumbens</i> Stapt.
Capim-carrapicho	<i>Cenchrus echinatus</i> L.
Capim-de-estrada	<i>Paspalum urvillei</i> Steudel.
Capim-de-rola	<i>Eragrostis ciliaris</i> (L.) Link
Capim-favorito	<i>Rhynchelytrum repens</i> (Willd.) C.E. Hubb.
Capim-massambará	<i>Sorghum halepense</i> (L.)Pers.
Carrapicho-beiço-de-boi	<i>Desmodium tortuosum</i> (Sw.) DC.
Carrapicho-de-carneiro	<i>Acanthospermum hispidum</i> DC.
Caruru-de-espinho	<i>Amaranthus spinosus</i> L.
Caruru-roxo	<i>Amaranthus hybridus</i> L.
Caruru-verde	<i>Amaranthus viridis</i> L.
Castanheiro-do-brejo	<i>Caperonia palustris</i> (L.) A.St.-Hil.
Catirina	<i>Hyptis lophanta</i> Mart. ex Benth.
Cipó-de-veado	<i>Polygonum convolvulus</i> L.
Corda-de-viola	<i>Merremia cissoides</i> (Lam.)Hafl.
Corda-de-viola	<i>Ipomoea purpurea</i> L.
Corda-de-viola	<i>Ipomoea nil</i> (L.) Roth.
Cordão-de-frade	<i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) R. Br.
Cravo-de-defunto	<i>Tagetes minuta</i> L.
Erva-de-bicho	<i>Polygonum persicaria</i> L.
Erva-de-botão	<i>Eclipta alba</i> (L.) Hassk.
Erva-de-pai-caetano	<i>Verbena litoralis</i> Kunth
Erva-de-touro	<i>Tridax procumbens</i> L.
Erva-grossa	<i>Elephantopus mollis</i> Kunth
Erva-santa-maria	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.
Falsa-serralha	<i>Emilia sonchifolia</i> (L.) DC.
Fedegoso	<i>Senna obtusifolia</i> (L.) H.S.Irwin & Barneby
Gervão-branco	<i>Croton glandulosus</i> L.
Gramma-touceiro	<i>Paspalum paniculatum</i> L.
Guanxuma	<i>Sida rhombifolia</i> L.
Joá-bravo	<i>Solanum sisymbriifolium</i> Lam.
Joá-de-capote	<i>Physalis angulata</i> L.
Losna-branca	<i>Parthenium hysterophorus</i> L.
Losna-do-campo	<i>Ambrosia elatior</i> L.
Macela	<i>Gamochoeta spicata</i> (Lam.) Cabrera
Maravilha	<i>Mirabilis jalapa</i> L.
Maria-gorda	<i>Talinum paniculatum</i> (Jacq.) Gaertn.
Maria-pretinha	<i>Solanum americanum</i> Mill.
Mela-bode	<i>Herissantia crispa</i> L. (Brizicky)
Melão-de-são-caetano	<i>Momordica charantia</i> L.
Mentrasto	<i>Ageratum conyzoides</i> L.
Moa	<i>Setaria italica</i> (L.) Beauv.
Nabiça	<i>Raphanus raphanistrum</i> L.
Picão-branco	<i>Galinsoga parviflora</i> Cav.
Poaia-branca	<i>Richardia brasiliensis</i> Gomes
Rubim	<i>Leonurus sibiricus</i> L.
Serralha	<i>Sonchus oleraceus</i> L.
Trapoceraba	<i>Commelina benghalensis</i> L.
Trevo-azedo	<i>Oxalis corniculata</i> L.

Botânica (1989). As identificações foram realizadas por taxonomista do IAPAR (Tabela 1).

As populações dos nematoides foram obtidas a partir de raízes de cafeeiros infestados no campo (*M. incognita* e *M. paranaensis*) e de lavouras de soja (*M. javanica*). A confirmação das espécies dos nematoides foi feita utilizando-se a técnica de eletroforese para isoenzimas, conforme proposto por Carneiro & Almeida (2001). As raças de *M. incognita* foram definidas através de reações de espécies diferenciadoras, segundo proposto por Taylor & Sasser (1978). As multiplicações destas populações foram feitas em tomateiros (*Lycopersicon esculentum* 'Rutgers', em casa de vegetação do IAPAR.

Os inóculos dos nematoides foram obtidos a partir do sistema radicular das plantas mantidas em casa de vegetação, utilizando-se o método de Hussey & Barker modificado por Boneti & Ferraz (1981). As plantas foram inoculadas entre cinco e 15 dias após o transplante, dependendo da taxa de crescimento de cada espécie, com suspensão de 5.000 ovos + J₂, em três orifícios de aproximadamente 2 cm de profundidade abertos ao redor da planta. Tomateiros 'Rutgers' foram utilizados como testemunhas da viabilidade dos inóculos das quatro populações de nematoides.

Sessenta dias após a inoculação, os sistemas radiculares foram coletados, lavados e processados para extração de ovos de acordo com a técnica já citada; estimou-se então o fator de reprodução médio (FR = população final / população inicial) para cada interação nematoide x planta daninha. As espécies vegetais com $0 < FR < 1$ foram consideradas resistentes, com $FR \geq 1$, suscetíveis e iguais a zero, imunes (Oostenbrink, 1966). Durante o experimento, as médias de temperaturas máximas e mínimas na casa de vegetação foram respectivamente 27,4 e 15,6 °C, com temperatura média de 20,9°C. Para as análises estatísticas, os dados de produção de ovos foram transformados em $\sqrt{x} + 0,5$. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Resultados e Discussão

A viabilidade dos inóculos dos diferentes nematoides pôde ser confirmada pelo número de

ovos produzidos nas plantas de tomate (Tabela 2).

Das espécies avaliadas para *M. incognita* raça 1, 42,10 % comportaram-se como resistentes, 40,35 % suscetíveis e 17,54 % imunes ao nematoide. Quanto a *M. incognita* raça 3, observou-se que 35,18 % foram resistentes, 46,29 % suscetíveis e 18,51 % imunes (Tabela 2). Para *M. javanica* 27,27 % foram resistentes, 56,36 % suscetíveis e 16,36 % imunes, enquanto para *M. paranaensis* 40,42 % foram imunes, 36,17 % suscetíveis e 23,40 % resistentes (Tabela 2).

A produção média de ovos do nematoide *M. incognita* variou de 0 a 205.200 com FR máximo de 41,0 para a raça 1 e de 0 a 506.160 (FR máximo de 101,2) para a raça 3. *M. javanica* produziu de 0 a 249.000 ovos (FR máximo de 49,8), e *M. paranaensis* de 0 a 128.000 ovos, com FR máximo de 25,6. Dentre as plantas daninhas avaliadas, castanheiro-do-brejo foi a mais suscetível para os três primeiros nematoides citados acima, e caruru-roxo a mais suscetível a *M. paranaensis*.

Suscetibilidade simultânea às quatro populações de nematoides avaliadas foram observadas em ançarinha-branca, apaga-fogo, capim-arroz, caruru-roxo, castanheiro-do-brejo, corda-de-viola (*Ipomoea nil*), erva-de-bicho, erva-de-botão, erva-de-pai-caetano, mentrasto e picão-branco. Beldroega-graúda, capim-amargoso e capim-de-rola apresentaram-se como resistentes, e gervão-branco e serralha como imunes aos quatro nematoides estudados.

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho e das informações disponíveis na literatura nacional, elaborou-se a Tabela 3, onde são observadas algumas diferenças quanto à reação das plantas daninhas a uma mesma espécie de nematoide. Essas diferenças podem ser decorrentes das variações de metodologias empregadas nos diferentes trabalhos, de variabilidade intra-específica das plantas daninhas, ou da possível existência de variação fisiológica quanto ao parasitismo dos nematoides.

Uma das táticas de manejo de nematoides fitoparasitos baseia-se no uso de adequada rotação de culturas, que visa a redução da população dos nematoides através do plantio sequencial de plantas não hospedeiras da espécie que se quer controlar. É importante, nesse caso, o conhecimento das espécies hospedeiras de cada nematoide. Em alguns casos a

Tabela 2 - Reação de plantas daninhas inoculadas com 5.000 ovos (PI) das raças 1 e 3 de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. paranaensis* determinada pelo número de ovos (PF) e fator de reprodução (FR).

Espécie	<i>Meloidogyne incognita</i>						<i>Meloidogyne javanica</i>			<i>Meloidogyne paranaensis</i>		
	Raça 1			Raça 3			PF	FR ²	Reação ³	PF	FR ²	Reação ³
<i>Euphorbia heterophylla</i>	3.240 a	0,648	R	40 a	0,008	R	25 a	0,005	R	0 a	0,000	I
<i>Chenopodium album</i>	27.200 c	5,440	S	5.075 a	1,015	S	34.600 b	6,920	S	68.160 e	13,632	S
<i>Chenopodium carinatum</i>	19.822 c	3,964	S	12.685 b	2,537	S	5.822 b	1,164	S	-	-	-
<i>Alternanthera tenella</i>	36.925 c	7,385	S	42.300 b	8,460	S	13.914 b	2,783	S	40.175 d	8,035	S
<i>Talinum triangulare</i>	4.200 a	0,840	R	488 a	0,098	R	275 a	0,055	R	880 a	0,176	R
<i>Heliotropium transalpinum</i>	0 a	0,000	I	257 a	0,051	R	580 a	0,116	R	25 a	0,005	R
<i>Siegesbeckia orientalis</i>	1.314 a	0,263	R	9.257 a	1,851	S	34.600 b	6,920	S	6.000 b	1,200	S
<i>Conyza primulifolia</i>	0 a	0,000	I	100 a	0,020	R	33 a	0,007	R	0 a	0,000	I
<i>Digitaria insularis</i>	340 a	0,068	R	100 a	0,020	R	888 a	0,177	R	171 a	0,034	R
<i>Echinochloa colonum</i>	50.600 d	10,120	S	61.742 c	12,349	S	163.200 d	32,640	S	37.250 d	7,450	S
<i>Eragrostis pilosa</i>	5.020 a	1,004	S	20.620 b	4,124	S	3.125 a	0,625	R	2.240 b	0,448	R
<i>Brachiaria decumbens</i>	433 a	0,087	R	0 a	0,000	I	57 a	0,011	R	-	-	-
<i>Cenchrus echinatus</i>	0 a	0,000	I	-	-	-	0 a	0,000	I	0 a	0,000	I
<i>Paspalum urvillei</i>	25 a	0,005	R	28 a	0,006	R	0 a	0,000	I	0 a	0,000	I
<i>Eragrostis ciliaris</i>	50 a	0,010	R	66 a	0,013	R	80 a	0,016	R	1.080 a	0,216	R
<i>Rhynchosyris repens</i>	5.571 b	1,004	S	2.366 a	0,473	R	11.057 b	2,211	S	1.760 b	0,352	R
<i>Sorghum halepense</i>	⁴ -	-	-	14.325 a	2,865	S	5.125 a	1,025	S	-	-	-
<i>Desmodium tortuosum</i>	0 a	0,000	I	-	-	-	0 a	0,000	I	0 a	0,000	I
<i>Acanthospermum hispidum</i>	133 a	0,027	R	-	-	-	⁴ -	-	-	514 a	0,103	R
<i>Amaranthus spinosus</i>	10.075 b	2,015	S	18.714 b	3,743	S	2.155 a	0,431	R	19.733 c	3,947	S
<i>Amaranthus hybridus</i>	119.028 e	23,806	S	68.914 c	13,783	S	92.975 c	18,595	S	128.000 f	25,600	S
<i>Amaranthus viridis</i>	76.400 e	15,280	S	6.288 a	1,258	S	-	-	-	-	-	-
<i>Caperonia palustris</i>	205.200 f	41,040	S	506.160 f	101,232	S	249.000 e	49,800	S	54.050 d	10,810	S
<i>Hyptis lophanta</i>	3.720 a	0,744	R	15.500 b	3,100	S	5.628 b	1,126	S	-	-	-
<i>Polygonum convolvulus</i>	100 a	0,020	R	0 a	0,000	I	200 a	0,040	R	22 a	0,004	R
<i>Merremia cissoides</i>	1.032 b	2,064	S	4.480 a	0,896	R	7.680 b	1,536	S	1.700 b	0,340	R
<i>Ipomoea purpurea</i>	22.700 c	4,540	S	21.900 b	4,380	S	10.200 b	2,040	S	3.480 b	0,696	R
<i>Ipomoea nil</i>	19.960 c	3,992	S	37.933 b	7,587	S	5.880 b	1,176	S	25.622 c	5,124	S
<i>Leonotis nepetifolia</i>	720 a	0,144	R	-	-	-	171 a	0,034	R	325 a	0,065	R
<i>Tagetes minuta</i>	50 a	0,010	R	0 a	0,000	I	0 a	0,000	I	0 a	0,000	I
<i>Polygonum persicaria</i>	5.911 a	1,182	S	30.911 b	6,182	S	25.820 b	5,164	S	27.340 c	5,468	S
<i>Eclipta alba</i>	18.360 c	3,672	S	62.280 c	12,456	S	10.920 b	2,184	S	26.533 c	5,307	S
<i>Verbena litoralis</i>	42.857 d	8,571	S	49.888 c	9,978	S	66.400 c	13,280	S	71.911 e	14,382	S
<i>Triadax procumbens</i>	1.100 a	0,220	R	0 a	0,000	I	60 a	0,012	R	0 a	0,000	I
<i>Elephantopus mollis</i>	100 a	0,020	R	66 a	0,013	R	1.240 a	0,248	R	0 a	0,000	I
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	366 a	0,073	R	0 a	0,000	I	5.711 b	1,142	S	400 a	0,080	R
<i>Emilia sonchifolia</i>	0 a	0,000	I	-	-	-	0 a	0,000	I	100 a	0,020	R
<i>Senna obtusifolia</i>	280 a	0,056	R	200 a	0,040	R	0 a	0,000	I	-	-	-
<i>Croton glandulosus</i>	0 a	0,000	I	0 a	0,000	I	0 a	0,000	I	0 a	0,000	I
<i>Paspalum paniculatum</i>	550 a	0,110	R	0 a	0,000	I	866 a	0,173	R	0 a	0,000	I
<i>Sida rhombifolia</i>	0 a	0,000	I	0 a	0,000	I	-	-	-	-	-	-
<i>Solanum sisymbriifolium</i>	366 a	0,073	R	1.760 a	0,352	R	34.033 b	6,807	S	27.600 c	5,520	S
<i>Physalis angulata</i>	11.400 b	2,280	S	2.280 a	0,456	R	96.400 c	19,280	S	-	-	-
<i>Parthenium hysterophorus</i>	485 a	0,097	R	0 a	0,000	I	-	-	-	-	-	-
<i>Ambrosia elatior</i>	540 a	0,108	R	40 a	0,008	R	22.125 b	4,425	S	2.160 b	0,432	R
<i>Gamochaeta spicata</i>	3.444 a	0,689	R	6.488 a	1,298	S	20.700 b	4,140	S	3.440 b	0,688	R
<i>Mirabilis jalapa</i>	0 a	0,000	I	33 a	0,007	R	0 a	0,000	I	875 a	0,175	R
<i>Talinum paniculatum</i>	-	7,747	-	38.100 b	7,620	S	-	-	-	-	-	-
<i>Solanum americanum</i>	3.888 a	0,778	R	2.222 a	0,444	R	175.200 d	35,040	S	22 a	0,004	R
<i>Herissantia crispata</i>	1.800 a	0,360	R	571 a	0,114	R	13.133 b	2,627	S	133 a	0,027	R
<i>Momordica charantia</i>	-	-	-	125.480 d	25,096	S	57.160 c	11,432	S	18.714 c	3,742	S
<i>Ageratum conyzoides</i>	9.120 b	1,824	S	30.311 b	6,062	S	43.100 b	8,620	S	21.800 c	4,360	S
<i>Setaria italica</i>	16.440 c	3,288	S	-	-	-	11.800 b	2,360	S	5.320 b	1,064	S
<i>Raphanus raphanistrum</i>	7.000 b	1,400	S	26.040 b	5,208	S	37.000 b	7,400	S	-	-	-
<i>Galinsoga parviflora</i>	28.725 c	5,745	S	5.777 a	1,156	S	68.550 c	13,710	S	25.685 c	5,137	S
<i>Richardia brasiliensis</i>	0 a	0,000	I	625 a	0,125	R	844 a	0,169	R	-	-	-
<i>Leonurus sibiricus</i>	88.360 e	17,672	S	302.550 e	60,510	S	18.840 b	3,768	S	1.880 b	0,376	R
<i>Sonchus oleraceus</i>	0 a	0,000	I	0 a	0,000	I	0 a	0,000	I	0 a	0,000	I
<i>Commelina benghalensis</i>	27.400 c	5,480	S	27.200 b	5,440	S	13.966 b	2,793	S	-	-	-
<i>Oxalis corniculata</i>	1.733 a	0,347	R	1.000 a	0,200	R	17.400 b	3,480	S	11.120 b	2,224	S
<i>Lycopersicon esculentum</i>	322.320 g	64,464	S	839.280 g	167,856	S	524.160 f	104,832	S	136.800 f	27,360	S

¹Média de 10 repetições. Para análises estatísticas, os valores de números de ovos + J₂ foram transformados em $\sqrt{x+0.5}$. Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferiram pelo Teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

²FR = população final de ovos (Pf) / população inicial de ovos (Pi = 5.000).

³R = Resistente (FR < 1); S = Suscetível (FR > 1); I = Imune (FR = 0).

⁴(-) = Planta daninha não foi avaliada quanto à reação ao nematoide da colona.

Tabela 3 – Análise comparativa das reações de espécies de plantas daninhas a *Meloidogyne* spp. avaliadas no presente trabalho e confrontada com a literatura nacional.

Planta daninha	Nematoide	Reação no presente estudo	Reação na literatura ¹	Referências
Amendoim-bravo (<i>Euphorbia heterophylla</i>)	<i>M. incognita</i> raça 3	R	I	Lordello <i>et al.</i> (1998)
	<i>M. javanica</i>	R	S	Asmus & Andrade (1997)
	<i>M. paranaensis</i>	I	Hospedeiro R	Lordello <i>et al.</i> (1988) Roese & Oliveira (2004)
Apaga-fogo (<i>Alternanthera tenella</i>)	<i>M. incognita</i> raça 3	S	S	Lordello <i>et al.</i> (1998)
	<i>M. javanica</i>	S	Má hospedeiro	Werlang & Santos (2000)
Capim-carrapicho (<i>Cenchrus echinatus</i>)	<i>M. javanica</i>	I	Má hospedeiro Não hospedeiro	Werlang & Santos (2000) Lordello <i>et al.</i> (1988)
	<i>M. paranaensis</i>	I	R	Roese & Oliveira (2004)
Capim-amargoso (<i>Digitaria insularis</i>)	<i>M. incognita</i> raça 3	R	I	Lordello <i>et al.</i> (1998)
Capim-arroz (<i>Echinochloa colonum</i>)	<i>M. incognita</i> raça 3	S	S	Lordello <i>et al.</i> (1998)
	<i>M. paranaensis</i>	S	S	Roese & Oliveira (2004)
Capim-braquiária (<i>Brachiaria decumbens</i>)	<i>M. javanica</i>	R	Reduziu a população Má hospedeiro	Brito e Ferraz (1987) Werlang & Santos (2000)
	<i>M. incognita</i> raça 1	R	I	Carneiro <i>et al.</i> (2006)
	<i>M. incognita</i> raça 3	I	R	Carneiro <i>et al.</i> (2006)
Capim-massarabá (<i>Sorghum halepense</i>)	<i>M. javanica</i>	S	Hospedeiro	Lordello <i>et al.</i> (1988)
Carrapicho-beiço-de-boi (<i>Desmodium tortuosum</i>)	<i>M. javanica</i>	I	Não foi hospedeiro	Werlang & Santos (2000)
	<i>M. paranaensis</i>	I	R	Roese & Oliveira (2004)
Caruru-de-espinho (<i>Amaranthus spinosus</i>)	<i>M. paranaensis</i>	S	R	Roese & Oliveira (2004)
Caruru-roxo (<i>Amaranthus hybridus</i>)	<i>M. incognita</i> raça 3	S	S	Lordello <i>et al.</i> (1998)
	<i>M. javanica</i>	S	S	Asmus & Andrade (1997)
			Bom hospedeiro Hospedeiro S	Werlang & Santos (2000) Lordello <i>et al.</i> (1988) Zem (1977)
Catirina (<i>Hyptis lophanta</i>)	<i>M. javanica</i>	S	Má hospedeiro	Werlang & Santos (2000)
Erva-de-touro (<i>Tridax procumbens</i>)	<i>M. paranaensis</i>	I	R	Roese & Oliveira (2004)
Falsa-serralha (<i>Emilia sonchifolia</i>)	<i>M. javanica</i>	I	Parasitando	Antônio & Lehman (1978)
	<i>M. paranaensis</i>	R	R	Roese & Oliveira (2004)
Fedegoso (<i>Senna obtusifolia</i>)	<i>M. javanica</i>	I	Má hospedeiro	Werlang & Santos (2000)
Maria-pretinha (<i>Solanum americanum</i>)	<i>M. paranaensis</i>	R	S	Roese & Oliveira (2004)
	<i>M. javanica</i>	S	Má hospedeiro S	Werlang & Santos (2000) Asmus & Andrade (1997)
	<i>M. incognita</i> raça 3	R	Encontrados S	Huang & Cupertino (1976) Lordello <i>et al.</i> (1998)
Melão-de-são-caetano (<i>Momordica charantia</i>)	<i>M. javanica</i>	S	S	Zem (1977)
Mentrato (<i>Ageratum conyzoides</i>)	<i>M. incognita</i> raça 3	S	S	Lordello <i>et al.</i> (1998)
	<i>M. javanica</i>	S	Parasitando	Antônio & Lehman (1978)
	<i>M. paranaensis</i>	S	R	Roese & Oliveira (2004)
Nabiça (<i>Raphanus raphanistrum</i>)	<i>M. incognita</i> raça 3	S	R	Lordello <i>et al.</i> (1998)
Picão-branco (<i>Galinsoga parviflora</i>)	<i>M. incognita</i> raça 3	S	S	Lordello <i>et al.</i> (1998)
	<i>M. javanica</i>	S	Hospedeiro	Lordello <i>et al.</i> (1988)
Poaia-branca (<i>Richardia brasiliensis</i>)	<i>M. incognita</i> raça 3	R	R	Lordello <i>et al.</i> (1998)
Rubim (<i>Leonurus sibiricus</i>)	<i>M. javanica</i>	S	Parasitando	Antônio & Lehman (1978)
Serralha (<i>Sonchus oleraceus</i>)	<i>M. paranaensis</i>	I	R	Roese & Oliveira (2004)
	<i>M. javanica</i>	I	Não hospedeiro	Lordello <i>et al.</i> (1988)
	<i>M. incognita</i> raça 3	I	I	Lordello <i>et al.</i> (1998)

¹I = imune (FR = 0); R = resistente (0 < FR < 1,0); S = suscetível (FR > 1,0); outras denominações para a reação foram as adotadas pelos autores nos respectivos trabalhos.

rotação diminui sensivelmente a população do nematoíde, mas quando é cultivado um hospedeiro suscetível, ou a área cultivada possui plantas daninhas suscetíveis, a população do patógeno cresce rapidamente (EMBRAPA, 2004).

Os resultados aqui obtidos sugerem que a eficiência de táticas de manejo dos nematoides de galhas pode ser comprometida pela presença de plantas daninhas na lavoura.

Conclusão

Várias espécies de plantas daninhas que ocorrem em lavouras dos municípios de Umuarama, Xambrê, Miraselva, Centenário do Sul, Rolândia e Londrina, no Estado do Paraná, apresentam suscetibilidade a *Meloidogyne incognita* raças 1 e 3, *M. javanica* e *M. paranaensis*, podendo, caso não controladas, comprometer a eficiência do manejo de áreas infestadas por esses nematoides.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento do Café pelos recursos financeiros alocados no desenvolvimento deste trabalho.

Literatura Citada

- ANTONIO, H. & P.S. LEHMAN. 1978. Nota sobre a ocorrência de nematoides do gênero *Meloidogyne* em algumas ervas daninhas nos estados do Paraná e do Rio Grande do Sul. In: REUNIÃO DE NEMATOLOGIA, III, Mossoró. Anais, p. 29-32.
- ASMUS, G.L. & P.J.M. ANDRADE. 1997. Reprodução de *Meloidogyne javanica* em algumas plantas daninhas de ocorrência freqüente na região oeste do Brasil. Embrapa, 1-3. (Comunicado Técnico19).
- ASMUS, G.L., M.M. INOMOTO, C.S.S. SAZAKI & M.A. FERRAZ. 2005. Reação de algumas culturas de cobertura utilizadas no sistema plantio direto a *Meloidogyne incognita*. Nematologia Brasileira, 29 (1): 47-52.
- BONETTI, J.I.S. & S. FERRAZ. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua*, em raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, 6 (3): 553.
- BRITO, J.A. & S. FERRAZ. 1987. Antagonismo de *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum* cv. Guiné a *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira, 11: 270-285.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & M.R.A ALMEIDA. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. Nematologia Brasileira, 25 (1): 35-44.
- CARNEIRO, R.G., A.P.A. MÔNACO, A.C.C. LIMA, K.C. NAKAMURA, M.P. MORITZ, A. SCHERER & D.C. SANTIAGO. 2006. Reação de Gramíneas a *Meloidogyne incognita*, a *M. paranaensis* e a *M. javanica*. Nematologia Brasileira, 30 (3): 287-291.
- DIAS, C.R., S.L. MACIEL, J.B. VIDA & C.A. SCAPIM. 1998. Efeito de quatro espécies de plantas medicinais sobre *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 em cultivo protegido. Nematologia Brasileira, 22 (2): 58-65.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2004. Nematoides e Alternativas de Manejo. <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Livro_Banana_Cap_10IDgRfpPx1siR.pdf> acesso em 15 janeiro de 2008.
- FERRAZ, C.A.M. 1961. Contribuição para o levantamento das plantas nativas, hospedeiras do nematoíde causadores de galhas. Bragantia, 20: 77-78.
- FERRAZ, L.C.C.B., R.A. PITELLI & F. SOUBHIA. 1982. Nematoides associados a plantas daninhas na região de Jaticabal, SP - segundo relato. Planta Daninha, 5 (1): 1-5.
- FERRAZ, L.C.C.B., R.A. PITELLI & L.E. BENDIXEN. 1983. An Annotated Bibliography of Weeds as Reservoirs for Organisms Affecting Crops in Brazil: 1. Root-Knot Nematodes. Ohio State, p. 1-16. (Research Bulletin 1153).
- FERRAZ, L.C.C.B., R.A. PITELLI & V. FURLAN. 1978. Nematoides associados a plantas daninhas na região de Jaticabal, SP - primeiro relato. Planta Daninha, 1 (1): 5-11.
- HUANG, C.S. & F.P. CUPERTINO. 1976. Nematoides fitoparasitos em áreas cultivadas do Distrito Federal e Goiás, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, IX, Campinas. Anais, p. 29-30.
- INSTITUTO DE BOTÂNICA. 1989. Pteridófitas e Fanerógamas. Técnicas de Coleta, Preservação e Herborização de Material Botânico. Secretaria do Meio Ambiente Instituto de Botânica - Governo do Estado de SP, São Paulo, p. 32-55.
- LORDELLO, L.G.E. 1969. O capim gordura pode abrigar nematoides. Revista de Agricultura, 44 (2-3): 51-52.
- LORDELLO, R.R.A., A.I.L. LORDELLO & E.M. PAULO. 1988. Multiplicação de *Meloidogyne javanica* em plantas daninhas. Nematologia Brasileira, 12: 84-92.
- LORDELLO, R.R.A., A.I.L. LORDELLO & R. DEUBER. 1998. Reprodução de *Meloidogyne incognita* em plantas daninhas. Nematologia Brasileira, 22 (2): 13-14. (Resumo).
- MAUCH, N. & S. FERRAZ. 1996. Efeito antagonico de plantas da família Compositae a *Meloidogyne incognita* raça 3. Nematologia Brasileira, 20 (2): 12-20.
- MÔNACO, A.P.A. 2008. Avaliação da reação de espécies de plantas daninhas ao nematoíde *Meloidogyne paranaensis* (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 36 p.

- OOSTENBRINK, M. 1966. Major characteristic of the relation between nematodes and plant. Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen, Nederland, 46 p.
- PONTE, J.J., E.R. FERNANDES & A.T. SILVA. 1977. Plantas hospedeiras de *Meloidogyne* no estado do Rio Grande do Norte (Brasil). Sociedade Brasileira de Nematologia, 2: 67-70.
- PONTE, J.J., O.J. VIANA, A. FRANCO, R.N. MENEZES, L.M. SILVEIRA & R.C. FONTELES. 1982. Indicação de plantas imunes à Meloidoginose. II. Segunda triagem entre gramíneas forrageiras. Sociedade Brasileira de Nematologia, 6: 21-25.
- PONTE, J.J., O.J. VIANA, F.S. CAVALCANTE, C.M. BISPO, F.V. MATOS & A. FRANCO. 1981. Indicação de plantas imunes à meloidoginose. I. Primeira triagem entre gramíneas forrageiras. Sociedade Brasileira de Nematologia, 5: 51-55.
- REBEL, E.K., G.E. LORDELLO & M.V. MORAES. 1974. Plantas hospedeiras de um nematóide nocivo ao cafeeiro. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Piracicaba, SP), 31: 431-435.
- ROESE, A.D. & R.D.L. OLIVEIRA. 2004. Capacidade reprodutiva de *Meloidogyne paranaensis* em espécies de plantas daninhas. Nematologia Brasileira, 28 (2): 137-141.
- SASSER, J.N. 1980. Root-knot nematodes: a global menace to crop production. Plant Disease, 64: 36-41.
- SILVA, J.F.V. & R.G. CARNEIRO. 1992. Reação de adubos verdes de verão e de inverno às raças 1, 2 e 4 de *Meloidogyne incognita*. Nematologia Brasileira, 16 (1 e 2): 11-18.
- TAYLOR, A.L. & J.N. SASSER. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). North Carolina State University Graphics. Raleigh, 111 p.
- VOLL, E. 2005. Dinâmica das plantas daninhas e práticas de manejo. Embrapa Soja, Londrina (PR), 85 p.
- WERLANG, R.C. & M.A. SANTOS. 2000. Hospedabilidade de plantas daninhas comuns em áreas de soja da região dos cerrados a *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira, 24 (1): 100. (Resumo).
- ZEM, A.C. 1977. Informações preliminares sobre os nematóides que se hospedam em plantas invasoras. In: REUNIÃO DE NEMATOLOGIA, II, Piracicaba. Anais, p. 45-48.

Avaliação Comparativa da Agressividade de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* à Variedade SP 911049 de Cana-de-açúcar

Bruno F.F. Barbosa^{1*}, Jaime M. dos Santos¹, Pedro L.M. Soares¹ & José C. Barbosa²

¹Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (FCAV – UNESP), 14884-900 Jaboticabal (SP) Brasil.

²Departamento de Ciências Exatas, FCAV – UNESP.

*Autor para correspondência: bruno.barbosa@posgrad.fcav.unesp.br

Recebido para publicação em 27 / 01 / 2009. Aceito em 23 / 04 / 2009

Editado por Mário Inomoto

Resumo - Barbosa, B.F.F., J.M.dos Santos, P.L.M. Soares & J.C. Barbosa. 2009. Avaliação comparativa da agressividade de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* à variedade SP 911049 de cana-de-açúcar.

Os nematoides causam elevadas perdas à cana de açúcar tanto no Brasil quanto em outras regiões produtoras. *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Pratylenchus zaeae* são as espécies-chaves para a cultura em todo o mundo. No presente estudo, avaliou-se comparativamente a agressividade de *M. incognita* e *M. javanica* à cana, utilizando-se a variedade SP 911049. Foram comparados o fator de reprodução desses nematoides, efeito dos nematoides na incidência natural de pragas e a influência no desenvolvimento e nas características tecnológicas da cana. Considerando-se os dados de FR, biometria, infestação natural de pragas, mortalidade de plantas, e variáveis tecnológicas, concluiu-se que, conquanto a taxa de multiplicação de *M. javanica* na variedade em questão tenha sido muito menor que a de *M. incognita*, aquela é mais agressiva à cana de açúcar.

Palavras-chaves: nematoides-das-galhas, interação, biometria, *Saccharum*, patogenicidade.

Summary - Barbosa, B.F.F., J.M.dos Santos, P.L.M. Soares & J.C. Barbosa. 2009. Evaluation of comparative aggressiveness of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* on sugarcane variety SP 911049.

Nematodes cause extensive losses to sugarcane in Brazil and also in other producing regions. *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *Pratylenchus zaeae* are the key species for this culture worldwide. In the present study, the aggressiveness of *M. javanica* and *M. incognita* to sugarcane variety SP 911049 was evaluated comparatively. The following parameters were compared: reproduction factor (RF) of these nematodes, effect of nematodes in the natural incidence of pests, and the influence on the development and technological characteristics of sugarcane. Considering the data of RF, biometrics, natural infestation of pests, mortality of plants, and technological variables, it was concluded that *M. javanica* was more aggressive to sugarcane, although its rate of multiplication was much smaller than the one of *M. incognita*.

Key words: root-knot nematodes, interaction, biometrics, *Saccharum*, aggressiveness.

Conteúdo

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é suscetível a várias espécies de nematoides, nas diferentes regiões produtoras do mundo, e os danos à produtividade são crescentes em função da monocultura e intenso uso do solo. Com efeito, 275 espécies de 48 gêneros já foram registradas associadas à cultura em termos mundiais, sendo os ectoparasitos

os mais frequentes (Moura & Almeida, 1981, Maqbool & Hashmin, 1987). As perdas causadas por esses patógenos à cultura, em termos mundiais, já foram estimadas em 15,3 % (Sasser & Freckman, 1987). Embora as espécies principais que causam danos à cultura possam variar de região para região, *Pratylenchus zaeae*, *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* são consideradas as espécies-chaves para a cultura (Cadet & Spaull,

2005). De acordo com Dinardo-Miranda (2005), *M. javanica* e *P. zeae* causam prejuízos da ordem de 20 a 30 % de redução da produtividade, porém o mais agressivo ainda é *M. incognita*, que chega a reduzir de 40 a 50 % já no primeiro corte. Além dos danos diretos, plantas atacadas por nematoides geralmente são predispostas ao ataque de outras pragas e doenças (Abawi & Chen, 1998).

Os objetivos do presente estudo foram: **a)** avaliar comparativamente a agressividade dos fitonematoides *M. incognita* e *Meloidogyne javanica* à cana-de-açúcar, utilizando a variedade SP 911049, **b)** estudar a predisposição de *M. incognita* e *M. javanica* à incidência natural de outras pragas na cultura, **c)** avaliar caracteres biométricos em plantas inoculadas e não inoculadas com *M. incognita* e *M. javanica* na mesma variedade. O termo agressividade faz menção à capacidade do patógeno em causar danos à produção da cana-de-açúcar.

O experimento foi instalado em um telado, em vasos de cerâmica contendo substrato constituído por mistura de terra e areia na proporção de 2:1, previamente autoclavada, sendo que cada vaso continha apenas uma planta correspondente a uma repetição. Foram utilizados dez vasos com dez litros de substrato por tratamento, sendo cada vaso uma repetição. Os tratamentos foram as duas espécies de nematoides das galhas (*M. incognita* e *M. javanica*) mais a testemunha não inoculada. A variedade utilizada foi a SP 911049 e a avaliação ocorreu um ano após o plantio. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, exceto os dados relativos à predisposição das plantas ao ataque de pragas que foram analisados pelo teste qui-quadrado.

Três toletes de cana de açúcar foram utilizados para plantio seguindo as recomendações técnicas para a cultura, em cada uma das unidades experimentais. Após a brotação foi realizado o desbaste, deixando-se um colmo por vaso. A seguir, o sistema radicular das plantas foi parcialmente exposto e inoculado. Os inóculos de *M. incognita* e de *M. javanica* foram preparados pela técnica de Hussey & Barker (1973), a partir de populações puras desses nematoides mantidas em casa de vegetação em tomateiro *Solanum lycopersicum*

'Santa Cruz Kada'. O inóculo foi obtido através da extração de ovos e juvenis de segundo estágio (J₂) das raízes de tomateiro, aos 50 dias após a inoculação (DAI). A seguir, a concentração das suspensões foi determinada com o auxílio da lâmina de Peters, ao estereoscópio e ajustada para 400 ovos e J₂ por ml. Então, 10 ml da suspensão do inóculo de cada nematoide, conforme o caso, foram vertidos sobre as raízes das plantas, parcialmente descobertas com jatos de água, e essas foram novamente recobertas com o mesmo substrato tratado. Aos 360 DAI foram feitas as avaliações do fator de reprodução e do efeito de *M. incognita* e *M. javanica* na incidência natural de outras pragas e em caracteres biométricos. As avaliações biométricas foram: diâmetro dos colmos no 3º. nó, comprimento dos colmos até a inserção da folha +1 (designação dada à primeira das folhas com bainha exposta, contadas a partir do ápice da planta), nº. de internódios das plantas, nº. de perfilhos e largura e comprimento da folha +3 (designação dada à terceira das folhas com bainha exposta, contadas a partir do ápice da planta). Em seguida, foram detectadas as pragas de incidência natural e contabilizado o número de plantas atacadas. Após essas avaliações, as amostras foram encaminhadas para análises tecnológicas de *pol%*cana, *brix* e *fibra%*cana no laboratório de análises tecnológicas da Usina São Martinho, localizada na fazenda São Martinho, s/n, Zona Rural, 14850-000 Pradópolis (SP).

A extração de *M. incognita* e *M. javanica* das raízes foi realizada através do método de Hussey & Barker (1973). O número de ovos e de espécimes dos nematoides por planta foi estimado pela contagem em câmara de Peters ao microscópio fotônico. Esse número diz respeito à população final (Pf) que, dividido pelo número de ovos e juvenis inoculados (Pi), resulta no fator de reprodução (FR).

Os dados da Tabela 1 enfatizam o elevado potencial biótico de *M. incognita* na variedade SP 911049, e se assemelham aos encontrados por outros pesquisadores (Garcia *et al.*, 1997, Regis & Moura, 1989). Apesar da grande variabilidade dentro de cada tratamento, nenhuma das plantas que sobreviveu exibiu FR menor que 1. Regis & Moura (1989) também obtiveram valores de FR > 27 para *M. incognita* em cinco variedades de cana, aos 110 dias após a

inoculação. As espécies *M. incognita* e *M. javanica* também foram avaliadas comparativamente por Dinardo-Miranda (1999) e, apesar da ausência de dados sobre o FR, os resultados observados denotam um potencial biótico superior de *M. incognita* em relação a *M. javanica*, o que foi confirmado no presente estudo, pois o FR para *M. incognita* foi cerca de 21 vezes maior. Potencial biótico é a capacidade potencial de uma população para aumentar seu número de indivíduos, em condições ambientais ideais. Contudo, quanto à agressividade dos nematoides à cana, os dados contidos na Tabela 2 diferem dos obtidos por Garcia *et al.* (1997) e por Dinardo-Miranda (1999). Trabalhando com outras variedades, esses pesquisadores concluíram que *M. javanica* é menos agressiva à cana que *M. incognita*. Os maiores valores de FR para *M. incognita* foram freqüentemente relacionados ao maior nível de dano causado por essa espécie à cultura que os causados por *M. javanica*.

A Tabela 2 faz a comparação entre as médias relativas ao número de ovos e J_2 e o FR dos nematoides, além de comparar as médias para todas as variáveis biométricas avaliadas. O teste de comparação de médias do número de ovos e J_2 apresentou diferenças acentuadas entre si, reafirmando as observações a respeito da Tabela 1. Entretanto, a largura da folha +3 para o tratamento correspondente a *M. javanica* foi menor do que os valores dessa variável

para o tratamento correspondente a *M. incognita*, sugerindo maior agressividade de *M. javanica* que de *M. incognita* à cana, no caso da variedade em questão. Em relação ao diâmetro do terceiro nó, não houve diferença significativa entre os tratamentos relativos aos nematoides, mas ambos foram inferiores à testemunha. Ressalta-se que no tratamento relativo à espécie *M. javanica*, que exibiu FR = 4,16 contra FR = 88,2 de *M. incognita*, duas plantas morreram no decorrer do experimento, enquanto no tratamento com *M. incognita* morreu apenas uma e, mesmo assim, ao final do experimento.

As variáveis biométricas número de entrenós, número de perfilhos, estatura até a folha +1 e comprimento da folha +3 não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos relativos aos nematoides e entre esses e a testemunha. Entretanto, os dados denotam uma tendência que sugere maior agressividade de *M. javanica* em relação a *M. incognita*, na variedade em questão.

No decorrer do experimento foi detectada infestação natural da broca da cana (*Diatraea saccharalis*) e da cochonilha (*Saccharicoccus sacchari*) na variedade SP 911049. As evidências sugeriram que os nematoides estavam predispondo as plantas ao ataque dessas pragas diferentemente. A Tabela 3 contém os dados das análises estatísticas das percentagens de colmos brocados e colmos atacados pela cochonilha.

Tabela 1 - População final (Pf) e fator de reprodução (FR) dos nematoides *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* na variedade SP 911049, um ano após o plantio.

Nematoide	Pf raízes	FR	Classificação final ¹
<i>Meloidogyne javanica</i>	16.625	4,16	S
<i>Meloidogyne incognita</i>	352.800	88,20	S

¹S = susceptível, R = resistente.

Tabela 2 - Comparação da população final nas raízes (Pf), fator de reprodução (FR) e variáveis biométricas (diâmetro do 3º. nó - DTN, n°. de entrenós - NE, n°. de perfilhos - NP, estatura até a folha +1 - EF+1, largura da folha +3 - LF+3, comprimento da folha +3 - CF+3) entre as plantas inoculadas com os nematoides *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*

Nematoide	Pf raízes	FR	DTN (mm)	NE	NP	ETF+1 (m)	LF+3 (cm)	CF+3 (cm)
<i>Meloidogyne incognita</i>	352.800 a	88,20	12,3 b	18,2 a	2,2 a	1,5 a	3,2 a	1,1 a
<i>Meloidogyne javanica</i>	16.625 b	4,16	10,0 b	16,9 a	3,5 a	1,4 a	2,1 b	1,1 a
Testemunha	-	-	15,3 a	22,0 a	2,4 a	1,65 a	3,4 a	1,3 a
F	16,97	-	9,37	1,32	0,91	0,43	8,13	2,32
C.V.	98,8257	-	20,27	33,95	79,61	43,22	27,26	17,71

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey a 1 % de probabilidade.

Tabela 3 - Comparação, pelo teste do qui-quadrado (5 % de probabilidade), entre plantas atacadas por broca e cochonilha nas plantas infectadas por *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*.

Nematoide	Com broca (%)	Sem broca (%)	Total	Com cochonilha (%)	Sem cochonilha (%)	Total
<i>Meloidogyne incognita</i>	24	12	36	36	0	36
<i>Meloidogyne javanica</i>	24	12	36	36	0	36
Testemunha	8	20	28	16	12	28
Total	56	44	100	88	12	100
Qui-quadrado			0,2267 ^{NS}			0,0125*

Constataram-se diferenças significativas apenas para o percentual de plantas atacadas pela cochonilha. De fato, não houve diferenças entre os nematoides, mas ambos diferiram da testemunha a 5 % de probabilidade pelo teste do qui-quadrado. Salienta-se que os danos nos colmos das plantas do tratamento *M. javanica*, quando atacadas pela broca, foram mais acentuados, em alguns casos até quebrando-se. A interação de nematoides com outras pragas é um fato já documentado. Russin *et al.* (1989) observaram aumento da população da lagarta-mede-palmo (*Pseudoplusia includens*) em plantas de soja inoculadas com nematoide-de-cisto (*Heterodera glycines*).

As observações sobre dados tecnológicos também sugerem uma relação semelhante à observada para os dados estatisticamente analisados das variáveis biométricas. Os valores para as variáveis tecnológicas relativas à *M. incognita* e *M. javanica* foram respectivamente: 18,58 e 16,84 de *brix*%; 16,31 e 13,89 de *pol*%; 13,22 e 11,28 % de *pol* corrigido (PC) e 130,60 e 113,38 % de açúcares totais redutores (ATR). Esses valores evidenciam que *M. javanica* de fato foi mais agressivo que *M. incognita* à variedade SP 911049. Porém, esse efeito não influenciou significativamente no *pol*%cana (% sacarose no caldo extraído) e no PCC (% de sacarose no colmo) em outros estudos (Silva *et al.*, 2006).

Considerando-se os dados de FR, biometria, infestação natural de pragas, mortalidade de plantas e variáveis tecnológicas, conclui-se que o parasitismo de *M. incognita* e *M. javanica* predispõe a cana de açúcar ao ataque de cochonilha. Conquanto a taxa de multiplicação de *M. javanica* na variedade em questão tenha sido muito menor que a de *M. incognita*, os resultados evidenciam que *M. javanica* foi mais agressiva à variedade SP911049, pois causou maiores danos

ainda que, dentre as variáveis consideradas, foi detectada diferença estatística somente para a largura da folha +3.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Usina São Martinho, nas pessoas de Marcos Marcarí, José Luiz e toda a equipe do Departamento de Qualidade Agrícola, pela atenção, material fornecido (variedade de cana) e pela análise tecnológica dos colmos. O primeiro autor agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o segundo e o quarto ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e o terceiro à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelas bolsas concedidas.

Literatura Citada

- ABAWI, G.S. & J. CHEN. 1998. Concomitant pathogen and pest interactions. In: BARKER, K.R., G.A. PEDERSON & G. L. WINDHAN (ed). Plant and Nematode Interactions. American Society of Agronomy Inc., Madison - EUA, p. 135-158.
- CADET, P. & V.W. SPAULL. 2005. Nematode parasites of sugarcane. In: LUC, M., R.A. SIKORA & J. BRIDGE (ed). Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. C.A.B. International Institute of Parasitology, Wallingford - UK, p. 645- 674.
- DINARDO-MIRANDA, L.L. 1999. Reação de variedades de cana-de-açúcar ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. Nematologia Brasileira, 23 (2): 76-83.
- DINARDO-MIRANDA, L.L. Nematóides e pragas de solo em cana-de-açúcar. In: Encarte do informações agronômicas, 110. Piracicaba. <[http://www.potafos.org/ppiweb/brazil.nsf/87cb8a98bf72572_b8525693e0053ea70/7759ddc6878ca7eb83256d05004c6dd1/\\$FILE/Enc25-32-110.pdf](http://www.potafos.org/ppiweb/brazil.nsf/87cb8a98bf72572_b8525693e0053ea70/7759ddc6878ca7eb83256d05004c6dd1/$FILE/Enc25-32-110.pdf)> acesso em: 15 de junho de 2005.
- GARCIA, V., S.F. SILVA & L.L. DINARDO-MIRANDA. 1997. Comportamento de variedades de cana-de-açúcar em relação à *Meloidogyne incognita*. Revista Nacional do Alcool e Açúcar, 17 (87): 14-19.

- HUSSEY, R.S. & K.R. BARKER. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57 (12): 1.025-1.028.
- MAQBOOL, M.A. & S. HASHMIN. 1987. Effect of granular nematicide on nematode populations and sugarcane yield. *Revue de Nématologie*, 10: 111-113.
- MOURA, R.M. & A.V. ALMEIDA. 1981. Estudos preliminares sobre a ocorrência de fitonematóides associados à cana-de-açúcar em áreas de baixa produtividade agrícola no Estado de Pernambuco. *Sociedade Brasileira de Nematologia*, 5: 213-220.
- REGIS, E.M.O. & R.M. MOURA. 1989. Comportamento de cinco variedades de cana-de-açúcar em relação ao parasitismo de *Meloidogyne incognita* raça 1. *Nematologia Brasileira*, 13: 109-118.
- RUSSIN, J.S., M.B. LAYTON, D.J. BOETHEL, E.C. MCGAUWLEY, J.P. SNOW & G.T. BERGGREN. 1989. Development of *Heterodera glycines* on soybean damaged by soybean looper and stem canker. *Journal of Nematology*, 21 (1): 108-114.
- SASSER, J.N. & D.W. FRECKMAN. 1987. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J.A. & D.W. DICKSON (ed). *Vistas on Nematology*. Society of Nematologists, Hyattsville - EUA, p. 7-14.
- SILVA, M.A., R.P. PINCELLI & L.L. DINARDO-MIRANDA. 2006. Efeito da aplicação de nematicidas em soqueira de cana-de-açúcar, em diferentes épocas, sobre a população de *Pratylenchus zizae* e atributos biométricos e tecnológicos da cultura. *Nematologia Brasileira*, 30 (1): 29-34.

Reação de *Coffea* spp. a *Meloidogyne mayaguensis*

Gleina C.S. Alves^{1,2*}, Eduardo J. de Almeida^{1,2} & Jaime M. dos Santos¹

¹Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista (FCAV – UNESP), 14883–090 Jaboticabal (SP) Brasil.

²Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*Autora para correspondência: gleinacosta@yahoo.com.br

Recebido para publicação em 24 / 03 / 2009. Aceito em 06 / 06 / 2009

Editado por Cláudia R. Dias-Arieira

Resumo – Alves, G.C.S., E.J. de Almeida & J.M. dos Santos. 2009. Reação de *Coffea* spp. a *Meloidogyne mayaguensis*.

O presente experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, com o objetivo de avaliar a reação de sete cultivares de cafeeiro (Obatã IAC 1669-20, Apoatã IAC 2258, Catuaí Amarelo IAC 62, Catuaí Vermelho IAC 99, Catuaí Amarelo 17 / 02, Catuaí Vermelho 20 / 15 e Mundo Novo IAC 379-19) a *Meloidogyne mayaguensis*. O inóculo foi obtido de raízes de goiabeira (*Psidium guajava*). A população inicial foi composta por 4.000 ovos e juvenis infectivos, inoculados em vasos contendo terra e areia. Após 240 dias foram recuperados os nematoides das raízes das mudas de cafeeiros e calculado o fator de reprodução (FR = Pf / Pi). Os resultados mostraram que todas as variedades de café testadas no experimento obtiveram FR < 1, ou seja, foram resistentes a *M. mayaguensis*.

Palavras-chaves: nematóides-das-galhas, cafeicultura, resistência.

Summary - Alves, G.C.S., E.J. de Almeida & J.M. dos Santos. 2009. Reaction of *Coffea* spp. to *Meloidogyne mayaguensis*.

The present experiment was carried out in greenhouse belonging to the Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, with the objective of evaluating the reaction of seven cultivars of coffee plants (Obatã IAC 1669-20, Apoatã IAC 2258, Catuaí Amarelo IAC 62, Catuaí Vermelho IAC 99, Catuaí Amarelo 17 / 02, Catuaí Vermelho 20 / 15 and Mundo Novo IAC 379-19) to *Meloidogyne mayaguensis*. The inoculum was obtained from roots of guava (*Psidium guajava*). The initial population was composed by 4,000 eggs and infective juveniles, inoculated in vases containing soil and sand. After 240 days, the nematodes were recovered from the roots and the reproduction factor (RF = Pf / Pi) was calculated. All coffee cultivars tested in the experiment showed RF < 1, therefore considered resistant to *M. mayaguensis*.

Key words: root-knot nematodes, coffee crop, resistance.

Conteúdo

As áreas cafeeiras no Brasil estão concentradas no centro-sul do país, nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Paraná. No estado de São Paulo a cafeicultura é constituída basicamente de *Coffea arabica*, principalmente as cultivares Catuaí e Mundo Novo (ABIC, 2009). A cafeicultura brasileira, bem como em outros países do mundo, tem sérios problemas com fitonematoides, sobretudo das espécies de *Meloidogyne*,

que são responsáveis por perdas da ordem de 45 % (Barbosa *et al.*, 2004). Dentre os nematoides causadores de galhas, a espécie *Meloidogyne mayaguensis* vem apresentando importância crescente no país nos últimos anos. No Brasil, Carneiro *et al.* (2001) fizeram o primeiro registro deste fitopatógeno, em Petrolina (PE), Curaçá e Maniçoba (BA), causando danos severos em plantios comerciais de goiabeira. Almeida *et al.* (2008) relataram a ocorrência de danos

provocados por esse nematoide em lavouras de soja (*Glycine max*) em Ituverava (SP) e diferentes olerícolas, como alface (*Lactuca sativa*), pepino (*Cucumis sativus*), pimentão (*Capsicum annuum*) e tomate cereja (*Solanum lycopersicum cerasiforme*) no município de Chapada dos Guimarães (MT).

Há registros da detecção deste nematoide em condições de vegetação primária da Mata Atlântica no Rio de Janeiro e Paraná, evidenciando ser uma espécie autóctone dos biomas brasileiros (Lima *et al.*, 2005; Carneiro *et al.*, 2006). Este fato gera preocupação às demais culturas, inclusive a cafeicultura, uma vez que *M. mayaguensis* já foi registrado parasitando raízes de cafeeiros em Cuba (Campos & Villain, 2005). Sendo a cafeicultura paulista constituída basicamente de *C. arabica*, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a reação de resistência ou suscetibilidade de seis cultivares de *C. arabica*, além de uma de *C. canephora*, a *M. mayaguensis*.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista (FCAV – UNESP), Jaboticabal (SP). As mudas de café utilizadas contavam com seis meses de idade e foram produzidas em substrato formado por solo e nutrientes (NPK), provenientes de viveiro comercial registrado, cujo laudo n°. LSAVRP / 16 / 2007, emitido pelo Laboratório de Sanidade Animal e Vegetal de Ribeirão Preto, constatou negativa a presença de nematoides. As cultivares de *C. arabica* utilizadas foram a Obatã IAC 1669-20, Catuaí Amarelo IAC 62, Catuaí Vermelho IAC 99, Catuaí Amarelo 17 / 02, Catuaí Vermelho 20/15 e Mundo Novo IAC 379-19; a cultivar de *C. canephora* foi Apoatã IAC 2258. As mudas foram transplantadas para vasos de cerâmica com capacidade para seis litros, contendo solo e areia na proporção 2:1, sendo este substrato autoclavado.

A população inicial de *M. mayaguensis* foi proveniente de raízes de goiabeira (*Psidium guajava*) de pomar comercial localizado no município de Vista Alegre do Alto (SP). A identificação da espécie se deu ao microscópio fotônico em estudo morfo-anatômico de fêmeas e machos e confirmada pelo estudo do fenótipo isoenzimático para esterase. O inóculo de

M. mayaguensis foi obtido pela técnica de Hussey & Barker (1973) e a contagem de ovos e juvenis de segundo estágio (J₂) foi realizada em câmara de Peters, com o auxílio de microscópio fotônico. A suspensão do nematoide, que constituiu o inóculo, foi ajustada para 400 ovos e J₂ por ml. A inoculação das raízes ocorreu dois meses após o transplante das mudas de cafeeiros para os vasos, por meio da incorporação de 10 ml da suspensão, que consistiu numa população inicial (Pi) de 4.000 ovos e J₂ por vaso, distribuídos em seis orifícios no substrato circundando o caule das plantas. O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizado com seis repetições, constituídas por um vaso cada. Para aferição da viabilidade do inóculo, o mesmo procedimento foi realizado com tomateiros (*Solanum lycopersicum*) ‘Santa Cruz Kada’. Os vasos com as plantas inoculadas foram mantidos em condições de casa de vegetação com irrigação diária.

O tomateiro foi avaliado cerca de 60 dias após a inoculação e os cafeeiros, cerca de 240 dias. Por ocasião da avaliação, as raízes das plantas foram coletadas e levadas ao laboratório onde se procedeu a extração dos nematoides pelo método de Hussey & Barker (1973) e, posteriormente, realizou-se a contagem de todas as formas de vida do nematoide, em câmara de Peters ao microscópio fotônico, que consistiu a população final (Pf). Em seguida, calculou-se o fator de reprodução (FR), que é definido pela relação Pf / Pi (Oostenbrink, 1966). Plantas com FR < 1 são consideradas resistentes e, portanto, não são hospedeiras favoráveis ao nematoide, enquanto que as que exibem FR > 1 são suscetíveis, logo, hospedeiras favoráveis ao nematoide.

As sete cultivares de cafeeiro testadas apresentaram FR < 1, portanto não se mostraram hospedeiras favoráveis a *M. mayaguensis* (Tabela 1). Os dados apresentados nesse trabalho são semelhantes aos obtidos por Carneiro *et al.* (2008), que observaram resistência de *C. arabica* Catuaí Vermelho IAC 144 e progênie H 419 –54-52 a *M. mayaguensis* proveniente de raízes de goiabeira (*P. guajava*). Muniz (2007) também obteve dados semelhantes com as cultivares Catuaí Vermelho IAC 144, IAPAR 59, Obatã 16-6920, Sarchimor 4361, H419-5-4-5-2, Tupi Amarelo IAC 5111 e Tupi Vermelho IAC 1669-33, que

Tabela 1 - Reação (FR = fator de reprodução) e desenvolvimento radicular (MFR = massa fresca da raiz) de sete genótipos de *Coffea* spp. frente a população de *Meloidogyne mayaguensis*.

Cultivares	MFR (g)	FR
Obatã IAC 1669-20	-	0,00
Apoatã IAC 2258	-	0,00
Catuai Amarelo IAC 62	16,6	0,06
Catuai Vermelho IAC 99	12,5	0,01
Catuai Amarelo 17/02	28,9	0,18
Catuai Vermelho 20/15	27,2	0,06
Mundo Novo IAC 379-19	23,75	0,06

demonstraram resistência ou resistência moderada a *M. mayaguensis* proveniente de raízes de goiabeira do Brasil. Tupi Vermelho IAC 1669-33 também foi resistente à população de *M. mayaguensis* proveniente da Costa Rica, no entanto, as cultivares Catuai Vermelho IAC 144, IAPAR 59 e Obatã 16-6920 foram suscetíveis.

Em Cuba, *M. mayaguensis* foi citada como a espécie de nematoide mais perigosa para as lavouras de café (Rodriguez *et al.*, 2001). Esta reação diferencial de hospedeiros a populações de espécies de *Meloidogyne* provenientes de regiões distintas também foi relatado no Brasil por Lordello & Lordello (2001), os quais afirmaram que apesar de *M. incognita* estar presente em diversas culturas e plantas daninhas no estado de Minas Gerais, esse nematoide não é detectado nas principais cultivares de cafeeiro que são suscetíveis. Contudo, esse nematoide é um dos principais fatores limitantes da cafeicultura em lavouras do estado de São Paulo.

Resultados obtidos por Roese *et al.* (2007) estudando o patossistema *M. paranaensis* - soja, apontaram que genótipos de plantas que apresentam resistência ou tolerância a uma determinada espécie de nematoide podem ter comportamento variável frente a isolados provenientes de diferentes regiões, o que poderia explicar a divergência dos resultados entre as pesquisas acima relatadas no Brasil e em Cuba.

Ainda nesse sentido, Almeida *et al.* (2008) relatam que *M. mayaguensis* provenientes de goiabeira ‘Pedro Sato’ de Vista Alegre do Alto (SP) não infectou mudas de mamão ‘Formosa’ (*Carica papaya*), ao passo que Souza *et al.* (2006) reportaram infecção natural de mamão por essa espécie de nematoide no Rio de Janeiro. Rodriguez *et al.* (2003) também afirmaram que a soja ‘Forrest’ não foi hospedeira preferencial a

um isolado de *M. mayaguensis* proveniente de Cuba, contrastando com uma população proveniente da África que se reproduziu bem nessa cultivar.

O conhecimento das espécies e da variabilidade inter e intraespecífica são fundamentais para o manejo dos nematoides. A exemplo do que acontece entre espécies de *Meloidogyne*, a identificação das espécies e raças permite, mediante diagnóstico, estabelecer a cultura a ser explorada ou as que poderão compor um plano de rotação visando o manejo da praga.

É recomendável observar, nos estudos vindouros, as demais idades do cafeeiro, pois, segundo reportaram Lordello & Zamith (1960), o fator estágio de desenvolvimento das plantas influencia na suscetibilidade de cafeeiro a *M. coffeicola*, que não infecta muda de cafés em estádios iniciais de desenvolvimento e seu parasitismo ocorre somente em estádios adultos.

São incipientes os trabalhos com culturas agrícolas hospedeiras a *M. mayaguensis* no Brasil, sobretudo com espécies e cultivares de *Coffea*, bem como com relação à variabilidade intraespecífica dessa espécie. Com isso, os conhecimentos atuais não permitem conjecturar a respeito das causas da resistência das espécies e cultivares de cafeeiros estudados.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do auxílio à pesquisa que proporcionou a realização desse trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de estudo concedidas.

Literatura Citada

ABIC-ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ. 2009. O café brasileiro na atualidade. <

- http://www.abic.com.br/scafe_historia.html#atualidade > acesso em 12 de janeiro de 2009.
- ALMEIDA, E.J., A.R. SILVA, P.L.M. SOARES & J.M. SANTOS. 2008. Novos registros sobre *Meloidogyne mayaguensis* no Brasil e estudo morfológico comparativo para distinção dessa espécie de *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Brasileira*, 32 (3): 236-241.
- BARBOSA, D.H.S.G., H.D.VIEIRA, R.M. SOUZA, A.P. VIANA & C.P. SILVA. 2004. Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. *Nematologia Brasileira*, 28 (1): 49-54.
- CAMPOS, V.P. & L. VILLAIN. 2005. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: LUC, M., R. SIKORA & J. BRIDGE (ed). *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CABI, Wallingford - UK, p. 529-579.
- CARNEIRO, R.G., A.P. MÔNACO, M.P. MORITZ, K.C. NAKAMURA & A. SCHERER. 2006. Identificação de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira e em plantas invasoras, em solo argiloso, no Estado do Paraná. *Nematologia Brasileira*, 30 (3): 293-298.
- CARNEIRO, R.M.D.G., L.G.F. MESQUITA, W. GONÇALVES & A.A. PEREIRA. 2008. Pathogenicity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) from Brazil and Central America on two genotypes of *Coffea arabica*. *Tropical Plant Pathology*, 33 (4): 309-312.
- CARNEIRO, R.M.D.G., W.A. MOREIRA, M.R.A. ALMEIDA & A.L.M.M. GOMES. 2001. Primeiro relato de fitonematóide *Meloidogyne mayaguensis* parasitando goiaba (*Psidium guajava* L.) cv. Paluma. *Nematologia Brasileira*, 25 (1): 55-57.
- GUIMARÃES, L.M.P., R.M. MOURA & E.M.R. PEDROSA. 2003. Parasitismo de *Meloidogyne mayaguensis* em diferentes espécies botânicas. *Nematologia Brasileira*, 27 (2): 139-145.
- HUSSEY, R.S & K.R. BARKER. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57: 1025-1028.
- LIMA, I.M., R.M. SOUZA, C.P. SILVA & R.M.D.G. CARNEIRO. 2005. *Meloidogyne* spp. from preserved areas of Atlantic Forest in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Nematologia Brasileira*, 29 (1): 31-38.
- LORDELLO, A.I.L. & R.R.A. LORDELLO. 2001. Nematóides encontrados em cafezais no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, XXII, Marília. Resumos, p. 86.
- LORDELLO, L.G.E. & A.P.L. ZAMITH. 1960. *Meloidogyne coffeicola* sp.n., a pest of coffee trees in the State of Paraná, Brazil. *Revista Bras. Biologia*, 20: 375-379.
- MUNIZ, M.F.S. 2007. Variabilidade genética e biológica de *Meloidogyne exigua* e patogenicidade de *Meloidogyne* spp. em genótipos de cafeeiros. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 99 p.
- OOSTENBRINK, R. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mededeelingen der Landbouw-Hoogeschool, Wageningen*, 66: 1-46.
- RODRIGUEZ, M.G., L. SANCHEZ & J. ROWE. 2001. Host status of agriculturally important plant families to the root-knot nematode *Meloidogyne mayaguensis* in Cuba. *Nematropica*, 33 (2): 125-130.
- ROESE, A.D., R.D.L. OLIVEIRA & D.S. OLIVEIRA. 2007. Variabilidade Fisiológica em Populações de *Meloidogyne paranaensis*. *Fitopatologia Brasileira*, 32 (1): 40-43.
- SOUZA, R.M., M.S. NOGUEIRA, I.M. LIMA, M.M. MELARATO & C.M. DOLINSKI. 2006. Manejo do nematóide das galhas da goiabeira em São João da Barra (RJ) e relato de novos hospedeiros. *Nematologia Brasileira*, 30 (2): 165-169.

Reação de Diferentes Frutíferas a *Meloidogyne ethiopica**

Lúcia Somavilla^{1**}, Cesar B. Gomes², Luis E.C. Antunes², Roberto P. de Oliveira² & Regina M.D.G. Carneiro³

*Parte da Dissertação de Mestrado da primeira autora.

¹Campus Universitário, Universidade Federal de Pelotas, C. Postal 354, 96010-900 Pelotas (RS) Brasil.

²Embrapa Clima Temperado, Rodovia BR 392 - km 78, C. Postal 403, 96001-960 Pelotas (RS) Brasil.

³Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica – qEB, Av. W 5 Norte (final), C. Postal 02372, 70770-900 Brasília (DF) Brasil.

**Autora para correspondência: lsomavilla@hotmail.com

Recebido para publicação em 23 / 04 / 2009. Aceito em 21 / 07 / 2009

Editado por Cláudia Dias-Arieira

Resumo – Somavilla, L., C.B. Gomes, L.E.C. Antunes, R.P. de Oliveira & R.M.D.G. Carneiro. 2009. Reação de diferentes frutíferas a *Meloidogyne ethiopica*.

Meloidogyne ethiopica é uma espécie de nematoide de galhas que causa danos à videira (*Vitis* spp.) e ao quivi (*Actinidia deliciosa*). Entretanto, pouco se sabe a respeito da reação de outras frutíferas a esse nematoide. Este trabalho teve por objetivo avaliar a reação de espécies nativas e comerciais (*Vaccinium asbey* ‘Delite’, *Eugenia involucrata*, *E. guabiju*, *E. uwalba*, *E. uniflora*, *Campomanesia xanthocarpa*, *Myciaria cauliflora*, *Morus nigra* ‘Xavante’ e ‘Guarani’, *Psidium cattleianum*, *Prunus persica* ‘Capdbosq’, *Citrus sunki* ‘Maravilha’ e ‘Tropical’) a *M. ethiopica*. Mudanças das diferentes frutíferas, mantidas em casa de vegetação, foram inoculadas com 10.000 ovos do nematoide por planta. O quivi ‘Hayward’ foi utilizado como testemunha e o tomateiro ‘Santa Cruz’ para aferição do inóculo. Decorridos oito meses da inoculação do nematoide, as raízes de cada planta foram avaliadas quanto ao número de galhas e ao fator de reprodução (FR = população final / população inicial). A hospedabilidade das plantas foi estimada pelo índice de galhas e FR. Observou-se que doze espécies não foram hospedeiras de *M. ethiopica*, enquanto *P. persica* ‘Capdebosq’ e a testemunha *A. deliciosa* ‘Hayward’ foram boas hospedeiras.

Palavras-chaves: hospedabilidade, nematoide-das-galhas, frutíferas.

Summary - Somavilla, L., C.B. Gomes, L.E.C. Antunes, R.P. de Oliveira & R.M.D.G. Carneiro. 2009. Reaction of different fruit crops to *Meloidogyne ethiopica*.

Meloidogyne ethiopica is the main root-knot nematode species that causes damage to grapes (*Vitis* spp.) and kiwi (*Actinidia deliciosa*) fruit crops; however, little is known about the reaction of other crops to this nematode. The objective of this study was to evaluate the host status of native and commercial fruit crops (*Vaccinium asbey* ‘Delite’, *Eugenia involucrata*, *E. guabiju*, *E. uwalba*, *E. uniflora*, *Campomanesia xanthocarpa*, *Myciaria cauliflora*, *Morus nigra* ‘Xavante’ and ‘Guarani’, *Psidium cattleianum*, *Prunus persica* ‘Capdbosq’, *Citrus sunki* ‘Maravilha’ and ‘Tropical’) to *M. ethiopica*. Seedlings of different fruit crops were inoculated with 10,000 eggs of the nematode per plant at greenhouse conditions. Kiwi ‘Hayward’ was used as control and tomato ‘Santa Cruz’ as control of inoculum viability. After eight months of inoculation, the roots of each plant were evaluated using the number of galls and nematode reproduction factor (RF = final population / initial population). The host status of plants was estimated by gall index and RF. Twelve fruit species and cultivars were non-hosts to *M. ethiopica*, while *P. persica* ‘Capdebosq’ and the control *A. deliciosa* ‘Hayward’ were good hosts.

Key words: host status, root-knot nematode, fruit crops.

Conteúdo

Problemas fitossanitários decorrentes do ataque por nematoides fitoparasitas causam grandes prejuízos no desenvolvimento e estabelecimento das frutíferas no pomar, na qualidade dos frutos e na produção, aumentando os custos despendidos na cultura, constituindo-se em um fator limitante à produtividade (Magunacelaya, 2005). O nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) figura como o gênero mais comum, causando perdas severas na produção agrícola (Nyczepir, 1991). Dentre as principais espécies de *Meloidogyne* que ocorrem no Brasil, *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica* são as mais freqüentes e estudadas (Carneiro *et al.*, 1998), porém pouco se sabe a respeito da associação de espécies frutíferas e culturas anuais com outras espécies de nematoide-das-galhas.

Recentemente, uma espécie exótica, *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968, foi detectada no Brasil, em quivi na Serra Gaúcha (Carneiro *et al.*, 2003), soja (*Glycine max*) em São Paulo (Castro *et al.*, 2003) e plantas de yacon (*Polymnia sonchifolia*) e tomate no Distrito Federal (Carneiro & Almeida, 2005). Mais tarde, esse nematoide também foi detectado em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) no Rio Grande do Sul (Gomes *et al.*, 2005). No Chile, essa espécie causa danos na cultura da videira e do quivi e está distribuída em várias regiões viticultoras desse país (Carneiro *et al.*, 2007).

Em trabalhos preliminares realizados por Carneiro *et al.* (2003) e Somavilla *et al.* (2006), foi estudada a reação de diversas espécies frutíferas a *M. ethiopica*. Os autores verificaram que morango (*Fragaria ananassa*), pera (*Pyrus calleryana*), framboesa (*Rubus idaeus*), amora-preta (*Rubus* sp.) e mirtilo (*Vaccinium ashei*) comportaram-se como imunes ao nematoide. Entretanto, poucas espécies e genótipos foram testados, necessitando de mais estudos sobre a reação de outras frutíferas ao referido nematoide.

Apesar dos relatos de ocorrência de *M. ethiopica* em quivi (*Actinidia deliciosa*) no Brasil (Carneiro *et al.*, 2003), as informações a respeito da reação de outras espécies de frutíferas de importância agrícola para a região Sul são escassas. Dentre as práticas de controle adotadas para culturas perenes, medidas preventivas, como escolha do local de instalação do pomar ou viveiro isento de pragas, plantio de mudas sadias

utilizando, quando possível, porta-enxertos resistentes aos nematoides são as principais. Na impossibilidade de uso de porta enxerto resistente ou tolerante em áreas infestadas, o plantio de fruteiras não hospedeiras, constitui-se em uma das medidas mais viáveis (Carneiro *et al.*, 1998; Campos *et al.*, 2002).

Considerando-se a ocorrência de *M. ethiopica* no Sul do Brasil e a importância econômica das espécies frutíferas para o Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, foi objetivo deste trabalho avaliar a hospedabilidade de diferentes frutíferas a *M. ethiopica*.

Quatorze espécies e cultivares de frutíferas foram avaliadas quanto à hospedabilidade a *M. ethiopica*, em casa de vegetação. Mudanças de mirtilo (*V. ashei*) 'Delite', cereja-do-mato (*Eugenia involucrata*), guabiju (*Myrcianthes pungens*), uvaia (*Eugenia uwalba*), pitanga (*Eugenia uniflora*), guavirova (*Campomanesia xanthocarpa*), jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), amora-preta (*Morus nigra*) 'Xavante' e 'Guarani', araçá amarelo (*Psidium cattleianum*), pessegueiro (*Prunus persica*) 'Capdbosq', dois porta enxertos de citros (*Citrus sunki*) 'Maravilha' e 'Tropical' e quivi 'Hayward' (testemunha), foram plantadas em sacos plásticos de dois litros contendo solo esterilizado e inoculadas com 10.000 ovos e juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. ethiopica* por planta, extraídos pelo método de Hussey & Barker (1973) a partir de plantas de tomateiros infectadas. Mudanças de tomateiro 'Santa Cruz' foram utilizadas como testemunha para aferição do inóculo.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente ao acaso e constou de seis repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma planta. Decorridos oito meses da inoculação, as raízes de cada planta foram separadas da parte aérea, lavadas cuidadosamente para retirar o solo, e avaliadas quanto ao índice de galhas (Taylor & Sasser, 1978). A seguir realizou-se a extração de ovos das raízes pelo método de Hussey & Barker (1973) para posterior quantificação e determinação do fator de reprodução (FR = população final / população inicial) do nematoide. A hospedabilidade das frutíferas foi estimada a partir de dois critérios: (a) índice de galhas (IG), escala de 0 a 5, considerando-se como boas hospedeiras ao nematoide (BH), as plantas que apresentaram nota ≥ 3 , más hospedeiras (MH) àquelas que receberam notas entre 1 e 2 e não hospedeiras as

que receberam nota = 0 (Sasser *et al.*, 1984); (b) fator de reprodução: $FR \geq 1$ indicou boa hospedeira, $FR < 1,0$ má hospedeira e $FR = 0$ não hospedeira (Oostenbrink, 1966; Sasser *et al.*, 1984).

Conforme resultados apresentados na Tabela 1, observou-se que, com exceção do pessegueiro 'Capdebosq' e do quivi 'Hayward', todas as espécies de frutíferas testadas foram consideradas não hospedeiras (imunes) a *M. ethiopica*. A não hospedabilidade das cultivares de amora-preta e mirtilo a *M. ethiopica* foi também observada por Carneiro *et al.* (2003), usando outras cultivares dessas espécies. Apenas o quivi (testemunha) e o pessegueiro foram bons hospedeiros, apresentando índice máximo de galhas (IG = 5). Carneiro *et al.* (2003), avaliando através do índice de galhas a reação desse mesmo porta-enxerto de pessegueiro (Capdebosq), constataram a hospedabilidade a *M. ethiopica*. Entretanto, foram observados índices de galhas inferiores (IG = 3) ao obtido neste estudo. Apesar dos pessegueiros inoculados com *M. ethiopica* terem apresentado índice máximo de galhas nas raízes, não foi observada a presença de ovos no sistema radicular, o que resultou em $FR = 0$ (Tabela 1).

No caso do pessegueiro, torna-se difícil adotar apenas o conceito de $FR=0$ (planta não hospedeira ou imune), uma vez que as plantas parasitadas pelo nematoide apresentam sintomas de meloidoginose

bastante evidentes nas raízes e na parte aérea, em condições de campo. Dessa maneira, adotaram-se os dois conceitos para o pessegueiro: BH quanto ao IG e NH quanto ao FR (Tabela 1). Conforme observações realizadas no Rio Grande do Sul, é bastante comum a ocorrência de pessegueiros com sistema radicular com sintomas severos de meloidoginose, ou seja, pesadamente atacados pelos nematoides de galhas, entretanto com número muito reduzido de ovos nas raízes. Esse fenômeno pode estar ligado à cultivar Capdebosq e parece estar associado a algum mecanismo de resistência da planta ao nematoide, que permite o desenvolvimento do juvenil até estádios mais avançados, ocorrendo a formação de sítios de alimentação e galhas, mas impedindo que a fêmea atinja o estágio adulto e consequentemente produza ovos (Rossi, 2002; Anthony *et al.*, 2005). Porém, pouco se sabe sobre essa reação de incompatibilidade do pessegueiro Capdebosq ao nematoide de galhas.

A cultivar de quivi Hayward, usada como testemunha, foi suscetível a *M. ethiopica*, confirmando a patogenicidade dessa espécie à cultura (Carneiro *et al.*, 2003). Essa cultivar é a mais plantada em todo o mundo e também relatada como altamente suscetível a outras espécies de nematoide-das-galhas, como *M. hapla*, *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* (Philippi *et al.*, 1996; Carneiro *et al.*, 2007).

Tabela 1 - Reação de espécies de fruteiras nativas e comerciais a *Meloidogyne ethiopica*.

Culturas ou cultivares	Nº. de galhas	IG ¹	FR ²	Reação ^{1,2}
Amoreira-preta 'Xavante'	0	0	0	NH
Amoreira-preta 'Guarani'	0	0	0	NH
Mirtilo 'Delite'	0	0	0	NH
Cereja-do-mato	0	0	0	NH
Guabiju	0	0	0	NH
Uvaia	0	0	0	NH
Pitanga	0	0	0	NH
Guavirova	0	0	0	NH
Araçá-amarelo	0	0	0	NH
Jaboticaba	0	0	0	NH
Pessegueiro 'Capdebosq'	155	5	0	BH ¹ /NH ²
Citros Sunki 'Maravilha'	0	0	0	NH
Citros Sunki 'Tropical'	0	0	0	NH
Quivi 'Hayward'	220	5	5,96	BH
Tomateiro	544	5	8,36	BH

¹Índice de galhas: 0 = nenhuma galha (não hospedeira = NH), 1 = 1-2 galhas e 2 = 3-10 galhas (más hospedeiras = MH), 3 = 11-30 galhas, 4 = 31-100 galhas e 5 ≥ 100 galhas (boas hospedeiras = BH).

²Fator de reprodução: $FR \geq 1$ boa hospedeira (BH), $FR < 1,0$ má hospedeira (MH), $FR = 0$ não hospedeira (NH).

O cultivo de frutíferas é realizado em toda região sul do Brasil. A presença de *M. ethiopica* nesses locais, associado ao potencial de danos, pode significar sérios prejuízos aos fruticultores e à economia dessa região. De acordo com as informações obtidas neste estudo, a não hospedabilidade apresentada por várias frutíferas a *M. ethiopica* vem a contribuir como uma alternativa na implantação de novos pomares em áreas infestadas.

Literatura Citada

- ANTHONY, F., P. TOPART, A. MARTINEZ, M. SILVA & M. NICOLE. 2005. Hypersensitive-like reaction conferred by the Mex-1 resistance gene against *Meloidogyne exigua* in coffee. *Plant Pathology*, 54 (4): 476-482.
- CAMPOS, V.P., J.R. CAMPOS, L.H.C.P. SILVA & M.R. DUTRA. 2002. Manejo de doenças causadas por nematóides em frutíferas. In: ZAMBOLIM, L. (ed.). Manejo Integrado: Fruteiras Tropicais - Doenças e Pragas. Editora UFV, Viçosa (MG), p. 185-237.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & M.R.A. ALMEIDA. 2005. Registro de *Meloidogyne ethiopica* Whitehead em plantas de yacon e tomate no Distrito Federal do Brasil. *Nematologia Brasileira*, 29 (2): 285-287.
- CARNEIRO, R.M.D.G., A.D. CAMPOS, M.C.J. FRANCISCO & M.C. RASEIRA. 1998. Avaliação de porta-enxertos de *Prunus* quanto a suscetibilidade ao nematóide anelado e ao conteúdo de enzimas Fenol Oxidases. *Nematologia Brasileira*, 22 (1): 32-38.
- CARNEIRO, R.M.D.G., C.B. GOMES, M.R. ALMEIDA, A.C.C. GOMES & I. MARTINS. 2003. Primeiro registro de *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968 em plantas quivi no Brasil e reação em diferentes plantas hospedeiras. *Nematologia Brasileira*, 27 (2): 152-158.
- CARNEIRO, R.M.D.G., M.R.A. ALMEIDA, E.T. COFCEWICZ, J.C. MAGUNACELAYA & E. ABALLAY. 2007. *Meloidogyne ethiopica*, a major root-knot nematode parasitizing *Vitis vinifera* and other crops in Chile. *Nematology*, 9 (5): 635-641.
- CASTRO, J.M.C., R.D. LIMA & R.M.D.G. CARNEIRO. 2003. Variabilidade enzimática de populações de *Meloidogyne* spp. em regiões produtoras de soja no Brasil. *Nematologia Brasileira*, 27 (1): 1-12.
- GOMES, C.B., J.J. CARBONARI, I.L. MEDINA & D.L. LIMA. 2005. Levantamento de *Meloidogyne ethiopica* em viveiros de quivi no Rio Grande do Sul e registro da ocorrência em fumo (*Nicotiana tabacum*) e guanxuma (*Sida rhombifolia*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, XXV, Piracicaba (SP). Resumos, p. 69.
- HUSSEY, R.S. & K.R. BARKER. 1973. A comparison of methods of collecting inocula for *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57: 1025-1028.
- MAGUNACELAYA, J.C. 2005. *Meloidogyne ethiopica* y el cultivo de la vid en Chile. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, XXV, Piracicaba (SP). Resumos, p.33.
- NYCZEPIR, A.P. 1991. Nematode management strategies in stone fruits in the United States. *Journal of Nematology*, 23 (3): 334-341.
- OOSTENBRINK, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen*, 66: 1-46.
- PHILIPPI, I., B.A. LATORE, G.F. PÉREZ & L. CASTILLO. 1996. Identificación de los nematodos del nudo (*Meloidogyne* spp.) del kivi por análisis de isoenzimas, en Chile. *Fitopatología*, 31 (2): 96-101.
- ROSSI, C.E. 2002. Levantamento, reprodução e patogenicidade de nematóide a fruteiras de clima subtropical e temperado. (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Piracicaba (SP), 111 p.
- SASSER, J.N., C.C. CARTER & R.M. HARTMAN. 1984. Standardization of Host Suitability Studies and Reporting of Resistance Root-knot Nematodes. North Carolina State University Graphics, Raleigh (NC) EUA, 32 p.
- SOMAVILLA, L., C.B. GOMES, R.P. OLIVEIRA & R.M.D.G. CARNEIRO. 2006. Resistência de cultivares de morangueiro ao nematóide das galhas *Meloidogyne ethiopica* Whitehead 1968. *Nematologia Brasileira*, 30 (3): 299-301.
- TAYLOR, A.L. & J.N. SASSER. 1978. Biology, Identification and Control of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.). North Carolina State University Graphics, Raleigh (NC) EUA, 111 p.

Screening of Cherry Tomato Genotypes for Resistance to *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*

Leônidas L. Belan*, Stênio O. Fonseca, Fábio R. Alves*, Waldir C. de Jesus Júnior, Frederico de P. Matta, Pablo D.S. Cabral, Lilian K.C. Rabello & Alessandra A. Rodrigues

Departamento de Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, 29500-000 Alegre (ES) Brazil.

*Corresponding authors: leonidas_agronomia@yahoo.com.br, fabioramosalves@yahoo.com.br

Received for publication on May 4, 2009. Accepted on September 10, 2009

Edited by Claudio Marcelo Oliveira

Summary - Belan, L.L., S.O. Fonseca, F.R. Alves, W.C. Jesus Júnior, F.P. Matta, P.D.S. Cabral, L.K.C. Rabello & A.A. Rodrigues. 2009. Screening of cherry tomato genotypes for resistance to *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*.

The resistance of twelve tomato accesses to *M. incognita* race 3 and *M. javanica* was assessed in a greenhouse experiment with eight replicates in a completely randomized design. Tomato accesses used in this study were: 05 (Indiana 73), 82 (Sweet Cherry), 11 (VR Sugar), 16 (Starfine), 25 (B/E – 1260-1-1), 40 (PI – 262910 CGS), 50 (UENF 201), 71 (ACC HIGH Pigmet line / ACC 2343), 78 (cherry small elongated format – collected at Brazilian SE), 79 (Ales cherry pear-form), 80 (cherry large rounded – collected at Brazilian SE) and 51 (UENF 202 – KC 46J2J2). Each plant was inoculated with 5,000 eggs + second stage juveniles. Tomato ‘Santa Clara’ was used as control. Host suitability was designated based on the percentage of the reproduction, i.e., 0-25 % = highly susceptible (HS), 26-50 % = susceptible (SU), 51-75 % = low resistant (LR), 76-95 % = moderately resistant (MR), 96-99 % = resistant (RE), 100 % = highly resistant (HR) or immune (IM). The great majority of accesses was SU or HS to both nematode species as did tomato ‘Santa Clara’. The accesses 05 and 82 were LR to *M. javanica*. The results obtained from the present study indicate that there are few resistance genes in commercial tomato cultivars and uncultivated tomato to *M. javanica* and *M. incognita*.

Key words: resistance, root-knot nematode, tomato

Resumo - Belan, L.L., S.O. Fonseca, F.R. Alves, W.C. Jesus Júnior, F.P. Matta, P.D.S. Cabral, L.K.C. Rabello & A.A. Rodrigues. 2009. Seleção de genótipos de tomateiro resistentes a *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* raça 3.

Neste estudo foram avaliados doze acessos de tomateiro ao parasitismo de *Meloidogyne incognita* raça 3 ou *M. javanica*, em experimento conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado com oito repetições. Os acessos de tomateiro foram: 05 (Indiana 73), 82 (Sweet Cherry), 11 (VR Sugar), 16 (Starfine), 25 (B/E – 1260-1-1), 40 (PI – 262910 CGS), 50 (UENF 201), 71 (ACC HIGH Pigmet line / ACC 2343), 78 (cereja pequeno formato alongado – coletado na região Sudeste do Brasil), 79 (Ales cereja piriforme), 80 (cereja redondo grande – coletado na região Sudeste) e 51 (UENF 202 – KC 46J2J2), além da cultivar Santa Clara (padrão de suscetibilidade). Cada planta foi inoculada com 5.000 ovos + juvenis de segundo estágio. Tomando por base o percentual de redução do FR, os acessos foram classificados da seguinte forma: 0-25 % = altamente suscetível (AS), 26-50 % = suscetível (SU), 51-75 % = pouco resistente (PR), 76-95 % = moderadamente resistente (MR), 96-99 % = resistente (R), 100 % = altamente resistente (AR) ou imune (I). A maioria dos acessos foi SU ou AS a ambas as espécies de nematoides, assim como o tomateiro Santa Clara. Os acessos 05 e 82 foram PR à *M. javanica*. Os resultados obtidos a partir desse estudo indicam que existem poucos genes de resistência em cultivares de tomateiros comerciais e tomateiros não cultivados a *M. javanica* e *M. incognita*.

Palavras-chaves: resistência, nematoides-das-galhas, tomateiro.

Conteúdo

Tomato (*Solanum lycopersicon*) is one of the most popular vegetable in Brazilian meal. In 2007, Brazil produced 3,356,456 tons of tomato in 56,275 ha. Goiás and São Paulo States are the largest national producers (IBGE, 2008). Diseases are one of the major factors for tomato yield losses. According to Lopes & Santos (1994), more than two hundred of biotic and abiotic diseases can decrease tomato yield. Root-knot nematodes, particularly *M. incognita* e *M. javanica*, are the most important pathogens to tomato because they are dispersed around the world and, depending on the susceptibility of plant and infestation level, they can cause considerably damage to tomato plants, mainly when temperature and humidity are elevated (Ali & Gad El-Hak, 1994; Lopes & Santos, 1994; Campos, 1999; Church *et al.*, 2004).

The plant-parasitic nematode management includes mainly chemical and cultural control (Johnson, 1985; Campos, 1999), however genetic resistance in plants is currently the method of choice for controlling *Meloidogyne incognita*. (Jacquet *et al.*, 2005). Sometimes, the use of resistant cultivars to root-knot nematodes associated with some other management practices can substitute or reduce the nematicide applications, chemical pesticides expensive and harmful to environment (Wanderley *et al.*, 2007, Charchar *et al.*, 2007).

Currently all the commercially available root-knot nematode resistant cultivars carry the dominant *Mi-1* gene, which confers resistance to the three major root-knot nematodes species, *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* and *M. javanica* (Jacquet *et al.*, 2005). This gene was detected in uncultivated species of *Solanum peruvianum* (Frazier & Denett, 1949), located in chromosome 6 (Gilbert & McGuire, 1955), and incorporated in commercial cultivars of *S. lycopersicon* (Thomason & Smith, 1957).

The difference in host reactions to *Meloidogyne* spp has been observed among genotypes of tomato. For instance, Trifonova & Vulkova (2007) reported that the tomato hybrids n°. 9-4, 9-6 and 9-8 were highly resistant to *M. incognita* whereas 12 hybrids were susceptible. Likewise, the tomato cultivar Mini Roma was the least susceptible to *M. incognita* while Moneymaker and Roma the most susceptible (Singh

& Khurma, 2007). Ali & Gad-El-Hak (1994) evaluated the reaction of 12 commercial tomato cultivars screened for resistance to *M. javanica* and concluded that five were tolerant and seven were susceptible.

In this study, we evaluated the resistance of 12 cherry tomato accesses to *Meloidogyne incognita* race 3 and *M. javanica* as an attempt to find source of resistance for further use in tomato breeding programs.

The study was carried out at the Agrarian Science Center, Federal University of Espírito Santo, municipality of Alegre (ES) Brazil. The twelve tomato accesses of Cherry group (*Solanum lycopersicon* and *S. lycopersicon* var. *cerasiforme*) used were: 05 (Indiana 73), 82 (Sweet Cherry), 11 (VR Sugar), 16 (Starfine), 25 (B/E – 1260-1-1), 40 (PI – 262910 CGS), 50 (UENF 201), 71 (ACC HIGH Pigmet line / ACC 2343), 78 (cherry small elongated format – collected at Brazilian SE), 79 (Ales cherry pear-form), 80 (cherry large rounded – collected at Brazilian SE) and 51 (UENF 202 – KC 46J2J2).

The isolates of *M. incognita* race 3 and *M. javanica* were reared on tomato ‘Santa Clara’ cultivated in bags containing a mixture of soil and sand 1:1 (v:v), previously sterilized in autoclave (121 °C / 2 h in three consecutive days) (Zauza *et al.*, 2007), maintained in greenhouse. Species identifications were performed by analysis of esterase isozyme. Eggs were extracted from roots using the method described by Hussey & Barker (1973) modified by Boneti & Ferraz (1981).

Tomato seeds were placed in trays of 128 cells containing an organic-mineral substrate. Twenty days after germination, seedlings were transplanted to plastic bags containing 2.000 cm³ of soil and sand 2:1 (v:v) sterilized in autoclave as described above. Each seedling was inoculated with 5,000 eggs + second-stage juveniles (J₂) of *M. incognita* race 3 or *M. javanica* at transplant. Plants were maintained in a greenhouse in a completely randomized design with eight replicates. The tomato ‘Santa Clara’ was used as control. The air temperature was registered during the experimental period at the greenhouse where the work was carried out.

Thirty five days after inoculation, root systems were carefully washed and egg extracted from the roots as described previously. The reproduction factor (Rf) was

calculated by dividing the final number of eggs obtained from each genotype by initial number of eggs (RF = Pf / Pi). Host suitability was designated according to Moura & Regis (1987) (Table 1).

All accesses were SU to *M. incognita* race 3 (Table 2), except the accesses 11, 78 and 80, which were HS. Similar results were reported by Trifonova & Vulkova (2007). These authors found that hybrids of *Solanum* spp. were also susceptible to *M. incognita*. In another study, six tomato cultivars, i.e., Moneymaker, Beefsteak, Roma, Summertaste, Mini Roma and Smallfry were tested for their susceptibility to *M. incognita*. The cultivars Moneymaker and Roma were the most susceptible whereas Mini Roma, the least susceptible (Singh & Khurma, 2007).

The accesses 51, 78, 79 and 80 were HS, the accesses 05 and 82 LR and the other accesses SU to *M. javanica* (Table 2). Ali & Gad-El-Hak (1994) found that out of 12 commercial tomato cultivars screened for resistance to *M. javanica*, seven were susceptible

and five tolerant. Perhaps the access 05 and 82 could be used in breeding programs aiming the introduction of resistance genes against *M. javanica* in commercial cultivars and reduce yield losses caused by this nematode species in the field (Charchar *et al.*, 2003).

The maximum, mean and minimum air temperature during the experimental period were 31.6, 25.3 and 20.5 °C, respectively. Perhaps the high temperature affected the resistance in some tomato genotypes used in this study. According to many authors, temperature higher than 28 °C break the resistance of gene *Mi* present in tomato plants (Dropkin, 1969; Araújo *et al.*, 1982; Ammati *et al.*, 1986; Inomoto *et al.*, 1995; Alves & Campos, 2001). In order to confirm the results, this experiment should be carried out again.

The results obtained from this and other previously published studies indicate that there are few resistance genes in commercial tomato cultivars and uncultivated tomato to *M. javanica* and *M. incognita*.

Table 1 - Scale of the percentage of reproduction (%R), according Moura & Regis (1987) and used in this study.

%R	Host reaction
0-25	Highly susceptible (HS)
26-50	Susceptible (SU)
51-75	Low resistant (LR)
76-95	Moderately resistant (MR)
96-99	Resistant (RE)
100	Highly resistant (HR) or immune (IM)

Table 2 - Reproduction factor (Rf), percentage of the reproduction (%R) and suitability of 12 tomato accesses to *Meloidogyne incognita* race 3 or *M. javanica*.

Accesses	<i>M. incognita</i> race 3			<i>M. javanica</i>			
	RF	(%R)	Reaction ¹	Accesses	RF	(%R)	Reaction
40	5,85	47,86	SU	05	13,78	73,26	LR
50	6,23	44,47	SU	82	24,61	52,26	LR
05	6,45	42,51	SU	11	26,45	48,69	SU
25	6,66	40,64	SU	16	30,31	41,21	SU
51	6,96	37,97	SU	25	31,61	38,68	SU
71	7,20	35,83	SU	40	32,47	37,01	SU
82	7,26	35,29	SU	50	33,59	34,84	SU
79	7,39	34,14	SU	71	34,02	34,01	SU
16	7,71	31,28	SU	51	48,69	5,55	HS
80	8,78	21,75	HS	78	39,01	24,33	HS
78	8,91	20,59	HS	79	39,97	22,46	HS
11	11,22	0,00	HS	80	41,35	19,80	HS
Santa Clara	8,76	21,93	HS (C)	Santa Clara	51,55	0,00	HS (C)

¹HS = highly susceptible, SU = susceptible, LR = low resistant, MR = moderately resistant, RE = resistant, HR = highly resistant, IM = immune, C = control.

Literature Cited

- ALI, A.H.H. & S.H. GAD EL-HAK. 1994. Host suitability and resistance of tomato to *Meloidogyne javanica*. Bulletin of Faculty of Agriculture, University of Cairo. 45 (3): 753-763.
- ALVES, F.R. & V.P. CAMPOS. 2001. Efeito do aquecimento do solo na resistência de Plantas a *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* raça 3. Nematologia Brasileira, 25(2): 153-162.
- AMMATI, M., I.J. THOMASON & H.E. MCKINNEY. 1986. Retention of resistance to *Meloidogyne incognita* in *Lycopersicon* genotypes at high soil temperature. Journal of Nematology, 18(4): 491-495.
- ARAÚJO, M.T.; M.F. BASSETT; J.J. AUGUSTINE & D.W. DICKSON. 1982. Effect of diurnal changes in soil temperatures on resistance to *Meloidogyne incognita* in tomato. Journal of Nematology, 14(3): 414-416.
- BONETTI, J.I. & S. FERRAZ. 1981. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira. 6: 553.
- CAMPOS, V.P. 1999. Manejo de doenças causadas por fitonematóides. Curso de Pós-Graduação à Distância - Manejo de Doenças de Plantas. Editora UFPA, Lavras, 120 p.
- CHARCHAR, J.M., V. GONZAGA, L.B. GIORDANO, L.S. BOITEUX, N.B.V. REIS & F.A.S. ARAGÃO. 2003. Reações de cultivares de tomateiro à infecção por população mista de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *M. javanica* em estufa plástica e campo. Nematologia Brasileira, 27: 49-54.
- CHARCHAR, J.M., V. GONZAGA, J.V. VIEIRA, V.R. OLIVEIRA, A.W. MOITA & F.A.S. ARAGÃO. 2007. Efeito da rotação de culturas no controle de *Meloidogyne* spp. em cenoura na região norte do Estado de Minas Gerais. Nematologia Brasileira, 31: 173-179.
- CHURCH, G.T., D.O. CHELLEMI & E.N. ROSSKOPF. 2004. *Meloidogyne* species within alternative tomato production systems. Journal of Nematology. 36 (3): 312.
- DROPKIN, V.H. 1969. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. Phytopathology, 59(11): 1632-1637.
- FRAZIER, W.A. & R.K. DENNETT. 1949. Tomato lines of *Lycopersicon esculentum* type resistant to tobacco mosaic virus. American for Society Horticultural Science, 54: 265-271.
- GILBERT, J.C. & D.C. MCGUIRE. 1955. Inheritance of resistance to severe root-knot from *Meloidogyne incognita* in commercial type tomatoes. American Society for Horticultural Science, 68: 437-442.
- HUSSEY, R.S. 1985. Host-Parasite relationships and associated physiological changes, In: SASSER, J.N & C.C. CARTER. (ed). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. North Carolina State University, Raleigh (NC) EUA, p.143-153.
- IBGE, 2008. Levantamento Sistemático da Produção.
- INOMOTO, M.M., E.A. GIGLIOTI, R.P. OLIVEIRA & C.M.G. OLIVEIRA. 1995. Effect of soil temperature on tomato resistance to *Meloidogyne javanica*. Summa Phytopathologica, 21(2): 175-177.
- JACQUET, M., M. BONGIOVANNI, M. MARTINEZ, P. VERSCHAVE, E. WAJNBERG & P. CASTAGNONE-SERENO. 2005. Variation in resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato genotypes bearing the *Mi* gene. Plant pathology, 54 (2): 93-99.
- JOHNSON, A.W. The role of nematicides in nematode management. In: SASSER, J.N & C.C. CARTER. (ed). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. North Carolina State University, Raleigh, p.249-267.
- LOPES, C.A. & J.R.M. SANTOS. 1994. Doenças do Tomateiro. EMBRAPA-CNPQ, Brasília, 61 p.
- MEDINA-FILHO, H.P. & S.D. TANKSLEY. 1983. Breeding for nematode resistance. In: EVANS, D.A., W.R. SHARP, P.V. AMMIRATO, & Y. YAMADA. (ed). Handbook of Plant Cell Culture: Technique for Propagation and Breeding. MacMillan, New York, p. 904-923.
- MOURA, R.M. & E.M.O. REGIS. 1987. Reação de cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em relação ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* (Nematoda: Heteroderidae). Nematologia Brasileira, 11: 215-225.
- SINGH, S.K. & U.R. KHURMA. 2007. Susceptibility of six tomato cultivars to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. The South Pacific Journal of Natural Science, 13: 73-77.
- THOMASON, I.S. & P.G. SMITH. 1957. Resistance in tomato to *Meloidogyne javanica* and *M. incognita*. Plant Disease Reporter, 41: 180-181.
- TRIFONOVA Z. & Z. VULKOVA. 2007. Resistance of F1 hybrids of *Lycopersicon* genus to populations of *Meloidogyne* species. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 13: 535-538.
- WANDERLEY, M.J.A., P.A. WANDERLEY, P.F. ATHAYDE FILHO, J.M. SANTOS & E.R. PEREIRA. 2007. Resistência genética do feijão caupi ao nematóide *Meloidogyne javanica*. Revista Brasileira de Agroecologia, 2 (1): 1.377-1.380.
- ZAUZA, E.A.V., A.C. ALFENAS & R.G. MAFIA. 2007. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: ALFENAS, A.C. & R.G. MAFIA (ed). Métodos em Fitopatologia. Editora UFV, Viçosa, p. 22-51.

Utilização de Produtos Alternativos no Manejo de Nematoides da Cana-de-açúcar no Estado de Pernambuco

Andréa Chaves^{1*}, Elvira M.R. Pedrosa², Lílian M.P. Guimarães¹, Sandra R.V.L., Maranhão² & Misterlaine K.R.S. Oliveira¹

¹Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Ângela Cristina C.P. de Luna s/n, Bairro Novo, 55810-000 Carpina (PE) Brasil.

²Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife (PE) Brasil.

*Autora para correspondência: achavesfuza@yahoo.com.br

Recebido para publicação em 5 / 01 / 2009. Aceito em 27 / 10 / 2009

Editado por Cláudia Dias-Arieira

Resumo - Chaves, A., S.R.V.L. Maranhão, L.M.P. Guimarães, E.M.R. Pedrosa & M. K. R.S. Oliveira. Utilização de produtos alternativos no manejo de nematoides da cana-de-açúcar no estado de Pernambuco.

Com o objetivo de avaliar o efeito do óleo de nim e torta de filtro, isoladamente ou associados, sobre a densidade populacional de nematoides endoparasitos, foi conduzido um experimento em área de plantio de cana-de-açúcar naturalmente infestada com *Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus zaeae*. Foi utilizado o delineamento experimental em blocos ao acaso, com parcelas de cinco linhas de dez metros, espaçamento entre plantas de 1,4 m, e cinco repetições. A variedade usada foi a RB 813804, com os seguintes tratamentos: 1) óleo de nim (2 l / ha); 2) óleo de nim (4 l / ha); 3) torta de filtro (60 t / ha); 4) torta de filtro (60 t / ha) + óleo de nim (2 l / ha); 5) aldicarbe (Temik 150 G, 20 kg / ha); 6) testemunha. Os tratamentos não afetaram as variáveis tecnológicas do caldo da cana. As maiores ($P \leq 0,05$) produtividades ocorreram nas plantas tratadas com torta de filtro isoladamente ou associada ao óleo de nim, com incrementos de 21,4 e 23,4 t / ha. A densidade populacional de *Meloidogyne* spp. no solo e na raiz não sofreu efeito dos tratamentos, diferentemente de *P. zaeae* em raízes, que apresentou as maiores densidades populacionais nas testemunhas e parcelas com torta de filtro. Os menores níveis populacionais de *P. zaeae* ocorreram nas parcelas com nematicida ou com o óleo de nim (4 l / ha), indicando eficiência no controle desse nematoide em condições de campo.

Palavras-chaves: *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus zaeae*, manejo integrado, *Saccharum* sp.

Summary - Chaves, A., S.R.V.L. Maranhão, L.M.P. Guimarães, E.M.R. Pedrosa & M. K. R.S. Oliveira. 2009. Use of alternative products in the management of sugarcane nematodes in Pernambuco State.

With the objective of evaluating the effect of the nim oil and filter press mud, separately or associated, on the population density of endoparasite nematodes, an experiment was carried out with the variety RB 813804 in a *Meloidogyne* spp. and *Pratylenchus zaeae* naturally infested field. The experiment was conducted in a completely randomized block design, with five 10-m lines as experimental units, 1.4 m between plants, and five replicates. The treatments were: 1) nim oil (2 l / ha); 2) nim oil (4 l / ha); 3) filter press mud (60 t / ha); 4) filter press mud (60 t / ha) + nim oil (2 l / ha); 5) aldicarb (Temik 150 G, 20 kg / ha); 6) control. The treatments did not affect the technological variables of sugarcane juice. Plants treated only with filter press mud or associated with nim oil presented the highest ($P \leq 0.05$) productivity, increasing 21.4 and 23.4 t / ha. *Meloidogyne* spp. densities in soil and roots were not affected by treatments, in contrast to *P. zaeae*, which presented the highest densities in roots with filter press mud and in the control. The lower ($P \leq 0.05$) *P. zaeae* density occurred in plants treated with aldicarb or nim oil (4 l / ha), indicating efficiency to control this nematode under field conditions.

Key words: *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus zaeae*, integrated management, *Saccharum* sp.

Conteúdo

A resistência de pragas a agrotóxicos e os elevados custos dos produtos químicos têm estimulado a busca por alternativas menos agressivas ao meio ambiente e de menor impacto financeiro à agricultura (Costa *et al.*, 2001). Pertencente à família Meliaceae, o nim (*Azadirachta indica*), árvore indiana conhecida há mais de 5.000 anos, apresenta atividade contra mais de 400 espécies de pragas (Martinez, 2002), constituindo grande repositório de substâncias bioativas (Costa *et al.*, 2001). O óleo de nim apresenta efeito repelente a muitos organismos e suas folhas possuem propriedades antivirais e antibacterianas (Baumer, 1983), bem como contra insetos, fungos, protozoários e nematoides (Schumutterer, 1990). Diferentes partes da planta foram estudadas e apresentaram mais de 40 ingredientes ativos, pertencentes a grupos de diterpenoides, triterpenoides, limonoides e flavonoides (Thakur *et al.*, 1981). Nimbim, nimbinim e nimbidim são exemplos dos muitos princípios ativos presentes nos extratos desta planta. A azadiractina, principal ingrediente ativo, tem sido estudada mais intensamente (Neves *et al.*, 2003).

Em insetos, os mecanismos de ação desta substância se diferenciam, podendo ser observada ação repelente e antialimentar, sobre crescimento, metamorfose e fecundidade e ação sobre o ciclo vital dos mesmos (Neves *et al.*, 2003). Em nematoides, no entanto, tais mecanismos ainda não estão elucidados. No controle de nematoides em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), o nim vem sendo usado através de extratos foliares e óleos aplicados na cobertura de rebolos e aplicação de tortas no fundo do sulco de plantio. Os extratos, óleos e tortas podem ser aplicados em combinação com outros produtos, num manejo integrado. Bhattacharya & Goswami (1988) demonstraram que a combinação de torta de nim com nematicida foi mais efetiva na redução de populações de nematoides que os tratamentos isolados. Extratos utilizados no tratamento do solo foram tão efetivos quanto os nematicidas, aumentando a produtividade da cana-de-açúcar (Salawu, 1992). A utilização da torta de filtro no manejo de nematoides contribui com propriedades corretivas de acidez do solo por conta dos efeitos quelantes da matéria

orgânica sobre o alumínio, alterações no balanço catiônico do solo e elevada capacidade de retenção de água, ocasionando aumento da produtividade da cana em sistemas não irrigados, melhorando a brotação e produtividade em plantios realizados em épocas desfavoráveis (Coleti *et al.*, 1980). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do óleo de nim e torta de filtro, isoladamente ou em conjunto, sobre a densidade populacional de nematoides endoparasitos da cana-de-açúcar, em tabuleiros costeiros nordestinos, e os efeitos em variáveis produtivas e industriais da cultura.

O experimento foi conduzido em área de solo arenoso, com alta infestação de *Pratylenchus zeae* (1.568 / 20 g de raiz) e baixa infestação por *Meloidogyne* spp. (162 / 20 g de raiz) em cultivos anteriores, na Usina Santa Tereza, Engenho Terra Rica (PE). O desenho experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com parcelas de cinco linhas de 10 m, com 1,4 m de espaçamento entre plantas e cinco repetições, 16 gemas por metro linear da variedade RB 813804. Os tratamentos utilizados foram: 1) óleo de nim (2 l / ha); 2) óleo de nim (4 l / ha); 3) torta de filtro (60 t / ha); 4) torta de filtro (60 t / ha) + óleo de nim (2 l / ha); 5) aldicarbe (Temik 150 G, 20 kg / ha); 6) testemunha (sem aplicação de produtos). O óleo de nim foi aplicado em pulverização sobre os rebolos da cana-de-açúcar, no fundo do sulco. A torta de filtro e o aldicarbe foram aplicados no fundo do sulco momentos antes do plantio. As populações de *Meloidogyne* spp. e *P. zeae* foram aferidas por ocasião do plantio e três, seis, nove e doze meses após, ocasião em que a cana foi colhida. As amostras foram retiradas nas três linhas centrais das parcelas e homogeneizadas. Para o processamento das amostras de solo foi utilizado o método de Jenkins (1964) e para as amostras de raízes, a técnica de Barker (1985) associada a Jenkins (1964). Por ocasião da colheita foram obtidos dados relativos à produtividade e índices associados ao rendimento industrial (*brix*, *Pol*, pureza, PCC e ATR). As análises das variáveis industriais foram feitas utilizando-se os métodos padrões da agroindústria açucareira (Fernandes, 2003). Os dados das estimativas populacionais dos nematoides, transformados para $\log_{10}(x + 1)$ e as variáveis agroindustriais da cana

foram estatisticamente testadas pela análise da variância, utilizando-se o teste de Tukey a 5 % para comparação das médias.

As parcelas com torta de filtro, isoladamente ou associadas ao óleo de nim, apresentaram as maiores ($P \leq 0,05$) produtividades, com incrementos de 21,36 e 23,39 t / ha (Tabela 1). Estes incrementos provavelmente ocorreram devido à melhoria nutricional da planta e não em razão da redução populacional dos nematoides. Resultados semelhantes foram obtidos por Novaretti & Nelli (1985) e Dinardo-Miranda *et al.* (2003). O uso da torta de filtro em cana-de-açúcar ocasiona elevada capacidade de retenção de água a baixas tensões (Paul, 1974), apresenta vantagens em relação à disponibilidade de nitrogênio (Moberly & Meyer, 1978), riqueza em cálcio, fósforo e ferro (Orlando Filho *et al.*, 1983), contribuindo para o aumento da produtividade desta cultura. Não ocorreram diferenças significativas nas variáveis industriais avaliadas (Tabela 1), corroborando os resultados de Barros *et al.* (2000).

A densidade populacional de *Meloidogyne* spp. no solo e raízes durante os períodos avaliados não foi afetada pelos tratamentos, ao contrário do que foi observado para *P. zeae*, cujos níveis populacionais foram significativamente menores nas parcelas que receberam aldicarbe ou óleo de nim (2 l / ha) quando comparadas com a testemunha (Tabela 1). A ineficiência da torta de filtro em diminuir a densidade de *P. zeae* concorda com Moberly & Meyer (1978), que constataram ser de curta

duração e de valor limitado o efeito nematicida da torta de filtro em solos arenosos.

Em contraste com outros trabalhos relacionados ao controle químico (Dinardo-Miranda *et al.*, 2003; Novaretti & Nelli, 1985), o tratamento nematicida não contribuiu com aumento de produtividade, apesar de ter reduzido significativamente a população de *P. zeae* no campo (Tabela 1). Mesmo tendo sido escolhido adequadamente para a época de instalação do experimento pela alta solubilidade (9.000 ppm) (Barros *et al.*, 2006), a precipitação pluviométrica acima das médias dos últimos anos, logo no primeiro mês após o plantio (janeiro de 2004), pode ter contribuído para a lixiviação do produto, não permitindo completa proteção às plantas (Figura 1). Embora as menores densidades populacionais de *P. zeae* tenham ocorrido nos tratamentos com nematicida e com o óleo de nim a 2 % (Tabela 1), Oliveira *et al.* (2005) não observaram efeito significativo do nim em *Pratylenchus brachyurus* em cana-de-açúcar. No entanto, extratos de nim utilizados no tratamento do solo foram tão efetivos quanto os nematicidas, e ainda aumentaram a produtividade da cana-de-açúcar (Salawu, 1992). Dessa forma, a dosagem do óleo de nim a 4 l / ha foi efetiva no controle de *P. zeae*, podendo ser utilizada no manejo desse nematoide em cana-de-açúcar.

Agradecimentos

À Usina Santa Teresa, Goiana (PE), pelo apoio na condução dos estudos em campo.

Tabela 1 - Variáveis produtivas e industriais da cana-de-açúcar e densidade populacional em 20 g de raízes obtidas aos 12 meses após o plantio na Usina Santa Teresa, Goiana (PE)

Tratamento	Variáveis produtivas		Variáveis industriais				Densidade populacional		
	TPH ¹	Incremento produtivo (t / ha)	Brix	Pol	Pureza	PCC	ATR	<i>Meloidogyne</i> spp.	<i>P. zeae</i>
Óleo de nim (2 l / ha)	38,34 bc	6,10	21,14 a	18,4 a	87,01 a	14,89 a	143,60 a	209,0 a	700,4 ab
Óleo de nim (4 l / ha)	45,41 ab	13,07	20,56 a	18,2 a	87,17 a	14,60 a	140,65 a	208,7 a	469,6 b
Torta de filtro (60 t / ha)	53,60 a	21,36	19,82 a	17,1 a	86,11 a	13,68 a	132,78 a	173,3 a	1.067,3 a
Torta de filtro (60 t / ha) + óleo de nim (2 l / ha)	55,63 a	23,39	20,14 a	17,3 a	84,90 a	13,83 a	135,23 a	151,2 a	752,2 ab
Aldicarbe (20 kg p.c. / ha)	33,31 c	1,07	21,16 a	18,1a	85,56 a	14,20 a	138,04 a	174,9 a	500,6 b
Testemunha	32,24 c	-	20,70 a	17,9 a	86,56 a	14,39 a	139,11 a	370,0 a	1.087,5 a
C.V. (%)	19,68	-	5,19	4,97	3,05	5,79	21,53	36,91	19,49

Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

¹Tonelada de Pol por hectare.

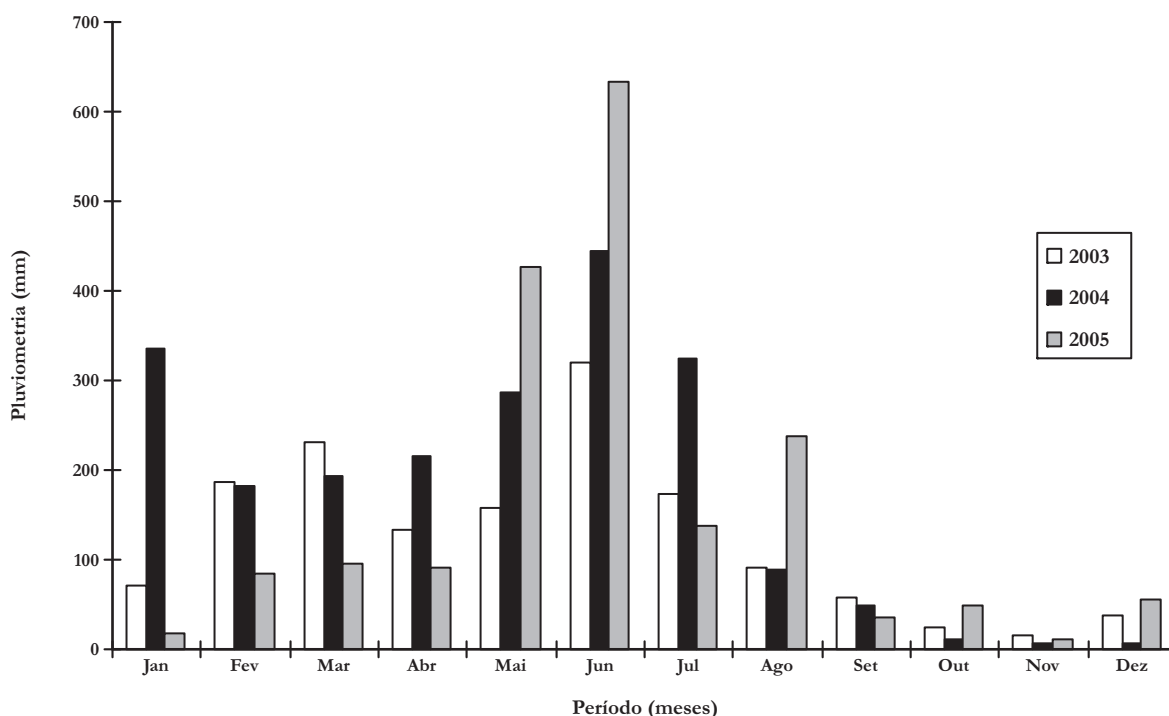


Figura 1 - Precipitação pluviométrica na Usina Santa Teresa – Engenho Terra Rica nos anos de 2003 a 2005.

Literatura Citada

- BARKER, K.R. 1985. Sampling nematodes communities. In: BARKER, K.R., C.C. CARTER & J.N. SASSER (ed). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Vol .II. Methodology. North Carolina State University Graphics, Raleigh (NC) EUA, p. 3-17.
- BARROS, A.C.B., R.M. MOURA & E.M.R. PEDROSA. 2000. Aplicação de terbufos no controle de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *Pratylenchus zaeae* em cinco variedades de cana-de-açúcar no Nordeste. Parte 1 - efeitos na cana planta. *Nematologia Brasileira*, 24 (1): 73-78.
- BARROS, A.C.B., R.M. MOURA & E.M.R. PEDROSA. 2006. Estudos sobre aplicações conjuntas de herbicidas e nematicidas sistêmicos na eficácia dos nematicidas em cana-de-açúcar. *Fitopatologia Brasileira*, 31 (3): 291-296.
- BAUMER, M. 1983. Notes on Trees and Shrubs in Arid and Semi-arid Regions. FAO, 280 p.
- BHATTACHARYA, D. & B.K. GOSWAMI. 1988. Effects of oil-cake used alone and in combination with aldicarb on *Meloidogyne incognita* infecting tomato. *Nematologia Mediterranea*, 16: 139-142.
- COLETI, J.T., V.C. BITTENCOURT & G.M. GIACOMINI. 1980. Torta de filtro em combinação com diferentes formas de fósforo, com vista à substituição da torta de mamona e de fosfatos solúveis em água, na fertilização da cana planta. *Brasil Açucareiro*, 6 (6):16-27.
- COSTA, M.J.N., V.P. CAMPOS & D.F. OLIVEIRA. 2001. Toxicidade de extratos vegetais e de esterco a *Meloidogyne incognita*. *Summa Phytopathologica*, 27 (2): 22-23.
- DINARDO-MIRANDA, L.L., C.C. MENEGATTI & V.GARCIA. 2003. Efeito da torta de filtro e de nematicida sobre infestações de fitonematóides e a produtividade da cana-de-açúcar. *Nematologia Brasileira*, 27 (1): 61-67.
- FERNANDES, A.C. 2003. Cálculos na Agroindústria da Cana-de-açúcar. 2ª. ed. Edição do Autor, Piracicaba (SP), 215 p.
- JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, 48: 692.
- MARTINEZ, S.S. 2002. O Nim – *Azadirachta indica*: Natureza, Usos Múltiplos, Produção. IAPAR, Londrina (PR), 142 p.
- MOBERLY, P.K. & J.H. MEYER. 1978. Filter cake a field and glasshouse evaluation. In: ANNUAL CONGRESS OF THE SOUTH AFRICAN SUGAR TECHNOLOGISTS ASSOCIATION, LII, Mount Edgecombe. Proceedings, p.131-136.
- NEVES, B.P., I.P. OLIVEIRA & J.C.M. NOGUEIRA. 2003. Cultivo e Utilização do Nim Indiano. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Goiânia (GO), 12 p. (Circular técnica, 62).

- NOVARETTI, W.R.T & E.J. NELLI. 1985. Use of nematicide and filter cake for control of nematodes attacking sugarcane, in São Paulo State. *Nematologia Brasileira*, 9 (2): 176-184.
- OLIVEIRA, F.S., M.R. ROCHA, A.J.S. REIS, V.O.F. MACHADO & R.A.B. SOARES. 2005. Efeito de produtos químicos e naturais sobre a população de nematóide *Pratylenchus brachyurus* na cultura da cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 35 (3): 171-178.
- ORLANDO FILHO, J., G.M.A. SILVA & E.J. de A. LEME. 1983. Utilização agrícola dos resíduos da agroindústria canavieira. In: ORLANDO FILHO, J. (ed). *Nutrição e Adubação da Cana-de-açúcar no Brasil*. Instituto do Açúcar e do Alcool, Piracicaba (SP), p. 451-475.
- PAUL, O.L. 1974. Effects of filter press mud on soil physical conditions in a sandy soil. *Tropical Agriculture*, 51: 288-292.
- SALAWU, E.O. 1992. Effect of neem leaf extract and ethoprop singly and in combination on *Meloidogyne incognita* anal growth of sugarcane. *Pakistan Journal of Nematology*, 10(1): 51-56.
- SCHUMUTTERER, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual Review Entomology*, 35: 271-298.
- THAKUR, R.S., S.B. SINGH & A.GOSWAMI. 1981. *Azadirachta indica* A. Juss - a review. *Cromap* 3, 135-40.