



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**Reprodução e distribuição de nematoides do
gênero *Meloidogyne* em canaviais de
Pernambuco e Paraíba**

Natália Monique Ribeiro Barbosa

**Recife – PE
2013**

NATÁLYA MONIQUE RIBEIRO BARBOSA

**REPRODUÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE NEMATOIDES DO GÊNERO
MELOIDOGYNE EM CANAVIAIS DE PERNAMBUCO E PARAÍBA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientadora: Elvira Maria Régis Pedrosa

Co-orientadora: Sandra Roberta Vaz Lira Maranhão

Co-orientadora: Lílian Margarete Paes Guimarães

**RECIFE-PE
FEVEREIRO-2013**

Ficha catalográfica

B238r Barbosa, Natália Monique Ribeiro
 Reprodução e distribuição de nematoides do gênero
Meloidogyne em canaviais de Pernambuco e Paraíba / Natália
Monique Ribeiro Barbosa. – Recife, 2013.
 62 f. : il.

 Orientadora: Elvira Maria Régis Pedrosa.
 Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal
Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2013.
 Referências.

 1. *Saccharum* spp. 2. Variabilidade 3. Ciclo de vida
 4. Nematóide das galhas I. Pedrosa, Elvira Maria Régis,
 orientadora II. Título

CDD 632

**REPRODUÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE NEMATOIDES DO GÊNERO
MELOIDOGYNE EM CANAVIAIS DE PERNAMBUCO E PARAÍBA**

NATÁLYA MONIQUE RIBEIRO BARBOSA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 20/02/2013

ORIENTADOR (A):

Prof^a. Dr^a. Elvira Maria Regis Pedrosa (UFRPE)

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr^a. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

Dr^a. Andréa Chaves (EECAC/UFRPE)

Dr^a. Sandra Roberta Vaz Lira Maranhão (UFRPE)

**RECIFE-PE
FEVEREIRO-2013**

A Deus

Ofereço

Aos meus pais, Manoel Barbosa Sobrinho e Maria José Ribeiro Barbosa, aos meus irmãos Emanuela Nataly Ribeiro Barbosa e Arthur Natanael Ribeiro Barbosa, e aos meus avós Severino Celestino de Vasconcelos (*in memoriam*) e Maria José Ribeiro de Vasconcelos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai e a minha mãe, pelo apoio dado e por todo o esforço que fizeram para que eu concluísse essa etapa na minha vida, tudo o que fiz foi com muito carinho e foi por vocês.

Aos meus irmãos por toda a alegria que me proporcionam, pela atenção que sempre têm por mim.

À toda a minha família, minha Vovó Zezinha que sempre respeitou minhas escolhas.

Ao meu noivo João Filipi e sua família, por todo o carinho e por sempre me encorajar e acreditar no meu potencial.

A minha orientadora Prof. Elvira Maria Regis Pedrosa, pelos ensinamentos durante todos esses anos de convívio e excelente orientação.

Aos Professores do mestrado: Sônia Oliveira, Gilvan Pio-Ribeiro, Rosa Mariano, Elineide Souza, Gaus Silvestre, pela dedicação ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia da UFRPE.

Aos colegas da Fitossanidade: Jaci, Greecy, Yrlânia, Luciana, Geane, Josiene, Rômulo, André, Edilaine, Celma, Ana, Claudeana, Jaqueline, Moara, Wilson, Darcy, Rômildo, Adelmo, Bob.

Ao Sr. Luiz Coelho e Sr. Luiz, pela grande ajuda nos experimentos, obrigada de verdade!!!

Aos meus amigos de sempre Lenivânia, Thárcio, Vanessa, Alexandra e Cleber.

À turma do laboratório de Fitonematologia, Marcela, Gabriela, Mariana, Thaís, Anailda, Karina, Diego, Bárbara, Douglas, Virgínia, Matheus, Matheus Quintela, Arinaldo, Mônica, Jefferson, Mércia, Hugo, Lílian, Carmem, Patrícia, Cícero e Maurício. Em especial a Dr^a. Sandra Maranhão e Prof^a. Lílian Guimarães pelo carinho durante esse tempo.

Ao apoio institucional e financeiro da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

	páginas
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO GERAL	vii
GENERAL ABSTRACT	viii
CAPÍTULO I- Introdução Geral.....	2
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
CAPÍTULO II- Reprodução de <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> e <i>M. enterolobii</i> em cana-de-açúcar e distribuição em canaviais de Pernambuco e Paraíba.....	20
ABSTRACT	20
RESUMO	21
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
AGRADECIMENTOS	30
LITERATURA CITADA	30
CAPÍTULO III- Penetração, desenvolvimento e reprodução de <i>Meloidogyne enterolobii</i> em cana-de-açúcar	39
ABSTRACT	39
RESUMO	40
INTRODUÇÃO.....	40
MATERIAL E MÉTODOS.....	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
AGRADECIMENTOS	47
LITERATURA CITADA	47
CONCLUSÕES GERAIS	54

RESUMO GERAL

Considerando a importância de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em cana-de-açúcar e o assinalamento de *M. enterolobii* em canaviais do Nordeste, o primeiro estudo teve como objetivo identificar por métodos bioquímicos espécies de *Meloidogyne* ocorrentes em canaviais nos Estados de Pernambuco e Paraíba e avaliar a reprodução das três espécies, isoladamente e conjuntas, na variedade RB 867515. Foram identificadas 19 populações do nematoide, através da eletroforese de isoenzimas, a maioria constituída exclusivamente por *M. incognita* fenótipo I1(Rm: 1.0) e I2 (Rm: 1.0, 1.1). *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii*, isoladamente ou em população conjunta, não afetaram as variáveis de crescimento da planta avaliadas. RB 867515 mostrou-se boa hospedeira para *M. incognita* e *M. javanica*, mas não para *M. enterolobii*, permitindo que as duas primeiras espécies se multiplicassem livremente. Os fenótipos de esterase obtidos após a realização do experimento mostraram variações quantitativas nas proporções das espécies inoculadas, indicando prevalência de *M. incognita* sobre as demais. O segundo estudo avaliou a penetração, o desenvolvimento e o comprimento do ciclo de *Meloidogyne enterolobii* em cana-de-açúcar variedade RB 98710 e o comportamento dessa variedade em relação ao parasitismo do nematoide. Após a infestação do solo com *M. enterolobii* e *M. javanica* (testemunha), raízes foram avaliadas aos 3, 7, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias após inoculação dos nematoides. Aos 45 dias, *M. javanica* conseguiu completar o ciclo, enquanto o número de formas vermiformes, salsichóides e ovoides de *M. enterolobii* foram reduzidos, não sendo encontradas fêmeas imaturas ou com massas de ovos. Utilizando diferentes densidades de inóculo, *M. enterolobii* não afetou o desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar aos 120 dias após a inoculação. Ao contrário de *M. javanica*, *M. enterolobii* teve a reprodução inibida, apresentando sempre fatores de reprodução menores do que 1.

Palavras-chave: *Saccharum* spp., variabilidade, ciclo de vida, nematoide das galhas.

GENERAL ABSTRACT

Considering *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* importance for sugarcane and reports of *M. enterolobii* in the crop in Northeastern Brazil, this study had as objective identifying through biochemical methods the species of *Meloidogyne* occurring in sugarcane fields of Pernambuco and Paraíba States and evaluating reproduction of this three species in association or individually on the variety RB 867515. It was identified 19 nematode populations, mostly constituted exclusively by *M. incognita* phenotype I1(Rm: 1.0) and I2 (Rm: 1.0, 1.1). *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. enterolobii*, in association or individually, did not affect plant growth variables. RB 867515 was a good host for *M. incognita* and *M. javanica*, but not for *M. enterolobii*, permitting free reproductions for the former nematodes. Esterase phenotypes at the end of the experiment presented quantitative variations in the species ratios used for inoculation, indicating *M. incognita* prevalence over the other species. The second study evaluated *Meloidogyne enterolobii* penetration, development and life cycle length on sugarcane variety RB 98710 as well the reaction of the variety to the nematode parasitism. After soil infestation with *M. enterolobii* and *M. javanica* (control), roots were evaluated at 3, 7, 10, 17, 24, 31, 38 and 45 days after inoculation for nematode development. At 45 days, *M. javanica* complete the life cycle in contrast to the low number of vermiform and swollen juveniles and no adult female of *M. enterolobii* found in roots. Using different nematode initial population densities, *M. enterolobii* did not affect initial sugarcane development at 120 days after inoculation. In contrast to *M. javanica*, *M. enterolobii* reproduction was inhibited presenting reproductive factor always lower than 1.

Keywords: *Saccharum* spp., variability, life cycle, root-knot nematode.

CAPÍTULO I
Introdução Geral

**REPRODUÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE NEMATOIDES DO GÊNERO
MELOIDOGYNE EM CANAVIAIS DE PERNAMBUCO E PARAÍBA
CAPÍTULO I- Introdução Geral**

1. Cana-de-açúcar

Classificação botânica e origem

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma gramínea semiperene, botanicamente pertencente à divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, subclasse Commelinidae, ordem Cyperales, família Poaceae. Trata-se de uma planta que se desenvolve em forma de touceira, tendo a parte aérea formada por colmos, folhas, inflorescências e frutos secos, tipo cariopse, e a parte subterrânea formada por rizomas que são constituídos por nós, internós e gemas, as quais são responsáveis pela formação dos perfilhos na touceira, e raízes fasciculadas ou em cabeleira. O colmo, responsável pela sustentação das folhas e das panículas, é caracterizado por nós bem marcados e entrenós distintos (LUCCHESI, 2001; MOZAMBANI, 2006).

Os primeiros registros de cultivo da cana-de-açúcar se devem a povos que viviam na faixa litorânea do Golfo de Bengala, na atual Índia. Cristóvão Colombo foi responsável pela difusão da planta no Continente americano em 1493, na Ilha Hispaniola (atual Haiti e República Dominicana). A cana-de-açúcar só chegou ao Brasil em 1533 a partir de Martim Afonso de Sousa, que implantou o primeiro engenho, São Jorge dos Erasmos, em São Vicente, em consórcio com a Alemanha (MOZER; TELLES, 2002).

Até o início do século XIX, só um tipo de cana era plantada no Brasil, a *crioula*, originária da Índia, era fina e tinha os colmos curtos. Logo após, em 1810 a cana *caiana* começou a ser cultivada no país, originária da região de Caiena na Guiana Francesa, era mais grossa e possuía colmos maiores do que a outra variedade e também proporcionava mais lucros aos produtores. Com o passar dos anos outras variedades chegaram ao Brasil, mas foi a partir de 1930 que passou a se utilizar às canas híbridas, obtidas da mistura de duas ou mais espécies, que tem proporcionado mais produtividade e maior resistência às pragas (MOZER; TELLES, 2002). No Brasil, o melhoramento genético é realizado por instituições públicas e privadas, com grande interação com o setor produtivo. Diversos programas de pesquisa nesta área estão sendo desenvolvidos. Após a extinção do Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de Açúcar (Planalsucar), ocorrida no mesmo período do fechamento do Instituto do

Açúcar e do Alcool (IAA), em 1990, a Rede Interuniversitária de Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (Ridesa), grupo composto por nove universidades absorveu todo o trabalho de pesquisa desenvolvida, até então, pelo Planalsucar. Além de dar continuidade ao programa de criação de novas variedades, a Ridesa o ampliou a fim de atender a crescente demanda do setor, inclusive com variedades mais precoces, que permitem aumentar o período de colheita. Atualmente a variedade RB 867515 é a mais plantada no Brasil, essa cultivar tem sido a melhor opção para manejo em solos de baixa fertilidade natural e de textura arenosa no cerrado brasileiro, ela se destaca pela produtividade de açúcar e tolerância às principais doenças que atingem a cana-de-açúcar (EMBRAPA, 2008).

Aspectos Econômicos

O aumento do cultivo da cana-de-açúcar ocorreu graças ao incentivo do governo brasileiro que criou o Programa Nacional do Alcool ou Proálcool em 14 de novembro de 1975 pelo decreto nº 76.593, com o objetivo de estimular a produção do álcool, visando o atendimento às necessidades do mercado interno e externo e à política de combustíveis automotivos. De acordo com o decreto, a produção do álcool oriundo da cana-de-açúcar ou de qualquer outro insumo deveria ser incentivada por meio da expansão da oferta de matérias-primas, com especial ênfase no aumento da produção agrícola, da modernização e ampliação das destilarias existentes e da instalação de novas unidades produtoras, anexas a usinas ou autônomas, e de unidades armazenadoras. A cana-de-açúcar tem o mais alto retorno para os agricultores por hectare plantado. O custo de produção do açúcar no país é baixo (inferior a US\$ 200/toneladas), permitindo competição no mercado internacional. Tal mercado é, entretanto, volátil e apresenta grandes oscilações de preços (BIODIESEL, 2011).

Cultivada em mais de 80 países tropicais e subtropicais, a cana-de-açúcar é uma cultura de grande expressão econômica (BARNES, 1964). O Brasil é o principal produtor mundial. No país, representa uma das principais culturas, sendo o agronegócio sucroalcooleiro responsável por 2,4% do PIB nacional (Produto Interno Bruto). Este setor gera mais de 3,6 milhões de empregos diretos e indiretos, além de congrega mais de 72.000 agricultores e mais de 330 usinas (ALBINO; CRESTE; FIGUEIRA, 2006).

A lavoura de cana-de-açúcar continua em expansão no Brasil. A área de cana-de-açúcar colhida destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2012/13 está estimada em 8.567,2 mil hectares, distribuídas em todos estados produtores, apresentando um aumento de 2,1% em relação à área cultivada na safra anterior, cuja produtividade média foi estimada em

68.289 kg/ha, 11,8% menor que a na safra 2010/11, que foi de 77.446 kg/ha. No Brasil atualmente o Estado de São Paulo é o maior produtor com 51,87% da produção, seguido por Goiás com 8,52%, Minas Gerais com 8,47%, Paraná com 7,17%, Mato Grosso do Sul com 6,37%, Alagoas com 5,23%, e Pernambuco com 3,84%, nos demais estados em torno de 3%. As áreas em produção continuam com progressivo aumento nos estados do Mato Grosso do Sul 12,5%, Goiás 7,9%, Espírito Santo 7,35%, Bahia 5,3%, Mato Grosso 5,5% e Minas Gerais (3,5%). Para as regiões Norte e Nordeste foi prevista para esta safra uma redução de 1,2% na área ocupada com a cana, ou seja, 14.100 hectares a menos que na safra anterior, portanto, pouco significativo. O rendimento médio para a região Nordeste poderá ser afetado devido a forte estiagem que assola praticamente todos os estados produtores, ao contrário do que ocorreu na safra anterior, quando o clima foi bastante chuvoso e favoreceu o desenvolvimento da lavoura de cana. Conseqüentemente a estimativa da produção poderá sofrer redução (CONAB, 2013).

2. Fitonematoides

Muitas doenças podem afetar a cana-de-açúcar em termos mundiais. Algumas doenças de importância atual e outras de importância potencial causam prejuízo direto ou constituem ameaças futuras. Em cana-de-açúcar a maioria das doenças é controlada por meio da resistência genética, mas nesta cultura a resistência não é absoluta, é gradual. Muitas variedades em cultivo podem apresentar certo nível de suscetibilidade a algumas doenças, tornando-se necessárias práticas de manejo para que os prejuízos causados pelas doenças sejam minimizados. As 10 principais doenças incluem: doença causada por vírus (mosaico); doenças causadas por bactérias (escaldadura das folhas, estrias vermelhas, raquitismo da soqueira); doenças causadas por fungos (carvão, ferrugens, mancha parda, podridão abacaxi, podridão de fusário e podridão vermelha) e doenças causadas por fitonematoides (MACCHERONI; MATSUOKA, 2006). Fitonematoides são parasitos obrigados, que obtêm nutrientes para o desenvolvimento e reprodução apenas do citoplasma de células vivas (HUSSEY; GRUNDLER, 1998).

Fitonematoides são organismos vermiformes que geralmente parasitam as raízes das plantas, comprometendo a absorção de água e nutrientes, causando grandes danos ao sistema radicular, tornando-o deficiente e pouco produtivo. A infecção por esses organismos afeta as relações água × planta e o processo fotossintético (MELAKEBERHAN; BROOKE; WEBSTER, 1986). Outros sintomas, associados à infecção como destruição de pelos

absorventes e redução da taxa de crescimento das raízes, limitam a exploração do solo e absorção de água e nutrientes, provocando o tombamento de plantas e predispondo-as ao ataque de outros microrganismos (DIAS; RIBEIRO JUNIOR, 2001). Em consequência, ocorrem significativas quedas na produtividade agrícola (MOURA, 1996; CADET; SPAUL, 2005). Muitas espécies de fitonematóides são encontradas em associação com a cana-de-açúcar, provocando perdas em milhões de Reais. Segundo Dinardo-Miranda (2006), em média, essas espécies causam perdas de produtividade entre 20 e 40% no primeiro corte de variedades susceptíveis, também reduzindo a produtividade e, conseqüentemente, a longevidade da cana soca.

Meloidogyne spp.

O primeiro registro de um fitonematóide na cultura da cana-de-açúcar ocorreu 1880 em Java, na Indonésia, durante investigações sobre uma doença da cana-de-açúcar. Os nematoides observados naquela época foram do gênero *Meloidogyne* Goeldi e *Pratylenchus* Graham, conhecidos como nematoides das galhas e das lesões radiculares, respectivamente. Nathan August Cobb foi o primeiro pesquisador a estudar a associação de nematoides com cana-de-açúcar, na Austrália e, posteriormente, no Havaí, respectivamente em 1906 e 1909. No Brasil, os primeiros estudos na área foram desenvolvidos por Luís Gonzaga Engelberg Lordello, visando à realização de assinalamento de espécies e levantamentos populacionais (LORDELLO, 1984). Atualmente, mais de 275 espécies de fitonematóides, filiados em pelo menos 48 gêneros, já foram assinalados em raízes e solos da rizosfera de cana-de-açúcar. Entretanto, na região Nordeste do Brasil, os fitonematoides encontrados com maior frequência em campos cultivados com cana-de-açúcar são as espécies *M. javanica* (Treub) Chitwood, *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood e *P. zae* Graham, com ênfase para o gênero *Meloidogyne* (MOURA et.al., 2000).

Outros nematoides comumente encontrados nos canaviais nordestinos são: *Criconemella* sp. De Grisse e Loof, *Helicotylenchus* sp. Steiner, *Hemicycliophora* sp. De Man, *Rotylenchulus* sp. Lindford e Oliveira, *Trichodorus* sp. Cobb e *Xiphinema* sp. Cobb (CRUZ; SILVA; RIBEIRO 1986; MOURA et al., 1999; MOURA et al., 2000; TOKESHI; RAGO, 2005).

Em solos com temperaturas acima de 28°C, *Meloidogyne* spp. têm sobrevivência prolongada. *M. incognita* e *M. javanica* são os mais cosmopolitas e apresentam boa adaptação às várias regiões edafoclimáticas do Brasil (EMBRAPA, 2007). Está ligada a agressividade

desses nematoides o hospedeiro suscetível, a espécie e/ou raça do nematoide presente na lavoura, o potencial de inóculo do nematoide na área e as características do solo. Solos mais arenosos ou franco-arenosos tendem a ser mais favoráveis ao nematoide pelo fato de facilitar a sua movimentação e migração. O monocultivo favorece o aumento da severidade desse patógeno (SILVA, 2012).

Nematoides do gênero *Meloidogyne* apresentam machos e fêmeas facilmente distinguíveis morfológicamente (dimorfismo sexual). Os machos são vermiformes e medem de 1,2 a 1,5 mm de comprimento por 30 a 36 µm de diâmetro. As fêmeas apresentam formato piriforme quando adultas e chegam a medir 0,40 a 1,3 mm de comprimento por 0,21 a 0,75 mm de largura (CARES; BLUM; ANDRADE, 2006).

Meloidogyne enterolobii Yang & Eisenback, sinónimo de *M. mayaguensis* (RANDIG et al., 2009; XU et al., 2004), vem causando sérios prejuízos a diversas culturas no Brasil e no mundo. Entretanto, em cultivos de cana-de-açúcar no estado de Pernambuco foi feito um único assinalamento deste nematoide por Moura et al. (2009).

3. Interação *Meloidogyne* × Hospedeiro

O ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. inicia-se no ovo, cujo interior sofre várias mudanças durante o desenvolvimento embrionário até a formação do juvenil do primeiro estágio, ou J₁. O J₁ sofre uma ecdise originando o juvenil do segundo estágio ou J₂, ainda dentro do ovo. O J₂ perfura o ovo com o estilete, rompendo a casca, e segue um gradiente de concentração de exsudados radiculares (gradientes de pH e moléculas da superfície celular) que orientam o movimento até chegar à raiz, onde penetra na região da zona de alongamento celular, logo atrás da coifa. Esta zona apresenta alto metabolismo por estar em diferenciação celular e, portanto, produz bastante exsudado. As células possuem pouca quitina, suberina e celulose depositada em suas paredes e, por isso, são mais facilmente penetradas pelo J₂, que migra para o tecido vascular e inicia a alimentação introduzindo substâncias nas células da planta, que irão alterá-las morfológica e fisiologicamente. Neste instante, o J₂ adquire uma forma alargada, tornando-se sedentário. Estas células especializadas da raiz recebem o nome de células gigantes (AGRIOS, 2005; FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2001).

Esses fitonematoides formam uma interação muito íntima e sofisticada com a planta hospedeira, promovendo a invasão do tecido vegetal, a evasão dos mecanismos de defesa e a formação dos sítios de alimentação permanentes (MEDEIROS, 2011).

Para se alimentarem, os fitonematoides tiveram que adequar suas peças bucais, desenvolvendo um órgão pontiagudo possibilitando a introdução do mesmo na planta, chamado de estilete. O estilete é uma lança, oca, utilizado para perfurar as paredes celulares e injetar secreções e retirar nutrientes das células do hospedeiro. Os J₂ induzem modificações nas células das raízes selecionadas (DAVIS; HUSSEY; BAUM, 2004). As células do córtex se multiplicam desordenadamente e a raiz engrossa, formando um tumor que recebe o nome de galha. As mudanças celulares resultam em aumento da concentração de aminoácidos, proteínas, RNA e DNA nas células gigantes; em aumento de exsudados radiculares, minerais, lipídios, hormônio de crescimento, respiração e transpiração, seguido por decréscimos de açúcares e celulose. Com a formação das células gigantes, ocorre também obstrução física dos vasos condutores de água e minerais, o que resulta em sintomas de murcha prematura e de deficiência de nutrientes, além do subdesenvolvimento da planta. Em seguida, o J₂ sofre três ecdises, passando a J₃, J₄ e forma adulta (fêmea ou macho). Quando o macho é formado, readquire a forma alongada, rompe a cutícula e abandona a raiz.

Segundo Pedrosa et. al (1996) atividades iniciais de alimentação por J₂ induz modificações localizadas das células do hospedeiro para formar um local de alimentação induzindo a diferenciação das células das raízes selecionadas para o local de alimentação do nematóide. Durante a migração desses nematóides, as glândulas subventrais do esôfago do nematóide são muito ativas e secretam substâncias que modificam a parede celular vegetal. Uma vez que o nematóide chega ao cilindro vascular torna a célula inicial sincicial. A formação de células de alimentação é um processo complexo associado a mudanças dramáticas na expressão dos genes da planta (GHEYSEN; MITCHUM, 2009).

O parasitismo de nematóides em raízes pode ter um impacto dramático sobre a fisiologia e o crescimento das plantas. Esses microorganismos removem nutrientes de plantas durante a alimentação e afetam a absorção e translocação de água pelas raízes, alteram ou destroem o tecido radicular retardando o crescimento das raízes. O dano às raízes, a partir dos resultados do parasitismo de nematóides na interrupção dos processos fisiológicos em toda a planta causam crescimento atrofiado, plantas cloróticas e com baixa produtividade (HUSSEY; WILLIAMSON, 1998).

4. Variabilidade e identificação de espécies de *Meloidogyne*

Conhecer a variabilidade das populações de fitopatógenos é útil no desenvolvimento de estratégias de controle de doenças de plantas (MILGROOM, 2001). Particularmente, no

caso das meloidoginoses, principal doença de origem nematológica da cultura da cana-de-açúcar, a correta identificação da espécie associada é de fundamental importância para a escolha de métodos de controle adequado.

Dentre os métodos usados para identificação de fitonematóides, as técnicas morfológicas são ainda as mais comumente utilizadas. Entretanto, especialmente para o grupo das meloidoginoses, a identificação ao nível específico, baseada apenas em caracteres morfológicos, além de ser demorada, muitas vezes é pouco precisa dependendo dos parâmetros avaliados (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001). Além do mais, com o aumento rápido do número de espécies descritas no gênero, a identificação baseada na configuração perineal está se tornando cada vez mais inapropriada devido às variações intraespecíficas já detectadas e, sobretudo, à similaridade e à sobreposição dessas características entre espécies (WHITEHEAD, 1968). Portanto, é comum o surgimento de populações com configurações perineais atípicas, o que aumenta a dificuldade de utilização destas para fins taxonômicos.

A utilização da técnica de marcadores isoenzimáticos é considerada mais segura que a configuração perineal para a identificação de espécies do gênero *Meloidogyne* (ESBENSHADE; TRIANTAPHYLLOU, 1985).

A eletroforese de isoenzimas, que fornece um meio de avaliação da variação genética, exibe um potencial enorme para a aplicação em genética de plantas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A técnica de isoenzimas detecta apenas os eventos mutacionais, que alteram a carga elétrica das proteínas em regiões codificadoras, e de um número limitado de genes que se expressam em enzimas. Dependentes do estágio de desenvolvimento da espécie, tais técnicas são consideradas de custo baixo e de ótimos resultados. Outra vantagem é que os polimorfismos enzimáticos estão mais próximos da expressão fenotípica final do que os polimorfismos de DNA, por ser um produto intermediário da expressão do gene (TORGGLER; CONTEL; TORGGLER, 1995). Nas suas pesquisas, Carneiro e Almeida (2001) afirmaram que a técnica de eletroforese é de grande validade para identificar todas as espécies de *Meloidogyne* até o momento estudadas bioquimicamente.

A informação básica ao se visualizar os dados enzimáticos é a de que diferenças na mobilidade de isoenzimas, em um campo elétrico, são resultantes das sequências de DNA que codificam essas enzimas. Em virtude das propriedades catalíticas das enzimas, as isoenzimas, especialmente, podem refletir o estado metabólico e diferenciado das células (SCANDALIOS, 1979).

As primeiras técnicas de biologia molecular aplicadas para fitonematoides envolveram a análise de polimorfismo de fragmentos obtidos pela digestão do DNA total com enzimas de

restrição (RFLPs – Restriction Fragment Length Polymorphisms) (CURRAN; BAILLIE; TRIANTAPHYLLOU, 1985). Mas foi somente graças à técnica de amplificação de DNA por PCR, por exemplo, que uma melhor discriminação intraespecífica pôde ser obtida e que métodos de diagnósticos foram propostos, como por exemplo, a amplificação de regiões de DNA mitocondrial ou ribossômico (NOIR et al., 2003).

Atualmente numerosas técnicas estão disponíveis, mas a utilização, na maioria dos casos, permanece limitada aos laboratórios de pesquisa e não generalizadas para condições de análise de rotina. O método de RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA tem sido utilizado para muitos estudos, uma vez que é sensível, rápido e relativamente simples, além de não requerer informações acerca da sequência nucleotídica do DNA genômico. Uma abordagem mais recente é a conversão dos marcadores de RAPD em SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), termo utilizado para definir marcadores RAPD cuja sequência interna tenha sido determinada, permitindo compor primers mais longos, ricos em GC e de sequência específica. Os marcadores SCAR podem ser utilizados como pontos de referência física do genoma, servindo para mapeamento, ou como marcadores genéticos, quando estão associados a algum genótipo de interesse (NOIR et al., 2003).

Nos nematoides das galhas, marcadores SCAR já foram desenvolvidos para identificar duas espécies quarentenárias, *M. chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo and Finley, 1980 e *M. fallax* Karssen, 1996, ou ainda, para separar as três espécies: *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwoodi, 1949, presentes principalmente em regiões tropicais e subtropicais (ZIJLSTRA, 2000; ZIJLSTRA; DONKERS-VENNE; FARGETTE, 2000; FOURIE; ZIJLSTRA; McDONALD, 2001).

Em áreas canavieiras do estado de Pernambuco, Chaves, Pedrosa e Moura (2002) detectaram através de eletroforese isoenzimática a frequência de 64 e 36% para *M. incognita* e *M. javanica*, respectivamente, porém, estudos para identificação dos nematoides das galhas ocorrentes em tabuleiros costeiros nordestinos são escassos.

M. enterolobii foi identificado e tornou-se o principal problema fitossanitário da cultura da goiaba (*Psidium guajava* L.) no Brasil. De fato, estima-se que mais de cinco mil hectares desta cultura estejam infestados pelo nematoide em vários Estados brasileiros. A área infestada por essa espécie é de cerca de 5.000 hectares no perímetro irrigado da Bahia e de Pernambuco (PEREIRA et al. 2009).

M. enterolobii foi detectado no estado de Goiás causando danos em goiabeiras cv. Paluma, consorciadas com mamoeiros (*Carica papaya* L.) cv. Formosa, o fenótipo M2 para a

isoenzima esterase (Rm: 0,7, 0,9) foi detectado e *M. enterolobii* identificado em ambas as culturas (SIQUEIRA et al 2009).

5. Resistência de plantas a *Meloidogyne* spp.

Os mecanismos de resistência de plantas a nematoides são vários, complexos e, em alguns casos, poucos conhecidos. A resistência pode decorrer de fatores que estão presentes antes que o nematoide penetre a raiz da planta. Nesta categoria, incluem-se os efeitos repelentes e/ou nematicida de determinadas substâncias químicas presentes no exsudato radicular de algumas plantas. O exemplo mais conhecido é a substância *a-Terrienil*, produzida pelos cravos de defuntos (*Tagetes* spp. L.) (HUANG, 1985).

Os fenóis são os principais produtos bioquímicos pré-formados nas plantas contra a invasão de fitopatógenos e podem ser sintetizados a partir da presença do patógeno ou de seus produtos, sendo induzidos por eliciadores ou inibidores alocados na superfície do microrganismo em interação com receptores presentes na planta por meio de fenômenos de reconhecimento. Nesse caso, genes de alerta são ativados, resultando na síntese de novos compostos e no aumento da atividade enzimática, importantes para a defesa da planta, além de, formar barreias estruturais e produzir compostos tóxicos, que resultam no atraso da infecção (SILVA, 2001).

As células vegetais são protegidas pela presença de uma parede celular rígida para afastar os invasores (KAPLAN; KEEN; THOMASON, 1980). A presença do estilete, localizado na região anterior permite ao nematoide superar este grande obstáculo. A ação do estilete combinada com a liberação na parede celular de enzimas que degradam através deste estilete facilitam a penetração das raízes e a migração subsequente dos nematoides endoparasitos ao local de alimentação adequada. Em alguns casos, as plantas podem impedir a invasão dos nematoides com uma barreira química, liberando naturalmente nematicidas ou repelentes (TOMCZAK, et al., 2008).

Após a penetração, os nematoides ainda podem ser afetados por compostos tóxicos já presentes nos tecidos das plantas (resistência bioquímica pré-formada). Correlação positiva entre os teores de compostos fenólicos e a resistência de tomate a *M. incognita* já foi observado em maior concentração em cultivares resistentes de tomate (HUANG, 1985).

A expressão da incompatibilidade ou resistência depois da penetração (infecção) é basicamente a mesma observada para outros patógenos (KAPLAN; DAVIS, 1987). Reações de resistência, frequentemente, são acompanhadas por reação de hipersensibilidade (HR), essa

reação ocorre nas células vizinhas do nematoide, durante a sua migração no tecido vegetal ou após o estabelecimento do sítio de alimentação. A resposta de defesa é inicialmente detectada dentro do citoplasma do sítio de alimentação inicial, imediatamente após a invasão do nematoide, e progride para prevenir a formação do sítio de alimentação através da necrose das células vizinhas (FARIA, et al., 2003).

Na interação nematoide-planta, cada espécie de fitonematoide induz um dano diferente no tecido hospedeiro. Nematoides *Thichodoridae* alimenta-se na superfície dos tecidos das raízes e induz, relativamente, pequenas respostas e danos no hospedeiro. *Longidoridae* estabelece seu sítio de alimentação em tecidos profundos de alguns tipos de raízes e causa declínio no crescimento da raiz. Endoparasitas sedentários, *Meloidogyne* spp. por exemplo, estão intimamente relacionados com seus hospedeiros. Esta relação é altamente especializada de modo a induzir células gigantes ou sincícios em seus sítios permanentes de alimentação dentro dos tecidos da planta (ZACHEO, BLEVE-ZACHEO, 1995).

A resistência é frequentemente manifestada pela necrose ao redor da célula inicial do sítio de alimentação ou pela expansão retardada dessa célula. Isto pode indicar que a resistência é alcançada após a injeção de secreções da glândula esofagiana dorsal dentro da célula vegetal. Também tem sido proposto que essas secreções sejam responsáveis pela indução, expansão e manutenção da célula nutridora (BAKER, 2002).

O primeiro trabalho relativo ao comportamento de variedades de cana, desenvolvido no Nordeste, em locais infestados por nematóides, foi o de Cruz, Silva e Ribeiro (1986), com resultados pouco satisfatórios. Atualmente, não há variedades com nível de resistência às principais espécies e raças de fitonematóides prevalentes (NOVARETTI et al., 1989; PEREIRA; ZAMBOLIM, 1996;).

Em função do importante papel que os nematoides desempenham na cultura da cana-de-açúcar, a presente pesquisa objetivou identificar por métodos bioquímicos espécies de *Meloidogyne* ocorrentes em canaviais nos estados de Pernambuco e Paraíba e avaliar o desenvolvimento e reprodução desse gênero nas variedades RB 867515 e RB 98710.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by nematodes. In: AGRIOS, G. N. (Ed.). **Plant Pathology**. 5. ed. London: Academic Press, 2005. p. 825-874.

ALBINO, J. C.; CRESTE, S.; FIGUEIRA, A. Mapeamento genético da cana-de-açúcar. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 36, p. 82-91, 2006.

BARNES, A. C. (Ed.). **The sugar cane**. 1 ed. New York: The New York Interscience Publishers INC., 1964. 456 p.

BAKKER, J. Durability of resistance against potato cyst nematodes. **Euphytica**, v. 124, n. 2, p. 157-162, 2002.

BIODIESEL. ProÁlcool – Programa Brasileiro do Álcool, 2011. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/proalcool/pro-alcool.htm>>. Acesso em: 09 nov. 2011.

CADET, P.; SPAULL, V. W. Nematode parasites of sugarcane. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Eds.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. 2. ed. Wallingford: CABI International Publishing, 2005. p. 645-674.

CARES, J. E.; BLUM, L. E. B.; ANDRADE, E. P. Nematologia vegetal: uma introdução. In: BLUM, L. E. B.; CARES, J. E.; UESUGI, C. H. (Eds.). **Fitopatologia: o estudo das doenças de plantas**. 1. ed. Brasília: Otimismo, 2006. p. 128-166.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides das galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 35-44, 2001.

CHAVES, A.; PEDROSA, E. M. R.; MOURA, R. M. Efeitos da Aplicação de Terbufós Sobre a Densidade Populacional de Nematóides Endoparasitos em Cinco Variedades de Cana-de-açúcar no Nordeste. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 167-176. 2002.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2012. Companhia Nacional de Abastecimento, 2013. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_12_10_34_43_boletim_cana_portugues_12_2012.pdf>. Acesso em: 16 jan./2013.

CRUZ, M. M.; SILVA, S. M. S.; RIBEIRO, A. G. Levantamento populacional de nematóides em cana-de-açúcar em áreas de baixa produtividade nos Estados de Alagoas e Sergipe.

Nematologia Brasileira, Brasília, v. 10, n. 1, p. 27-28, 1986.

CURRAN, J.; BAILLIE, D. L.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. Use of restriction fragments length differences in genomic DNA to identify nematode species. **Parasitology**, Leeds, v. 90, p. 137-144, 1985.

DAVIS, E. L.; HUSSEY, R. S.; BAUM, T. J. Getting to the roots of parasitism by nematodes.

Trends in Parasitology, Oxford, v. 20, p. 134-141, 2004.

DIAS, M. S. C.; RIBEIRO JUNIOR, P. M. Nematóides na bananicultura. In: SIMPÓSIO NORTE MINEIRO SOBRE A CULTURA DA BANANA, 1., 2001, Montes Claros. **Anais...** Montes Claros: Unimontes, p. 168-179, 2001.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Manejo de nematoides e pragas de solo em cana-de-açúcar. In: CAMPOS, A. P.; VALE, D. W.; ARAÚJO, E. S.; CORRADI, M. M.; YAMAUTI, M. S.; FERNANDES, O. A.; FREITAS, S. (Eds.). **Manejo integrado de pragas**. 1. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006, p. 59-80.

EMBRAPA- Cultivo de tomate para industrialização. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, 2007. Disponível em

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial/doencas_nema.htm> Acesso em: 23 mai. 2012.

EMBRAPA- Agência de Informação Cana-de-açúcar. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, 2008. Disponível em

<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_141_22122006154842.html> Acesso em: 21 fev. 2013.

ESBENSHADE, P. R.; TRIANTAPHYLOU, A. C. Use of enzyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 17, n. 1, p. 6-20. 1985.

FARIA, C. M. D. R.; SALGADO, S. M. L.; CAMPOS, H. D.; RESENDE, M. L. V.; CAMPOS, V. P.; COIMBRA, J. L. Mecanismos de ataque e defesa na interação nematoide planta. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, p. 373-410, 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. (Eds.). **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

FOURIE, H.; ZIJLSTRA, C.; McDONALD, H. Identification of root-knot nematode species occurring in South Africa using the SCAR-PCR technique. **Nematology**, Leiden, v. 3, p. 675-680, 2001.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S. **Introdução a nematologia**. Viçosa: UFV, 2001, 84 p. (Cadernos didáticos, 58).

GHEYSEN, G.; MITCHUM, M. G. Molecular Insights in the Susceptible Plant Response to Nematode Infection. In: BERG, R. H.; TAYLOR, C. G. (Ed.). **Plant Cell Monographs**. Cell Biology of Plant Nematode Parasitism. 1. ed. Germany: Springer, 2009. v. 15, p. 45-81.

HUANG, J. S. Mechanisms of resistance to root-knot nematodes. In: SASSER, J. N.; CARTER, C. C. (Eds.). **An advanced treatise on Meloidogyne: Biology and control**. 1. ed. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. v. 1, p.11-17.

HUSSEY, R. S.; WILLIAMSON, V. M. Physiological and Molecular Aspects of Nematode Parasitism. In: BARHER, K R.; PEDERSON, G. A.; WINDHAM, G. L. (Ed.). **Plant and Nematode Interactions**. 1. ed. Madison: ASA, 1998. v. 36, p. 87-108.

HUSSEY, R. S.; GRUNDLER, F. M. W. Nematode parasitism of plants. In: PERY, R. N.; WRIGTH, D. J. (Eds.). **The physiology and biochemisty of free living and plant-parasitic nematodes**. 1. ed. London: CABI Publishing, 1998. p. 213-243.

KAPLAN, D.T.; DAVIS, E.L. Mechanismo os plant incompatibility with nematodes. In: Veech, J.A. & Dickson, D.W. (Eds.). **Vistas on Nematology**, 1. ed. Maryland, USA: Editora, 1987. p. 267-277.

KAPLAN, D. T.; KEEN, N. T.; THOMASON, I. J. Studies on the mode of action of glyceollin in soybean incompatibility to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Physiology Plant Pathology**, London, v. 16, p. 319-325, 1980.

LORDELLO, L. G. E. (Ed.). **Nematóides das plantas cultivadas**. 8. ed. São Paulo: Nobel, 1984. 314 p.

LUCCHESI, A. A. Cana-de-açúcar. In: CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A. (Eds.) **Ecofisiologia de culturas extrativistas: cana-de-açúcar, seringueira, coqueiro, dendzeneiro e oliveira**. 1. ed. Piracicaba: Cosmópolis Stoller do Brasil, 2001. v. 1, p. 13-45.

MACCHERONI, W.; MATSUOKA. Manejo das principais doenças da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V.; PINTO, S. N.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. (Eds.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. 1. ed. Piracicaba: CP 2, 2006. p. 238-256.

MEDEIROS, J. E. **Influência da fertirrigação na nematofauna e caracterização isoenzimática de *Meloidogyne spp.* em cana-de-açúcar**. 2011, 94f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

MELAKEBERHAM, H.; BROOKE, R. C.; WEBSTER, J. M. Relationship between physiological response of French beans of different age to *Meloidogyne incognita* and subsequent yield losses. **Plant Pathology**, London, v. 35, p. 203-213, 1986.

MILGROOM, M.C. The synthesis of genetics and epidemiology contributions of population biology in plant pathology. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 83, p. 57-62, 2001.

MOURA, R. M. Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 209-245, 1996.

MOURA, R. M.; ALMEIDA, R. M. A.; COSTA, M.; LIMA, S. T. S.; CARNEIRO, R. M. D.G. *Meloidogyne* species detected in sugarcane fields in the State of Pernambuco, Brazil. In: II INTERNATIONAL CONGRESS OF TROPICAL NEMATOLOGY (40th ONTA), 28., 2009, Maceió. **Anais...** Maceió: Universidade Federal de Alagoas, p. 24-24, 2009.

MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R.; MARANHÃO, S. R. V. L.; MACEDO, M. E. A.; MOURA, A. M.; SILVA, E. G.; LIMA, R. F. Ocorrência dos fitonematóides *Pratylenchus zae* e *Meloidogyne* spp. em cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 101-103, 2000.

MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R.; MARANHÃO, S. R. V. L.; MOURA, A. M.; MACEDO, M. E. A.; SILVA, E. G. Nematóides associados à cana-de-açúcar no Estado de Pernambuco, Brasil. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 23, n. 2, p. 92-99, 1999.

MOZAMBANI, A. E. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V.; PINTO, A. D. S.; JENDIROBA, E. (Orgs.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. 1. ed. Piracicaba: CP 2, 2006. p. 11-18.

MOZER, S.; TELLES, V. **Descobrimos a História**. 1. ed. São Paulo: Editora Ática, 2002. 151 p.

NOIR, S.; ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; COMBRES, M. C.; LASHERMES, P. Identification of a major gene (*Mex – 1*) from *Coffea canephora* conferring resistance to *M. exigua* in *Coffea arabica*. **Plant Pathology**, London, v. 52, p. 97-103, 2003.

NOVARETTI, W. R. T.; CARDERAN, J. O.; STRABELLI, J.; AMORIM, E. Efeitos da utilização de composto, associado ou não a nematicida e adubos minerais, no controle de nematóides e na produtividade de cana-de-açúcar. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 13, p. 93-107. 1989.

PEDROSA, E. M. R.; HUSSEY, R. S.; BOERMA, H. R.. Cellular responses of resistant and susceptible soybean genotypes infected with *Meloidogyne arenaria* races 1 and 2. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 28, n. 2, p. 225-232, 1996.

PEREIRA, F. O. M.; SOUZA, R. M.; SOUZA, P. M.; DOLINSKI, C.; SANTOS, G. K. Estimativa do Impacto Econômico e Social Direto de *Meloidogyne mayaguensis* na Cultura da Goiaba no Brasil. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 33, n.2, p. 178-181. 2008.

PEREIRA, J. C.; ZAMBOLIM, L. Compostos orgânicos no controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 353-379. 1996.

RANDIG, O.; DEAU, F.; SANTOS, M. F. A.; TIGANO, M. S.; CARNEIRO, R. M. D. G.; CATAGNONE-SERENO, P. A novel species-specific satellite DNA family in the invasive root-knot nematode *Meloidogyne mayaguensis* and its potential use for diagnostics. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 125, p. 485-495, 2009.

SCANDALIOS, J. G. Control of gene expression and enzyme differentiation. In: SCANDALIOS, J. G. (Ed.). **Physiological genetics**. 1. ed. New York: Academic Press, 1979. p. 63-107.

SILVA, A. P. **Comportamento de variedades de cana-de-açúcar ao parasitismo de *Meloidogyne incognita* e *M. enterolobii***. 2012, 47 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

SILVA, J. F. V. Resistência genética de soja a nematóides do gênero *Meloidogyne*. In: SILVA, J. F. V.; MAZAFFERA, P.; CARNEIRO, R. G.; ASMUS, G. L.; FERRAZ, L. C. C. B. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja: Sociedade de Nematologia, 2001. 127p.

SIQUEIRA, K. M. S.; FREITAS, V. M.; ALMEIDA, M. R. A.; SANTOS, M. F. A.; CARES, J. A. TIGANO, M. S.; CARNEIRO, R. M. D. G. Detecção de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira e mamoeiro no estado de Goiás, usando marcadores moleculares. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, vol. 34, n. 4, p. 256-260, 2009.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de fitopatologia** – Doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, p. 185-196.

TOMCZAK, A.; KOROPACKA, K.; SMANT, G.; GOVERSE, A.; BAKKER, E.. Resistant plant responses. In: ANGUS, S.; WENDY, P.; BURKHARD, S. (Eds.). **The plant plasma membrane**, 1. ed. New York: Springer, 2008. v. 15, p. 83-113.

TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. (Eds.). **Isoenzimas - variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 175 p. (Séries Monografia, 1).

WHITEHEAD, A. G. Taxonomy of *Meloidogyne* (Nematodea: Heteroderidae) with descriptions of four new species. **Transactions Zoology Society of London**, London, v. 32, p. 263-401, 1968.

XU, J.; LIU, P.; MENG, Q.; LONG, H. Characterization of *Meloidogyne* species from China using isozyme, phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 309-315, 2004.

ZACHEO, G.; BLEVE-ZAQUEO, T. Plant-nematode interactions: histological, physiological and biochemical interactions. In: KOHMOTO, K.; SINGH, U. M.; SINGH, R. P. (Eds.). **Pathogenesis and Host Specificity in Plant Disease**, Elsevier Science Ltda., Oxford, 1995. p. 321-353.

ZIJLSTRA, C. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, p. 283-290, 2000.

ZIJLSTRA, C.; DONKERS-VENNE, D. T. H. M.; FARGETTE, M. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified regions (SCAR) based PCR assays. **Nematology**, Leiden, v. 2, p. 847-853, 2000.

CAPÍTULO II

Reprodução de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii* em cana-de-açúcar e distribuição em canaviais de Pernambuco e Paraíba

1 **REPRODUÇÃO DE MELOIDOGYNE INCOGNITA, M. JAVANICA E M. ENTEROLOBII**
2 **EM CANA-DE-AÇÚCAR E DISTRIBUIÇÃO EM CANAVIAIS DE PERNAMBUCO E**
3 **PARAÍBA¹**

4 **CAPÍTULO II- Reprodução de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii* em**
5 **cana-de-açúcar e distribuição em canaviais de Pernambuco e Paraíba**

6 N. M. R. Barbosa², E. M. R. Pedrosa^{3*}, S. R. V. L. Maranhão²

7
8 ¹Parte da dissertação da primeira autora. ²Universidade Federal Rural de Pernambuco

9 Departamento de Agronomia, Brasil. ³Universidade Federal Rural de Pernambuco

10 Departamento de Tecnologia Rural, Brasil. * Autor para correspondência: Universidade

11 Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Tecnologia Rural, Dois Irmãos, Recife, PE,

12 Brasil, CEP: 52171-900, Phone: 55-81-88722222, Fax: 55-81-33206205, e-mail:

13 elvira.pedrosa@dtr.ufrpe.br

14
15 **ABSTRACT**

16 Barbosa, N. M. R., E. M. R. Pedrosa, S. R. V. L. Maranhão. 2013. **Reproduction of**
17 ***Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. enterolobii* in sugarcane and distribution on**
18 **crop in Pernambuco e Paraíba.** Nematropica 00:00-00

19
20 Considering *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* importance for sugarcane and reports of
21 *M. enterolobii* in the crop in Northeastern Brazil, this study had as objective identifying
22 through biochemical methods the species of *Meloidogyne* occurring in sugarcane fields of
23 Pernambuco and Paraíba States and evaluating reproduction of this three species in
24 association or individually on the variety RB 867515. It was identified 19 nematode
25 populations, mostly constituted exclusively by *M. incognita* phenotype I1(Rm: 1.0) and I2
26 (Rm: 1.0, 1.1). *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. enterolobii*, in association or

27 individually, did not affect plant growth variables. RB 867515 was a good host for *M.*
28 *incognita* and *M. javanica*, but not for *M. enterolobii*, permitting free reproductions for the
29 former nematodes. Esterase phenotypes at the end of the experiment presented quantitative
30 variations in the species ratios used for inoculation, indicating *M. incognita* prevalence over
31 the other species.

32 Key words: *Saccharum* spp., variability, esterase phenotypes, root-knot nematode.

33

34

RESUMO

35 Barbosa, N. M. R., E. M. R. Pedrosa, S. R. V. L. Maranhão. 2013. **Reprodução de**
36 ***Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii* em cana-de-açúcar e distribuição em**
37 **canaviais de Pernambuco e Paraíba.** Nematropica 00:00-00

38

39 Considerando a importância de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em cana-de-
40 açúcar e o assinalamento de *M. enterolobii* em canaviais do Nordeste, este estudo teve como
41 objetivo identificar por métodos bioquímicos espécies de *Meloidogyne* ocorrentes em
42 canaviais nos Estados de Pernambuco e Paraíba e avaliar a reprodução das três espécies,
43 isoladamente e conjuntas, na variedade RB 867515. Foram identificadas 19 populações do
44 nematoide, através da eletroforese de isoenzimas, a maioria constituída exclusivamente por
45 *M. incognita* fenótipo I1(Rm: 1.0) e I2 (Rm: 1.0, 1.1). *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e
46 *M. enterolobii*, isoladamente ou em população conjunta, não afetaram as variáveis de
47 crescimento da planta avaliadas. RB 867515 mostrou-se boa hospedeira para *M. incognita* e
48 *M. javanica*, mas não para *M. enterolobii*, permitindo que as duas primeiras espécies se
49 multiplicassem livremente. Os fenótipos de esterase obtidos após a realização do experimento
50 mostraram variações quantitativas nas proporções das espécies inoculadas, indicando
51 prevalência de *M. incognita* sobre as demais.

52 Palavras chave: *Saccharum* spp., variabilidade, fenótipos de esterase, nematoide das galhas.

53

54

INTRODUÇÃO

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

A produtividade média da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) tem sido baixa nos Estados de Pernambuco e Paraíba, em decorrência de vários fatores bióticos e abióticos, em particular, o parasitismo dos fitonematoides *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood, *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood e *Pratylenchus zaeae* Graham. (MOURA et al., 1999). Quando esses patógenos estão presentes em alta infestação o sistema radicular da planta parasitada torna-se pouco desenvolvido e com baixa eficiência reduzindo assim a produtividade agrícola. (DIANRDO-MIRANDA; GIL; MENEGATTI, 2003). De acordo com Moura e Regis (1991), o nível de danos ocasionados pelo parasitismo do nematoide das galhas na cultura da cana-de-açúcar é da ordem de 15%, chegando até 60% de perdas nos países menos desenvolvidos, onde não há grande difusão das técnicas de controle.

65

66

67

68

69

70

71

Os primeiros registros desses nematoides na cultura da cana-de-açúcar foram feitos na ilha de Java (Indonésia) por Treub, em 1885. Na região Nordeste do Brasil a doença é conhecida como mal-das-reboleiras e caracteriza-se por apresentar rápida progressão e severidade alta à cultura (DIAS-ARIEIRA et al., 2010). Estudos realizados em canaviais pernambucanos confirmaram a presença das espécies *M. arenaria*, *M. incognia*, *M. enterolobii*, *M. javanica* e *M. hispanica* através dos fenótipos de esterase (MOURA et al., 2009, CHAVES et at 2009).

72

73

74

Existem poucos estudos sobre os níveis de danos de *Meloidogyne* spp. em cana-de-açúcar. Níveis maiores que 400 juvenis por 50g de raízes indicam alta densidade populacional, assim justificando a adoção de medidas de controle (NOVARETTI, 1997).

75

76

77

78

Em geral a identificação das espécies de *Meloidogyne* era feita com base na configuração da região perineal de fêmeas adultas, fundamentada em caracteres morfológicos. No entanto, essa técnica apresenta limitações devido às variações intraespecíficas, similaridade da região perineal entre as espécies, e frequente surgimento de configurações

79 perineais atípicas nas populações (CASTRO; LIMA; CARNEIRO, 2003). Tendo sido
80 primeiramente realizada em 1949 por Chitwood (MOURA, 1996). Nos anos 60 foi
81 desenvolvido um novo tipo de marcador genético, as isoenzimas (MARKET; MOLLER,
82 1959). Destacando-se como uma técnica confiável, a eletroforese de isoenzimas tem merecido
83 destaque na identificação e caracterização de espécies de *Meloidogyne* por apresentar grande
84 eficiência na identificação de populações atípicas, com rápida execução e custo relativamente
85 baixo (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001).

86 Nos últimos anos, diferentes métodos de controle têm sido pesquisados, dando foco à
87 integração entre técnicas disponíveis para tornar mais racional, eficiente e econômico o
88 manejo de nematoides em cana-de-açúcar (NOVARETTI; MONTEIRO; FERRAZ, 1998). O
89 uso de variedades resistentes em áreas infestadas tem sido bastante enfatizado. No entanto,
90 para que seja adotado, é necessário, entre outros fatores, o conhecimento do comportamento
91 das variedades em relação às espécies de fitonematoides de importância para a cultura
92 (DINARDO-MIRANDA et al., 1995). O objetivo do presente estudo foi identificar por
93 métodos bioquímicos espécies de *Meloidogyne* ocorrentes em canaviais nos Estados de
94 Pernambuco e Paraíba e avaliar a reprodução das três espécies, isoladamente e associadas, na
95 variedade RB 867515.

96 MATERIAL E MÉTODOS

97 **Variabilidade de populações de *Meloidogyne* spp.**

98 Foram coletadas amostras de diferentes regiões produtoras de cana-de-açúcar nos
99 Estados de Pernambuco e Paraíba, em áreas com sintomas de fitonematoses. Em Pernambuco
100 foram selecionadas três unidades produtoras: Usina Santa Teresa situada no município de
101 Goiana, Usina São José situada no município de Igarassu e Usina Petribú situada no
102 município de Carpina, e na Paraíba três unidades produtoras: Destilaria Giasa situada no
103 município de Pedra de Fogo, Usina Japungú situada no município de Santa Maria e Destilaria
104 Miriri situada no município de Mamanguape.

105 As amostras provenientes do campo foram constituídas de solo e raízes coletadas num
106 caminhamento em zig-zag próximas à rizosfera de plantas de cana-de-açúcar, sendo cada
107 amostra composta obtida de cinco sub-amostras simples. Os pontos amostrados foram
108 georreferenciados, as amostras acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas ao
109 laboratório de Fitonematologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Cada amostra
110 composta foi homogeneizada e depositada em três vasos com capacidade para 3L cada e, em
111 seguida, uma muda de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Santa Cruz Kada, com 20
112 dias de idade, foi transplantada para cada um dos vasos, com o objetivo de multiplicar as
113 populações de *Meloidogyne* spp. existentes para posterior caracterização bioquímica. Após 30
114 dias do transplântio das mudas, 10 fêmeas adultas de cada uma das amostras compostas foram
115 retiradas das raízes do tomateiro. A coleta das fêmeas adultas, de coloração branco-leitosa em
116 plena produção de ovos, foi realizada ao microscópio estereoscópico com auxílio de estilete
117 de ponta fina. As massas de ovos das fêmeas coletadas foram retiradas individualmente,
118 etiquetadas e armazenadas em *eppendorf*, contendo água onde foram acondicionadas em
119 geladeira a 4°C, visando à purificação das espécies (ESBENSHADE; TRIANTAPHYLLOU,
120 1990).

121 Cada uma das 10 fêmeas, retiradas do interior das raízes, foi colocada intacta em um
122 *eppendorf*, contendo 4µL de solução tampão (2g sacarose; 100 µl de triton-X; 0,2 mg de azul
123 de bromofenol; 7,8 ml de água destilada) para extração da enzima esterase (KUNIEDA DE
124 ALONSO et al., 1995). Posteriormente, as fêmeas foram maceradas com um pistilo para que
125 o extrato protéico fosse aplicado nas cavidades do gel de poliacrilamida. Durante o processo
126 de extração, as amostras permaneceram à baixa temperatura, para evitar a desnaturação de
127 proteínas e, conseqüentemente, perda da atividade enzimática (SCANDALIOS, 1979).

128 Utilizando-se a metodologia de Alfenas (1998), na avaliação por marcadores
129 isoenzimáticos o gel de poliacrilamida a 7% AA/BIS (acrilamida e bis-acrilamida), foi
130 preparado pela dissolução de acrilamida e bis-acrilamida na solução tampão tris-glicina, pH

131 8,2. À mistura foram cuidadosamente adicionados 75 µl de TEMED (tetrametildiamina) e
132 0,75 mL de persulfato de amônia a 10%. Em seguida, vertida no molde de acrílico até a
133 polimerização completa do gel. Foi utilizada uma cuba horizontal contendo tampão borato de
134 lítio. As amostras foram aplicadas, individualmente, com auxílio de micropipetas,
135 empregando-se 3 µL do extrato proteico de cada amostra nas cavidades do gel, procedendo-se
136 em seguida a corrida eletroforética a 4°C, mantendo a voltagem constante de 120 volts. A
137 migração foi monitorada por meio do deslocamento da linha frontal de azul de bromofenol. A
138 eletroforese foi interrompida quando a linha frontal atingiu 6 cm do ponto de aplicação das
139 amostras, cerca de 2 horas e meia após o início da corrida. Para a revelação dos sistemas
140 enzimáticos, adotou-se os procedimentos baseados na metodologia proposta por Alfenas
141 (1998). Para detecção de α -esterase (α -EST) os géis foram corados usando-se 3,0 ml de α -
142 nafitil acetato 1%, em acetona 50%; 40 mg de fast blue RR salt; 50 ml de tampão fosfato de
143 sódio monobásico 0,2 M, pH 4,2; 10 ml de tampão fosfato de sódio dibásico 0,2 M, pH 9,2; e
144 40 ml de água destilada, sendo em seguida incubados por 2 horas, no escuro, a 35° C. Todos
145 os géis, após a coloração, foram lavados, fixados (em solução contendo álcool metílico, ácido
146 acético e água destilada na proporção de 1:1:1 v/v) por 20 minutos, avaliados para a
147 confecção dos zimogramas e em seguida fotografados.

148 A identificação das espécies de *Meloidogyne* baseou-se no padrão isoenzimático para
149 esterase, conforme proposto por Esbenshade e Triantaphyllou (1990) e Carneiro e Almeida
150 (2001). Os fenótipos foram identificados por uma letra e um número que correspondem,
151 respectivamente, a inicial do nome da espécie de *Meloidogyne* encontrado juntamente com o
152 número de bandas (ESBENSHADE; TRIANTAPHYLLOU, 1985, 1990).

153 **Reprodução de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii* em cana-de-açúcar**

154 Populações de *M. incognita* e de *M. javanica* de cana-de-açúcar das áreas estudadas e
155 de *M. enterolobii* Yang & Eisenback de goiabeira, da EMBRAPA Semiárido em Petrolina,
156 foram multiplicados e mantidos em casa de vegetação, parasitando tomateiros cv. Santa Cruz

157 Kada. Para obtenção do inóculo, as raízes de tomateiros, após 45 dias da inoculação, foram
158 lavadas em água corrente e realizada a extração de ovos conforme a técnica descrita por
159 Hussey & Barker (1973). Em seguida, a suspensão foi imediatamente vertida em peneiras,
160 sobrepostas, de 200 e 500 Meshes. Os ovos retidos na peneira de 500 Meshes foram lavados
161 com jatos de água, para retirar os resíduos de hipoclorito de sódio, e recolhidos em becker.
162 Após a extração, ajustou-se a concentração do inóculo, através de contagem em lâmina de
163 Petter. Rebolos de cana-de-açúcar da variedade RB 867515, cedidos pela Estação
164 Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina (EECAC), foram plantados em copos com
165 capacidade de 500 ml e, após um mês da brotação, transplantados para sacos plásticos com
166 capacidade para 5 kg com solo esterilizado em autoclave. O inóculo consistiu de 20 mil ovos
167 de *Meloidogyne* por planta, assim constituído: T1 = 20.000 ovos de *M. incognita*, T2 = 20.000
168 ovos de *M. javanica*, T3 = 20.000 ovos de *M. enterolobii*, T4 = 10.000 ovos de *M. incognita* +
169 10.000 ovos de *M. javanica*, T5 = 10.000 ovos de *M. incognita* + 10.000 ovos de *M.*
170 *enterolobii*, T6 = 10.000 ovos de *M. javanica* + 10.000 ovos de *M. enterolobii*, T7 = 6.600
171 ovos de *M. incognita* + 6.600 ovos de *M. javanica* + 6.600 ovos de *M. enterolobii* e T8 =
172 testemunha não inoculada. O delineamento adotado foi inteiramente casualizado com seis
173 repetições. O experimento foi conduzido em casa de vegetação com temperatura média de
174 28,3°C e umidade relativa do ar de 69,1%. Após 120 dias de inoculação, as plantas foram
175 avaliadas em relação à altura; número e diâmetro do colmo; número de perfilhos; biomassa
176 fresca da parte aérea e da raiz; número e índice de galhas, segundo a escala proposta por
177 Taylor e Sasser (1978); número de ovos, extraídos conforme técnica descrita por Hussey e
178 Barker (1973); e fator de reprodução ($FR = Pf/Pi$).

179 Os dados foram submetidos à análise da variância e as médias separadas pelo teste de
180 Tukey a 5% de probabilidade, quando necessário. Os dados relativos ao número de perfilhos
181 foram transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$ e os dados relativos ao número de ovos foram
182 transformados para $\log_{10}(x+1)$.

183 A suspensão de ovos obtida de cada tratamento que recebeu inoculação de mais de
184 uma espécie de *Meloidogyne* (tratamentos T4, T5, T6, T7) foi homogeneizada e retirada
185 alíquotas de 5.000 ovos para inoculação de tomateiros cultivar Santa Cruz, com 20 dias de
186 idade, cultivado em solo esterilizado. Após 30 dias da inoculação, 10 fêmeas adultas de
187 coloração branco-leitosa em plena produção de ovos foram retiradas de cada uma das parcelas
188 referentes aos tratamentos T4, T5, T6, T7 e identificadas bioquimicamente, conforme descrito
189 anteriormente.

190 RESULTADOS E DISCUSSÃO

191 Variabilidade de populações de *Meloidogyne* spp.

192 Nos dois estados (Pernambuco e Paraíba) foram isoladas 19 populações do nematoide
193 das galhas (Tabela 1). Para *M. incognita* o padrão esterase revelou o fenótipo I1 (Rm: 1.0) e I2
194 (Rm: 1.0, 1.1), e para *M. javanica*, J3 (Tabela 2).

195 De acordo com Santos e Triantaphyllou 1992, o que diferencia o fenótipo esterase de
196 I1 e I2 é a presença de uma segunda banda em I2. O fenótipo I1 é o mais comum em *M.*
197 *incognita* (ESBENSHADE; TRIANTAPHYLLOU, 1985).

198 No presente estudo, em Pernambuco observaram-se sete populações constituídas
199 apenas por *M. incognita* (77,7%) com a proporção de 71% para esterase Est I1 e 29% para
200 esterase Est I2, e uma população de *M. javanica* (11,1%) apresentando esterase Est J3. Uma
201 população mista foi observada, apresentando esterase Est I1 e esterase Est J3 na proporção de
202 40% e 60% respectivamente. Barbosa et al. (2011) também identificaram três fenótipos de
203 esterase para *Meloidogyne* em canaviais de Pernambuco, para *M. incognita* os fenótipos I1 e
204 I2 apareceram em 50% das amostras analisadas, *M. javanica* foi identificado em 25% das
205 amostras e populações mistas de *M. incognita* e *M. javanica* foram detectadas numa
206 proporção de 25%.

207 Na Paraíba foram observadas 10 populações constituídas exclusivamente por *M.*
208 *incognita*, sendo 80% para esterase I1 e 20% para esterase I2, corroborando Souza et al.

209 (2012), que identificaram os fenótipos I1 e I2 de *M. incognita* em canaviais da Paraíba.
210 Barbosa et al. (2012), em áreas canavieiras de Pernambuco e Paraíba, observaram três
211 fenótipos de esterase, I1 e I2 para plantas infectadas por *M. incognita* e J3 para as infectadas
212 por *M. javanica*, indicando frequência da ordem de 94% e 6% para *M. incognita* e *M.*
213 *javanica*, respectivamente.

214 No Paraná, *Meloidogyne* oriundo de cafeeiros (*Coffea arabica* L.), após análise dos
215 fenótipos de esterase em gel de acrilamida, apresentou o fenótipo S1, que se caracteriza pela
216 presença de uma banda de menor mobilidade em relação àquela primeira banda de *M.*
217 *javanica*, utilizada como padrão de comparação, e ao fenótipo I1, típico de *M. incognita*
218 (OLIVEIRA; OLIVEIRA; GONÇALVES, 2006).

219 Em áreas produtoras de soja (*Glycines Max* (L.) Merr) no Brasil, quatro populações
220 apresentaram fenótipo de esterase diferentes daqueles frequentemente encontrados para
221 espécies de *Meloidogyne* associados à cultura da soja, a população que exibiu fenótipo J2 foi
222 identificada como *M. javanica*, a população com P1 identificada como *M. paranaensis*
223 Carneiro e as populações com esterase G3 e S1 não foram identificadas em espécie (CATRO;
224 LIMA; CARNEIRO, 2003).

225 **Reprodução de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii* em cana-de-açúcar**

226 *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii* isoladamente ou em população
227 conjunta não afetaram significativamente ($P=0,05$) a altura, o diâmetro e o número de colmos,
228 o número de perfilho e a biomassa fresca da raiz, aos 120 dias após a inoculação (Tabela 2).
229 Esse resultado corrobora resultado de Silva et al. (2012) quando o parasitismo de *M.*
230 *enterolobii* não afetou a altura e o diâmetro do colmo, aos 90 dias após a inoculação,
231 independentemente do nível de inóculo.

232 Em relação à biomassa fresca da parte aérea, houve diferença estatística entre *M.*
233 *enterolobii* e Testemunha (T), não diferindo dos demais tratamentos. Comportamento
234 semelhante em relação à variedade estudada x peso fresco da parte aérea x *M. enterolobii*, foi

235 relatado por Silva et al., 2012. Considerando o efeito de *Meloidogyne enterolobii*
236 isoladamente, o peso fresco da parte aérea, foi significativamente maior em relação aos
237 demais tratamentos (Tabela 2).

238 *Meloidogyne enterolobii* apresentou baixo parasitismo, diferindo da testemunha em
239 relação ao número de galhas, e diferindo dos demais tratamentos (Tabela 2). A exceção das
240 plantas inoculadas com *M. enterolobii* isoladamente, as plantas inoculadas com os demais
241 nematoides (isoladamente ou em conjunto) apresentaram índices de galhas superiores a 3,
242 indicando reação de susceptibilidade (Taylor e Sasser, 1978). A livre multiplicação de *M.*
243 *incognita* e *M. javanica* na variedade RB 867515 foi confirmada pelos mais altos números de
244 ovos ($P \leq 0,05$) e pelos valores dos fatores de reprodução sempre maiores do que 1,0 em todos
245 os tratamentos com nematoides, exceto *M. enterolobii* isoladamente, cuja pequena parte da
246 população inicial conseguiu completar o ciclo (Tabela 2). Esses resultados corroboram
247 Guimarães et al. (2008) e Chaves et al. (2009) que relataram a variedade RB867515 como boa
248 hospedeira de *M. incognita*.

249 Os fenótipos de esterase obtidos após a realização do experimento (Figura 1)
250 mostraram variações quantitativas nas populações inoculadas em mistura. Por exemplo, para o
251 tratamento T4 (50% de *M. incognita* + 50% de *M. javanica*) a revelação para esterase revelou
252 uma proporção de 64% e 36% para *M. incognita* (Est I1) e *M. javanica* (Est J3),
253 respectivamente. Para T5 (50% de *M. incognita* + 50% de *M. enterolobii*) foi revelado 100%
254 de *M. incognita* (Est I1). Para T6 (50% de *M. javanica* + 50% de *M. enterolobii*) foi revelado
255 100% de *M. javanica* (Est J3). Para T7 (33% de *M. incognita* + 33% de *M. javanica* + 33% de
256 *M. enterolobii*) o bandejamento apresentou frequência de 73% e 27% para *M. incognita* (Est
257 I1) e *M. javanica* (Est J3), respectivamente, não apresentando fenótipo de esterase para *M.*
258 *enterolobii*.

259 Esses resultados sugerem que *M. incognita* está mais adaptado à cana-de-açúcar nas
260 condições do Nordeste do que *M. javanica*, refletindo-se em seu maior potencial reprodutivo.

261 Por outro lado a variedade RB 867515 mostrou-se má hospedeira para *M. enterolobii*. A baixa
262 capacidade de reprodução de *M. enterolobii* em cana-de-açúcar pode estar associada ao fato
263 da população em estudo ser oriunda de goiabeira e não de cana-de-açúcar, como as outras
264 duas espécies. Pode-se especular que ciclos subsequentes de cultivo da mesma variedade de
265 cana-de-açúcar em solo infestado por *M. enterolobii* exerça uma pressão de seleção
266 favorecendo o aparecimento de isolados mais virulentos com maior fecundidade ou ciclo de
267 vida mais rápido.

268 AGRADecIMENTOS

269 A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior (CAPES) pela
270 concessão da bolsa de estudo. As Usinas São José, Petribú, Santa Tereza, Japungu, e as
271 Destilarias Giasa e Miriri, pela disponibilidade de áreas de estudo e pessoal técnico para
272 realização das amostragens.

273 LITERATURA CITADA

- 274 Alfenas, A. C. Eletroforeses de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em
275 plantas e microrganismos. Editora. Viçosa. 1998.
- 276 Barbosa, N. M. R., Guimarães, J. F. R., Freitas, M. A., Silva, T. H. C. A., Silva, L. M.; Souza,
277 M. A. L. M., Pedrosa, E. M. R. 2001. Caracterização bioquímica através dos fenótipos de
278 esterase de populações de *Meloidogyne* spp. em canaviais da zona da mata do estado de
279 Pernambuco. XI Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão-Recife, Brasil.
- 280 Barbosa, N. M. R., Pedrosa, E. M. R., Maranhão, S. R. V. L., Silva, A. P. 2012.
281 Caracterização bioquímica de populações de *Meloidogyne* spp. em cana-de-açúcar nos
282 estados de Pernambuco e Paraíba. Tropical Plant Pathology. 37 (cd-room)
- 283 Carneiro, R. M. D. G., Almeida, M. R. A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de
284 enzimas dos nematóides das galhas para identificação de espécies. Nematologia
285 Brasileira. 25(1):35-44.

- 286 Castro, J. M. C., Lima, R. D., Carneiro, R. M. D. G. 2003. Variabilidade Isoenzimática de
287 populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de regiões brasileiras produtoras de soja.
288 Nematologia Brasileira. 27(1):1-12.
- 289 Castro, J. M. C., Santana, T. A. S. 2010. Primeiro registro de *Meloidogyne enterolobii* em
290 goiabeira no Estado de Alagoas. Nematologia Brasileira. 34(3):169-171.
- 291 Dias-Arieira, C. R. , Santos, E. R. , Biela, F. , Chiamolera, F. M. , Cunha, T. P. L. , Santana,
292 S. M. , Puerari, H. H. 2010. Reação de Variedades de Cana-de-açúcar aos Nematóides-
293 das-galhas. Nematologia Brasileira. 34(4):198-203.
- 294 Dinardo-Miranda, L. L., Novaretti, W. R. T., Morelli, J. L., Nelli , E. J. 1995. Comportamento
295 de variedades de cana-de-açúcar em relação a *Meloidogyne javanica*, em condições de
296 campo. Nematologia Brasileira. 19(1):60-66.
- 297 Esbenschade, P. R., Triantaphyllou, A. C. 1990. Isozyme phenotypes for the identification of
298 *Meloidogyne* species. Journal of Nematology. 22(1):10-15.
- 299 Esbenschade, P. R., Triantaphyllou, A. C. 1985. Use of enzyme phenotypes for the
300 identification of *Meloidogyne* species. Journal of Nematology. 17(1):6-20.
- 301 Guimarães, L. M. P.; Pedrosa, E. M. R.; Coelho, R. S. B.; Chaves, A.; Maranhão, S. R. V. L.;
302 Miranda, T. L. Efeito de metil jasmonato e silicato de potássio no parasitismo de
303 *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus zae* em cana-de-açúcar. Nematologia Brasileira,
304 32:50-55-2008.
- 305 Hussey, R. S., H. R Barker. 1973. A comparison of methods collecting inocula of
306 *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant disease Reporter. 57:1025-1028.
- 307 Kunieda De Alonso, S., Alfenas, A. C., Santos, J. M., Ferraz, S. 1995. Análise de isoenzimas
308 para identificação de espécies de *Meloidogyne*. Fitopatologia Brasileira. 20(1):20-14.
- 309 Markert, C. L., Moller, F. 1959. Multiple forms of enzymes: issue, ontogenetic and species
310 species patterns. Proc Natl Acad Sci. 45:753-763.

- 311 Moura, R.M., Almeida, R.M.A., Costa, M., Lima, S.T.S., Carneiro, R.M.D.G. 2009.
312 *Meloidogyne* species detected in sugarcane fields in the State of Pernambuco, Brazil.
313 Nematologia Brasileira. 33(4):329.
- 314 Moura, R. M. 1996. Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. In: Revisão anual de
315 patologia de plantas. 4:209-245.
- 316 Moura, R. M., Regis, E. M. O. 1991. Interações entre a meloidoginose da cana-de-açúcar e
317 deficiências minerais observadas no estado do Rio Grande do Norte. Nematologia
318 Brasileira. 15:179-188.
- 319 Novaretti, W.R.T. 1997. Controle de *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus zae* (Nemata:
320 Tylenchoidea) em cana-de-açúcar com nematicidas, associados ou não à matéria orgânica.
321 (Tese de Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz -Universidade de
322 São Paulo, Piracicaba, 51 p.
- 323 Novaretti, W. R.T., Monteiro, A. R., Ferraz, L. C. C. B. 1998. Controle químico de
324 *meloidogyne incognita* e *Pratylenchus zae* em cana-de-açúcar com carbofuran e
325 terbufos. Nematologia Brasileira. 22(1):60-74.
- 326 Oliveira, D. S., Oliveira, R. D. L., Gonçalves, W. 2006. Fenótipos S1 de esterase em
327 *Meleoidogyne incognita* no Brasil. Fitopatologia Brasileira. 31(2):207.
- 328 Santos, J. M., Triantaphyllou, H. H. 1992. Determinação dos fenótipos enzimáticos e estudos
329 comparativos da morfologia de 88 populações de *Meloidogyne* spp. Do cafeeiro.
330 Nematologia Brasileira. 16:88.
- 331 Scandalios, J. G. Control of gene expression and enzyme differentiation. In: Scandalios, J. G.
332 Physiological genetics. Academic Press, 1979.
- 333 Silva, A. P., Pedrosa E. M. R., Chaves, A., Maranhão, S. R. V. L., Guimarães, L. M. P.,
334 Rolim, M, M. 2012. Reação de variedade de cana-de-açúcar ao parasitismo de
335 *Meloidogyne incognita* e *M. enterolobii*. Revista Brasileira de Ciências Agrárias.
336 7(5):814-819.

- 337 Souza, M. A. L. M., Barbosa, N. M. R., Pereira, B. C. C. B., Batista, M. G. C., David, M. F.
338 L., Pedrosa, E. M. R. 2012. Caracterização de populações de *Meloidogyne* spp. em
339 canaviais do Estado da Paraíba. XII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão- Recife,
340 Brasil.
- 341 Taylor, A.L., Sasser, J.N. Biology, identification and control of root-knot nematodes
342 (*Meloidogyne* species). North Carolina State University Graphics. 1978.
- 343
- 344

345 Tabela 1. Localização das áreas e espécies de *Meloidogyne* identificadas nos estados de
 346 Pernambuco e Paraíba.

Amostra	Local	Lote	Engenho	Área (ha)	<i>Meloidogyne incognita</i>	<i>M. javanica</i>
1	PE- São José	274	Cumbe	NI	X	
2	PE- São José	274	Cumbe	NI	X	
3	PE- São José	545	Campinas	NI	X	
4	PE- São José	667	D'água	NI	X	
5	PE- Petribu	02	Mourão	3,6	X	
6	PE- Petribu	02	Mourão	3,6		X
7	PE- Petribu	48	Cancela	8,95	X	X
8	PE- Petribu	48	Cancela	8,95	X	
9	PB- Japungú	29	Boa Vista	24,49	X	
10	PB- Japungú	22	Boa Vista	33,09	X	
11	PB- Japungú	94	Taberaba	11,80	X	
12	PB- Miriri	49	S. Emília II	22,87	X	
13	PB- Miriri	49	S. Emília II	22,87	X	
14	PB- Miriri	65	S. Emília II	10,82	X	
15	PB- Miriri	65	S. Emília II	10,82	X	
16	PB- Miriri	09	S. Terezinha I	12,86	X	
17	PB- Miriri	09	S. Terezinha I	12,86	X	
18	PB- Giasa	170	Ibura	20,40	X	
19	PE- Santa Tereza	19	Terra Rica	4,46	X	

347 Dados fornecidos pelas unidades produtoras; NI= Não Informado.

348

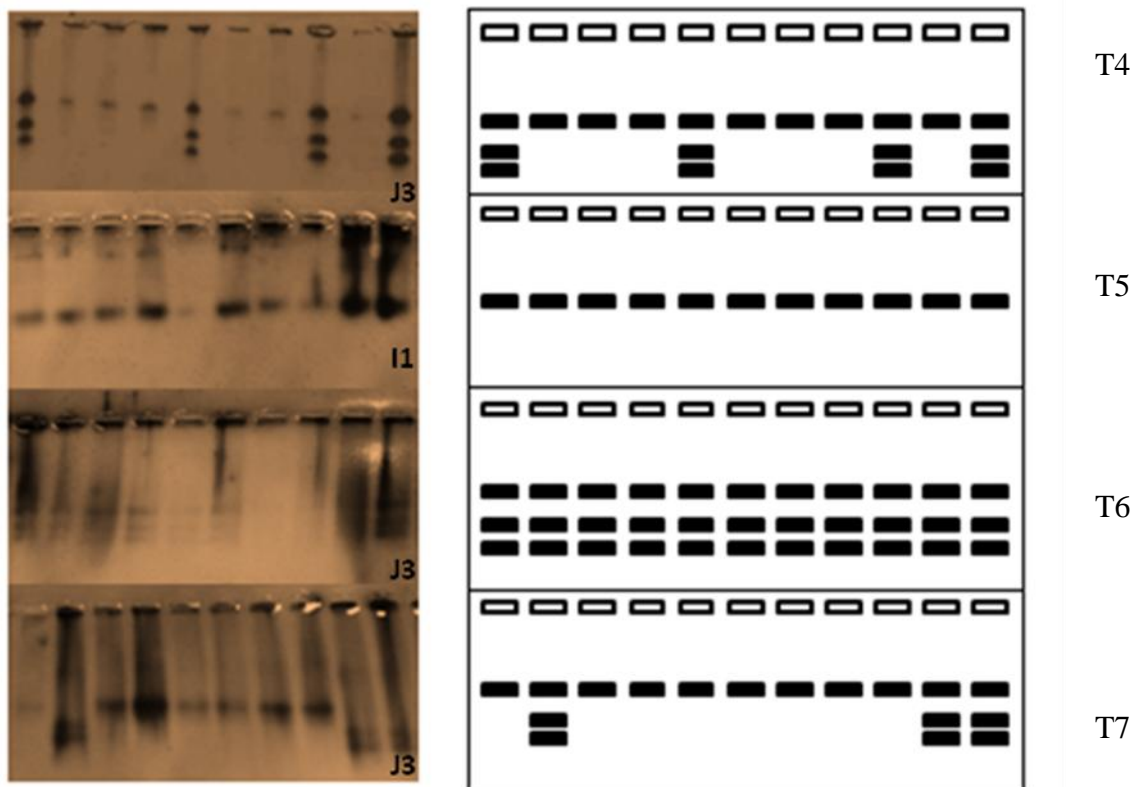
349 Tabela 2. Espécies de *Meloidogyne* provenientes de áreas produtoras de cana-de-açúcar dos
 350 Estados de Pernambuco e Paraíba, caracterizadas pelos fenótipos revelados com o sistema
 351 isoenzimático esterase

Amostra	Localidade	Localização	Espécie	Fenótipo (EST)
1	PE- São José	07°47'10,5'' 35°01'5,6''	<i>Meloidogyne incognita</i>	I1
2	PE- São José	07°47'10,5'' 35°01'16'	<i>M. incognita</i>	I1
3	PE- São José	07°46'57,4'' 35°0,0'55,5''	<i>M. incognita</i>	I2
4	PE- São José	07°52'2,1'' 35°0,0'48,6''	<i>M. incognita</i>	I1
5	PE- Petribu	07°49'15,4'' 35°08'52,9''	<i>M. incognita</i>	I1
6	PE- Petribu	07°49'14,1'' 35°08'51,7''	<i>M. javanica</i>	J3
7	PE- Petribu	07°49'21,7'' 35°08'52,2''	<i>M. incognita</i> <i>M. javanica</i>	I1 J3
8	PE- Petribu	07°49'17,1'' 35°08'50,8''	<i>M. incognita</i>	I1
9	PB- Japungú	06°52'59,5'' 35°03'54,3''	<i>M. incognita</i>	I1
10	PB- Japungú	06°52'59,1'' 35°03'54,1''	<i>M. incognita</i>	I1
11	PB- Japungú	06°52'17'' 35°01'47,7''	<i>M. incognita</i>	I1
12	PB- Miriri	06°51'49,1'' 34°57'59,7''	<i>M. incognita</i>	I1
13	PB- Miriri	06°51'1,9'' 34°58'47,8''	<i>M. incognita</i>	I1
14	PB- Miriri	06°52'35,9'' 34°58'16,7''	<i>M. incognita</i>	I2
15	PB- Miriri	06°52'36,8'' 34°58'3,5''	<i>M. incognita</i>	I2
16	PB- Miriri	06°48'38,8'' 34°57'8,6''	<i>M. incognita</i>	I1
17	PB- Miriri	06°48'34,8'' 34°56'58,3''	<i>M. incognita</i>	I1
18	PB- Giasa	07°21'29'' 35°0,0'34''	<i>M. incognita</i>	I1
19	PE- Santa Tereza	07°37'20,2'' 34°58'19''	<i>M. incognita</i>	I2

352 Tabela 2. Efeito de populações de *Meloidogyne incognita* (Mi), *M. javanica* (Mj) e *M. enterolobii* (Me), isoladamente ou em mistura, sobre a
 353 altura da planta, diâmetro do colmo (DC), número de colmos (NC), número de perfilho (NP), biomassa fresca da parte aérea (BFPA), biomassa
 354 fresca da raiz (BFR), número de galhas (NG), índice de galhas (IG), número de ovos (NO) por planta e fator de reprodução (FR), 120 dias após a
 355 inoculação da cana-de-açúcar variedade RB869515

Nematoide	Altura	DC	NC	NP	BFPA	BFR	NG	IG	NO	FR
100%Mi	2,52 a	1,68 a	6,00 a	0,96 a	279,08 ab	167,31 a	87,16 a	4,00	4,40 a	1,27
100%Mj	2,54 a	1,56 a	5,16 a	0,70 a	268,30 ab	142,47 a	100,00 a	5,00	4,51 a	1,76
100%Me	2,65 a	1,61 a	5,66 a	0,70 a	328,38 a	142,14 a	15,16 b	3,00	3,33 b	0,11
50%Mi+50%Mj	2,56 a	1,75 a	5,83 a	0,79 a	317,30 ab	145,20 a	100,00 a	5,00	4,45 a	1,55
50%Mi+50%Me	3,25 a	1,50 a	5,66 a	0,70 a	277,45 ab	130,50 a	89,16 a	4,50	4,49 a	1,59
50%Mj+50%Me	2,53 a	1,55 a	5,83 a	0,79 a	271,00 ab	134,24 a	82,16 a	4,50	4,49 a	1,74
33%Mi+33%Mj+33%Me	2,37 a	1,76 a	5,33 a	0,98 a	276,66 ab	153,61 a	100,00 a	5,00	4,60 a	2,34
Testemunha (não inoculada)	2,25 a	1,63 a	5,83 a	0,79 a	242,07 b	162,68 a	0,00 b	0,00	0,00 c	0,00
CV (%)	23,36	12,26	10,45	29,21	16,42	20,34	14,11		4,26	

356 Para análise estatística, os dados relativos ao número de perfilhos foram transformados para $\sqrt{(x+0.5)}$ e os dados relativos ao número de ovos por
 357 planta foram transformados para $\log_{10}(x+1)$, sendo apresentada a média dos dados transformados. Na mesma coluna, médias seguidas pelas
 358 mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade.



359 Figura 1. Gel de poliacrilamida a 7% apresentando fenótipos de esterase de espécies de
 360 *Meloidogyne* ao final do experimento. Em T4, 64% *M. incognita* (Est I1) e 36% *M. javanica*
 361 (Est J3); em T5, 100% *M. incognita* (Est I1); em T6, 100% *M. javanica* (Est J3); e em T7,
 362 73% *M. incognita* (Est I1) e 27% *M. javanica* (Est J3).

CAPÍTULO III

Penetração, desenvolvimento e reprodução de *Meloidogyne enterolobii* em cana-de-açúcar

1 **PENETRAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E REPRODUÇÃO DE *MELOIDOGYNE***

2 ***ENTEROLOBII* EM CANA-DE-AÇÚCAR¹**

3 **CAPÍTULO III- Penetração, desenvolvimento e reprodução de *Meloidogyne enterolobii***
4 **em cana-de-açúcar**

5 N. M. R. Barbosa², E. M. R. Pedrosa^{3*}, S. R. V. L. Maranhão²

6
7 ¹Parte da dissertação da primeira autora. ²Aluna de Pós-graduação, Universidade Federal
8 Rural de Pernambuco Departamento de Agronomia, Brasil. ³Professor, Universidade Federal
9 Rural de Pernambuco Departamento de Tecnologia Rural, Brasil. * Autor para
10 correspondência: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Tecnologia
11 Rural, Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil, CEP: 52171-900, Phone: 55-81-88722222, Fax: 55-
12 81-33206205, e-mail: elvira.pedrosa@dttr.ufrpe.br

13
14 **ABSTRACT**

15 Barbosa, N. M. R., E. M. R. Pedrosa, S. R. V. L. Maranhão. 2013. **Penetration, development**
16 **and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* in sugarcane.** Nematopica 00:00-00

17 The objective of this study was evaluating *Meloidogyne enterolobii* penetration,
18 development and life cycle length on sugarcane variety RB 98710 as well the reaction of the
19 variety to the nematode parasitism. After soil infestation with *M. enterolobii* and *M. javanica*
20 (control), roots were evaluated at 3, 7, 10, 17, 24, 31, 38 and 45 days after inoculation for
21 nematode development. At 45 days, *M. javanica* complete the life cycle in contrast to the low
22 number of vermiform and swollen juveniles and no adult female of *M. enterolobii* found in
23 roots. In another experiment, using different nematode initial population densities, *M.*
24 *enterolobii* did not affect initial sugarcane development at 120 days after inoculation. In
25 contrast to *M. javanica*, *M. enterolobii* reproduction was inhibited presenting reproductive
26 factor always lower than 1.

27 Key words: *Saccharum* spp., life cycle, root-knot nematode, level of inoculum.

28

29

RESUMO

30 Barbosa, N. M. R., E. M. R. Pedrosa, S. R. V. L. Maranhão. 2013. **Penetração,**
31 **desenvolvimento e reprodução de *Meloidogyne enterolobii* em cana-de-açúcar.**

32 Nematropica 00:00-00

33 O objetivo do presente estudo foi avaliar a penetração, desenvolvimento e
34 comprimento do ciclo de *Meloidogyne enterolobii* em cana-de-açúcar variedade RB 98710 e o
35 comportamento dessa variedade em relação ao parasitismo do nematoide. Após a infestação
36 do solo com *M. enterolobii* e *M. javanica* (testemunha), raízes foram avaliadas aos 3, 7, 10,
37 17, 24, 31, 38 e 45 dias após inoculação dos nematoides. Aos 45 dias, *M. javanica* conseguiu
38 completar o ciclo, enquanto o número de formas vermiformes, salsichóides e ovoides de *M.*
39 *enterolobii* foram reduzidos, não sendo encontradas fêmeas imaturas ou com massas de ovos.
40 Em outro experimento, utilizando diferentes densidades de inoculo, *M. enterolobii* não afetou
41 o desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar aos 120 dias após a inoculação. Ao contrário de
42 *M. javanica*, *M. enterolobii* teve a reprodução inibida, apresentando sempre fatores de
43 reprodução menores do que 1.

44 Palavras chave: *Saccharum* spp., ciclo de vida, nematoide das galhas, nível de inoculo.

45

46

INTRODUÇÃO

47 O sistema radicular da planta é o maior componente biótico do solo, proporcionando
48 energia para a fauna presente. Os fitonematoides possuem um importante papel nos processos
49 ecológicos do solo e participam de algumas interações afetando o cultivo da cana-de-açúcar
50 (MONDINO et al., 2010).

51 Os fitonematoides mais importantes para a cultura são os endoparasitos sedentários
52 pertencentes ao gênero *Meloidogyne* Goeldi, representados pelas espécies *M. incognita*

53 (Kofoid e White) Chitwood e *M. javanica* (Treub) Chitwood e o endoparasito migrador
54 *Pratylenchus zae* Graham, devido à severidade das doenças que causam e expressiva
55 disseminação em canaviais de todo mundo (CAIXETA et al., 2011). Em média, as perdas
56 causadas por esses organismos variam entre 20 a 40% no primeiro corte de variedades
57 susceptíveis acarretando a diminuição da longevidade da cana soca (CAMPOS et al., 2006).

58 Estudos realizados em canaviais pernambucanos confirmaram a presença de *M.*
59 *enterolobii* Yang & Eisenback, através dos fenótipos de esterase (MOURA et al., 2009).
60 Inicialmente assinalada em Petrolina (PE), Curaçá e Maniçoba (BA), por Carneiro et al.
61 (2001), em plantações de goiaba, esse nematoide recebeu o nome de *M. mayaguensis*. Após
62 estudos morfológicos, gama de hospedeiros, fenótipos para as enzimas EST e MDH e
63 sequencias de mtDNA, a espécie foi considerada *M. enterolobii*.

64 O ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. se inicia com um ovo depositado pela fêmea, em
65 média 400 ovos são depositados em uma matriz gelatinosa que os protege. O
66 desenvolvimento do ovo inicia-se em poucas horas após a deposição, as células se
67 multiplicam no interior do ovo originando o juvenil de primeiro estágio (J_1), que logo sofre a
68 primeira ecdise e se transforma em juvenil de segundo estágio (J_2) (TIHOHOD, 1993). Após a
69 eclosão, os J_2 vermiformes e móveis, passam a migrar no solo a procura de um hospedeiro.
70 Ao penetrar na planta, se posicionam na periferia do cilindro vascular, estabelecendo assim o
71 parasitismo. Nessa fase, sucessivas secreções esofagianas são secretadas através do estilete
72 formando as células de alimentação, de onde são tirados os nutrientes para o desenvolvimento
73 do nematoide. Nessa fase o juvenil apresenta-se mais robusto, com o corpo salsichóide,
74 perdendo a capacidade de movimentação. O J_2 sofre a segunda ecdise transformando-se em
75 juvenil de terceiro estágio (J_3). Logo em seguida, acontece a terceira ecdise dando origem ao
76 juvenil de quarto estágio (J_4). Os J_3 e J_4 possuem o esôfago parcialmente degenerados e não se
77 alimentam. A quarta ecdise acontece formando-se os adultos com estilete e esôfago

78 regenerados, as fêmeas adultas são globosas com coloração branco-leitosa (AMORIM et al.,
79 2011).

80 Quando parasitam as raízes da cana-de-açúcar, *Meloidogyne* spp. modificam a
81 fisiologia dos tecidos. Em solos arenosos, os fitonematóides aliados a deficiências
82 nutricionais e podridão de raízes podem destruir canaviais antes do primeiro corte. Os
83 sintomas causados por esses microrganismos podem se confundidos com deficiências
84 minerais, baixa fertilidade do solo, podridão de raízes, e estresse hídrico. Na parte aérea da
85 planta pode ser observado desenvolvimento irregular, amarelecimento, murcha, enfezamento
86 de plantas, geralmente distribuídos em reboleiras, já nas raízes os sintomas apresentados são
87 galhas com intumescimento das extremidades (KIMAT et al., 2005).

88 O objetivo do presente estudo foi avaliar a penetração, desenvolvimento e
89 comprimento do ciclo de *Meloidogyne enterolobii* em cana-de-açúcar variedade RB 98710 e o
90 comportamento dessa variedade em relação ao parasitismo do nematoide.

91 MATERIAL E MÉTODOS

92 A população de *M. enterolobii* foi proveniente de goiabeiras, da EMBRAPA
93 Semiárido em Petrolina. Uma população de *M. javanica*, obtida de áreas cultivada com cana-
94 de-açúcar em Pernambuco, foi usada como testemunha. As populações dos nematoides foram
95 mantidas em casa de vegetação, parasitando tomateiros (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Santa
96 Cruz Kada. A confirmação das espécies foi efetuada através da eletroforese de isoenzimas
97 com revelação esterase, utilizando-se a metodologia de Alfenas (1998). A extração de ovos
98 seguiu a técnica descrita por Hussey & Barker (1973). Foram efetuados dois experimentos.

99 No primeiro experimento, as plantas de cana-de-açúcar foram obtidas a partir de
100 mudas de meristema cedidas pelo Centro Tecnológico do Nordeste (CETENE) mantidas em
101 tubetes com 90 dias de idade (aclimatadas). O genótipo estudado foi o da sigla RB 98710.
102 Foram inoculadas 90 mudas com 20 mil ovos cada, sendo 45 mudas inoculadas com *M.*
103 *enterolobii* e 45 mudas com *M. javanica*. A infestação foi feita em quatro orifícios

104 equidistantes, ao redor da planta de cana-de-açúcar, onde foi depositada a suspensão na
105 concentração estabelecida. Após a infestação do solo, foram realizadas oito coletas, aos 3, 7,
106 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias após inoculação. Para cada época de coleta, foram retiradas ao
107 acaso, quatro plantas para cada espécie do nematoide, as quais tiveram as partes aéreas
108 descartadas e os sistemas radiculares lavados cuidadosamente.

109 As raízes inoculadas foram submetidas à coloração com fucsina ácida e dissecadas sob
110 microscópio estereoscópico para a localização dos diferentes estádios de desenvolvimento de
111 *M. enterolobii* e *M. javanica* nas raízes. Foram considerados cinco estádios de
112 desenvolvimento: vermiforme, salsichóide, ovóide, fêmea jovem sem ovos e fêmea com
113 massas de ovos. Quando necessário, foram feitas preparações microscópicas em meio de
114 glicerina em lâminas de vidro para a observação ao microscópio ótico e classificação dos
115 estádios de desenvolvimento dos nematoides, segundo Triantaphyllou e Hirschmann (1960) e
116 Siddiqi e Taylor (1970).

117 No segundo experimento, rebolos de cana-de-açúcar da variedade RB 98710, cedidos
118 pela Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina (EECAC), foram plantados em
119 copos com capacidade de 500 ml e após um mês de brotação foram transplantados para sacos
120 plásticos com solo, esterilizado em autoclavave, com capacidade para cinco quilos. Após a
121 extração dos ovos, ajustou-se a concentração do inóculo, através de contagem em lâmina de
122 Petter. Foram usados quatro níveis de inóculo: 0, 20.000, 50.000 e 100.000 de *M. enterolobii*
123 por planta. Para *M. javanica* (usado como testemunha) aplicou-se 20.000 ovos por planta. O
124 delineamento adotado foi inteiramente casualizado com seis repetições. O experimento foi
125 conduzido em casa de vegetação com temperatura média de 28,3°C e umidade relativa do ar
126 de 69,1%. Após 120 dias da inoculação, foram avaliadas variáveis relativas ao
127 desenvolvimento das plantas: altura, número e diâmetro do colmo, número de perfilhos;
128 biomassa da parte aérea e da raiz, além das variáveis relativas ao nematoide: número e índice

129 de galhas, segundo a escala proposta por Taylor & Sasser (1978), número de ovos por planta
130 e o fator de reprodução ($FR=Pi/Pf$).

131 Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e as médias separadas pelo
132 teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Os dados relativos ao número de ovos foram
133 transformados em $\log_{10}(x+1)$, e os relativos ao número de perfilhos para $\sqrt{(x+0,5)}$. Modelos
134 lineares, quadráticos, logarítmicos e cúbicos foram usados na tentativa de descrever o
135 desenvolvimento da variedade de cana em função da densidade do nematoide.

136 RESULTADOS E DISCUSSÃO

137 No primeiro experimento o desenvolvimento de *M. enterolobii* diferiu de *M. javanica*
138 pela análise do Qui-quadrado ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 1). Não foram
139 observados nematoides no interior do sistema radicular das plantas avaliadas quatro dias após
140 a inoculação. No entanto, sete dias após a inoculação, foram encontrados nas raízes das
141 plantas J₂ vermiformes de *M. javanica* e *M. enterolobii*. Esse resultado corrobora com Moritz
142 et al. (2008) que não encontraram diferença significativa entre o número de J₂ de *M.*
143 *paranaensis* que penetrou nas raízes das cultivares resistentes e suscetíveis de soja após oito
144 dias da inoculação.

145 Dez dias após a inoculação, foi observado *M. javanica* e *M. enterolobii* na forma
146 salsichóide, caracterizando o estabelecimento parasitário do patógeno com o hospedeiro,
147 nesse mesmo período foi detectado maior ($P\leq 0,05$) número de vermiformes de *M. javanica* no
148 interior das raízes (Tabela 1).

149 Dezesete dias após a inoculação, estádios vermiforme, salsichóide e ovoide foram
150 encontrados nas raízes com *M. javanica*, mas apenas estádios vermiforme e salsichóide para
151 *M. enterolobii* (Tabela 1). Em tomateiros ‘Helper M’ aos 17 dias após a inoculação embora
152 fossem encontrados J₂ de *M. javanica* e *M. enterolobii* nas raízes, o número de J₂ de *M.*
153 *javanica* foi significativamente maior, contudo, em tomateiro ‘Magnet’, não houve diferença

154 na penetração entre as duas espécies do nematoide (WESTERICH; ROSA; WILCKEN,
155 2011).

156 O número de vermiformes e salsichóides para *M. javanica* 24 dias após inoculação foi
157 reduzido embora fossem observadas fêmeas imaturas. Para *M. enterolobii* foi observada a
158 maior média para vermiformes com redução para o número de salsichóide e ovoide (Tabela
159 1). Carneiro et al. (2005) obtiveram resultados similares ao trabalhar com genótipos de
160 algodão suscetível (IAC 98/708) e resistente (IAC 96/414) avaliando o número de fêmeas de
161 *M. incognita* no interior das raízes coradas.

162 Trinta e um dias após a inoculação das plantas, formas de *M. javanica* salsichóides,
163 ovóides, fêmeas imaturas e com massas de ovos foram observadas no interior das raízes, para
164 *M. entrolobii* foram observadas formas vermiformes, salsichóides e ovoides, com ligeiro
165 aumento das últimas. Resultado semelhante foi observado 38 dias após a inoculação de *M.*
166 *javanica* e *M. enterolobii*. Moura et al. 1993 avaliando a suscetibilidade e resistência de
167 genótipos de soja verificou que após penetrarem as raízes dos genótipos resistentes os J₂
168 sofrem diferentes processos na planta: podem retornar ao solo, morrendo logo em seguida,
169 podem iniciar o desenvolvimento, verificando-se aumento do volume do corpo, porém com
170 prejuízo do seu desenvolvimento, e sem conclusão do ciclo de vida; ou podem morrer logo
171 após a penetração, devido a reações necróticas de hipersensibilidade.

172 Quarenta e cinco dias após a inoculação, o número de formas de *M. javanica* estava
173 mais elevado principalmente em relação às fêmeas com massas de ovos e formas
174 vermiformes, eclodidas possivelmente dos ovos produzidos (Figura 1). Para *M. enterolobii*, o
175 número de formas vermiforme, salsichóide e ovoide foram reduzidos, não sendo encontradas
176 fêmeas (imaturas ou com massas de ovos), provavelmente devido à morte prematura de
177 alguns juvenis, que não conseguem completar o ciclo, associado a menor velocidade de
178 desenvolvimento, alongando a duração do ciclo. Os mecanismos de resistência das plantas a
179 *Meloidogyne* geralmente estão associados a fatores presentes nas plantas que alteram ou

180 inibem a formação das células gigantes, privando o nematoide de alimentação, inibindo o
181 desenvolvimento e a reprodução do nematoide (Dropkin, Nelson, 1960).

182 No segundo experimento *M. enterolobii* não afetou significativamente ($P \leq 0,05$) o
183 diâmetro e o número de colmos, o número de perfilho e a biomassa fresca da parte aérea aos
184 120 dias após a inoculação (Tabela 2). Silva et al. (2012) também relataram que *M.*
185 *enterolobii* não afetou significativamente ($P=0,05$) o desenvolvimento inicial da cana-de-
186 açúcar aos 90 dias após a inoculação, independentemente do nível de inoculo avaliado.

187 Em relação altura da planta, houve diferença estatística entre *M. enterolobii* (20.000
188 ovos) e Testemunha (T), não diferindo os demais tratamentos. (Tabela 2).

189 Quanto ao peso fresco da raiz (PFR), houve diferença estatística entre *M. javanica*
190 (20.000 ovos), *M. enterolobii* (20.000 ovos) e Testemunha (T), não diferindo dos demais
191 tratamentos (Tabela 2). Guimarães et al. 2003 em experimento com feijão caupi observaram
192 que *M. enterolobii* (6.000 ovos) afetou o peso das raízes das plantas, provavelmente, pela
193 grande quantidade de penetrações e galhas induzidas pelo nematoide.

194 *M. enterolobii* induziu significativamente ($P \leq 0,05$) menor quantidade de galhas e,
195 conseqüentemente, índices de galhas mais baixos do que *M. javanica*. Independente do nível
196 de inoculo de *M. enterolobii* as plantas exibiram reação de resistência por apresentarem
197 valores menores do que 3. Ao contrário, as plantas inoculadas com *M. javanica* apresentaram
198 índices de galhas igual a 5, caracterizando reação de susceptibilidade (Taylor & Sasser, 1978).
199 Esses resultados estão também em consonância com a baixa reprodução de *M. enterolobii*,
200 que independente do nível de inóculo apresentou sempre fatores de reprodução menores do
201 quem 1, em contraste com a alta reprodução de *M. javanica* (Tabela 2). Silva et al. (2012)
202 observaram que a exceção da RB 92579, que apresentou reação de imunidade (FR=0), o
203 número de ovos de *M. enterolobii* por planta aumentou com o aumento da densidade de
204 inoculo nas demais variedades estudadas (RB863129, RB 867515 e SP81-3250), contudo os
205 fatores de reprodução foram sempre menores do que 1.

206 Em trabalhos realizados com genótipos de café (*Coffea arabica* L.) resistentes e
207 suscetíveis a *M. paranaensis* Carneiro, Sera et al. (2007) constataram que em níveis de
208 inóculo elevados, todos os genótipos comportam-se com suscetível e, com níveis de inóculo
209 baixos, como resistente, recomendando realização de vários testes para obtenção de um
210 padrão de resistência e suscetibilidade em relação a nível de inoculo.

211 Para *M. enterolobii*, 120 dias não foram suficientes para que os eventos do ciclo de
212 vida, desde o estímulo à eclosão até a produção de ovos, fossem completados para a maior
213 parte dos nematoides, embora tenha sido suficiente *M. javanica*.

214 AGRADecIMENTOS

215 A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior (CAPES) pela
216 concessão da bolsa de estudo.

217 LITERATURA CITADA

218 Alfenas, A. C. Eletroforeses de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em
219 plantas e microrganismos. Editora Viçosa. 1998.

220 Amorim, L., Rezende, J. A. M., Bergamin Filho, A. Manual de Fitopatologia : Princípios e
221 conceitos. Editora Ceres, 2011.

222 Caixeta, L. B., Pedrosa, E. M. R., Guimarães, L. M. P., Barros, P. A., Rolim, M. M. 2011.
223 Variações no solo e nematofauna após o corte da cana-de-açúcar e aplicação de vinhaça.
224 Nematropica. 41(2):271-280.

225 Carneiro, R. M. D. G.; Moreira, W. A.; Almeida, M. R. A. 2001. Primeiro registro de
226 *Meloidogyne mayaguensis* no Brasil. Nematologia Brasileira. 25(2):223-228.

227 Carneiro, R. M. D. G., Neves, D. I., Falcão, R., Paes, N. S., Cia, E., Grosii de Sá, M. F. 2005.
228 Resistência de genótipos de algodoeiro a *Meloidogyne incognita* raça 3: reprodução e
229 histopatologia. Nematologia Brasileira. 29(1):1-10.

230 Campos, A. P., Vale, D. W., Araújo, E. S., Corradi, M. M., Yamauti, M. S., Fernandes, O. A.,
231 Freitas. S. Manejo integrado de pragas. FUNEP, 2006.

- 232 Dropkin, V.H., Nelson, P.E. 1960. The histopathology of root-knot nematode infections in
233 soybeans. *Phytopathology*, 50: 442-447.
- 234 Guimarães, L. M. P., Moura, R. M., Pedrosa, E. M. R. 2003. Parasitismo de *Meloidogyne*
235 *mayaguensis* em diferentes espécies botânicas. *Nematologia Brasileira*. 27(2):139-145.
- 236 Hussey, R. S., Barker, H. R. A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp.
237 including a new technique. *Plant disease Reporter*. 57:1025-1028.
- 238 Kimat, H., Amorim, L., Rezende, J. A. M., Bergamin Filho; A., Camargo, L. E. A. Manual de
239 Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. Editora Ceres, 2005.
- 240 Mondino, E. A., Tavares, O. C. H., Lima, E., Berbara, R. L. L. 2010. Comunidades de
241 nematodos en caña de azúcar bajo diferentes sistemas de labranza y cosecha.
242 *Nematropica*. 40(2):203-215.
- 243 Moritz, M. P., Carneiro, R. G., Santiago, D. C., Nakamura, K. C., Pignoni, E., Gomes, J. C.
244 2008. Estudo da penetração e reprodução de *Meloidogyne paranaensis* em raízes de
245 cultivares de soja resistente e suscetível. *Nematologia Brasileira*. 32(1):33-40.
- 246 Moura, R.M., Almeida, R.M.A., Costa, M., Lima, S.T.S., Carneiro, R.M.D.G. 2009.
247 *Meloidogyne* species detected in sugarcane fields in the State of Pernambuco, Brazil.
248 *Nematologia Brasileira*. 33(4):329.
- 249 Moura, R.M., Davis, E.L., Luzzi, B.M., Boerma, H.R., Hussey, R.S. 1993. Post-infectious
250 development of *Meloidogyne incognita* on susceptible and resistant soybean genotypes.
251 *Nematropica*. 23(1):7-13.
- 252 Sera, G. H.; Sera, T.; Mata, J. S.; Ito, D. S.; Fonseca, I. C. B.; Alegre, C. R.; Azevedo, J. A.;
253 Ribeiro-Filho, C. Reação da cultivar de café Tupi IAC 1669-33 em diferentes níveis de
254 inóculo do nematóide *Meloidogyne paranaensis*. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do
255 Brasil, 5., 2007, Águas de Lindóia. Resumo... Águas de Lindóia: SPCB, 2007. v. único,
256 CD Rom.

- 257 Siddiqui, I.A.; Taylor, D.P. 1970. Histopathogenesis of galls induced by *Meloidogyne naasi*
258 in wheat roots. *Journal of Nematology*. 2(3):239-247.
- 259 Silva, A. P., Pedrosa E. M. R., Chaves, A., Maranhão, S. R. V. L., Guimarães, L. M. P.,
260 Rolim, M, M. 2012. Reação de variedade de cana-de-açúcar ao parasitismo de
261 *Meloidogyne incognita* e *M. enterolobii*. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*.
262 7(5):814-819.
- 263 Taylor, A.L., Sasser, J.N. Biology, identification and control of root-knot nematodes
264 (*Meloidogyne* species). North Carolina State University Graphics. 1978.
- 265 Tihohod, D. *Nematologia Agrícola Aplicada*. FUNEP, 1993
- 266 Triantaphyllou, A.C.; Hirschmann, H. 1960. Post infection development of *Meloidogyne*
267 *incognita* Chitwood 1949 (Nematoda: Heteroderidae). *Annales de L'Institut*
268 *Phytopathologique Benaki, New Series*. 3:1-11.
- 269 Westerich, J. N.; Rosa, J. M. O.; Wilcken, S. R. S. 2011. Estudo comparativo da biologia de
270 *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*) e *Meloidogyne javanica* em tomateiros com
271 gene *Mi*. *Summa Phytopathology*. 37(1):35- 41.

272 Tabela 1. Distribuição dos estádios de desenvolvimento de *Meloidogyne enterolobii* (Me) e *M. javanica* (Mj) em cana-de-açúcar variedade
 273 RB 96710 aos 4, 7, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias após a inoculação.

	Dias após a inoculação															
	4		7		10		17		24		31		38		45	
	Mj	Me	Mj	Me	Mj	Me	Mj	Me	Mj	Me	Mj	Me	Mj	Me	Mj	Me
Vermiforme	0	0	34	20	32	5	10	6	4	22	15	5	3	7	12	3
Salsichóide	0	0	0	0	24	17	32	16	16	9	13	7	4	9	6	8
Ovóide	0	0	0	0	0	0	12	0	12	6	23	11	10	14	5	9
Fêmea	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	25	0	33	0	6	0
Fêmea com ovos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	13	0	26	0

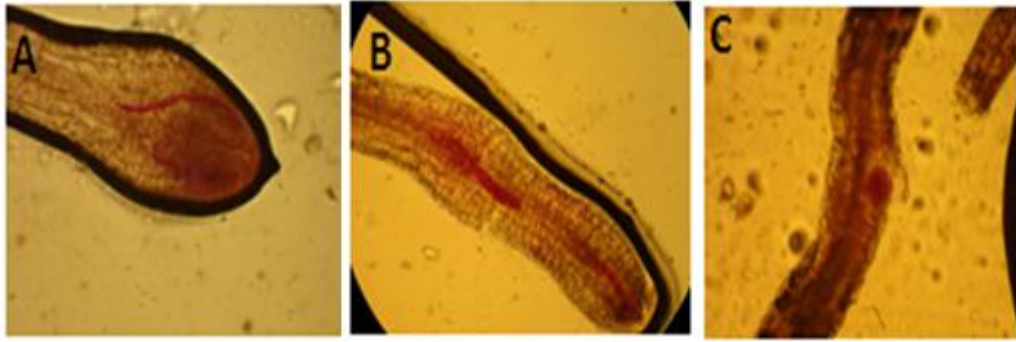
274 O desenvolvimento de *Meloidogyne enterolobii* diferiu do de *M. javanica* aos 4, 7, 10, 17, 24, 31, 38, e 45 dias após a inoculação da cana-de-
 275 açúcar variedade RB 96710 pela análise do Qui-quadrado ao nível de 5% de probabilidade.

276

277 Tabela 2. Efeito de diferentes níveis de inóculo de *Meloidogyne enterolobii* (Me) sobre a altura, diâmetro do colmo (DC), número de colmos
 278 (NC), número de perfilho (NP), biomassa fresca da parte aérea (BFPA), biomassa fresco da raiz (BFR), número de galhas (NG), índice de galhas
 279 (IG), número de ovos (NO) por planta e fator de reprodução (FR), 120 dias após a inoculação da cana-de-açúcar variedade RB 96710.

Nematóide/Pi	Altura	DC	NC	NP	BFPA	BFR	NG	IG	NO	FR
Mj/ 20.000	2,35 ab	1,75 a	5,83 a	1,08 a	243,81 a	114,93 a	100,00 a	5,00 a	4,75 a	2,92
Me/ 20.000	2,52 a	1,75 a	6,16 a	1,19 a	261,84 a	137,05 a	7,5 b	2,16 b	2,97 b	0,05
Me/ 50.000	2,48 ab	1,68 a	6,33 a	0,79 a	269,02 a	120,32 ab	8,5 b	2,33 b	3,08 b	0,06
Me/ 100.000	2,30 ab	1,76 a	6,50 a	1,02 a	267,26 a	113,99 ab	11,00 b	2,50 b	3,08 b	0,06
T (não inoculada)	2,27 b	1,76 a	6,16 a	1,21 a	234,61 a	109,06 b	0,00 c	0,00 c	0,00 c	0,00
CV (%)	5,74	5,19	9,85	43,52	13,98	13,50	9,73	15,95	7,00	

280 Para análise estatística, os dados relativos ao número de perfilhos foram transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$ e os dados relativos ao número de ovos
 281 foram transformados para $\log_{10}(x+1)$, sendo apresentado a média dos dados transformados. Na mesma coluna, médias seguidas pelas mesmas
 282 letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



283

284 Figura 1. Estádios de desenvolvimento de *M. enterolobii* em cana-de-açúcar variedade RB

285 96710, em A: Vermiforme; B: Salsichóide; C: Ovóide.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- *M. incognita* predomina nas áreas de cana-de-açúcar analisadas nos estados de Pernambuco e Paraíba, ocorrendo também a presença de *M. javanica* em Pernambuco porém em menor frequência;
- Os fenótipos de esterase I1 e I2 para *M. incognita* e J3 para *M. javanica* ocorreram nas amostras analisadas;
- As variedades RB 867515 e RB 98710 mostraram-se más hospedeiras para *M. enterolobii*;
- O desenvolvimento de juvenis de *M. enterolobii* é retardado ou inibido na variedade RB98710.