

TEREZA CRISTINA DE ASSIS

**FITONEMATÓIDES ASSOCIADOS A ZINGIBERALES
ORNAMENTAIS EM PERNAMBUCO: ESTIMATIVA DO NÚMERO
DE AMOSTRAS PARA MONITORAMENTO, EFEITO DE
INDUTORES DE RESISTÊNCIA E AVALIAÇÃO DE
MECANISMOS ENVOLVIDOS**

RECIFE

Fevereiro de 2006

TEREZA CRISTINA DE ASSIS

**FITONEMATÓIDES ASSOCIADOS A ZINGIBERALES
ORNAMENTAIS EM PERNAMBUCO: ESTIMATIVA DO NÚMERO
DE AMOSTRAS PARA MONITORAMENTO, EFEITO DE
INDUTORES DE RESISTÊNCIA E AVALIAÇÃO DE
MECANISMOS ENVOLVIDOS**

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO

Prof.^a Dra. Elvira Maria Régis Pedrosa – Orientadora

Prof. Dr. Rildo Sartori Barbosa Coelho – Co-Orientador

Prof. Dr. Egídio Bezerra Neto – Co-Orientador

RECIFE

Fevereiro de 2006

**FITONEMATÓIDES ASSOCIADOS A ZINGIBERALES
ORNAMENTAIS EM PERNAMBUCO: ESTIMATIVA DO NÚMERO
DE AMOSTRAS PARA MONITORAMENTO, EFEITO DE
INDUTORES DE RESISTÊNCIA E AVALIAÇÃO DE
MECANISMOS ENVOLVIDOS**

TEREZA CRISTINA DE ASSIS

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 23 de fevereiro de 2006.

ORIENTADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Elvira Maria Régis Pedrosa

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Egídio Bezerra Neto (UFRPE)

Prof^ª. Dra. Sônia Maria Alves de Oliveira (UFRPE)

Prof^ª. Dra. Elineide Barbosa da Silveira (UFRPE)

Dra. Sayonara Maria de Assis Silvestre (MAPA)

Dra. Andréa Baltar Barros (CETENE - UFPE)

RECIFE-PE

Fevereiro de 2006

A Deus, aos meus pais José Inácio e Maria José e aos meus sogros Sílvio (in memoriam) e Enilda, imprescindíveis nas horas mais difíceis,

AGRADEÇO.

A Domingos, meu querido esposo, por seu amor e dedicação, pelo incentivo e confiança depositados em mim,

OFEREÇO.

Ao nosso amado filho Vítor Arthur, que ilumina as nossas vidas e nos dá forças para continuarmos lutando,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pelo apoio institucional e à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo; e ao programa PROMATA pelo apoio financeiro;

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Elvira Maria Régis Pedrosa, pela orientação, apoio, compreensão, confiança e amizade, que tornou possível a realização desta pesquisa;

Aos professores Rildo Sartori Barbosa Coelho e Egídio Bezerra Neto pela orientação e apoio nas atividades desenvolvidas no projeto e aos professores Maria Menezes, Rosa Mariano, Sônia Oliveira, Romero Moura e Delson Laranjeira, pela amizade e ensinamentos em muitos momentos;

A Sra. Carol Paranhos, proprietária da Fazenda Rio Branco, por permitir o desenvolvimento de parte deste trabalho em sua propriedade;

À Coordenação do curso de Pós-Graduação em Fitossanidade, pelo apoio dispensado; aos demais funcionários e professores do curso, pelos ensinamentos ministrados;

Aos colegas de turma do Doutorado em Fitopatologia, Andréa Baltar e Angélica Barbosa, pela amizade e boa convivência;

Aos bolsistas e estagiários do Laboratório de Fitonematologia, Jeane, Virgínia, Roberto, Thiciano, Adriano e Daniela, os quais contribuíram para a realização deste trabalho, pela amizade e apoio nas horas difíceis;

Aos amigos Lílian, Sandra, Regina, Andréa Chaves, Andréa Baltar, Angélica, Neílza, Adelmo, Roberto “Bob”, Darci, Ilka, pelos momentos de descontração e amizade;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

	Folha
AGRADECIMENTOS.....	v
SUMÁRIO.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	x
CAPÍTULO I – Introdução Geral	1
Referências Bibliográficas.....	15
CAPÍTULO II – Fitonematóides associados à Zingiberales tropicais no estado de Pernambuco e estimativa do número de amostras para monitoramento.....	22
Resumo.....	23
Abstract.....	25
Material e Métodos.....	27
Resultados e Discussão.....	29
Referências Bibliográficas.....	34
CAPÍTULO III – Efeito de indutores de resistência sobre a nematofauna associada à rizosfera e a atividade de β -1,3-glucanase e peroxidase em bastão do imperador.....	43
Resumo.....	44
Summary.....	45
Introdução.....	46
Material e Métodos.....	48
Resultados e Discussão.....	51
Literatura Citada.....	57
CAPÍTULO IV – Desenvolvimento de <i>Meloidogyne incognita</i> e alterações enzimáticas em plantas de <i>Alpinia purpurata</i>	67
Resumo.....	68
Summary.....	69
Introdução.....	70
Material e Métodos.....	71
Resultados e Discussão.....	74
Literatura Citada.....	77
CONCLUSÕES GERAIS.....	82

RESUMO

O aumento expressivo na área plantada com ornamentais tropicais em Pernambuco reflete o crescente interesse pela floricultura no Estado. Este estudo teve por objetivos: 1) realizar levantamento de fitonematóides em áreas produtoras de Zingiberales em Pernambuco, 2) estimar o número de amostras recomendado para monitoramento, 3) avaliar os efeitos de indutores abióticos de resistência sobre a nematofauna associada à rizosfera, 4) avaliar a atividade de enzimas em plantas de bastão do imperador (*Etilingera elatior*), 5) analisar a produção de enzimas em plantas de alpínia (*Alpinia purpurata*) sob parasitismo de *Meloidogyne incognita*. No período de 2002 a 2004, foram visitadas 10 áreas produtoras de Zingiberales ornamentais (*Etilingera elatior*, *Zingiber spectabilis*, *Alpinia purpurata*, *Musa coccinea*, *Tapeinochilos ananassae* e *Heliconia* spp.), no estado de Pernambuco. Em cada propriedade, foram coletadas raízes de plantas parasitadas por fitonematóides e solo da rizosfera. Após processamento das amostras, foram determinadas as densidades populacionais dos gêneros de nematóides presentes e estimado o número recomendado de amostras para monitoramento, considerando diferentes níveis de erro aceitável. O estudo com indutores foi desenvolvido em plantio comercial, com plantas cultivadas por um e dois anos, no período de setembro a dezembro de 2005. Acibenzolar-S-metil (ASM), silicato de potássio e torta de nim foram utilizados como indutores. Foram analisadas a densidade populacional de nematóides parasitos e de vida livre, curva de densidade populacional dos nematóides, área abaixo da curva da densidade populacional (AACDP), fator de reprodução (FR), diâmetro do pecíolo e atividade das enzimas β -1,3-glucanase e peroxidase. No estudo de enzimas em plantas de alpínia, sob parasitismo de *M. incognita* foram determinadas as atividades da esterase, fosfatase ácida e peroxidase. No levantamento, constatou-se ocorrência freqüente dos gêneros: *Pratylenhus*, *Rotylenchulus*,

Meloidogyne, *Helicotylenchus* e *Criconemella*. Sintomas da meloidoginose foram constatados em 100 % das áreas de plantio, com os níveis populacionais médios de *Meloidogyne* spp. elevados, alcançando 375 espécimes/300 cm³ de solo e 6090 espécimes/20 g de raízes, considerando diferentes hospedeiros e áreas. Entre as espécies de *Meloidogyne* foram detectadas *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica*. As estimativas do número de amostras indicaram que pelo menos 11, 20, 10, 18 e 10 amostras por área são recomendadas para monitoramento dos gêneros *Pratylenchus*, *Rotylenchulus*, *Meloidogyne*, *Helicotylenchus* e *Criconemella*, respectivamente, considerando um nível de erro de 20 %. As associações *M. arenaria* com *E. elatior*, *Rotylenchulus* sp. com *A. purpurata*, *Heliconia* spp. e *M. coccinia*, e *Criconemella* sp. com *A. purpurata* constituíram os primeiros relatos da ocorrência em Pernambuco. ASM reduziu a densidade populacional, AACDP e FR de *M. incognita*, apresentando resultados semelhantes aos obtidos pelo nematicida, destacando-se dos demais tratamentos, sem no entanto influenciar negativamente as populações de outros nematóides presentes no solo. Não foram verificados sintomas de fitotoxidez em nenhum dos tratamentos realizados. A ação do ASM mostrou-se mais relacionada com a produção de peroxidases do que com a atividade de β -1,3-glucanases em plantas de bastão do imperador. A produção de enzimas foi maior em *A. purpurata* parasitada do que na testemunha. A maior atividade foi verificada pela enzima fosfatase ácida, enquanto esterase e peroxidase expressaram fraca atividade em plantas parasitadas.

Palavras-chave: *Heliconia* spp., *Etilingera elatior*, *Alpinia purpurata*, *Zingiber spectabilis*, *Musa coccinea*, *Tapeinoquilos ananassae*, *Meloidogyne incognita*, acibenzolar-S-metil, silicato de potássio, torta de nim, peroxidase, β -1,3-glucanase, fosfatase, esterase.

ABSTRACT

The expressive increase in production of tropical flowers in Pernambuco indicates the State rising interest in ornamentals. This study had the objectives of: 1) screening plant parasitic nematodes in Zingiberales (*Etilingera elatior*, *Zingiber spectabilis*, *Alpinia purpurata*, *Musa coccinea*, *Tapeinoquilos ananassae* e *Heliconia* spp.) producing areas of Pernambuco, 2) predicting number of samples for nematodes monitoring at different acceptable error levels, 3) studying the effect of resistance abiotic inductors on nematode community associated with plant roots and soil, 4) evaluating enzymes activity in *E. elatior*, and 5) evaluating enzymes production in *A. purpurata* infected with *Meloidogyne incognita*. Samples (soil and roots of nematode parasited plants) were collected in producing areas from 2002 to 2004. Populational density of plant parasitic nematodes were evaluated and used to predict number of samples for monitoring. The study of induction resistance was carried out in one and two years old plants of a commercial area, from September to December in 2005. Acibenzolar-S-methyl (ASM), potassium silicate and neem cake were used as inductors, being analyzed free living and plant parasitic nematodes population density, area under nematode population density curve (AUNPDC), reproduction factor (RF), diameter of plant stem, β -1,3-glucanase and peroxidase activity. Enzymatic activity of esterase, phosphatase and peroxydase was evaluated in *A. purpurata* infected with *M. incognita*. *Pratylenhus* sp., *Rotylenchulus* sp., *Meloidogyne* spp., *Helicotylenchus* sp. and *Criconemella* sp. were frequents in most of samples. Symptoms of root-knot nematodes were verified in 100 % of the growing areas, being levels of *Meloidogyne* spp. considered high, up to 375 nematodes per 300 cm³ soil and 6090 nematodes per 20 g of roots, considering different areas and hosts. Among *Meloidogyne* species, *M. incognita*, *M. arenaria* and *M. javanica* were detected. Data analysis indicated

that at least 11, 20, 10, 18 and 10 samples per area are recommended for monitoring the genus *Pratylenchus*, *Rotylenchulus*, *Meloidogyne*, *Helicotylenchus* and *Criconemella*, respectively, at 20 % error. The associations *M. arenaria* with *E. elatior*, *Rotylenchulus* sp. with *A. purpurata*, *Heliconia* spp. and *M. coccinia*, and *Criconemella* sp. with *A. purpurata* consisted of the first occurrence report in Pernambuco, Brazil. ASM was the best resistance inductor, reducing *M. incognita* population density, AUNPDC and FR with results similar to the nematicide control, but with no influence on free living nematodes in soil. Fitotoxic symptoms were not verified in any treatment. The action of ASM seems to be more related with peroxidases production than the β -1,3-glucanases activity in the plant. Among all of the inductors evaluated, ASM was the most effective inducing resistance against *M. incognita* in *E. elatior*. Enzymatic production was higher in *A. purpurata* parasited than in the controls. The acid phosphatase activity was high in contrast with the low esterase and peroxydase activity expressed in parasited plants.

Keywords: *Heliconia* spp., *Etilingera elatior*, *Alpinia purpurata*, *Zingiber spectabilis*, *Musa coccinea*, *Tapeinoquilos ananassae*, *Meloidogyne incognita*, acibenzolar-S-methyl, potassium silicate, neem cake, peroxydase, β -1,3-glucanase, esterase, phosphatase.

INTRODUÇÃO GERAL

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

Importância econômica das flores ornamentais tropicais

As plantas ornamentais tropicais incluem espécies das famílias Strelitziaceae, Heliconiaceae, Musaceae, Zingiberaceae, pertencentes a ordem Zingiberales, as quais vegetam naturalmente ou são exploradas em plantios convencionais na faixa tropical úmida da América, Ásia e Pacífico, sendo fonte de divisas importantes para alguns países destas regiões (CASTRO; GRAZIANO, 1997).

Em países de clima subtropical e temperado a exemplo de Holanda, Alemanha, Dinamarca e Itália, a exploração da floricultura tropical só é possível sob condições controladas, onerando o produto que se destina unicamente ao mercado de plantas de vaso (BERRY; KRESS, 1991). O Brasil possui grande amplitude de climas e solos, o que torna possível a diversificação da floricultura (NANNETTI, 1994). Isto o coloca entre os países que possuem maior contingente de espécies nativas de plantas ornamentais, distribuídas na maioria dos Estados (CRISCUOLO, 1978).

A floricultura no Brasil é uma atividade consolidada e os estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Goiás, Pernambuco, Ceará, Alagoas, Bahia e Amazonas destacam-se como maiores produtores (CASTRO, 1998). A produção de flores tem grande potencial no agronegócio brasileiro, embora não existam dados estatísticos a respeito do volume produzido nacionalmente, em virtude das inúmeras variedades e diferentes modos de apresentação ao mercado (AKI, 1999).

Em Pernambuco, a produção de flores gerou 1.500 empregos diretos e indiretos, permitindo uma movimentação financeira em torno de R\$ 30 milhões no ano 2000 e totalizando 200 produtores (CEAGEPE, 2001). As áreas produtoras de flores tradicionais concentram-se no Agreste do Estado, nos municípios de Garanhuns, Gravatá, Bonito e Barra de Guabiraba, com expansão para Bezerros, Camocim do São Félix, Caruaru e Chã Grande.

O agronegócio de flores tropicais no Nordeste, em condições de irrigação, tem um retorno 30

vezes maior que o do milho (*Zea mays* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e três vezes maior que fruteiras como videira (*Vitis vinifera* L.) e mangueira (*Mangifera indica* L.). Em termos de importância econômico-social, apesar de uma maior concentração de mão de obra ser requerida apenas na implantação da cultura e capinas, essa atividade emprega em média uma a duas pessoas por 1,65 ha (CHAGAS, 2000).

De acordo com Chagas (2000), em Pernambuco as ornamentais tropicais ocupavam, até o ano de 1999, 12 municípios onde estavam distribuídos 31 produtores. Considerando-se o total de 5 ha em 1994 e 51,2 ha em 1999, houve um significativo aumento de 900% em área plantada, nesse período. As flores tropicais vem sendo cultivadas nos municípios de Camaragibe, Paulista, Ipojuca, Igarassu, Recife, Escada, Moreno, Cabo de Santo Agostinho, Ribeirão, Água Preta, Sairé, Vitória de Santo Antão e Petrolina, com destaque para os quatro primeiros, localizados na zona da Mata do Estado.

Em Pernambuco, a floricultura tropical acontece em habitat natural. Por esta razão, a floricultura é uma atividade econômica que anualmente vem aumentando a participação na renda agrícola do Estado, e tornando-se, na agricultura regional, um negócio bem sucedido (WARUMBY; COELHO; LINS, 2004).

Descrição geral e uso de Zingiberales

Entre as flores tropicais encontram-se as Zingiberales que incluem oito famílias (Zingiberaceae, Costaceae, Marantaceae, Canaceae, Lowiaceae, Musaceae, Heliconiaceae e Streliziacae) com 89 gêneros e, aproximadamente, 1.800 espécies. As plantas desta ordem são facilmente reconhecidas por apresentarem folhas grandes com lâmina possuindo venação transversa, pecíolo longo, inflorescências grandes, com brácteas frequentemente coloridas (Figura 1). São herbáceas rizomatozas, perenes, pequenas a arborescente, inflorescência terminal ou lateral, freqüentemente com brácteas grandes, côncavas a

espatiformes com cores variadas (CASTRO, 1995a).

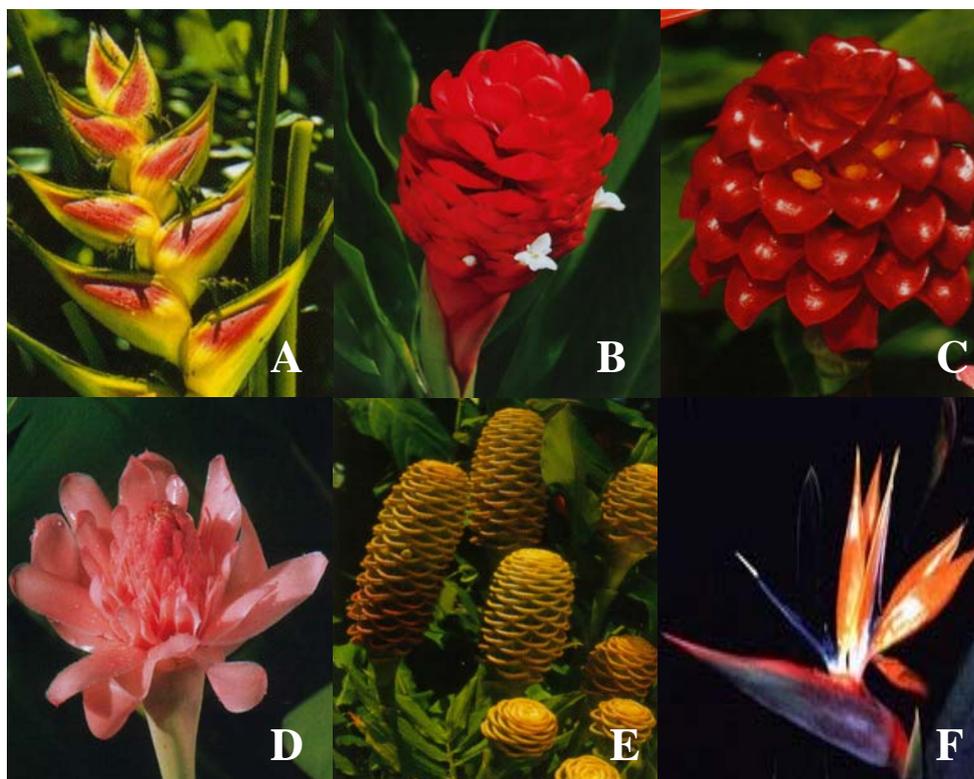


Figura 1. Inflorescências de plantas pertencentes a ordem Zingiberales: helicônia (A), alpínia (B), tapeinóquilos (C), bastão do imperador (D), sorvete (E) e ave do paraíso (F).

Muitos têm sido os usos das espécies distribuídas na ordem Zingiberales. Na família Musaceae, são utilizadas para alimentação as bananas (*Musa* sp. L.) e o cânhamo de Manila (*M. textilis* L. Née). Muitas espécies da família Zingiberaceae são utilizadas como aromatizantes ou condimentos, destacando-se o gengibre (*Zingiber officinalis* Roscoe). No Brasil, o gengibre é empregado na fabricação de duas bebidas: a gengibirra e o quentão. Algumas zingiberáceas apresentam propriedades medicinais. A família Marantaceae inclui a araruta (*Maranta arundinaceae* L.), fonte de amido fino, e a família Cannaceae, a menor de todas, oferece rizomas que são comestíveis (CASTRO, 1995b).

Embora outras espécies dessas famílias tenham outros usos menores e regionais, caso do consumo de botões florais e bainha de folhas, ou do emprego de folhas para proteção de

alimentos no cozimento, ou mesmo para cobertura de abrigos e moradias, sem dúvida, o principal e mais difundido é a exploração do caráter decorativo das inflorescências e folhas. Desse modo, as espécies de Zingiberales têm sido cultivadas visando o comércio como flores e folhagens de corte ou de vaso (WOOD, 1995).

Apenas há poucos anos, as espécies de Zingiberales vêm sendo cultivadas visando comercialização. Desse modo, pouco se conhece sobre técnicas de cultivo e manejo das plantas, assim como sobre a resistência destes materiais vegetais às doenças e pragas que ocorrem, principalmente, quando se consideram os fitonematóides (LAMAS, 2002).

Fitonematoses em Zingiberales ornamentais

A crescente demanda das espécies de Zingiberales ornamentais teve como consequência a expansão da área cultivada e o aumento da importação e comercialização de rizomas. Por serem plantas muito rústicas, as Zingiberales ornamentais têm variados níveis de resistência a doenças e pragas, porém nas regiões tropicais, a temperatura e umidade elevadas favorecem a ocorrência de epidemias (SEWAKE; UCHIDA, 1995).

O plantio de algumas espécies em larga escala através de propagação vegetativa e o intercâmbio indiscriminado de germoplasma, muitas vezes sem quarentena necessária, podem promover desequilíbrio no agroecossistema com ocorrência de doenças e pragas e disseminação dentro e entre campos de plantio (BALA; HOSEIN, 1996). Alguns plantios ainda são efetuados sob vegetação nativa e não obedecem a critérios técnicos. Entretanto, a produtividade é satisfatória, apesar da qualidade do produto não ser ideal, em decorrência da falta de tecnologia para produção e conservação pós-colheita (CHAGAS, 2000).

Apesar das muitas vantagens e oportunidades para cultivo de Zingiberales ornamentais, existem muitas doenças que causam sérios problemas à produção, destacando-se aquelas decorrentes do parasitismo de nematóides (Tabela 1). No entanto, não existem estudos

detalhados sobre etiologia, sintomatologia, medidas de controle, levantamentos da intensidade de fitonematoses nas principais áreas produtoras do estado de Pernambuco, como também sobre o número ideal de amostras para quantificação das populações dos parasitos.

Levantamentos fitopatológicos são fundamentais para obtenção de informações sobre a importância relativa de doenças, no monitoramento de flutuações populacionais de fitonematóides ao longo do tempo e na análise de eficiência de práticas de controle recomendadas (KING, 1980). Os levantamentos constituem-se, portanto, em importante instrumento para o desenvolvimento de programas de manejo integrado de doenças (CAMPBELL; MADDEN, 1990; BERGAMIN FILHO, 1995).

O número de amostras, tomado em um experimento ou em levantamentos de campo, normalmente determina a qualidade ou a confiabilidade dos dados de quantificação da doença obtidos e o custo da iniciativa. Um número reduzido de amostras poderá resultar em dados não confiáveis e não representativos. Entretanto, muitas amostras poderão oferecer dados de melhor qualidade, mas desperdiçar recursos valiosos. O objetivo é alocar sabiamente os recursos e, ao mesmo tempo, determinar o número de amostras que podem ser tomadas para alcançar determinado nível de confiança e precisão nos resultados obtidos (CAMPBELL; MADDEN, 1990).

Tabela 1. Ocorrência de fitonematóides em Zingiberales ornamentais.

PATÓGENO	HOSPEDEIRO	LOCAL	REFERÊNCIA
<i>Helicotylenchus</i> sp.	<i>Heliconia pissetacorum</i> cv. Andromeda	Havaí, USA	SEWAKE; UCHIDA (1995)
<i>Helicotylenchus</i> sp.	<i>H. rostrata</i>	Austrália	CONNELLY; BELLGARD (1999)
<i>Meloidogyne incognita</i>	<i>H. angusta</i> cv. Yellow	Filipinas	TANGONAN; QUEBRAL (1992)
<i>Meloidogyne</i> spp.	Christmas, <i>Heliconia</i> sp.		
<i>Meloidogyne</i> spp.	<i>H. farinosa</i> cv. Rio	Havaí, USA	SEWAKE; UCHIDA (1995)
<i>Pratylenchus</i> sp.	<i>H. caribaeae</i> cv. Purpúrea	Havaí, USA	SEWAKE; UCHIDA (1995)
<i>Radopholus similes</i>	<i>H. chartaceae</i> cv. Sexy Pink	Havaí, USA	SEWAKE; UCHIDA (1995)
<i>Rotylenchulus reniformis</i>	<i>H. stricta</i> cv. Bucky	Havaí, USA	SEWAKE; UCHIDA (1995)
<i>Criconebella onoensis</i>	<i>Alpinia</i> sp.	América Central	BALA; HOSEIN (1996)
	<i>Alpinia</i> sp., <i>Heliconia</i> sp.	América Central	BALA; HOSEIN (1996)
H. dihystrera			
	<i>Alpinia</i> sp., <i>Heliconia</i> sp.	América Central	BALA; HOSEIN (1996)
H. Psudorobustus			
<i>Helicotylenchus</i> sp.	<i>Alpinia</i> sp., <i>Heliconia</i> sp.	América Central	BALA; HOSEIN (1996)
<i>Hoplolaimus</i> sp.	<i>Alpinia</i> sp.	América Central	BALA; HOSEIN (1996)
	<i>Alpinia</i> sp., <i>Heliconia</i> sp.	América Central	BALA; HOSEIN (1996)
M. incognita			
<i>Peltamigratus</i> sp.	<i>Alpinia</i> sp.	América Central	BALA; HOSEIN (1996)
	<i>Alpinia</i> sp.	América Central	BALA; HOSEIN (1996)
P. zeae			
<i>Pratylenchus</i> sp.	<i>Alpinia</i> sp., <i>Heliconia</i> sp.	América Central	BALA; HOSEIN (1996)
	<i>Alpinia</i> sp., <i>Heliconia</i> sp.	América Central	BALA; HOSEIN (1996)
R. reniformis			
<i>Tylenchorhynchus annulatus</i>	<i>Alpinia</i> sp., <i>Heliconia</i> sp.	América Central	BALA; HOSEIN (1996)
<i>Xiphinema</i> spp.	<i>Heliconia</i> sp.	América Central	BALA; HOSEIN (1996)
<i>Meloidogyne</i> sp.	<i>Musa coccinea</i>	Paulista - PE	COELHO (2001)
<i>Meloidogyne</i> sp.	<i>M. ventulinea</i>	Paulista - PE	COELHO (2001)
<i>Meloidogyne</i> sp., <i>Xiphinema</i> sp.		Paulista - PE	COELHO (2001)
<i>Helicotylenchus</i> sp.	M. ornata		
<i>Meloidogyne</i> sp., <i>Xiphinema</i> sp.	<i>M. coccinea</i>	Aldeia - PE	COELHO (2001)
<i>Helicotylenchus</i> sp.			
<i>M. incognita</i> , <i>Xiphinema</i> sp.	<i>A. purpurata</i>	Aldeia - PE	COELHO (2001)
<i>Meloidogyne</i> sp.	<i>A. purpurata</i>	Paulista - PE	COELHO (2001)
<i>M. incognita</i> , <i>Xiphinema</i> sp.	<i>Alpinia</i> sp.	Aldeia - PE	COELHO (2001)
<i>Meloidogyne</i> sp.	<i>A. purpurata</i>	Paulista - PE	COELHO (2001)
<i>Helicotylenchus</i> sp., <i>Tylenchus</i> sp., <i>Criconebellmoides</i> sp.	<i>H. orthotricha</i> cv. Edge of Nigth	Aldeia - PE	COELHO (2001)
<i>Helicotylenchus</i> sp., <i>Dorylaimus</i> sp.	<i>H. chartacea</i> cv. Sexy Pink	Aldeia - PE	COELHO (2001)
<i>Meloidogyne</i> sp., <i>Xiphinema</i> sp.	<i>H. rostrata</i>	Aldeia - PE	COELHO (2001)
<i>Helicotylenchus</i> sp., <i>Tylenchus</i> sp., <i>Criconebellmoides</i> sp.	<i>H. caribaeae</i>	Aldeia - PE	COELHO (2001)
<i>Meloidogyne</i> sp.	<i>H. psittacorum</i> cv. Alan carle	Aldeia - PE	COELHO (2001)
<i>Xiphinema</i> sp.	<i>H. latspata</i>	Paulista - PE	COELHO (2001)
<i>Xiphinema</i> sp., <i>Helicotylenchus</i> sp.	<i>H. rostrata</i>	Paulista - PE	COELHO (2001)
<i>Meloidogyne</i> sp.	<i>Etilingera elatior</i>	Paulista - PE	COELHO (2001)
<i>Helicotylenchus</i> sp.	<i>Tapeinochilos ananassae</i>	Água Preta - PE	COELHO (2001)
<i>Meloidogyne</i> sp.	<i>Zengiber</i> sp.	Paulista - PE	COELHO (2001)

Com efeito, a amostragem constitui uma das mais importantes atividades no estudo de epidemias de doenças de plantas e permite a obtenção de estimativas representativas das características da epidemia por um custo reduzido, com a maior exatidão e precisão

possível (CAMPBELL; MADDEN, 1990; NEHER; CAMPBELL, 1997), possibilitando o ajuste entre o que é biológica e estatisticamente razoável (CAMPBELL; DUTHIE, 1989).

Em relação às perdas provocadas, os nematóides causam reduções na produção, que variam de suaves a destruição total da planta ou do plantio. O nível de dano depende da susceptibilidade da cultura, condições ambientais, presença de outros patógenos, que podem interagir com o parasito, e densidade populacional de fitonematóides (TIHOHOD, 1993). Além do mais, a densidade populacional pode variar durante todo o ano nos climas tropicais, em face às variações de temperatura e umidade do solo (LORDELLO, 1984).

As fitonematoses causadas por espécies dos gêneros *Meloidogyne* Göeldi, *Radopholus* Thorne, *Helicotylenchus* Steiner e *Pratylenchus* Filip'ev constituem um dos principais problemas fitossanitários em plantas ornamentais tropicais em Pernambuco (COELHO; WARUMBY, 2002). No entanto, não existem estudos aprofundados sobre as espécies ocorrentes e intensidade da doença. O parasitismo tem ocorrência comum em alpinias, bastão do imperador, musas e helicônias, causando danos às raízes e, conseqüentemente, redução severa no crescimento e morte de plantas. O controle das fitonematoses é bastante difícil e envolve diversas estratégias para reduzir a população do parasito a níveis que não afetem o desenvolvimento da planta.

Tradicionalmente, nematicidas sistêmicos têm sido usados para controlar doenças causadas por nematóides. Entretanto, o uso de nematicidas apresenta restrições econômicas e ambientais. O desenvolvimento de estratégias de biocontrole vem crescendo intensamente. Parasitos de ovos, juvenis, ou adultos de nematóides fitopatogênicos vêm sendo testados em muitos laboratórios, e novas tecnologias desenvolvidas para manipular as complexas relações hospedeiro-patógeno, de modo a reduzir a suscetibilidade da planta á infecção (SEWAKE; UCHIDA, 1995). Testes de variedades visando a resistência de Zingiberales a fitonematoses e o melhoramento de plantas são escassos. Da mesma forma,

não existem estudos envolvendo indução de resistência em plantas por meio do uso de indutores bióticos ou abióticos.

Uso de indutores em resistência de plantas a fitonematoses

A resistência sistêmica induzida é uma proposta promissora para o controle de doenças, reduzindo efetivamente a dependência aos agrotóxicos e constituindo-se em método alternativo para o controle de fitonematóides (VRAIN, 1999; ANWAR et al., 2003)

Muitas plantas exibem várias respostas de defesa quando são atacadas por fitopatógenos. Esta resposta inclui a morte programada de células, produção de metabólitos secundários antimicrobianos (fitoalexinas), produção de proteínas relacionadas com a patogênese (PR-proteínas), a exemplo de quitinases e β -1,3-glucanases, proteínas RIPS, defensinas, e a lignificação da parede celular. As PR-proteínas são acumuladas no local e sistemicamente após a indução química (VAN LOON, 1997), atuando direta e indiretamente contra os fitopatógenos. Diretamente através da hidrólise das ligações β -1,3-glucosídicas existentes nas células do fitopatógeno e indiretamente, promovendo a liberação de oligossacarídeos do fitopatógeno, que atuam como elicitores das reações de defesa da planta (BOWLES, 1990). A eficácia da resposta de defesa determina a suscetibilidade da planta ao fitopatógeno (STICHER; MANI; MÉTRAUX, 1997; PENNINCKX et al., 1998). A produção de PR-proteínas parece estar envolvida diretamente na resistência ou tolerância de tomateiros (*Lycopersicon esculentum* Mill.) contra *M. incognita* (Kofoid e White) Chitwood (ANWAR et al., 2003).

A resistência induzida é expressa através de uma resposta localizada e sistêmica. Na resistência local adquirida ocorre uma interação patógeno X hospedeiro resistente, que

ocasiona reação de hipersensibilidade. Em seguida, sinais bioquímicos são transmitidos do local da infecção, para outras partes da planta, que são induzidas a ativar os mecanismos de defesa. Este processo termina com a expressão da resistência sistêmica adquirida (RSA) (VIJAYAN et al., 1998).

O conhecimento das alterações bioquímicas que tornam as plantas resistentes pode possibilitar o desenvolvimento de plantas transgênicas, com expressão acentuada da resistência à doença, ou novos produtos químicos que estimulem os mecanismos de defesa na planta (RYALS et al., 1996).

A resistência sistêmica adquirida (RSA) pode ser distinguida de outros tipos de resistência pelo amplo espectro de proteção a fitopatógenos e mecanismos envolvidos na defesa da planta. Por exemplo, em fumo a ativação da RSA resulta na redução significativa da severidade de doenças causadas por *Phytophthora parasitica* Dastur, *Cercospora nicotianae* Ellis e Everh., *Peronospora tabacina* Adani, “*Tobacco mosaic virus*” - TNW, “*Tobacco necrosis virus*” - TNV, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wolf e Foster) Young, Dye e Wilkie e *Pectobacterium carotovorum* (Jones) Bergey (VERNOOIJ et al., 1995).

O elicitor liberado pelo fitopatógeno é o sinal primário para induzir as respostas de defesa da planta. Esta molécula interage com os receptores da célula hospedeira, e através de mecanismos pouco conhecidos, ativa genes específicos. Vários trabalhos têm mostrado algumas moléculas sinalizadoras, envolvidas na indução de resistência, destacando-se o ácido salicílico, o metil jasmonato, etileno, peróxido de hidrogênio e radicais de superóxido (VIJAYAN et al., 1998).

Os elicitores são classificados em bióticos, tais como os complexos de carboidratos, lipídeos e proteínas (DARVILL; ALBERSHEIM, 1984); e, abióticos, a exemplo de acibenzolar-S-metil (ASM), ácido DL- α -amino-*n*-butírico, jasmonatos, quitosana e

silicatos (STICHER; MANI; MÉTRAUX, 1997). Os elicitores abióticos são compostos que induzem a síntese de fitoalexinas, como também outras respostas de defesa da planta. Podem não ter atividade antimicrobiana ou exercer um duplo modo de ação, e serem capazes de atuar diretamente sobre o patógeno ou elicitar respostas de defesa (LYON; REGLINSKI; NEWTON, 1995). Entre os elicitores testados contra fitonematóides citam-se: benzothiadiazole em tomateiro e videiras (*Vitis vinifera* L.) contra *M. incognita* (OWEN; GREEN; DEVRALL, 1998), hidroxyurea em tomateiro contra *M. javanica* (Treub) Chitwood (GLAZER; ORION, 1985), quitosana em tomateiro contra *M. incognita* (VASIUKOVA et al., 2001), lipopolissacarídeos de *Rhizobium etli* Segovia em batateira (*Solanum tuberosum* L.) contra *Globodera pallida* Stone (REITZ et al., 2000), oxycorn em tomateiro e videiras contra *M. incognita* (ANWAR et al., 2003) e jasmonatos contra *M. incognita* em tomateiro (COOPER; JIA; GOGGIN, 2005), espinafre (*Spinacia oleracea* L.) e aveia (*Avena sativa* L.) (SORIANO et al., 2004a, b).

O éster S-metil do ácido benzo (1,2,3)-tiadiazole-7-carbotiólico (ASM) é o único composto liberado para uso em plantios comerciais, com potencial para induzir resistência, sem causar problemas de fitotoxidez (GÖRLACH et al., 1996). O ASM não apresenta qualquer ação direta sobre os microrganismos, estando seu modo de ação relacionado à ativação de genes de defesa da planta, como por exemplo, genes que codificam para a produção de enzimas envolvidas na síntese de lignina e compostos fenólicos, que conferem uma maior resistência ao tecido vegetal; e, fitoalexinas, compostos de baixo peso molecular, com características antimicrobianas, que se acumulam em células adjacentes ao ponto de infecção, restringindo assim o desenvolvimento do fitopatógeno (CIBA, 1996).

A interação planta-patógeno é mediada por uma complexa cadeia de eventos moleculares e citológicos que determinam a suscetibilidade e a resistência do hospedeiro. Benhamou e Bélanger (1998) verificaram que a aplicação de ASM em folhas de pepino

(*Cucumis sativus* L.) antes da inoculação de *Pythium ultimum* Trow. resultou no acúmulo de fenólicos no sítio de penetração do fungo. Além disso, mudanças estruturais em folhas de pepino 24 horas após a inoculação de *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ellis e Halsted também foram constatadas por Xuei; Järlfors e Kuc (1987), sendo que 96 horas após a inoculação com o fitopatógeno, o peg de penetração foi envolvido por uma papila semelhante a calose.

Atividade enzimática dos tecidos da planta sob a influência de fitonematóides

Nematóides parasitas de plantas segregam enzimas hidrolíticas das glândulas esofagianas como celulases, amilases, proteases e pectinases. A última, possivelmente, constitui-se ferramenta importante na patogênese por dissolver a parede celular e polímeros da lamela média, os quais podem ser absorvidos posteriormente pelo parasito (ZINOV'EVA; VASYUKOVA; OZERETSKOVSKAYA, 2004). Estas hidrolases são a razão primária para mudanças metabólicas na planta hospedeira. A atividade enzimática de nematóides provavelmente é influenciada pela atividade parasitária. Por exemplo, no endoparasito migrador *Pratylenchus penetrans* (Cobb) Chitwood e Oteifa, a atividade celulolítica é sete vezes maior que no endoparasito sedentário *Heterodera trifolii* Goffart (MORGAN; MCALLAN, 1962). O nematóide *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev mostrou atividade celulolítica 28 vezes mais alta que *D. myceliophagus* Goodey, que se alimenta de fungos (DROPKIN; MARCH; SPALDING, 1962).

Um papel particular e importante na patogênese é o da β -glicosidase que pode induzir grande liberação de fenóis. Muitos fenóis liberados são química e biologicamente extremamente ativos, podendo influenciar diretamente o metabolismo celular, por meio de oxidases (ZINOV'EVA; VASYUKOVA; OZERETSKOVSKAYA, 2004). A origem de glicosidases em tecido de planta doente pode ser diferente. Por exemplo, β -glicosidase é

secretada por nematóides (MAESENEER, 1964), a produção aumenta depois que o nematóide penetra na planta, como foi demonstrado em raízes de batateira (GIEBEL; JACKOWIAK, 1976). Em variedades suscetíveis, depois da invasão das raízes, por *Globodera rostochiensis* Wollenweber, a atividade de β -glucosidase aumentou quatro vezes. Em variedades resistentes o aumento da atividade enzimática foi leve, embora teste bioquímico tivesse revelado maior atividade de β -glucosidase nos locais de alimentação dos nematóides (GIEBEL; KRENZ; WILSKI, 1975). Esta atividade não foi mostrada através de células do sincício, nem através de células inalteradas adjacentes a ele. Foi assumido que, em raízes de batateiras suscetíveis infectadas, houve aumento da atividade da glucosidase em todo sistema radicular. Assim as doenças causadas por nematóides não se limitam aos locais de alimentação.

As enzimas hidrolíticas produzidas por nematóides destroem as células do hospedeiro, ativando as endohidrolases da planta, aumentando atividade hidrolítica no local de alimentação. Tratamentos de tecidos de planta com pectase e celulase envolvem a atividade de oxidoredutases. Em estudos desenvolvidos por Giebel; Krenz e Wilski (1975) na área invadida por *M. incognita* e *G. rostochiensis* a atividade de hidrolase, oxidase e dehidrogenase foi aumentada. Segundo alguns pesquisadores, as oxidoredutases parecem estar conectadas à resposta suscetível-resistente de tecidos de planta, e podem modificar muitos componentes fisiológicos da célula da planta hospedeira ativando fenóis, auxinas e aminoácidos. Por exemplo, em raízes de tomateiro a infecção causada por *M. incognita* aumentou a atividade de dehidrogenases. Infecção semelhante ocorreu em raízes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) aumentando a atividade de β -fosfogluconate dehidrogenase e peroxidase mais na variedade resistente que na suscetível (NOEL; MCCLURE, 1978).

Em geral, oxidação induz maturação, diferenciação e senescência de células. Por outro

lado, redução induz a divisão celular. Células jovens e ativas são caracterizadas por redução (STONIER, 1972). O potencial de redução da célula pode determinar a resposta do tecido da planta à infecção do nematóide.

A indução de alta redução em células doentes pode mantê-las jovens e disponíveis para manutenção de metabolismo favorável ao desenvolvimento do nematóide. Por exemplo, em raízes de tomateiro, após a invasão de *M. incognita*, foi observado aumento nos níveis de alguns redutores como ácido ascórbico e ácido glutâmico. Atividade do ácido dehidroascórbico redutase também foi observada (KANNAN, 1968). Em raízes de plantas suscetíveis a *G. rostochiensis* e *M. hapla* Chitwood ocorreu aumento de inibidores de ácido indol acético-oxidase (KNYPL; CHYLINSKA; BRZESKI, 1975).

O aumento de atividade de oxidases induzido por nematóides, nos tecidos de plantas resistentes, pode favorecer a biogênese de ligninas, que fazem parte do tecido necrosado (VRAIN, 1999). Ao contrário, há evidência de peroxidases estarem presentes em exudatos do estilete de fêmeas de *M. incognita*, que induzem o desenvolvimento de células gigantes nas plantas hospedeiras. Endo e Veech (1969) observaram alta atividade enzimática de oxirredutase em células gigantes, formadas em raízes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merrill) infectadas com *M. incognita*, como também em várias células na proximidade da região labial do nematóide. Porém, nenhuma peroxidase foi detectada no sítio de alimentação formado em raízes de batateira atacadas por *G. rostochiensis* (GIEBEL; KRENZ; WILSKI, 1975).

Este trabalho teve por objetivos efetuar levantamento de fitonematóides associados a Zingiberales ornamentais tropicais em áreas de plantio do estado de Pernambuco e estimar o número de amostras recomendado para quantificar populações de fitonematóides em futuros levantamentos (Capítulo 2); avaliar o efeito de indutores de resistência sobre a nematofauna associada à rizosfera de plantas de bastão do imperador (*Etilingera elatior*

R.M. Smith), em condições de campo, e a atividade das enzimas α -1,3-glucanase e peroxidase na planta (Capítulo 3); e, estudar a produção de enzimas por alpinia (*Alpinia purpurata* (Vieill.) Schum), associadas à penetração e desenvolvimento de *M. incognita* (Kofoit & White) Chitwood na hospedeira (Capítulo 4).

Referências Bibliográficas

- AKI, A. **Repensando a comercialização de flores**. Campinas: SEBRAE, 1999. 110P.
- ANWAR, S.A. et al. Induction of tolerance to root-knot nematode by oxycorn. **Journal of Nematology**, Gainesville, v. 35, p. 306–313, 2003.
- BALA, G.; HOSEIN, F. Plant-parasitic nematodes associated with anthuriums and other tropical ornamentals. **Nematropica**, Florida, v. 26, p. 9-14, 1996.
- BENHAMOU, N.; BÉLANGER R.R. Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **The Plant Journal**, Southampton, v. 14, p. 13-21, 1998.
- BERGAMIN FILHO, A. Avaliação de danos e perdas. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 672-690.
- BERRY, F.; KRESS, W.J. **Heliconia: an identification guide**. Washington: Smithsonian Institute, 1991. 334p.
- BOWLES, J.D. Defense-related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, Berkeley, v. 59, p. 873-907, 1990.
- CAMPBELL, C.L.; DUTHIE, J.A. Sampling for disease assessment. **Biological and Cultural Tests for Control of Plant Diseases**, St. Paul, v. 4, p. v-viii, 1989.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 532p.

CASTRO, C.E.F. Cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.4, p.1-46, 1998.

CASTRO, C.E.F. **Helicônia para exportação**: aspectos técnicos da produção. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995a. 44p. (Série Publicações Técnicas FRUPEX, 16).

CASTRO, C.E.F. Inter-relações das famílias das Zingiberales. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 1, p. 1-11, 1995b.

CASTRO, C.E.F.; GRAZIANO, T.T. Espécies do gênero de *Heliconia* (Heliconiaceae) no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 3, p. 15-28, 1997.

CEAGEPE. **Mercado de flores**. Recife: Companhia de Abastecimento e Armazéns de Pernambuco, 2001. Disponível em: <<http://www.ceagepe.com.br/flores/edição081.htm>>
Acesso em: 4 set. 2001.

CHAGAS, A.J.C. **Floricultura tropical na Zona da Mata de Pernambuco**. Recife: SEBRAE/PE, 2000. 24p.

CIBA. **The plant activator**: nature created the concept. Basel: Ciba-Geigy, 1996. 35p.

COELHO, R.S.B. **Laudos da seção de fitossanidade** – diagnóstico fitossanitário (2001). Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, 2001. 15f.

COELHO, S, R.; WARUMBY, J.F. Doenças de plantas ornamentais tropicais detectadas na Zona da Mata de Pernambuco. **Floricultura em Pernambuco**, Recife, v. 1, p. 67-69, 2002.

CONNELLY, M.; BELLGARD, S. **Diseases of heliconia**. Sydney: Northern Territory Government of Australia 1999. Disponível em: <<http://www.nt.gov.au/dpif/pubcat/agnotes/779.htm>> Acesso em: 15 set. 2001.

COOPER, W.R.; JIA, L.; GOGGIN, L. Effects of jasmonate-induced defenses on root-knot nematode infection of resistant and susceptible tomato cultivars. **Journal of Chemical Ecology**, Nowell, v. 31, p. 1953–1967, 2005.

CRISCUOLO, P.D. **Floricultura na economia agrícola do estado de São Paulo**. Parte I. São Paulo: Instituto de Economia Agrícola, 1978. 27p.

DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Phytoalexins and their elicitors – a defense against microbial infection in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, San Diego, v. 35, p. 243-275, 1984.

DROPKIN, V.H.; MARCH, P.B.; SPALDING, D.H. Cell-wall degrading enzymes in some plant parasitic, myceliophagus and free-living nematodes. **Phytopathology**, St. Paul, v. 52, p. 1218, 1962.

ENDO, B.Y.; VEECH, J.A. The histochemical localization of oxidoreductive enzymes of soybeans infected with root knot nematode *Meloidogyne incognita acrita*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, p. 442-447, 1969.

GIEBEL, J.; JACKOWIAK, N. Tryptophan decarboxylase in resistant and susceptible potato roots infected with *Heterodera rostochiensis*. **Nematologica**, Leiden, v. 22, p. 462-466, 1976.

GIEBEL, J.; KRENZ, J.; WILSKI, A. Localization of some enzymes in roots of susceptible and resistant potatoes infected with *Heterodera rostochiensis*. **Nematologica**, Leiden, v. 17, p. 29-33, 1975.

GLAZER, C.; ORION, D. An induced resistance effect of hydroxyurea on plants infected by *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, Gainesville, v. 17, p. 21-24, 1985.

GÖRLACH, J. et al. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 629-643, 1996.

KANNAN, S. Studies in nematode infected root-knots of the tomato plant. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 8, p. 153-154, 1968.

KING, J.E. Cereal survey methodology in England and Wales. In: TENG, P.S.; KRUPA, S.V. (Eds.) **Crop loss assessment which constrain production and crop improvement in agriculture and forestry**. Minnesota: University of Minnesota, 1980. p. 124-133. (Agricultural Experiment Station - University of Minnesota. Miscellaneous Publication, 7).

KNYPL, J.S., CHYLINSKA, K.M.; BRZESKI, M.W. Increased level of chlorogenic acid and inhibitors of indolyl-3-acetic acid oxidase in roots of carrot infested with the northern root-knot nematode. **Physiology Plant Pathology**, Washington, v. 6, p. 51-64, 1975.

LAMAS, A.M. **Floricultura tropical: técnicas de cultivo**. Recife: SEBRAE, 2002. 88p.

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

LYON, G.D.; REGLINSKI, T.; NEWTON, A.C. Novel disease control compounds: the potential to immunize plants against infection. **Plant Pathology**, London, v. 44, p. 407-427, 1995.

MAESENEERR, J. Leaf browning of *Ficus* spp., new host plant of *Aphelenchoides fragarie* (Ritzema Bos.). **Nematologica**, Leiden, v.10, p.403-408, 1964.

MORGAN, G.T.; MCALLAN, J.W. Hydrolitic enzymes in plant-parasitic nematodes. **Nematologica**, Leiden, v.8, p.209-215, 1962.

NANNETTI, D.C. 1994. **Utilização de cultura de tecidos vegetais na micropropagação de *Heliconia* sp.** 106 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras. Lavras, 1994.

NEHER, D.; CAMPBELL, C.L. Determining sample size. In: FRANCL, L.J.; NEHER, D.A. (Eds.) **Exercises in plant disease epidemiology**. St. Paul: APS Press, 1997. p. 12-15.

NOEL, G.R.; MCCLURE, M.A. Peroxidase and 6-phosphoglucanate dehydrogenase in resistant and susceptible cotton infected by *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, Gainesville, v. 10, p. 34-39, 1978.

OWEN, K.J.; GREEN, C.D.; DEVRALL, B.J. Systemic acquired resistance against root-knot nematodes in grapevines. **Proceedings...** 7th International Congress of Plant Pathology, p. 38. 1998. (Abstract).

PENNINCKX, I.A.M.A. et al. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 2103-2113, 1998.

REITZ, M. et al. Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3515–3518, 2000.

RYALS, J.A. et al. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1809-1819, 1996.

SEWAKE, K.T.; UCHIDA, J.Y. **Diseases of heliconia in hawaii**. Honolulu: Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, 1995. 18p.

SORIANO, I.R. et al. Inducible flavone in oats (*Avena sativa*) is a novel defense against plant-parasitic nematodes. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, p. 1207-1214, 2004a.

SORIANO, I.R. et al. Phytoecdysteroids: a novel defense against plant-parasitic nematodes. **Journal of Chemical Ecology**, Nowell, v. 30, p. 1885-1899, 2004b.

STICHER, L.; MANI, B.M.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235-270, 1997.

STONIER, T. The role of auxin protectors in autonomous growth. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF PLANT TISSUE CULTURE, 2., 1972, Strasbourg: **Proceedings**. Strasbourg: ICPTC, 1972. p. 423-235.

TANGONAN, N.G.; QUEBRAL, F.C. **Host index of plant diseases in the Philippines**. 2. ed. St. Davao: G & G Bisling Printers, 1992. 273p.

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

VAN LOON, L.C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, Dublin, v. 103, p. 753-765, 1997.

VASIUKOVA, N.I. et al. Modulation of plant resistance to diseases by water-soluble chitosan. **Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya**, Moskva, v. 37, p. 115–122, 2001.

VERNOOIJ, B. et al. 2,6-dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens does not require the accumulation of salicylic acid. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v. 8, p. 228-234, 1995.

VIJAYAN, P. et al. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, p. 7209-7214, 1998.

VRAIN, T.C. Engineering natural and synthetic resistance for nematode management. **Journal of Nematology**, Gainesville, v. 31, p. 424–436, 1999.

WARUMBY, J.F.; COELHO, R.S.B.; LINS, S.R.O. **Principais doenças e pragas em flores tropicais no estado de Pernambuco**. Recife: SEBRAE, 2004. 98p.

WOOD, T. Ornamental Zingiberaceae. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 1, p. 12-13, 1995.

XUEI, X.L.; JÄRLFORS, U.; KUC, J. Ultra structural changes associated with induced systemic resistance of cucumber to disease: host response and development of *Colletotrichum lagenarium* in systemically protected leaves. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 66, p. 1028-1038, 1987.

ZINOV'EVA, S.V.; VASYUKOVA, N.I.; OZERETSKOVSKAYA, O.L. Biochemical aspects of plant interactions with phytoparasitic nematodes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moskva, v. 40, p. 111–119, 2004.

**Fitonematóides associados à Zingiberales tropicais no estado de
Pernambuco e estimativa do número de amostras para
monitoramento**

CAPÍTULO 2

Fitonematóides associados à Zingiberales tropicais no estado de Pernambuco e estimativa do número de amostras para monitoramento

Tereza Cristina de Assis^{1*}, Elvira Maria Regis Pedrosa^{1**}, Rildo Sartori Barbosa Coelho¹,
Domingos Eduardo Guimarães Tavares de Andrade^{2***}, Thiciano Leão Miranda¹, Roberto Brito
Cavalcanti¹

¹UFRPE, Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, 52171-900, Recife, PE. email: crisassis@uol.com.br.

²UFAL, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Laboratório de Fitopatologia, 57100-000, Rio Largo, AL. email: degta@uol.com.br.

Parte de Tese de Doutorado do primeiro autor.

*Bolsista CAPES.

**Bolsista de produtividade do CNPq

***Bolsista CNPq.

Aceito para publicação em...

RESUMO

Assis, T.C., Pedrosa, E.M.R., Coelho, R.S.B., Andrade, D.E.G.T., Miranda, T.L., Cavalcanti, R.B. Fitonematóides associados à Zingiberales tropicais no estado de Pernambuco e estimativa do número de amostras para monitoramento. *Summa Phytopathologica*.

O aumento expressivo na área plantada com ornamentais tropicais em Pernambuco demonstra o crescente interesse pela floricultura no Estado, no entanto pouco se conhece em relação às fitonematoses associadas ao cultivo comercial de Zingiberales. Este estudo teve por objetivos realizar levantamento de fitonematóides em áreas produtoras de Pernambuco e estimar o número de amostras recomendado para monitoramento. No período de 2002 a 2004, foram visitadas 10 áreas produtoras de Zingiberales ornamentais (*Etilingera elatior*, *Zingiber spectabilis*, *Alpinia purpurata*,

Musa coccinea, *Tapeinoquilos ananassae* e *Heliconia* spp.), localizadas no estado de Pernambuco. Em cada propriedade foram coletadas raízes de plantas parasitadas por fitonematóides e solo da rizosfera. As amostras foram processadas pelo método de flotação centrífuga e determinadas as densidades populacionais dos gêneros presentes, as quais foram analisadas estatisticamente para estimativa do número recomendado de amostras para monitoramento, considerando diferentes níveis de erro aceitáveis. Constatou-se ocorrência freqüente dos seguintes gêneros: *Pratylenchus*, *Rotylenchulus*, *Meloidogyne*, *Helicotylenchus* e *Criconemella*. Sintomas da meloidoginose foram constatados em 100 % das áreas de plantio, com níveis populacionais médios de *Meloidogyne* spp. elevados, alcançando 375 espécimes/300 cm³ de solo e 6090 espécimes/20 g de raízes, considerando diferentes áreas e hospedeiros. As espécies de *Meloidogyne* detectadas foram *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica*. As estimativas do número de amostras indicaram que pelo menos 11, 20, 10, 18 e 10 amostras são recomendadas para monitoramento dos gêneros *Pratylenchus*, *Rotylenchulus*, *Meloidogyne*, *Helicotylenchus* e *Criconemella*, respectivamente, considerando um nível de erro de 20 %. As associações *M. arenaria* com *E. elatior*, *Rotylenchulus* sp. com *A. purpurata*, *Heliconia* spp. e *M. coccinea*, e *Criconemella* sp. em *A. purpurata* constituíram os primeiros relatos da ocorrência em Pernambuco.

Palavras-chave adicionais: *Heliconia* spp., *Etlingera elatior*, *Alpinia purpurata*, *Zingiber spectabilis*, *Musa coccinea*, *Tapeinoquilos ananassae*.

ABSTRACT

Assis, T.C., Pedrosa, E.M.R., Coelho, R.S.B., Andrade, D.E.G.T., Miranda, T.L., Cavalcanti, R.B. Plant parasitic nematodes associated with tropical Zingiberales in Pernambuco State, Brazil, and prediction of samples number for monitoring. *Summa Phytopathologica*.

The expressive increase in area growing ornamental tropical in Pernambuco indicates crescent interests for floriculture in the state, however relationships among plant parasitic nematodes and Zingiberales are unknown. This study had as objectives to screen plant parasitic nematodes in Zingiberales (*Etilingera elatior*, *Zingiber spectabilis*, *Alpinia purpurata*, *Musa coccinea*, *Tapeinoquilos ananassae* and *Heliconia* spp.) producing areas of Pernambuco and predict number of samples for nematodes monitoring at different levels of acceptable error. Samples (soil and roots of nematode parasited plants) were collected in producing areas, from 2002 to 2004 and processed by centrifugal flotation method. Populational density of plant parasitic nematodes were evaluated and used to predict recommended number of samples for monitoring. *Pratylenchus* sp., *Rotylenchulus* sp., *Meloidogyne* spp., *Helicotylenchus* sp. and *Criconemella* sp. were frequent in most of samples. Symptoms of root-knot nematodes were verified in 100 % of the planting areas, being levels of *Meloidogyne* spp. considered high, up to 375 nematodes per 300 cm³ soil and 6090 nematodes per 20 g of roots, considering different areas and hosts. Among *Meloidogyne* species, *M. incognita*, *M. arenaria* and *M. javanica* were detected. Data analysis indicated that at least 11, 20, 10, 18 and 10 samples are recommended for monitoring the genus *Pratylenchus*, *Rotylenchulus*, *Meloidogyne*, *Helicotylenchus* and *Criconemella*, respectively, at 20 % error. The associations *M. arenaria* with *E. elatior*, *Rotylenchulus* sp. with *A. purpurata*, *Heliconia* spp. and *M. coccinea*, and *Criconemella* sp. with *A. purpurata* consisted of the first occurrence report in Pernambuco, Brazil.

Additional Keywords: *Heliconia* spp., *Etilingera elatior*, *Alpinia purpurata*, *Zingiber spectabilis*, *Musa coccinea*, *Tapeinoquilos ananassae*.

A floricultura no Brasil é uma atividade consolidada e, em Pernambuco, a produção de flores totalizou 200 produtores, em 2001, gerando 1.500 empregos diretos e indiretos e movimentação financeira em torno de R\$ 30 milhões (8). Consistentemente, houve aumento expressivo em área

plantada com ornamentais tropicais no Estado que alcançou incremento de 900%, distribuídos pelos municípios de Camaragibe, Paulista, Ipojuca, Igarassu, Recife, Escada, Moreno, Cabo de Santo Agostinho, Ribeirão, Água Preta, Sairé, Vitória de Santo Antão e Petrolina, com destaque para os quatro primeiros, localizados na Zona da Mata (9).

Apesar das muitas vantagens e oportunidades para cultivo de Zingiberales ornamentais, o parasitismo de nematóides pode causar perdas elevadas na produção (13). O nível de dano das fitonematoses depende de vários fatores, destacando-se a susceptibilidade da cultura, condições ambientais, densidade populacional dos fitonematóides e presença de outros organismos fitopatogênicos, que podem interagir com o fitoparasito (28). Além do mais, a densidade populacional do parasito pode variar durante todo o ano nos climas tropicais, em face às variações de temperatura e umidade do solo (20).

As fitonematoses, causadas por espécies dos gêneros *Meloidogyne* Göeldi, *Radopholus* Thorne, *Helicotylenchus* Steiner e *Pratylenchus* Filip'ev, vêm constituindo um dos principais problemas fitossanitários em plantas ornamentais tropicais em Pernambuco (13). O parasitismo tem ocorrência comum em alpinias (*Alpinia* spp.), bastão do imperador (*Etilingera elatior* R.M. Smith), musas (*Musa* spp.) e helicônias (*Heliconia* spp.), causando danos às raízes e, conseqüentemente, redução severa no crescimento e morte de plantas. O controle das fitonematoses é muito difícil e envolve diversas estratégias para reduzir a população a níveis que não afetem o desenvolvimento da planta (29), sendo fundamental o monitoramento das populações presentes.

Apesar da importância das fitonematoses para as Zingiberales ornamentais, não existem levantamentos sobre a intensidade da doença em áreas produtoras, nem sobre o número de amostras recomendado para monitoramento das populações presentes. Levantamentos fitopatológicos são fundamentais para obtenção de informações sobre a importância relativa de doenças, monitoramento de flutuações populacionais dos fitonematóides ao longo do tempo e análise de eficiência de práticas de controle recomendadas (18), constituindo-se em importante instrumento para o desenvolvimento de programas de manejo integrado de doenças (7).

O número de amostras, tomado em um experimento ou levantamento de campo, determina a

qualidade ou a confiabilidade dos dados de quantificação da doença obtidos e o custo da iniciativa (7). No entanto, torna-se necessário o ajuste entre o que é biológica e estatisticamente razoável (6). O presente trabalho teve por objetivos efetuar levantamento de fitonematóides associados a Zingiberales ornamentais tropicais em áreas de plantio do estado de Pernambuco e estimar o número de amostras recomendado para quantificar populações de fitonematóides em futuros levantamentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Levantamento de fitonematóides em Zingiberales ornamentais

No período de 2002 a 2004, foram realizados levantamentos de fitonematóides em 10 áreas produtoras das seguintes Zingiberales ornamentais: bastão do imperador, zingiber (*Zingiber spectabilis* Roscoe), alpínia (*Alpinia purpurata* (Vieill.) Schum.), musa ornamental (*Musa coccinea* Andrews), tapeinóquilos (*Tapeinoquilos ananassae* Hassk) e helicônias (*Heliconia* spp.) (30), localizadas nos municípios de Igarassu, Ribeirão, Cabo de Santo Augustinho, Alecrim, Jaboatão dos Guararapes, Paudalho e São Lourenço da Mata, do estado de Pernambuco (Tabela 1). As áreas de produção foram tomadas ao acaso e as coletas realizadas em plantas doentes que se encontravam em diferentes estádios de desenvolvimento (vegetativo e floração).

Inserir Tabela 1.

Em cada propriedade, foram coletadas raízes de plantas parasitadas por fitonematóides e solo de rizosfera, com número de amostras por área variável, mas não inferior a oito amostras. Informações adicionais sobre o local e a espécie de Zingiberales envolvida foram obtidas de cada área. Após a coleta, o material devidamente acondicionado e etiquetado foi processado no Laboratório de Fitonematologia da UFRPE.

O processamento das amostras de solo foi realizado pelo método de flotação centrífuga (16).

Para a extração de nematóides, 100 g de raízes foram lavadas, cortadas em pedaços de aproximadamente 2 cm e trituradas em liquidificador, em baixa velocidade, por 10 a 20 segundos. O macerado mais o líquido foram passados em peneiras de 60 sobre 400 meshes, e o filtrado observado diretamente em microscópio ou, quando necessário, processado pelo método de Jenkins (16).

A avaliação consistiu na identificação dos gêneros de fitonematóides presentes, segundo chave de identificação de Mai & Mullin (21) e na determinação da densidade populacional de cada gênero identificado. A identificação de espécies de *Meloidogyne* fundamentou-se no modelo perineal de fêmeas adultas, segundo Chitwood et al. (10), sendo utilizada a metodologia de Taylor & Netscher (27) no preparo dos corantes e das lâminas.

A prevalência dos fitonematóides foi estimada pela quantidade de áreas com presença do nematóide em relação ao total de áreas analisadas (7).

Determinação do número de amostras para quantificação de fitonematóides em Zingiberales

Os dados obtidos no levantamento foram analisados conforme a metodologia descrita por Campbell & Madden (7). O número de amostras (n) para monitoramento foi estimado para cada área onde os fitonematóides foram observados, utilizando-se a equação: $n = S^2 / (X^2 \cdot CVx^2)$, onde X correspondeu às médias populacionais do fitonematóide; S^2 variância da média e CVx ao coeficiente de variação da média, considerando-se confiabilidades (erros aceitáveis) pré-estabelecidas de 5, 10, 15 e 20 % ($CVx = 0,05, 0,1, 0,15$ e $0,20$). Utilizando-se os dados obtidos para cada área, foi calculado o número ideal médio de amostras considerando os diferentes níveis de erro aceitáveis.

Visando comparar a influência dos níveis populacionais dos nematóides sobre o número de amostras, foi efetuada a análise de correlação de Pearson, ao nível de 5 % de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Levantamento de fitonematóides em Zingiberales ornamentais

No levantamento efetuado em áreas de cultivo de Zingiberales ornamentais, no período de 2002 a 2004, constatou-se a ocorrência dos seguintes gêneros de fitonematóides: *Pratylenchus*, *Rotylenchulus* Filip'ev, *Meloidogyne*, *Helicotylenchus* e *Criconemella* De Grisse & Loof, sendo a densidade populacional variável entre os diferentes hospedeiros avaliados (Tabela 2). Em Pernambuco, esses gêneros de fitonematóides já foram relacionados em Zingiberales (12), com exceção de *Rotylenchulus* e *Criconemella*, que não constam como parasitos de plantas da ordem Zingiberales. No Havaí *Rotylenchulus reniformis* Lindford & Oliveira é relatado parasitando *Heliconia* spp. (24), enquanto *Criconemella onoensis* Luc foi relatado na América Central parasitando *Alpinia* sp. (5). Não foi verificada a presença de *Radopholus*, outro importante gênero de fitonematóide previamente relatado por Coelho & Warumby (13).

Inserir Tabela 2.

Os níveis populacionais médios para *Meloidogyne* spp. nos diferentes hospedeiros foram elevados, variando de 0 a 374,7 espécimes/300 cm³ de solo e de 208,8 a 6089,9 espécimes/20 g de raízes; seguido de *Rotylenchulus* sp. (0 a 132,3 espécimes/300 cm³ de solo e de 0 a 402,1 espécimes/20 g de raízes); *Helicotylenchus* sp. (15,7 a 106,6 espécimes/300 cm³ de solo e de 0 a 165,9 espécimes/20 g de raízes); *Pratylenchus* sp. (0 a 29,7 espécimes/300 cm³ de solo e de 0 a 47,9 espécimes/20 g de raízes); e *Criconemella* sp. com baixos níveis populacionais (0 a 5,8 espécimes/300 cm³ de solo e de 0 a 39,0 espécimes/20 g de raízes) (Tabela 2). De forma similar, Bala & Hosein (5) em levantamentos realizados em Trinidad e Tobago observaram elevada frequência de *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood em *Alpinia* sp e *Heliconia* sp. que, segundo os autores, contribuiu para o menor crescimento das plantas e, conseqüente redução da produção de flores.

Estudos morfológicos da região perineal de fêmeas adultas identificaram o parasitismo das espécies *M. incognita*, *M. arenaria* (Neal) Chitwood e *M. javanica* (Treub) Chitwood, as quais

incitaram sintomas reflexos, como nanismo, caules finos, desfolhamento, amarelecimento, enrolamento e necrose das folhas, flores pequenas e descoloridas; e, diretos a exemplo de sistema radicular com poucas raízes e com formação de galhas, em todas as espécies de plantas analisadas neste levantamento (Figura 1). As espécies *M. incognita* e *M. javanica* são relatadas como importantes causadoras de galhas em helicônias (26), no entanto não foram encontrados relatos na literatura especializada para *M. arenaria*, sendo este, portanto, o primeiro relato de ocorrência em Zingiberales ornamentais.

Inserir Figura 1.

As associações parasíticas de *M. arenaria* em *E. elatior*; *Rotylenchulus* sp. em *A. purpurata*, *Heliconia* spp. e *M. coccinia*; e, *Criconemella* sp. em *A. purpurata* constituíram os primeiros relatos da ocorrência desses fitonematóides em áreas comerciais do estado de Pernambuco (1, 2, 3, 4). Neste estudo, destaque deve ser dado também as elevadas populações de *M. incognita* observadas em *A. purpurata* (var. Rosa, Kimi, Vermelha e Jungle King), *H. psittacorum* (var Alan Carle, Red Opol, Saci, Gold Red Adrian), *H. stricta* (var Las cruces), *H. rostrata*, *H. ortotricha* (var She), *H. chartacea* (var sexy pink), *M. coccinea*, e em associação com *M. arenaria* e *M. javanica* em *E. elatior*.

Sintomas de meloidoginose foram constatados em 100 % das áreas de plantio, indicando alta prevalência da doença nos municípios analisados, seguido de *Rotylenchulus* e *Helicotylenchus* constatados em 90 % das áreas e, em menor prevalência, *Pratylenchus* e *Criconemella*, respectivamente ocorrendo em 50 e 40 % das áreas estudadas (Tabela 3). A densidade populacional entre os gêneros de fitonematóides variou quando analisando conjuntamente às áreas de plantio. Considerando amostras de solo e raiz, a densidade populacional média de *Meloidogyne* spp. (180,78 espécimes/300 cm³ de solo e 3447,16 espécimes/20 g de raiz) foi superior a dos demais fitonematoides. Fato semelhante foi verificado por Costa et al. (14), onde espécies do gênero *Meloidogyne* predominaram em relação às demais, nas associações com plantas ornamentais de diferentes gêneros.

Inserir Tabela 3.

Em 80 % das áreas foram constatados níveis populacionais extremamente elevados de

Meloidogyne spp. variando entre 1123,71 e 7452,38 espécimes/20 g de raízes, enquanto que em apenas 20 % das áreas observou-se densidades inferiores, variando de 799,87 a 809,52 (Tabela 3). Os demais fitonematóides apresentaram níveis populacionais relativamente baixos quando comparados com *Meloidogyne* spp., entretanto a permanente manutenção de plantas infectadas no campo pode propiciar a elevação dos níveis populacionais ao longo do tempo (22). Outro fator preocupante é a comercialização de mudas infectadas por fitonematóides, as quais são fonte de inóculo primário para áreas onde estes não ocorram.

A meloidoginose encontra-se generalizada nas áreas de plantio dos municípios visitados do estado de Pernambuco, indicando uma grande adaptação do fitonematóide ao ambiente e aos hospedeiros. Os elevados níveis populacionais de *Meloidogyne* spp. no solo e raízes de Zingiberales verificados neste estudo, podem inviabilizar num futuro próximo o cultivo destas ornamentais por promover redução do crescimento das plantas e, conseqüentemente, baixíssima produção e/ou produtividade.

Determinação do número de amostras para quantificação de fitonematóides em Zingiberales

Na estimativa do número ideal de amostras para quantificação das populações dos fitonematóides em áreas de cultivo, o número de amostras a serem consideradas reduziu significativamente ($P \leq 0,05$) com a elevação do erro aceitável (Tabela 4). Considerando-se a média das 10 áreas de plantio, 340, 332, 225, 293 e 432 amostras de 300 cm³ de solo ou de 179, 330, 174, 299 e 160 amostras de 20 g de raízes, respectivamente para *Pratylenchus*, *Rotylenchulus*, *Meloidogyne*, *Helicotylenchus* e *Criconemella* parecem ser apropriadas para quantificar as populações destes fitonematóides quando o erro aceitável é de 5%, enquanto esses valores reduzem drasticamente para 21, 20, 14, 18 e 27 amostras de 300 cm³ de solo ou 11, 20, 10, 18 e 10 amostras de 20 g de raízes, respectivamente para *Pratylenchus*, *Rotylenchulus*, *Meloidogyne*, *Helicotylenchus* e *Criconemella* quando o erro aceitável se eleva para 20 %.

Inserir Tabela 4.

Na determinação do número ideal de amostras, a escolha do nível de erro a ser utilizado

depende do propósito da amostragem (11, 19). Assim, em futuros levantamentos de fitonematóides, em cada área de cultivo devem ser amostrados pelo menos 10, 10, 11, 18 e 20 amostras por área de cultivo de 1 a 3 ha, respectivamente para *Meloidogyne*, *Cricconemella*, *Pratylenchus*, *Helicotylenchus* e *Rotylenchulus*, considerando conjuntamente amostras de solo e raízes, com um nível de erro máximo de 20 %, o qual é considerado adequado em levantamentos de campo (25).

As diferenças entre os números de amostras de solo e raízes necessários para quantificar as populações do mesmo fitonematóide pode ser explicada pela variação entre as médias e as variâncias observadas entre as áreas de cultivo de zingiberales ornamentais. Neste estudo não foram verificadas correlações significativas entre as densidades populacionais dos fitonematóides e o número de amostras, como verificado em outros patossistemas por Rossi & Battilani (23) e Jong (17).

Um pressuposto básico para estimar o número de amostras é que os dados dos locais analisados são representativos do que poderia ocorrer em outros campos, sendo a validade desses pressupostos variável entre patossistemas (7). Outro aspecto importante a considerar, é que o número de amostras para quantificar as populações de fitonematóides precisa ser dinâmico, uma vez que pode variar com o progresso da doença (15, 19) e com as mudanças do arranjo espacial de plantas doentes no campo durante o desenvolvimento da doença (6, 19).

Os resultados deste estudo servem como base para futuros levantamentos de fitonematoses em Zingiberales no Estado de Pernambuco, uma vez que os dados foram originados de campos sob diferentes condições e estimados considerando necessidades crescentes de precisão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Assis, T.C.; Pedrosa, E.M.R.; Coelho, R.B.S.; Moura, R.M. Fitonematóides associados ao cultivo comercial de *Musa* ornamental nos municípios de Igarassu e Ribeirão, em Pernambuco. **Anais**, XXIV Congresso Brasileiro de Nematologia, Petrolina, PE. 2003a. p.149.
2. Assis, T.C.; Pedrosa, E.M.R.; Coelho, R.B.S.; Moura, R.M.; Cunha, A.C. Ocorrência de alta

- densidade populacional de *Meloidogyne incognita* em associação com outros fitonematóides em áreas de cultivo comercial de *Heliconia* spp. em Pernambuco. **Anais**, XXIV Congresso Brasileiro de Nematologia, Petrolina, PE. 2003b. p.148.
3. Assis, T.C.; Pedrosa, E.M.R.; Coelho, R.B.S.; Moura, R.M.; Matos, D.S.S. Ocorrência de alta densidade populacional de *Meloidogyne incognita* em associação com outros fitonematóides em áreas de cultivo comercial de *Alpinia* spp. em Pernambuco. **Anais**, XXIV Congresso Brasileiro de Nematologia, Petrolina, PE. 2003c. p.146.
 4. Assis, T.C.; Pedrosa, E.M.R.; Coelho, R.B.S.; Moura, R.M.; Medeiros, J.E. Ocorrência de alta densidade populacional de *Meloidogyne* spp. em áreas de cultivo comercial de *Etilingera elatior* em Pernambuco. **Anais**, XXIV Congresso Brasileiro de Nematologia, Petrolina, PE. 2003d. p.147.
 5. Bala, G.; Hosein, F. Plant-parasitic nematodes associated with anthuriums and other tropical ornamentals. **Nematropica**, Florida, v.26, p.9-14, 1996.
 6. Campbell, C.L.; Duthie, J.A. Sampling for disease assessment. **Biological and Cultural Tests for Control of Plant Diseases**, St. Paul, v.4, p.v-viii, 1989.
 7. Campbell, C.L.; Madden, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 532p.
 8. CEAGEPE. Mercado de flores, 2001. Recife: Companhia de Abastecimento e Armazéns de Pernambuco, 2001. Disponível em: <<http://www.ceagepe.com.br/flores/edição081.htm>> Acesso em: 4 set. 2001.
 9. Chagas, A.J.C. **Floricultura tropical na Zona da Mata de Pernambuco**. Recife: SEBRAE/PE, 2000. 24P.
 10. Chitwood, B.G.; Specht, A.W.; Havis, A.L. Reactions of peach seedlings to nematodes infections. **Phytopathology**, St. Paul, v.41, p.559, 1951.
 11. Cochran, W.G. **Sampling techniques**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1977. 428p.
 12. Coelho, R.S.B. **Laudos da seção de fitossanidade** – diagnóstico fitossanitário (2001). Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), 2001. 15f.
 13. Coelho, R.S.B.; Warumby, J.F. Doenças de plantas ornamentais tropicais detectadas na Zona

- da Mata de Pernambuco. **Floricultura em Pernambuco**, Recife, v.1, p.67-69, 2002.
14. Costa, M.J.N.; Oliveira, S.; Coelho, S.J.; Campos, V.P. Nematóides em plantas ornamentais. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v.25, p.1127-1132, 2001.
 15. Duthie, J.A.; Campbell, C.L.; Nelson, L.A. Efficiency of multistage sampling for estimating of intensity of leaf spot diseases of alfafa in field experiments. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, p.959-964, 1991.
 16. Jenkins, W.R.A. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, St. Paul, v.48, p.692, 1964.
 17. Jong, P.D. Sampling for detection: Leek rust as a example. **International Journal of Pest Management**, Oxford, v.41, p.31-35, 1995.
 18. King, J.E. Cereal survey methodology in England and Wales. In: Teng, P.S.; Krupa, S.V. (Eds.) **Crop loss assessment which constrain production and crop improvement in agriculture and forestry**. Minnesota: University of Minnesota, 1980. p.124-133. (Agricultural Experiment Station - University of Minnesota. Miscellaneous Publication, 7).
 19. Kranz, J. Measuring plant disease. In: Kranz, J.; Rotem, J. (Eds.) **Experimental techniques in plant disease epidemiology**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. p.35-50.
 20. Lordello, L.G.E. **Nematóides das plantas cultivadas**. 8. ed. São Paulo: Nobel, 1984. 314p.
 21. Mai, W.F.; Mullin, P.G. **Plant-parasitic nematodes a pictorial key to genoma**. 5.ed. New York: Cornell University Press, 1996. 277p.
 22. Moura, R.M. O gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte II. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.5, p.281-315, 1997.
 23. Rossi, V.; Battilani, P. Assessment of intensity of *Cercospora* disease on sugarbeet. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.124, p.63-66, 1989.
 24. Sewake, K.T.; Uchida, J.Y. **Diseases of heliconia in hawaii**. Honolulu: Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, 1995. 18p.
 25. Southwood, T.R.E. **Ecological methods**. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1978. 524p.
 26. Tangonan, N.G.; Quebral, F.C. **Host index of plant diseases in the Philippines**. 2. ed. St. Davao: G & G Bisling Printers, 1992. 273p.

27. Taylor, D.P.; Netscher, C. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Nematologica**, Leiden, v.20, p.268-269, 1974.
28. Tihohod, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: FUNEP/SP, 1993. 372p.
29. Whitehead, A.G. **Plant nematode control**. New York: CAB International, 1998. 384p.
30. Wood, T. Ornamental Zingiberaceae. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.1, p.12-13, 1995.

**Efeito de Indutores de Resistência sobre a Nematofauna
Associada à Rizosfera e a Atividade de β -1,3-glucanase e
Peroxidase em Bastão do Imperador**

CAPÍTULO 3

**Efeito de Indutores de Resistência sobre a Nematofauna Associada à
Rizosfera e a Atividade de β -1,3-glucanase e Peroxidase em
Bastão do Imperador**

TEREZA CRISTINA DE ASSIS^{1*}, ELVIRA MARIA REGIS PEDROSA^{1**}, RILDO SARTORI
BARBOSA COELHO¹, EGÍDIO BEZERRA NETO², DOMINGOS EDUARDO GUIMARÃES
TAVARES DE ANDRADE^{3***}, MARCOS
GREGÓRIO DE LIMA² & MARIA CLARA BORBA ESPINDOLA²

¹UFRPE, Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, 52171-900, Recife, PE. email:
crisassis@uol.com.br.; ²UFRPE, Departamento de Química, Laboratório de Bioquímica Vegetal,
52171-900, Recife, PE.; ³UFAL, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia e
Fitossanidade, Laboratório de Fitopatologia, 57100-000, Rio Largo, AL. *Bolsista CAPES.

Bolsista de produtividade do CNPq. *Bolsista CNPq.

Parte de Tese de Doutorado do primeiro autor.

Recebido para publicação em . / / . Aceito em / / .

RESUMO - Assis, T.C.; E.M.R. Pedrosa; R.S.B. Coelho; E. Bezerra Neto; D.E.G.T. Andrade; M.G. Lima & M.C.B. Spindola. Efeito de indutores de resistência sobre a nematofauna associada à rizosfera e a atividade de β -1,3-glucanase e peroxidase em bastão do imperador.

Foi estudado o efeito de indutores abióticos de resistência sobre a nematofauna associada a rizosfera e a atividade de enzimas em plantas de bastão do imperador (*Etilingera elatior*). O estudo foi desenvolvido em plantio comercial, em plantas cultivadas por um e dois anos, no período de

setembro a dezembro de 2005. Acibenzolar-S-metil (ASM), silicato de potássio e torta de nim foram utilizados como indutores, sendo analisadas as variáveis: densidade populacional de nematóides parasitos e de vida livre, curva da densidade populacional dos nematóides, área abaixo da curva da densidade populacional (AACDP), fator de reprodução (FR), diâmetro do pecíolo e atividade das enzimas β -1,3-glucanase e peroxidase. ASM induziu as melhores respostas, reduzindo as densidades populacionais, AACDP e FR de *Meloidogyne incognita* nas raízes, com resultados semelhantes aos obtidos pelo padrão de controle nematicida, sem no entanto afetar as populações de *Rhabditis* presentes no solo. Não foram verificados sintomas de fitotoxidez com nenhum dos tratamentos realizados. A ação do ASM mostrou-se mais relacionada com a produção de peroxidases do que com a atividade de β -1,3-glucanases na planta.

Palavras-chave: acibenzolar-S-metil, silicato de potássio, torta de nim, indução de resistência, Zingiberales, *Meloidogyne incognita*

SUMMARY - Assis, T.C.; E.M.R. Pedrosa; R.S.B. Coelho; E. Bezerra Neto; D.E.G.T. Andrade; M.G. Lima & M.C.B. Spindola. Effect of resistance inductors on soil and root nematode community and β -1,3-glucanase and peroxidase activity in *Etlingera elatior*.

It was evaluated the effect of resistance abiotic inductors on nematode community associated with soil and plant roots and enzyme activities in *Etlingera elatior*. The study was carried out in one and two years old plants of a commercial growing area, from September to December in 2005. Acibenzolar-S-methyl (ASM), potassium silicate and neem cake were used as inductors, being analyzed the variables: free living and plant parasitic nematodes population density, area under nematode population density curve (AUNPDC), reproduction factor (RF), diameter of plant stem, β -1,3-glucanase and peroxidase activity. ASM induced the best responses reducing *Meloidogyne incognita* density in roots, AUNPDC and FR with results similar to the nematicide control, but with no influence on the free living nematode *Rhabditis* sp. in soil. Fitotoxic symptoms were not

verified in any treatment. The action of ASM seems to be related with peroxidases rather than β -1,3-glucanases activity in the plant.

Keywords: acibenzolar-S-methyl, potassium silicate, neem cake, resistance induction, Zingiberales, *Meloidogyne incognita*

Introdução

O bastão do imperador (*Etilingera elatior* R.M. Smith), também conhecido por flor da redenção e gengibre de tocha, é uma planta ornamental tropical pertencente à família Zingiberaceae. Apresenta crescente expansão no Brasil, principalmente em Pernambuco, sendo utilizada como flor de corte e na composição paisagística de jardins e bosques (Lamas, 2002). Entretanto, a expansão da área cultivada e a importação de mudas não certificadas têm contribuído para o aumento da incidência e severidade de problemas fitossanitários na região (Warumby *et al.*, 2004).

As fitonematoses, causadas por espécies dos gêneros *Meloidogyne* Göeldi, *Radopholus* Thorne, *Helicotylenchus* Steiner e *Pratylenchus* Filip'ev, vêm constituindo um dos principais problemas fitossanitários em plantas ornamentais tropicais em Pernambuco (Coelho & Warumby, 2002; Assis *et al.*, 2006). O controle destas doenças é bastante difícil, envolvendo diversas estratégias para reduzir as populações a níveis que não afetem o desenvolvimento da hospedeira.

A resistência sistêmica induzida é uma proposta promissora para o controle de doenças, reduzindo efetivamente a dependência aos agrotóxicos e constituindo-se em método alternativo para o controle de fitonematóides (Vrain, 1999; Anwar *et al.*, 2003). Esta resistência é expressa através de resposta localizada e sistêmica, culminando com a expressão da resistência sistêmica adquirida - RSA (Vijayan *et al.*, 1998).

A RSA pode ser ativada por indutores bióticos, constituídos de raças avirulentas ou organismos não patogênicos, e indutores abióticos de natureza química diversa (Reitz *et al.*, 2000; Vasiukova *et al.*, 2001; Anwar *et al.*, 2003). O acibenzolar-S-metil foi o primeiro indutor químico a

ser usado comercialmente e tem demonstrado ser um potente ativador da RSA em diversos patossistemas (Görlach *et al.*, 1996), porém vários outros indutores também têm sido pesquisados para a ativação da RSA, tais como complexos de carboidratos, lipídeos e proteínas (Darvill & Albersheim, 1984), ácido DL- β -amino-*n*-butírico (BABA), jasmonatos, quitosana, silicatos, entre outros (Sticher *et al.*, 1997; Vasiukova *et al.*, 2001).

A interação planta-patógeno é mediada por uma complexa cadeia de eventos moleculares e citológicos que determinam a suscetibilidade e a resistência do hospedeiro. O conhecimento das alterações bioquímicas que tornam as plantas resistentes pode possibilitar o desenvolvimento de plantas transgênicas, com expressão acentuada da resistência a doença, ou novos produtos químicos que estimulem os mecanismos de defesa na planta (Ryals *et al.*, 1996). A resposta de resistência inclui a morte programada de células, produção de metabólitos secundários antimicrobianos (fitoalexinas), produção de proteínas relacionadas com a patogênese (PR-proteínas), como as quitinases e β -1,3-glucanases, proteínas RIPS, defensinas e a lignificação da parede celular (Van Loon, 1997).

Considerando a importância do bastão do imperador como uma das ornamentais tropicais mais comercializadas no estado de Pernambuco e a inexistência de informações sobre o controle de fitonematóides em Zingiberales, este trabalho teve por objetivos avaliar o efeito de indutores de resistência sobre a nematofauna associada à rizosfera de plantas de bastão do imperador, em campo, e a atividade das enzimas β -1,3-glucanase e peroxidase na planta.

Material e Métodos

Efeito de indutores abióticos de resistência sobre a nematofauna associada a rizosfera de bastão do imperador

No período de setembro a dezembro de 2005 foi desenvolvido em cultivo comercial, localizado no município de Paudalho, em Pernambuco, dois experimentos utilizando indutores abióticos de resistência, para avaliar o efeito do uso destes compostos sobre a nematofauna associada a rizosfera de bastão do imperador. Os experimentos foram conduzidos em uma área de

350 m², constituída por plantas com um (experimento 1) e dois (experimento 2) anos de cultivo, em espaçamento de 2,5 × 3,5 m.

Os indutores utilizados foram acibenzolar-S-metil (Bion 0,5 e 1,0 g do produto em solução, para touceiras de um e dois anos, respectivamente), silicato de potássio (10 e 15 mL do produto em solução, para touceiras de um e dois anos) e torta de nim (*Azadiracta indica* A. Juss) (500 e 1000 g/planta com um e dois anos), sendo testado também nematicida a base de terbufôs 5% (25 e 50 g/planta com um e dois anos), todos aplicados a 50 cm da planta. Os produtos acibenzolar-S-metil e o silicato de potássio foram diluídos em 50 L de água e distribuídos 2 L na base das touceiras, considerando as concentrações para touceiras de um e dois anos.

As coletas de raízes e solo da rizosfera foram realizadas mensalmente durante três meses e o delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 5 (acibenzolar-S-metil, silicato de potássio, torta de nim, nematicida e testemunha) × 4 (época de coleta: 0, 30, 60 e 90 dias após a aplicação dos tratamentos), com cinco repetições, cada uma constituída por uma touceira de bastão do imperador, totalizando 25 parcelas experimentais, em cada experimento. Paralelamente, foi medido o diâmetro de cinco perfilhos marcados em cada planta.

O processamento das amostras de solo (300 cm³) foi realizado pelo método de flotação centrífuga (Jenkins, 1964), enquanto para a extração de nematóides em raízes (20 g), as mesmas foram lavadas, cortadas em pedaços de aproximadamente 2 cm e trituradas em liquidificador, em baixa velocidade, por 10 a 20 segundos. O macerado mais o líquido foram passados em peneiras de 60 sobre 400 meshes, e os filtrados, processados pelo método de Jenkins (1964).

Após a determinação da densidade populacional dos gêneros de nematóide identificados, foram plotadas curvas de crescimento da densidade populacional dos nematóides e calculada a área abaixo da curva da densidade populacional (AACDP), pela expressão $AACDP = \sum (y_i + y_{i+1}) / 2 * d_{ti}$, onde y_i e y_{i+1} são os valores da densidade observados em duas avaliações consecutivas e d_{ti} o intervalo entre avaliações (Shaner & Finney, 1977), normalizadas conforme Fry (1978); e o fator de reprodução (FR), determinado pela expressão $FR = P_f / P_i$, onde P_f é a população final aos 90 dias após a realização dos tratamentos e P_i é a população inicial obtida na primeira coleta, antes de

qualquer tratamento nas plantas.

Para análise estatística os dados relativos as densidades populacionais dos nematóides foram transformados para $\log_{10}(x+1)$ e o fator de reprodução para $\sqrt{x+1}$, sendo submetidos à análise de variância, utilizando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade, para separação das médias.

Atividade de β -1,3-glucanase e peroxidase em plantas sob efeito de indutores químicos

Amostras de 1,0 g de folhas de cada tratamento obtidas aos 20 e 45 dias após a aplicação dos produtos foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido, adicionando-se 1% (v/v) de polivinilpirrolidona (PVP) e 1,0 mL de tampão acetato de potássio (50 mM/pH5,0) contendo 1mM EDTA. Os extratos foram em seguida, centrifugados a 10.000 rpm, por 10 minutos a -4°C , sendo o sobrenadante transferido para tubos de Eppendorf e armazenado a -80°C (Dann & Deverall, 2000). Os sobrenadantes foram utilizados na avaliação da atividade enzimática.

A atividade de β -1,3-glucanase foi avaliada pela dosagem da glicose liberada com a hidrólise da laminarina (Tuzun *et al.*, 1989). Para isto, pipetou-se para tubos de ensaio, 100 μL do extrato enzimático ou solução padrão de glicose na faixa de 0 a 500 mg/L, 200 μL de tampão de acetato de potássio (0,1 M/pH 4,8) e 200 μL de laminarina (15 mg/mL). Este material foi incubado a temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, acrescentou-se 1,0 mL do padrão interno de glicose e 4,0 mL do reagente analítico do ácido dinitrossalicílico (ADNS) (Miller, 1959). Em seguida os tubos de ensaio foram fechados, agitados e colocados para aquecer a 100°C por 15 minutos. Após este período foram realizadas leituras espectrofotométricas a 570 nm e comparadas com padrões de glicose, sendo a atividade da enzima expressa em mg de glicose/h. A curva padrão de glicose foi preparada como adição de padrão, da mesma forma das amostras, substituindo-se a laminarina por soluções de glicose (0-500 mg/L).

A atividade da peroxidase foi avaliada com base na diferença da absorbância produzida com a oxidação do guaiacol e concomitante redução do peróxido de hidrogênio (Dann & Deverall, 2000). Para isto, pipetou-se para uma cubeta espectrofotométrica, 50 μL de guaiacol (0,02M), 0,5 mL de

peróxido de hidrogênio (0,38M) e 2,0 mL de tampão acetato de sódio (0,1M, pH 5,0). Este material foi agitado suavemente, adicionando-se em seguida 50 µL do extrato enzimático da planta. As leituras espectrofotométricas foram efetuadas a 470 nm, intercaladas de 10 segundos, durante um minuto. Estimou-se a atividade enzimática com base na diferença de absorvância por minuto e por peso da amostra fresca, sendo expressa em Δ de absorvância/h.

Para análise estatística os valores relativos a peroxidase foram transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos submetidas ao teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Efeito de indutores abióticos de resistência sobre a nematofauna associada a rizosfera de bastão do imperador

Meloidogyne incognita (Kofoid & White) Chitwood e *Rhabditis* Dujardin sp. foram os nematóides prevalentes na área estudada. Em todas as avaliações foi verificada ocorrência em baixas frequências e densidades populacionais dos seguintes gêneros de fitonematóides: *Helicotylenchus* Steiner, *Rotylenchulus* Filip'ev, *Pratylenchus* Filip'ev e *Criconemella* De Grisse & Loof. Em relação aos nematóides de vida livre também foram verificados os seguintes gêneros: *Mononchus* Bastian, *Dorylaimus* Dujardin, *Acrobeles* Linstow e *Aphelenchus* Bastian. Fitonematóides geralmente ocorrem conjuntamente com outros nematóides, incluindo os predadores que se alimentam dos primeiros. Nematóides predadores são comuns em todos os tipos de solo, sendo considerados como promissores agentes de biocontrole. Akhtar & Mahmood (1996) verificaram que a incorporação de torta de nim ao solo favoreceu o aumento da população de nematóides predadores como *Mononchus aquaticus* Coetzee, o qual foi responsável por reduzir significativamente a incidência de nematóides das galhas em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*

Mill.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.).

As curvas cumulativas da densidade populacional de *M. incognita* e *Rhabditis* sp. mostraram que na coleta inicial, antes da aplicação dos indutores, a densidade populacional dos nematóides foi relativamente baixa (Figura 1), possivelmente devido ao excesso de chuvas nos meses que antecederam a instalação do experimento. No entanto a densidade populacional elevou-se rapidamente com o passar do tempo, principalmente na testemunha, atingindo um valor máximo de 6.746 espécimes de *M. incognita* por 20 g de raízes em plantas com dois anos de cultivo, aos 60 dias da instalação do experimento. Ainda em relação a *M. incognita*, plantas com dois anos de cultivo apresentaram maiores densidades populacionais do que plantas com um ano. O tratamento com acibenzolar-S-metil foi o mais eficaz mantendo a curva da densidade populacional de *M. incognita* nas raízes em baixos valores até o final das avaliações, em plantas com um e dois anos, sem comprometer o desenvolvimento do *Rhabditis* sp. De forma similar, Baysal *et al.* (2005) verificaram que folhas de pimentão inoculadas com *Phytophthora capsici* Leonian três dias após o tratamento com acibenzolar-S-metil apresentaram redução de 45% da severidade da doença na planta.

Considerando os dados de plantas com um e dois anos, plantas tratadas com acibenzolar-S-metil apresentaram os menores valores de AACDP e FR para *M. incognita* nas raízes, os quais diferiram significativamente da testemunha, mas sem diferir do nematicida. Essas diferenças não foram verificadas no solo (Tabela 1). Da mesma forma, a densidade populacional de *M. incognita* nas raízes foi significativamente menor com a utilização de acibenzolar-S-metil que na testemunha. Comportamento semelhante ocorreu no solo em plantas com um ano de idade, mas não em plantas com dois anos (Tabela 2).

A torta de nim também reduziu significativamente a densidade populacional de *M. incognita* no solo da rizosfera de plantas, com um e dois anos de cultivo, em relação a testemunha (Tabela 2). No entanto essas diferenças não se verificaram em raízes de plantas com um e dois anos. Akhtar (2000) verificou que a utilização de folhas ou torta de nim aumentou o crescimento de plantas quando comparado com o nematicida, no entanto a menor penetração por *M. incognita* foi verificada neste último. Para *Rhabditis* sp. não foram verificadas diferenças significativas entre os

tratamentos. Alam *et al.* (1980) verificaram que a incorporação de torta de nim ao solo reduziu significativamente o índice de galhas em raízes de tomateiro, berinjela (*Solanum melongena* L.) e pimentão, promovendo aumento do peso de raízes e caule nessas plantas, fatos também verificados em outros patossistemas (Prasad *et al.*, 1994; Akhtar, 2000). Entretanto, Siddiqui & Alan (1989) avaliando o efeito de exsudatos de raízes de nim sobre o percentual de mortalidade de diferentes espécies de fitonematóides (*Hoplolaimus indicus* Sher, *Helicotylenchus indicus* Siddiqui, *Rotylenchulus reniformis* Lindford & Oliveira e *M. incognita*), verificaram que *M. incognita* foi menos suscetível aos exsudatos da planta. Plantas de nim produzem compostos como nimbinas, salaninas, tionemone, azadiractina e vários flavonóides que têm mostrado ter ação nematicida, além disso a torta de nim suplementa a planta com a adição de nutrientes como N, P e K (Akhtar & Mahmood, 1996).

Em relação ao efeito dos tratamentos no desenvolvimento das plantas, ocorreram diferenças significativas no diâmetro do pecíolo, com os maiores diâmetros verificados nos tratamentos nematicida e torta de nim e os menores diâmetros observados na testemunha e acibenzolar-S-metil (Tabela 2).

Nas concentrações usadas neste estudo os indutores não causaram alteração visual ou fitotoxidez em folhas ou flores das plantas testadas, como verificado por Burketová *et al.* (1999) em folhas de beterraba (*Beta vulgaris* L.) quando utilizaram os indutores acibenzolar-S-metil, silicato de sódio, quitosana, paraquat e nitrato de prata. Segundo os autores, a pulverização de plantas com todas as concentrações de acibenzolar-S-metil testadas não causaram sintoma visível sobre as folhas de beterraba. Lopez & Lucas (2002), estudando a ação dos indutores acibenzolar-S-metil, ácido 2,6-dicloro-isonicotinico, ácido salicílico e fosfato dibásico de potássio quanto a habilidade para induzir resistência em sementes e folhas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) contra *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, relataram que a máxima redução da doença nas folhas, sem efeitos fitotóxicos, foi obtida com 0,3 µM de acibenzolar-S-metil; concentrações maiores causaram efeitos fitotóxicos na planta.

Atividade de β -1,3-glucanase e peroxidase em plantas sob efeito de indutores químicos

Os efeitos dos indutores de resistência e nematicida sobre a atividade de β -1,3-glucanase e peroxidase em plantas de bastão do imperador são apresentados na Tabela 3. Considerando conjuntamente os tratamentos e as diferentes épocas de avaliação (20 e 45 dias), foram verificadas interações significativas para as duas enzimas. Embora não tenham sido verificadas diferenças significativas na atividade de β -1,3-glucanase em plantas com um ano de cultivo, em plantas com dois anos de cultivo avaliadas aos 45 dias a atividade de β -1,3-glucanase foi maior em plantas tratadas com acibenzolar-S-metil diferindo significativamente da testemunha mas não do nematicida. Torta de nim e silicato de potássio não diferiram dos demais tratamentos. Similarmente, o tratamento de roseiras (*Rosa* sp. Rose) com 50 μ M de acibenzolar-S-metil resultou no aumento da proteção da planta contra *Diplocarpon rosae* F.A. Wolf, sendo acompanhado pela acumulação de várias proteínas extracelulares, com destaque para β -1,3-glucanase (Suo & Leung, 2002), que é uma das PR-proteínas envolvidas nos processos de defesa das plantas contra fitopatógenos (Thimmapuram *et al.*, 2001). De forma similar, em folhas de pimentão (*Capsicum annuum* L.) inoculadas com *Phytophthora capsici* Leonian, acibenzolar-S-metil promoveu a indução de L-fenilalanina amônia liase, o aumento do conteúdo total de fenóis e a elevada atividade das enzimas quitinase e β -1,3-glucanase, o que contribuiu para o aumento da resistência da planta contra a doença (Baysal *et al.*, 2005).

Níveis reduzidos de β -1,3-glucanase podem também estar presentes em plantas não infectadas ou não tratadas, sendo sua concentração variável, dependendo do estágio fenológico da planta (Reepka *et al.*, 1997), assim como da expressão de PR-genes devido a danos mecânicos ocorridos na planta (Nielsen *et al.*, 1994). De acordo com Baldrige *et al.* (1998) os níveis de β -1,3-glucanase foram inicialmente similares em raízes de plantas de alfafa (*Medicago sativa* L.) resistentes e suscetíveis, mas acumularam-se mais rapidamente em plantas resistentes após a infecção por *Pratylenchus penetrans* (Cobb) Chitwood & Oteifa.

A formação de proteínas induzidas pelo patógeno em plantas é uma reação importante, estando relacionada tanto com a patogênese quanto com a resposta de defesa contra o patógeno. As PR-proteínas do grupo 2 (β -1,3-glucanase) têm por função degradar a parede celular dos patógenos

e sinalizar para ativar os mecanismos de resistência em plantas, o que evidencia seu envolvimento nos mecanismos de defesa. No entanto, o envolvimento desta enzima na reação de resistência contra fitonematóides é ambíguo, ou seja, nem sempre o aumento da atividade da enzima está correlacionado com a reação de resistência na planta (Zinov'eva *et al.*, 2004).

Em plantas com um e dois anos de cultivo, considerando a primeira época de avaliação (20 dias), a atividade da peroxidase foi maior em plantas tratadas com acibenzolar-S-metil diferindo significativamente de silicato de potássio, torta de nim, nematicida e da testemunha (Tabela 3). No patossistema macieira (*Malus domestica* Bork) x *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow a proteção de mudas contra a ação da bactéria foi constantemente associada com a ativação das enzimas peroxidases e β -1,3-glucanases, sendo a acumulação destas iniciadas rapidamente nas plantas e mantidas por 17 dias após a indução com acibenzolar-S-metil (Brisset *et al.*, 2000).

Aumentos da atividade da peroxidase podem ocorrer também como consequência natural do processo de senescência, como relatado em várias plantas (Abeles *et al.*, 1988; Bartoli *et al.*, 1995; Panava & Rubinstein, 1998), ou estar diretamente envolvida como um dos mediadores na cascata de reações na planta, em resposta a estresses diversos (Minibaeva & Gordon, 2003).

O comportamento da peroxidase em plantas resistentes e suscetíveis é variável. Isoperoxidases foram detectadas em raízes de tomateiro resistente (cv. Rossol) e suscetível (cv. Roma VF), quando infectadas ou não por *M. incognita*. No entanto a atividade destas enzimas expressou-se de forma diferente nestes cultivares. Todas as plantas apresentaram naturalmente produção de isoperoxidases quando não infectadas pelo nematóide, no entanto a infecção pelo parasito aumentou rapidamente a atividade desta enzima na cultivar resistente, quando comparada com a suscetível. A infecção por *M. incognita* induziu diferentemente várias isoperoxidases na planta. A atividade de isoperoxidases foi aumentada em frações do citoplasma de raízes cinco dias após a inoculação com *M. incognita* e possivelmente contribuiu para a produção de etileno encontrado em reações compatíveis entre tomateiro e nematóides das galhas (Molinari, 1991).

Isoformas de peroxidases estão envolvidas como um importante componente de resposta a estresses em plantas, mas também podem atuar regulando os níveis de peróxido de hidrogênio nos tecidos das plantas, pelo envolvimento com a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio

(Malolepsza & Urbanek, 2000). O aumento evidente na produção de espécies de oxigênio ativo é um importante componente de resposta da planta a diversos fatores de estresse, tais como: ataque de fitopatógenos, xenobiose, ozônio, etc. Peroxidases foram consideradas como antioxidantes que protegem as células contra os efeitos danosos de peróxido de hidrogênio, embora também possam operar como oxidantes (Minibaeva & Gordon, 2003).

Neste estudo ficou evidenciado que o uso de acibenzolar-S-metil é uma importante alternativa para o manejo de *M. incognita* em Zingiberales ornamentais, pois proporcionou a manutenção dos reduzidos níveis populacionais do parasito durante os 90 dias de duração dos experimentos, além de não provocar efeitos fitotóxicos nas plantas. A utilização de elicitores para induzir a expressão da defesa em plantas é uma importante alternativa para o controle de diversas doenças pois apresenta vantagens como: (a) ecologicamente correto (o alvo é o sistema de resistência da planta, não os fitopatógenos); (b) proteção sistêmica (atuando em toda a planta); (c) multiplicidade dos caminhos envolvidos (maior dificuldade de adaptação do patógeno); e, (d) inespecificidade a patógenos (atuando em fungos, bactérias, vírus, nematóides, etc.) (Zinov'eva *et al.*, 2004).

Literatura Citada

ABELES, F.B.; L.J. DUNN; P. MORGENS; A. CALLAHAM; R.E. DINTERMAN & J. SCHMIDT. 1988. Induction of 33-kD and 60-kD peroxidases during ethylene-induced senescence of cucumber cotyledones. *Plant Physiology*, 87:609–615.

AKHTAR, M. 2000. Nematicidal potential of the neem tree *Azadiracta indica* (A. Juss). *Integrated Pest Management Reviews*, 5:57-66.

AKHTAR, M. & I. MAHMOOD. 1996. Organic soil amendments in relation to nematode management with particular reference to India. *Integrated Pest Management Reviews*, 1:201-215.

ALAM, M.M.; M. AHMAD & A.M. KHAN. 1980. Effect of organic amendments on the growth and chemical composition of tomato, eggplant and chilli and their susceptibility to attack by *Meloidogyne incognita*. *Plant and Soil*, 57:231–236.

- ANWAR, S.A.; M.V. MCKENRY; K.Y. YANG & A.J. ANDERSON. 2003. Induction of tolerance to root-knot nematode by oxycom. *Journal of Nematology*, 35:306–313.
- ASSIS, T.C. 2006. Fitonematóides associados a Zingiberales ornamentais em Pernambuco, determinação do número de amostras, efeito de indutores de resistência e avaliação de mecanismos envolvidos. 105 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- BALDRIDGE, G.D.; N.R. O’NEILL & D.A. SAMAC. 1998. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) resistance to the root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans*: defense-response gene mRNA and isoflavonoid phytoalexin levels in roots. *Plant Molecular Biology*, 38:999–1010.
- BARTOLI, C.G.; M. SIMONTACCHI; J.G. GUIAMET; E. MONTALDI & S. PUNTARULO. 1995. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation during aging of *Chrysanthemum morifolium* RAM petals. *Plant Science*, 104:161–168.
- BAYSAL, O.; C. TURGUT & G. MAO. 2005. Acibenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves. *Biologia Plantarum*, 49:599-604.
- BRISSET, M.N.; S. CESBRON; S.V. THOMSON & J.P. PAULIN. 2000. Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European Journal of Plant Pathology*, 106:529–536.
- BURKETOVÁ, L.; M. SINDELAROVÁ & L. SINDELÁR. 1999. Benzothiadiazole as an inducer of b-1,3-glucanase and chitinase isozymes in sugar beet. *Biologia Plantarum*, 42:279-287.
- COELHO, S.R. & J.F. WARUMBY. 2002. Doenças de plantas ornamentais tropicais detectadas na Zona da Mata de Pernambuco. *Floricultura em Pernambuco*, 1:67-69.
- DANN, E.K. & B.J. DEVERALL. 2000. Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. *Plant Pathology*, 49:324-332.

- DARVILL, A.G. & P. ALBERSHEIM. 1984. Phytoalexins and their elicitors – a defense against microbial infection in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35:243-275.
- FRY, W.E. 1978. Quantification of general resistance of potato cultivars and fungicide effects for integrated control of potato late blight. *Phytopathology*, 68:1650-1655.
- GÖRLACH, J.; S. VOLRATH; G. KNAUF-BEITER; G. HENGY; U. BECKHOVE; K.H. KOGEL; M. OOSTENDORP; T. STAUB; E. WARD; H. KESSMANN & J. RYALS. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell*, 8:629-643.
- JENKINS, W.R.A. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report*, 48:692.
- LAMAS, A.M. 2002. Floricultura tropical: técnicas de cultivo. SEBRAE, Recife. 88p.
- LOPEZ, A.M.Q. & J.A. LUCAS. 2002. Effects of plant defence activators on anthracnose disease of cashew. *European Journal of Plant Pathology*, 108:409–420.
- MALOLESZA, U.; H. URBANEK. 2000. The oxidants and antioxidant enzymes in tomato leaves treated with o-hydroxyethylrutin and infected with *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 106:657-665.
- MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426-428.
- MINIBAEVA, F.V. & L.K. GORDON. 2003. Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50:411–416.
- MOLINARI, S. 1991. Induction of isoperoxidases in resistant and susceptible tomato cultivars by *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 23:254-258.
- NIELSEN, K.K.; K. BOJSEN; D.B. COLLINGE & J.D. MIKKELSEN. 1994. Induced resistance in sugar beet against *Cercospora beticola*: induction by dichloroisonicotinic acid is independent of

chitinase and β -1,3-glucanase transcript accumulation. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 45:89-99.

PANAVAL, T. & B. RUBINSTEIN. 1998. Oxidative events during programmed cell death of daylily (*Heimerocalli* hybrid) petals. *Plant Science*, 133:125–132.

PRASAD, D.; D.K. NAGIA; S. KUMAR; M.L. SAINI. 1994. Integrated approach for management of plant-parasitic nematodes in brinjal, *Solanum melongena* L. *Plant Protection Bulletin*, 46:31–33.

REITZ, M.; K. RUDOLPH; I. SCHRODER; S. HOFFMANN-HERGARTEN; J. HALLMANN & R.A. SIKORA. 2000. Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:3515–3518.

REPKA, V.; I. FISHEROVÁ & G. VANEK. 1997. Immunohistochemical localization of stress-related anionic peroxidase in germinating cucumber seeds. *Biologia Plantarum*, 39:467-472.

RYALS, J.A.; U.H. NEUENSCHWANDER; M.G. WILLITS; A. MOLINA; H.Y. STEINER & M.D. HUNT. 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 8:1809-1819.

SHANER, G. & R.E. FINNEY. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, 67:1051-1056.

SIDDIQUI, M.A. & M.M. ALAM. 1989. Effect of root-exudates of neem and persian lilac on plant parasitic nematodes. *Anz. Schädlingskde, Pflanzenschutz, Umweltschutz*, 62:33-35.

STICHER, L.; B.M. MANI & J.P. METRAUX. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 35:235-270.

SUO, Y. & D.W.M. LEUNG. 2002. ASM-induced accumulation of extracellular proteins and blackspot disease in rose. *Biologia Plantarum*, 45:273-279.

THIMMAPURAM, J.; T.S. KO; S.S. KORBAN. 2001. Characterization and expression of β -1,3-glucanase genes in peach. *Molecular Genetic and Genomics*, 265:469-479.

TUNZUN, S.; N.M. RAO; U. VOGELI; C.L. SCHARDL & J. KUC. 1989. Induced systemic resistance to blue mold: early induction and accumulation of β -1,3-glucanase, chitinase, and other pathogenesis-related proteins (β -proteins) in immunized tobacco. *Phytopathology*, 79:979-983.

VAN LOON, L.C. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, 103:753-765.

VASIUKOVA, N.I.; S.V. ZINOV'EVA; L.I. IL'INSKAIA; E.A. PEREKHOD; G.I. CHALENKO; N.G. GERASIMOVA; A.V. IL'INA; V.P. VARLAMOV & O.L. OZERETSKOVSKAIA. 2001. Modulation of plant resistance to diseases by water-soluble chitosan. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya*, 37:115–122.

VIJAYAN, P.; J. SHOCKEY; A. LÉVESQUE; R.J. COOK & J. BROWSE. 1998. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95:7209-7214.

VRAIN, T.C. 1999. Engineering natural and synthetic resistance for nematode management. *Journal of Nematology*, 31:424–436.

WARUMBY, J.F.; R.S.B. COELHO & S.R.O. LINS. 2004. Principais doenças e pragas em flores tropicais no estado de Pernambuco. SEBRAE, Recife. 98p.

ZINOV'EVA, S.V.; N.I. VASYUKOVA & O.L. OZERETSKOVSKAYA. 2004. Biochemical aspects of plant interactions with phytoparasitic nematodes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40:111–119.

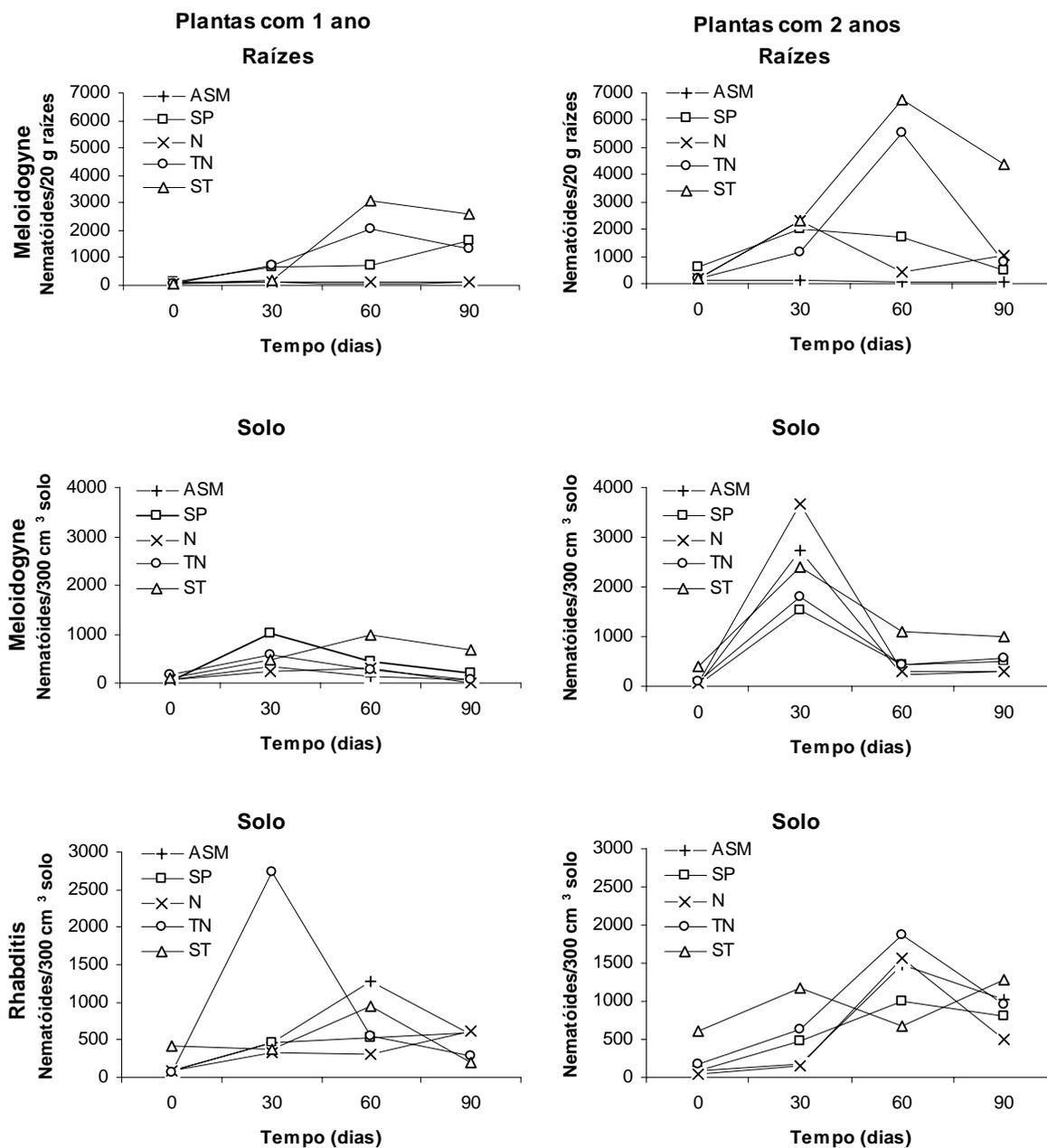


Figura 1. Curvas da densidade populacional de *Meloidogyne incognita* e *Rhabditis* sp. em plantas de bastão do imperador sem tratamento (ST) e sob efeito dos indutores de resistência acibenzolar-S-metil (ASM), silicato de potássio (SP), torta de nim (TN) e do nematicida terbufós (N).

Tabela 1. Área abaixo da curva da densidade populacional (AACDP) e fator de reprodução (FR) para *Meloidogyne incognita* e *Rhabditis* sp. em plantas de bastão do imperador sob efeito de indutores de resistência e nematicida.

Tratamento	<i>Meloidogyne incognita</i>				<i>Rhabditis</i> sp.	
	AACDP		Fr		AACDP	Fr
	Raiz	Solo	Raiz	Solo		
<i>Plantas com 1 ano</i>						
Acibenzolar-S-metil	8640 b	15720 a	4,0 bc	3,1 ab	62460 a	12,3 a
Silicato de potássio	67500 ab	46860 a	14,1 abc	9,1 ab	40320 a	19,9 a
Torna de nim	104340 ab	28980 a	28,9 ab	1,8 ab	104190 a	6,6 a
Nematicida	9900 b	18120 a	2,1 c	0,4 b	29880 a	8,8 a
Testemunha	138390 a	56460 a	77,2 a	40,9 a	49140 a	0,7 a
<i>Plantas com 2 anos</i>						
Acibenzolar-S-metil	8940 b	77130 a	1,7 b	10,7 a	65940 a	4,2 a
Silicato de potássio	128190 a	66990 a	2,2 b	16,7 a	57750 a	4,9 a
Torna de nim	213720 a	77130 a	9,2 ab	1,6 a	92100 a	6,8 a
Nematicida	100500 ab	123900 a	22,4 ab	7,9 a	59700 a	2,8 a
Testemunha	341130 a	125460 a	63,1 a	21,6 a	83850 a	4,8 a

Para análise estatística os dados obtidos da AACDP e Fr foram transformados respectivamente para $\log_{10}(x+1)$ e raiz $(x+1)$, sendo apresentadas as médias dos dados originais. Médias seguidas de mesma letra minúscula na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2. Efeito de acibenzolar-S-metil, silicato de potássio, torta de nim e terbufós sobre o diâmetro do caule e densidade populacional de *Meloidogyne incognita* e *Rhabditis* sp. em plantas de bastão do imperador.

Tratamento	Diâmetro do caule (mm)	<i>Meloidogyne incognita</i>		<i>Rhabditis</i> (espécimes /300 cm ³ de solo)
		Raiz (espécimes/ 20 g de raízes)	Solo (espécimes / 300 cm ³ de solo)	
<i>Plantas com 1 ano</i>				
Acibenzolar-S-metil	12,1 b	105,5 b	148,0 b	604,0 a
Silicato de potássio	12,8 ab	780,5 ab	421,0 ab	423,5 a
Torta de nim	13,4 ab	1040,0 ab	272,0 b	912,0 a
Nematicida	13,6 a	98,0 b	161,5 b	338,5 a
Testemunha	12,2 b	1048,5 a	571,5 a	487,0 a
<i>Plantas com 2 anos</i>				
Acibenzolar-S-metil	15,2 b	94,5 b	826,0 ab	689,5 bc
Silicato de potássio	16,6 ab	1210,5 a	626,0 b	593,5 bc
Torta de nim	17,7 a	1899,0 a	727,5 b	909,5 ab
Nematicida	17,9 a	985,0 a	1077,0 ab	566,5 c
Testemunha	16,5 ab	3419,0 a	1222,0 a	936,0 a

Para análise estatística os dados relativos às densidades populacionais dos nematóides foram transformados para $\log_{10}(x+1)$, sendo apresentada a média dos dados originais. Médias seguidas de mesma letra minúscula na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3. Efeito de acibenzolar-S-metil, silicato de potássio, torta de nim e terbufôs sobre a atividade de β -1,3-glucanase (mg de glucose/h) e peroxidase (Δ de absorvância/h) em plantas de bastão do imperador cultivadas por um e dois anos, em duas épocas de avaliação (aos 20 e 45 dias após a aplicação dos tratamentos).

Tratamento	1 ano de cultivo		2 anos de cultivo	
	Avaliação 1	Avaliação 2	Avaliação 1	Avaliação 2
	<i>β-1,3-glucanase</i>			
Acibenzolar-S-metil	31,99 a A	31,93 a A	31,93 a B	32,13 a A
Silicato de potássio	31,99 a A	31,94 a A	31,93 a B	32,09 ab A
Torta de nim	31,99 a A	31,90 a A	31,93 a B	32,10 ab A
Nematicida	31,94 a A	31,93 a A	31,95 a B	32,15 a A
Testemunha	31,96 a A	31,90 a A	31,95 a A	31,99 b A
	<i>Peroxidase</i>			
Acibenzolar-S-metil	0,564 a A	0,040 a B	1,057 a A	0,077 a B
Silicato de potássio	0,030 b A	0,150 a A	0,052 b A	0,313 a A
Torta de nim	0,027 b A	0,024 a A	0,124 b A	0,241 a A
Nematicida	0,020 b A	0,056 a A	0,098 b A	0,017 a A
Testemunha	0,010 b A	0,006 a A	0,051 b A	0,136 a A

β -1,3-glucanase (CV= 0,17%); peroxidase (CV=14,12%). Para análise estatística os dados relativos à atividade da peroxidase foram transformados para raiz ($x+0,5$), sendo apresentada a média dos dados originais. Médias seguidas de mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem significativamente entre si pelo teste de tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 1. Espécies de Zingiberales ornamentais coletados em municípios do Estado de Pernambuco

Áreas	Município	Espécies coletadas
A-01	Igarassu	<i>Etilingera elatior</i> , <i>Zingiber spectabilis</i> , <i>Alpinia purpurata</i> , <i>Musa coccinea</i> , <i>Heliconia psittacorum</i> (var. Alan Carle e Saci) e <i>H. stricta</i> (var. Las Cruses)
A-02	Igarassu	<i>E. elatior</i> , <i>H. psittacorum</i> (var. Red Opol) e <i>H. rostrata</i>
A-03	Igarassu	<i>E. elatior</i> , <i>A. purpurata</i> , <i>M. coccinea</i> , <i>H. ortotricha</i> (var. She), <i>H. psittacorum</i> (var. Red Opol e Gold Red Adrian) e <i>H. charteacea</i> (var. Sexy Pink)
A-04	Ribeirão	<i>E. elatior</i> , <i>A. purpurata</i> , <i>M. coccinea</i> e <i>H. psittacorum</i> (var. Alan Carle)
A-05	Ribeirão	<i>E. elatior</i> , <i>A. purpurata</i> e <i>H. psittacorum</i> (var. Alan Carle)
A-06	Cabo de Santo Augustinho	<i>Tapeinoquilos ananassae</i> , <i>A. purpurata</i> , <i>M. coccinea</i> , <i>H. rostrata</i> (var. Grande) e <i>H. stricta</i> (var. Faribard)
A-07	Alecrim	<i>A. purpurata</i> e <i>H. psittacorum</i> (var. Alan Carle)
A-08	Jaboatão dos Guararapes	<i>E. elatior</i> , <i>A. purpurata</i> e <i>M. coccínea</i>
A-09	Paudalho	<i>E. elatior</i> e <i>H. birrai</i>
A-10	São Lourenço da Mata	<i>A. purpurata</i> e <i>M. coccínea</i>

Tabela 2. Densidade populacional de fitonematóides associados a diferentes Zingibelaes tropicais no estado de Pernambuco

Hospedeiro	Densidade populacional ¹				
	<i>Pratylenchus</i>	<i>Rotylenchulus</i>	<i>Meloidogyne</i>	<i>Helicotylenchus</i>	<i>Criconemella</i>
Solo					
<i>Alpinia purpurata</i>	2,7	37,5	148,9	30,3	5,8
<i>Etilingera elatior</i>	29,7	59,2	135,8	15,7	0,0
<i>Heliconia</i> spp. ²	4,7	45,5	106,9	18,0	0,0
<i>Musa coccinea</i>	4,9	132,3	374,7	40,4	0,0
<i>Tapeinochilos ananassae</i>	0,0	70,6	0,0	106,6	0,0
<i>Zingiber spectabilis</i>	0,0	0,0	0,0	17,6	0,0
Raízes					
<i>Alpinia purpurata</i>	24,4	402,1	3904,2	28,4	39,0
<i>Etilingera elatior</i>	22,5	0,0	6089,9	27,5	0,0
<i>Heliconia</i> spp. ²	2,9	4,0	208,8	0,8	0,0
<i>Musa coccinea</i>	47,9	56,7	3047,8	165,9	0,0
<i>Tapeinochilos ananassae</i>	0,0	0,0	412,3	79,0	0,0
<i>Zingiber spectabilis</i>	0,0	0,0	622,1	0,0	0,0

¹ Densidade populacional média: no solo (nível populacional médio de fitonematóides avaliado em amostras de 300 cm³ de solo); nas raízes (nível populacional médio de fitonematóides avaliado em 20 g de raízes).

² *Heliconia psittacorum*, *H. stricta*, *H. rostrata*, *H. ortotricha*, *H. chartacea*, *H. birai* e *H. psittacorum* x *H. spathocircinata*.

Tabela 3. Densidade populacional de fitonematóides associados a Zingiberales ornamentais e respectivas áreas de estudo no estado de Pernambuco.

Áreas	Densidade populacional ¹				
	<i>Pratylenchus</i>	<i>Rotylenchulus</i>	<i>Meloidogyne</i>	<i>Helicotylenchus</i>	<i>Criconemella</i>
Solo					
A-01	5,89	40,44	22,66	38,45	-
A-02	8,88	59,11	231,02	56,17	-
A-03	3,52	157,28	47,97	46,10	0,88
A-04	-	13,26	51,06	4,40	-
A-05	-	4,40	124,40	31,06	4,40
A-06	-	36,68	462,13	30,47	-
A-07	-	-	346,57	8,80	-
A-08	38,00	235,53	215,33	-	11,33
A-09	40,00	13,33	193,33	16,66	-
A-10	-	53,33	113,33	20,00	6,66
Média	9,63	61,34	180,78	25,21	2,33
Raízes					
A-01	5,62	8,38	799,87	14,05	-
A-02	-	-	6.069,71	50,79	-
A-03	55,84	1,25	1.455,31	21,13	-
A-04	41,23	3,14	1.123,71	15,80	-
A-05	-	-	2.762,50	23,80	126,91
A-06	-	-	2.376,05	163,12	-
A-07	-	-	6.856,82	-	-
A-08	-	1.293,57	7.452,38	110,95	-
A-09	55,47	11,90	4.765,71	-	-
A-10	-	238,09	809,52	23,80	-
Média	15,82	155,63	3.447,16	42,34	12,69

¹ Densidade populacional média: no solo (nível populacional médio de fitonematóides avaliado em amostras de 300 cm³ de solo); nas raízes (nível populacional médio de fitonematóides avaliado em 20 g de raízes).

Tabela 4. Tamanho da amostra para quantificação de fitonematóides em zingiberales tropicais, com a confiabilidade definida pelo coeficiente de variação da média (erro).

Espécie	Média ¹	Variância ²	Erro (%) ³			
			5	10	15	20
Solo						
<i>Pratylenchus</i>	9,63	428,55	340,02	85,00	37,78	21,25
<i>Rotylenchulus</i>	61,34	2.479,04	332,20	83,05	36,91	20,76
<i>Meloidogyne</i>	180,78	23.699,57	225,20	56,30	25,02	14,08
<i>Helicotylenchus</i>	25,22	582,61	293,50	73,38	32,61	18,34
<i>Criconemella</i>	2,33	5,27	432,44	108,11	48,05	27,03
Raízes						
<i>Pratylenchus</i>	15,82	620,12	179,48	44,87	19,94	11,22
<i>Rotylenchulus</i>	155,63	23.063,00	330,33	82,58	36,70	20,65
<i>Meloidogyne</i>	3.447,16	1.510.119,64	174,06	43,51	19,34	10,88
<i>Helicotylenchus</i>	42,34	1.023,34	299,44	74,86	33,27	18,72
<i>Criconemella</i>	12,69	6.441,93	160,00	40,00	17,78	10,00

¹ Média populacional do fitonematóide em 10 áreas de plantio do Estado de Pernambuco.

² Variância (S^2) média da população de fitonematóides em 10 áreas de plantio do Estado de Pernambuco.

³ Tamanho ideal da amostra admitindo erros de 5, 10, 15 e 20, determinado conforme Campbell e Madden (1990).



Figura 1. Sintomas causados por *Meloidogyne* spp. em *Alpinia purpurata* (A e E), *Etilingera elatior* (B e F), *Heliconia* spp. (C) e *Musa coccinia* (D).

**Desenvolvimento de *Meloidogyne incognita* e alterações
enzimáticas em plantas de *Alpinia purpurata***

CAPÍTULO 4

Desenvolvimento de *Meloidogyne incognita* e Alterações Enzimáticas em Plantas de *Alpinia purpurata*

TEREZA CRISTINA DE ASSIS^{1*}, ELVIRA MARIA REGIS PEDROSA^{1**}, DOMINGOS EDUARDO GUIMARÃES TAVARES DE ANDRADE^{2***}, RILDO SARTORI BARBOSA COELHO¹, CARMEM VIRGINIA MENDONÇA AGUIAR DA SILVA¹

¹UFRPE, Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, 52171-900, Recife, PE. email: crisassis@uol.com.br.; ²UFAL, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Laboratório de Fitopatologia, 57100-000, Rio Largo, AL. email: degta@uol.com.br.;

*Bolsista CAPES. **Bolsista de produtividade do CNPq. ***Bolsista CNPq. Parte de Tese de Doutorado do primeiro autor.

Recebido para publicação em / / . Aceito em / / .

RESUMO – Assis, T.C.; E.M.R. Pedrosa; D.E.G.T. Andrade; R.S.B. Coelho & C.V.M.A. Silva. Desenvolvimento de *Meloidogyne incognita* e alterações enzimáticas em plantas de *Alpinia purpurata*.

O cultivo de *Alpinia purpurata* vem em franca expansão em Pernambuco, no entanto fitonematoses causadas por espécies do gênero *Meloidogyne* constituem um dos principais problemas no Estado. Este trabalho teve por objetivo investigar padrões protéicos e isoenzimáticos de plantas de *A. purpurata* parasitadas por *M. incognita*. Para tanto, plantas de alpinia obtidas por micro-propagação foram cultivadas em solo esterilizado e mantidas em condições de laboratório. Após a aclimação e enraizamento, as plantas foram inoculadas com 5000 juvenis do segundo estágio (J₂) de *M. incognita* e aos 2, 4, 8, 16 e 24 dias após a inoculação, determinado os estádios

de desenvolvimento dos nematóides nas raízes e variações nas enzimas esterase, fosfatase ácida e peroxidase, através de padrões eletroforéticos de isoenzimas. Plantas não inoculadas foram usadas como testemunhas. Aos dois e quatro dias após a inoculação, os nematóides encontravam-se no estágio vermiforme, aos oito dias apresentavam-se alargados, passando a globosos aos 16 dias após a inoculação. Fêmeas adultas globosas sem massas de ovos foram observadas aos 24 dias após a inoculação. Todas as plantas de alpinia parasitadas ou não por *M. incognita* apresentaram atividade isoenzimática de esterase, fosfatase ácida e peroxidase. No entanto, de maneira geral, a intensidade das bandas foi maior em plantas parasitadas, principalmente as da fosfatase ácida.

Palavras-chave: ornamentais, fosfatase, peroxidase, esterase, nematóides das galhas.

SUMMARY – Assis, T.C.; E.M.R. Pedrosa; D.E.G.T. Andrade; R.S.B. Coelho & C.V.M.A. Silva. Development of *Meloidogyne incognita* and changes in enzymatic activity on *Alpinia purpurata*.

Alpinia purpurata cropping is increasing in Pernambuco, Brasil, being the rot-knot nematodes a major problem in the state. This study had the objective of analyzing proteic eletrophoretic isozymatic pattern of the plant associated with penetration and development of *Meloidogyne incognita*. The plants were obtained by micro-propagation, cultivated in sterilized soil under laboratory conditions. After acclimatation and roots development, the plants were inoculated with 5000 second stage juveniles (J_2) of *M. incognita* and at 2, 4, 8, 16 and 24 days after inoculation it was determined nematode developmental stage in roots and esterase, acid phosphatase and peroxydase variations in plants through eletrophoretic pattern of isozymes. Non inoculated plants were used as the control. At two and four days after inoculation, nematodes were vermiform, at eight and ten days were enlarged, and globous at 16 days after inoculation. Globous femeals without egg mass were observed 24 days after inoculation. All plants (parasited or not with *M.*

incognita) induced esterase, acid phosphatase and peroxydase response but, in general, the bands intensity was higher in parasited ones, mainly of acid phosphatase.

Keywords: ornamentals, phosphatase, peroxydase, esterase, rot-knot nematode.

Introdução

Alpinia purpurata (Vieill.) Schum, é uma planta tropical pertencente a família Zingiberaceae. Cultivada há muito tempo como planta ornamental em paisagismo, vem sendo utilizada na jardinagem de parques e em residências devido à intermitente floração durante todo o ano (Castro, 1995a, 1995b). O uso potencial dessa planta como flor de corte, face a durabilidade e exuberância das inflorescências, aliada ao florescimento contínuo, contribuiu para a expansão do cultivo desta planta no estado de Pernambuco, que teve incremento em área de quase 1000 % entre os anos de 1999 e 2000 (Chagas, 2000).

Apesar das muitas vantagens e oportunidades para cultivo de *A. purpurata*, existem muitas doenças de natureza biótica que causam sérios problemas à produção, destacando-se aquelas decorrentes do parasitismo de nematóides. Fitonematoses causadas por espécies do gênero *Meloidogyne* Goeldi constituem-se um dos principais problemas fitossanitários em plantas ornamentais tropicais em Pernambuco, causando danos às raízes e, conseqüentemente, redução severa no crescimento e morte de plantas (Assis, 2006).

Nematóides parasitas de plantas segregam enzimas hidrolíticas das glândulas esofagianas que dissolvem a parede celular e componentes sólidos dos tecidos vegetais, que podem ser absorvidos pelo parasito, agindo como “enzimas digestivas”. Além disso, a formação de proteínas induzidas pelo patógeno em plantas é uma importante reação, a qual está relacionada tanto com a patogênese quanto com a resposta de defesa contra o patógeno. Muitas hidrolases foram encontradas associadas ao parasitismo de nematóides. Entre as mais comuns destacam-se celulase, protease e amilase. Estas hidrolases são a razão primária para mudanças metabólicas na planta hospedeira (Zinov'eva *et al.*, 2004).

A análise eletroforética de padrões protéicos e isoenzimáticos é muito utilizada em estudos taxonômicos de nematóides e avaliação da atividade de plantas sob estresse (Alfenas *et al.*, 1991; Zinov'eva *et al.*, 2004). A análise de isoenzimas evidencia a variação na sequência de aminoácidos da molécula protéica que tem a mesma função catalítica, detectando desta maneira a variação entre a sequência de DNA que codifica as proteínas (McDonald & McDermott, 1993).

Considerando a importância sócio-econômica de *A. purpurata* como uma das ornamentais tropicais mais comercializadas no estado de Pernambuco, o presente trabalho teve por objetivo estudar alterações enzimáticas na planta, associadas à penetração e desenvolvimento de *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood, observadas na análise eletroforética de padrões protéicos e isoenzimáticos.

Material e Métodos

Desenvolvimento de *M. incognita* em raízes de plantas de *A. purpurata*

Plantas de *A. purpurata*, obtidas por micro-propagação (EMBRAPA, Petrolina), foram cultivadas em copos descartáveis (200 mL) contendo solo esterilizado com brometo de metila e mantidas em condições normais de laboratório (UR = 60 %, T = 30±2 °C). Após a aclimação e enraizamento, aproximadamente 60 dias, as plantas foram inoculadas com 5000 juvenis (J₂) de *M. incognita*. Dois dias após a inoculação, as plantas foram removidas dos vasos, os sistemas radiculares lavados com água corrente, e transplantadas para vasos com solo esterilizado, exceto aquelas avaliadas dois dias após a inoculação, possibilitando que a penetração do nematóide fosse sincronizada para um período de 48 horas. As avaliações foram realizadas aos 2, 4, 8, 16 e 24 dias após a inoculação, quando as plantas foram cortadas na linha do solo, e as raízes (1,0 g) coradas utilizando-se a técnica descrita por Byrd *et al.* (1983). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 (plantas inoculadas e não inoculadas) x 5 (períodos de avaliação), com

cinco repetições. Para determinação do estágio de desenvolvimento dos nematóides no interior das raízes, seguiu-se o critério adotado por Sydenham *et al.* (1997): 1) vermiformes, inclui os J₂ não alargados; 2) alargados, J₂ alargados em forma de salsicha; 3) globosos, juvenis parcialmente globosos com caudas cônicas; 4) adultos, fêmeas adultas totalmente globosas com ou sem massas de ovos. Paralelamente, parte do sistema radicular de plantas inoculadas e não inoculadas foi submetida a análises químicas para estudos enzimáticos.

Padrões protéicos e isoenzimáticos em plantas de *A. purpurata* parasitadas por *M. incognita*

Na extração das enzimas do tecido vegetal do sistema radicular, previamente lavado com água corrente, foi analisado 1,0 g de raízes de plantas infectadas por *M. incognita*. A testemunha consistiu de plantas não inoculadas. Durante o processo de extração, as amostras permaneceram à baixa temperatura, para evitar a desnaturação de proteínas e, conseqüentemente, perda da atividade enzimática. A trituração foi manual, com adição de nitrogênio líquido, em almofariz de porcelana. Durante a trituração foi adicionada 0,5 g de polivinilpirolidona (PVPP) para remover compostos fenólicos e aumentar a estabilidade das enzimas. A solução extratora (sacarose (0,2 M), 2 g; PVP-40 (2,56 %), 2 g; EDTA (5 %), 1 g; 2-mercaptoetanol (0,2 %), 1 mL; e tampão Tris-HCl (pH 8,0) (trizma base (99,9 %), 12,11 g; ácido clorídrico (37 %) para titular e 500 mL de água destilada), 15 mL) foi adicionada uma alíquota de 2,0 mL para proteger as enzimas contra efeitos de metabólitos secundários liberados pela ruptura dos tecidos.

As placas de gel de poli-acrilamida a 5 % AA/BIS (acrilamida e bis-acrilamida), foram preparadas pela dissolução da acrilamida e bis-acrilamida na solução tampão tris-glicina, pH 8,2. Foram cuidadosamente adicionados à mistura 0,1 mL de TEMED (tetrametildiamina) e 2,8 mL de persulfato de amônio a 1 %. Em seguida, vertida no molde de vidro até a polimerização completa do gel. Este foi colocado numa cuba horizontal

contendo tampão tris-glicina a 0,125 M, pH 8,2, fazendo-se uso de tecido perfex como ponte de conexão. Os extratos foram aplicados, individualmente, com auxílio de micropipetas, empregando-se 20 µL de cada amostra nas cavidades do gel, procedendo-se em seguida a corrida eletroforética a 4 °C, mantendo a corrente constante em 10 mA, durante quatro horas (Alfenas *et al.*, 1991). O corante utilizado como marcador foi azul de bromofenol.

A coloração para detecção de esterase foi realizada através da imersão do gel, por uma hora a 37 °C, em uma solução corante, preparada com tampão fosfato a 0,1 M, pH 6,5 (100 mL), alfa-naftil-acetato 1 % (0,05 g), fast blue (0,05 g), acetona (2,5 mL) e água destilada (2,5 mL). Para a fixação das bandas, o gel foi imerso numa solução preparada com metanol (100 mL), ácido acético (20 mL), glicerol (0,5 mL) e água destilada (80 mL) (Alfenas *et al.*, 1991). Para detecção de fosfatase ácida o gel de poliacrilamida foi incubado em solução composta por: tampão acetato 50 mM, pH 5,5, 50 mL; β-naftilfosfato ácido de sódio 1 % em acetona 50 %, 1,5 mL; MgCl₂ 1M, 0,5 mL; e fast black K sal ou fast garnet GBC sal⁶ 50 mg, à temperatura de 30 °C por uma a cinco horas. Em seguida, a solução foi descartada e o gel fixado em glicerol 10 %. Para detecção de peroxidase o gel de poliacrilamida foi incubado em solução composta por: tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0 100 mL; 3-amino-9-etilcarbazole 50 mg, dimetilformamida (DMF) 5 mL, CaCl₂ 1 M 2 mL, H₂O₂ (3 %) 6 mL; em ausência de luz, por três horas, à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi descartada e o gel fixado em glicerol 10 %.

A secagem dos géis foi efetuada em condições normais de laboratório, por um período de 72 horas, colocando cada gel individualmente entre folhas de papel celofane, para posterior elaboração dos zimogramas. A interpretação dos zimogramas foi realizada com base no número, intensidade da coloração e posição das bandas das enzimas, no gel de poliacrilamida. Para o cálculo da mobilidade relativa (Rf) das bandas foi empregada a

fórmula $R_f = (d/D) \times 100$ (1), onde d = distância percorrida pela molécula e D = distância percorrida pelo corante marcador.

Resultados e Discussão

Na determinação do estágio de desenvolvimento dos nematóides no interior das raízes de alpínia, foi verificado que aos dois e quatro dias após a inoculação os nematóides encontravam-se no estágio vermiforme (juvenis de segundo estágio (J_2) não alargados); aos oito dias após a inoculação os indivíduos apresentavam-se alargados (J_2 alargados em forma de salsicha), e aos 16 dias após a inoculação, globosos (juvenis parcialmente globosos com caudas cônicas). Fêmeas adultas globosas sem massas de ovos foram observadas 24 dias após a inoculação.

O número médio de nematóides detectados no interior das raízes parasitadas foi de 197, 336, 88, 101 e 45 espécimes/ g de raiz) aos 2, 4, 8, 16 e 24 dias após a inoculação, respectivamente.

Todas as plantas de alpínia revelaram resposta isoenzimática de esterase, fosfatase ácida e peroxidase, variando no entanto na intensidade e mobilidade relativa das bandas, considerando plantas parasitadas ou não por *M. incognita* (Figura 1). Exsudatos de fitonematóides contém celulases, amilases e pectinases, sendo esta última possivelmente uma ferramenta importante na patogênese de fitonematoses, por atacar a parede celular e polímeros da lamela média. Além disso, a formação de proteínas induzidas pelo patógeno em plantas é uma importante reação, a qual está relacionada tanto com a patogênese quanto com a resposta de defesa contra o patógeno (Zinov'eva *et al.*, 2004).

Com relação a esterase, plantas de alpínia expressaram alta produção desta enzima a partir do quarto dia após a inoculação, no entanto não apresentaram variação quanto ao número e posição de bandas, praticamente localizadas na mesma região do gel, sendo a intensidade fraca em plantas não parasitadas e média em plantas parasitadas exceto no 16º dia que apresentou intensidade forte na inoculada (Figura 1A), embora pequena variação na mobilidade relativa tenha sido observada (Tabela 1). Neste estudo, plantas de alpínia parasitadas por *M. incognita* expressaram resposta de esterase pouco maior do que plantas não parasitadas, diferindo do observado por Montes *et al.*

(2003) que verificaram maior expressão enzimática de esterase em plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) resistentes em comparação com seus parentais suscetíveis, após a infecção de raízes por *Heterodera avenae* Wollenweber.

Em relação a fosfatase ácida, plantas de alpinia expressaram resposta para esta enzima já a partir do segundo dia após a inoculação, apresentando maior variação na intensidade (média a forte), número (uma a duas bandas) e posição de bandas, do que a esterase. A intensidade das bandas indica a atividade da enzima, que se revelou fraca em plantas não parasitadas e forte em plantas parasitadas, ocupando diferentes regiões do gel (Figura 1B). A variação na mobilidade relativa das bandas para esta enzima foi maior naquelas plantas sob influência do nematóide (Tabela 1). Os resultados demonstram que plantas de alpinia quando parasitadas por *M. incognita* desenvolvem alta expressão de fosfatase ácida, diferindo acentuadamente de plantas não parasitadas. Alguns trabalhos têm demonstrado que a fosfatase ácida pode ser um excelente marcador, devido a sua atividade, para genes de resistência em plantas de tomate infectadas por *M. incognita* (van Daelen *et al.*, 1993; Zhong *et al.*, 1999), no entanto não está clara a participação dessa enzima na patogênese ou resposta da planta.

Das enzimas estudadas, a peroxidase não se expressou em plantas sadias de alpinia, embora plantas parasitadas expressassem fraca atividade desta enzima a partir do oitavo dia. A intensidade das bandas foi a mesma em plantas com oito e 16 dias, não sendo mais observada a atividade da peroxidase em plantas aos 24 dias após a inoculação (Figura 1C). Não houve variação na mobilidade relativa das bandas para esta enzima (Tabela 1). Os resultados mostram que plantas de alpinia quando parasitadas por *M. incognita* não desenvolvem ou apresentam fraca expressão para peroxidase. Em estudos conduzidos por Molinari (1991), isoperoxidases foram detectadas em raízes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) resistente (cv. Rossol) e suscetível (cv. Roma VF), quando infectadas ou não por *M. incognita*, no entanto, a atividade destas enzimas foi expressa de forma diferente nas cultivares. Todas as plantas apresentaram naturalmente produção de isoperoxidases quando não infestadas pelo nematóide, porém a infecção pelo parasito aumentou rapidamente a atividade destas enzimas na cultivar resistente, quando comparada com a suscetível.

Peroxidases estão envolvidas na produção de superóxido e peróxido de hidrogênio. Isoformas de peroxidases estão possivelmente envolvidas na indução dos mecanismos de defesa da planta. O aumento evidente na produção de espécies de oxigênio ativo é um importante componente de resposta da planta a diversos fatores de estresse, tais como ataque de fitopatógenos, xenobióse, ozônio, etc., sendo consideradas como antioxidantes que protegem as células contra os efeitos danosos de peróxido de hidrogênio, embora, também possam atuar como oxidantes (Minibaeva & Gordon, 2003).

Neste estudo ficou evidenciado que plantas de alpínia apresentaram elevada atividade para fosfatase ácida, enquanto fraca atividade foi expressa para esterase e peroxidase. As enzimas são codificadas por diferentes alelos ou locos gênicos distintos, possuindo, frequentemente, atividades e mobilidades diferentes, sendo estas diferenças atribuídas a variações na composição de aminoácidos ou no tamanho da molécula, o que, por sua vez, depende da seqüência de nucleotídeos do DNA (McDonald & McDermott, 1993).

Literatura Citada

ALFENAS, C.A.; I. PETERS; W. BRUNE & G.C. PASSADOR. 1991. Eletroforese de proteínas e isoenzimas para identificação de espécies de fungos e essências florestais. UFV, Viçosa. 242p.

ASSIS, T.C. 2006. Fitonematóides associados a Zingiberales ornamentais em Pernambuco, determinação do número de amostras, efeito de indutores de resistência e avaliação de mecanismos envolvidos. 105 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

BYRD, D.W.; T. KIRKPATRICK & K.R. BARKER. 1983. An Improved technique for clearing and staining plant tissue for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, 14:142-143.

CASTRO, C.E.F. 1995a. Helicônia para exportação: aspectos técnicos da produção. EMBRAPA-SPI, Brasília. 44p. (Série Publicações Técnicas FRUPEX, 16).

CASTRO, C.E.F. 1995b. Inter-relações das famílias das Zingiberales. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 1:1-11.

- CHAGAS, A.J.C. 2000. Floricultura tropical na Zona da Mata de Pernambuco. SEBRAE/PE, Recife. 24p.
- MCDONALD, B.A. & J.M. MCDERMOTT. 1993. Population genetics of plant pathogenic fungi. *Bioscience*, 43:311-319.
- MINIBAEVA, F.V. & L.K. GORDON. 2003. Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50:411-416.
- MOLINARI, S. 1991. Induction of isoperoxidases in resistant and susceptible tomato cultivars by *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 23:254-258.
- MONTES, M.J.; I. LÓPEZ-BRAÑA; M.D. ROMERO; E. SIN; M.F. ANDRÉS; J.A. MARTÍN-SÁNCHEZ & A. DELIBES. 2003. Biochemical and genetic studies of two *Heterodera avenae* resistance genes transferred from *Aegilops ventricosa* to wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 107:611-618.
- SYDENHAM, G.M.; R. MCSORLEY & R.A. DUNN. 1997. Effects of temperature on resistance in *Phaseolus vulgaris* genotypes and on development of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 29:90-103.
- VAN DAELEN, R.A.J.J.; F. GERBENS; F. VAN RUISSEN; J. AARTS; J. HONTELEZ & P. ZABELL. 1993. Long-range physical maps of two loci (Aps-1 and GP79) flanking the root-knot nematode resistance gene (Mi) near the centromere of tomato chromosome 6. *Plant Molecular Biology*, 23:185-192.
- ZHONG, X.B.; J. BODEAU; P.F. FRANSZ; V.M. WILLIAMSON; A. VAN KAMMEN; J.H. JONG & P. ZABEL. 1999. FISH to meiotic pachytene chromosomes of tomato locates the root-knot nematode resistance gene Mi-1 and the acid phosphatase gene Aps-1 near the junction of euchromatin and pericentromeric heterochromatin of chromosome arms 6S and 6L, respectively. *Theoretical and Applied Genetics*, 98:365-370.
- ZINOV'EVA, S.V.; N.I. VASYUKOVA & O.L. OZERETSKOVSKAYA. 2004.

Biochemical aspects of plant interactions with phytoparasitic nematodes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40:111–119.

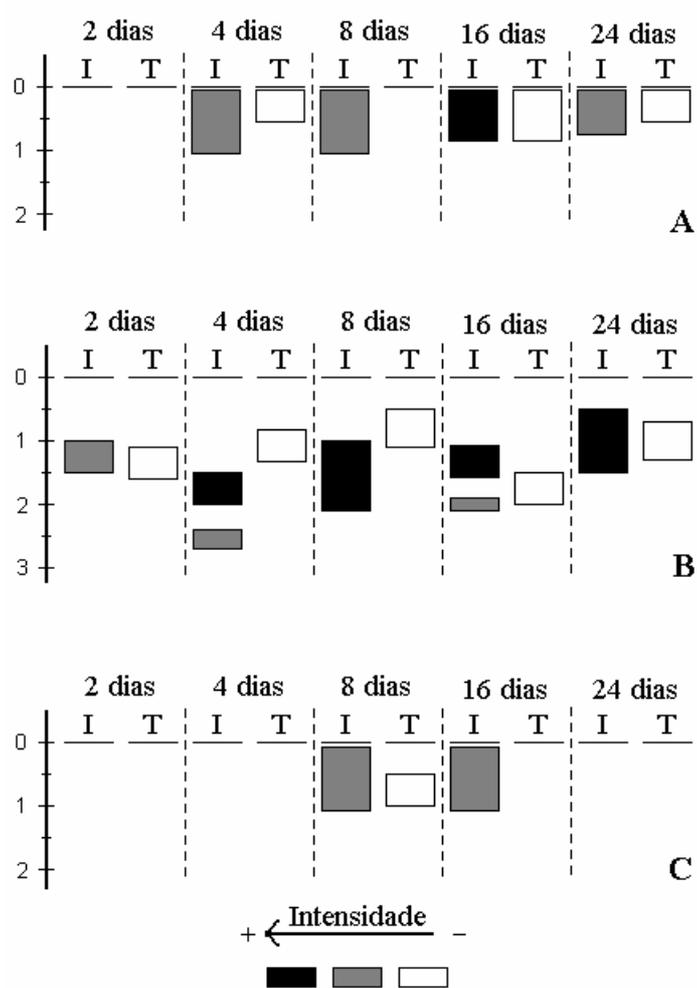


Figura 1. Zimograma dos padrões eletroforéticos de esterase (A), fosfatase ácida (B) e peroxidase (C) em plantas de *Alpinia purpurata* infectadas (I) e não infectadas (T) por *Meloidogyne incognita*, aos 2, 4, 8, 16 e 24 dias após a inoculação, em gel de poliacrilamida.

Tabela 1. Mobilidade relativa* das bandas de esterase, fosfatase ácida e peroxidase, em plantas de *Alpinia purpurata* infectadas (I) e não infectadas (T) por *Meloidogyne incognita*, aos 2, 4, 8, 16 e 24 dias após a inoculação.

Região do gel	Dias após a inoculação									
	2 dias		4 dias		8 dias		16 dias		24 dias	
	I	T	I	T	I	T	I	T	I	T
	<i>Esterase</i>									
1	-	-	20,0*	10,0	20	-	16,0	16,0	14,0	12,0
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Fosfatase ácida</i>									
1	25,0	26,7	33,3	21,66	35,0	18,33	26,7	33,3	25,0	21,66
2	-	-	45,0	-	-	-	35,0	-	-	-
	<i>Peroxidase</i>									
1	-	-	-	-	16,7	16,7	16,7	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Mobilidade relativa obtida pela fórmula: $Rf = (d/D) \times 100$ (Alfenas *et al.*, 1991). (-) Não apresentou bandas.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

Os nematóides mais freqüentes associados a Zingiberales ornamentais (*Etilingera elatior*, *Zingiber spectabilis*, *Alpinia purpurata*, *Musa coccinea*, *Tapeinoquilos ananassae* e *Heliconia* spp.), em Pernambuco, pertencem aos gêneros: *Pratylenchus*, *Rotylenchulus*, *Meloidogyne*, *Helicotylenchus* e *Criconemella*.

O nematóide das galhas de encontra disseminado em todas as áreas de plantio de Zingiberales visitadas no estado de Pernambuco.

Para monitorar flutuações populacionais dos gêneros *Pratylenchus*, *Rotylenchulus*, *Meloidogyne*, *Helicotylenchus* e *Criconemella*, em áreas de plantio de zingiberales, são necessárias pelo menos 11, 20, 10, 18 e 10 amostras, respectivamente.

As associações *M. arenaria* × *E. elatior*, *Rotylenchulus* sp. × *A. purpurata*, *Heliconia* spp. e *M. coccinea*, e *Criconemella* sp. × *A. purpurata* constituem patossistemas em Pernambuco, relatados pela primeira vez no presente estudo.

A aplicação de acibenzolar-S-metil reduziu as densidades populacionais, área abaixo da curva da densidade populacional e fator de reprodução de *M. incognita* e não promoveu o aparecimento de sintomas de fitotoxidez em plantas de bastão do imperador.

A ação do acibenzolar-S-metil mostrou-se mais relacionada com a produção de peroxidases do que com a atividade de β -1,3-glucanases em plantas de bastão do imperador.

O estágio de desenvolvimento de *M. incognita* influencia a atividade enzimática das plantas de *A. purpurata*.

O parasitismo de *M. incognita* em alpinia acentua a expressão izoenzimática de esterase, fosfatase ácida e peroxidase.

A atividade da fosfatase ácida foi maior que esterase e peroxidase em plantas de alpinia infectadas por *M. incognita*.

