**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Meloidoginoses da cultura do tabaco: identificação de espécies,
caracterização de isolados e reação de genótipos de *Nicotiana* spp. a
*Meloidogyne enterolobii***

Jerônimo Vieira de Araújo Filho

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de Concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2012**

Jerônimo Vieira de Araújo Filho
Engenheiro Agrônomo

Meloidoginoses da cultura do tabaco: identificação de espécies, caracterização de isolados e reação de genótipos de *Nicotiana* spp. a *Meloidogyne enterolobii*

Orientador:
Prof. Dr. **LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO**

Tese apresentada para obtenção do título
de Doutor em Ciências. Área de Concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Araújo Filho, Jerônimo Vieira de

Meloidoginoses da cultura do tabaco: identificação de espécies, caracterização de isolados e reação de genótipos de *Nicotiana* spp. a *Meloidogyne enterolobii* / Jerônimo Vieira de Araújo Filho. - Piracicaba, 2012.
90 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Fumicultura 2. Fumo 3. Melhoramento genético vegetal 4. Meloidoginose
5. Nematóide 6. Resistência de plantas I. Título

CDD 633.71
A663m

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A meus pais e irmãos,
Aos meus professores e amigos,
A Andressa C. Z. Machado (em especial)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao “povo brasileiro”,

A pesquisadora e grande amiga **Dr^a Andressa Cristina Zamboni Machado**, pessoa impar, não apenas pelo incondicional apoio em todas as etapas deste estudo, mas principalmente pelo enriquecimento pessoal e amável convivência ao longo destes cinco anos,

À **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, ESALQ, Campus de Piracicaba, onde cursei mestrado e doutorado, pela grande oportunidade,

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo apoio financeiro,

Ao professor **Dr Luis Eduardo Aranha Camargo** pela orientação, agradável amizade e boa convivência,

Ao “Mestre” **Dr Luiz Carlos Camargo Barbosa Ferraz**, nematologista singular, docente de quilate, pela formação primária, pelos bons conselhos e grande amizade,

Aos grandes e eternos amigos do Laboratório de Genética Molecular (LGM): **Fernanda Raquel, Débora Wassano, Raphael Severo, Bruno Lima, Mariana Cia, Adalgisa Thayne, Rafael Popin, Thais Egreja, Giselle de Carvalho, Máisa Curtolo e Aline Zavaglia**, pela inestimável convivência, ornamentada de muitos risos e regada com agradáveis conversas,

Ao grande amigo e fitopatologista **Dr Leandro José Dallagnol** pela amizade e pela grande ajuda na etapa de microscopia eletrônica de varredura,

Aos grandes amigos da Zoologia, **Sônia Antedomenico, Mauro F. Bonfim Junior, Kércya M. S. Siqueira, Vitalis W. Wekesa, José Luiz F. Piedade e Fernando Rodrigues**,

Ao **Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura (NAP/MEPA)** pelo apoio,

Aos professores e amigos da Universidade de Rio Verde (FESURV), **Ms. Luis Henrique Carregal Pereira da Silva** e **Dr Hércules Campos Diniz**, pelos ensinamentos e incentivos decisivos,

Aos grandes amigos da graduação, **Júlio C. Farias**, **Pedro C. da Luz Junior**, **Wainer G. Gonçalves** e **Claudete Baumgratz**,

A professora **Dr^a Rosangela D'Arc de Lima Oliveira**, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), pelo envio de sementes de espécies diferenciadoras,

Aos demais professores e funcionários do **Departamento de Fitopatologia e Nematologia**, pelos ensinamentos e demais serviços prestados,

Ao pesquisador **Dr Carlos Eduardo Puccinelli** e demais funcionários da empresa **Souza Cruz S. A**, pelo auxílio na elaboração deste estudo,

Aos funcionários da **Seção de Pós-Graduação** e da **Biblioteca**, por todos os serviços que prestaram na elaboração desta obra,

Em suma, a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para realização desta obra.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
Referências	20
2 INCIDÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>MELOIDOGYNE</i> EM CULTIVARES DE TABACO PORTADORES DO GENE <i>Rk</i> NA REGIÃO SUL DO BRASIL.....	21
Resumo	21
Abstract.....	21
2.1 Introdução	22
2.2 Material e Métodos	24
2.2.1 Estabelecimento e Manutenção de populações e isolados.....	24
2.2.2 Análises morfológicas e bioquímicas de populações de <i>Meloidogyne</i>	25
2.2.3 Análise da sequência da região parcial 18S -ITS1 -5.8S.....	26
2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	28
2.2.5 Caracterização patogênica de isolados monoespecíficos em hospedeiros diferenciais...	28
2.2.6 Caracterização morfométrica de isolados monoespecíficos	29
2.3 Resultados.....	30
2.3.1 Fenótipos de α -esterase.....	30
2.3.2 Análise das populações com base em configurações perineais.....	31
2.3.3 Sequenciamento da região 18S-ITS1-5.8S	38
2.3.4 Caracterização patogênica de isolados	41
2.3.5 Caracterização morfométrica de isolados.....	44
2.4 Discussão	53
2.5 Considerações finais	60
Referências	61
3 AVALIAÇÃO DE ACESSOS DE <i>Nicotiana</i> spp. PARA RESISTÊNCIA A <i>Meloidogyne enterolobii</i> (Nematoda: Tylenchoidea).....	71
Resumo	71
Abstract.....	71
3.1 Introdução	72
3.2 Material e Métodos	73
3.2.1 Material vegetal	73

3.2.2 Ensaio de avaliação da resistência.....	76
3.2.3 Análises estatísticas.....	77
3.3 Resultados e Discussão	78
3.4 Considerações finais	87
Referências.....	87

RESUMO

Meloidoginoses da cultura do tabaco: identificação de espécies, caracterização de isolados e reação de genótipos de *Nicotiana* spp. a *Meloidogyne enterolobii*

Espécies de *Meloidogyne* constituem o principal grupo de fitonematoides causadores de doenças em plantas. São espécies polífagas, distribuídas mundialmente e que se reproduzem profusamente nas mais variadas culturas agrícolas. O fumo não figura exceção, sendo severamente afetado por tais vermes. Globalmente, o controle destas moléstias é realizado essencialmente pela incorporação, em cultivares comerciais, de um único gene de resistência encontrado em *Nicotiana tomentosa* (gene *Rk*) e sabidamente efetivo contra às raças 1 e 3 de *M. incognita*. Todavia, a frequente ocorrência de plantas sintomáticas em cultivos nacionais sugere a existência de outros genótipos de *Meloidogyne* como agentes etiológicos da doença atualmente. Neste ensejo, realizou-se, no presente estudo, um levantamento das espécies de *Meloidogyne* ocorrentes em 39 áreas de plantio de fumo na região Sul do Brasil, em cultivares portadoras do gene *Rk*. Para isto, populações oriundas de raízes infectadas foram estabelecidas e mantidas em plantas de tomate e indivíduos das mesmas foram identificados em nível de espécie por meio da análise de isoenzimas (α -esterases), da observação de configurações perineais e do sequenciamento da região 18S-ITS1-5.8S do RNA ribossomal. Isolados obtidos a partir destas populações foram estabelecidos a partir de uma única massa de ovos, mantidos em plantas de tomate, agrupados em espécies com base nestes resultados e analisados quanto à patogenicidade em hospedeiros diferenciais e frente a várias características morfométricas. Identificaram-se *M. incognita* em dezoito amostras (46,2%), *M. enterolobii* em dez (25,6%), *M. javanica* em treze (33,3%), *M. arenaria* em duas (5,1%) e *M. inornata* em uma (2,6%). Populações mistas também foram encontradas (25,6%). Duas populações (5,1%) morfológica e bioquimicamente atípicas (LGM 27 e LGM 38) foram encontradas, mas com espectro de patogenicidade e sequências de 18S-ITS1-5.8S idênticas a *M. enterolobii* e *M. incognita*, respectivamente. Variações intra-específicas foram observadas sob o âmbito patogênico e morfométrico, porém geralmente próximas às suas descrições originais. *M. incognita* raça 2 foi predominante (79%) e variantes de *M. enterolobii* foi fato comum (40%). Tendo em vista a elevada ocorrência de *M. enterolobii* neste levantamento e a escassez de informações acerca de fontes de resistência a esta espécie, buscou-se, também, caracterizar, com base em índice de galhas (IG), a reação (resistência/suscetibilidade) de 97 acessos perante *M. enterolobii*. Destes, 7 genótipos (J102007T10, J1612008T12, J1612008T34, I112008T97, I112008T98, I112008T99 e I112008T100) foram identificados e avaliados em um segundo experimento. Estes mostraram-se como fontes promissoras de resistência, haja vista que exibiram valores baixos de severidade (IG<1,0). Diante dos resultados, depreende-se a necessidade de incluir resistência a biótipos virulentos, máxime raça 2, de *M. incognita*, a *M. javanica*, a *M. arenaria* e a *M. enterolobii* em cultivares comerciais. Sob este aspecto, este estudo definiu fontes de resistência para *M. enterolobii*, constituindo informação inédita na literatura fitonematológica.

Palavras – chave: *Meloidogyne* spp.; Resistência de plantas; Fumicultura; Melhoramento genético; Nematóide; Tabaco

ABSTRACT

Meloidogyne diseases in tobacco crops: identification of species, characterization of isolates and evaluation of *Nicotiana* spp. accessions for resistance to *Meloidogyne enterolobii*

Meloidogyne species are undoubtedly the major group of plant parasitic nematodes. *Meloidogyne* species are polyphagous, worldwide distributed and reproduce profusely in various agronomical crops. Tobacco crop is not an exception, being severely affected by these worms. Worldwide, the control of these diseases is based mainly on the incorporation in commercial cultivars of a single resistance gene found in *Nicotiana tomentosa* (gene *Rk*) and known to be effective against races 1 and 3 of *M. incognita*. However, the frequent occurrence of symptomatic plants in tobacco crops suggests the existence of other genotypes of *Meloidogyne* as etiological agents of the disease today. Therefore, our study aimed to perform a survey of *Meloidogyne* species occurring in 39 tobacco growing areas in Southern Brazil, in cultivars carrying the *Rk* gene. For this, *Meloidogyne* populations obtained from infected roots were established, maintained on tomato plants and specimens were identified at specific level by isoenzyme analysis (α -esterase), by analysis of perineal patterns and by sequencing of the 18S- ITS1-5.8S ribosomal RNA region. Isolates obtained from these populations were established from a single egg mass, maintained in tomato plants, grouped into species based on these results and analyzed for host range (pathogenicity) and several morphometric characteristics. From the total of samples, eighteen (46.2%) contained *M. incognita*, ten (25.6%) *M. enterolobii*, thirteen (33.3%) *M. javanica*, one (2.6%) *M. arenaria* and one (2.6%) *M. inornata*. Mixed populations were also found in 25.6% of the samples. Two populations (LGM 27 e LGM 38) (5.1%) were morphologically and biochemically atypical, but with host ranges and ITS1-5.8S-18S sequences identical to *M. enterolobii* and *M. incognita*, respectively. Intraspecific variations were observed in relation to host range and morphometric characters, but usually close to their original descriptions. *M. incognita* race 2 was predominant (79%) and strains of *M. enterolobii* were common fact (40%). Due to the high incidence of *M. enterolobii* found in this survey and the absence of information about resistance sources to this species, we characterized, based on gall index (GI), the reactions (resistance/susceptibility) of 97 accession of *Nicotiana* spp. to *M. enterolobii*. Seven genotypes (J102007T10, J1612008T12, J1612008T34, I112008T97, I112008T98, and I112008T99 I112008T100) were identified and evaluated in a second experiment. These were considered promising sources of resistance, once they exhibited low severity values (IG <1.0). From of our results, it is obviously necessary to include resistance to virulent biotypes (mainly race 2) of *M. incognita*, *M. javanica*, *M. enterolobii* and *M. arenaria* in commercial cultivars. This study defined resistance sources for *M. enterolobii* thus providing novel information for the literature related to plant nematodes.

Keywords: *Meloidogyne* spp; Plant resistance; Tobacco farming; Plant breeding; Nematodes; Tobacco

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática da organização geral do DNA ribossômico em eucariotos28
- Figura 2 - Fenótipos de α -esterases observados em populações de *Meloidogyne* coletadas na cultura do fumo na região sul do Brasil. Listras pretas significam isoformas principais (sempre nítidas) e azuis, secundárias31
- Figura 3 - Configurações perineais típicas observadas em populações de *Meloidogyne* encontradas na cultura do fumo no sul do Brasil. Fotografias retiradas a partir de microscopia de luz (à esquerda) e microscopia eletrônica de varredura (à direita). *M. javanica* (A), *M. incognita* (B), *M. enterolobii* (C), *M. inornata* (D), *M. arenaria* (E), *M. sp. 1* (F), *M.sp.2* (G)35
- Figura 4 - Alinhamento de sequências da região ITS1 de indivíduos oriundos de populações de *Meloidogyne* coletados em cultivares de fumo no Sul do Brasil39
- Figura 5 - Árvore filogenética (UPGMA) resultantes do alinhamento das sequências da região ITS1 das diversas populações de *Meloidogyne* spp. deste estudo. Valores de bootstrap suportam mais de 70% para formação do agrupamento40
- Figura 6 - Scarterplot e dendograma obtidos a partir de dados morfométricos de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp. submetidos a análise de componentes principais. Indivíduos de 1-10 (*Me*); 11-23 (*Mj*); 24-37 (*Mi*); 38(*Ma*); 39(*Min*); 40(LGM 38); 41(LGM 27)51
- Figura 7 - Gráfico heplot mostrando (di) similaridade morfométrica entre juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne* através da análise canônica discriminante (CA)52
- Figura 8 - Scarterplot e Dendograma obtidos a partir de dados morfométricos de machos de *Meloidogyne* spp. submetidos a análise de componentes principais. Indivíduos de 1-10 (*Me*); 11-22 (*Mj*); 24-36 (*Mi*); 37(*Ma*); 38(*Min*); 39(LGM 38); 40(LGM 27) ...53
- Figura 9 - Gráfico heplot mostrando (di) similaridade morfométrica entre juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne* através da análise canônica discriminante (CA)53
- Figura 10 - Distribuição de espécies de *Meloidogyne* identificadas em plantas de fumo infectadas oriundas de áreas produtoras da região sul do Brasil57
- Figura 11 - Histograma exibindo a pronunciada frequência de indivíduos suscetíveis no primeiro ensaio.....83

Figura 12 - Histograma exibindo a pronunciada frequência de indivíduos suscetíveis no primeiro ensaio 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Origens de amostras de raízes sintomáticas de fumo utilizadas para o estabelecimento de populações de nematoides e de culturas monoespecíficas de <i>Meloidogyne</i>	25
Tabela 2 - Iniciadores universais utilizados nas reações de PCR (VRAIN et al., 1992; CHERRY et al., 1997)	27
Tabela 3 - Espécies de <i>Meloidogyne</i> encontradas infectando cultivares de fumo portadoras do gene <i>Rk</i>	36
Tabela 4 - Isolados LGM, suas respectivas identidades específicas e reações em hospedeiros diferenciais	43
Tabela 5 - Análise morfométrica de juvenis de segundo estágio (J2) de espécies de <i>Meloidogyne</i> obtidos em campos de tabaco na região sul do Brasil.....	45
Tabela 6 - Análise morfométrica de machos de espécies de <i>Meloidogyne</i> obtidos em campos de tabaco na região sul do Brasil	48
Tabela 7 - Lista de genótipos de <i>Nicotiana</i> spp. avaliados, sob condições de casa de vegetação, para resistência a <i>M. enterolobii</i> no experimento 1	75
Tabela 8 - Modelo da análise de variância (ANOVA) para resposta de acessos de <i>Nicotiana</i> a <i>M. enterolobii</i> no primeiro experimento	77
Tabela 9 - Índice de Galhas (IG) e tipo de reação de acessos de <i>Nicotiana</i> spp. a <i>M. enterolobii</i> avaliados sob condições de casa-de-vegetação (experimento 1).....	79
Tabela 10 - Índice de Galhas (IG) e tipo de reação de acessos de <i>Nicotiana</i> spp. a <i>M. enterolobii</i> avaliado sob condições de casa-de-vegetação (experimento 2)	82
Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA), estimativas de componente quadrático, variância ambiental, coeficiente de variação genético, coeficiente variação ambiental e índice de variação (θ) obtidas para dados de IG em acessos de <i>Nicotiana</i>	84

1 INTRODUÇÃO

Nicotiana tabacum L. é, presentemente, a espécie agrícola não alimentícia de maior importância no cenário econômico internacional. O Brasil, especificamente, figura não apenas como segundo maior produtor mundial, mas também como o maior exportador da folha processada (SINDITABACO, 2012). A produção total na última safra (2010/11) foi de aproximadamente 867 mil toneladas. Neste particular, a região sul responde por aproximadamente 96% da produção nacional, enquanto a região nordeste responde por apenas 4% (ABIFUMO, 2012). Este universo integra aproximadamente 870 mil pessoas diretamente em seu ciclo produtivo, somando uma receita anual bruta de R\$ 4,1 bilhões (AFUBRA, 2012).

Não obstante, a despeito do aprimoramento das diversas técnicas de cultivo, assim como ocorre com várias outras culturas de interesse econômico, o modelo de exploração agrícola está alicerçado, em sua essência, na utilização de uma estreita base genética (SANTOS, 2002) aliada ao cultivo intensivo; estes fatores, entre outros aspectos, concorrem, via de regra, para o aparecimento e/ou intensificação de diversos problemas de ordem sanitária, abrangendo inúmeras plantas daninhas, pragas e doenças. Dentre as enfermidades, aquelas incitadas por nematoides ocupam hoje posição de incontestável relevo, quer seja pela severidade dos danos causados, quer seja pela ampla distribuição geográfica de tais organismos ou mesmo pelo seu difícil manejo. Em tal cenário, particularmente no Brasil, as meloidoginoses se destacam, indubitavelmente, pois causam elevadas perdas na cultura do fumo (LORDELLO, 1986; SUDO, 1997).

Assim, tendo em vista a importância que patologias desta natureza representam para a fumicultura nacional, torna-se imprescindível o desenvolvimento de táticas de manejo que proporcionem condições de convivência com estes organismos e que, simultaneamente, possibilitem significativa redução nas perdas a eles devidas. Diante do quadro acima delineado e partindo da premissa de que a utilização de nematicidas é limitada pelo apelo da sustentabilidade ambiental e que o controle cultural é, frequentemente, alternativa pouco atrativa em termos econômicos, tem-se buscado priorizar a resistência genética como ferramenta chave no manejo destes vermes fitoparasitos (WEISCHET; BROWN, 2001; YI et al., 1998).

Desta forma, é evidente que o controle genético destes patógenos, assim como qualquer outra ferramenta que venha a ser adicionada ao manejo integrado de nematoses

(MIN), tende a ser mais eficiente caso seja fundamentado em levantamentos que contemplem não apenas a identificação, mas também a distribuição e caracterização das principais espécies parasitas ocorrentes nas principais regiões produtoras da cultura em apreço. Contudo, no caso do fumo brasileiro, este levantamento atualizado e sistemático infelizmente inexistente até o momento, não se dispondo, pois, de subsídios suficientes para prescrição de métodos eficientes de controle.

Em face deste cenário, desenvolveu-se o presente trabalho com o objetivo de realizar um levantamento, com base em caracterizações morfológicas, morfométricas, bioquímicas, patogênicas e moleculares, das espécies de *Meloidogyne* ocorrentes nas principais regiões produtoras de fumo da região sul do Brasil. Além disso, com base nos resultados deste levantamento, o trabalho objetivou também caracterizar, baseando-se em índice de galhas (IG), as reações de acessos de fumo à *M. enterolobii*, espécie polífaga e que se mostrou emergente, de ampla ocorrência e com elevado potencial de causar perdas na cultura.

Referências

- ABIFUMO. **Associação Brasileira da Indústria do Fumo**. Disponível em: <<http://www.abifumo.com.br>>. Acesso em: 28 fev.2012.
- AFUBRA. **Associação dos Fumicultores do Brasil**. Disponível em: <http://www.afubra.com.br>>. Acesso em: 28 fev. 2012.
- LORDELLO, L.G.E. **Nematóides das plantas cultivadas**. 8 ed. São Paulo: Nobel, 1986.p. 314.
- SANTOS, M. **Caracterização fenotípica e molecular de genótipos de fumo utilizados no sul do Brasil**. 2002. 122p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- SINDITABACO. **Sindicato Interestadual da Indústria do Tabaco**. Disponível em: <<http://www.sindifumo.com.br>> . Acesso em: 28 fev. 2012.
- SUDO, S. Problemas nematológicos na cultura do fumo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA., 20., 1997. Gramado RS. **Resumos...**, (Palestra) Gramado RS, 1997. p.46-47.
- WEISCHET, B.; BROWN, D.J.F. **Conhecendo os nematóides**: Nematologia geral. Moscou: Pensoft, 2001.p. 209.
- YI, H.Y.; RUFT, R.C.; WERNSMAN, E.A.; CONKLING, M.C. Mapping the root knot nematode resistance gene (*Rk*) in Tobacco with RAPD markers. **Plant Disease**, Saint Paul, v.82, n.12, p.1319-1322, 1998.

2 INCIDÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *MELOIDOGYNE* EM CULTIVARES DE TABACO PORTADORES DO GENE *Rk* NA REGIÃO SUL DO BRASIL

Resumo

A fumicultura é, sem dúvida, uma das atividades agrícolas de maior relevância na região sul do Brasil. Todavia, existem diversos fatores limitantes à sua produção, tais como a incidência de *Meloidogyne* spp. Neste ensejo, realizou-se um levantamento de espécies de *Meloidogyne* ocorrentes em amostras vegetais de cultivares portadoras do gene *Rk*, o qual confere resistência às raças 1 e 3 de *M. incognita*, provenientes de 39 áreas produtoras de fumo da região sul do Brasil. A identificação baseou-se na análise de zimogramas de α -esterases, de padrões perineais e da sequência parcial da região 18S-ITS1-5.8S do RNA ribossomal. No mais, caracterização morfométrica e patogênica de isolados monoespecíficos obtidos da maioria das populações também foram determinadas. Do total das amostras, dezoito (46,2%) continham *M. incognita*, dez (25,6%) *M. enterolobii*, treze (33,3%) *M. javanica*, duas (5,1%) *M. arenaria* e uma (2,7%) *M. inornata*. Em 25,6% das amostras foram encontradas mais de uma espécie. Duas populações, denominadas LGM 27 e LGM 38, apresentaram características morfológicas e bioquímicas atípicas, mas espectro de patogenicidade e sequências de 18S-ITS1-5.8S idênticas a *M. enterolobii* e *M. incognita*, respectivamente. Variações intra-específicas entre isolados foram observadas no âmbito patogênico e morfométrico, porém geralmente próximas às suas descrições originais. Depreende-se, portanto, que, em face da eficiência do gene *Rk* ser restrita às raças 1 e 3 de *M. incognita*, é imprescindível não apenas a busca de fontes de resistência a isolados virulentos de *M. incognita* (máxime raça 2), mas também a necessidade de contemplar resistência a outras espécies, tais como *M. enterolobii*, *M. inornata*, *M. arenaria* e *M. javanica* em programas de melhoramento de fumo. Em adição a isto, profundas alterações no planejamento do manejo integrado, tais como rotação de culturas, devem ser consideradas futuramente em áreas infestadas.

Palavras – chave: Nematoses; Isoenzimas; Região ITS1; Morfologia; *Nicotiana tabacum*

Abstract

Tobacco is one of the most important crops in southern Brazil. However, there are several factors that limit its productivity, such as the incidence of *Meloidogyne* species. Our study surveyed *Meloidogyne* spp. from cultivars carrying the *Rk* resistance gene, which confers resistance to races 1 and 3 of *M. incognita*, sampled from 39 tobacco-producing areas. The identification was based on the analysis of α -esterase zymograms, perineal patterns and partial sequencing of the 18S-ITS1-5.8S ribosomal RNA region. In addition, morphometric and pathogenic characterization of monospecific isolates was also determined. *M. incognita*, *M. enterolobii*, *M. javanica*, *M. arenaria* and *M. inornata* were detected in eighteen (46.2%), ten (25.6%), thirteen (33.3%), two (5.1%) and one (2.6%) samples, respectively. Mixtures of species were also found in 25.6% of the samples. Moreover, we detected two morphological and biochemically atypical populations (LGM 27 and LGM 38) which showed host range and

18S-ITS1-5.8S sequences identical to *M. enterolobii* and *M. incognita*, respectively. Intra-specific variation among isolates was observed for both pathogenic and morphometric variables, but in general were close to their original descriptions. Based on our results and considering that the efficiency of the *Rk* gene is limited to races 1 and 3 of *M. incognita*, it is indispensable not only to search for sources of resistance to virulent isolates of *M. incognita*, but also to consider resistance to other species such as *M. enterolobii*, *M. inornata*, *M. arenaria* and *M. javanica* in tobacco breeding programs. In addition, changes in the planning of integrated management procedures, such as crop rotation, should be considered in areas infested with *Meloidogyne*.

Keywords: Nematode diseases; Isoenzyme; ITS1 region; Morpholog; *Nicotiana tabacum*

2.1 Introdução

Fitonematoides são responsáveis por perdas consideravelmente elevadas em espécies cultivadas, sendo, pois, considerados como um fator limitante à obtenção de índices satisfatórios de produtividade em importantes culturas (WEISCHET; BROWN, 2001; FERRAZ; BROWN, 2002; TRUDGILL; BLOK, 2001). O tabaco, cultura de grande importância econômica no cenário internacional, não é exceção a esta regra; pelo contrário, nematoses figuram como as principais enfermidades que acometem a cultura, sendo responsáveis por prejuízos que variam de 15 a 27,5% (SHEW; LUCAS, 1991; DIAZ-SILVEIRA; HERRERA, 1998).

Na literatura internacional, são inúmeras as espécies parasitas associadas ao tabaco, representantes dos mais variados hábitos de vida e sumariadas por Johnson, Way e Barker (2005). De modo geral, entre as espécies assinaladas, encontram-se algumas tidas como parasitas mais comuns e importantes da cultura, como *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, e *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949. Além destas, há outras de ocorrência ocasional e/ou patogenicidade ainda não bem estabelecida, como *M. hapla* Chitwood, 1949, *Pratylenchus* spp, *Globodera* spp, *Aphelenchoides* spp, *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936, e *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, 1940 (AKEHURST, 1981; RICH; GARCIA, 1985; CROWDER et al., 2003; RICH; KINLOCH, 2009; ROBINSON et al., 1997; SOSA-MOSS; BARKER; DAYKIN, 1983; PÉREZ; FERNÁNDEZ, 1998). Por vezes, verifica-se, ainda, a ocorrência concomitante de várias espécies, tais como *M. javanica*, *M. incognita* e *R. reniformis* (PATEL; PATEL, 1991) ou mesmo interagindo com agentes patogênicos de outra natureza, tais como espécies de *Pythium*, *Rhizoctonia* e *Fusarium* (BATTEN; POWELL,

1970; POWELL; MELENDEZ; BATTEN; MAI; ABAWI, 1987); originando, assim, enfermidades de natureza bastante complexa.

Globalmente, o controle de meloidoginoses, principal nematose, é fundamentado, quase que exclusivamente, no plantio de cultivares resistentes portadoras de um único gene com efeito de dominância completa, denominado *Rk* (DROLSOM; MOORE; GRAHAM, 1958). Este gene foi aparentemente transferido de *N. tomentosa* (espécie selvagem próxima) e confere resistência às raças 1 e 3 de *M. incognita* (RUFTY; WERNSMAN; POWELL, 1983; YI; RUFTY, 1998). No Brasil, todavia, apesar de seu uso disseminado (gene *Rk*), meloidoginoses ainda constituem sério problema fitossantitário na cultura (SUDO, 1997). Uma hipótese deveras verossímil para este fato reside em eventuais alterações, induzidas pelo uso exclusivo e compulsório do gene *Rk*, na comunidade de fitonematoides, favorecendo variedades de *M. incognita* e/ou outras espécies contra as quais o gene em apreço é inefetivo, conforme observado em outras regiões produtoras do mundo (FORTTNUM; KRAUSZ; CONRAD, 1984; RICH; GARCIA, 1985; STANTON et al., 1992; SCHMITT, 1988).

Infelizmente, no Brasil, a despeito da sua importância econômica, os levantamentos nematológicos em áreas destinadas à fumicultura são exíguos e antigos, realizados nos idos de 50, 70 e 80. Por vezes, os registros limitam-se a simples assinalamentos de caráter pontual (FIGUEIREDO, 1958; PONTE, 1977; ZEM; ZANON; MONTEIRO, 1985; SUDO; ESPINDOLA, 1987). Os únicos relatos publicados recentemente assinalaram a ocorrência de *M. enterolobii* Yang & Eisenback, 1983 e *M. ethiopica* Whitehead, 1968, em plantas de fumo na região Sul do País (GOMES; COUTO; CARNEIRO, 2008; GOMES et al., 2005). Ainda mais preocupante é que a adoção de medidas eficientes de controle diante deste panorama torna-se severamente comprometida. Além disso, deve-se considerar que, neste lapso de tempo, outras espécies foram descritas ou revalidadas (MOENS; PERRY; STARR, 2010), tornando desatualizada parte de identificações anteriores. Por fim, há de se destacar ainda que identificações realizadas no passado, em sua maioria, necessitam ser vistas com grandes reservas devido, primariamente, à sobreposição de várias características morfológicas e morfométricas existentes entre as diversas espécies filiadas ao gênero *Meloidogyne*; além, é claro, da ocorrência de variações intra-específicas e/ou intra-populacionais (CARNEIRO, 2007).

Diante do cenário acima delineado, vê-se como muito necessária a realização de um levantamento nematológico atualizado nas principais regiões produtoras de fumo do País, de forma que o mesmo venha fornecer subsídios para uma eficiente prescrição de medidas de controle. Dessa forma, objetivou-se, no presente trabalho, não apenas identificar espécies de

Meloidogyne ocorrentes em áreas destinadas à fumicultura, como também caracterizá-las sob o ponto de vista morfométrico e patogênico.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Estabelecimento e Manutenção de populações e isolados

Populações de nematoides foram estabelecidas em mudas de tomate (*Solanum lycopersicum* L) cv. Santa Clara a partir da inoculação de espécimes (ovos e juvenis de segundo estágio) obtidos de raízes parasitadas (com galhas) de cultivares de tabaco portadoras do gene *Rk*, coletadas em diversas regiões produtoras do sul do Brasil (Tabela 1). As plantas de tomate foram mantidas em copos plásticos (500cm³) em casa-de-vegetação expostas a uma faixa de temperatura de 25-30 °C. Estas populações foram submetidas à análises morfológicas e bioquímicas com a finalidade de determinar suas respectivas identidades específicas.

Isolados monoespecíficos de cada população (isolados LGM) foram estabelecidos a partir da inoculação de uma única massa de ovos obtida de cada raiz sintomática, em plantas de tomates cv Santa Clara, sendo, posteriormente, utilizadas para realizar caracterizações morfométricas e patogênicas. Devido ao modo de reprodução partenogenético obrigatório (NOE, 2010; WEISHET; BROWN, 2001), cada isolado foi considerado, portanto, uma linhagem clonal. A identidade específica de cada isolado LGM foi confirmada via fenótipos de α -esterase, conforme técnica capitulada doravante.

Tabela 1 - Origens de amostras de raízes sintomáticas de fumo utilizadas para o estabelecimento de populações de nematoides e de culturas mono específicas de *Meloidogyne*

Amostra	Cidade/Estado	Cultivar	Região
01	Araranguá/SC	CSC 444	Morro do Prong
02	Içará/SC	CSC 467	Campo Mãe Luzia
03	Treze de Maio/SC	CSC 404	Treze de Maio
04	Pedras Grandes/SC	CSC 438	Alto Pedrinhas
05	Içará/SC	CSC 405	Campo Mãe Luzia
06	Araranguá/SC	CSC 444	Bairro Santa Catarina
07	Sombrio/SC	CSC 467	Sanga da Toca
08	Araranguá/SC	CSC 444	Sanga da Toca
09	Sombrio/SC	CSC 405	Santa Fé
10	Sombrio/SC	CSC 444	Costa da Lagoa
11	Treze de Maio/SC	CSC 404	Treze de Maio
12	Vale do Sol/RS	CSC 467	Faxinal de Dentro
13	Vale do Sol/RS	CSC 439	Faxinal de Dentro
14	Venancio Aires/RS	CSC 444	Lagoa Estrela
16	Venancio Aires/RS	CSC 401	Lagoa Bem Feito
17	Rio Pardo/RS	CSC 401	Passo da Areia
18	Rio Pardo	CSC 416	Lagoa João Rodrigues
21	Vera Cruz/RS	CSC 444	Lagoa Henrique D'Ávila
23	Presidente Nereu/SC	CSC 405	Presidente Nereu
26	Ascura/SC	CSC 439	Ascura
27	Vidal Esmos/SC	CSC 405	Rio do Lauro
28	Ascura/SC	CSC 439	Ascura
29	Agronomica/SC	CSC 444	Mosquito Grande
30	Agronomica/SC	CSC 444	Mosquito Grande
31	Ituporanga/SC	CSC 405	Cerro Negro
32	Apiuna/SC	CSC 467	Margem Esquerda
33	Agrolândia/SC	CSC 416	Ribeirão do Tigre
34	Agronomica/SC	CSC 405	Alto Gropp
35	Ituporanga/SC	CSC 405	Cerro Negro
36	Mercedes/PR	BRAVO 702	Três Irmãs
37	Marechal Candido Rondon/PR	BRAVO 702	Porto Mendes
38	Marechal Candido Rondon/PR	BRAVO 702	Porto Mendes
39	Mercedes/PR	BRAVO 702	Três Irmãs
40	Mercedes/PR	BRAVO 702	Três Irmãs
41	Marechal Candido Rondon/PR	BRAVO 702	Porto Mendes
42	Marechal Candido Rondon/PR	BRAVO 702	Aunhapora
43	Marechal Candido Rondon/PR	BRAVO 702	Porto Mendes
44	Missol/PR	BRAVO 702	São João
45	Mercedes/PR	BRAVO 702	Três Irmãs

2.2.2 Análises morfológicas e bioquímicas de populações de *Meloidogyne*

Ao menos dez fêmeas branco-leitosas de cada população foram removidas, aleatoriamente, das raízes de tomateiro e transferidas imediatamente para uma gota de solução

de ácido láctico a 45%. A região perineal de cada exemplar foi, então, cortada, limpa e montada em glicerina para posterior observação em microscópio composto de luz (HARTMAN; SASSER, 1985). Todas as lâminas permanentes foram codificadas (Tabela 3) e depositadas na coleção nematológica do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), em Londrina (PR).

Para a determinação dos fenótipos de α -esterase, um total de 18 fêmeas jovens, branco-leitosas e em plena fase de oviposição, foram dissecadas diretamente da raiz parasitada de tomate de cada amostra com auxílio de microscópio estereoscópico e estilete de ponta fina. Seguidamente, cada fêmea foi colocada em um tubo capilar (hematócrito) contendo 5 μ l de solução extratora (2% de Triton 100X, 20% de sacarose, 0,01% de azul de bromofenol e 78% de água deionizada) (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001). Posteriormente, as fêmeas foram maceradas e transferidas para poços em gel de poliacrilamida (PAGE) com gel de empacotamento de 4% (pH 6,8) e gel separador de 7,5% (pH 8,9) utilizando tampão de corrida com Tris-glicina (pH 8,9). Extratos de três fêmeas do isolado IPR MJAV 81 de *M. javanica* exibindo típico fenótipo J3 (*Rm*: 1.0, 1.3 e 1.4) foram adicionados em um único poço de cada gel atuando, dessa forma, como isolado referência. A eletroforese foi realizada em aparato Mini PROTEAN III (Bio-Rad), a 4°C, sob voltagem constante de 100 V no gel de empilhamento (± 15 min) e, então, a 200 V no gel separador (25 - 30 min) (BRITO et al., 2004). A revelação foi realizada utilizando α nafetilacetato como substrato e mediante incubação a 37°C, conforme descrito por Carneiro e Almeida (2001). A taxa de mobilidade relativa (*Rm*) foi calculada atribuindo-se valor 1 à isoforma de menor mobilidade do isolado de referência J3, sendo a linha divisória entre os géis separador e de empacotamento o ponto inicial de referência para as medições.

2.2.3 Análise da sequência da região parcial 18S -ITS1 -5.8S

A extração de DNA genômico foi realizada consoante Stanton, McNicol e Steele, (1998). Uma fêmea de cada população foi coletada com auxílio de microscópio estereoscópico, transferida para solução 1M NaCl e conservada a -20 °C. Na ocasião da extração, cada fêmea foi colocada em um tubo de microcentrífuga contendo 20 μ l de NaOH 0,25 M e, então, incubada a 25°C por uma noite. Posteriormente, a solução foi aquecida a 99 °C por 3 min., adicionando-se, seguidamente, 10 μ l de HCl 0,25 M, 5 μ l de Tris-HCl 0,5 M e 5 μ l de Triton

X-100 2%. Finalmente, a solução foi novamente incubada a 99 °C por 3 min. e armazenada a -20 °C.

As reações de sequenciamento da região 18S-ITS1-5.8S (Figura 1) foram realizadas em um volume de 50µl, utilizando o Kit Promega Taq PCR Master Mix (Promega, Maryland, USA) e o par de iniciadores (VRAIN et al., 1992; CHERRY et al., 1997) (Tabela 2) foi sintetizado pela empresa Sigma-Genosys (The Woodlands, TX, USA). Em um tubo de microcentrífuga de 0,5 ml foi adicionada uma quantidade de 25µl de Kit Taq PCR Master Mix (1x), 1,5µl (0,3µM) de cada iniciador, 18µl de água mili-Q e 4µl de DNA. A solução foi pré-aquecida a 94 °C por 2 minutos em termociclador e depois submetida às condições de amplificação descritas por Cherry et al., (1997), que consistem em 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 57°C e 2 minutos a 72°C. Após a amplificação, 10µl do produto da reação foram resolvidos por eletroforese em tampão 0,5X TBE (Tris-Borato-EDTA) em gel de agarose 1% corado com Syber Safe (0,5x). Os fragmentos foram visualizados em transiluminador UV, usando o marcador molecular 1Kb Plus (Invitrogen, SP, Brasil) como referência para determinação de pesos moleculares. As sequências de nucleotídeos foram, então, comparadas por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

As sequências foram alinhadas com o programa CLUSTAL X2 (THOMPSON et al., 1997) e editadas manualmente através do programa GeneDoc onde necessário (NICHOLAS; NICHOLAS JR; DEERFIELD II; 1997). A sequência de um isolado da espécie *Pratylenchus coffeae* (número de acesso AB053485) foi escolhida para representar um taxon *outgroup*. A sequência de *M. enterolobii* Melg 2 disponível no GenBank (número de acesso JF309158.1) também foi adicionada às análises filogenéticas. Os dendogramas foram construídos através do programa MEGA 4 (TAMURA et al., 2007) usando o método baseado no algoritmo UPGMA com modelo de Máxima Verossimilhança (ML) e com deleção completa. As análises filogenéticas foram realizadas com 1000 permutações.

Tabela 2 - Iniciadores universais utilizados nas reações de PCR (VRAIN et al., 1992; CHERRY et al., 1997)

Iniciador	Sequência (5'-3')	Direção
18S	TTGATTACGTCCCTGCCCTTT	F
RN58SR	ACGAGCCGAGTGATCCACCG	R

Figura 1 - Representação esquemática da organização geral do DNA ribossômico em eucariotos

2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os espécimes utilizados (cerca de 15 fêmeas por população) foram parcialmente dissecados de segmentos de raízes parasitadas de tomate, deixando expostas somente as regiões perineais. Posteriormente, os mesmos foram transferidos para recipientes plásticos contendo solução fixadora de glutaraldeído 3 % em tampão fosfato de sódio 0,1 M em pH 7,2 a 4 °C. Procedeu-se a pós-fixação em tetróxido de ósmio 1 % por duas horas à temperatura ambiente, seguida da desidratação em soluções de concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100 %). As amostras foram secas ao ponto crítico, utilizando-se CO₂ como fluido de transição. Após a secagem, as amostras foram armazenadas em recipiente hermeticamente fechado, contendo sílica-gel. A montagem dos nematoides foi realizada sobre “stub” contendo fita adesiva de carbono e um fio de cabelo e/ou cobre como suporte para obtenção de um ângulo de inclinação. Os espécimes foram cobertos com fina camada de ouro, utilizando metalizador MED 010, e examinados ao microscópio LEO 435 VP, operando a 20 kV.

2.2.5 Caracterização patogênica de isolados monoespecíficos em hospedeiros diferenciais

Todos os ensaios relativos à caracterização patogênica foram realizados, sob condições de casa-de-vegetação, nos períodos de 07/10/11 a 07/12/11 (#1), 11/01/12 a 12/03/12 (#2), 06/05/12 a 06/07/12 (#3). Cada isolado foi inoculado em uma série de hospedeiros diferenciadores proposta por Hartman e Sasser (1985) e modificada por Nono-Wondim et al., (2002). Assim, incluíram-se as seguintes espécies: tomate (*Solanum lycopersicum* ‘Rutgers’), fumo (*Nicotiana tabacum* ‘NC 95’), algodão (*Gossypium hirsutum* ‘Deltapine 61’), pimentão (*Capsicum annuum* ‘Early California Wonder’), melancia (*Citrullus vulgaris* ‘Charleston Gray’) e amendoim (*Arachis hypogaea* ‘Florunner’). Cada parcela foi constituída de uma única planta, cultivada em vasos plásticos (500cm³), e cada

tratamento (espécie hospedeira) foi repetido seis vezes em arranjo experimental inteiramente casualizado.

A inoculação foi realizada com 2.000 exemplares (ovos e eventuais juvenis de segundo estágio recém-eclodidos) por planta, obtidos a partir de raízes de tomate parasitados imersos em solução de hipoclorito de sódio 0,5% (HUSSEY; BARKER, 1973). A temperatura média diária durante os períodos experimentais foram de 22,6°C (#1), 25°C(#2), 18,40°C (#3), respectivamente para o primeiro, segundo e terceiro ensaios. Após 60 dias, as raízes foram removidas, coradas com Floxina B (15mg/l por 20 minutos) e o número de galhas e/ou massas de ovos mensurados, consoante escala proposta por Taylor e Sasser (1978). Dessa forma, as notas foram determinadas da seguinte maneira: nota 0=nenhuma galha ou massa de ovos por raiz; 1=1 a 2 galhas ou massas de ovos por raiz; 2=3 a 10 galhas ou massas de ovos por raiz; 3= 11 a 30 galhas ou massas de ovos por raiz; 4=31 a 100 galhas ou massas de ovos por raiz e 5= mais de 100 galhas ou massas de ovos por raiz. Espécies com índice médio igual ou inferior a 2 foram consideradas hospedeiras resistentes (-) e aquelas que exibiram este índice superior a 2, suscetíveis (+) (TAYLOR; SASSER, 1978).

2.2.6 Caracterização morfométrica de isolados monoespecíficos

Parâmetros morfométricos de dez juvenis de segundo estágio (J2) e de dez machos foram obtidos de cada isolado monoespecífico. Os espécimes foram mensurados vivos através de microscopia óptica em lâminas temporárias após serem relaxados a aproximadamente 5 °C por cerca de 5 minutos. Foram mensurados os seguintes parâmetros: comprimento total do corpo (L), diâmetro maior do corpo ($\varnothing_c$), diâmetro em nível do ânus ($\varnothing_a$) (juvenis J2), diâmetro do corpo em nível do bulbo do estilete ($\varnothing_{bs}$) (machos), diâmetro em nível do poro excretor ($\varnothing_{pe}$) (machos), comprimento do estilete (St), altura do bulbo do estilete (AbSt), diâmetro do bulbo do estilete ($\varnothing_{bSt}$), comprimento do esôfago (CE) (machos), distância da base do estilete ao término da região anterior (DBSTA) (J2), distância da base do estilete à abertura da glândula esofagiana dorsal no canal do esôfago (DGO), distância do bulbo mediano ao término da região anterior (DBMA), comprimento da válvula do bulbo mediano (CVBM) (J2), largura da válvula do bulbo mediano (LVBM) (J2), distância do poro excretor ao término da região anterior (DEA), região hialina da cauda (HC) (J2), comprimento da cauda (CT), comprimento do espículo (LE) (machos) e comprimento do gubérnaculo (LG) (machos). Com tais medidas, calcularam-se também os índices demanianos (alométricos) a

(L/Øc), c (L/T), c'(T/Øa) e as razões AbSt/ØbSt (machos), L/DBMA e DEA*100/L (SIDDIQUI, 2000; JEPSON, 1983).

Os valores de cada característica foram analisados entre as espécies por meio de análise univariada paramétrica (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey HSD ($P_{\text{espécie}} < 0,05$) na presença de diferenças estatísticas. Esse tipo de análise permite a visualização de diferenças significativas entre espécies baseadas em cada característica individual e, na presença desta diferença, indica quais variáveis são capazes de distinguir determinada espécie das demais; assim, pode-se endereçar questionamentos acerca de quais variáveis discriminam os isolados atípicos das demais espécies de *Meloidogyne*. Ademais, os dados foram submetidos a dois procedimentos multivariados distintos, a saber: análise de componentes principais (ACP), utilizando-se para este fim uma matriz de correlação, e análise canônica discriminante (ACD). Ambas as análises foram realizadas com auxílio do software R (versão 2.15). Essas técnicas multivariadas permitem não apenas acessar os caracteres de maior poder discriminante como também obter um panorama geral acerca da similaridade morfológica sob os âmbitos inter e intra-específico, haja vista que reduzem informações redundantes em seu espaço geométrico por meio da formação de vetores.

2.3 Resultados

As populações analisadas, bem como os respectivos resultados observados para cada uma delas estão sumariadas na Tabela 3. As observações dos modelos perineais alinharam-se, em sua maioria, aos resultados encontrados a partir da análise do polimorfismo de α -esterases.

2.3.1 Fenótipos de α -esterase

Das 39 amostras, foram observadas treze isoformas de α -esterase, encerrando, no total, oito zimogramas, dos quais seis foram espécie-específicas (Figura 2); assim, dezoito amostras (46,2%) exibiram fenótipos típicos de *M. incognita* (I1 e I2; Rm: 1.0 e 1.1), dez (25,6%) de *M. enterolobii* (VS1-S1; Rm: 0.75, 0.85, 1.0 e 1.1), treze (33,3%) de *M. javanica* (J3; Rm: 1.0, 1.3, 1.4), duas (5,1%) de *M. arenaria* (A2; Rm: 1.25, 1.35) e uma (2,7%) *M. inornata* Lordello, 1956 (I3=Y3; Rm: 0.90, 1.25 e 1.35). Em dez amostras foram encontrados fenótipos enzimáticos de duas espécies (25,6%). Dois fenótipos atípicos e, aparentemente, inéditos na literatura nematológica foram encontrados nas populações LGM 27 e 38, ora designados, F2

(R_m : 0,75; 0,90; 0,95) e F3 (R_m : 0,90; 1,0; 1,1), respectivamente. Ao contrário de estudo anterior, não foi encontrado nenhum fenótipo típico (E3; R_m : 0,90, 1,05 e 1,20) de *M. ethiopica* (GOMES et al., 2005), espécie típica de regiões de clima temperado.

Figura 2 - Fenótipos de α -esterases observados em populações de *Meloidogyne* coletadas na cultura do fumo na região sul do Brasil. Listras pretas significam isoformas principais (sempre nítidas) e azuis, secundárias

2.3.2 Análise das populações com base em configurações perineais

Do total de indivíduos analisados (#483), observaram-se modelos perineais típicos de quatro espécies principais: *M. javanica* (#127), *M. incognita* (#141), *M. enterolobii* (#74) e *M. arenaria* (#37). Formas aberrantes e/ou intermediárias foram também encontradas em algumas populações de *M. incognita* (13,5%), várias de *M. enterolobii* (39,3%) e na população de *M. arenaria* (27%). No mais, duas populações morfologicamente atípicas e variáveis foram encontradas no presente estudo.

Indivíduos identificados como *M. javanica* exibiram, via de regra, algumas pequenas variações no formato da região perineal, mas apresentaram, invariavelmente, características típicas da espécie, tais como: arco dorsal variando entre o baixo e o moderadamente baixo, apresentando duas longas, conspícuas e típicas incisuras (linhas laterais) em ambos os lados do modelo perineal, dividindo as estrias ventrais e dorsais (Figura 3A). Indivíduos de *M. incognita* exibiram, por sua vez, linhas laterais frequentemente marcadas por bifurcações, interrompendo a continuidade entre as estrias dorsais e ventrais; além disso, exibiram arco dorsal trapezoidal (ou quadrangular) tipicamente elevado (Figura 3B).

Embora a maioria dos indivíduos identificados como *M. enterolobii* tenha apresentado modelos perineais similares aos de sua descrição ou ao de *M. mayaguensis*, espécie júnior de *M. enterolobii* (YANG, B.; EISENBACK, 1983; RAMMAH; HIRSCHMANN, 1988; KARSSSEN et al., 2012), observou-se uma elevada variabilidade intra-específica, com a

ocorrência de indivíduos atípicos, ora assemelhando-se a *M. arenaria*, ora assemelhando-se a *M. incognita*. Assim, a maioria exibiu configuração perineal variando entre o oval e o arredondado, estrias finas e espaçadas e exibindo arco dorsal moderadamente elevado (Figura 3C); outros, porém, apresentaram arco dorsal demasiadamente alto e trapezoidal, similar a *M. incognita*, e alguns raros indivíduos apresentaram curiosamente linhas laterais evidentes. A população LGM 30, aliás, apresentou, além dessas variações, espécimes com uma ou duas asas laterais.

A população de *M. arenaria* também exibiu algumas variações entre indivíduos, embora a maioria apresentasse modelos perineais típicos da espécie em apreço; logo, os indivíduos exibiram modelo perineal ovoide e com arco dorsal baixo (Figura 3E), frequentemente comprimido dorso-lateralmente, caracterizando-se pela formação de “ombros” característicos da espécie. Alguns exemplares, não obstante, apresentaram uma ou duas asas laterais bastante proeminentes, entre outras particularidades, em consonância ao observado em algumas populações de *M. arenaria* (PONTE, 1977; CLIFF; HIRSCHMANN, 1985; RAMMAH; HIRSCHMANN, 1993; CARNEIRO et al., 2008; SKANTAR.; CARTA.; HANDOO, 2008).

Duas populações (LGM 27 e LGM 38) não tiveram suas respectivas identidades específicas prontamente determinadas, seja pela elevada plasticidade fenotípica exibida pelos seus modelos perineais, seja pela ausência de características típicas, seja pelos fenótipos atípicos de α -esterase. A primeira (LGM 27) apresentou configuração perineal variando entre o arredondado e o ovalado, ausência de linhas laterais e pontuações, e frequentemente exibindo uma ou duas asas laterais bem evidentes (Figura 3F). A segunda (LGM 38) apresentou configuração perineal muito semelhante, às vezes idêntica, à *M. incognita* (Figura 3G). Todavia, devido à sobreposição de algumas características taxionômicas entre espécies descritas de *Meloidogyne*, é primário, ou mesmo temerário, classificá-la como *M. incognita* baseando-se tão somente nesta característica.

Figura 3 - Configurações perineais típicas observadas em populações de *Meloidogyne* encontradas na cultura do fumo no sul do Brasil. Fotografias retiradas a partir de microscopia de luz (à esquerda) e microscopia eletrônica de varredura (à direita). *M. javanica* (A), *M. incognita* (B), *M. enterolobii* (C), *M. inornata* (D), *M. arenaria* (E), *M. sp. 1* (F), *M.sp.2* (G)

Tabela 3 - Espécies de *Meloidogyne* encontradas infectando cultivos de fumo portadoras do gene *Rk*

População	Códigos de Depósito	Configuração Perineal ^a	Fenótipos de esterase	18S-ITS1-5.8S	Diagnóstico Final
LGM 01	IPR LGM1	<i>Mi</i>	<i>Mi</i> (I ₁ e I ₂)	<i>Mi</i> (90%; 8e-142; AF387093.1)	<i>Mi</i>
LGM 02	IPR LGM2	<i>Mi</i>	<i>Mi</i> (I ₁)	<i>Mi</i> (84%; 8e-102; AF387093.1)	<i>Mi</i>
LGM 03	IPR LGM3	<i>Me</i>	<i>Me</i> (VS1-S1)	<i>Me</i> (95%; 3e-160; JF309153.1)	<i>Me</i>
LGM 04	IPR LGM4	<i>Me</i>	<i>Me</i> (VS1-S1)	<i>Me</i> (94%; 0; JF309153.1; JF309158.1; JF309156.1)	<i>Me</i>
LGM 05	IPR LGM5	<i>Mj</i>	<i>Mj</i> (J3)	-	<i>Mj</i>
LGM 06	IPR LGM6	<i>Mi</i>	<i>Mi</i> (I ₂)	<i>Mi</i> (89%; 2e-133; AF387093.1)	<i>Mi</i>
LGM 07	IPR LGM7	<i>Mj e Mi</i>	<i>Mj</i> (J3) e <i>Mi</i> (I ₁)	<i>Mi</i> (99%; 0; JQ405212.1; AY438556.1)	<i>Mj e Mi</i>
LGM 08	IPR LGM8	<i>Mj</i>	<i>Mj</i> (J3)	<i>Mj</i> (99%; 0; AY829374.1)	<i>Mj</i>
LGM 09	IPR LGM9	<i>Mi</i>	<i>Mi</i> (I ₂)	<i>Mi</i> (89%; 8e-142; AF387093.1)	<i>Mi</i>
LGM 10	IPR LGM10	<i>Mi e MJ</i>	<i>Mj</i> (J3) e <i>Mi</i> (I ₁)	<i>Mi</i> (94%; 9e-176; AF387093.1)	<i>Mj e Mi</i>
LGM 11	IPR LGM11	<i>Me</i>	<i>Me</i> (VS1-S1)	<i>Me</i> (92%; 2e-152; JF309153.1)	<i>Me</i>
LGM 12	IPR LGM12	<i>Mj</i>	<i>Mj</i> (J3)	<i>Mj</i> (98%; 0; AY438555.1)	<i>Mj</i>
LGM 13	IPR LGM13	<i>Mj</i>	<i>Mj</i> (J3)	<i>Mj</i> (98%; 0; AY438555.1)	<i>Mj</i>
LGM 14	IPR LGM14	<i>Mi</i>	<i>Mi</i> (I ₂)	<i>Mi</i> (99%; 0; JQ405212.1; AY438556.1)	<i>Mi</i>
LGM 16	IPR LGM16	<i>Mi</i>	<i>Mi</i> (I ₁)	-	<i>Mi</i>
LGM 17	IPR LGM17	<i>Mj e Ma</i>	<i>Mj</i> (J3) e <i>Ma</i> (A2)	-	<i>Mj e Ma</i>
LGM 18	IPR LGM18	<i>Mj</i>	<i>Mj</i> (J3)	<i>Mj</i> (97%; 0; AY438555.1)	<i>Mj</i>
LGM 21	IPR LGM21	<i>Mj</i>	<i>Mj</i> (J3)	<i>Mj</i> (98%; 0; AY438555.1)	<i>Mj</i>
LGM 23	IPR LGM23	<i>Me e MJ</i>	<i>Me</i> (VS1-S1)	<i>Mj</i> (98%; 0; AY438555.1)	<i>Me e MJ</i>
LGM 26	IPR LGM26	<i>Me</i>	<i>Me</i> (VS1-S1)	<i>Me</i> (94%; 0; JF309153.1)	<i>Me</i>
LGM 27	IPR LGM27	<i>M. sp.1</i>	<i>M. sp.1</i> (F2)*	<i>Me</i> (92%; 6e-153; JF309153.1)	<i>Msp.</i>
LGM 28	IPR LGM28	<i>Me</i>	<i>Me</i> (VS1-S1)	<i>Me</i> (95%; 0; JF309153.1)	<i>Me</i>
LGM 29	IPR LGM29	<i>Mj e Me</i>	<i>Mj</i> (J3) e <i>Me</i> (VS1-S1)	<i>Me</i> (94%; 5e-123; JF309153.1)	<i>Mj e Me</i>
LGM 30	IPR LGM30	<i>Me</i>	<i>Me</i> (VS1-S1)	<i>Me</i> (94%; 7e-162; JF309153.1)	<i>Me</i>
LGM 31	IPR LGM31	<i>Ma</i>	<i>Ma</i> (A2)	<i>Ma</i> (99%; 0; AY438554.1)	<i>Ma</i>

(continua)

Tabela 3 - Espécies de *Meloidogyne* encontradas infectando cultivares de fumo portadoras do gene *Rk*

População	Códigos de Depósito	Configuração Perineal	Fenótipos de esterase	18S-ITS1-5.8S ^c	Diagnóstico Final (conclusão)
LGM 32	IPR LGM32	<i>Mi e Me</i>	<i>Mi</i> (I ₁) e <i>Me</i> (VS1-S1)	<i>Me</i> (94%; 4e-169; JF309153.1)	<i>Mi e Me</i>
LGM 33	IPR LGM33	<i>Mj</i>	<i>Mj</i> (J3)	<i>Mj</i> (98%; 0; AY438555.1)	<i>Mj</i>
LGM 34	IPR LGM34	<i>Mj e Me</i>	<i>Mj</i> (J3) e <i>Me</i> (VS1-S1)	<i>Mj</i> (98%; 0; AY438555.1)	<i>Mj e Me</i>
LGM 35	IPR LGM35	<i>Mi</i>	<i>Mi</i> (I ₂)	<i>Mi</i> (99%; 0; JQ405212.1)	<i>Mi</i>
LGM 36	IPR LGM36	<i>Mi</i>	<i>Mi</i> (I ₁)	<i>Mi</i> (98%; 0; JQ405212.1)	<i>Mi</i>
LGM 37	IPR LGM37	<i>Mj</i>	<i>Mj</i> (J3)	<i>Mj</i> (98%; 0; AY438555.1)	<i>Mj</i>
LGM 38	IPR LGM38	<i>Mi e M. sp.2</i>	<i>M. sp.2</i> (F3) [*]	<i>Mi</i> (99%; 0; JQ405212.1)	<i>Msp.</i>
LGM 39	IPR LGM39	<i>Mi</i>	<i>Mi</i> (I ₂ e I ₁)	<i>Mi</i> (99%; 0; JQ405212.1)	<i>Mi</i>
LGM 40	IPR LGM40	<i>Mi</i>	<i>Mi</i> (I ₁)	<i>Mi</i> (99%; 0; ; AY438556.1)	<i>Mi</i>
LGM 41	IPR LGM41	<i>Mi</i>	<i>Mi</i> (I ₁ e I ₂)	<i>Mi</i> (99%; 0; JQ405212.1; AY438556.1)	<i>Mi</i>
LGM 42	IPR LGM42	<i>Mi</i>	<i>Mi</i> (I ₁)	<i>Mi</i> (99%; 0; JQ405212.1; AY438556.1)	<i>Mi</i>
LGM 43	IPR LGM43	<i>Mj e Mi</i>	<i>Mj</i> (J3) e <i>Mi</i> (I ₁)	<i>Mi</i> (99%; 0; JQ405212.1; AY438556.1)	<i>Mj e Mi</i>
LGM 44	IPR LGM44	<i>Mj</i>	<i>Mj</i> (J3) e <i>Mi</i> (I ₁)	<i>Mi</i> (99%; 0; JQ405212.1; AY438556.1)	<i>Mj e Mi</i>
LGM 45	IPR LGM45	<i>Mi</i>	<i>Min</i> (I3) e <i>Mi</i> (I ₁)	<i>Mi</i> (95%; 0; AY438556.1)	<i>Min e Mi</i>

a- Abreviações: *Ma*, *M. arenaria*; *Me*, *M. enterolobii*; *Mi*, *M. incognita*; *Min*, *M. inornata*; *Mj*, *M. javanica*b- ^{*}Fenótipos atípicos de α-esterasec- Espécie de *Meloidogyne* (Identidade; *e-value*; número de acesso do GeneBank)

2.3.3 Sequenciamento da região 18S-ITS1-5.8S

O produto da amplificação rendeu um único fragmento de aproximadamente 420pb, dos quais a região ITS1 correspondeu a aproximadamente 215pb, coerentemente ao observado na literatura nematológica (POWERS et al., 1997). A identidade específica das populações aparentemente puras com base na análise de zimogramas de α -esterase foi confirmada via sequenciamento parcial da região 18S-ITS1-5.8S. No caso de populações mistas, sequência altamente similar a uma das espécies identificadas foi também encontrada. Desse modo, as sequências apresentaram elevados valores de cobertura e identidade (*E-values* altamente significativos) com sequências de isolados de mesma espécie depositadas no GenBank. Não obstante, como esperado para espécies partenogenéticas obrigatórias (HUGALL; STANTON; MORITZ, 1998; POWERS, 2004; HANDOO et al., 2005), foi observado baixo polimorfismo entre as sequências de populações classificadas como *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. incognita*. Curiosamente, as sequências de populações classificadas como *M. enterolobii* e a população LGM 27 foram quase idênticas entre si e com outras sequências de *M. enterolobii* depositadas no GenBank, tais como *M. enterolobii* Melg 2; inclusive, distinguindo-se das demais sequências em doze nucleotídeos (Figura 4).

A significância destas observações foi, quase integralmente, suportada pela análise filogenética utilizando o algoritmo UPMGA (Figura 5). Observaram-se, desse modo, a formação de cinco grupos distintos. O primeiro e maior grupo engloba a grande maioria das sequências analisadas (LGM 33, LGM 43, LGM 13, LGM 14, LGM 44, LGM 38, LGM 39, LGM 23, LGM 41, LGM 35, LGM 31, LGM 12, LGM 34, LGM 33, LGM 07, LGM 40, LGM 42, LGM 21, LGM 18). O segundo e terceiro grupos são compostos por sequências únicas, LGM 45 e 10, respectivamente. O quarto grupo encerra sequências das populações de *M. enterolobii* Melg 2, LGM 03, LGM 04, LGM 11, LGM 26, LGM 27, LGM 28, LGM 29, LGM 30. Finalmente, o último grupo encerra três sequências (LGM 01, LGM 06 e LGM 09).

Figura 5 - Árvore filogenética (UPGMA) resultantes do alinhamento das sequências da região ITS1 das diversas populações de *Meloidogyne* spp. deste estudo. Valores de bootstrap suportam mais de 70% para formação do agrupamento

2.3.4 Caracterização patogênica de isolados

Os espectros de patogenicidade dos isolados LGM perante hospedeiros diferenciais permitiram classificar os 39 isolados em 5 espécies de *Meloidogyne* (Tabela 4). A elevada severidade observada no tratamento controle (Tomate cv ‘Rutgers’) atesta tanto a viabilidade dos inóculos quanto das condições ambientais durante os períodos experimentais. De modo geral, os resultados estão, na grande maioria dos casos, em consonância com aqueles obtidos pelos métodos bioquímicos e morfológicos. Cinco isolados (12,8%) apresentaram espectros não totalmente coincidentes com o esperado, a saber: LGM 23, LGM 26, LGM 30, LGM 32 e LGM 10.1.

À exceção dos isolados LGM 36, 39 e 42, classificados como *M. incognita* raça 1, todos os outros isolados de *M. incognita* foram classificados como *M. incognita* raça 2 (79%), haja vista que parasitaram fumo, melancia, tomate e pimentão, mas não algodão e amendoim.

A maioria dos isolados classificados como *M. enterolobii* (60%) apresentaram reação similar a *M. incognita* raça 2, ocorrendo, pois, reação compatível em tomate, fumo, melancia e pepino, coerentemente ao observado na oportunidade da descrição de *M. mayaguensis* (espécie júnior de *M. enterolobii*) e em diversos outros trabalhos (RAMMAH; HIRSCHMANN, 1988). Não obstante, quatro variantes fisiológicos (LGM 23, LGM 26, LGM 30 e LGM 32) foram observados, diferindo por não causar doença em pimentão.

Os isolados de *M. javanica* apresentaram, de modo geral, resposta típica da espécie, com reação compatível ocorrendo em tomate, fumo e melancia, mas não em pimentão, amendoim e algodão. Apenas um isolado, nomeado LGM 10.1, parasitou pimentão; esta variante fisiológica já foi detectada em outros trabalhos (OGBUJI, 1981; CARNEIRO, CASTAGNONE-SERENO, DICKSON, 1998).

O isolado LGM 45 (*M. inornata*) teve sua identidade devidamente confirmada também pelo teste fisiológico, uma vez que, apesar de exibir modelo perineal similar à *M. incognita*, sua reação perante o círculo de hospedeiros diferenciais foi idêntica ao de *M. javanica*, fenômeno observado também para sua população tipo (CARNEIRO et al, 2008). O isolado LGM 31, enquadrou-se, conforme esperado, na raça 2 de *M. arenaria*. Infelizmente, este patótipo exhibe, habitualmente, maior potencial patogênico do que a raça 1 (HIRUNSALEE; BARKER; BEUTE, 1995a,b). Interessantemente, o isolado LGM 27 apresentou reação também similar à *M. incognita* raça 2 e *M. enterolobii*; o isolado LGM 38, por seu turno,

exibiu reação similar a *M. incognita* raça 1, haja vista que não causou doença em tabaco e em algodão.

Tabela 4 - Isolados LGM, suas respectivas identidades específicas e reações em hospedeiros diferenciais

Isolados	Hospedeiros Diferenciais						
	Espécie	Fumo	Tomate	Melancia	Amendoim	Pimentão	Algodão
LGM 01	<i>Mi</i>	4,67±0,52	5,0±0	5,0±0	0±0	3,83±0,41	0±0
LGM 02	<i>Mi</i>	4,5±0,55	5,0±0	5,0±0	0±0	3,83±0,41	0±0
LGM 03	<i>Me</i>	5,0±0	5,0±0	4,0±0,89	0±0	3,67±0,52	0,33±0,52
LGM 04	<i>Me</i>	4,83±0,41	4,83±0,41	4,67±0,52	0±0	3,5±0,55	0±0
LGM 06	<i>Mi</i>	4,5±0,55	5,0±0	5,0±0	0±0	2,17±0,75	0±0
LGM 07.1	<i>Mj</i>	4,5±0,55	5,0±0	3,4±0,55	0±0	0±0	0±0
LGM 07.2	<i>Mi</i>	4,0±0,63	3,83±0,41	4,8±0,45	0±0	2,83±0,41	0±0
LGM 08	<i>Mj</i>	4,67±0,52	4,4±0,55	4,6±0,55	0±0	0,33±0,82	0±0
LGM 09	<i>Mi</i>	4,67±0,52	4,83±0,41	4,4±0,89	0±0	4,33±0,52	0±0
LGM 10.1	<i>Mj</i>	5±0	5±0	5±0	0±0	4,2±0,84	0±0
LGM 10.2	<i>Mi</i>	4,83±0,41	4,5±0,55	4,4±0,55	0±0	2,83±0,75	0±0
LGM 11	<i>Me</i>	4,2±0,40	4,8±0,40	5,0±0	0±0	3,2±0,40	0±0
LGM 12	<i>Mj</i>	3,67±0,52	3,33±0,52	4,6±0,55	0±0	0±0	0±0
LGM 13	<i>Mj</i>	5,0±0	5,0±0	5,0±0	0±0	0±0	0±0
LGM 14	<i>Mi</i>	4,83±0,41	4,0±0,63	4,0±0	0±0	2,5±0,84	0±0
LGM 16	<i>Mi</i>	3,67±1,37	5,0±0	5,0±0	0±0	3,67±0,81	0±0
LGM 17	<i>Mj</i>	4,33±0,52	4,17±0,75	5,0±0	0±0	0±0	0±0
LGM 18	<i>Mj</i>	4,5±0,55	4,83±0,41	5,0±0	0±0	0,4±0,89	0±0
LGM 21	<i>Mj</i>	4,67±0,52	5,0±0	4,6±0,55	0±0	0,17±0,41	0±0
LGM 23	<i>Me</i>	3,0±0	3,5±0,55	5,0±0	0±0	0,17±0,41	0±0
LGM 26	<i>Me</i>	3,17±0,41	3,5±0,55	4,4±0,55	0±0	0,17±0,41	0±0
LGM 27	<i>M.sp1</i>	4,17±0,41	5,0±0	4,0±0	0±0	2,5±1,38	0±0
LGM 28	<i>Me</i>	3,83±0,75	5,0±0	4,83±0,41	0±0	3,4±0,55	0±0
LGM 29	<i>Me</i>	4,83±0,41	5,0±0	4,0±1,22	0±0	3,83±0,41	0,17±0,41
LGM 30	<i>Me</i>	4,67±0,52	3,67±0,52	4,4±0,55	0±0	0±0	0±0
LGM 31	<i>Ma</i>	4,8±0,40	4,7±0,52	4,4±0,55	0±0	0,83±0,98	0±0
LGM 32	<i>Me</i>	4,5±0,83	4,7±0,52	3,6±0,55	0±0	4,2±0,75	0±0
LGM 33	<i>Mj</i>	4,67±0,52	4,83±0,41	4,83±0,41	0±0	0,5±0,84	0±0
LGM 34	<i>Me</i>	4,67±0,52	5,0±0	5,0±0	0±0	1,5±0,54	0±0
LGM 35	<i>Mi</i>	4,6±0,55	5,0±0	5,0±0	0±0	3,4±0,55	0±0
LGM 36	<i>Mi</i>	0,17±0,41	5,0±0	4,4±0,55	0±0	2,5±0,55	0±0
LGM 37	<i>Mj</i>	4,33±0,52	5±0	5±0	0±0	0±0	0±0
LGM 38	<i>M.sp2</i>	1±0,60	5,0±0	5,0±0	0±0	3,8±0,40	0±0
LGM 39	<i>Mi</i>	0±0	5,0±0	5,0±0	0±0	4,0±0	0±0
LGM 40	<i>Mi</i>	3,17±0,75	5,0±0	4,5±0,55	0±0	3,33±0,52	0±0
LGM 41	<i>Mi</i>	4,33±0,82	4,83±0,41	5,0±0	0±0	4,17±0,41	0±0
LGM 42	<i>Mi</i>	0,33±0,82	5±0	4,67±0,52	0±0	1,8±1,79	0±0
LGM 43	<i>Mj</i>	5,0±0	5,0±0	5,0±0	0±0	0±0	0±0
LGM 44	<i>Mj</i>	4,67±0,52	4,67±0,52	4,2±0,84	0±0	0,33±0,51	0±0
LGM 45	<i>Min</i>	3,5±0,55	5,0±0	4,67±0,52	0±0	0±0	0±0

Algodão cv. Deltapine 61; fumo cv. NC 95; pimentão cv. Early California Wonder; melância cv. Charleston Grey; amendoim cv. Florunner; e tomate cv. Rutgers.

2.3.5 Caracterização morfométrica de isolados

No que concerne à caracterização morfométrica, as médias, desvios padrões e valores máximos e mínimos observados de cada característica em cada espécie e isolados atípicos estão dispostos nas Tabelas 5 (J2) e 6 (machos), respectivamente. Variações morfométricas foram observadas para todas as espécies, seja em J2, seja em machos; não obstante, ficaram, de maneira geral, dentro dos limites relatados nas descrições originais. Sob este aspecto, as únicas diferenças consideráveis foram observadas entre indivíduos machos do isolado classificado como *M. inornata*. Algumas dessas variações quando confrontadas com medidas obtidas na literatura podem ser atribuídas a fatores diversos, tais como: espécie hospedeira, número de indivíduos mensurados e ao método de mensuração (nematoide vivo vs nematoide morto) (NAKASONO, 2004; BROWN; TOPHAM, 1984).

A ANOVA revelou diferenças significativas ($P_{\text{espécie}} < 0,05$) entre espécies para todas as 38 variáveis (J2 e machos). No entanto, devido à grande sobreposição morfométrica entre as espécies analisadas neste estudo, poucas características foram consideradas únicas para determinada espécie em particular, diferenciando-a das demais, tais como: Øa e HC (J2) para *M. enterolobii*; CT e DEA*100/L (J2) para *M. arenaria*; c (J2) para *M. inornata*; DGO, a, DEA*100/L e L/DBMA (machos) para *M. javanica*. Interessantemente, o isolado LGM 27 diferenciou-se de *M. enterolobii*, em indivíduos machos, apenas em uma única característica morfométrica (AbSt/ØbSt).

Tabela 5 - Análise morfométrica de juvenis de segundo estágio (J2) de espécies de *Meloidogyne* obtidos em campos de tabaco na região sul do Brasil (continua)

Variáveis	Espécies						
	<i>M. javanica</i> n=130	<i>M. incognita</i> n=140	<i>M. enterolobii</i> n=100	<i>M. arenaria</i> n=10	<i>M. inornata</i> n=10	LGM 27 n=10	LGM 38 n=10
Linear (µm)							
L	479,9±26,5 (416,5 – 529,2)	429,4±20,7 (352,0 – 490)	429,5±20,1 (387,1 – 470,4)	474,8±12,1 (450,8 – 490,0)	469,9±39,3 (431,2 – 553,7)	455,7±15,5 (431,2 – 480,2)	416,0±27,4 (382,2 – 450,8)
Øc	18,2±1,7 (14,7 – 22,1)	15,5±1,2 (14,7 – 17,2)	19,6±1,6 (14,7 – 22,1)	18,4±1,7 (14,7 – 19,6)	20,6±2,9 (17,2 – 24,5)	16,7±1,0 (14,7 – 17,2)	15,9±1,7 (14,7 – 19,6)
Øa	11,9±1,0 (10,0 – 14,0)	10,3±0,5 (9,0 – 11,0)	12,9±1,3 (10,0 – 16,0)	11,6±0,8 (11,0 – 13,0)	11,4±0,6 (11,0 – 12,50)	11,4±0,5 (11,0 – 12,0)	10,5±0,7 (10,0 – 12,0)
St	10,7±0,6 (9,5 – 12,0)	10,4±0,5 (10,0 – 11,0)	10,4±0,5 (10,0 – 11,0)	10,3±0,7 (9,5– 11,0)	10,5±0,50 (10,0 – 11,0)	10,5±0,5 (10,0 – 11,0)	10,7±0,7 (10,0 – 12,0)
DBSTA	14,7±0,7 (13,0 – 16,0)	14,7±0,7 (13,0 – 16,0)	14,6±0,7 (13,0 – 16,0)	15,4±1,4 (14,0±17,0)	14,9±0,7 (14,0 – 16,0)	14,6±0,5 (14,0 – 15,0)	15,1±0,3 (15,0 – 16,0)
AbSt	1,5±0,1 (1,0 – 2,0)	1,5±0,1 (1,0 – 2,0)	1,5±0,10 (1,5 – 2,0)	1,5±0,2 (1,0 – 1,5)	1,3±0,3 (1,0 – 1,5)	1,6±0,2 (1,5 – 2,0)	1,5±0,0 (1,5-1,5)
ØbSt	2,5±0,2 (2,0 – 3,0)	2,4±0,2 (2,0 – 2,5)	2,2±0,3 (2,0 – 3,0)	2,2±0,3 (1,5 – 2,5)	2,3±0,3 (2,0 – 2,5)	2,5±0,0 (2,5 – 2,5)	2,5±0,0 (2,5 – 2,5)

Tabela 5 – Análise morfométrica de juvenis de segundo estágio (J2) de espécies de *Meloidogyne* obtidos em campos de tabaco na região sul do Brasil

(continuação)

Variáveis	Espécies						
	<i>M. javanica</i> n=130	<i>M. incognita</i> n=140	<i>M. enterolobii</i> n=100	<i>M. arenaria</i> n=10	<i>M. inornata</i> n=10	LGM 27 n=10	LGM 38 n=10
Linear (µm)							
DGO	3,4±0,3 (3,0 – 4,0)	3,2±0,3 (3,0 – 3,5)	3,1±0,6 (2,0-4,0)	3,6±0,4 (3,0 – 4,0)	2,8±0,3 (2,5 – 3,0)	3,3±0,3 (3,0 – 3,5)	3,1±0,2 (3,0 – 3,5)
DBMA	50,6±3,7 (34,0 – 60,0)	47,7±5,8 (30,0 – 61,0)	51,6±3,9 (44,0 – 63,0)	47,4±14,6 (32,0 – 80,0)	43,9±7,1 (34,0 – 56,0)	50,0±2,0 (47,0 – 53,0)	52,1±3,0 (48,0 – 58,0)
CVBM	4,4±0,3 (4,0 – 5,0)	4,0±0,3 (3,5 – 6,0)	4,9±0,2 (4,5 – 5,0)	4,7±0,3 (4,5 – 5,0)	5,0±0,2 (4,5 – 5,0)	4,5±0,0 (4,5 – 4,5)	4,1±0,3 (4,0 – 5,0)
LVBM	3,4±0,3 (3,0 – 4,0)	3,1±0,2 (2,5 – 4,0)	3,1±0,2 (3,0 – 3,5)	3,7±0,3 (3,5 – 4,0)	3,5±0,6 (2,0 – 4,0)	3,0±0,0 (3,0 – 3,0)	3,2±0,3 (3,0 – 4,0)
DEA	90,7±4,4 (75,0 – 108,0)	88,1±6,3 (66,0 – 101,0)	88,7±4,0 (77,0 – 96,0)	79,6±13,3 (64,0 – 105,0)	93,3±7,1 (86,0 – 107,0)	90,2±2,1 (86,0 – 93,0)	86,7±7,0 (75,0 – 100,0)
CT	53,8±4,3 (47,0 – 65,0)	50,1±2,6 (45,0 – 59,0)	51,9±3,6 (44,0 – 60,0)	57,6±4,8 (52,0 – 65,0)	49,2±6,3 (41,0 – 57,0)	51,5±2,8 (47,0 – 56,0)	51,5±3,4 (45,0 – 55,0)
HC	12,5±1,6 (10,0 – 16,0)	10,7±0,8 (10,0 – 15,0)	15,9±2,4 (9,0 – 20,0)	19,1±3,3 (15,0 – 23,0)	18,6±1,4 (17,0 – 21,0)	12,2±2,1 (25,1 – 31,3)	11,4±1,3 (10 – 14)

Tabela 5 – Análise morfométrica de juvenis de segundo estágio (J2) de espécies de *Meloidogyne* obtidos em campos de tabaco na região sul do Brasil

		Espécies						(conclusão)	
Variáveis		<i>M. javanica</i> n=130	<i>M. incognita</i> n=140	<i>M. enterolobii</i> n=100	<i>M. arenaria</i> n=10	<i>M. inornata</i> n=10	LGM 27 n=10	LGM 38 n=10	
Taxas									
a		26,6±1,7	27,8±1,6	22,1±1,9	26,1±2,6	23,1±2,5	27,5±2,1	26,2±1,4	
		(21,8 – 33,3)	(24,0 – 33,3)	(20,0 – 30,0)	(23,5 – 30,7)	(19,6 – 26,6)	(25,1 – 31,3)	(23,0 – 28,3)	
c		8,6±0,7	8,6±0,5	8,3±0,6	8,3±0,7	9,7±1,8	8,9±0,4	8,1±0,4	
		(7,2 – 10,7)	(7,3 – 9,8)	(7,0 – 10,0)	(7,2 – 9,2)	(7,6 – 12,9)	(8,3 – 9,4)	(7,6 – 8,8)	
c'		4,6±0,5	4,9±0,3	4,1±0,5	5,0±0,4	4,3±0,6	4,5±0,2	4,9±0,3	
		(3,6 – 5,7)	(4,0 – 5,7)	(3,3 – 5,5)	(4,2 – 5,7)	(3,5 – 5,2)	(4,2 – 4,7)	(4,5 – 5,4)	
L/DBMA		9,5±0,9	9,1±1,1	8,4±0,7	10,8±3,0	10,9±1,9	9,1±0,5	8,0±0,7	
		(7,6 – 15,0)	(7,1 – 14,1)	(6,5 – 10,4)	(6,0 – 15,2)	(8,0 – 13,6)	(8,3 – 10,1)	(6,9 – 9,2)	
Porcentagem									
(DEA/L)*100		19,0±1,3	20,5±1,6	20,7±1,03	16,8±2,8	19,9±1,7	19,8±0,8	20,9±2,3	
		(16,6 – 24,2)	(15,5 – 27,5)	(18,1 – 23,0)	(13,3 – 21,9)	(17,2 – 23,1)	(18,7 – 21,1)	(18,0 – 24,9)	

n=número de indivíduos mensurados.

Todas as medidas estão em µm: média±desvio padrão e amplitude em parênteses.

Tabela 6 - Análise morfométrica de machos de espécies de *Meloidogyne* obtidos em campos de tabaco na região sul do Brasil

		Espécies				(continua)	
Variáveis	<i>M. javanica</i> n=110	<i>M. incognita</i> n=140	<i>M. enterolobii</i> n=100	<i>M. arenaria</i> n=10	<i>M. inornata</i> n=10	LGM 27 n=10	LGM 38 n=10
Linear							
(µm)							
L	1650,0±97,1 (1450,4 – 1930,6)	1460,8±83,4 (1166,2 – 1577,8)	2083,1±156,7 (1813,0 – 2508,8)	1496,5±93,8 (1352,4 – 1626,8)	1535,7±95,2 (1362,2 – 1656,2)	2052,1±124,6 (1852,2 – 2254,0)	1519,5±50,0 (1519,0 – 1666,0)
Øc	38,5±3,4 (34,3 – 49,0)	37,5±2,5 (28,4 – 44,1)	54,4±5,5 (49,0 – 68,6)	39,2±3,3 (34,3 – 44,1)	40,2±5,1 (34,3 – 49,0)	52,9±4,5 (49,0 – 58,8)	42,1±2,5 (39,2 – 44,1)
Øbst	20,5±2,1 (17,0 – 27,0)	18,0±0,7 (17,0 – 20,0)	20,8±0,8 (20,0 – 22,0)	18,7±0,7 (18,0 – 20,0)	18,2±0,9 (17,0 – 20,0)	20,5±0,7 (20,0 – 22,0)	18,8±0,8 (18,0 – 20,0)
Øpe	29,7±3,1 (27,0 – 41,7)	28±0,8 (27,0 – 30,0)	25,6±0,7 (24,0 – 27,0)	28,7±0,7 (28,0 – 30,0)	28,6±1,0 (27,0 – 30,0)	25,9±0,7 (25,0 – 27,0)	29,0±0,8 (28,0 – 30,0)
CE	113,7±51,5 (86,0 – 308,7)	94,2±4,6 (86,0 – 105,0)	105,0±94,6 (89,0 – 140,0)	101,4±5,3 (95,0±110,0)	106,6±7,0 (97,0 – 121,0)	99,8±4,9 (89,0 – 107,0)	101,5±3,0 (97,0 – 106,0)
St	23,1±0,9 (22,0 – 25,0)	23,6±0,7 (22,0 – 25,0)	22,9±0,9 (21,0 – 25,0)	24,3±1,2 (23,0 – 26,0)	23,2±0,8 (22,0 – 24,0)	23,1±0,7 (22,0 – 24,0)	24,7±0,7 (24,0-26,0)

Tabela 6 - Análise morfométrica de machos de espécies de *Meloidogyne* obtidos em campos de tabaco na região sul do Brasil

(continuação)

Variáveis	Espécies					
	<i>M. javanica</i> n=110	<i>M. incognita</i> n=140	<i>M. enterolobii</i> n=100	<i>M. arenaria</i> n=10	<i>M. inornata</i> n=10	LGM 27 n=10
Linear (µm)						
AbSt	3,5±0,6 (3,0 – 5,5)	3,9±0,2 (3,5 – 4,5)	3,8±0,3 (3,0 – 4,0)	4,1±0,4 (3,5 – 5,0)	4±0,3 (3,5 – 4,5)	3,5±0,4 (3,0 – 4,0)
ØbSt	5,9±0,7 (5,0 – 8,5)	5,9±0,3 (4,0 – 6,5)	5,5±0,4 (5,0 – 6,0)	6,0±0,4 (5,5 – 7,0)	5,8±0,4 (5,0 – 6,5)	5,6±0,4 (5,0 – 6,0)
DGO	2,9±0,4 (2,0 – 4,0)	3,5±0,4 (2,5 – 4,5)	4,2±0,3 (4,0 – 4,5)	4,0±0,3 (3,5 – 4,5)	3,4±0,4 (3,0 – 4,0)	4,1±0,4 (3,5 – 4,5)
DBMA	94,8±10,2 (83,0 – 147,0)	101,9±5,7 (89,0 – 121,0)	101,5±7,1 (86,0 – 121,0)	125,6±7,5 (113 – 140)	122±10,0 (103,0 – 136,0)	96,5±6,1 (89,0 – 105,0)
DEA	140,1±17,9 (120,0 – 220,5)	139,9±8,3 (113,0 – 173,0)	163,3±5,5 (151,0 – 176,0)	142,5±10,8 (128 – 160)	148,4±11,0 (129,0 – 160,0)	153,2±7,0 (139,0 – 161,0)
CT	23,1±2,9 (18,0 – 34,3)	22,6±1,4 (18,0 – 25,0)	17,9±1,4 (15,0 – 21,0)	23,2±1,7 (21,0 – 26,0)	23,7±2,1 (20,0 – 27,0)	16,3±1,4 (14,0 – 18,0)
LE	28,0±2,3 (18,0 – 31,0)	27,9±0,9 (26,0 – 30,0)	25,9±0,8 (25,0 – 28,0)	28,5±1,1 (27,0 – 30,0)	28,6±1,0 (27,0 – 30,0)	25,3±0,7 (24,0 – 26,0)
						24,8±0,8 (24,0 – 26,0)
						29,0±0,8 (28,0 – 30,0)
						115,5±7,2 (107,0 – 126,0)
						153,3±7,2 (139,0 – 162,0)
						24,8±0,8 (24,0 – 26,0)
						29,0±0,8 (28,0 – 30,0)

Tabela 6 - Análise morfométrica de machos de espécies de *Meloidogyne* obtidos em campos de tabaco na região sul do Brasil

Espécies								(conclusão)			
<i>M. javanica</i>		<i>M. incognita</i>		<i>M. enterolobii</i>		<i>M. arenaria</i>		<i>M. inornata</i>		LGM 27	LGM 38
Variáveis	n=110	n=140	n=100	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
Linear (µm)											
G	8,7±0,9	8,3±0,8	8,0±0,9	8,9±0,9	8,9±1,0	8,6±1,1	9,3±0,8				
	(7,0 – 10,0)	(7,0 – 10,0)	(7,0 – 10,0)	(8,0 – 10,0)	(7,0 – 10,0)	(7,0 – 10,0)	(8,0 – 10,0)				
Taxas											
a	43,1±3,1	39,1±2,3	38,5±3,1	38,3±2,1	38,5±3,0	38,9±2,5	37,9±1,7				
	(37,5 – 49,7)	(32,3 – 46,3)	(31,07 – 51,0)	(34,8 – 42,0)	(33,0 – 42,0)	(34,8 – 44,4)	(35,6 – 40,8)				
AbSt/ØbSt	1,7±0,2	1,5±0,1	1,5±0,1	1,5±0,1	1,5±0,1	1,6±0,1	1,4±0,1				
	(1,3 – 2,0)	(1,0 – 1,7)	(1,3 – 1,7)	(1,2 – 1,7)	(1,3 – 1,6)	(1,4– 1,8)	(1,3 – 1,5)				
L/DBMA	17,6±1,8	14,4±1,0	20,6± 2,0	11,9±0,9	12,6±0,8	21,3±1,9	13,8± 0,9				
	(12,8 – 21,2)	(11,3 – 16,2)	(16,4 – 27,8)	(11,0 – 13,5)	(11,8 – 14,3)	(18,3 – 25,3)	(12,5 – 15,3)				
c	72,4±7,7	64,7± 3,0	116,8± 9,5	64,7±5,1	65,0±3,1	126,4±8,1	64,2± 2,9				
	(54,9 – 98,0)	(48,6 – 84,4)	(97,0 – 166,6)	(58,8 – 74,7)	(61,3 – 71,1)	(116,0 – 140,9)	(59,9 – 68,6)				
Porcentagens											
(DEA/L)*100	8,5±1,0	9,6±0,6	7,9±0,6	9,6±1,0	9,7±0,8	7,5±0,5	9,6±0,5				
	(6,9 – 11,4)	(8,1 – 11,6)	(6,4 – 9,2)	(8,5 – 11,4)	(8,3 – 10,7)	(6,8 – 8,6)	(8,7 – 10,2)				

n=número de indivíduos mensurados.

Todas as medidas estão em µm: média±desvio padrão e amplitude em parênteses.

Pequena variabilidade morfométrica intraespecífica foi observada por meio das análises multivariadas (PCA e CA), mas com pequena sobreposição entre isolados de espécies distintas. Em relação às medidas de J2, a porcentagem da variância explicada pelos dois primeiros componentes principais (CP) e variáveis canônicas (VC) foram de cerca de 52,6% (PCA) e 66%(CA), respectivamente. No PCA, o CP1 foi positivo para dez características e foi mais positivamente correlacionado com $\varnothing c$ (0,92) e $\varnothing a$ (0,95); CP2 foi positivo para quinze características e foi mais positivamente correlacionado com L (0,93). Como mostrado pelo Scatterplot e dendograma (Figura 6) pode-se visualizar a formação de três agregados. O primeiro e maior grupo (em preto) incluiu todos os isolados de *M. incognita* (100% de correspondência), LGM 27, LGM 38, LGM 32 (*M. enterolobii*) e isolados de *M. javanica* (LGM 43 e LGM 44); o segundo grupo (em vermelho) encerra a grande maioria (85% de correspondência) de isolados de *M. javanica* (LGM 7.1, LGM 08, LGM 10.1, LGM 12, LGM 13, LGM 17, LGM 18, LGM 21, LGM 29.2, LGM 33, LGM 37), dois isolados de *M. enterolobii* (LGM 03 e LGM 11), *M. arenaria* e *M. inornata*; o terceiro e último grupo (em verde) encerra os demais isolados de *M. enterolobii* (70% de correspondência), a saber: LGM 34, LGM 04, LGM 28, LGM 29.1, LGM 30, LGM 23 e LGM 26. Entretanto, o gráfico Heplot (Figura 7), obtido por meio da análise de variáveis canônicas, exibiu maior capacidade estatística de diferenciar as espécies a partir de indivíduos J2 que a análise de PCA. Observa-se, por exemplo, que *M. inornata* e *M. arenaria* não foram alocados em nenhum agrupamento. No mais, também foi observada elevada correspondência específica dentro de grupos.

Figura 6 - Scatterplot e dendograma obtidos a partir de dados morfométricos de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp. submetidos à análise de componentes principais. Indivíduos de 1-10 (*Me*); 11-23 (*Mj*); 24-37 (*Mi*); 38(*Ma*); 39(*Min*); 40(LGM 38); 41(LGM 27)

Figura 7 - Gráfico heplot mostrando (di) similaridade morfométrica entre juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne* através da análise canônica discriminante (CA)

Os resultados das análises de indivíduos machos alinham-se àqueles observados em indivíduos J2, mas com índices de correspondência maiores. A porcentagem de variância explicada pelos dois primeiros componentes principais e variáveis canônicas foram de cerca de 76,7% (PCA) e 82,7% (CA), respectivamente. No PCA, o CP1 foi positivo para dez características e foi mais positivamente correlacionado com L(0,97), $\emptyset c$ (0,97) e c (0,98); CP2 foi positivo para nove características e foi mais positivamente correlacionado com $\emptyset bSt$ (0,93). Como mostrado pelo scatterplot e dendograma (Figura 8) também se pode visualizar a formação de três agregados a exemplo do verificado na análise de indivíduos J2. O primeiro grupo (preto) inclui *M. incognita* (100% de correspondência), dois isolados de *M. javanica* (LGM 43 e LGM 44), *M. arenaria*, *M. inornata* e LGM 38; o segundo grupo (vermelho) encerra a grande maioria (92% de correspondência) de isolados de *M. javanica* (LGM 7.1, LGM 08, LGM 10.1, LGM 12, LGM 17, LGM 18, LGM 21, LGM 29.2, LGM 33 e LGM 37); o terceiro grupo (verde) encerra todos os isolados de *M. enterolobii* (100% de correspondência) e o isolado LGM 27. Situação análoga foi observada pelo gráfico Heplot (Figura 9), obtido por meio da análise de variáveis canônicas, onde a formação de grupos espécie-específicos foi igualmente visualizada.

Figura 8 - Scatterplot e Dendograma obtidos a partir de dados morfométricos de machos de *Meloidogyne* spp. submetidos à análise de componentes principais. Indivíduos de 1-10 (*Me*); 11-22 (*Mj*); 24-36 (*Mi*); 37(*Ma*); 38(*Min*); 39(LGM 38); 40(LGM 27)

Figura 9 - Gráfico heplot mostrando (di) similaridade morfológica entre juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne* através da análise canônica discriminante (CA)

2.4 Discussão

Os resultados demonstram que a frequente ocorrência de meloidoginioses em campos infestados de variedades portadoras do gene *Rk*, deve-se primariamente à natureza etiológica da enfermidade, incitada por genótipos virulentos de *M. incognita* e outras espécies, mormente *M. javanica* e *M. enterolobii*. Lamentavelmente, devido à escassez de informações acerca do panorama nematológico nacional detalhado antes da introdução de cultivares resistentes no Brasil, a hipótese de seleção direcional a favor destas formas virulentas é provável, mas certamente não conclusiva.

No presente estudo não foram observados alguns fenótipos de α -esterase, tais como J2 (*Rm*: 1.0 e 1.4) e J2a (*Rm*: 1.0 e 1.3) para *M. javanica*; A1 (*Rm*: 1.25) e A3 (*Rm*: 1.2, 1.25 e 1.35) para *M. arenaria* e S1 (*Rm*: 0.80) para *M. incognita*; fenótipos que já haviam sido relatados, com relativa frequência, em algumas populações brasileiras de *Meloidogyne*, encontradas parasitando algumas culturas como alface, café e soja (CARNEIRO; ALMEIDA; QUÉNÉHERVE, 2000; CASTRO; LIMA; CARNEIRO, 2003; OLIVEIRA; OLIVEIRA; GONÇALVES, 2006; COFCEWICZ et al., 2004). Estes resultados sugerem, portanto, certa homogeneidade bioquímica de populações de *Meloidogyne* encontradas na cultura do fumo na região Sul do Brasil. No que tange aos fenótipos atípicos e inéditos de α -esterase (F2 e F3), interessantemente, as isoformas de maior mobilidade, para ambos os fenótipos, aparecem nitidamente somente quando se adicionam grandes quantidades de extrato protéico, geralmente três fêmeas.

A utilização exclusiva da observação de modelos perineais, como realizado em alguns laboratórios, mostra-se consideravelmente limitada para identificação específica de *Meloidogyne*, ora pela ocorrência de indivíduos aberrantes e/ou intermediários que ocorrem comumente em populações monoespecíficas, ora pela coexistência de espécies semelhantes (populações mistas); situações estas, difíceis de serem solucionadas mesmo por taxionomistas experientes, resultando, conseqüentemente, em diagnósticos inconsistentes (CARNEIRO; ALMEIDA; CARNEIRO, 1996; CARNEIRO et al., 2004). Com efeito, elevada variabilidade intra-específica em populações classificadas como de *M. enterolobii* com base em zimogramas de α -esterase foi encontrada tanto neste estudo quanto em trabalhos diversos, seja no exterior ou mesmo no Brasil (BRITO et al, 2004; HUMPHREYS et al., 2012; CARNEIRO et al., 2001). Soma-se, ainda, o considerável número de espécies que exibem modelo perineal similar ao de *M. incognita*. Portanto, a adoção de técnicas complementares, não subjetivas e factíveis, tais como a eletroforese de α -esterases, mostra-se, de fato, imprescindível (CARNEIRO; ALMEIDA; QUÉNÉHERVÉ, 2000).

A presença de populações de *M. incognita*, classificadas por meio de critérios bioquímicos e morfológicos altamente correlatos, em grupos distintos vem ratificar estudos anteriores (HUGALL; STANTON; MORITZ, 1998), nos quais foi demonstrada a elevada complexidade estrutural dos genes ribossomais em espécies apomíticas tropicais (*M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica*), caracterizado tanto pela presença de diferentes cópias de ITS1 dentro de um mesmo indivíduo quanto pela ocorrência de cópias quase idênticas entre estas espécies; portanto, baixa correlação existe entre as morfoespécies filiadas ao gênero *Meloidogyne* e sequências destes genes, restringindo, consideravelmente, seu valor

diagnóstico de maneira isolada (HANDOO et al., 2005). Estes resultados corroboram a hipótese de evolução por hibridização nestas espécies. Não obstante, existe, pelo menos em teoria, a possibilidade da existência de espécies morfológica e/ou bioquimicamente indistinguíveis de *M. incognita*; afinal, algumas espécies de *Meloidogyne* foram descritas justamente a partir de isolados morfolologicamente similares a *M. incognita*, tais como *M. paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes, Santos & Almeida, 1996, *M. inornata*, *M. ethiopica*, *M. izalcoensis* Carneiro, Almeida, Gomez & Hernandez, 2005 e *M. thailandica* Handoo, Skantar, Carta & Erbe, 2005 (CARNEIRO et al., 1996; CARNEIRO et al., 2008; CARNEIRO et al., 2005; CARNEIRO et al., 2004; HANDOO et al., 2005). Quanto à ocorrência de polimorfismos entre as sequências de *M. enterolobii* e as demais, a mesma figura fato bastante animador à medida que torna possível o desenho de iniciadores específicos para *M. enterolobii*, separando-a de outras espécies apomíticas tropicais. Adicionalmente, a formação do grupo composto somente pela população LGM 45 dá suporte ao seu *status* taxionômico *sui generis*.

No que concerne à caracterização morfométrica, a elevada correspondência entre caracteres (J2 e machos) e classificação prévia em nível de espécie (grupos) ratifica o valor taxionômico das variáveis utilizadas, desde que, obviamente, as mesmas sejam submetidas a tratamentos estatísticos multivariados apropriados. Análises destas combinações permitiram, de maneira geral, um melhor entendimento das relações morfométricas entre os isolados de *Meloidogyne*. Métodos univariados, por seu turno, demonstraram baixa capacidade em discriminar isoladamente as espécies de *Meloidogyne*. Infelizmente, o *status* taxionômico dos isolados atípicos (LGM 27 e LGM 38) não pôde ser determinado com segurança, sobretudo para o isolado LGM 27. É, entretanto, inconteste a proximidade morfométrica de LGM 27 e LGM 38 com *M. enterolobii* e *M. incognita*, respectivamente. A hipótese de especiação críptica (especiação sem diferenças morfológicas óbvias) para o isolado LGM 38 não pode, obviamente, ser descartada.

O predomínio de genótipos virulentos (biótipos e espécies), em áreas sob intensa pressão de seleção, já havia sido observado em áreas produtoras nos EUA e Austrália, nas décadas de 80 e 90 (FORTTNUM; KRAUSZ; CONRAD, 1984; RICH; GARCIA, 1985; STANTON et al., 1992) ou mesmo no Brasil, em amostras coligidas também em municípios de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (ZEM; ZANON; MONTEIRO, 1985; JOHNSON; WAY; BARKER, 2005). Não obstante, nos EUA e Austrália, este predomínio é produto de seleção direcional, conforme exaltado pelos respectivos autores.

No que diz respeito à inesperada ocorrência de populações avirulentas na cultivar NC95 de fumo (portador do gene *Rk*) (LGM 36, 38, 39 e 42), conforme demonstrado pelo teste de hospedeiros diferenciais, parasitando e causando doença em cultivares teoricamente resistentes justifica-se tanto pelo provável uso de cultivares alcunhadas “piratas” por parte de alguns fumicultores (PULCINELLI, comunicação pessoal) quanto pela eventual ocorrência de temperaturas (30 – 35°C) nas quais o gene *Rk* torna-se inefetivo (SHERPHERD; BARKER, 1990). Em relação a *M. enterolobii*, variações no seu espectro de virulência têm sido observadas frequentemente em diversas regiões do mundo, principalmente no que diz respeito à sua capacidade de causar doença ou não em algodão. Estas observações, somadas aos resultados deste trabalho suportam e solidificam a ideia de existência de raças fisiológicas também para esta espécie, conforme preconizado por Brito et al., (2004).

Considerando que o panorama nematológico nacional era caracterizado predominantemente pela ocorrência de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (ZEM; ZANON; MONTEIRO, 1985; SUDO; ESPINDOLA, 1987), os resultados do presente estudo demonstram que, atualmente, o espectro das espécies de *Meloidogyne* que acometem a cultura é maior, e inclui *M. incognita*, *M. javanica*, *M. enterolobii*, *M. arenaria* e *M. inornata*. Este maior espectro pode ser fruto de um levantamento mais criterioso, polifásico, mas também pode refletir uma alteração na composição de espécies, produto do uso intensivo e prolongado do gene *Rk*, que é efetivo contra as raças 1 e 3 de *M. incognita* e a raça 1 de *M. arenaria*. Com efeito, a segunda hipótese é corroborada pelos resultados obtidos no teste de hospedeiros diferenciais, nos quais conspícua prevalência da raça 2 de *M. incognita* foi observada. Esta elevada incidência de *M. incognita* e *M. javanica* em cultivares resistentes não figura novidade, haja vista que já foi mencionada em alguns estudos anteriores. Apesar dessa clara predominância de *M. incognita*, é imprescindível mencionar que sua distribuição foi relativamente menor quando comparada à de *M. javanica* e *M. enterolobii* (Figura 10).

Não obstante, ao contrário dos achados anteriores, no presente estudo, *M. arenaria* apresentou pequena porcentagem de ocorrência (5,1%); *M. enterolobii*, por seu turno, foi a terceira espécie de maior porcentagem de ocorrência (25,6%). Acrescentando-se os assinalamentos realizados por Gomes, Couto e Carneiro (2008), torna-se ainda mais evidente a importância dessa última espécie no cenário patológico da cultura, demonstrando, pois, não apenas elevada incidência como também considerável distribuição geográfica, principalmente no estado de Santa Catarina (Figura 10). Surgem, assim, questionamentos diversos acerca de sua recente detecção: teria *M. enterolobii* sido introduzido e disseminado neste lapso de tempo? O que levaria à sua crescente incidência? Seria *M. enterolobii* espécie indígena? Teria

a mesma sido erroneamente identificada, mercê, provável, das dificuldades inerentes aos métodos de identificação utilizados na época? Além disso, o que teria feito a incidência de *M. arenaria* diminuir a esta taxa?

Figura 10 - Distribuição de espécies de *Meloidogyne* identificadas em plantas de fumo infectadas oriundas de áreas produtoras da região sul do Brasil

Partindo da premissa de que *M. enterolobii* exibe, habitualmente, elevada variabilidade morfológica com alguns de seus modelos perineais muito similares a *M. arenaria*, e que, no passado, a identificação de espécies de *Meloidogyne* era realizada quase que exclusivamente na observação desta característica, é plausível concluir que *M. enterolobii* tenha sido, frequentemente, confundido com *M. arenaria* ou mesmo, em alguns casos, com *M. incognita*. De fato, devido à adoção de critérios taxionômicos não subjetivos e exequíveis, sobretudo o uso de marcadores bioquímicos (fenótipos de α -esterases), é demasiadamente crescente, em relativamente pequeno lapso de tempo, o número de registros desta espécie nas mais diversas culturas, no Brasil e em todo o mundo (CARNEIRO et al., 2006; CHARCHAR et al., 2009; SILVA et al., 2008; ALMEIDA et al., 2008; MOLINARI et al., 2006; BRITO et al., 2008; BRITO et al., 2010). Coerentemente, *M. enterolobii* foi recentemente detectada parasitando plantas de sucanga (*Senefeldera multiflora* Mart) na Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro, demonstrando, pois, ser espécie indígena no território brasileiro e eliminando,

por conseguinte, a hipótese de introdução (LIMA et al., 2005). Corrobora, ainda, com esta linha de pensamento, o fato de que a população E180, da qual *M. mayaguensis* (= *M. enterolobii*) foi descrita, tenha sido identificada, primeiramente, como uma população atípica de *M. arenaria*, devido à sua elevada similaridade morfológica (RAMMAH; HIRSCHMANN, 1988). Estas evidências, em conjunto, tornam tangível a ideia de que *M. enterolobii* tenha sido negligenciado compulsoriamente devido, principalmente, à dificuldades inerentes a sua identificação.

Este trabalho figura, ao que tudo indica, como o primeiro registro de *M. inornata* parasitando plantas de fumo na região sul do Brasil. Anteriormente, esta espécie já tinha sido assinalada parasitando plantas de fumo no estado de São Paulo (FIGUEIREDO, 1958). Acredita-se que este nematoide tenha sido, por vezes diversas, assinalado como *M. incognita* devido, sobretudo, ao não estabelecimento de marcadores bioquímicos na época e a inobservância de parâmetros morfológicos dos machos e J2, diferenças morfológicas que lhes são típicas. A identificação de *M. inornata* (LGM 45) neste estudo foi possível somente pelo uso de eletroforese de α -esterases (principal característica discriminante da espécie); afinal, sua configuração perineal é bastante semelhante à *M. incognita* (Figura 2D). Com efeito, esta espécie, descrita nos idos de 50 e revalidada atualmente; é sabidamente próxima de *M. incognita* em termos morfológicos (configuração perineal) (LORDELLO, 1956; CARNEIRO et al., 2008).

As observações realizadas neste estudo revestem-se, em conjunto, de grande importância não apenas acadêmica, mas, sobretudo prática, na medida em que implica em alterações consideráveis no manejo da enfermidade em questão. Sabe-se, por exemplo, que o rol de espécies vegetais a serem incluídas em eventuais esquemas de rotação ou sucessão é deveras tênue para *M. enterolobii* se comparado às opções disponíveis para *M. javanica* e *M. incognita*, espécies mais comuns e, por esta razão, rotineiramente estudadas por pesquisadores diversos. Até o momento, são poucas as culturas reconhecidas como não hospedeiras de *M. enterolobii* (toranja, laranja azeda, alho e amendoim) (CASTAGNONE-SERENO, 2012), podendo não figurar, portanto, como opções atrativas. Ainda, opções de rotação devem ser direcionadas, evidentemente, a patótipos virulentos, principalmente raça 2 de *M. incognita*, algo, muitas vezes, não especificado na literatura nematológica.

Esta mesma linha de raciocínio aplica-se também ao controle genético das meloidoginoses. Neste particular, vale enfatizar que, embora não se disponham de cultivares com elevados níveis de resistência a biótipos virulentos de *M. incognita* (raças 2 e 4), *M. arenaria* (raça 2) e *M. javanica*, fontes com elevados níveis de resistência aos mesmos já são

sabidamente conhecidas, sejam espécies selvagens de *Nicotiana* ou não (DI VITO et al., 1998; REED; SCHNEIDER, 1992; DAVIS et al., 1988; NG'AMBI et al., 1999); para *M. enterolobii*, infelizmente, fontes de resistência virtualmente inexistem até o presente momento. Preocupações estas, indubitavelmente, tangíveis, sólidas, sendo integralmente justificáveis na medida em que o verme em apreço se destaca justamente pela sua singular capacidade de se desenvolver e causar doença mesmo em cultivares de espécies portadoras de genes de resistência monogênica (genes *R*) que, habitualmente, conferem resistência à *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (FARGETTE; BRAAKSMA, 1990; BERTHOU et al., 2003; BRITO et al., 2007; CETINTAS et al., 2008); estas observações sugerem, assim, a dificuldade de se encontrar genes de grande efeito efetivos contra *M. enterolobii*.

O predomínio de patótipos virulentos de *M. incognita* já foi relatado para diversos outros patossistemas envolvendo espécies de solanáceas carregando genes *R*, tais como cultivares de tomate portadores do gene *Mi*, pepino com o gene *N* e de melão com genes *Me1* e *Me3* (TZORTZAKAKIS, 2005; ROBERTSON et al., 2006), constituindo-se em mais um claro exemplo da plasticidade genética de populações de *M. incognita*. Partindo do pressuposto de que genes *R* de solanáceas que conferem resistência a espécies de *Meloidogyne* sejam, estrutural e funcionalmente relacionados, é provável que a virulência tenha elevado custo adaptativo associado, conforme observado para populações de *M. incognita* virulentas em cultivares de tomate portadores do gene *Mi* (CASTAGNONE-SERENO; BONGIOVANNI; WAJNBERG, 2006; CASTAGNONE-SERENO, 2006). Logo, infere-se, teoricamente, que cultivares de fumo portadoras de gene *Rk* possam vir a ter sua efetividade restaurada após alguns anos, caso não lhes seja imposta a mesma pressão de seleção; este fato seria, sem dúvida, animador para programas de melhoramento de fumo. Com efeito, nas amostras coligidas caracterizadas pela coexistência com outras espécies, *M. incognita* não foi a espécie prevalente em nenhuma delas, confirmando, pelo menos teoricamente, a baixa capacidade competitiva de indivíduos virulentos desta espécie.

É digno de nota também que este quadro torna-se ainda mais preocupante em áreas infestadas em que coexistem mais de uma espécie de *Meloidogyne*, como ocorreu em várias áreas deste estudo (25,64%). Afinal, teoricamente, o rol de opções para o manejo destes vermes tende, por razões óbvias, a se estreitar consideravelmente em áreas com esta particularidade; as eventuais prescrições de medidas de controle tornam-se, conseqüentemente, tarefas bastante complexas e pouco exequíveis. Além disso, a introgressão de vários genes, conferindo resistência a mais de uma espécie, em cultivares comerciais, via melhoramento convencional, é tarefa, sem dúvida, laboriosa e onerosa.

Outra questão pertinente diz respeito à inexistência de estudos relativos à determinação do limiar de dano econômico de *M. enterolobii* na cultura do tabaco. Sabe-se, no entanto, que *M. enterolobii* exibe, em culturas diversas, maior taxa de multiplicação e patogenicidade que *M. incognita* (CASTAGNONE-SERENO, P, 2012).

Em suma, diante dos resultados aqui obtidos vê-se como necessária a realização de mais estudos que possam subsidiar a integração das diversas formas de manejo de meloidoginioses na cultura do fumo. Pesquisas acerca do controle genético e cultural devem ser imediatamente reformuladas.

2.5 Considerações finais

O *status* taxionômico dos isolados LGM 27 e LGM 38 permanecem incógnitos; estudos morfológicos (machos, fêmeas e J2) e moleculares (sequenciamento de outras regiões genômicas) adicionais mostram-se necessários para definí-los.

O uso exclusivo da observação de modelos perineais na determinação de espécies de *Meloidogyne* pode resultar em resultados inconsistentes; ferramentas adicionais (máxime fenótipos de α -esterases) devem ser indubitavelmente utilizadas rotineiramente.

Quanto à meloidoginioses na cultura do fumo, existe a necessidade urgente de incluir *M. enterolobii*, parasito até então negligenciado, na lista de patógenos potenciais, levando-o em consideração tanto na prescrição de esquemas de rotação e/ou sucessão quanto em programas de melhoramento visando à resistência genética.

A inclusão de resistência a biótipos virulentos de *M. incognita* em programas de melhoramento mostra-se igualmente necessário.

Sob o âmbito acadêmico e prático, estudos de patogenicidade comparativa entre as espécies ocorrentes neste levantamento deve, futuramente, serem realizados.

Referências

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.p. 948.

AKEHURST, B.C. **Tobacco**. Longman: New York, 1981. p.441-447.

ALMEIDA, E.J.; SOARES, P.L.M.; SILVA, A.R.; SANTOS, J.M. Novos registros de *Meloidogyne mayaguensis* no Brasil e estudo morfológico comparativo com *M. incognita*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v.32, n.3, p.236 – 241, 2008.

ALMEIDA, E.J.; SOARES, P.L.M.; SILVA, A.R.; SANTOS, J.M. Novos registros sobre *Meloidogyne mayaguensis* no Brasil e estudo morfológico comparativo com *M. incognita*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v.32, n.3, p. 236-241, 2008.

BATTEN, C.K.; POWELL, N.T. The *Rhizoctonia-Meloidogyne* Disease Complex in Flue-cured Tobacco. **Journal of Nematology**, College Park, v.3, n.2, p. 164 - 169, 1971.

BERTHOU, F.; KOUASSI, A.; BOSSIS, M.; DANTEC, J.P.; EDDAOUDI, M.; FERJI, Z.; PELLE, R.; TAGHZOUTI, M.; ELLISSECHE, D.; MUGNIÉRY, D. Enhancing the resistance of the potato to Southern root knot nematodes by using *Solanum sparsipilum* germoplasm. **Euphytica**, Wageningen, v.132, p.57-65, 2003.

BRITO, J.A.; KAUR, R.; CETINTAS, R.; STANLEY, J.D.; MENDES, M.L.; MCAVOY, E.J.; POWERS, T.O.; DICKSON, D.W. Identification and isozymes characterization of *Meloidogyne* spp. infecting horticultural and agronomic crops, and weed plant in Florida. **Nematology**, Leiden, v.10, n.5, p.757-766, 2008.

BRITO, J.A.; KAUR, R.; CETINTAS, R.; STANLEY, J.D.; MENDES, M.L.; POWERS, T.O.; DICKSON, D.W. *Meloidogyne* spp. infecting ornamental plants in Florida. **Nematropica**, Bradenton, v.40, p.87-103, 2010.

BRITO, J.A.; POWERS, T.O.; MULLIN, P.G.; INSERRA, R.N.; DICKSON, D.W. Morphological and Molecular Characterization of *Meloidogyne mayaguensis* Isolates from Florida. **Journal of Nematology**, College Park, v.36, n.3, p.232-240, 2004.

BRITO, J.A.; STANLEY, J.D.; KAUR, R.; CETINTAS, R.; DI VITO, M.; THIES, J.A.; DICKSON, D.W. Effects of the *Mi-1*, *N*, *Tabasco* genes on infection and reproduction of *M. mayaguensis* on tomato and pepper genotypes. **Journal of Nematology**, College Park, v.39, n.4, p.327-332, 2007.

BROWN, D.J.F.; TOPHAN, P.B. A comparison of the reported variation in the morphometrics of *Xiphinema diversicaudatum* (Nematoda: Dorylaimida) and the effect of preparing specimens for examination by optical microscopy. **Nematologia Mediterrânea**, Bari, v.12, p.169-186, 1984.

CARNEIRO, R.G.; MÔNACO, A.P.A.; MORITZ, M.P.; NAKAMURA, K.C.; SCHERER, A. Identificação de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira e em plantas invasoras, em solo argiloso, no estado do Paraná. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v.30, n.3, p.293-298, 2006.

- CARNEIRO, R.M.D.G. Impacto de novas espécies de *Meloidogyne* na agricultura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 27., 2007. **Anais...** (Palestra), 2007.p.36 – 37.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides das galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v.25, n.1, p.223-228, 2001.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; CARNEIRO, R.G. Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge, v.19, n.6, p.555-560, 1996.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; GOMES, A.C.M.M.; HERNANDEZ, A. *Meloidogyne izalcoensis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising coffee in El Salvador. **Nematology**, Leiden, v.7, n.6, p. 819-832, 2005.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. **Nematology**, Leiden, v.2, n.6, p. 645-654, 2000.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; CARNEIRO, R.G.; ABRANTES, I.M.O.; SANTOS, M.S.N.A. *M. paranaensis* n.sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasiting coffee in Brazil. **Journal of Nematology**, College Park, v.28, n.2, p.177 – 189, 1996.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; CASTAGNONE-SERENO, P.; DICKSON, D.W. Variability among four populations of *Meloidogyne javanica* from Brasil. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge, v.21, n.4, p.319-326.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; MENDES, L.M.; ALMEIDA, M.R.A.; SANTOS, M.F.A.; GOMES, A.C.M.M.; KARSSSEN, G. Additional Information on *Meloidogyne inornata* Lordello, 1956 (Tylenchida: Meloidogynidae) and its characterisation as valid species. **Nematology**, Leiden, v.10, n.1, p.123-136, 2008.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; MOREIRA, W.A.; ALMEIDA, M.R.A.; GOMES, A.C.M.M. First record of *Meloidogyne mayaguensis* on guava in Brazil. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v.25, n.2, p.223-228, 2001.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; SANTOS, M.F.A.; ALMEIDA, M.R.A.; MOTA, F.C.; GOMES, A.C.M.M.; TIGANO, M.S. Diversity of *Meloidogyne arenaria* using morphological, cytological and molecular approaches. **Nematology**, Leiden, v.10, n.6, p.819-834, 2008.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; TIGANO, M.S.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A.; SARAH J-L. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. **Nematology**, Leiden, v.6, n.2, p.287-298, 2004.
- CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root knot nematodes. **Heredity**, London, v.96, p.282-289, 2006.

CASTAGNONE-SERENO, P. *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*): profile of an emerging, highly pathogenic, root-knot nematode species. **Nematology**, Leiden, v.14, n.2, p.133-138, 2012.

CASTAGNONE-SERENO, P.; BONGIOVANNI, M.; WAJNBERG, E. Selection and parasite evolution: a reproductive fitness cost associated with virulence in the parthenogenetic nematode *M. incognita*. **Evolutionary Ecology**, London, v.21, p.259-270, 2007.

CASTRO, J.M.C.; LIMA, R.D.; CARNEIRO, R.M.G. Variabilidade enzimática de populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de regiões brasileiras de soja. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v.27, n.1, p.1-12, 2003.

CETINTAS, R.; KAUR, R.; BRITO, J.A.; MENDES, M.L.; NYCZEPIR, A.P.; DICKSON, D.W. Pathogenitcity and reproductive potential of *Meloidogyne mayaguensis* and *M. floridensis* compared with three common *Meloidogyne* spp. **Nematropica**, Bradenton, v.37, p.21-31, 2007.

CHARCHAR, J.M.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S.; LIMA-NETO, A.F. Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no estado do Tocantins. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v.33, n.2, p.182-186, 2009.

CHERRY, T.; SZALANSKI, A.L.; TODD, T.C.; POWERS, T.O. The internal transcribed spacer region of *Belonolaimus* (Nemata:Belonolaimidae). **Journal of Nematology**, College Park, v.29, n.1, p.23-29, 1997.

CLIFF, G.M.; HIRSCHMANN, H. Evaluation of morphological variability in *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, College Park, v.17, n.4, p.445-449, 1985.

COFCEWICZ, E.T.; CARNEIRO, R.M.G.; CASTAGNONE-SERENO, P.; QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotypes and genetic diversity of root knot nematodes parasitizing Musa in Brasil. **Nematology**, Leiden, v.6, n.1, p.85-95, 2004.

CROWDER, B.J.; WILKINSON, C.A.; JOHNSON, C.S.; EINSENBACH, J.D. Inheritance of resistance to tobacco cyst nematode in flue-cured Tobacco. **Crop Science**, Madson, v.43, p.1305-1312, 2003.

DAVIS, E.L.; RICH, J.R.; GWYNN, G.R.; SISSON, V. Greenhouse evaluation of *Nicotiana* spp. for resistance to root knot nematodes. **Nematropica**, Bradenton, v.18, n.2, p.99-107, 1988.

DI VITO, M.; LOMBARDI, D.A.; ZACCHEO, G.; CATALANO, F. Response of lines and cultivars of tobacco and *Nicotiana* species to Italian populations of *Meloidogyne* species. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.26, p.271-274, 1998.

DÍAZ-SILVEIRA, M.F.; HERRERA, J.O. An overview of nematological problems in Cuba. **Nematologica**, Leinden, v.28, p.151-164, 1998.

DROLSOM, P. N.; MOORE, E.L.; GRAHAM, T.W. Inheritance of resistance to root-knot nematodes in tobacco. **Phytopathology**, Saint Paul, v.48, p.686-689, 1958.

- FARGETTE, M.; BRAAKSMA, R. Use of the esterase phenotype in the taxonomy of the genus *Meloidogyne*. 3. A study of some 'B' race lines and their taxonomic position. **Revue Nématologie**, cidade, v.13, p.375-386, 1990.
- FARGETTE, M.; DAVIES, K.G.; ROBINSON, M.P.; TRUDGILL, D.L. Characterization of resistance-breaking *Meloidogyne incognita*-like populations using lectins, monoclonal antibodies and spores of *Pasteuria penetrans*. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge, v.17, p.537-542, 1994.
- FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. **An Introduction to Nematodes: Plant Nematology**. Sofia: Pensoft Publishers, 2002. v.1. 236p.
- FIGUEIREDO, M.B. Algumas observações sobre os nematóides que atacam o fumo no estado de São Paulo. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.33, n.2, p.69-73, 1958.
- FORTNUM, B.A.; KRAUSZ, J.P.; CONRAD, N.G. Increasing incidence of *Meloidogyne arenaria* on Flue-Cured Tobacco in South Carolina. **Plant Disease**, Saint Paul, v.68, n.3, p.244-245, 1984.
- GOMES, C.B.; COUTO, M.E.O.; CARNEIRO, R.M.D.G. Registro de ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira e fumo no sul do Brasil. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.32, n.3, p.244-247, 2008.
- GOMES, C.B.; CARBONARI, J.J.; MEDINA, I.L.; LIMA, D.L. Levantamento de *M. ethiopica* em viveiros de quivi no Rio Grande do Sul e registro da ocorrência em fumo (*Nicotina tabacum*) e guaxuma (*Sida rhombifolia*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 25, 2005. Piracicaba-SP. **Anais...** Piracicaba, 2005.p?????????
- HANDOO, Z.A.; SKANTAR, A. M.; CARTA, L.K.; ERBE, E.F. morphological and molecular characterization of a new root-knot nematode, *Meloidogyne thailandica* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), parasitizing ginger (*Zingiber* sp.). **Journal of Nematology**, College Park, 37, n.3, p. 342-353, 2005.
- HARTMAN, K.M.; SASSER, J.N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host and perineal pattern morphology. In: BARKER, K.R., CARTER, C.C. E SASSER, J.N. (Ed.). **An advanced treatise on Meloidogyne**. v.2: Methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. p. 115-123.
- HIRUNSALEE, A.; BARKER, K.R.; BEUTE, M.K. Effects of peanut-tobacco rotations on population dynamics of *Meloidogyne arenaria* in mixed-race populations. **Journal of Nematology**, College Park, v.27, p.178-188, 1995a.
- HIRUNSALEE, A.; BARKER, K.R.; BEUTE, M.K. Infection, reproduction potential, and root galling by root knot nematode species and concomitant populations on peanut and tobacco. **Journal of Nematology**, College Park, v.27, p.172-177, 1995b.
- HUGALL, A.; STANTON, J.; MORITZ, C. Reticulate evolution and the origins of ribosomal internal transcribed spacer diversity in apomitic *Meloidogyne*. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.16, n.2, p.157-164, 1999.

HUMPHREYS, D.A.; WILLIAMSON, V.M.; SALAZAR, L.; FLORES-CHAVES, L.; GÓMEZ-ALPIZAR, L. Presence of *Meloidogyne enterolobii* Yang & Eisenback (= *M. mayaguensis*) in guava and acerola from Costa Rica. **Nematology**, Leiden, v.14, n.2, p.199-207, 2012.

HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparasion of methods of colleting inocula for *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v.57, p.1025 – 1028, 1973.

JEPSON, S.B. Identification of *Meloidogyne* a general assessment and a comparison of male morphology using light rnicroscopy, with a key to 24 species. **Revue Nématologie**, v.6, n.2, p.375-386, 1990.

JEPSON, S.B. The use of second-stage juvenile tail as an aid in the identification of *Meloidogyne* species. **Nematologica**, Leinden, v.29, p. 11 – 28, 1983.

JOHNSON, C.S.; WAY, J.; BARKER, K.R. Nematode parasites of Tobacco. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. St. Albans: C.A.B International – Institute of Parasitology, 2005. p.675-708.

KARSSSEN, G.; LIAO J.; KAN Z.; EVELYN YJ VAN HEESE, E.Y.J.; DEN NIJS, L.J.M.F. On the species status of the root-knot nematode *Meloidogyne mayaguensis* Rammah & Hirschmann, 1988. **ZooKeys**, v.181, p.67 – 77, 2012.

LIMA, I.M.; SOUZA, R.M.; SILVA, C.P.; CARNEIRO, R.M.G. *Meloidogyne* spp. from preserved áreas of Atlantic Forest in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v.29, n.1, p.31-38, 2005.

LORDELLO, L.G.E. “*Meloidogyne inornata*” sp. n., a serious pest of soybean in the state of São Paulo, Brazil (Nematoda, Heteroderidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v.16, n.1, p.65-70, 1956.

LORDELLO, L.G.E. **Nematóides das plantas cultivadas**. 8 ed. São Paulo: Nobel, 1986.p.314.

MAI, W.F.; ABAWI, G.S. Interactions among root knot nematodes and *Fusarium* wilt fungi on host plants. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.25, p.317-38, 1987.

MOENS, M.; PERRY, R.N.; STAR, J.L. *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: MOENS, M.; PERRY, R.N.; STAR, J.L.(Ed.). **Root-knot nematodes**. Wallingford: CABI International, 2010. p.1-13.

MOLINARI, S.; LAMBERTI, F.; CROZZOLI, R.; SHARMA, S.B.; PORTALES, L.S. Isozyme patterns of exotic *Meloidogyne* spp. populations. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.33, p.61-65, 2006.

NAKASONO, K. Studies on morphological and physio-ecological variation of the reniform nematode, *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, 1940 with an emphasis on differential geographical distribution of amphimitic and parthenogenetic populations in Japan. **Journal of Nematology**, College Park, v.35, n.3, p.63-67, 2004.

NG'AMBI, T.B.S.; RUFTY, R.C.; BARKER, K.R.; MELTON, T.A. Identification of sources of resistance to four species of root knot nematodes in tobacco. **Journal of Nematology**, College Park, v.31, n.3, p. 272-282, 1999.

NICHOLAS, K.B.; NICHOLAS JR, H.B.; DEERFIELD II, D.W. GeneDoc, analysis and visualization of genetic variation. **EMBNEW.NEWS**, Hixton, v.4, p.14, 1997.

NOE, J.P. **Nematoides parasitas de plantas**. In: TRIGIANO, R.N.; WINDHAM, M.T.; WINDHAM, A.S. (Ed.). **Fitopatologia: Conceitos e Exercícios de Laboratório**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 83-96.

NONO-WONDIM.; SWAI, I.S.; MROSSO, L.K.; CHADHA, M.L.; OPEÑA, R.T. Identification of root-knot nematode species occurring on tomatoes in Tanzania and resistant lines for their control. **Plant Disease**, Saint Paul, v.86, p.127-130, 2002.

OGBUJI, O.R. Variations in infectivity among populations of *Meloidogyne javanica* on tobacco and pepper. **Plant Disease**, Saint Paul, v.65, n.1, p.65-66, 1981.

OLIVEIRA, D.S.; OLIVEIRA, R.D.L.; GONÇALVES, W. Fenótipo S1 de Esterase em *Meloidogyne incognita* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n.2, p.207, 2006.

PATEL, S.K.; PATEL, D.J. The interaction between *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *Rotylenchulus reniformis* in Tobacco. **Nematologia Mediterrânea**, Bari, v.19, p.41-42, 1991.

PÉREZ, M.; FERNÁNDEZ, E. Plant parasitic nematodes associated with tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) in the pinar del Rio Province of Cuba. **Nematropica**, Bradenton, v.28, p.187-193, 1998.

PONTE, J.J. **Nematóides das galhas: espécies ocorrentes no Brasil e seus hospedeiros**. Mossoró: Brascan Nordeste, 1978.p.99.

POWELL, N.T.; MELENDEZ, P.L.; BATTEN. C.K. Disease complexes in tobacco involving *Meloidogyne incognita* and certain soil-borne fungi. **Phytopathology**, Saint Paul, v.61, p.1332-1337, 1971.

POWERS, T. Nematode Molecular Diagnostics: from bands to barcodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.42, p.367-83, 2004.

POWERS, T.O.; TODD, T.C.; BURNELL, A.M.; MURRAY, P.C.B.; FLEMING, C.C.; SZALANSKI, A.L.; ADAMS, B.A.; HARRIS, T.S. The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. **Journal of Nematology**, College Park, v.29, n.4, p.441-450, 1997.

RAMMAH, A.; HIRSCHIMANN, H. Morphological comparison of seven hypotriploid populations of *Meloidogyne arenaria* with typical triploid population. **Journal of Nematology**, College Park, v.25, n.2, p.103-120, 1993.

RAMMAH, A.; HIRSCHIMANN, H. Morphological comparison of three host races of *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, College Park, v.22, n.1, p.56-68, 1990.

RAMMAH, A.; HIRSCHMANN, H. *Meloidogyne mayaguensis* n.sp. (Meloidogynidae), a root knot nematode from Puerto Rico. **Journal of Nematology**, College Park, v.20, n.1, p.58-69, 1988.

REED; S.M.; SCHNEIDER, S.M. Evaluation of *Nicotiana orthophora* as a source of resistance to *Meloidogyne incognita* race 4 for tobacco. **Journal of Nematology**, College Park, v.24, n.2, p.253-256, 1992.

RICH, J.R.; GARCIA, M.R. Nature of the root knot disease in Flórida Tobacco. **Plant Disease**, Saint Paul, v.69, p.972-974, 1985.

RICH, J.R.; KINLOCH, R.A. **Tobacco nematode management**. University of Florida IFAS extension, 1997. 5p.

ROBERTSON, L.; LÓPEZ-PÉREZ, J.A.; BELLO, A.; DíEZ-ROJO, M.A.; ESCUER, M.; PIEDRA-BUENA, A.; ROS, C.; MARTINEZ, C. Characterization of *M. incognita*, *M. arenaria* and *M. hapla* populations from Spain and Uruguay parasitizing pepper (*Capsicum annuum* L.). **Crop Protection**, Guildford, v.25, p.440-445, 2006.

ROBINSON, A.F.; INSERRA, R.N.; CASWELL-CHEN, E.P.; VOVLAS, N.; TROCOLLI, A. *Rotylenchulus* species: identification, distribution, host range, and crop plant resistance. **Nematropica**, Bradenton, v.27, p.127-180, 1997.

RUFTY, R.C.; WERNSMAN, E.A.; POWELL, N.T. A genetic analysis of the association between resistance to *Meloidogyne incognita* and a necrotic response to infection by a strain of potato virus Y in tobacco. **Phytopathology**, Saint Paul, v.73, p.1413-1418, 1983.

SCHMITT, D.P. Incidence of plant parasitic nematodes in the coastal plain of north Carolina. **Plant Disease**, Saint Paul, v.72, p.107-110, 1988.

SGEPHERD, J.A.; BARKER, K.R. Nematodes parasites of tobacco. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford :CAB International, 1990. p.493-517.

SHEW, H.D.; LUCAS, G.B. **Compendium of tobacco diseases**. St. Paul: APS Press, 1991.p.68.

SIDDIQI, M.R. **Tylenchida parasites of plants and insects**. 2nd ed. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2000.p.852.

SILVA, G.S.; PEREIRA, A.L.; ARAÚJO, J.R.G.; CARNEIRO, R.M.DG. Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em *Psidium guajava* no estado do Maranhão. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v.32, n.3, p. 242-243, 2008.

SKANTAR, A.M.; CARTA, L.K.; HANDOO, Z.A. molecular and morphological characterization of an unusual *Meloidogyne arenaria* population from Traveler's Tree, *Ravenala madagascariensis*. **Journal of Nematology**, College Park, v.40, n.3, p.179-189, 2008.

SOSA-MOSS, C.; BARKER, K.R.; DAYKIN, M.E. Histopathology of selected cultivars of tobacco infected with *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, College Park, v.15, n.3, p.392-297, 1983.

STANTON, J.M.; McNICOL, C.D.; STEELE, V. Non-manual lysis of second-stage *Meloidogyne* juveniles for identification of pure and mixed samples based on the polymerase chain reaction. **Australasian Plant Pathology**, v.27, p.112-115, 1998.

STANTON, J.M.; O'BRIEN, P.C.; SCHIPKE, L.G.; HUGALL, A.; MORITZ, C. Species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) affecting tobacco in north Queensland, including two new host races of *M. arenaria*. **Australasian Plant Pathology**, v.21, n.4, p.150-157, 1992.

SUDO, S. Problemas nematológicos na cultura do fumo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 20., 1997. Gramado RS, **Resumos...** (Palestra), 1997. p.46-47.

SUDO, S.; ESPINDOLA, E.E. Survey of root-knot nematode species in tobacco plants grown in the South of Brazil. Coresta Meeting: Agronomy and Phytopathology Groups. **Coresta Information Bulletin**, 1987, abstract 2086.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.24 n.8, p.1556-1599, 2007.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. **Biology, identification, and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.)**. Cooperative Publication. Departament of Plant Pathology, North, Raleigh, N.C. Carolina State University and U.S. Agency for International of Developmen, 1978.p.111.

TOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The Clustal X windows interface, flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.24, p.4876-4882, 1997.

TRUDGILL, D.L.; BLOK, V.C. Apomitic, polyphagous root knot nematodes: Exceptionally Successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.39, p.53-77, 2001.

TZORTZAKAKIS, E.A.; ADAM, M.A.M.; BLOK, V.C.; PARASKEVOPOULOS, C.; BOURTZIS, K. Occurrence of resistance-breaking populations of root-knot nematodes on tomato in Greece. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.113, p.101-105, 2005.

VRAIN, T.C., WAKARCHUK, D.A.; LÉVESQUE, A.C.; HAMILTON, R.I. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge, v.15, n.6, p.563-573, 1992.

WEISCHET, B.; BROWN, D.J.F. **Conhecendo os nematóides**: Nematologia geral. Moscou: Pensoft, 2001.p.209.

YANG, B.; EISENBACK, J.D. *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (Meloidogynidae), a root knot nematode parasitizing Pacara Earpod Tree in China. **Journal of Nematology**, College Park, v.15, n.3, p.381-391, 1983.

YI, H.Y.; RUFT, R.C.; WERNSMAN, E.A.; CONKLING, M.C. Mapping the root knot nematode resistance gene (*Rk*) in Tobacco with RAPD markers. **Plant Disease**, Saint Paul, v.82, n.12, p.1319-1322, 1998.

ZEM, A.C.; ZANON, J.I.; MONTEIRO, A.R. Nota sobre a ocorrência de nematóides associados à cultura do fumo no Estado de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE NEMATLOGIA, 9, 1985. Piracicaba, SP. **Resumos...** Sociedade Brasileira de Nematologia/Copersucar, 1985. p.62.

3 AVALIAÇÃO DE ACESSOS DE *Nicotiana* spp. PARA RESISTÊNCIA A *Meloidogyne enterolobii* (Nematoda: Tylenchoidea)

Resumo

A ocorrência de espécies de *Meloidogyne* tem limitado consideravelmente a produtividade da cultura do fumo. Entre estas, *M. enterolobii*, espécie sabidamente polífaga, surge como patógeno emergente, ocorrendo em diversas regiões produtoras de fumo na região sul do Brasil. Apesar disso, informações acerca de fontes de resistência no gênero *Nicotiana* não estão disponíveis na literatura. Deste modo, este estudo objetivou caracterizar o nível de resistência de acessos de *Nicotiana* perante este parasito através da avaliação do índice de galhas (IG). Para isto, realizaram-se, sob condições de casa-de-vegetação, dois experimentos em delineamento inteiramente casualizado. O primeiro, em caráter de *screening*, coligiu 97 acessos de *Nicotiana* e o segundo reuniu os genótipos promissores identificados no primeiro ensaio. Cada planta inoculada constituiu a unidade experimental. A variedade de tomate “Santa Clara” foi utilizada como padrão de suscetibilidade em ambos os experimentos. No primeiro experimento observou-se variação significativa entre os genótipos avaliados ($P < 0,01$), mas com conspícuo predomínio (92%) de genótipos suscetíveis ($IG > 1$). Os níveis de resistência de sete genótipos (J102007T10, J1612008T12, J1612008T34, I112008T97, I112008T98, I112008T99 e I112008T100) identificados como satisfatórios no primeiro ensaio ($IG < 1$) foram confirmados no segundo ensaio, figurando, pois, como promissoras fontes de resistência a serem utilizadas em programas de melhoramento. Componentes de variância, elevados valores do coeficiente de determinação genotípico ($H^2 = 92\%$) e índice de variação ($\theta = 1,16$) suportam a possibilidade de melhoramento para resistência a este patógeno.

Palavras-chaves: Resistência genética; *Nicotiana tabacum*; Nematode-das-galhas; Melhoramento vegetal

Abstract

The occurrence of *Meloidogyne* species has considerably limited the productivity of tobacco crops. Among these, *M. enterolobii*, a known polyphagous species, appears as an emerging pathogen, occurring in several tobacco growing regions in southern Brazil. Nevertheless, information about sources of resistance in species of *Nicotiana* are not available in the literature. Thus, this study aimed to characterize the level of resistance of accessions of *Nicotiana* against this parasite, based on the gall index (IG). For this, we performed two experiments under greenhouse conditions in a completely randomized design. The first experiment evaluated 97 *Nicotiana* accessions and the second experiment evaluated the promising genotypes identified in the first. The experimental unit consisted of a single inoculated plant. The tomato cv “Santa Clara” was used as a susceptible standard in both experiments. There was significant variation among genotypes in the first experiment (P

<0.01), but with marked predominance (92%) of susceptible genotypes ($IG > 1$). The resistance levels of seven genotypes (J102007T10, J1612008T12, J1612008T34, I112008T97, I112008T98, I112008T99 and I112008T100) considered to be satisfactory ($IG < 1$) were confirmed in the second experiment, thus comprising promising resistance sources to be used in breeding programs. High levels of coefficient of genotypic determination ($H^2 = 0.92$) and variation index ($\theta = 1.16$) support the possibility of breeding for resistance against *M. enterolobii*.

Keywords: Genetic resistance: *Nicotiana tabacum*; Root-knot nematodes; Plant breeding

3.1 Introdução

Os nematoides das galhas radiculares, espécies filiadas ao gênero *Meloidogyne*, constituem, indubitavelmente, o principal grupo de nematoides fitopatogênicos. São espécies biotróficas, polífagas e cosmopolitas, reproduzindo-se profusamente desde plantas herbáceas até lenhosas (LORDELLO, 1986; AGRIOS, 2005; NOE, 2010; FERRAZ; BROWN, 2002). Na cultura do fumo, especificamente, a literatura acerca do tema é fecunda, com diversos registros de ocorrência de meloidoginoses na cultura em todo o mundo e, não raro, lhes sendo atribuídas perdas expressivas (SHEW; LUCAS, 1991; SUDO, 1997; DIAZ-SILVEIRA; HERRERA, 1998).

Conforme capitulado anteriormente, um grande número de espécies se multiplica e causa doenças em tabaco, mas entre as principais espécies associadas a danos na cultura, em ordem de importância, incluem-se *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, respectivamente (PONTE, 1977; SUDO; ESPINDOLA, 1987; PEREZ; FERNANDEZ, 1998; JOHNSON; WAY; BARKER, 2005). Destas, *M. incognita*, em todas suas variações subespecíficas, vem galgar, historicamente, posição de inegável destaque, quer seja pela severidade dos danos causados, quer seja pela ampla distribuição geográfica e elevada capacidade de multiplicação ou ainda pelo seu difícil manejo. Em função disso, diversas formas de manejo têm sido adotadas, incluindo-se a rotação (ou sucessão) de culturas com espécies não hospedeiras, o uso de nematicidas e o emprego de variedades resistentes. Com efeito, programas de melhoramento priorizaram e desenvolveram genótipos carregando resistência a *M. incognita*, há mais de seis décadas. Essa resistência foi, aparentemente, transferida de *N. tomentosa*, espécie selvagem próxima, é de herança monogênica com dominância completa conferida pelo gene *Rk* (*root knot resistance gene*, em inglês) (DROLSOM; MOORE; GRAHAM, 1958; RUFTY et al., 1983; YI et al., 1998).

Como a maioria das resistências monogênicas, no entanto, a enorme pressão de seleção impôs, ao longo do tempo, a seleção direcional a favor de indivíduos virulentos dentro das populações de *M. incognita*, originando sub-populações virulentas em genótipos portadores do gene *Rk*, neste caso denominadas raças 2 (avirulentas em algodão cv Deltapine 61) e 4 (virulentas em algodão cv Deltapine 61) (HARTMAN; SASSER, 1885). Além disso, a estreita base genética da cultura acarretou também em mudança no padrão etiológico da doença em diversas áreas, caracterizando-se pelo predomínio de espécies outrora menos expressivas, tais como *M. arenaria* e *M. javanica* (FORTTNUM; KRAUSZ; CONRAD, 1984; RICH; GARCIA, 1985; STANTON et al., 1992; ZEM; ZANON; MONTEIRO, 1985; SCHIMITT, 1988). Consoante estudo descrito no capítulo anterior, além de populações virulentas de *M. incognita* e *M. javanica*, encontrou-se em regiões produtoras do Sul do Brasil não apenas elevada incidência, mas também ampla distribuição de *M. enterolobii*, espécie comumente negligenciada em programas de melhoramento de fumo.

Diante de tais assertivas, torna-se evidente a necessidade de incluir resistência a biótipos virulentos de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii* em cultivares comerciais de tabaco. Sob este aspecto, embora ainda não se disponha de genótipos comerciais altamente resistentes a *M. incognita* (raças 2 e 4), *M. arenaria* (raça 2) e *M. javanica*, diversas fontes de resistência são conhecidas há algum tempo (DI VITO et al., 1998; REED; SCHNEIDER, 1992; NG'AMBI; RUFTY; BARKER, 1995; DAVIS; RICH; GWYNN; SISSON, 1988; NG'AMBI et al., 1999); para *M. enterolobii*, contudo, não há informações acerca de acessos resistentes até o presente momento.

Em vista do exposto, o presente estudo objetivou caracterizar as reações de acessos de *Nicotiana* spp. frente a *M. enterolobii*. Tal caracterização baseou-se essencialmente no índice de galhas (IG) (BRIDGE; PAGE, 1980), refletindo, pois, a quantidade de doença.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material vegetal

Dois experimentos foram realizados, sob condições de casa-de-vegetação, em Rio Negro, PR (26° 06'21"S 49°47'52"O; 780 m de altitude). As temperaturas médias diárias no substrato foram de 22,6°C (experimento 1) e 24,6 °C (experimento 2), respectivamente.

O primeiro experimento avaliou 97 acessos (Tabela 7) e visou selecionar aqueles com algum grau de resistência. O segundo experimento ateu-se a avaliar os acessos considerados

promissores no primeiro experimento. Três genótipos não testados (Xanthi, K326 e By21) no experimento 1 também foram inclusos no segundo experimento.

Tabela 7 - Lista de genótipos de *Nicotiana* spp. avaliados, sob condições de casa de vegetação, para resistência a *M. enterolobii* no experimento 1

Acessos de <i>Nicotiana</i> spp. ^b									
	Cigar wrapper	Don Rep	Samsun NO 15	CSC 304	Brown leaf	Connecticut Broa Pleaf	Walkers Broad Leaf	Delhi 76	Bel C
Balikesir									J102007T10
Bafra	Kentucky 160	Darck Madole		Magnolia	Gen 911	Duva	Florida Sumatra	Salerno Criolo	Burel 22
LJ 100	Guapo	DH 1048		F Corda 12	Talo Branco	Dark Malawe	Red Rose	Herval de Baixo	Madura
F Corda 7	F Corda 11	F Corda 4		Greider	F Corda10	Bel – W3	Bel 61-10	Petiço	Dark G. River
Delhi	Fumo de Corda	Bahce		F Corda 3	AFC	F Corda 2	Dark O.S	Maryland 872	Pennleaf 1
Izmir	Delcrest 66	F Corda 8		Pennbel 69	Espada G	Tigre	Basma	Madura tobacco	Ky 907
Fumo de Corda	LJ 50	Espadão		Stewart Cuban	F Corda 6	Agonya	Bravo 702	Amarelão	Banket A-1
Zimmer Spanish	F Corda 13	F Corda 5		Sesmaria	Lysistrata	MD 608	Ast-C	Guacharo	Madura jepon raja
F Corda 9	Kelly Burley	LJ 02		Tukuba-2FC	Ky 190	Zm/A 5190	F Corda 1	Taio 4	J1612008T12
Bithis	F Corda 14	Alto Samerbil		Karabaglar	Hicks broadleaf	Maus	Ky 26V	Fumo comum B.B	I112008T97

b – genótipos de mesmo nome tem origens distintas.

3.2.2 Ensaios de avaliação da resistência

O isolado de *M. enterolobii* foi obtido de solo coletado no município de Carlópolis, PR (23° 25'46"S 49°43'16,74"O) e previamente identificado via marcadores bioquímicos (fenótipos de α -esterase), parâmetros fisiopatológicos (hospedeiros diferenciais) e configuração perineal (HARTMAN; SASSER, 1985; CARNEIRO; ALMEIDA, 2001; ESBENSHADE; TRIANTAPHYLLOU, 1990), conforme descrito no capítulo anterior. A população foi mantida, sob condições de casa-de-vegetação, em plantas de tomate cv 'Santa Clara'. O inóculo constitui-se essencialmente de ovos e eventualmente indivíduos J2 recém-eclodidos extraídos de raízes parasitadas em solução de hipoclorito de sódio 0,5% (HUSSEY; BARKER, 1973). O número de exemplares (ovos e indivíduos J2) de cada suspensão aquosa foi determinado por observação ao microscópio óptico com auxílio da lâmina de Peters e ajustada para a concentração final de 490 espécimes/ml (ensaio 1) e 430 espécimes/ml (ensaio 2).

As sementes dos acessos foram semeadas em bandejas com substrato e as mudas repicadas para tubetes de 240 cm³ contendo substrato previamente autoclavado (2 horas; 120°C). Os ensaios foram arranjados em delineamento inteiramente ao acaso, sendo que a parcela experimental foi constituída por uma planta em cada tubete. Cada tratamento contou com pelo menos sete e cinquenta e sete repetições para os experimentos 1 e 2, respectivamente.

As inoculações foram realizadas em plantas de quatro semanas de idade pipetando-se o inóculo em dois orifícios de 2 cm de profundidade, feitos a 1 cm de distância do colo das plantas. As populações iniciais (P_i) foram de aproximadamente 490 e 430 exemplares/recipientes para os experimentos 1 e 2, respectivamente.

Os experimentos foram avaliados aos 90 (experimento1) e 60 (experimento2) dias após a inoculação. Os tubetes foram imersos em balde plástico contendo 4 L de água para separação do substrato e das raízes. As raízes foram, então, lavadas, enxutas em papel absorvente e avaliadas visualmente consoante o índice de galhas (IG) da escala de sintomas proposta por Bridge e Page (1980). Atribuíram-se, assim, as seguintes notas: 0=sem galhas; 1=poucas galhas, pequenas, difíceis de encontrar; 2= apenas galhas pequenas, mas bem visíveis e raízes principais sem galhas; 3=algumas galhas grandes e raízes principais sem galhas; 4=predominância de galhas grandes, mas raízes principais sem galhas; 5= 50% das raízes afetadas, algumas raízes principais com galhas e sistema radicular reduzido; 6=raízes

principais com galhas; 7=maioria das raízes principais com galhas; 8= todas as raízes principais com galhas, incluindo as raízes axiais e poucas raízes sem galhas; 9=todas as raízes com muitas galhas e plantas perto da morte e 10=todas as raízes com muitas galhas e plantas geralmente mortas. Em ambos os experimentos, genótipos que apresentaram valores médios de IG superiores a um foram considerados suscetíveis e aqueles com valores inferiores ou iguais, resistentes.

3.2.3 Análises estatísticas

Os dados do primeiro experimento foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando-se o software R (versão 2.15); as médias foram, então, comparadas pelo teste HSD (Honestly Significant Difference) de Tukey ($\alpha = 0,99$), utilizando-se software R (versão 2.15). No mais, considerando os genótipos como efeito fixo, excluído o tratamento controle (tomate), foram estimados, a partir da ANOVA, os componentes de variância usando o procedimento PROC VARCOMP através do software SAS (versão 9.1; SAS Institute, Inc., Cary, NC) (Tabela 8). Assim, determinaram-se a variância fenotípica (σ_p^2), a variância ambiental (σ_e^2), o componente quadrático (ϕ_g), o coeficiente de variação genotípica ($CV_g = \phi_g^{0.5}/\mu$), o coeficiente de variação fenotípica ($CV_p = (\sigma_p^2)^{0.5}/\mu$), o índice de variação ($\theta = CV_g/CV_p$) e o coeficiente de determinação genotípico ($H^2 = \phi_g/\sigma_p^2$), medida análoga à herdabilidade em sentido amplo (VENCOSVSKY; BARRIGA 1992; CRUZ, 2005). No segundo ensaio, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para avaliar a diferença estatística entre os genótipos e, posteriormente, as médias foram submetidas ao teste *t* de Student através do software R (versão 2.15).

Tabela 8 - Modelo da análise de variância (ANOVA) para resposta de acessos de *Nicotiana* a *M. enterolobii* no primeiro experimento

Fontes de Variação	GL ¹	QM ²	EQM ³
Acesso	g - 1	QM _{cultivars}	$\sigma_e^2 + r \phi_g$
Erro	(r - 1)g	QM _{error}	σ_e^2
Total	rg - 1		

GL¹ – graus de liberdade;

QM² – Quadrado Médio;

EQM³ – Esperança do Quadrado Médio

3.3 Resultados e Discussão

Os dados de IG e o tipo de reação (resistente ou suscetível) de cada genótipo estão apresentados nas Tabelas 9 e 10. Os elevados índices de severidade ($IG = 5,74$ e $5,07$, respectivamente para os ensaios 1 e 2) exibidos pelo tratamento controle (tomate) atestam tanto a viabilidade dos inóculos utilizados quanto as condições experimentais apropriadas em ambos os ensaios. No mais, os elevados níveis de severidade observados, de modo geral, nos acessos atestam a capacidade do isolado utilizado em causar doença em espécies de *Nicotiana*.

No primeiro experimento, os dados não foram transformados, haja vista que o teste de Levene (modificado por Brown-Forsythe) para homogeneidade de variâncias não foi significativo ($P=0,2729$). A ANOVA mostrou a existência de diferenças altamente significativas ($F_{96,770}=13,31$; $P<0,01$) entre os acessos. As médias de IG variaram de 0 (J1612008T34 e I112008T99) a 6,22 (Balikesir); porém, houve evidente predomínio (92%) de genótipos com elevados valores de IG (Figura 11). Consoante a análise de comparação de médias, observou-se, portanto, a formação de três grupos distintos quanto à característica em apreço. O primeiro e maior grupo reuniu os acessos que não diferiram significativamente do tratamento controle (tomate), os quais exibiram elevada severidade de sintomas ($IG>3,86$), sendo, por esta razão, considerados altamente suscetíveis (AS); o segundo coligiu genótipos que se apresentaram como moderadamente suscetíveis (MS), caracterizando-se por níveis intermediários de sintomas ($1,71<IG<3,78$) e o terceiro e menor grupo incluiu acessos com valores de IG muito baixos ($IG\leq 1$) e definidos, no presente estudo, como resistentes (R), a saber: J102007T10, J1612008T12, J1612008T34, J1612008T45, I112008T97, I112008T98, I112008T99 e I112008T100. Estes foram avaliados no segundo experimento.

Tabela 9 - Índice de Galhas (IG) e tipo de reação de acessos de *Nicotiana* spp. a *M. enterolobii* avaliados sob condições de casa-de-vegetação (experimento 1)

(continua)			
Genótipos	n ¹	IG ²	Reação ³
Balikesir	9	6,22±0,833a	AS
Bafra	9	6,11±0,93ab	AS
LJ 100	9	6,00±0,53abc	AS
F Corda 7	9	5,78±1,20abcd	AS
Tomate cv 'Santa Clara'	33	5,74±1,02abcd	AS
Delhi	9	5,56±0,73abcde	AS
Izmir	8	5,50±0,53abcde	AS
Fumo de Corda	9	5,44±1,09abcdef	AS
Zimmer Spanish	9	5,44±0,88abcdef	AS
F Corda 9	7	5,43±1,27abcdef	AS
Bithis	7	5,43±1,51abcdef	AS
Cigar wrapper Don Rep	9	5,33±1,12abcdefg	AS
Kentucky 160	9	5,22±0,44abcdefg	AS
Guapo	9	5,22±0,67abcdefg	AS
F Corda 11	9	5,33±1,32abcdefg	AS
Fumo de Corda	9	5,22±1,09abcdefg	AS
Delcrest 66	9	5,22±1,09abcdefg	AS
LJ 50	9	5,11±0,78abcdefg	AS
F Corda 13	9	5,11±0,93abcdefg	AS
Kelly Burley	9	5,11±0,93abcdefg	AS
F Corda 14	9	5,11±1,05abcdefg	AS
Samsun NO 15	9	5,11±1,05abcdefg	AS
Darck Madole	8	5,00±0,93abcdefg	AS
DH 1048	9	5,00±1,32 abcdefg	AS
F Corda 4	9	5,22±1,64abcdefg	AS
Bahce	8	5,25±2,12abcdefg	AS
F Corda 8	9	5,00±1,50abcdefg	AS
Espadão	9	4,89±0,78abcdefgh	AS
F Corda 5	6	4,83±0,41abcdefgh	AS
LJ 02	9	4,89±1,05abcdefgh	AS

Tabela 9 – Índice de Galhas (IG) e tipo de reação de acessos de *Nicotiana* spp. a *M. enterolobii* avaliados sob condições de casa-de-vegetação (experimento 1)

(continuação)			
Genótipos	n ¹	IG ²	Reação ³
Alto Samerbil	9	4,89±1,17abcdefgh	AS
CSC 304	9	4,89±1,27abcdefgh	AS
Magnolia	9	4,78±0,97abcdefghi	AS
F Corda 12	9	4,67±0,87abcdefghi	AS
Greider	9	4,67±1,12abcdefghi	AS
F Corda 3	8	4,63±1,41abcdefghi	AS
Pennbel 69	9	4,56±0,53abcdefghij	AS
Stewart Cuban	9	4,44±0,88abcdefghij	AS
Sesmaria	9	4,44±1,13abcdefghij	AS
Tukuba-2FC	9	4,44±1,24abcdefghij	AS
Karabaglar	9	4,44±1,24abcdefghij	AS
Brown leaf	9	4,33±0,71abcdefghijk	AS
Gen 911	9	4,33±1,12abcdefghijk	AS
Talo Branco	9	4,22±0,83abcdefghijk	AS
F Corda10	9	4,33±1,41abcdefghijk	AS
AFC	9	4,33±1,41abcdefghijk	AS
Espada G	9	4,11±0,78abcdefghijk	AS
F Corda 6	9	4,22±1,39abcdefghijk	AS
Lysistrata	9	4,22±1,56abcdefghijk	AS
Ky 190	9	4,11±1,17abcdefghijk	AS
Hicks broadleaf	9	4,11±1,36abcdefghijk	AS
Connecticut Broa Pleaf	9	4,11±1,62abcdefghijk	AS
Duva	9	4,00±1,12abcdefghijkl	AS
Dark Malawe	9	4,00±1,12abcdefghijkl	AS
Bel – W3	9	4,00±1,41abcdefghijkl	AS
F Corda 2	9	4,00±1,66abcdefghijkl	AS
Tigre	9	4,00±1,66abcdefghijkl	AS
Agonya	7	4,0±2,16abcdefghijkl	AS
MD 608	9	3,89±1,05abcdefghijkl	AS
Zm/A 5190	9	3,89±1,17abcdefghijkl	AS

Tabela 9 – Índice de Galhas (IG) e tipo de reação de acessos de *Nicotiana* spp. a *M. enterolobii* avaliados sob condições de casa-de-vegetação (experimento 1)

Genótipos	n ¹	IG ²	(continuação)
			Reação ³
Maus	9	3,89±1,54abcdefgijkl	AS
Walkers Broad Leaf	9	3,89±1,54abcdefgijkl	AS
Florida Sumatra	9	3,88±1,23abcdefgijkl	AS
Red Rose	7	3,86±0,90abcdefgijkl	AS
Bel 61-10	9	3,78±0,83bcdefghijkl	MS
Dark O.S	9	3,78±1,32bcdefghijkl	MS
Basma	9	3,78±1,09bcdefghijkl	MS
Bravo 702	9	3,75±1,04bcdefghijkl	MS
Ast-C	9	3,75±1,39bcdefghijkl	MS
F Corda 1	7	3,71±1,60cdefghijkl	MS
Ky 26V	9	3,67±1,87cdefghijkl	MS
Delhi 76	9	3,56 ±0,73defghijklm	MS
Salterno Criolo	9	3,50±1,20defghijklm	MS
Herval de Baixo	8	3,50±1,41defghijklm	MS
Petiço	9	3,44±0,88defghijklm	MS
Maryland 872	9	3,44±1,33defghijklm	MS
Madura tobacco	8	3,38±1,19efghijklm	MS
Amarelão	9	3,33±1,58efghijklm	MS
Guacharo	9	3,33±1,12efghijklm	MS
Taio 4	9	3,33±1,32efghijklm	MS
Fumo comum B.B	9	3,11±0,93fghijklmn	MS
Bel C	9	3,11±1,36fghijklmn	MS
Burel 22	9	3,00±1,12ghijklmn	MS
Madura	9	2,56±1,13hijklmno	MS
Dark G. River	9	2,44±0,73ijklmno	MS
Pennleaf 1	8	2,25±0,46jklmnop	MS
Ky 907	9	2,00±1,00klmnop	MS
Banket A-1	9	2,00±1,58klmnop	MS
Madura jepon raja	7	1,71±1,60lmnop	MS
J1612008T12	9	1,00±0mnop	R

Tabela 9 – Índice de Galhas (IG) e tipo de reação de acessos de *Nicotiana* spp. a *M. enterolobii* avaliados sob condições de casa-de-vegetação (experimento 1)

Genótipos	n ¹	IG ²	(conclusão)
			Reação ³
I112008T97	9	0,78±0,44nop	R
J102007T10	8	0,75±0,46nop	R
J1612008T45	9	0,78±0,83nop	R
I112008T100	9	0,33±0,50op	R
I112008T98	9	0,22±0,44op	R
J1612008T34	9	0±0p	R
I112008T99	9	0±0p	R

1. n – número de repetições;

2. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (P>0,01) segundo teste de Tukey;

3. IG≤1, resistente (R); IG≥1, suscetível (MS e AS).

Tabela 10 - Índice de Galhas (IG) e tipo de reação de acessos de *Nicotiana* spp. a *M. enterolobii* avaliado sob condições de casa-de-vegetação (experimento 2)

Genótipos	N	IG	Reação
By21	77	0,39±0,52g	R
J102007T10	76	0,37±0,73g	R
J1612008T34	87	0,24±0,50g	R
J1612008T12	55	0,25±0,44g	R
I112008T97	90	0,78±0,58f	R
I112008T98	90	0,86±0,70ef	R
I112008T99	84	0,76±0,65ef	R
I112008T100	88	0,96±0,71e	R
J1612008T45	90	1,74±0,92d	MS
K326	85	2,63±1,32c	MS
Xanthi	89	3,19±1,14b	MS
Tomate cv 'Santa Clara'	57	5,07±1,21a	AS

1. n – número de repetições;

2. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (P>0,01) segundo teste de Kruskal-Wallis;

3. IG≤1, resistente (R); IG≥1, suscetível (MS e AS).

Figura 11 - Histograma exibindo a pronunciada frequência de indivíduos suscetíveis no primeiro ensaio

Estimativas de Φ_g , σ_e^2 , σ_p^2 , CV_f , CV_g , H^2 e θ obtidos a partir das esperanças matemáticas dos quadrados médios (experimento 1) estão sumariados na Tabela 11. O baixo valor de CV_a (28,93%) indica a boa precisão experimental do ensaio em questão (PIMENTEL-GOMES, 1987). Elevados valores de ϕ_g (1,78) e, conseqüentemente, de H^2 (92%) foram observados também. O valor de θ foi consideravelmente elevado, sendo da ordem de 1,16. Estes elevados valores de Φ_g e de H^2 refletem tanto a elevada variabilidade genética entre acessos testados quanto a pequena interferência ambiental na manifestação da resistência. Ademais, o parâmetro θ , que auxilia a detecção de variabilidade genética da população, mostrou-se maior que uma unidade. De acordo com Vencovsky e Barriga (1992), quando isso ocorre, as condições são altamente favoráveis à seleção, haja vista que a variação genética supera a ambiental (variação negligenciável). Conjuntamente, estes resultados vêm demonstrar a elevada possibilidade de selecionar genótipos superiores (característica altamente herdável), resultando, via de regra, em ganhos de seleção expressivos em programas de melhoramento.

Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA), estimativas de componente quadrático, variância ambiental, coeficiente de variação genético, coeficiente variação ambiental e índice de variação (θ) obtidas para dados de IG em acessos de *Nicotiana*

ANOVA						
Fonte de variação		GL ¹	SQ ²	QM ³	F _{valor}	P _{valor}
Genótipo		96	1702	17,725	13,31	2x10 ⁻¹⁶
Erro		770	1025	1,332		
Total		866	2097			
Componentes de Variância						
σ _p ²	φ _g	σ _e ²	CV _F (%)	CV _e (%)	CV _g (%)	Θ
1,94	1,78	1,33	34,94	28,93	33,46	1,16

GL¹ – graus de liberdade;

SQ² – Soma de Quadrados;

QM³ – Quadrado Médio

Situação análoga ocorreu no segundo experimento, onde diferença estatística entre os genótipos avaliados ($P < 0,01$) foi observada. Os dados do segundo experimento, no entanto, não atenderam, segundo teste de Levene (modificado por Brown-Forsythe), as pressuposições requeridas (homogeneidade de variâncias) para a realização da ANOVA, mesmo após transformações indicadas, tais como $\ln(x+1)$ ou $(x+1)^{0,5}$. As médias de IG no segundo ensaio variaram de 0,39 (By21) a 3,19 (Xanthi). Dos oito genótipos promissores obtidos no primeiro ensaio, apenas o acesso J1612008T45 (12,5%) não teve sua reação de resistência devidamente confirmada, alocando-se na categoria fenotípica MS. A frequente ocorrência de indivíduos segregantes (57,78%), exibindo fenótipos MS (55,56%) e AS (2,22%), foi, obviamente, fator determinante para obtenção desta incongruência entre os experimentos. Aliás, certa variabilidade fenotípica foi observada também dentro de outros genótipos promissores, com indivíduos exibindo fenótipos MS e/ou AS (3,33%, 11,11%, 9,41%, 15,73% e 9,2% para I112008T97, I112008T98, I112008T99, I112008T100 e J102007T10, respectivamente), indicando, assim, uma possível segregação para a resistência nos materiais genéticos avaliados (Figura 12).

Resistência completa, fenótipo caracterizado pela total ausência de doença, não foi observada em nenhum acesso deste estudo. Assim, embora não tenha sido realizado estudo de herança genética, presume-se, em função destas observações, que a resistência encontrada não se deve, muito provavelmente, a um sistema monogênico.

O presente estudo vem prover informações acerca da reação de acessos de *Nicotiana* a *M. enterolobii* e parâmetros genéticos desta característica. Estas informações constituem subsídios inéditos na literatura nematológica; consequentemente, possíveis comparações entre resultados de trabalhos distintos não foram realizados; afinal, *M. enterolobii* não é

reconhecido ainda, como mencionado no capítulo anterior, como patógeno da cultura do fumo.

Dos sete genótipos resistentes identificados neste estudo, quatro (I112008T97, I112008T98, I112008T99, I112008T100) são híbridos interespecíficos (*N. tabacum* x *N. repanda*) e aparentados entre si e três (J102007T10, J1612008T12, J1612008T34) são linhas puras de *N. tabacum*. Estes genótipos figuram obviamente como material a ser utilizado em programas de melhoramento. Apesar das dificuldades inerentes à transferência da resistência de *N. repanda*, estes resultados afiguram-se fato bastante promissor para melhoristas de fumo; afinal, vislumbra-se, desse modo, a obtenção de genótipos comerciais carregando genes de resistência (piramidação de genes) de origens distintas e, por conseguinte, tornando a característica mais estável perante a plasticidade fenotípica de populações do patógeno; previne-se, assim, a seleção de indivíduos virulentos em campos infestados.

Curiosamente, os híbridos interespecíficos (*N. tabacum* x *N. repanda*) conferem também resistência ao nematoide javanês, *M. javanica* (característica da espécie selvagem *N. repanda*) (STAVELY; PITTARELLI; BURK, 1973; GWYNN et al., 1986); este parasito é encontrado em elevada frequência em campos infestados, seja de forma isolada, seja coexistindo com outras espécies, tais como *M. enterolobii*. Sob o âmbito acadêmico, esta correlação entre as duas características pode indicar não apenas similaridades entre mecanismos de patogenicidade utilizados pelas duas espécies de *Meloidogyne* como também entre mecanismos similares de resistência da espécie vegetal. Sob este último aspecto, as resistências podem ser determinadas pelo mesmo QTL ou QTLs distintos, mas muito próximos. Futuramente, é imprescindível a realização de ensaios de campo, em ambientes diversos, a fim de mensurar a estabilidade destas resistências.

Figura 12 - Histograma exibindo a pronunciada frequência de indivíduos suscetíveis no primeiro ensaio

3.4 Considerações finais

Os genótipos J102007T10, J1612008T12, J1612008T34, I112008T97, I112008T98, I112008T99 e I112008T100 constituem fontes promissoras de resistência a *M. enterolobii*.

Resistência de origens distintas e de maior espectro em uma mesma variedade é recomendável e, teoricamente, possível.

Referências

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.p. 948.
- BRIDGE, J.; PAGE, S.L.J. Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart. **Tropical Pest Management**, Basingstoke, v.26, p. 296–298, 1980.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides das galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v.25, n.1, p.223-228, 2001.
- CRUZ, C.D. **Princípios de genética quantitativa**. Viçosa: UFV, 2005.p.394.
- DAVIS, E.L.; RICH, J.R.; GWYNN, G.R.; SISSON, V. Greenhouse evaluation of *Nicotiana* spp. for resistance to root knot nematodes. **Nematropica**, Bradenton, v.18, n.2, p.99-107, 1988.

DI VITO, M.; LOMBARDI, D.A.; ZACCHEO, G.; CATALANO, F. Response of lines and cultivars of tobacco and *Nicotiana* species to Italian populations of *Meloidogyne* species. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.26, p.271-274, 1998.

DÍAZ-SILVEIRA, M.F.; HERRERA, J.O. An overview of nematological problems in Cuba. **Nematologica**, Leiden, v.28, p.151-164, 1998.

DROLSOM, P. Carolina State University and U.S. Agency for International of Development. In: N.; MOORE, E.L.; GRAHAM, T.W. Inheritance of resistance to root-knot nematodes in tobacco. **Phytopathology**, Saint Paul, v.48, p.686-689, 1958.

ESBENSHADE, P.R.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, College Park, v.22, n.1, p.10 – 115, 1990.

FERRAZ, L.C.C.B.; BROWN, D.J.F. **An Introduction to Nematodes: Plant Nematology**. Sofia: Pensoft Publishers, 2002.p.236.

FORTNUM, B.A.; KRAUSZ, J.P; CONRAD, N.G. Increasing incidence of *Meloidogyne arenaria* on Flue-Cured Tobacco in South Carolina. **Plant Disease**, Saint Paul, v.68, n.3, p.244-245, 1984.

GWYNN, G.R.; BARKER, K.R.; KOMN, D.A.; BURK, L.G.; REED, S.M. Genetic resistance to tobacco mosaic virus, cyst nematodes, root knot nematodes, and wildfire from *Nicotiana repanda* incorporated into *N. tabacum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.70, p.958 – 962, 1986.

HARTMAN, K.M.; SASSER, J.N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host and perineal pattern morphology. In: BARKER, K.R., CARTER, C.C. ; SASSER, J.N. (Ed.). **An advanced treatise on Meloidogyne**. v.2: Methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. p. 115-123.

HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparasion of methods of colleting inocula for *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v.57, p.1025 – 1028, 1973.

JOHNSON, C.S.; WAY, J.; BARKER, K.R. Nematode parasites of Tobacco. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. St. Albans: C.A.B International – Institute of Parasitology, 2005. p.675-708.

LORDELLO, L.G.E. **Nematóides das plantas cultivadas**. 8 ed. São Paulo: Nobel, 1986.p.314

NG'AMBI, T.B.S.; RUFTY, R.C.; BARKER, K.R. Response of root-knot resistant tobacco to concomitant populations of *Meloidogyne* species. **Plant Disease**, Saint Paul , v.79, 1008-1013, 1995.

NG'AMBI, T.B.S.; RUFTY, R.C.; BARKER, K.R.; MELTON, T.A. Identification of sources of resistance to four species of root knot nematodes in tobacco. **Journal of Nematology**, College Park, v.31, n.3, p. 272-282, 1999.

- NOE, J.P. **Nematoides parasitas de plantas**. Ed: TRIGIANO, R.N.; WINDHAM, M.T.; WINDHAM, A.S. In: Fitopatologia: Conceitos e Exercícios de Laboratório. 2.ed. 2010. p.83-96.
- PÉREZ, M.; FERNÁNDEZ, E. Plant parasitic nematodes associated with tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) in the pinar del Rio Province of Cuba. **Nematropica**, Bradenton, v.28, p.187-193, 1998.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. São Paulo: Nobel, 1987. 467 p.
- PONTE, J.J. **Nematóides das galhas: espécies ocorrentes no Brasil e seus hospedeiros**. Mossoró: Brascan Nordeste, 1978.p.99.
- REED; S.M.; SCHNEIDER, S.M. Evaluation of *Nicotiana orthophora* as a source of resistance to *Meloidogyne incognita* race 4 for tobacco. **Journal of Nematology**, College Park, v.24, n.2, p.253-256, 1992.
- RICH, J.R.; GARCIA, M.R. Nature of the root knot disease in Flórida Tobacco. **Plant Disease**, Saint Paul , v.69, p.972-974, 1985.
- RUFTY, R.C.; WERNSMAN, E.A.; POWELL, N.T. A genetic analysis of the association between resistance to *Meloidogyne incognita* and a necrotic response to infection by a strain of potato virus Y in tobacco. **Phytopathology**, Saint Paul, v.73, p.1413–1418, 1983.
- SCHMITT, D.P. Incidence of Plant Parasitic Nematodes in the Coastal Plain of North Carolina. **Plant Disease**, Saint Paul, v.72, p.107-110, 1988.
- SHEW, H.D.; LUCAS, G.B. **Compendium of tobacco diseases**. St. Paul: APS Press, 1991. 44p.
- STANTON, J.M.; O'BRIEN, P.C.; SCHIPKE, L.G.; HUGALL, A.; MORITZ, C. Species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) affecting tobacco in north Queensland, including two new host races of *M. arenaria*. **Australasian Plant Pathology**, v.21, n.4, p.150-157, 1992.
- STAVELY, J.R.; PITTARELLI, G.W.; BURK, L.G. *Nicotiana repanda* as a potential source for disease resistance in *N. tabacum*. **The Journal of Heredy**, Washington, v.64, p.265 – 271, 1873.
- SUDO, S. Problemas nematológicos na cultura do fumo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 20., 1997. , Gramado RS. **Resumos....** (Palestra), 1997. p.46-47.
- SUDO, S.; ESPINDOLA, E.E. Survey of root-knot nematode species in tobacco plants grown in the South of Brazil. Coresta Meeting: Agronomy and Phytopathology Groups. **Coresta Information Bulletin**, 1987, abstract 2086.
- VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética Biométrica no Fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496 p.

YI, H.Y.; RUFT, R.C.; WERNSMAN, E.A.; CONKLING, M.C. Mapping the root knot nematode resistance gene (*Rk*) in Tobacco with RAPD markers. **Plant Disease**, Saint Paul, v.82, n.12, p.1319-1322, 1998.

ZEM, A.C.; ZANON, J.I.; MONTEIRO, A.R. Nota sobre a ocorrência de nematóides associados à cultura do fumo no Estado de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA, 9., 1985. Piracicaba, SP. **Resumos...** Sociedade Brasileira de Nematologia/Copersucar, 1985. p.62.