



Universidade de Brasília - UnB
Instituto de Ciências Biológicas - IB
Departamento de Fitopatologia
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

**Interações da cenoura e do tomateiro com espécies de
Meloidogyne: Parasitismo e resistência genética**

Dwillian Firmiano Cunha

Dwillian Firmiano Cunha

**Interações da cenoura e do tomateiro com espécies de
Meloidogyne: Parasitismo e resistência genética**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

Orientador

Prof. Leonardo Silva Boiteux, Ph.D

Coorientadores

Jadir Borges Pinheiro, DSc

Agnaldo Donizete Ferreira de Carvalho, DSc

Maria Esther de Noronha Fonseca Boiteux, Ph.D

FICHA CATALOGRÁFICA

CUNHA, Dwillian F.

Interações da cenoura e do tomateiro com espécies de *Meloidogyne*: Parasitismo e resistência genética

Dwillian Firmiano Cunha

Brasília, 2023.

158p.

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia,
Universidade de Brasília, Brasília.

1. *Daucus carota* spp., *Solanum* spp., nematoides-das-galhas, Nematóide.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Estudo da resistência genética em cenoura a *Meloidogyne javanica*.

A Deus, a minha família e amigos, dedico

DEDICATÓRIA

Um sonho que teve início na graciosa cidade de São João Nepomuceno, floresceu a partir das raízes da minha infância, na quietude de um pequeno quintal nos fundos de uma modesta moradia.

Expresso minha profunda gratidão aos meus pais, Luzia e José Carlos.

Minha mãe, uma mulher guerreira e resiliente, cujos esforços incansáveis e encorajamento desde a minha base são verdadeiramente inestimáveis. Suas preces me fortaleceram ao longo desta jornada grandiosa.

Meu pai, um exemplo de sabedoria e caráter, cujas conversas sempre me enriqueceram, tanto no sentido pessoal, quanto profissionalmente. Sem seu apoio, esse momento nunca teria chegado.

Luzia e José Carlos, nós vencemos!

À minha madrinha, Esmeraldina (in memoriam), cujos primeiros incentivos à busca pelo conhecimento universitário permanecem vivos em minha memória.

Aos meus amados irmãos, Carlos Eduardo, João Pedro, Braulliom e Alan, cujo apoio mútuo perdura mesmo diante de tantas brigas e dificuldades. Agradeço pelo incentivo que me deram desde a graduação. Amo vocês!

A minha tia Gracinha pelos inúmeros incentivos e orações, pelo acolhimento maternal desde a graduação e que me acompanha até hoje.

Ao Thávio, meu valioso companheiro e grande amigo. Os sentimentos que nutro por você são de uma pureza e autenticidade singulares. Muito obrigado por trilhar ao meu lado nos momentos de alegria e dificuldade, pela companhia, aprendizados e carinho sempre. Sou eternamente grato!

Ao meu orientador, Leonardo Silva Boiteux. Sua orientação me fez enxergar a ciência de uma forma diferente e criativa, tonando essa jornada ainda mais animadora. Sou muito grato por sempre me dar suporte nos momentos que precisei, pelos conselhos e avaliações críticas, os quais desempenharam um papel fundamental em minha

evolução. Sua animação profissional, reconhecimento e humildade, me leva a uma profunda admiração pela sua pessoa.

Quero agradecer ao meu coorientador e amigo, Jadir Borges Pinheiro. Sua carinhosa recepção na área de Nematologia foi fundamental para minha atual paixão por esse campo. As conversas que tivemos foram enriquecedoras, tanto em conhecimento, quanto em valiosas lições de vida. Tenho muito orgulho de você e de sua influência em minha jornada. Muito obrigado!

À minha coorientadora, Dra. Maria Esther de Noronha Fonseca Boiteux, pelo rico conhecimento que compartilhou, especialmente nas análises moleculares. Sempre fiquei agradecido pelos seus feedbacks e avaliações críticas, assim como pelo carinho e atenção que sempre demonstrou por mim.

Ao meu coorientador, Dra. Agnaldo Donizete F. de Carvalho, cujo empenho e dedicação foram fundamentais para o êxito de meus trabalhos. Com ele pude aprender muito sobre a cultura da cenoura e práticas de melhoramento. Sou grato pelos conselhos, pela oportunidade de trabalho em conjunto e pela rica experiência compartilhada comigo.

Meus agradecimentos também ao Dr. Giovani Olegário da Silva da Embrapa Hortaliças de Canoinhas-SC, por sua inestimável ajuda nas análises estatísticas e conhecimentos estatísticos.

Aos colegas do Laboratório de Nematologia - Regis, Miguel, Leandro, Felipe, Pedro, Carlos Ragassi e Erciso - expresso minha profunda apreciação pelos momentos memoráveis, lições aprendidas e convívio.

Ao Sr. Pedro, expresso minha gratidão pelo apoio na condução dos meus experimentos, pela disponibilidade e dedicação no cuidado com as plantas em todas as ocasiões, inclusive nos fins de semana. Aprecio também as conversas enriquecedoras que tivemos, suas contagiadas gargalhadas repletas de alegria e o valioso conhecimento compartilhado ao longo desse período.

Aos amigos de longa data, Anderson e Ana, minha gratidão pelas risadas compartilhadas, incentivo constante e carinho mútuo. Deus não poderia ter me abençoado com amigos mais preciosos.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro, Prof. Mara Rúbia da Rocha e Prof. Juvenil Enrique Cares. Agradeço por terem aceitado o convite para avaliar este trabalho e por fazerem parte deste momento marcante e de muitos ensinamentos.

Ao técnico de laboratório, Chico; ao auxiliar de limpeza, Iran; e a todos os indivíduos envolvidos direta e indiretamente, minhas sinceras palavras de agradecimento. Suas contribuições são parte integrante desta conquista.

Por fim, mas igualmente relevante, à Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, expresse meu reconhecimento por viabilizarem a concretização deste sonho. Aos dedicados professores do PPG/FIT, minha profunda apreciação por todos os conhecimentos transmitidos, e ao CNPq, pelo auxílio financeiro ao longo da minha pesquisa.

Do fundo do meu coração, meus sinceros agradecimentos.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Prof. Leonardo Silva Boiteux e coorientação dos pesquisadores: Jadir Borges Pinheiro, Agnaldo Donizete Ferreira de Carvalho e Maria Esther de Noronha Fonseca Boiteux com o apoio do Departamento de Fitopatologia da UnB e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Hortaliças.

**Interações da cenoura e do tomateiro com espécies de *Meloidogyne*:
Parasitismo e resistência genética**

DWILLIAN FIRMIANO CUNHA

DISSERTAÇÃO APROVADA em (18/08/2023) por:

Professora Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro

Professora Mara Rúbia da Rocha

Professor Leonardo Silva Boiteux
Orientador (Presidente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL, BRASIL
2023

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO GERAL.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUÇÃO GERAL.....	21
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
1. A cultura da cenoura.....	29
1.1 Origem e Histórico.....	29
1.2 Importância socioeconômica.....	32
1.3 Classificação taxonômica e biologia.....	33
2. A cultura do tomateiro.....	34
2.1 Origem e Histórico.....	34
2.2 Importância socioeconômica.....	35
2.3 Classificação taxonômica e biologia.....	36
3. Os nematoides-das-galhas (<i>Meloidogyne</i> spp.).....	36
3.1 Principais espécies de <i>Meloidogyne</i> parasitas da cenoura.....	38
3.2 Principais espécies de <i>Meloidogyne</i> parasitas do tomateiro.....	38
3.3 Ciclo de vida e comportamento de <i>Meloidogyne</i> spp.....	39
3.4 Sintomas causados pelo nematoide-das-galhas.....	41
4. Identificação de <i>Meloidogyne</i> spp.....	42
5. Manejo do nematoide-das-galhas.....	43
6. Resistência genética.....	45
6.1. Resistência a espécies de <i>Meloidogyne</i> em cenoura.....	45
6.2 Resistência a espécies de <i>Meloidogyne</i> no tomateiro.....	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
CAPÍTULO 2: REAÇÃO DE GERMOPLASMA DE TOMATEIRO SOB DIFERENTES NÍVEIS DE INÓCULO DE <i>Meloidogyne enterolobii</i>	60
RESUMO.....	61
ABSTRACT.....	62
1. INTRODUÇÃO.....	63
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	66
2.1 Caracterização da área experimental.....	66
2.2 Obtenção, identificação e multiplicação de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	66
2.3 Delineamento experimental.....	67
2.4 Instalação e condução do experimento.....	68
2.5 Preparo de suspensão e inoculação das plantas de tomate.....	68
2.6 Avaliação do experimento.....	69
2.7 Análise estatística.....	71
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4. CONCLUSÕES.....	84
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
CAPÍTULO 3: POTENCIAL EFEITO RESIDUAL DO GENE DE RESISTÊNCIA <i>Mi-1.2</i> AO <i>Meloidogyne enterolobii</i>: ANÁLISE EMPREGANDO LINHAGENS ISOGÊNICAS DE TOMATEIRO (<i>Solanum lycopersicum</i>)	88
RESUMO.....	89

ABSTRACT	90
1. INTRODUÇÃO	91
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	93
2.1 Caracterização da área experimental.....	93
2.2 Obtenção, identificação e multiplicação de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	93
2.3 Delineamento experimental.....	94
2.4 Instalação e condução do experimento.....	94
2.5 Preparo de suspensão e inoculação das plantas de tomate.....	94
2.6 Material vegetal e confirmação da presença/ausência do gene <i>Mi-1.2</i>	95
2.7 Avaliação do experimento.....	97
2.8 Análise estatística.....	97
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	99
4. CONCLUSÕES.....	108
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
CAPÍTULO 4: PANORAMA ATUAL DO EMPREGO DO GENE <i>MI-1.2</i> DE RESISTÊNCIA AOS NEMATÓIDES-DAS-GALHAS EM CULTIVARES COMERCIAIS DE TOMATEIRO NO BRASIL E REAÇÃO À INFECÇÃO POR <i>MELOIDOGYNE JAVANICA</i> E <i>M. INCOGNITA</i>.....	111
RESUMO.....	112
ABSTRACT.....	113
1. INTRODUÇÃO.....	114
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	117
2.1 Caracterização da área experimental.....	117
2.2 Obtenção, identificação e multiplicação de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	117
2.3 Delineamento experimental.....	118
2.4 Instalação e condução do experimento.....	118
2.5 Avaliação do experimento.....	118
2.6 Análise estatística.....	119
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	121
4. CONCLUSÕES.....	127
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128
CAPÍTULO 5: USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA SELEÇÃO DE CULTIVARES BRASILEIRAS DE CENOURA (<i>Daucus carota</i>) ASSOCIADOS A RESISTÊNCIA GENÉTICA A <i>Meloidogyne javanica</i>.....	132
RESUMO	133
ABSTRACT	134
1. INTRODUÇÃO	135
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	138
2.1 Caracterização da área experimental.....	138
2.2 Obtenção, identificação e multiplicação de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	138
2.3 Delineamento experimental.....	138
2.4 Instalação e condução do experimento.....	138
2.5 Preparo de suspensão e inoculação das plantas de tomate.....	139
2.6 Confirmação da associação com um locus de resistência a <i>Meloidogyne javanica</i> (<i>Mj-1</i>).....	140
2.7 Avaliação do experimento.....	141
2.8 Análise estatística.....	142
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	144
4. CONCLUSÕES.....	151
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	152

CONCLUSÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO.....154

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2: Reação de germoplasma de tomateiro sob diferentes níveis de inóculo de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	60
Tabela 2.1. Acessos de espécies de <i>Solanum (lycopersicum)</i> avaliadas quanto ao comportamento sob diferentes níveis de inóculo (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + eventuais J2) de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	67
Tabela 2.2. Avaliação do índice de galhas e índice de massas de ovos (IG e IMO), segundo a escala de Taylor & Sasser (1978).....	70
Tabela 2.3. Resumo da análise de variância, com os quadrados médios e significância de acessos de tomateiro sob diferentes níveis de inóculo (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + eventuais J2) de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	72
Tabela 2.4. Reação de acessos de tomateiro sob diferentes níveis de inóculo (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + eventuais J2) de <i>Meloidogyne enterolobii</i> com base na variável IG.....	73
Tabela 2.5. Reação de acessos de tomateiro sob diferentes níveis de inóculo (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + eventuais J2) de <i>Meloidogyne enterolobii</i> com base na variável IMO.....	74
Tabela 2.6. Reação de acessos de tomateiro sob diferentes níveis de inóculo (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + eventuais J2) de <i>Meloidogyne enterolobii</i> com base na variável NOGR.....	75
Tabela 2.7. Reação de acessos de tomateiro sob diferentes níveis de inóculo (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + eventuais J2) de <i>Meloidogyne enterolobii</i> com base na variável FR.....	78

CAPÍTULO 3: Potencial efeito residual do gene de resistência *mi-1.2* a *Meloidogyne enterolobii*: análise empregando linhagens isogênicas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*).....88

Tabela 3.1. Resumo da análise de variância, com os quadrados médios e significância de isolinhas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*), submetido a *Meloidogyne enterolobii*.....99

Tabela 3.2. Reação de isolinhas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) inoculadas com diferentes níveis de inóculo de *Meloidogyne enterolobii*, baseada na variável IG.....100

Tabela 3.3. Reação de isolinhas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) inoculadas com diferentes níveis de inóculo de *Meloidogyne enterolobii*, baseada na variável IMO.....101

Tabela 3.4. Reação de isolinhas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) inoculadas com diferentes níveis de inóculo de *Meloidogyne enterolobii*, baseada na variável FR.....101

CAPÍTULO 4. Panorama atual do emprego do gene *Mi-1.2* de resistência aos nematoides-das-galhas em cultivares comerciais de tomateiro no Brasil e reação à infecção por *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*.....111

Tabela 4.1. Avaliação de cultivares comerciais de tomateiro desafiadas com uma população de *Meloidogyne javanica*.....121

Tabela 4.2. Avaliação de cultivares comerciais de tomateiro desafiadas com uma população de *Meloidogyne incognita* raça 1.....122

Tabela 4.3. Reações de imunidade (I), resistência (R) e suscetibilidade (S) de cultivares de tomateiro comercializadas no Brasil em resposta a inoculações com populações de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* raça 1.....125

CAPÍTULO 5: Uso de marcadores moleculares para seleção de cultivares brasileiras de cenoura (*Daucus carota*) associados a resistência genética a *Meloidogyne javanica*.....132

Tabela 5.1. Variáveis empregadas na correlação com o fator de reprodução (FR) de acessos de cenoura sob suspensão de inóculo de 8 mil ovos + eventuais juvenis de *Meloidogyne javanica*.....141

Tabela 5.2. Viabilidade do inóculo de *Meloidogyne javanica* de acordo com as testemunhas padrões.....144

Tabela 5.3. Fenotipagem na ordem crescente de FR de cenouras quando submetidas a uma inoculação com 8 mil O+J2 de *Meloidogyne javanica*.....145

Tabela 5.4. Correlação simples entre as variáveis e o FR de cenouras quando inoculadas com 8 mil O+J2 de *Meloidogyne javanica*.....147

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: Revisão bibliográfica.....	28
Figura 1.1. Ciclo de vida de <i>Meloidogyne</i> spp. (nematoide-das-galhas) em hortaliças. Ilustração: Vanessa Reyes	41
CAPÍTULO 2: Reação de germoplasma de tomateiro sob diferentes níveis de inóculo de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	60
Figura 2.1. A: Instalação do experimento com os vasos devidamente identificados; B: Acessos de tomateiro (<i>Solanum lycopersicum</i>) com 35 dias após a semeadura (DAS).....	68
Figura 2.2. A: Marcação dos orifícios para deposição do inóculo B: Inoculação de suspensão de ovos + J2 de <i>Meloidogyne enterolobii</i> em acessos de espécies de <i>Solanum (lycopersicon)</i>	69
Figura 2.3. A: Imersão de raízes em solução corante de Floxina B (6 mg/L) por 15-20 min (Taylor & Sasser, 1978), B: Raiz após o procedimento de coloração.....	70
Figura 2.4. Curva de regressão para a variável Fator de Reprodução para a testemunha de suscetibilidade Rutgers em resposta a crescentes níveis de inóculo do nematoide <i>Meloidogyne enterolobii</i>	77
Figura 2.5. Curva de regressão para o fator de reprodução das testemunhas padrões de tomate (Rutgers e Nemadoro) em resposta a crescentes níveis de inóculo do nematoide <i>Meloidogyne enterolobii</i>	79
Figura 2.6. Curvas de regressão para o Fator de Reprodução dos acessos CNPH 1035 e CNPH 1048 em resposta a crescentes níveis de inóculo do nematoide-das-galhas <i>Meloidogyne enterolobii</i>	80

Figura 2.7. Curvas de regressão para o fator de reprodução para acessos de tomate (CNPH 1290 e CNPH 1439) em resposta a crescentes níveis de inóculo do nematoide *Meloidogyne enterolobii*.....81

CAPÍTULO 3: Potencial efeito residual do gene de resistência *Mi-1.2* a *Meloidogyne enterolobii*: análise empregando linhagens isogênicas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*).....88

Figura 3.1. A: Marcação dos orifícios para deposição do inóculo **B:** Inoculação de suspensão de ovos + J2 de *Meloidogyne enterolobii* em acessos de espécies de *Solanum (lycopersicon)*.....95

Figura 3.2. A: Coleta de material vegetal das cultivares contrastantes de tomateiro: cultivar ‘Rio Grande’ (*Mi-1.2/ Mi-1.2*) versus ‘Nemadoro’ (*Mi-1.2/ Mi-1.2*) com auxílio de alicate; **B:** Discos de material vegetal e posterior armazenamento nos microtúbulos refrigerados.....96

Figura 3.3. A: Aplicação do master mix + suspensão de DNA em cada amostra **B:** Parâmetros utilizados nas ampliações da PCR.....96

Figura 3.4. Curva de regressão para o fator de reprodução das testemunhas padrões de tomate (Rutgers e Tospodoro) em resposta a crescentes níveis de inóculo do nematoide *Meloidogyne enterolobii*.....103

Figura 3.5. Curvas de regressão para o fator de reprodução para isolinhas de tomate (Nemadoro e Rio Grande) em resposta a crescentes níveis de inóculo do nematoide *Meloidogyne enterolobii*.....104

Figura 3.6. Curva de regressão para a variável Fator de Reprodução para a isolinha Calipso em resposta a crescentes níveis de inóculo do nematoide-das-galhas *Meloidogyne enterolobii*.....104

Figura 3.7. Curva de regressão para a variável Fator de Reprodução para a isolinha Europel em resposta a crescentes níveis de inóculo do nematoide-das-galhas *Meloidogyne enterolobii*....105

Figura 3.8. Curva de regressão para a variável Fator de Reprodução para a isolinha Rio Grande em resposta a crescentes níveis de inóculo do nematoide-das-galhas *Meloidogyne enterolobii*.....105

Figura 3.9. Eletroforese em gel de agarose (1,7%) dos marcadores SCAR/STS codominantes previamente identificados em estreita ligação com um *locus* de resistência a *Meloidogyne enterolobii* (*Mi-1.2*) em tomateiro. Detecção da presença e ausência do gene *MI-1.2* para resistência a *M. enterolobii* nas isolinhas de tomate.....106

CAPÍTULO 4. Panorama atual do emprego do gene *Mi-1.2* de resistência aos nematoides-das-galhas em cultivares comerciais de tomateiro no Brasil e reação à infecção por *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*.....111

Figura 4.1. Detecção da presença/ausência do gene de resistência *Mi-1.2* em cultivares de tomateiro comercializadas no Brasil.125

CAPÍTULO 5: Uso de marcadores moleculares para seleção de cultivares brasileiras de cenoura (*Daucus Carota*) associados a resistência genética a *Meloidogyne javanica*.....132

Figura 5.1. A: Fenotipagem da população F2 de ‘Brasília #83147’ aos 30 dias após a semeadura (DAS) com desbaste; **B:** Plantas adultas com 90 dias após a semeadura (DAS); **C:** Raiz de tomateiro cv. ‘Rutgers’ (sem *Mi-1.2*) aos 65 dias após a inoculação com *Meloidogyne javanica*; **D:** Raiz de cenoura ‘Roxa’ (sem *Mi-1.2*) aos 120 dias após a inoculação com *Meloidogyne javanica*.....139

Figura 5.2. A: Marcação dos orifícios para deposição do inóculo **B:** Inoculação de suspensão de ovos + J2 de *Meloidogyne javanica* em uma população F2 de ‘Brasília #83147’.....140

Figura 5.3. A: Coleta de material vegetal da população F2 de ‘Brasília #83147’; **B:** Aplicação do master mix + suspensão de DNA em cada amostra.....141

Figura 5.4. A e B: Lavagem do sistema radicular da cenoura em balde com água. **A:** Planta de cenoura com solo nas raízes sendo imersa em água. **B:** Cenoura com o sistema radicular limpo, sem solo.....142

Figura 5.5. A e B: Planta 48 com muitas galhas e deformações incitadas pelo nematoide-das-galhas (*Meloidogyne javanica*); **C e D:** Planta 97 com uma grande multiplicação de *M. javanica*; **E:** Bifurcação na raiz causada pelo nematoide e **F:** Plantas com ausência de galhas.....146

Figura 5.6. Eletroforese em gel de agarose (1,7%) dos marcadores SCAR/STS codominantes previamente identificados em estreita ligação com um locus de resistência a *Meloidogyne javanica* (*Mj-1*) em ‘Brasília #83147’. Detecção da presença e ausência do gene *MJ-1* para resistência a *M. javanica* em cultivares de cenoura.....149

RESUMO GERAL

CUNHA, Dwillian Firmiano. **Interações da cenoura e do tomateiro com espécies de *Meloidogyne*: Parasitismo e resistência genética.** 2023. 158p Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

Os nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) representam importante grupo de patógenos radiculares devido aos danos induzidos em uma ampla gama de hospedeiras. O parasitismo por *Meloidogyne* spp. é um grande obstáculo à produção de cenoura (*Daucus carota*) em regiões subtropicais, causando perdas de produção e qualidade. No Brasil, as espécies com maior importância na cenoura são *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. A cultivar ‘Brasília’ é a principal fonte de resistência a essas duas espécies. No entanto, ainda não estão disponíveis sistemas de marcadores moleculares ligados aos fatores de resistência para as cultivares brasileiras de cenoura, que facilitaria o processo de seleção. O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) também é severamente afetado por *Meloidogyne* spp. com especial destaque para *M. enterolobii* devido à sua recente disseminação geográfica e pela capacidade de “quebrar” a resistência conferida pelo gene *Mi-1.2*. Todavia, fontes alternativas de resistência no tomateiro a *M. enterolobii* ainda não estão disponíveis. Além disso, novas metodologias de avaliação de plantas em relação ao *M. enterolobii* são necessárias em ambas as hortaliças. Neste contexto, o presente trabalho objetivou estudar diferentes aspectos das interações de cenoura e tomateiro com espécies de *Meloidogyne*. **Em cenoura**, realizou-se um estudo com uma população F₂ de 108 plantas da população de melhoramento ‘Brasília #83147’ (que segrega para resistência a *M. javanica*). Plantas foram inoculadas com 8000 ovos de *M. javanica* aos 30 dias após a semeadura. DNA total foi extraído de amostras foliares e avaliadas (via PCR) com marcadores do tipo SCAR/STS codominantes (SQ1850R / SQ1700S e SQ6650R / SQ6590S) previamente identificados em estreita ligação com um locus de resistência a *M. javanica* (*Mj-1*) em ‘Brasília’. Quanto às análises nematológicas, avaliou-se os sistemas radiculares de plantas individuais aos 120 dias após a inoculação (DAI) quanto ao fator de reprodução (FR = pf/pi) e o número de ovos por grama de raiz (NOGR). Raízes de plantas individuais contrastantes (resistentes versus suscetíveis) foram vernalizadas e submetidas a autofecundação (geração S1). O bioensaio de inoculação em conjunto com a análise de marcadores confirmou que a resistência não está fixada nessa população, com muitos indivíduos suscetíveis sendo detectados. No entanto, foi possível identificar indivíduos com resistência extrema (resposta do tipo imunidade) e com a presença dos marcadores SCAR/STS codominantes. Esses indivíduos podem ser agora utilizados como parentais em estudos genéticos e na seleção assistida por marcador molecular do fator de resistência, auxiliando no desenvolvimento de novas cultivares brasileiras de cenoura resistentes a *M. javanica*. **No tomateiro**, foi avaliado o comportamento de 24 acessos de germoplasma de *Solanum (Lycopersicon)* sob diferentes níveis de inóculo de *M. enterolobii*. Os acessos foram inoculados com quatro níveis de inóculo de *M. enterolobii* (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos) aos 15 dias após o transplantio. Quanto às análises nematológicas, as raízes do tomateiro aos 45 dias após a inoculação foram avaliadas de acordo com o índice de galhas (IG), índice de massa de ovos (IMO), número de ovos por grama de raiz (NOGR) e o fator de reprodução (FR). Todos os acessos de tomateiro avaliados apresentaram respostas de suscetibilidade, sendo imprescindível conduzir avaliações mais amplas de coleções de germoplasma em busca de fontes de resistência efetivas à esse patógeno emergente. No processo de inoculação de *M. enterolobii*, que consistia na utilização de plantas com 15 dias após a semeadura e com 15 cm de comprimento, entre a primavera e o verão, concluiu-se que a dose de

inóculo entre 1000 a 2000 ovos de *M. enterolobii* pode ser considerada ótima e frequentemente suficiente para desencadear a expressão máxima dos sintomas nos tomateiros em estudo. Isso indica que, em relação à infecção e multiplicação de *M. enterolobii*, níveis mais elevados de inóculo podem não ser necessariamente vantajosos para a manifestação dos sintomas. O potencial efeito residual do gene *Mi-1.2* também foi estudado em ensaios comparativos empregando linhagens isogênicas (isolinhas) contrastantes para esse fator de resistência: ‘Rio Grande’ (*mi-1.2/mi-1.2*) versus ‘Nemadoro’ (*Mi-1.2/Mi-1.2*). A condição alélica de cada planta individual foi confirmada via marcadores moleculares ligados ao locus *Mi-1.2*. O gene *Mi-1.2*, embora extremamente efetivo a pelo menos 13 espécies de *Meloidogyne*, não conferiu efeito residual significativo a *M. enterolobii* se mostrando ineficiente para interferir mesmo em aspectos quantitativos do processo de parasitismo. O marcador molecular ligado ao gene *Mi-1.2* também foi empregado para avaliar a utilização do melhoramento genético deste gene no panorama varietal brasileiro. Os resultados indicaram que um, número significativo de cultivares de tomateiro apresentam esse gene, mas a expressão da resistência se mostra variável de acordo com a cultivar onde o gene foi incorporado. Diante da importância do tomateiro e da cenoura no Brasil, os resultados deste estudo contribuem substancialmente para os programas de melhoramento visando o desenvolvimento de cultivares resistentes às diferentes espécies de *Meloidogyne*.

Palavras-chaves: Nematóide-das-galhas., *Daucus carota*, *Solanum lycopersicum*.

Orientador – Leonardo Silva Boiteux – Universidade de Brasília, UnB

Coorientadores –Jadir Borges Pinheiro – Embrapa Hortaliças

Agnaldo Donizete Ferreira de Carvalho – Embrapa Hortaliças

Maria Esther de Noronha Fonseca Boiteux – Embrapa Hortaliças

ABSTRACT

CUNHA, Dwillian Firmiano. **Interactions of carrot and tomato with *Meloidogyne* species: Parasitism and genetic resistance.** 2023. 158p. Dissertation (Master Degree – Plant Pathology) – University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) represent an important group of root pathogens inducing damages in a wide range of hosts. The parasitism of *Meloidogyne* species is a major obstacle to carrot (*Daucus carota*) production in subtropical regions, causing yield and quality losses. In Brazil, the most important species in carrots are *M. javanica* and *M. incognita*. The cultivar ‘Brasília’ is the main source of resistance against these two nematode species. However, molecular marker systems linked to resistance factors in carrot cultivars from Brazil are still not available, which would facilitate the selection process. Tomato (*Solanum lycopersicum*) is also severely affected by *Meloidogyne* species with special emphasis on *M. enterolobii* due to its recent geographic spread and its ability to “break-down” the resistance conferred by the *Mi-1.2* gene. However, alternative sources of resistance in tomato to *M. enterolobii* are not yet available. Furthermore, new nematological methodologies are necessary for the evaluation of plants against *M. enterolobii* in both vegetables. In this context, the present work aimed to study different aspects of carrot and tomato interactions with *Meloidogyne* species. **In carrots**, a study was carried out with an F₂ population of 108 plants of the breeding population ‘Brasília #83147’ (which segregates for resistance to *M. javanica*). Plants were inoculated with 8000 eggs + eventual J2 of *M. javanica* 30 days after sowing. Total DNA was extracted from foliar samples and evaluated (via PCR) with codominant SCAR/STS-like markers (SQ1_{850R}/SQ1_{700S} and SQ6_{650R}/SQ6_{590S}) previously identified in close connection with a resistance locus to *M. javanica* (*Mj-1*) in ‘Brasília’. As for the nematological analyses, the root systems of individual plants were evaluated at 120 days after inoculation (DAI) regarding the reproduction factor (FR = pf/pi) and the individual quantification of galls and egg mass. Roots of individual contrasting plants (resistant versus susceptible) were vernalized and subjected to selfing (S₁ generation). Inoculation bioassay in conjunction with marker analysis confirmed that resistance is not fixed in this population, with many susceptible individuals being detected. However, it was possible to identify individuals with extreme resistance (immunity-like response) and with the presence of codominant SCAR/STS markers. These individuals can now be used as parentals in genetic studies and molecular-assisted selection of the resistance factor, helping in the development of new Brazilian carrot cultivars resistant to *M. javanica*. **In tomato**, the behavior of 24 *Solanum (Lycopersicon)* germplasm accessions under different levels of *M. enterolobii* inoculum was evaluated. Accessions were inoculated with four levels of *M. enterolobii* inoculum (1000, 2000, 4000 and 8000 eggs + eventual J2s) 15 days after transplanting. As for the nematological analyses, the tomato roots at 45 days after inoculation were evaluated according to the gall index (IG), egg mass index (IMO), number of eggs per gram of root (NOGR) and the factor of reproduction (FR). All tomato accessions evaluated showed susceptibility responses, making it essential to conduct broader evaluations of germplasm collections in search for effective sources of resistance against this emerging pathogen. In the *M. enterolobii* inoculation process, the inoculum dose of 1000 eggs + occasional J2 can be considered optimal and often sufficient to trigger the maximum expression of symptoms in the studied tomato plants. This indicates that, regarding the infection and proliferation of *M. enterolobii*, higher inoculum levels may not necessarily be advantageous for symptom manifestation. The potential residual effect of the *Mi-1.2* gene was also studied in comparative assays using isogenic lines (isolines) contrasting for this resistance factor: ‘Rio Grande’ (*mi-1.2/mi-*

1.2) versus ‘Nemadoro’ (*Mi-1.2/ Mi-1.2*). The allelic status of each individual plant was confirmed via molecular markers linked to the *Mi-1.2* locus. The *Mi-1.2* gene, although extremely effective against at least 13 *Meloidogyne* species did not confer a significant residual effect against *M. enterolobii*, proving to be inefficient to interfere even in quantitative aspects of the process of parasitism. The molecular marker linked to the *Mi-1.2* gene was also used to evaluate the breeding employment of this gene in the Brazilian varietal panorama. The results indicated that a significant number of tomato cultivars have this gene, but the resistance expression is variable according to the cultivar where the gene was incorporated. Given the importance of tomato and carrot in Brazil, the results of this study contribute substantially to breeding programs aimed at developing cultivars resistant to different *Meloidogyne* species.

Key words: Root-knot nematode, *Daucus carota*, *Solanum lycopersicum*.

Advisor – Leonardo Silva Boiteux – University of Brasilia, UnB

Co-Advisors – Jadir Borges Pinheiro – Embrapa Hortaliças

Agnaldo Donizete Ferreira de Carvalho – Embrapa Hortaliças

Maria Esther de Noronha Fonseca Boiteux – Embrapa Hortaliças

INTRODUÇÃO GERAL

Os nematoides-das-galhas (NGs), pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, Göldi, 1887, parasitam mais de 3000 espécies hospedeiras, induzindo severos danos à maioria das culturas agrícolas em todo o mundo (Abdellatif et al., 2016). As perdas anuais são estimadas em US\$ 100 bilhões de dólares (Ghareeb et al., 2020). A denominação “nematóide-das-galhas” é apropriada, pois descreve a principal e mais marcante característica da interação das espécies de *Meloidogyne* com as diferentes espécies hospedeiras que é a indução de hipertrofias e hiperplasias radiculares (Pinheiro et al., 2014a; Ferraz & Brown, 2016).

A cenoura (*Daucus carota*) é a principal espécie da família Apiaceae em termos econômicos. De acordo com dados da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), a produção mundial de cenoura em 2020 foi cerca de 39,3 milhões de toneladas em aproximadamente 1,22 milhões de hectares (FAO, 2020). O consumo da cenoura está amplamente difundido no Brasil, o que posiciona o país entre os dez maiores produtores do mundo, com produção superior a 700 mil toneladas em aproximadamente 25 mil ha, figurando como a 5ª hortaliça mais cultivada e consumida nacionalmente (Conab, 2020; Cunha et al., 2021).

Dentre os principais patógenos que afetam a cultura da cenoura, merece destaque os nematoides-das-galhas (NGs) (*Meloidogyne* spp.). O parasitismo por *Meloidogyne* spp. é um grande obstáculo na produção de cenoura em regiões subtropicais, causando perdas de produção e qualidade. Em regiões produtoras localizadas em climas mais amenos, a espécie *Meloidogyne hapla* Chitwood, 1949 é a mais prevalente. Por outro lado, em áreas de produção com temperaturas mais elevadas, *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 e *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 são as espécies predominantes (Parsons et al., 2015). De maneira geral, *M. incognita*, *M. javanica* e *M. hapla* são as principais espécies de NGs que causam perdas na produção de cenoura no Brasil (Cunha et al., 2021), embora *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949 também tem sido encontrada em áreas isoladas de cultivos de cenoura pelo país.

Na cenoura, as perdas causadas por nematoides variam entre 20–100%, dependendo da densidade populacional, da suscetibilidade da cultivar, da espécie de nematóide, do tipo de solo e das condições ambientais (temperatura e umidade relativa) (Pinheiro, 2017). As

perdas vão desde o descarte de raízes que seriam comercializadas até o abandono da lavoura, sendo a área inutilizada por vários anos para o plantio de cenoura (Pinheiro, 2017). Os danos causados pelas populações de nematoides da espécie *M. javanica* correspondem à hiperplasia e hipertrofia celular do sistema radicular, reduzindo a produtividade e comprometendo a classificação comercial do produto (Huang & Porto, 1988; Charchar et al., 2000; Huang & Porto, 1988). Os principais sintomas são a formação de galhas nas raízes secundárias, também denominadas de “pipocas”. Na raiz principal, além de alterações no comprimento e no diâmetro, bifurcações também são observadas na forma de “gancho” em algumas cultivares, embora esse sintoma possa ser decorrente da compactação do solo ou problemas hídricos, e nem sempre estando associado ao nematoide. No entanto, a presença de galhas nas raízes é um indicativo inequívoco da infecção pelo nematoide-das-galhas (Pinheiro, 2017).

No contexto da busca por alternativas de manejo, a identificação de fontes de resistência torna-se essencial. Assim, a partir de pesquisas conduzidas pela Embrapa Hortaliças desde o início da década de 1980, foram encontrados acessos de cenoura que demonstraram resistência/tolerância as diferentes espécies de *Meloidogyne*, sendo as fontes de resistência mais importantes as cultivares ‘Brasília’ e ‘Tropical’ (Charchar & Vieira, 1990; Pinheiro, 2017). A cultivar ‘Brasília’ revelou-se como uma notável fonte de resistência frente às espécies do nematoide-das-galhas em diferentes regiões produtoras no mundo (Simon et al., 1997; 2000). Essas descobertas adquirem relevância fundamental para o desenvolvimento de estratégias de manejo integrado de NGs em cultivos de cenoura, permitindo a implementação de abordagens agronômicas sustentáveis e eficazes na mitigação dos impactos econômicos negativos causados por esses patógenos.

Através da genética clássica em combinação com marcadores moleculares, foi localizada a região genômica contendo o locus *Mj-1* que confere elevados níveis de resistência a *M. javanica* na cultivar ‘Brasília’ (Boiteux et al., 2000; 2004; Simon et al., 2000). O gene *Mj-1* está localizado no cromossomo 8 (Simon et al., 2019) e também confere resistência parcial as populações de *M. incognita*. Em 2014, outro locus de resistência a *M. javanica* foi mapeado no acesso ‘PI 652188’ e denominado *Mj-2*. O locus *Mj-2* também está no cromossomo 8, mas se localiza em uma região distinta do *Mj-1* (Aamir Ali et al., 2013; Simon et al., 2019). A descoberta dos genes *Mj-1* e do *Mj-2* é significativa para o

melhoramento genético para resistência aos nematoides-das-galhas em cenoura (Simon et al., 2019).

Em contraste com a cenoura, que é uma hortaliça tuberosa, o tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é classificado como uma hortaliça-fruto. Essa hortaliça é amplamente cultivada em várias regiões do mundo devido às suas diversas aplicações, como alimento, tempero e uso industrial, além de apresentar notáveis valores nutricionais e propriedades nutracêuticas (Lu et al., 2020). Sua característica cosmopolita permite que seja cultivado em diferentes climas, podendo ser utilizado *in natura*, e sendo destaque entre as hortaliças no que se refere ao processamento industrial (Kessel, 2003).

Os nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) estão entre os patógenos mais comuns e mais amplamente disseminadas no tomateiro, induzindo severos danos em cultivares suscetíveis (Abd-Elgawad, 2014, 2020; El-Shafeey et al., 2019). A invasão primária de *Meloidogyne* spp. pode ter efeitos sinérgicos, facilitando a invasão do tomateiro por outros patógenos radiculares, incluindo espécies de *Ralstonia* (Singh & Siddiqui, 2012) e de *Fusarium* (Kassie et al., 2019). De fato, os NGs representam uma ameaça significativa para a produção de tomate, limitando tanto a quantidade quanto a qualidade dos frutos e causando prejuízos econômicos aos produtores. Estudos realizados por Tariq-Khan et al. (2017) e Mukhtar et al. (2017) destacam o impacto negativo desses patógenos nas lavouras de tomate. A gravidade das perdas de produção é evidenciada pelo estudo de Karssen et al. (2013), que estima que as perdas de tomate devido a esses organismos do gênero *Meloidogyne* atinjam o índice de 61 %.

A interação entre cultivares suscetíveis de tomateiro com os nematoides-das-galhas e outros patógenos representa uma ameaça considerável para a produção sustentável de tomates em diversas regiões tropicais e subtropicais. Neste aspecto, destacam-se as áreas de cultivo no Brasil, onde as espécies de *Meloidogyne* apresentam ampla distribuição geográfica, grande gama de hospedeiros e alta capacidade reprodutiva (Gabriel et al., 2020). Em escala global, as perdas na cultura do tomateiro podem variar entre 25 e 100% (Jablonska et al., 2007; Seid et al., 2015). Um especial destaque no tomateiro é a espécie *Meloidogyne enterolobii* Yang & Eisenback, 1983, devido à sua recente disseminação geográfica e pela capacidade de “quebrar” a resistência conferida pelo gene *Mi-1.2* (Tigano et al., 2010; Gabriel et al., 2020). No Brasil, *M. enterolobii* foi inicialmente relatado em pomares de goiabeiras em 2001 e, desde então, vem causando grandes

prejuízos em ampla gama de plantas hospedeiras (Carneiro et al., 2001; Castro, 2019). De modo geral, esse nematoide se manifesta de forma agressiva nas plantas hospedeiras, com perdas de produção superiores a 65%, apresentando alta densidade populacional e causando grande número galhas, diferentemente do observado para outras espécies do gênero. Essa percentagem de perdas é consideravelmente maior quando comparada com outras espécies de nematoide-das-galhas (Castagnone-Sereno, 2012). Além disso, fontes de resistência estáveis à *M. enterolobii* ainda não foram detectadas no germoplasma do tomateiro (Silva et al., 2019).

A resistência aos NGs no tomateiro foi obtida por meio da introgressão de um único gene dominante (denominado de *Mi-1*) a partir do parente selvagem do tomateiro *S. peruvianum* (posteriormente classificado como *Lycopersicon peruvianum*) (Bailey 1941; Gilbert & McGuire 1956). A região genômica no cromossomo 6 onde o gene *Mi-1.2* está localizado contém um agrupamento ('cluster') de diferentes genes (denominados de *Mi-1.1* até *Mi-1.7*) que apresentam elevados níveis de similaridade estrutural entre si. No entanto, estudos detalhados demonstraram que apenas o gene *Mi-1.2* é capaz de codificar o fenótipo de resistência funcional aos NGs (Milligan et al. 1998; Seah et al. 2007). Esta fonte de resistência se mostrou eficaz as três espécies mais importantes de NGs: *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. incognita* (Roberts 1992; Williamson 1998). Recentemente, uma cultivar de tomateiro contendo o gene *Mi-1.2* se mostrou resistente as populações de 13 diferentes espécies de *Meloidogyne* (Gabriel et al., 2020), entretanto se mostrou suscetível quando exposta a populações de *M. hapla* e *M. enterolobii* e também a populações virulentas de *M. javanica* coletadas no Sul do Brasil (Gabriel et al., 2022). Um aspecto interessante do gene *Mi-1.2* tem sido a sua capacidade de conferir resistência/tolerância as diferentes insetos-pragas, incluindo a mosca branca *Bemisia tabaci*, Gennadius, 1889 o pulgão da batata *Macrosiphum euphorbiae* Thomas, 1878 e o psílídeo do tomateiro *Bactericerca cockerelli* Šulc, 1909 (Rossi et al., 1998; Nombela et al., 2003; Casteel et al., 2006).

Devido à ampla gama de espécies hospedeiras e persistência no solo, os NGs são patógenos de difícil manejo nas lavouras (Kumari et al., 2016). Desta forma, o controle das chamadas "meloidoginoses" na cultura da cenoura e tomateiro representam um grande desafio para os produtores. Os produtos nematicidas, ainda que eficazes, têm um uso restrito devido ao elevado custo, não disponibilidade de registro para diversas

culturas, elevada toxicidade e impactos ambientais deletérios. Além disso, o uso intensivo de nematicidas químicos para manejar os fitonematoides resultou em problemas ambientais e de saúde, bem como a seleção de populações de NGs com resistência aos nematicidas (Molinari, 2011; Abd-Elgawad, 2020). Por essas razões, muitos princípios ativos tiveram o seu uso comercial banido em diversas regiões (Abd-Elgawad, 2020).

Nas últimas duas décadas foi observado progresso significativo no desenvolvimento de estratégias de manejo de nematoides em diferentes culturas de importância econômica. No entanto, o manejo dos NGs ainda é uma preocupação séria devido à sua ampla diversidade de espécies e a amplitude de hospedeiros. No que se refere ao manejo, o ideal é evitar a entrada desses patógenos na área, para isso, são essenciais medidas de prevenção, como a utilização de mudas certificadas e saudáveis, a higienização de máquinas e equipamentos quando usados em áreas com presença de nematoides e o controle do tráfego de pessoas.

Dentre as várias técnicas no manejo integrado de nematoides, merecem destaque a solarização do solo, o uso de plantas antagonistas, o controle biológico, a inundação do solo, nematicidas químicos, a rotação com culturas não hospedeiras e a resistência genética (Zasada et al., 2010). O controle biológico, a rotação de culturas, as práticas culturais e a resistência das plantas são atualmente as principais áreas de pesquisa para os cientistas que buscam enfrentar esse desafiador problema (Sikandar et al., 2020b). Embora exista um número crescente de práticas de manejo, a resistência de plantas oferece uma estratégia ecologicamente amigável e economicamente sustentável para o controle das “meloidoginoses”.

Nesse contexto, a resistência genética de plantas se destaca como a estratégia mais sustentável e economicamente viável para reduzir simultaneamente as densidades populacionais de NGs abaixo do nível de dano e evitar perdas na colheita. Dessa forma, a resistência tem sido considerada como a primeira linha de defesa da planta as espécies de NGs de importância para o tomateiro (Roberts, 1992; Williamson, 1998; Seid et al., 2015). Para tal, se torna crucial o conhecimento dos recursos genéticos disponíveis com resistência aos NGs dentro do germoplasma das espécies hospedeiras cultivadas bem como de suas espécies selvagens relacionadas. Estudos envolvendo a elucidação dos mecanismos de ação gênica, o desenvolvimento e aplicação de marcadores moleculares associados aos fatores de resistência também são cruciais dentro dos modernos programas

de melhoramento genético da cenoura e do tomateiro visando o desenvolvimento (em maior escala) de cultivares resistentes nestas duas relevantes hortaliças. Com os avanços nas tecnologias de sequenciamento de próxima geração, o mapeamento preciso e o desenvolvimento de marcadores auxiliarão no avanço da seleção assistida por marcadores. Dentro deste cenário, se justifica ações de pesquisa tendo como finalidade estudar diferentes aspectos das interações da cenoura e do tomateiro com espécies de *Meloidogyne*. A presente Dissertação visa contribuir em alguns aspectos relacionados com esses temas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho visa estudar diferentes aspectos das interações de cenoura e tomateiro com espécies de *Meloidogyne*.

2.2 Objetivos específicos

A) Cenoura

- ✓ Validar marcadores moleculares do tipo SCAR/STS codominantes visando a seleção de cultivares brasileiras de cenoura (*Daucus carota*) associados à resistência genética a *Meloidogyne javanica* em casa de vegetação;
- ✓ Identificar indivíduos com resistência extrema (resposta do tipo imunidade) na população F₂ ‘Brasília #83147’ em casa de vegetação.

B) Tomateiro

- ✓ Estudar o comportamento de acessos de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças (CNPQ) sob diferentes níveis de inóculo de *Meloidogyne enterolobii* em casa de vegetação;
- ✓ Verificar o potencial efeito residual do gene *Mi-1.2* em ensaios comparativos empregando linhagens isogênicas (isolinhas) contrastantes para esse fator de resistência em casa de vegetação;
- ✓ Conhecer o nível de inóculo mais adequado de *M. enterolobii* para a obtenção da máxima manifestação das reações nematológicas.
- ✓ Avaliar o panorama atual do emprego do gene *Mi-1.2* de resistência aos nematoides-das-galhas em cultivares comerciais de tomateiro no Brasil.

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

1. A cultura da cenoura

1.1 Origem e histórico

A cenoura (*Daucus carota*) pertence à família Apiaceae e ao grupo das Hortaliças de raízes tuberosas. A espécie tem sido cultivada há mais 5.000 anos na Ásia Central (Afeganistão, Paquistão e Irã), embora esses dados sejam incertos. Além disso, regiões que incluem o Cazaquistão, Quirguistão, Tadjiquistão, Turcomenistão e Uzbequistão foram centros básicos de origem de cenouras cultivadas na Ásia (Vavilov et al., 1992; Simon et al., 2008). O Afeganistão tem sido considerado centro primário de diversidade de cenouras e a Turquia o centro secundário (Stolarczyk & Janick, 2011). Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram empregados para analisar a estrutura e filogenia do gênero *Daucus* (Iorizzo et al., 2013). Foi encontrada uma clara separação entre as cenouras selvagens e as cultivadas, estando, portanto, os resultados experimentais de acordo com documentos históricos que indicavam a Ásia Central como o centro de origem da cenoura cultivada (Iorizzo et al., 2013).

Inicialmente, a cenoura foi utilizada pelos gregos e romanos para fins medicinais, onde, curiosamente, apenas as sementes eram consumidas. Forma, cor e sabor foram os principais critérios de seleção na domesticação das raízes de cenoura visando o consumo humano (Simon et al., 2008; Grzebelus et al., 2014). As cenouras cultivadas são classificadas em dois grandes grupos: cenouras de origem oriental e cenouras ocidentais. Essa classificação considera formato, arquitetura e pigmentação nas raízes (Rubatzky et al., 1999). As cenouras orientais possuem raízes pigmentadas (roxas, amarelas, rosas, amarelo-alaranjado e algumas avermelhadas), florescem precocemente e sempre apresentam raízes mais grossas, curtas, estreitas e cônicas, possuindo folhas pubescentes e, comparativamente, teores mais baixos dos carotenoides precursores da vitamina A (alfa-caroteno e beta-caroteno). Em contrapartida, as cenouras ocidentais têm raízes pigmentadas por carotenoides (raízes amarelas, laranjas ou vermelhas, e ocasionalmente brancas), têm sempre forma cilíndrica ou cilíndrica afilada e folhas menos pubescentes. Possuem também maior teor de carotenoides pró-vitamina A e maior teor de açúcar do que as cenouras orientais (Rubatzky et al., 1999; Baranski et al., 2012). O argumento de que a cenoura cultivada do tipo oriental foi domesticada a partir das cenouras selvagens na região ao redor do Afeganistão é geralmente aceito (Heywood, 1983; Simon et al., 2008). No entanto, com base no primeiro estudo molecular sobre a domesticação da

cenoura, acredita-se que a cenoura cultivada do tipo ocidental tenha dado origem diretamente às cenouras do tipo oriental (Iorizzo et al., 2013).

A cenoura foi dispersa da Arábia ao norte da África até alcançar a Península Ibérica por volta do século X (Embrapa 2008). Na Holanda, no século XVI, uma cenoura laranja foi selecionada como tributo à casa real dos Países Baixos, a Casa de Orange (em neerlandês Oranje-Nassau). A cenoura foi criada a partir de mutações das formas amarelas e posterior cruzamento dessas com outras variedades, resultando na cor laranja característica (Banga, 1957, 1963, Heywood, 1983) também podendo ser chamada de cenoura moderna (Dossa & Fuchs, 2017).

O compilado de comentários feitos por Banga (1957; 1963) mostra que as cenouras roxas, em geral, eram consideradas de melhor sabor do que as cenouras amarelas. Uma característica das cenouras roxas, mencionada pelos autores, é que elas tinham o potencial de deixar manchas escuras nas mãos, utensílios de cozinha e na água de cozimento. Essas manchas provavelmente eram causadas pelos pigmentos naturais do grupo das antocianinas solúveis em água e presentes nas cenouras roxas. Tal peculiaridade pode ter gerado comentários negativos por parte de algumas pessoas, que podem ter visto isso como um inconveniente ao manipular e cozinhar as cenouras. A partir do século XVII, devido à preferência da população, a cenoura laranja expandiu-se pelo Mediterrâneo e Europa e desbancou a cenoura roxa. Com boa palpabilidade, versatilidade culinária e bom valor nutricional, a cenoura disseminou-se por toda a Europa. No Brasil, o primeiro relato do cultivo da cenoura ocorreu no século XIX, quando as cultivares trazidas pelos portugueses açorianos foram introduzidas no estado do Rio Grande do Sul. No entanto, a sua difusão, principalmente no sul e sudeste, só ocorreu depois da imigração de asiáticos e outros europeus (Rodrigues, 2020).

Como mencionado por Simon et al. (2008), o desenvolvimento das cenouras alaranjadas no Ocidente trouxe consigo a diferenciação de características distintivas entre os tipos de cenoura. Isso teve início no século XVI, quando os tipos “Long Orange e “Horn” (cenouras de raízes curtas e laranjas) foram descritos. Posteriormente, diversas variações de ambos os tipos foram identificadas e descritas. As diferenças entre estes tipos não se limitam ao comprimento da raiz de armazenamento, mas também abrangem a intensidade da cor, a coloração do núcleo, o tamanho, a forma da ponta da raiz e a taxa de maturação

da colheita. Essas mesmas distinções ainda são usadas nos dias de hoje para auxiliar na categorização dos grupos varietais de cenouras (Simon et al., 2008).

Atualmente a cenoura é cultivada em diversas variedades ao redor do mundo. Os principais tipos de raiz de cenoura incluem grupos varietais europeus (Nantes', 'Chantenay', 'Danvers', 'Paris Market', 'Flakkee', 'Berlicum' e 'Amsterdam Forcing'), grupos asiáticos ('Kuroda' e 'Harumaki'), grupos norte-americanos ('Imperator') e grupos sul-americanos ('Brasília' e cultivares derivadas). Esses grupos possuem inúmeras cultivares nomeadas, o que demonstra a diversidade de opções disponíveis para os agricultores e consumidores.

Desde 1981, a Embrapa Hortaliças tem desempenhado um papel fundamental no estudo e desenvolvimento de cultivares de cenoura no Brasil. O lançamento da cenoura 'Brasília' foi um marco significativo para viabilizar o cultivo da cenoura no país, pois possibilitou expansão do cultivo para novas regiões, incluindo o cerrado brasileiro. Essa expansão resultou na estabilidade de preços e no fornecimento regular do alimento durante todo o ano. Ao longo dos quase 40 anos seguintes, a cultivar 'Brasília' serviu como base genética para o desenvolvimento de vários materiais genéticos destinados ao plantio no verão brasileiro, incluindo as cultivares 'BRS Planalto', 'BRS Paranoá' e o híbrido 'BRS Carmela' (Charchar & Vieira, 1990; Charchar & Vieira, 1991; Pinheiro, 2017).

A contínua pesquisa e a utilização da cultivar 'Brasília' como base para novas cultivares demonstram a importância dessa variedade para a agricultura brasileira e seu papel na diversificação e melhoria do cultivo de cenouras no país (Charchar & Vieira, 1990; Charchar & Vieira, 1991; Boiteux et al., 2000). Novos materiais genéticos derivados da cultivar 'Brasília' têm sido lançados (Vieira et al., 2012). Em 2020, a Embrapa Hortaliças, em parceria com o setor produtivo (empresa Isla Sementes), alcançou um marco significativo no mercado nacional ao desenvolver a cultivar 'BRS Paranoá' que foi o primeiro material genético de cenoura destinada exclusivamente ao sistema orgânico de produção. Em 2023, a parceria atingiu outro avanço importante ao criar o primeiro híbrido de cenoura, o BRS Carmela, que possui resistência à bactéria e aos fungos causadores da queima-das-folhas, a principal doença foliar que ataca a cultura da cenoura. A resistência do híbrido 'BRS Carmela' à queima-das-folhas é uma característica extremamente valiosa para os produtores, pois essa doença pode causar danos consideráveis às plantas e afetar negativamente a produtividade das lavouras. Apesar do sucesso no

desenvolvimento de cultivares de cenoura, a busca por cultivares com maior nível de resistência aos NGs é imprescindível para a cadeia produtiva da hortaliça.

1.2 Importância socioeconômica do cultivo da cenoura

A cenoura é a hortaliça com maior importância econômica dentro família Apiaceae, que ainda inclui o aipo (*Apium graveolens* L.), a salsa (*Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss) e o coentro (*Coriandrum sativum* L.) (Rubatzky et al., 1999). A cenoura destaca-se como uma excelente fonte de carotenoides, vitaminas e fibras dietéticas e é também é rica em minerais e antioxidantes (Arscott & Tanumihardjo, 2010). De acordo com dados da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), a produção mundial de cenoura em 2021 foi cerca de 39,3 milhões de toneladas em aproximadamente 1,22 milhões de hectares, sendo a China responsável por mais de 50% da produção mundial, seguida por Uzbequistão e Rússia (FAO, 2020).

O consumo da cenoura foi amplamente difundido no Brasil, o que posiciona o país entre os dez maiores produtores do mundo, com uma produção superior a 700 mil toneladas em aproximadamente 25 mil ha, figurando como a 5ª hortaliça mais cultivada e consumida nacionalmente (Dossa & Fuchs, 2017; Conab, 2020). A região Sudeste concentra a maior produção com mais de 60% do total, seguida pela região Sul, Nordeste, Centro-Oeste e Norte. O estado de Minas Gerais é o maior produtor e apresenta a maior área cultivada com a hortaliça no Brasil (Nick & Borém, 2016). As principais regiões produtoras estão distribuídas nas regiões de São Gotardo e Carandaí (MG), Marilândia do Sul (PR), Caxias do Sul (RS), Cristalina (GO) e microrregião de Irecê (BA). Quando somadas, essas regiões representam quase 16 mil ha e mais de 90% de toda a produção brasileira (IBGE, 2017; Cunha et al., 2021).

O município de São Gotardo possui grande relevância no cenário nacional da produção de cenoura se destacando entre todas as principais regiões produtoras, sendo responsável por aproximadamente 50% de todo o abastecimento. São Gotardo possui a maior área cultivada, com uma média em torno de 5500 ha, seguida pelo município de Cristalina, com 1100 ha e o município de Caxias do Sul, com 700 ha (HF Brasil, 2021). Em 2022, a região de São Gotardo conquistou a Indicação Geográfica (IG), na modalidade Indicação de Procedência, pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) para a produção de cenoura. O selo é importante para a valorização da cenoura produzida na região. Por outro lado, na microrregião de Irecê (BA) no semiárido brasileiro, que abrange os

municípios de Irecê, Lapão, América Dourada e João Dourado, aproximadamente 5 mil unidades familiares estão engajadas na produção contínua de cenouras ao longo do ano, abrangendo uma extensão de 6 mil hectares. Esse valor corresponde a cerca de 20% da produção nacional total de cenouras. Nessa região, caracterizada pela utilização de abordagens tecnológicas mais simples, a totalidade da área cultivada até o ano de 2008 era alocada exclusivamente para o cultivo da variedade de cenoura Brasília. A microrregião é a única que apresenta um sistema de produção divergente das demais. O clima semiárido, com altas temperaturas e longos períodos sem chuva (estiagem), faz com que os produtores utilizem sistemas de irrigação via microaspersão ou gotejamento e não o pivô central. Outras características incluem a utilização de cultivares de polinização aberta de baixa produtividade, uso pouco racional das sementes (8 kg/ha) e intermédio de terceiros durante a comercialização (Embrapa, 2021).

1.3 Classificação taxonômica e biologia da cenoura

A cenoura é uma espécie herbácea bienal pertencente à família Apiaceae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Apiales e gênero *Daucus* (Rubatzky et al., 1999). Existem várias subespécies e variedades de cenoura, que podem ser classificadas de acordo com suas características morfológicas e de cultivo. Algumas das subespécies mais comuns incluem a subespécie *sativus* (cenoura cultivada), a subespécie *maximus* (cenoura selvagem) e a subespécie *carota* (cenoura selvagem de origem europeia).

A raiz se desenvolve a partir dos hipocótilos e apresenta boa capacidade de armazenamento. O sistema radicular é do tipo pivotante, ou seja, uma raiz principal longa da qual se formam as raízes secundárias. Uma grande quantidade de carboidratos é armazenada na raiz tuberosa para permitir a floração da planta. A cor da raiz varia e inclui laranja, amarelo, roxo, vermelho e branco (Simon et al., 2008). A inflorescência típica da cenoura é uma umbela achatada em forma de guarda-chuva, podendo ser terminal ou primária, composta de flores brancas com 10-15 cm de diâmetro. A umbela é formada pela união de pequenas flores individuais com cinco pétalas e cinco anteras. Após o surgimento da umbela primária, as demais são denominadas umbelas secundárias, terciárias e quaternárias. Embora geralmente as flores sejam hermafroditas, a esterilidade masculina é uma característica importante para a produção de sementes híbridas. Além disso, a umbela é uma característica que distingue as cenouras de táxons relacionados. A

cor das flores da cenoura cultivada geralmente é branca e as folhas são compostas (Simon et al., 2008).

A maioria das cenouras cultivadas (*Daucus carota* subsp. *sativus*) é diploide ($2n = 2x = 18$), ou seja, possui dois conjuntos de cromossomos em suas células somáticas. O número básico de cromossomos é 9 (Iorizzo et al., 2011). A associação entre os grupos de ligação da cenoura com cromossomos paquítenos foi elucidada através de ensaios utilizando a tecnologia de hibridização fluorescente *in situ* ou FISH – *Fluorescence In Situ Hybridization* (Iovene et al., 2011). Os nove cromossomos de cenoura foram classificados em três grupos: os cromossomos 1, 6 e 8 com centrômeros subterminais; os cromossomos 2 e 4 com centrômeros terminais e, por fim, os cromossomos 3, 5, 7 e 9 com centrômeros quase medianos (Iovene et al., 2011). Os comprimentos dos cromossomos da cenoura variam de 2 a 4 μm com o cromossomo 1 sendo o mais longo (Iovene et al., 2011).

2. A cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum*)

2.1 Origem e histórico

Amplamente difundido, o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é originário dos Andes peruanos sendo domesticado na Mesoamérica, em uma região correspondente ao atual México, a partir do ancestral *S. lycopersicum* L. var. *cerasiforme* (SLC) (Blanca et al., 2012, 2015; Razifard et al., 2020). Posteriormente, a hortaliça foi levada para a Europa. O botânico italiano Mattioli descreveu variedades com tipos de frutos achatados, redondos e segmentados em 1544 (McCue, 1952). Isso indicava que frutos de tomate de várias formas provavelmente chegaram à Europa vindos da América (Sahagún, 1577; Sanfunentes Echevarría, 2006).

No início, o tomate não foi imediatamente adotado para consumo pelos europeus, pois foi considerado em diferentes épocas e regiões como uma planta ornamental, tendo frutos venenosos. Posteriormente, o tomate se tornou um valioso ingrediente para molhos e sopas, uma cura milagrosa e, finalmente, um ingrediente fresco para saladas (Harvey et al., 2003). No século XIX o tomate se tornou um componente regular da dieta na Grã-Bretanha e na América do Norte (Harvey et al., 2003). Em contraste, o tomate foi bem recebido, extensivamente cultivado e consumido como alimento no século XVIII no sul da Europa, que, portanto, poderia ter se tornado um centro secundário de diversidade (Boswell, 1937; Bauchet & Causse, 2012).

Como resultado desta longa tradição de uso, ocorre um grande número de variedades tradicionais de tomate ao longo da bacia do Mediterrâneo, mostrando uma diversidade fenotípica impressionante em termos de aparência do fruto, adaptação às condições locais e uso culinário. Apesar do interesse em desvendar a história da população e dos processos que deram origem à domesticação do tomate (Blanca et al., 2015; Razifard et al., 2020), ainda não existem análises genéticas detalhadas da história da diversificação das variedades tradicionais de tomate.

2.4 Importância socioeconômica do tomateiro

O tomateiro é considerado uma das hortaliças de maior importância econômica no mundo, sendo amplamente cultivado em diferentes condições: em campos, estufas e jardins (Berni et al., 2018). A produção mundial de tomate é estimada em 4,0 milhões de toneladas métricas, com um crescimento de 2,0% em relação ao último levantamento, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). No Brasil, a área plantada é de 56.874 hectares, sendo que a maioria dos produtores nacionais pertencem aos estados de Goiás e São Paulo, que representam 28,9% e 25,6% da produção nacional, respectivamente. As médias de produção estimadas são de 92.394 kg/ha em Goiás e 78.344 kg/ha em São Paulo (IBGE, 2021).

O tomateiro é cultivado em todo o mundo devido às suas diversas utilizações na alimentação, tempero e uso industrial (Lu et al., 2020). Considerado uma cultura cosmopolita pela possibilidade de cultivo em diferentes regiões, o tomate figura como o segundo produto olerícola mais cultivado no mundo (Conab, 2019) e como cultura processada ocupa o primeiro lugar entre as hortaliças (Kessel, 2003). É consumido *in natura* e/ou utilizado para fazer pastéis, purês, ketchup e sucos de frutas (Ogwulumba & Ogwulumba, 2018).

O tomate é considerado um alimento promotor da manutenção da saúde humana (Shah et al., 2015; Kelebek et al., 2017) devido ao seu alto valor nutricional, a presença de compostos bioativos e funcionais e propriedades antioxidantes naturais (presença de vitamina C), compostos fenólicos e compostos carotenoides. O principal carotenoide presente no fruto do tomateiro é o licopeno, que é responsável pela cor vermelha dos frutos de tomate e seus derivados (Martínez-Valverde et al., 2002; Eyiler & Oztan, 2011).

2.3 Classificação taxonômica e biologia

O tomateiro pertence ao gênero *Solanum*, aos subgêneros *Eulycopersicum* e *Eriopersicon*, à classe Dicotiledôneas, à ordem Turbiflorae e à família Solanaceae. Essa família inclui batata, berinjela, pimentão e pimenta e o tomateiro (*Solanum lycopersicum*, Nuez, 1995).

O tomateiro é uma cultura semi-perene; todavia é cultivado como cultura anual. As plantas apresentam caráter herbáceo-arbustivo, com caule flexível, ramificação lateral abundante e pelos em sua arquitetura natural, que podem ser alterados ou modificados por meio de poda e sistemas de cultivo, geralmente sistemas de cultivo no solo para a indústria e sistemas de condução para consumo *in natura* (Filgueira, 2013). As plantas apresentam diferentes formas de desenvolvimento (rasteiras, semi-eretas e eretas) e dois hábitos de crescimento (determinado, semi-determinado e indeterminado). O hábito de crescimento determinado é representado por cultivares que apresentam ausência de dominância apical e ramos ou flores solitárias na extremidade do caule; enquanto as plantas com hábito indeterminado são representadas pela maioria das cultivares de tomate de mesa (consumo *in natura*), com dominância apical e emissão de ramos florais a cada três folhas emitidas (Alvarenga, 2013; Filgueira, 2013).

A cultura do tomateiro é adaptada a diferentes condições climáticas, incluindo climas tropicais quentes e úmidos, o que requer uma temporada de crescimento longa, pois a velocidade de crescimento está relacionada à temperatura do ar e à idade da planta (Selina & Bledsoe, 2002). A temperatura ideal do ar para a maioria das variedades de tomate é de 21 a 24 °C, com tolerância para uma amplitude de 10 a 38 °C. Temperaturas do ar abaixo de 10 °C causam diminuição na taxa de crescimento, polinização deficiente, paralisia na absorção de água e nutrientes. Em contrapartida, temperaturas acima de 38 °C podem causar aborto de flores, redução na percentagem de germinação, morte prematura das mudas, aborto de frutos, podridão tardia nos frutos, danos nos tecidos e problemas com escaldão nos frutos (Marouelli & Silva, 2000).

3. Os nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.)

Os nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) são conhecidos pelos danos provocados nos sistemas radiculares de diferentes culturas (Carneiro et al., 2006). As espécies de *Meloidogyne* estão entre os patógenos de plantas mais prejudiciais em todo o mundo e estão presentes em todas as regiões temperadas e tropicais (Trudgill & Blok, 2001). São endoparasitas sedentários obrigatórios, com elevado grau de polifagia e ampla gama de

hospedeiras, parasitando as principais culturas de importância econômica do mundo (Jones et al., 2013). O gênero *Meloidogyne* pertence ao Reino Animalia, Filo Nematoda, Classe Chromadorea, Ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Infraordem Tylenchomorpha, superfamília Tylenchoidea e família Meloidogynidae (De Ley & Blaxter, 2002; Karssen & Moens, 2006). O primeiro registro do gênero no Brasil ocorreu em 1887, em um cafezal no Rio de Janeiro, descrito por Goeldi, ao descrever a espécie *M. exigua*. Atualmente, já foram descritas 98 espécies de *Meloidogyne* no mundo (Subbotin et al., 2021), podendo parasitar mais de 5000 espécies de plantas (Santos, 2011). Dessas, mais de 21 espécies estão presentes no Brasil (Carneiro et al., 2016; Carneiro & Santos, 2022). A gama de hospedeiras dos nematoides-das-galhas é tão extensa que é difícil encontrar culturas que não sejam hospedeiras dependendo da espécie de *Meloidogyne* (Olsen, 2000).

Dentro do gênero *Meloidogyne*, merecem destaque as espécies *M. incognita*, *M. javanica*, *M. hapla* e *M. arenaria* que são as mais amplamente encontradas em lavouras de tomate em escala global (Jones et al., 2013). As espécies *M. incognita* e *M. javanica* são as mais comuns nas proximidades da linha do equador, sendo abundantemente encontradas em solos leves em regiões tropicais quentes da Ásia, África, América do Sul, Austrália, Estados Unidos e estufas na Europa. A espécie *M. javanica* tem mostrado alta capacidade de sobrevivência em áreas mais secas ao redor do mundo (com menos de 500 mm de precipitação anual) (Olowe, 2006; Oka, 2019). Por outro lado, em regiões com invernos mais curtos (0 a 15 °C), *M. hapla* é mais predominante no norte da Europa, norte da Ásia, América do Norte (Estados Unidos, sul do Canadá) e parte da América do Sul (Trudgill & Blok, 2001)

Dependendo da espécie de NGs envolvida, época do ano, espécie hospedeira e das práticas culturais adotadas, a perda de rendimento pode ser total (Jablonska et al., 2007; Seid et al., 2015). Os nematoides-das-galhas desenvolveram um mecanismo de parasitismo particularmente sofisticado, no qual podem transformar células hospedeiras específicas em células alimentadoras especializadas, alterando a expressão de um subconjunto de genes-alvo. Os nematoides fitoparasitas possuem uma espécie de lança ou estilete oca e prostrátil para penetrar a parede celular das células vegetais. Eles penetram nas raízes e induzem um sítio de alimentação, convertendo as células ao redor do estilete em células gigantes (Palomares-Rius et al., 2017). Esse processo infeccioso leva à

formação de galhas nas raízes, o que impede que a planta absorva água e nutrientes (Ralmi et al., 2016). Além dos danos diretos, a infecção pelo nematoide também atua como ponto de entrada para infecções secundárias por vários patógenos presentes no solo. Como exemplo, a invasão primária de espécies de *Meloidogyne* leva ao aumento da multiplicação e colonização de espécies/raças de *Ralstonia* e *Fusarium* em tomate (Singh & Siddiqui, 2012; Kassie et al., 2019).

3.1 Principais espécies de *Meloidogyne* parasitas da cenoura

Em hortaliças, os nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) se constitui no grupo mais importante devido à ocorrência na maioria das espécies cultivadas (Pimenta & Carneiro, 2005). Em muitas regiões produtoras de cenoura, os nematoides-das-galhas são as principais patógenos que limitam a produção de cenoura (Roberts, 1987). As perdas causadas por nematoides variam de 20% até 100%, dependendo da densidade populacional, da suscetibilidade da cultivar, da espécie de nematoide, do tipo de solo e das condições ambientais (temperatura e umidade relativa) (Viljoen et al., 2019). Os danos vão além do descarte de produtos que não são adequados para comercialização, como o abandono da área de produção (Pinheiro, 2017).

Em regiões produtoras mais frias, a espécie *M. hapla* é a mais prevalente, ao passo que em áreas de produção mais quentes, *M. javanica* e *M. incognita* são as espécies de NGs predominantes na cultura da cenoura (Parsons et al., 2015). No Brasil, *M. incognita*, *M. javanica* e *M. hapla* são as principais espécies de NGs que causam perdas na produção de cenoura (Cunha et al., 2021). Outras espécies de nematoides como *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941., *Helicotylenchus dihystera* (Cobb, 1893) Sher, 1961., *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, 1940, *Scutellonema* spp., espécies de *Tylenchorhynchus* e *Mesocriconema* também têm sido detectadas infectando a cultura da cenoura, porém sem relatos de danos significativos.

3.2 Principais espécies de *Meloidogyne* parasitas do tomateiro

O tomateiro é a hortaliça mais importante do mundo, mas é frequentemente atacado por *Meloidogyne* spp., limitando a quantidade e a qualidade da produção de frutos (Mukhtar et al., 2017). As principais espécies que afetam a cultura do tomateiro são: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. enterolobii* e *M. hapla*. Essas espécies têm uma ampla distribuição geográfica devido à duração do ciclo de vida mais rápida e adaptabilidade a diversas condições climáticas (Jones et al., 2013) apresentando perdas

variando de 25–100 % (Jablonska et al., 2007; Seid et al., 2015), com especial destaque para a espécie *M. enterolobii* devido a sua recente expansão geográfica e pela capacidade de “quebrar” a resistência conferida pelo gene *Mi-1.2* (Tigano et al., 2010). Todavia, fontes alternativas de resistência no tomateiro a *M. enterolobii* ainda não estão disponíveis.

No Brasil, o nematoide *M. enterolobii* foi inicialmente relatado em pomares de goiabeiras no início da década de 2000 (Carneiro et al., 2001). Desde então, esse NG vem causando grandes prejuízos em ampla gama de hospedeiros (Carneiro et al., 2001; Castro, 2019). De modo geral, esse nematoide se manifesta de forma agressiva nas plantas hospedeiras, apresentando alta densidade populacional e causando grande número de grandes galhas, diferentemente do observado para outras espécies do gênero. Os nematoides-das-galhas limitam a quantidade e a qualidade da produção de frutos, comprometendo a lavoura e causando prejuízos econômicos aos produtores (Mukhtar et al., 2017; Tariq-Khan et al., 2017). Estima-se que as perdas de produção de tomate devido a esses organismos sejam de 61,0% (Karssen et al., 2013).

3.3 Ciclo de vida e comportamento das espécies de *Meloidogyne*

O ciclo de vida das espécies de *Meloidogyne* (Fig. 1.1) é constituído de seis fases: o ovo, juvenil de primeiro (J1), segundo (J2), terceiro (J3) e quarto (J4) estádios e a forma adulta (fêmea ou macho). No interior do ovo, após a embriogênese, ocorre a formação do juvenil de primeiro estádio (J1), que passa por uma ecdise e se transforma em juvenil de segundo estádio (J2), que corresponde ao estádio móvel e infeccioso. Segundo Tihohod (2000), a eclosão do juvenil é influenciada por condições ambientais favoráveis à sobrevivência do nematoide, tais como: umidade, aeração do solo, pH e produtos químicos. Após a eclosão, os J2 migram através do solo em busca de alimento; nesse percurso, são atraídos por exsudatos radiculares, adentrando nas raízes das plantas. Após a penetração, os J2 movem-se entre as células do córtex até alcançar o cilindro vascular (Taylor & Sasser 1983, Abad et al., 2009; Carneiro et al., 2021).

No início da alimentação, o J2 injeta secreções produzidas pelas glândulas esofagianas que induzem a formação de células gigantes multinucleadas, constituindo-se o sítio de alimentação onde os nematoides podem tornar-se sedentários (Huang & Maggenti, 1969). Quando em condições favoráveis, sucedem-se mais três ecdises até atingir a fase adulta, completando o ciclo em torno de 21 a 45 dias. No início da alimentação do nematoide,

ocorre um desequilíbrio hormonal que leva à multiplicação de células parenquimáticas do córtex e cilindro vascular (hiperplasia), resultando em engrossamento das raízes, conhecido como galha (Moens et al., 2009; Pinheiro et al., 2014a).

Gradualmente, os juvenis assumem formato salsichoide e se dá início à segunda (J2 para J3), a terceira (J3 para J4) e a quarta ecdises (J4 para adultos) podendo ser fêmea ou macho. Nesta última, os adultos exibem dimorfismo sexual clássico. Os machos são filiformes, longos e possuem mobilidade, enquanto as fêmeas assumem um formato periforme. Após a quarta ecdise, as fêmeas começam a se alimentar até o fim do parasitismo. Ao contrário, os machos deixam a raiz, migram para o solo e não se alimentam (Karssen & Moens, 2006). Esse dimorfismo sexual é influenciado por condições ambientais e disponibilidade de alimento (Ferraz & Monteiro, 2011).

Devido à hipersensibilidade às condições ambientais, *Meloidogyne* spp. é considerado um organismo poiquilotérmico (Sharma & Kaushik, 2021). O desenvolvimento dos nematoides-das-galhas ocorre apenas quando a temperatura está acima de uma temperatura base específica (aproximadamente 8-13 °C, dependendo da espécie), e com o aumento da temperatura, a taxa de desenvolvimento também aumenta. Como o ciclo de vida depende tanto da temperatura quanto do tempo, o comprimento do ciclo de vida é calculado com base no conceito de tempo térmico de graus-dias. Por exemplo, *M. incognita*, para completar seu ciclo de vida, requer de 300 a 700 graus-dia acumulados com uma temperatura base de 10-13 °C (Giné, 2016; Giné et al., 2021). Os nematoides tropicais são mais ativos para a infecção em uma faixa de temperatura de 24 a 32 °C, enquanto outros nematoides-das-galhas podem permanecer ativos em uma faixa de temperatura entre 10-32 °C (Dávila-Negrón & Dickson, 2013). A temperatura ideal para a sobrevivência do ovo, assim como do juvenil, é de 5 a 10 °C (Wang & McSorley, 2008). Diversos artigos publicados desde 2016 mostram que as proteínas efetoras, como a miPFN3 (*M. incognita*), MjTTL5 (*M. javanica*) e MeTCTP (*M. enterolobii*), estão envolvidas na modulação das vias de desenvolvimento do hospedeiro para induzir e manter os sítios de alimentação do nematoide (Truong et al., 2015; Nguyen et al., 2018; Vieira & Gleason, 2019).

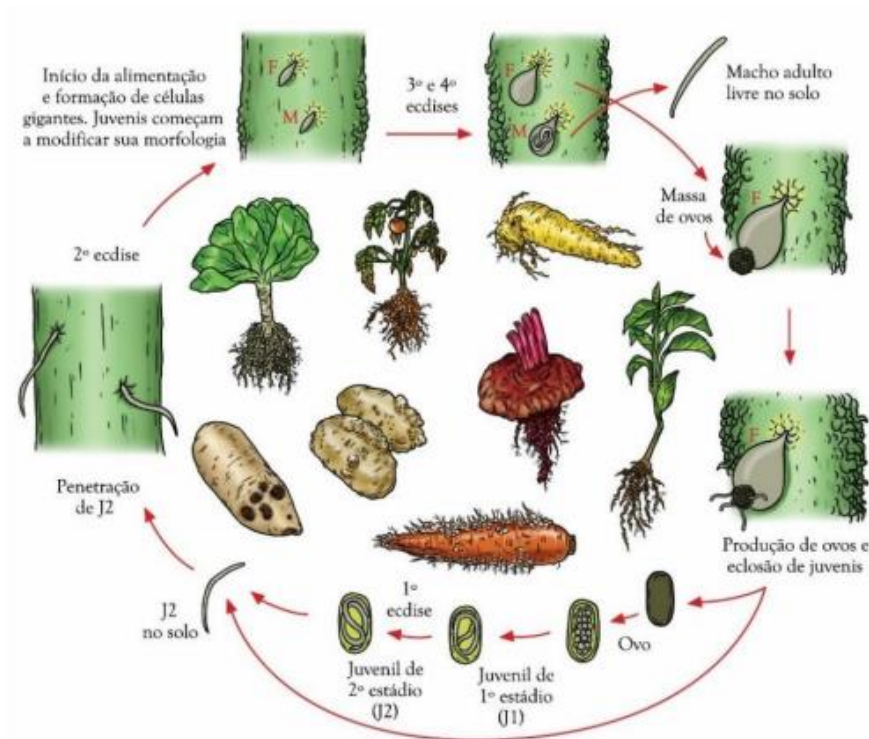


Figura 1.1 Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. (nematóide-das-galhas) em hortaliças. Ilustração: Vanessa Reyes

3.4 Sintomas causados pelos nematoides-das-galhas

Os principais sintomas das meloidoigynoses são clássicos e divididos em dois grupos: sintomas diretos e sintomas reflexos. Os sintomas diretos compreendem a formação de galhas (engrossamento das raízes) e diminuição do sistema radicular, tanto na raiz principal quanto nas secundárias. Esses sintomas são considerados típicos e de fácil visualização no campo pelo produtor ou especialista. As plantas severamente afetadas por *Meloidogyne* spp. apresentam o sistema radicular altamente desorganizado e com baixo volume radicular, o que compromete a absorção de água e nutrientes pela planta, implicando em sintomas muito parecidos com deficiência nutricional (amarelecimento das folhas e clorose), denominados como sintomas reflexos (Vale et al., 2013). Quando tubérculos e rizomas são atacados, o nematóide causa a destruição, diminuição e a atrofia do órgão de interesse, implicando na perda do padrão exigido para a comercialização (Pinheiro, 2017).

Na cenoura, os danos causados pelas populações de nematoides da espécie *M. javanica* resultam da hiperplasia e hipertrofia celular do sistema radicular, reduzindo a produtividade e comprometendo a classificação comercial do produto no mercado (Huang

& Porto, 1988; Chachar et al., 2000). Os sintomas são a formação de galhas nas raízes secundárias, também denominadas de "pipocas" quando na raiz principal, além de alterações no comprimento e no diâmetro da raiz principal. Também ocorrem bifurcações na cenoura, conhecidas como "gancho", por alguns produtores, porém esse sintoma nem sempre está associado ao nematoide e pode ser causado pela compactação do solo ou condições hídricas inadequadas. Entretanto, a presença de galhas nas raízes é um indicativo de que o nematoide-das-galhas é o causador da doença (Pinheiro, 2017).

Em contrapartida, os sintomas reflexos são observados na parte aérea da planta: crescimento lento, nanismo, amarelecimento das folhas e murcha. Nos casos mais graves, ocorre a morte prematura da planta. Devido à baixa motilidade do nematoide no solo, esses sintomas geralmente aparecem em reboleiras (Machaca-Calsin et al., 2019). Em cultivos de cenoura, o principal sintoma em plantas infectadas na fase inicial (25 a 35 dias após a semeadura) é o amarelecimento foliar em consequência da localização de galhas no prolongamento da raiz principal, que obstruem a absorção de água e de nutrientes do solo, principalmente o nitrogênio. Além disso, o parasitismo aumenta a suscetibilidade da planta a outros patógenos de solo (Zhou et al. 2016).

4 Identificação de espécies de *Meloidogyne*

Em razão da importância econômica dos nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) a identificação acurada das espécies é essencial para a elaboração de estratégias de manejo eficientes e atividades de pesquisa. As 98 espécies de *Meloidogyne* podem ser caracterizadas através de três métodos: método morfológico (configuração da região perineal das fêmeas, morfologia e morfometria da região anterior e do estilete de machos, fêmeas e J2s), método bioquímico (fenótipos de isoenzima para distinguir as espécies de *Meloidogyne*) e método molecular (PCR-SCAR).

A diagnose baseada apenas nas características morfológicas do nematoide predominou por muito tempo, com destaque para a observação do padrão perineal das fêmeas (Seessao et al., 2017). Posteriormente, a técnica de eletroforese de isoenzimas passou a ser adotada em procedimentos de rotina, sendo ainda muito utilizada nos dias atuais. Na última década, vários protocolos de diagnóstico por meio de técnicas moleculares baseadas em DNA foram desenvolvidos. Segundo Carneiro et al., (2016), o método bioquímico e molecular são os mais recomendados para uma identificação rápida e precisa.

A eletroforese de isoenzimas destaca-se como a principal técnica bioquímica utilizada para diagnosticar *Meloidogyne* spp. (Esbenshade & Triantaphyllou, 1990; Carneiro et al., 2000; Carneiro & Almeida, 2001). Essa técnica é fundamentada na diferença de mobilidade das enzimas extraídas de fêmeas adultas, conhecida como polimorfismo das esterases de fêmeas. Ela desempenhou um papel crucial na identificação correta da espécie *Meloidogyne paranaenses*; Carneiro, Carneiro, Abrantes, Santos & Almeida, 1996 previamente erroneamente classificada como *M. incognita* por mais de 10 anos (Carneiro et al., 1996b). A eletroforese de isoenzimas é eficiente na distinção entre diferentes espécies de nematoides, além de requerer pouco tempo, tornando-se o método mais amplamente adotado por pesquisadores e profissionais em suas rotinas de trabalho.

A utilização de técnicas moleculares na identificação de nematoides é fundamentada na dissimilaridade genética entre táxons, refletida através de variações em regiões do DNA genômico. Ao contrário da técnica de eletroforese de isoenzimas, que restringe a fêmeas adultas, as técnicas moleculares permitem a detecção do nematoide em todas as fases do ciclo de vida (ovos, juvenis ou adultos). Essa abordagem utiliza o DNA para analisar diversos genes simultaneamente, até mesmo quando diferentes espécies de nematoides estão misturadas em uma única amostra. Além disso, as técnicas moleculares são consideradas rápidas e relativamente de baixo custo. Atualmente, existem duas estratégias empregadas nessas técnicas: a) seleção de marcadores do tipo SCAR; e b) amplificação de um fragmento gene-específico através do uso de primers específicos (Zilstra et al., 2000; Randig et al., 2002).

5 Manejo dos nematoides-das-galhas

Devido à enorme variedade de hospedeiros, os nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) são patógenos de difícil manejo (Kumari et al., 2016). Consequentemente, o controle das meloidoginoses representa grande desafio para os produtores. Neste contexto, o ideal é evitar a entrada do patógeno na área. Para isso, medidas preventivas são essenciais, como usar mudas certificadas e sadias, higienizar equipamentos e ferramentas oriundos de áreas com nematoides e controlar o trânsito de pessoas.

Dentre as diversas técnicas no manejo integrado de fitonematoides, podemos destacar a solarização do solo, controle biológico, inundação do solo, uso de plantas antagonistas, nematicida químicos, rotação com culturas não hospedeiras e resistência genética

(Wiratno et al., 2009). O controle biológico, a rotação de culturas, as práticas culturais e a resistência das plantas são atualmente as principais áreas de pesquisa para os cientistas que buscam enfrentar esse desafiador problema (Sikandar et al., 2020b).

O emprego de indutores de resistência tem demonstrado resultados promissores. No estudo conduzido por Silva et al. (2021), observou-se que a aplicação de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn resultou em um aumento significativo na massa fresca das raízes de tomate em comparação com os tratamentos alternativos. Além disso, constatou-se uma diminuição na penetração do J2 nas raízes das plantas submetidas a diferentes indutores de resistência. A densidade populacional de *M. enterolobii* apresentou uma redução significativa somente nos casos em que as plantas foram tratadas com *R. sachalinensis Reynoutria sachalinensis* (F.Schmidt) Nakai destacando-o como um possível agente potencial de indução de resistência em plantas de tomate.

O uso intensivo de nematicidas químicos por décadas para manejar os fitonematoides resultou em problemas ambientais e de saúde, bem como resistência a nematicidas (Molinari, 2011; Abd-Elgawad, 2020). Desde a proibição do fumigante metilamina, vários novos compostos com baixos efeitos tóxicos e de natureza não-fumigante, como fuensulfona, fuopyram e fuzaindolizina, estão em uso para o manejo de nematoides (Morris et al., 2016; Oka, 2020). No entanto, o uso de nematicidas químicos tem um efeito prejudicial na saúde do solo, e resíduos de pesticidas na produção levam à poluição ambiental (Gad, 2014). Todavia, caso a área apresente altíssima infestação pelo nematoide-das-galhas, pode ser necessário a utilização de agrotóxicos visando a diminuição da população do nematoide em um curto prazo de tempo. Embora existam boas práticas de manejo disponíveis, a resistência genética oferece uma estratégia ecologicamente correta e economicamente viável para controlar esses patógenos (Devran et al., 2013). A utilização de cultivares com maior nível de resistência genética, como por exemplo as cenouras derivadas de “Brasília”, em conjunto com as práticas citadas, tem apresentado grande importância no manejo dos nematoides-das-galhas na cultura da cenoura.

Fontes de resistência a espécies de *Meloidogyne* foram identificadas em Acessos de cenoura, em trabalhos pioneiros coordenados pela Embrapa Hortaliças desde 1982, sendo uma das principais fontes de resistência as cultivares Brasília e Tropical (Charchar & Vieira, 1990; Charchar & Vieira 1991; Pinheiro, 2017). A cultivar ‘Brasília’ é a principal

fonte de resistência às espécies de *Meloidogyne*. Entre as fontes de resistência, ‘Brasília’ é a fonte de resistência mais promissora a *M. javanica* (Simon et al., 1997; Vieira et al., 2003).

6 Resistência genética para manejo/controlado dos nematoides-das-galhas

Um dos métodos mais eficientes e econômicos de reduzir perdas causadas por nematoides é a resistência genética (Roberts, 2002). A resistência consiste nos efeitos dos genes do hospedeiro que restringem ou impedem a multiplicação de nematoides numa espécie hospedeira (Trudgill, 1991). Ela pode ser classificada em resistência vertical (mediada por um único gene) e resistência horizontal (mediada por mais de um gene). A primeira, por ser conferida por um único gene, é mais fácil de ser suplantada pelo nematoide, enquanto a segunda é mais durável no campo (Pascholati, 2011). Ainda vale salientar que a resistência vertical está geralmente associada à possibilidade de quebra pelo surgimento de novas raças.

O plantio de variedades geneticamente resistentes, quando disponíveis, tem sido a melhor forma de manejo; porém, essa estratégia é dependente da identificação de fontes de resistência e do mapeamento de genes que controlam essa característica em um número mais amplo de plantas hospedeiras (Fragoso et al., 2007). Vários projetos de pesquisa estão sendo conduzidos em todo o mundo para melhorar a resistência das plantas aos nematoides-das-galhas (Padilla-Hurtado et al., 2022). Segundo Trudgill (1991), as plantas geralmente respondem à invasão dos nematoides com a ativação de uma série de mecanismos de defesa, tais como a liberação de compostos tóxicos, reação de hipersensibilidade, aumento das proteínas ricas em hidroxiprolina, aumento de superóxidos, fitoalexinas e compostos fenólicos, entre outros mecanismos. De fato, os genes de resistência eficazes aos nematoides-das-galhas devem apresentar amplo espectro (ou seja, reconhecer classes amplas de elicitores diferentes) ou ter coevoluído com outro agente patogênico.

6.1. Resistência as espécies de *Meloidogyne* em cenoura

Fontes de resistência de cenoura a espécies de *Meloidogyne* foram identificadas em Acessos de cenoura, em estudos pioneiros coordenados pela Embrapa Hortaliças desde 1982, sendo uma das principais fontes de resistência as cultivares ‘Brasília’ e ‘Tropical’ (Charchar & Vieira, 1990; Charchar & Vieira, 1991; Pinheiro, 2017). De fato, a cultivar ‘Brasília’ revelou-se como uma notável fonte de resistência frente às espécies do

nematoide-das-galhas em diferentes regiões produtoras no mundo (Simon et al., 1997; 2000). Essas descobertas adquirem relevância fundamental para o desenvolvimento de estratégias de manejo integrado de NGs em cultivos de cenoura, permitindo a implementação de abordagens agronômicas sustentáveis e eficazes na mitigação dos impactos econômicos negativos causados por essa enfermidade. Através da combinação de estratégias de genética clássica e marcadores moleculares, foi localizada a região genômica contendo o locus *Mj-1* que confere elevados níveis de resistência a *M. javanica* na cultivar ‘Brasília’ (Simon et al., 2000; Boiteux et al., 2004). O gene *Mj-1* está localizado no cromossomo 8 (Simon et al., 2019) e também confere resistência parcial as populações de *M. incognita*. Em 2013, outro locus de resistência a *M. javanica* foi mapeado na cultivar ‘PI 652188’ e denominado *Mj-2*. O *Mj-2* também está no cromossomo 8, mas se localiza em uma região distinta do *Mj-1* (Aamir Ali et al., 2013; Simon et al., 2019). A descoberta dos genes *Mj-1* e do *Mj-2* é significativa para o melhoramento genético da resistência aos nematoides-das-galhas em cenoura (Simon et al., 2019).

6.2. Resistência as espécies de *Meloidogyne* no tomateiro

A resistência no tomateiro foi obtida através da introgressão de um único gene dominante (denominado de *Mi-1.2*) a partir do parente selvagem do tomateiro *Solanum peruvianum* (posteriormente classificado como *Lycopersicon peruvianum* (L.) Mill.) (Bailey 1941; Gilbert & McGuire 1956; Gabriel et al., 2020). A região genômica no cromossomo 6 onde o gene *Mi-1* está localizado contém um agrupamento de diferentes genes (denominados de *Mi-1.1* até *Mi-1.7*) que apresentam elevados níveis de similaridade estrutural entre si. No entanto, estudos adicionais demonstraram que apenas o gene *Mi-1.2* é capaz de codificar um gene de resistência funcional aos NGs (Milligan et al. 1998; Seah et al. 2007). Esta fonte de resistência se mostrou eficaz as três espécies mais importantes de NGs: *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. incognita* (Roberts 1992; Williamson 1998). Mais recentemente, uma cultivar de tomateiro contendo o gene *Mi-1.2* se mostrou resistente a populações de 13 diferentes espécies de *Meloidogyne* (Gabriel et al., 2020), mas se mostrou suscetível quando submetida as populações de *M. hapla* e *M. enterolobii* e também contra populações virulentas de *M. javanica* coletadas no Sul do Brasil (Gabriel et al., 2022). Como mencionado, os genes de resistência tais como o *Mi-1.2* podem reconhecer amplas classes de elicitores ou é capaz de reconhecer um fator de avirulência conservado durante o processo de especiação, visto que ele condiciona uma resposta de

resistência a uma gama de 13 espécies de *Meloidogyne* (Gabriel et al., 2020). O gene foi clonado e também demonstrou conferir resistência ao pulgão da batata *Macrosiphum euphorbiae* (Williamson, 1999) e possivelmente à mosca branca *Bemisia tabaci* (Nombela et al., 2000).

Desta forma, do ponto de vista do agricultor, a resistência genética é a medida de controle mais atraente, uma vez que não requer nenhuma atividade extra durante o ciclo da cultura, sendo compatível com outras medidas de manejo. O conhecimento dos recursos genéticos disponíveis com resistência aos NGs dentro do germoplasma das espécies hospedeiras cultivadas bem como de suas espécies selvagens relacionadas. Estudos envolvendo a elucidação dos mecanismos de ação gênica, o desenvolvimento e aplicação de marcadores moleculares associados aos fatores de resistência também são cruciais dentro dos modernos programas de melhoramento genético da cenoura e do tomateiro visando o desenvolvimento (em maior escala) de cultivares resistentes nestas duas relevantes hortaliças. Dentro deste cenário, se justifica ações de pesquisa tendo como finalidade de estudar diferentes aspectos das interações de cenoura e tomateiro com espécies de *Meloidogyne*. A presente Dissertação visa contribuir em alguns aspectos relacionados com o manejo genético destes patógenos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; ROSSO, M.N.; ENGLER, J.A.; FAVERY, B. (2009) Invasion, feeding and development. In: PERRY RN; MOENS M; STARR JL (Eds) Root-knot nematodes, CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK, pp.163–181.
- ABD-ELGAWAD, M.M.M. (2014) Yield losses by phytonematodes: Challenges and opportunities with special reference to Egypt. *Egyptian Journal of Agronomy* 13:75–94.
- ABD-ELGAWAD, M.M.M. (2020) Optimizing biological control agents for controlling nematodes of tomato in Egypt. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 30:58.
- ABDELLATIF, K.F.; ABDELFATTAH, R.H.; EL-ANSARY, M.S.M. (2016) Green nanoparticles engineering on root-knot nematode infecting eggplants and their effect on plant DNA modification. *Iranian Journal of Biotechnology* 14: 250.
- ALI, A.; MATTHEWS, W.C.; CAVAGNARO, P.F.; IORIZZO, M.; ROBERTS, P.A.; SIMON, P.W. (2013) Inheritance and mapping of *Mj-2*, a new source of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) resistance in carrot. *Journal of Heredity*, 105(2):288–291.
- ALVARENGA, M.A.R. (2013) Tomate: Produção em campo, em casa de vegetação e hidroponia. Lavras: UFL, pp. 455.
- ARSCOTT, S.A.; TANUMIHARDJO, S.A. (2010) Carrots of many colors provide basic nutrition and bioavailable phytochemicals acting as a functional food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9: 223-239.
- BAILEY, D.M. (1941) The seedling method for root-knot nematode resistance. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 38:573-575.
- BANGA, O. (1957) Origin of the European cultivated carrot. *Euphytica* 6:54-63.
- BANGA, O. (1963) Main Types of the Western Carotene Carrot and Their Origin. W.E.J. Tjeenk, Willink, Zwolle, Cornell University, Ithaca, New York, USA, pp. 153.
- BARANSKI, R.; ALLENDER, C.; KLIMEK-CHODACKA, M. (2012) Towards better tasting and more nutritious carrots: carotenoid and sugar content variation in carrot genetic resources. *Food Research International* 47:182–187.
- BAUCHET, G.; CAUSSE, M. (2012) Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. In: Çalişkan M, (Ed). Genetic diversity in plants. London: IntechOpen.
- BERNI, R.; ROMI, M.; PARROTTA, L.; CAI, G.; CANTINI, C. (2018) Ancient tomato (*Solanum lycopersicum*) varieties of Tuscany have high contents of bioactive compounds. *Horticulturae* 4: 1-14.

- BLANCA, J.; CAÑIZARES, J.; CORDERO, L.; PASCUAL, L.; DIEZ, M.J.; NUEZ, F. (2012) Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS One* 7, e48198.
- BOITEUX, L.S.; BELTER, G.J.; ROBERTS, A.P.; SIMON, W.P. (2000) RAPD Linkage map of the genomic region encompassing the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) resistance locus in carrot. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 439-446.
- BOITEUX, L.S.; HYMAN, J.R.; BACH, I.C.; FONSECA, M.E.N.; MATTHEWS, W.C.; ROBERTS, P.A.; SIMON, P.W. (2004) Employment of flanking codominant STS markers to estimate allelic substitution effects of a nematode resistance locus in carrot. *Euphytica* 136: 37-44.
- BOSWELL, V.R. (1937) Improvement and genetics of tomatoes, peppers, and eggplant. In: *Yearbook of the United States Department of Agriculture*. Washington, DC: United States Government Printing Office, pp. 176–206.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & SANTOS, M.F.A. (2022) Integrated management of nematodes in coffee. In: R. Muschler (Ed.) *Climate-smart production of coffee: improving social and environmental sustainability*. Cambridge, UK: Burleigh Dodds Science Publishing, pp. 343–378.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; SANTOS, M.F.A.; CASTRO, J.M.C. (2021) Nematodes. *Guava: botany, production and uses*. CAB International, London, pp. 270-284.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; MONTEIRO, J.M.S; SILVA, U.C.; GOMES, G. (2016) Gênero *Meloidogyne*: diagnose através de eletroforese de isoenzimas e marcadores SCAR. In: OLIVEIRA, C.M.G.; SANTOS, M.A.; CASTRO, L.H.S. (Eds) *Diagnose de fitonematoides*, Millennium Editora, Campinas, SP, cap.3, pp.47-64.
- CARNEIRO, R.G.; MORITZ, M.P.; MONACO, A.P.A.; LIMA, A.C.C.; SANTIAGO, D.C. (2006) Reação de cultivares de mandioca às raças 1 e 3 de *Meloidogyne incognita*, a *M. paranaensis* e a *M. javanica*. *Nematologia Brasileira* 30:275-279.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; BRAGA, R.S.; ALMEIDA, C.A.DE; GIORIA, R. (2016) Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* parasitando plantas de tomate e pimentão resistentes à meloidoginose no estado de São Paulo. *Nematologia Brasileira*, Brasília, v.30, n.1, pp.81-86.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. (2001) Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira* 25(1):35-44.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; MOREIRA, W.A.; ALMEIDA, M.R.A.; GOMES, A.C.M.M. (2001) Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Brasil. *Nematologia Brasileira* 25(2):223-228.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; QUÉNÉHERVÉ, P. (2000) Enzyme phenotype of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology* 2:645-654.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; CARNEIRO, R.G. (1996b) Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. *Fundamental and Applied Nematology* 19:555-560.

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

CASTEEL, C.L.; WALLING, L.L.; AND PAINE, T.D. (2006) Behavior and biology of the tomato psyllid, *Bactericerca cockerelli*, in response to the *Mi-1.2* gene. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 121:67-72.

CASTRO, J.M.C. (2019) *Meloidogyne enterolobii* e sua evolução nos cultivos brasileiros. *Nematoides fitoparasitas. Informe Agropecuário* 40:41-48.

CHARCHAR, J.M.; VIEIRA, J.V.; FACION, C.E. (2000) Controle de nematoides das galhas em cenoura através de rotação. *Fitopatologia Brasileira* 5:329-336.

CHARCHAR, J.M.; VIEIRA, J.V. (1991) Metodologia para seleção de cenoura com resistência a nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.) em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira* 16(2):22-31.

CHARCHAR, J.M.; VIEIRA, J.V. (1990) Seleção de linhagens de cenoura para resistência a nematoides de galhas *Meloidogyne* spp. *Fitopatologia Brasileira* 15(2):130-137.

CONAB: (2020) Companhia Nacional de Abastecimento. Boletim Hortigranjeiro, v. 6, n. 7. Brasília: CONAB. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/hortigranjeiros-prohort/boletim-hortigranjeiro>. Consultado em 25 Jul. 2023.

CUNHA, T.G.D.; VISÔTTO, L.E.; PINHEIRO, L.M.; GOD, P.I.V.G.; ROSA, J.M.O.; OLIVEIRA, C.M.G.; LOPES, E.A. (2021) Distribution of *Meloidogyne* species in carrot in Brazil. *Ciência Rural* 51: e20200552.

DÁVILA-NEGRÓN M.; DICKSON D.W. (2013) Comparative thermaltime requirements for development of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, and *M. javanica*, at constant temperatures comparación de requisitos térmicos para el desarrollo de *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, and *M. javanica*. *Nematropica* 43(2):152–163.

DEVIRAN Z.; BAŞKÖYLÜ B.; TANER A.; DOĞAN F. (2013) Comparison of PCR-based molecular markers for identification of *Mi* gene. *Acta Agric Scand Sect B–Soil Plant Sci* 63(5):395–402.

DE LEY, P.; BLAXTER, M.L. (2002) Systematic position and phylogeny. *The Biology of Nematodes*. London: pp. 1-30.

DERPSCH, R.; CALEGARI, A. (1992) Plantas para adubação verde de inverno. Londrina: IAPAR. 80 p. (IAPAR. Circular, 73).

DOSSA, D.; FUCHS, F. (2017) Cenoura: Produção, mercado e preços na CEASA-PR. Boletim Técnico 04. CENOURA

- EL-SHAFEEY I. E., EL-KHATEEB N. M. M., ELSHARKAWY M. M., ELSARY G. S., HOMAYED S. H. (2019) Induction of systemic resistance Against *Meloidogyne incógnita* by different chemical and biological inducers in tomato plants. *Fres. Environ. Bull.* 28 6692–6700.
- EMBRAPA. (2021) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Cenoura (Sistemas de Produção nº 2). Brasília: Embrapa.
- ESBENSHADE, P.R.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. (1990) Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 22:10-15.
- EYILER, E.; OZTAN, A. (2011) Production of frankfurters with tomato powder as a natural additive. *LWT - Food Science and Technology* 44:307-311.
- FAO. Faostats – FAO Statistical Databases. (2020). Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Consultado em: 25 jul. 2023.
- FERRAZ, L.C.C.B.; BROWN, D.J.F. (2016) Nematologia de plantas: fundamentos e importância. Norma Editora: Manaus, 250 p.
- FERRAZ, L.C.C.B.; MONTEIRO, A.R. Nematoides. In: BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. (2011) Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos, ed. 4. Agronômica Ceres, São Paulo: v.1, pp. 211-305.
- FILGUEIRA, F.A.R. (2013) Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3. ed. rev. ampl. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 421p.
- FRAGOSO, D.B.; GUEDES, R.N.C.; OLIVEIRA, M.G.A. (2007) Partial characterization of glutathione S-transferases in pyrethroid-resistant and -susceptible populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research* 43:167-170.
- FREITAS, L.G.; NEVES, W.S.; OLIVEIRA, R.; D'ARC L. (2016) Métodos em nematologia vegetal. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (Eds) Métodos em Fitopatologia. Editora UFV, Viçosa, MG:, 2 ed, pp. 257-296
- GAD, S.C. (2014) Nematicides. In: Encyclopedia of toxicology, 3rd ed. Academic Press, Cambridge, USA: pp. 473–474.
- GABRIEL, M.; KULCZYNSKI, S.M.; MUNIZ, M.F.; BOITEUX, L.S.; CARNEIRO, R.M. (2020) Reaction of a heterozygous tomato hybrid bearing the *Mi-1.2* gene to 15 *Meloidogyne* species. *Plant Pathology* 69(5):944-952.
- GABRIEL, M.; KULCZYNSKI, S.M.; SANTOS, M.F.; SOUZA, C.F.; MUNIZ, M.F.; BOITEUX, L.S.; CARNEIRO, R.M. (2022) A novel virulent Brazilian pathotype of *Meloidogyne javanica* towards the tomato *Mi-1.2* gene and pathogenicity to resistant rootstock. *Journal of Plant Diseases and Protection* 129(5):1269-1276.
- GHAREEB, R. Y.; ALFY, H.; FAHMY, A. A.; ALI, H. M.; ABDELSALAM, N. R. (2020) Utilization of *Cladophora glomerata* extract nanoparticles as eco-nematicide and

enhancing the defense responses of tomato plants infected by *Meloidogyne javanica*. Sci Rep. 10, 19968.

GILBERT, J.C.; MCGUIRE, D.C. (1956) Inheritance of resistance to severe root-knot from *Meloidogyne incognita* in commercial type tomatoes. Proceedings of the American Society for Horticultural Science 68:437-442.

GINÉ, B.A.; MONFORT, P.; SORRIBAS, F.J. (2021) Creation and validation of a temperature-based phenology model for *Meloidogyne incognita* on common bean. Plants 10(2):240.

GINÉ, B.A. (2016) Population dynamics of *Meloidogyne* spp. on tomato and cucumber and biologically-based management strategies.

GRZEBELUS, D.; LORIZZO, M.; SENALIK, D.; ELLISON, S.; CAVAGNARO, P.; MACKO-PODGORNI, A.; HELLER-USZYNSKA, K.; KILIAN, A.; NOTHNAGEL, T.; ALLENDER, C.; SIMON, P.; BARANSKI, R. (2014) Diversity, genetic mapping, and signatures of domestication in the carrot (*Daucus carota*) genome, as revealed by Diversity Arrays Technology (DArT) markers. Molecular Breeding 33: 625–637.

HARVEY, MARK & QUILLEY, STEVE & BEYNON, HUW. (2002). Exploring the Tomato. Transformations of Nature, Society and Economy.

HEYWOOD, V.H. (1983) Relationships and evolution in the *Daucus Carota* complex. Isr. Journal of Plant Sciences 32, 51–65.

HORTIFRUTI BRASIL – HFBRASIL. (2021) Anuário 2020-2021. Disponível em: <https://www.hfbrasil.org.br/revista/acessar/completo/retrospectiva-2020-perspectivas-2021.aspx>. Consultado em: 25 jul. 2023.

HUANG, S.P.; PORTO, M.V.B. (1988) Efeito do alqueive na população dos nematóides das galhas e na produção de cenoura. Fitopatologia Brasileira 13:377-381.

HUANG, C.S.; MAGGENTI, A.R. (1969) Mitotic aberrations and nuclear changes of developing giant cells in *Vicia faba* caused by root knot nematode *Meloidogyne javanica*. Phytopathology 59:447-455.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2021) Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Estatística da Produção Agrícola. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2021_jan.pdf> Consultado em: 26 jul. 2023

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2017). Horticultura: número de estabelecimentos agropecuários e quantidade produzida por produtos da horticultura. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/acervo#/S/Q> Consultado em: 25 jul. 2023

IORIZZO, M.; SENALIK, D.A.; ELLISON, S.L.; GRZEBELUS, D.; CAVAGNARO, P.F.; ALLENDER, C.; BRUNET, J.; SPOONER, D.M.; DEYNZE, A.V.; SIMON, P.W. (2013) Genetic structure and domestication of carrot (*Daucus carota* subsp. *sativus*) (Apiaceae). American Journal of Botany 100:930–938.

- IORIZZO, M.; SENALIK, D.A.; GRZEBELUS, D.; BOWMAN, M.; CAVAGNARO, P.F.; MATVIENKO, M.; ASHRAFI, H.; DEYNZE, A.V.; SIMON, P.W. (2011) De novo assembly and characterization of the carrot transcriptome reveals novel genes, new markers, and genetic diversity. *BMC Genomics* 12:1-14.
- IOVENE, M.; CAVAGNARO, P.F.; SENALIK, D.; BUELL, C.R.; JIANG, J.; SIMON, P.W. (2011) Comparative FISH mapping of *Daucus* species (Apiaceae family). *Chromosome Research* 19:493–506.
- JABLONSKA, B.; AMMIRAJU, J.S.S.; BHATTARAI K.K.; MANTELIN S.; DE ILARDUYA O.M.; ROBERTS P.A.; KALOSHIAN I. (2007) The *Mi-9* gene from *Solanum arcanum* conferring heat stable resistance to root-knot nematodes is a homolog of *Mi-1*. *Plant Physiology* 143:1044–1054.
- JONES, J.T.; HAEGEMAN, A.; DANCHIN, E.G.; GAUR, H.S.; HELDER, J.; JONES, M.G.; KIKUCHI, T.; MANZANILLA-LÓPEZ, R.; PALOMARES-RIUS, J.E.; WESEMAEL, W.M. (2013) Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14:946-961.
- KARSSSEN, G., WESEMAEL, W. AND MOENS, M. (2013) Root-knot nematodes. *Plant Nematology*. CABI Publishing, Wallingford: pp. 73-108.
- KARSSSEN, G.; MOENS, M. (2006) Root-knot nematodes. *Plant Nematology*. CABI Publishing, Wallingford: pp. 59–90.
- KASSIE Y.G. (2019) Status of root-knot nematode (*Meloidogyne* species) and *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum*) disease complex on tomato (*Solanum lycopersicum*) in the central Rift Valley, *Ethiopian Journal of Agricultural Sciences* 10(8):1090–1103.
- KELEBEK, H.; SELLI, S.; KADIROĞLU, P.; KOLA, O.; KESEN, S.; UÇAR, B.; ÇETINER, B. (2017) Bioactive compounds and antioxidant potential in tomato pastes as affected by hot and cold break process. *Food Chemistry* 220: 31-41.
- KESSEL, C. (2003) Fertilizing tomatoes. *Veg. Prod. Pub.* 363:11–27.
- KUMARI, C.; DUTTA, T.; BANAKAR, P. (2016) Comparando as mudanças na expressão gênica relacionadas à defesa após o ataque do nematoide das galhas em cultivares de arroz suscetíveis versus resistentes. *Sci Rep* 6, 22846.
- LU, R.; VAN B.R.; SAEYS W.; LI C.; CEN H. (2020) Measurement of optical properties of fruits and vegetables: a review. *Postharvest Biol Technol* 159:111003.
- MACHACA-CALSIN, C.P.; SILVA, W.; MÁRQUEZ, L.; OLIVEIRA, A.; HELLER, E.; GOMES, C.B. (2019) Danos associados ao nematoide-das-galhas (*Meloidogyne javanica*) em feijoeiro. In: Embrapa Clima Temperado-Resumo em anais de congresso. In: Congresso Brasileiro de Nematologia 36, Caldas Novas. Nematoides: da Ciência ao Campo. [Anais, palestras e resumos]. Campinas: Infobibos.
- MAROUELLI, W.A.; SILVA, W.L.C. (2000) Irrigação. In: Silva, J. B. C.; Giordano, L. B. (Orgs.). *Tomate para processamento industrial*. Brasília: Embrapa, pp. 60-71.

- MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M.J.; PROVAN, G.; CHESSON, A. (2002) Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of The Science of Food and Agriculture* 82:323-330.
- MCCUE, GA. (1952) The history of the use of the tomato: an annotated bibliography. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 39:289–348.
- MILLIGAN, S.B.; BODEAU, J.; YAGHOobi, J.; KALOSHIAN, I.; ZABEL, P.; WILLIAMSON, V.M. (1998) The root-knot nematode gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper-nucleotide binding leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* 10:1307-1319.
- MOENS, M.; PERRY, R.N.; STARR, J.L. (2009) *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J.L. (Eds). *Root-knot nematodes*, CAB International, Wallingford, UK, pp. 01-17.
- MOLINARI, S. (2011) Resistência vegetal natural e induzida, como estratégia de controle de nematoides fitoparasitários alternativos a pesticidas. *Plant Cell Rep.* 30, 311–323.
- MORRIS, K.A.; LANGSTON, D.B.; DAVIS, R.F.; NOE, J.P.; DICKSON, D.W.; TIMPER, P. (2016) Efficacy of various application methods of fluensulfone for managing root-knot nematodes in vegetables. *Journal Nematology* 48(2):65-71.
- MUKHTAR, T.; HUSSAIN, M.A.; KAYANI, M.Z. (2017) Respostas de rendimento de 12 cultivares de quiabo ao nematoide das galhas (*Meloidogyne incognita*). *Bragantia* 76:108–112.
- NGUYEN, C.N.; PERFUS-BARBEOCH, L.; QUENTIN, M.; ZHAO, J.; MAGLIANO, M.; MARTEU, N.; ROCHA, M.; NOTTET, N.; ABAD, P.; FAVERY, B. (2018) A root-knot nematode small glycine and cysteine-rich secreted effector, MiSGCR1, is involved in plant parasitism. *New Phytologist* 217:687–699.
- NICK, C.; BORÉM, A. (2016) *Cenoura: do plantio a colheita*. Viçosa: UFV.
- NOMBELA, G.; WILLIAMSON, V.M.; MUÑIZ, M. (2003) The root-knot nematode resistance gene *Mi-1.2* of tomato is responsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16:645-649.
- NOMBELA, G.; BEITIA, F.; MUÑIZ, M. (2000). Variation in tomato host response to *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in relation to acyl sugar content and presence of the nematode and potato aphid resistance gene *Mi*. *Bulletin of Entomological Research*, 90:161-167.
- NUEZ, F. (1995). *El cultivo del tomate*. (Mundi-Prensa, Ed.). Madrid, Barcelona, México.
- PADILLA-HURTADO, B., MORILLO-CORONADO, Y., TARAPUES, S., BURBANO, S., SOTO- SUÁREZ, M., URREA, R., et al. (2022) Evaluation of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) population density for disease resistance screening of tomato germplasm carrying the gene *mi-1*. *Chil. J. Agric. Res.* 82 (1): 157–166.

- PARSONS, J.; MATTHEWS, W.C.; IORIZZO, M.; ROBERTS, P.A.; SIMON, P.W. (2015) *Meloidogyne incognita* nematode resistance QTL in carrot. *Molecular Breeding* 35:1-11.
- PINHEIRO, J.B. (2017) *Nematoides em hortaliças*. 1. ed. Brasília-DF: Embrapa. 194p.
- PINHEIRO, J.B.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; PEREIRA, R.B.; MOITA, A.W. (2014) Reação de Acessos de *Capsicum* ao nematoide-das-galhas. *Horticultura Brasileira* 32: 371-375.
- PINHEIRO, J.B.; BOITEUX, L.S.; PEREIRA, R.B.; ALMEIDA M.R.A.; CARNEIRO R.M.D.R. (2014^a) Identificação de espécies de *Meloidogyne* em tomateiro no Brasil. *Embrapa Hortaliças. Boletim de pesquisa e desenvolvimento*, 102: 1-14.
- PALOMARES-RIUS, J.E.; ESCOBAR, C.; CABRERA, J.; VOVLAS, A.; CASTILLO, P. (2017) Anatomical alterations in plant tissues induced by plant-parasitic nematodes. *Frontiers in Plant Science* 8:1987.
- OGWULUMBA, S.I.; OGWULUMBA, I.C. (2018) Screen house management of *Meloidogyne javanica* (Treb) in UC82B tomato (*Solanum lycopersicum*) with leaf extract of *Jatropha curcas*. *Journal of Entomology and Nematology* 10:33–36.
- OKA, Y. (2019) Survival of *Meloidogyne javanica* during the summer season under semiarid conditions. *European Journal of Plant Pathology* 155:917–926.
- OKA Y. (2020) From old-generation to next-generation nematicides. *Agronomy* 10(9):1387.
- OLSEN, M.W. (2000) Root-knot Nematode. University of Arizona, Arizona Cooperative Extension, AZ1187 (November), pp. 1–3.
- OLWE, T. (2006) The influence of climatic features on distribution and infection of root-knot nematodes *Meloidogyne* spp., in cowpea growing areas in Nigeria. *Ife Journal of Science* 8(2):185–192.
- PASCHOLATI, S. F. (2011) Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (ed.). *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*. Piracicaba: Agronômica Ceres. p. 593-636
- PIMENTA, C.A.M.; CARNEIRO, R.M.D.G. (2005) Utilização de *Pasteuria penetrans* em controle biológico de *Meloidogyne javanica* em duas culturas sucessivas de alface e tomate. Brasília DF. Embrapa. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento no. 116).
- RALMI, N.H.A.A; KHANDAKER, M.M.; MAT N. (2016) Occurrence and control of root knot nematode in crops: a review. *Aust J Crop Sci* 10(12):1649–1654.
- RANDIG, O.; BONGIOVANNI, M.; CARNEIRO, R.M.D.G.; CASTAGNONE-SERENO P. (2002) Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome* 45:862–870.

- RAZIFARD, H.; RAMOS, A.; VALLE, A.L. (2020). Genomic evidence for complex domestication history of the cultivated tomato in Latin America. *Molecular Biology and Evolution* 37: 1118–1132.
- ROBERTS, P.A. (1987) The influence of planting date of carrot on *Meloidogyne incognita* reproduction and injury to roots. *Nematologica* 33:335–342
- ROBERTS, P.A. (1992) Current status of the availability, development, and use of host plant resistance to nematodes. *Nematology* 24:213-227.
- ROBERTS, P.A. (2002). Concepts and consequences of resistance. In: Starr, J.L.; Cook, R.; Bridge, J (Eds.). *Plant Resistance of Parasitic Nematodes*. 1st ed. CAB International. Wallingford. pp.23-41.
- RODRIGUES, P. (2020) A história da cenoura: O papel de pesquisa para a consolidação do cultivo no país. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/49845405/a-historia-da-cenoura>. Consultado em: 25 jul. 2023.
- ROSSI, M.; GOGGIN, F.L.; MILLIGAN, S.B., KALOSHIAN, I.; ULLMAN, D.E.; WILLIAMSON, V.M. (1998) The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:9750-9754.
- RUBATZKY, V.E. QUIROS, C.F.; SIMON, P.W. (1999) Carrots and related vegetable Umbelliferae. Department of Vegetable Crops, University of California and University of Wisconsin. CABI pp. 304
- SAHAGÚN B. (1577) History general de las cosas de Nueva España por el fray Bernardino de Sahagún: el Códice Florentino. Libro X: del pueblo, sus virtudes y vicios, y otras naciones. Florence: Biblioteca Medicea Laurenziana.
- SANFUMENTES ECHEVARRRÍA, O. (2006) Europa y su percepción del nuevo mundo a través de las especies comestibles y los espacios americanos en el siglo XVI. *Historia* 39:531–556.
- SANTOS, M.F.A. (2011) Diversidade de *Meloidogyne incognita* e espécies correlatas como surgem abordagens biológicas, citológicas, morfológicas e moleculares. Dissertação Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.
- SEAH, S.; TELLEEN, A.C.; WILLIAMSON, V.M. (2007) Introgressed and endogenous Mi-1 gene clusters in tomato diVer by complex rearrangements in Xanking sequences and show sequence exchange and diversifying selection among homologues. *Theor. Appl. Genet.* 114:1289-1302.
- SEESAO, Y.; GAY, M.; MERLIN, S.; VISCOGLIOSI, E.; ALIOUAT-DENIS, C.M.; AUDEBERT, C. (2017) A review of methods for nematode identification. *Journal of Microbiological Methods*. 138: 37-49
- SEID, A.; FININSA, C.; MEKETE, T.; DECRAEMER, W.; WESEMAEL, W.M. (2015) Tomato (*Solanum lycopersicum*) and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) – a century-old battle. *Nematology* 17(9): 995-1009.

- SELINA, P.; BLEDSOE, M.E. (2002) Greenhouse/Hothouse hydroponic tomato timeline. Village Farms: Liver Pool, 8p.
- SHAH, K.; SINGH, M.; RAI, A.C. (2015) Bioactive compounds of tomato fruits from transgenic plants tolerant to drought. *LWT - Food Science and Technology* 61: 609–614.
- SHARMA, M.; KAUSHIK, P. (2021) Breeding for root-knot nematode resistance in eggplant: progress and prospects. Preprints 2021.
- SIKANDAR, A., ZHANG, M., WANG, Y., ZHU, X., LIU, X., FAN, H., XUAN, Y., CHEN, L., DUAN, Y (2020b). Review article: *Meloidogyne incognita* (root-knot nematode) a risk to agriculture. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 18 (1), 1679–1690.
- SIMON, R.; BOITEUX, L. (1997) Germplasm sources, inheritance, and marker assisted selection for southern and northern nematodes in carrot. *J. Appl. Genet.* 38: 57–59
- SIMON, P.W.; MATTHEWS, W.C.; ROBERTS, P.A. (2000) Evidence for simply inherited dominant resistance to *Meloidogyne javanica* in carrot. *Theoretical and Applied Genetics* 100:735-742.
- SIMON, P.W.; FREEMAN, R.E.; VIEIRA, J.V.; BOITEUX, L.S.; BRIARD, M.; NOTHNAGEL, T.; MICHALIK, B.; KWON, Y.S. (2008) Carrot. *Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae.* Springer New York pp. 327-357.
- SIMON, P.W.; IORIZZO, M.; GRZEBELUS, D.; BARANSKI, R. (2019) The carrot genome; Springer, New York, NY, pp. 372
- SILVA, J. D. O., OLIVEIRA, C. M., CARNEIRO, R. G. D. S., & DA ROCHA, M. R. (2021) *Meloidogyne enterolobii* development and reproduction in tomato plants treated with resistance inducers. *Nematology*, 24(3) 283-288.
- SILVA, A.J.; DE OLIVEIRA, G.H.; PASTORIZA, R.J.; MARANHÃO, E.H.; PEDROSA, E.M.; MARANHÃO, S.R.; BOITEUX, L.S.; PINHEIRO, J.B.; DE CARVALHO, J.L.S. (2019) Search for sources of resistance to *Meloidogyne enterolobii* in commercial and wild tomatoes. *Horticultura Brasileira* 37:188-198.
- SINGH, N.; SIDDIQUI, Z.A. (2012) *Meloidogyne javanica*. *International Journal of Vegetable Science* 18(1):78–86.
- STOLARCZYK, JOHN & JANICK, J.. (2011) Carrot: History and iconography. *Chron. Horticult.* 51; 13-18.
- SUBBOTIN, S.A.; PALOMARES-RIUS, J.E.; CASTILLO, P. (2021) Systematics of root-knot nematodes (Nematoda: Meloidogynidae). In: HUNT, D. J.; PERRY, R.N. (Eds) *Nematology Monographs and Perspectives*, Brill, 14, Leiden, The Netherlands.
- TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. (1983) Biología, identificación y control de los nematodos del nódulo de la raíz. Proyecto Internacional de *Meloidogyne*. Carolina Del Norte: Departamento de Fitopatología de La Universidad Del Estados de Carolina Del Norte y Agencia de Estados Unidos para Desarrollo Internacional.

- TARIQ-KHAN, M.; MUNIR, A.; MUKHTAR, T.; HALLMANN, J.; HEUER, H. (2017) Distribution of root-knot nematode species and their virulence on vegetables in northern temperate agro-ecosystems of the Pakistani-administered territories of Azad Jammu and Kashmir. *Journal Plant Disease Protection* 124:201–212.
- TIGANO, M.; DE SIQUEIRA, K.; CASTAGNONE-SERENO, P.; MULET, K.; QUEIROZ, P.; DOS SANTOS, M.; TEIXEIRA, C.; ALMEIDA, M.; SILVA, J.; CARNEIRO, R.M.D. (2010) Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* and development of a SCAR marker for this guava-damaging species. *Plant Pathology*, 59:1054-1061.
- TIHOHOD, D. (2000) *Nematologia agrícola aplicada*. FUNEP, Jaboticabal, pp 372.
- TIHOHOD, D. (1989) *Nematologia Agrícola*. Jaboticabal, FCAV 80p.
- TRUDGILL, D.L.; BLOK, V.C. (2001) Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 39:53-77.
- TRUDGILL, D.L. (1991) Resistance and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. *Annual Review of Phytopathology* 29: 167-192.
- TRUONG N.M.; NGUYEN C.N.; ABAD P.; QUENTIN M.; FAVERY B. (2015) Function of root-knot nematode effectors and their targets in plant parasitism. *Adv. Bot. Res.* 75: 293–324.
- VAVILOV, N.I., VAVYLOV, M.I., NÍDOROFEEV, F.V. (1992) *Origem e Geografia das Plantas Cultivadas* (Cambridge University Press), Cambridge, MA.
- VIEIRA, J. V., CHARCHAR, J. M., ARAGÃO, F. A., BOITEUX, L. S. (2003). Heritability and gain from selection for field resistance against multiple root-knot nematode species (*Meloidogyne incognita* race 1 and *M. javanica*) in carrot. *Euphytica*, 130: 11–16.
- VIEIRA, J. V., DA SILVA, G. O., CHARCHAR, J. M., FONSECA, M. E. N., SILVA, J. B., NASCIMENTO, W. M., BOITEUX L.S, PINHEIRO, J.B., REIS, A., RESENDE F. V., CARVALHO, A.D. (2012) BRS Planalto: cultivar de cenoura de polinização aberta para cultivo de verão. *Horticultura Brasileira*, 30: 359–363.
- VIEIRA P.; GLEASON C. (2019) Plant-parasitic nematode effectors—insights into their diversity and new tools for their identification. *Curr. Opin. Plant Biol.* 50, 37–43.
- VILJOEN, J.J.F.; LABUSCHAGNE, N.; FOURIE, H.; SIKORA, R.A. (2019) Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomatoes and carrots by plant growth-promoting rhizobacteria. *Tropical Plant Pathology* 44: 284-291.
- WANG, K.H.; MCSORLEY, R. (2008) Exposure time to lethal temperatures for *Meloidogyne incognita* suppression and its implication for soil solarization. *Journal of Nematology* 40(1):7-14.
- WILLIAMSON, VM. (1999) Plant nematode resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 327-331

WILLIAMSON, V.M. (1998) Root-knot nematodes resistance genes in tomato and their potential for future use. *Annual Review of Phytopathology* 36:277-293.

WIRATNO, D.; TANIWIRYONOC, H.; VAN DER BERG, J.A.G.; RIKSEND, I.M.C.M.; RIETJENS, S.R.; DJIWANTIA, J.E.; KAMMENGAD, A.J. MURK. (2009) Nematicidal activity of plant extracts against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *The Open Natural Products Journal* 2009:77-85.

ZASADA, I.A.; HALBRENDT, J.M.; KOKALIS-BURELLE, N.; LAMONDIA, J.; MCKENRY, M.V.; NOLING, J.W. (2010) Managing nematodes without methyl bromide. *Annual Review Phytopathology* 48:311–328.

ZHOU, L.; YUEN, G.; WANG, Y.; WEI L, J.I.G. (2016) Avaliação de agentes de controle biológico bacteriano para o controle da doença do nematóide das galhas no tomate. *Colheita Protection* 84:8–13.

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

CAPÍTULO 2

**Avaliação de germoplasma de *Solanum (Lycopersicon)* sob
diferentes níveis de inóculo de *Meloidogyne enterolobii***

RESUMO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é considerado uma das principais hortaliças hospedeiras do nematoide-das-galhas *Meloidogyne enterolobii*. Esse patógeno representa uma das maiores ameaças para o cultivo do tomateiro devido ao seu perfil de virulência mais amplo, sendo capaz de se reproduzir em cultivares contendo o gene de resistência *Mi-1.2*. Além disso, fontes de resistência adequadas a *M. enterolobii* ainda não foram identificadas em germoplasma de tomateiros silvestres do gênero *Solanum* (*Lycopersicon*). Neste contexto, o principal objetivo do presente trabalho foi avaliar a reação de acessos de tomateiro sob quatro diferentes níveis de inóculo de *M. enterolobii* (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + eventuais J2). O experimento foi conduzido em vasos plásticos (2 L) em casa de vegetação. Foram avaliados (para cada nível de inóculo de *M. enterolobii*) 24 acessos de oito espécies e variedades botânicas de *Solanum* (*Lycopersicon*) oriundos de uma coleção de germoplasma da Embrapa Hortaliças. As cultivares 'Santa Clara' e 'Nemadoro' foram utilizadas como testemunhas padrão. O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados (DBC) com quatro repetições para cada nível de inóculo. A unidade experimental foi constituída de uma planta por vaso. As plantas foram inoculadas aos 15 dias após o transplantio (DAT). Os sistemas radiculares foram avaliados 45 dias após a inoculação (DAI) quanto ao índice de galhas (IG), índice de massa de ovos (IMO); número de ovos + J2 por grama de raiz (NOGR) e o fator de reprodução (FR). Curvas de regressão foram obtidas a partir das variáveis FR e níveis de inóculo e as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Todos os acessos avaliados apresentaram variados níveis de suscetibilidade, com nenhum acesso se mostrando promissor do ponto de vista do melhoramento genético. No processo de inoculação de *M. enterolobii*, a dose de inóculo de 1000 O+J2 pode ser considerada ótima e muitas vezes suficiente para desencadear a expressão máxima dos sintomas nos tomateiros em estudo, indicando que, em relação à infecção e proliferação de *M. enterolobii*, em níveis mais elevados de inóculo podem não ser necessariamente vantajosos para a manifestação dos sintomas.

Palavras-chaves: Nematóide-das-galhas, *Solanum lycopersicum*, Espécies silvestres, Resistência genética.

ABSTRACT

Evaluation of *Solanum (Lycopersicon)* germplasm under different inoculum levels of *Meloidogyne enterolobii*.

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is considered one of the main host vegetables for the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii*. This pathogen represents one of the greatest threats to tomato cultivation due to its broader virulence profile, being able to reproduce in cultivars containing the *Mi-1.2* resistance gene. Furthermore, adequate sources of resistance against *M. enterolobii* have not yet been identified in germplasm of wild tomato plants of the genus *Solanum (Lycopersicon)*. In this context, the main objective of the present work was to evaluate the reaction of tomato accessions under four different inoculum levels of *M. enterolobii* (1000, 2000, 4000 and 8000 eggs + eventual J2s). The experiment was carried out in plastic pots (2 L) in a greenhouse. Twenty-four accessions of eight species and botanical varieties of *Solanum (Lycopersicon)* from a germplasm collection of Embrapa were evaluated (for each inoculum level of *M. enterolobii*). The tomato cultivars 'Santa Clara' and 'Nemadoro' were used as standard checks. The experimental design used was randomized blocks (DBC) with four replications for each inoculum level. The experimental unit consisted of one plant per pot. Plants were inoculated 15 days after transplanting (DAT). Root systems were evaluated 45 days after inoculation (DAI) for gall index (IG), egg mass index (IMO); number of eggs + J2 per gram of root (NOGR) and reproduction factor (FR). From the variables RF and inoculum levels, regression curves were calculated, and the averages were grouped using the Scott-Knott test ($P < 0.05$). All evaluated accessions displayed varying levels of susceptibility, with no accession showing promise from the tomato breeding standpoint. In the *M. enterolobii* inoculation process, the inoculum dose of 1000 eggs + occasional J2 can be considered optimal and often sufficient to trigger the maximum expression of symptoms in the studied tomato plants. This indicates that, regarding the infection and proliferation of *M. enterolobii*, higher inoculum levels may not necessarily be advantageous for symptom manifestation.

Keywords: Root-knot nematode, *Solanum lycopersicum*, Wild species, Genetic resistance.

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é intensamente cultivado em todo o mundo devido a sua ampla e eclética utilização culinária e industrial bem como devido ao seu valor nutricional e suas propriedades nutraceuticas (Lu et al., 2020). No Brasil, a área plantada é de 56.874 hectares com destaque para os estados de Goiás e São Paulo. As médias de produção estimadas são de 92.394 kg/ha em Goiás e 78.344 kg/ha em São Paulo (IBGE, 2021). Os nematoides-das-galhas do gênero *Meloidogyne* Goeldi representam um dos grupos de patógenos mais comuns afetando os níveis de produtividade do tomateiro no Brasil (Pinheiro et al., 2014). Levantamentos têm indicado *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 e *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949 como as principais espécies associadas com a cultura do tomateiro no Brasil (Pinheiro et al., 2015). De fato, estas três espécies apresentam ampla distribuição geográfica devido à sua taxa de ciclo de vida mais rápida e adaptabilidade a diversas condições climáticas (Abd-Elgawad, 2014, 2020; Jones et al., 2013).

No entanto, um especial destaque na cultura do tomateiro é a espécie *M. enterolobii* (Yang & Eisenback, 1983), devido a sua recente disseminação geográfica, ampla gama de hospedeiros e pela capacidade de “quebrar” a resistência conferida pelo gene *Mi-1.2* (Tigano et al., 2010; Gabriel et al., 2020; Dareus et al., 2021) bem como outras fontes de resistência em diferentes espécies hospedeiras (Pinheiro et al., 2015; Koutsovoulos et al., 2020). Por exemplo, *M. enterolobii* consegue infectar e causar danos em fontes de resistência reportadas como eficientes as outras espécies de *Meloidogyne*, incluindo o gene *N* em *Capsicum annuum*, o gene *Rk* de *Vigna unguiculata*, o gene *Mir1* em *Glycine max*, o gene *Mh* de *S. tuberosum* e o gene *Mi-1* de *Gossypium hirsutum*, *Ipomoea batatas* e *Solanum lycopersicum* (Schwarz, 2019; Collett et al., 2021).

No Brasil, *M. enterolobii* foi inicialmente relatado em pomares de goiabeiras e, desde então, vem causando grandes prejuízos em ampla gama de hospedeiros (Carneiro et al., 2001), já tendo sido detectado infectando o tomateiro em condições naturais (Pinheiro et al., 2014). Plantas infectadas com *M. enterolobii* apresentam redução no crescimento, na longevidade e na resistência a diversos estresses abióticos (Dareus et al., 2021). De forma geral, os danos de *M. enterolobii* podem incluir a redução na qualidade e na produtividade (Abd-Elgawad, 2021). Os sintomas observados acima do solo incluem o amarelamento foliar, murcha e crescimento retardado, enquanto abaixo do solo, os sintomas se

manifestam na forma de galhas nas raízes, as quais podem ser consideráveis em tamanho e quantidade (Jia et al., 2022). Devido as semelhanças entre *M. enterolobii* e outras espécies de nematoides-das-galhas, diagnósticos precoces se tornam muito difíceis (Min et al., 2012), requerendo análises bioquímicas e/ou moleculares (Philbrick et al., 2020).

Apesar de serem eficazes as diferentes espécies de *Meloidogyne*, os produtos químicos sintéticos são muito tóxicos e perigosos para o meio ambiente (Sikandar et al., 2021b), fazendo com que a maioria dos compostos nematicidas tem sido retirada do mercado (Onkendi et al., 2014). Sendo assim, o controle biológico, a rotação de culturas, as práticas culturais e a resistência genética são as principais táticas para enfrentar esse problema desafiador (Sikandar et al., 2020b; Köhl et al., 2019). Devido à sua eficiência, praticidade e facilidade de implementação, a resistência genética, sempre que disponível, tem sido método de controle mais indicado.

A avaliação de germoplasma visando resistência aos nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) tem sido uma ação de pesquisa intensivamente implementada pelos programas de melhoramento genético de culturas pertencentes a família Solanaceae. Recursos genéticos de tomateiro e berinjela, especialmente parentes selvagens como *Solanum peruvianum*, *S. torvum*, *S. sisymbriifolium*, *S. aculeatissimum* e *S. toxicarium*, foram identificados como materiais promissores exibindo alto grau de resistência a esses nematoides (Charchar & Boiteux, 1996; Pinheiro et al., 2009; Moslehi et al., 2015; Pereira et al., Pinheiro et al., 2020). Pinheiro et al. (2020) estudaram trinta e sete acessos de pimentão para identificar sua resistência as três espécies de nematoide-das-galhas (*M. incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii*). Apenas dois acessos (CNPH 6144 e CNPH 30118) foram resistentes a *M. enterolobii*.

No tomateiro, a resistência às espécies de *Meloidogyne* é conferida por pelo menos dez genes denominados de *Mi-1*, *Mi-2*, *Mi-3*, *Mi-4*, *Mi-5*, *Mi-6*, *Mi-7*, *Mi-8*, *Mi-9* e *Mi-HT* (Rezk et al., 2021). Apenas cinco deles (*Mi-1*, *Mi-3*, *Mi-5*, *Mi-9* e *Mi-HT*) tiveram seus genes mapeados até o momento (El-Sappah et al., 2019), sendo que algumas destas fontes não foram ainda avaliadas contra populações de *M. enterolobii*. Atualmente, os esforços de pesquisa no tomateiro têm se concentrado na busca por fontes de resistência genética ao *M. enterolobii* (Castillo & Castagnone-Sereno, 2020). Estudos conduzidos com a avaliação de germoplasma no Brasil relataram alguns poucos acessos de *Solanum* (*Lycopersicon*) com resistência parcial e/ou instável ao *M. enterolobii* (Pinheiro et al.,

2009; Silva et al., 2019), sendo nenhum deles promissor para emprego em programas de melhoramento genético. Desta forma, fontes alternativas de resistência no tomateiro a *M. enterolobii* ainda não se encontram disponíveis. Ademais, novas metodologias de avaliação nematológicas são necessárias para os processos de seleção de plantas resistentes especificamente para a espécie *M. enterolobii*. Neste contexto, objetivou-se avaliar a reação de acessos de tomateiro sob diferentes níveis de inóculo de *M. enterolobii*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.4 Caracterização da área experimental

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e nos Laboratórios de Nematologia, Melhoramento e Genômica na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), na Unidade Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPQ/Embrapa Hortaliças). A unidade se localiza na Rodovia BR-060, Km 09 (Brasília/Anápolis), Fazenda Tamanduá, Gama – Distrito Federal, altitude de 996 metros e coordenadas geográficas de 15°56'00" de latitude Sul e 48°08'00" de longitude a Oeste.

2.2 Obtenção, identificação e multiplicação de uma população de *Meloidogyne enterolobii*

Fêmeas de *M. enterolobii* coletadas de raízes de pimentão na área de produção de Taquara e Pipiripau no Distrito Federal, Brasil foram multiplicadas em tomateiros cultivar 'Rutgers' e mantidas em casa de vegetação. A espécie do inóculo foi confirmada utilizando-se a técnica bioquímica Eletroforese de Isoenzimas de acordo com o fenótipo de esterase En₂, o qual apresenta duas bandas principais (Rm: 0,7; 0,9) e duas bandas mais fracas (Rm 0,75; 0,95) (Carneiro & Almeida, 2001). Para tal, fêmeas individuais de coloração branco-leitosa foram extraídas das raízes e inseridas nos tubos hematócitos não heparinizados contendo 8 µL de solução de extração (constituída por 5 g de sacarose, 0,25g de Triton X-100 e 15 mL de água destilada). Adicionou-se 2,5 µL da Solução F (azul de bromofenol) em cada tubo contendo as fêmeas maceradas. Até o momento da utilização, os tubos contendo as fêmeas foram mantidos no gelo em recipiente do tipo gerbox e armazenados em freezer (-18° C). Para a produção de inóculo, o nematoide foi multiplicado em plantas de tomate cv. 'Rutgers' em vasos com capacidade para 5 litros contendo uma mistura de solo e areia esterilizada na proporção (2:1). As plantas foram inoculadas com suspensão de 5.000 ovos e eventuais juvenis de segundo estágio (J2) de *M. enterolobii* aos 3 dias após o transplântio (DAT). Aos 65 dias após a inoculação, ovos e J2 foram extraídos dos sistemas radiculares das plantas de tomate segundo a técnica de Hussey & Barker (1973) modificada por Bonetti & Ferraz (1981), que consiste em processar todo sistema radicular infectado de cada planta em liquidificador com hipoclorito de sódio a 0,5%. Em sequência, o material processado passou por um conjunto de três peneiras sobrepostas: 42 mesh (0,354 mm), 100 mesh (0,149 mm) e 500 mesh (0,025mm de abertura de malha), para a obtenção da suspensão de inóculo que é constituída pelos ovos e J2 retidos na peneira de 500 mesh. A suspensão de ovos e J2 foi

recolhida em um béquer de vidro para quantificação e calibração do inóculo em câmara de Peter com auxílio de um microscópio óptico (modelo Nikon Eclipse 80i).

2.3 Delineamento experimental

O desenho experimental utilizado foi em Delineamento em blocos casualizados (DBC) com 4 repetições por nível de inóculo. A unidade experimental foi constituída de 1 planta por vaso. Foram avaliados (para cada nível de inóculo de *M. enterolobii*) 24 acessos de espécies de *Solanum (Lycopersicon)* oriundos de uma coleção de germoplasma da Embrapa Hortaliças (**Tabela 2.1**). A cultivar 'Rutgers' foi empregada como testemunha padrão de suscetibilidade, enquanto a cultivar Nemadoro foi selecionada como um exemplo de resistência já comprovada aos nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.). Isso foi feito para avaliar a viabilidade do inóculo de *M. enterolobii*.

Tabela 2.1. Acessos de tomateiro e espécies silvestres de *Solanum (Lycopersicon)* avaliados quanto à reação a uma população de *Meloidogyne enterolobii* sob diferentes níveis de inóculo (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + eventuais J2) em casa de vegetação, Brasília-DF, 2023.

Acessos	Espécie de <i>Solanum (Lycopersicon)</i>
1 CNPH 0378	<i>S. pimpinelifolium</i> L.
2 CNPH 0410	<i>S. chilense</i> (Dunal) Reiche
3 CNPH 0854	<i>S. lycopersicum</i> Morioka # 22
4 CNPH 0859	<i>S. lycopersicum</i> Morioka # 17
5 CNPH 1027	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> Galeni HBH
6 CNPH 1029	<i>S. lycopersicum</i> pruniforme HBH
7 CNPH 1031	<i>S. lycopersicum</i> HBH
8 CNPH 1035	<i>S. peruvianum</i>
9 CNPH 1048	<i>S. lycopersicum</i> Hawaii 7996
10 CNPH 1123	<i>S. peruvianum</i> L 03707
11 CNPH 1155	<i>S. chilense</i> LA 1969 x <i>S. lycopersicum</i>
12 CNPH 1236	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>
13 CNPH 1281	<i>S. peruvianum</i> x <i>S. lycopersicum</i>
14 CNPH 1287	<i>S. habrochaites</i> PI 126445 S.Knapp & D.M.Spooner PI 126445
15 CNPH 1289	<i>S. habrochaites</i> PI 128650
16 CNPH 1290	<i>S. habrochaites</i> PI 126449
17 CNPH 1436	<i>S. peruvianum</i> LA 0153
18 CNPH 1438	<i>S. peruvianum</i> LA 0444
19 CNPH 1439	<i>S. peruvianum</i> LA 0454
20 CNPH 1516	<i>S. lycopersicum</i> LA 3912
21 CNPH 1730	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> Tocantins
22 CNPH 1742	<i>S. pimpinellifolium</i> LA 1607
23 CNPH 1747	<i>S. chmielewskii</i> (C.M.Rick, Kesicki, Fobes & M.Holle)

		D.M.Spooner, G.J.Anderson & R.K Jansen LA 3643
24	CNPH 1749	<i>S. cheesmaniae</i> (Riley) Fosburg LA 1139
25	'Rutgers'	<i>S. lycopersicum</i>
26	'Nemadoro'	<i>S. lycopersicum</i>

2.4 Instalação e condução do experimento

O experimento foi conduzido entre 20 de novembro de 2022 a 04 de janeiro de 2023 (Fig. 2.1). Para os ensaios, as sementes dos acessos de espécies de *Solanum* (*Lycopersicon*) oriundos de uma coleção de germoplasma da Embrapa Hortaliças foram semeadas em bandejas de poliestireno com 128 células piramidais invertidas (40 mL/célula) em substrato estéril Bioplant® e mantidas por 20 dias. Posteriormente, as mudas de tomates com aproximadamente 15 cm foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 2 litros, contendo uma mistura de solo e areia esterilizados na proporção (2:1). A irrigação foi feita mediante as necessidades das plantas, sendo realizadas geralmente, três vezes ao dia: início da manhã, início e final da tarde.



Figura 2.1. A: Instalação do experimento com os vasos devidamente identificados; B: Acessos de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) com 20 dias após a inoculação (DAI). Foto: Dwillian F. Cunha

2.5 Preparo de suspensão e inoculação das plantas de tomate

O preparo da suspensão foi realizado conforme Hussey & Barker (1973) modificada por Bonetti & Ferraz (1981). *Meloidogyne enterolobii* foi extraído dos sistemas radiculares do tomateiro 'Rutgers', sabidamente suscetível a *M. enterolobii*. A cultivar é reconhecida mundialmente para a multiplicação de espécies de *Meloidogyne*. As plantas individuais foram inoculadas com quatro níveis de inóculo (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + eventuais J2) de *M. enterolobii* aos 3 dias após o transplantio (DAT) para os vasos, depositadas em três orifícios de 2 cm de profundidade entorno da planta (Fig. 2.2).



Figura 2.2. A: Marcação dos orifícios para deposição do inóculo B: Inoculação de suspensão de ovos + J2 de *Meloidogyne enterolobii* em acessos de espécies de *Solanum* (*Lycopersicon*). Foto: Dwillian F. Cunha

2.6 Avaliação do experimento

Aos quarenta e cinco dias após a inoculação, os sistemas radiculares das plantas foram coletados e avaliadas as seguintes variáveis nematológicas: Índice de galhas (IG), Índice de massa de ovos (IMO), Número de ovos+J2 por grama de raiz (NOGR) e o Fator de reprodução (FR). Para os índices de galhas e massa de ovos, as raízes foram avaliadas conforme escala proposta por Taylor & Sasser (1978) (**Tabela 2.2**) e o número de ovos e J2 por grama de raízes foi determinado a partir da fórmula:

$$NOGR = PF / \text{Massa de raiz}$$

Por sua vez, o cálculo do fator de reprodução (FR) foi calculado pela relação de Oostenbrink (1966):

$$FR = PF / Pi$$

Em que:

FR: fator de reprodução;

PF: corresponde à população final;

Pi: corresponde à população inicial (5.000 ovos e eventuais J2).

Tabela 2.2. Avaliação do índice de galhas e índice de massas de ovos (IG & IMO), segundo a escala de Taylor & Sasser (1978), Brasília, DF, 2023

Nota ou grau	Galhas	Massa de ovos
0	0	0
1	1-2	1-2
2	3-10	3-10
3	11-30	11-30
4	31-100	31-100
5	>100	>100

Os sistemas radiculares foram separados de suas partes aéreas, os quais foram lavados em água cuidadosamente e avaliados os seus pesos frescos (g), para posterior cálculo do número de ovos por grama de raiz. Em seguida, foram imersos em solução corante de Floxina B (6 mg/L) por 15-20 min (Taylor & Sasser, 1978), a fim de facilitar a visualização das massas de ovos externas dos nematoides (**Fig. 2.3**). Em seguida, quantificados a olho nu quanto aos IG e IMO. Logo, os sistemas radiculares foram processados separadamente, para extração de ovos e eventuais juvenis de segundo estágio de *M. enterolobii* conforme técnicas de Hussey & Barker (1973) modificada por Bonetti & Ferraz (1981).



Figura 2.3. **A:** Imersão de raízes em solução corante de Floxina B (6 mg/L) por 15-20 min (Taylor & Sasser, 1978), **B:** Raiz após o procedimento de coloração. **Foto:** Dwillian F. Cunha

O número de ovos foi estimado pela contagem em lâmina de Peter sob microscópio óptico (modelo Nikon Eclipse 80i). A partir dos valores obtidos, foram determinados o fator de reprodução *FR* de cada acesso com o respectivo nível de inóculo de *M. enterolobii*. Com relação à reação dos acessos aos nematoides, foram considerados imunes aqueles que apresentaram *FR* igual a zero, resistentes, os que apresentaram *FR* menor que 1,0 e suscetíveis as que apresentaram *FR* maior que 1,0 (Oostenbrink, 1966).

2.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com auxílio do software Genes (Cruz, 2016). Antes da análise, os dados foram verificados quanto à normalidade pelo Teste de Lilliefors, e todos estavam normais. Os dados resultantes foram submetidos a análises de variância; as médias das variáveis foram agrupadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Nas tabelas as médias apresentadas são as originais sem transformação. Foram estimados também o coeficiente de variação ambiental (CV), coeficiente de variação genotípico (CVg) e o coeficiente de determinação genotípico (H^2), de acordo com Cruz & Regazzi (2001).

$$CV = 100 \times \frac{\sqrt{\text{quadrado médio residual}}}{\text{Média}}$$

$$CV(g) = \frac{\sqrt{\sigma^2}}{\text{Média}}, \text{ sendo } \sigma^2 = \frac{\text{quadrado médio dos Acessos} - \text{quadrado médio residual}}{\text{número de repetições}}$$

$$H^2 = \frac{\text{Quadrado médio dos Acessos} - \text{Quadrado médio residual}}{\text{Quadrado médio dos Acessos}}$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os acessos de tomateiro avaliados permitiram o desenvolvimento do nematoide nos sistemas radiculares. Os acessos apresentaram diferentes reações em relação ao parasitismo de *Meloidogyne enterolobii*. Diferenças significativas foram observadas para todas as variáveis avaliadas no experimento ($P < 0,05$). Os coeficientes de variação (CV) foram considerados baixos a médio para a maioria das variáveis avaliadas, entretanto para o número de ovos por grama de raiz (NOGR) um valor de 100,48% indica que, a precisão experimental foi menor.

A herdabilidade no sentido amplo ou coeficiente de determinação genotípico (H^2), que varia de 0 a 100%, e mede a proporção entre a variação genotípica e a fenotípica foi elevada (H^2 : 95%) para a variável fator de reprodução, o que indica a preponderância da variabilidade genética proporcionalmente à variabilidade total. O mesmo ocorreu com o número de ovos + J2 por grama de raiz (H^2 : 95%), índice de galhas (H^2 : 93%) e índice de massas de ovos (H^2 : 91%). Dessa forma, houve pouca influência das condições ambientais e experimentais nos resultados, demonstrando confiabilidade nos dados obtidos do experimento (Falconer & Mackay, 1996) (**Tabela 2.3**).

Tabela 2.3. Resumo da análise de variância, com os quadrados médios e significância de acessos de tomateiro sob diferentes níveis de inóculo (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + eventuais J2) de *Meloidogyne enterolobii* aos 45 DAI. Brasília, DF, 2023.

Fonte variação	GL	Índice de galhas	Índice de massa de ovos	Número de ovos + J2 por grama de raiz	Fator de reprodução
Blocos	3	0,81	0,35	10,42 10 ⁶	29,68
Acessos (G)	25	3,48*	4,65*	18,19 10 ⁷ *	609,50*
Níveis de inóculo (NI)	3	47,83*	57,91*	29,75 10 ⁷ *	264,49*
G x NI	75	1,43*	1,33*	13,05 10 ⁶ *	225,39*
Resíduo	309	0,25	0,43	85,02 10 ⁵	30,99
Média geral	-	4,33	3,72	2901,86	11,03
CV %	-	11,59	17,56	100,48	50,47
H ² %	-	0,93	0,91	0,95	0,95

*Significativo a 5% pelo teste F. H^2 : coeficiente de determinação genotípico ou herdabilidade no sentido amplo, em porcentagem.

Os padrões de suscetibilidade (tomateiro ‘Rutgers’), utilizado como controle, apresentou FRs moderados a altos (sempre $FR > 10$) considerando $P_i = (1000, 2000, 4000 \text{ e } 8000 \text{ ovos} + \text{eventuais J2})$ de *M. enterolobii* comprovando a viabilidade e qualidade do inóculo.

Além disso, ‘Rutgers’ destacou-se por apresentar o maior fator de reprodução do experimento, com 68,03 de FR. Na média do índice de galhas sob os diferentes níveis de inóculo (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + eventuais J2) de *M. enterolobii*, ficou evidente que no menor nível de inóculo (1 mil O+J2) ocorreu uma variação genética grande entre os acessos (H^2 : 93%). Em contrapartida, quando no máximo nível de inóculo (8000 O+J2) quase todos os acessos (exceto CNPH 1290 e CNPH 859) apresentaram nota máximo para o índice de galhas (nota 5) e coeficiente de determinação quase zero (H^2 : 0,01 %). Esse fato é corroborado por Pinheiro et al. (2009), quando verificou em seu estudo que o acesso CNPH 859 apresentou IG igual a 3.

IG e IMO são parâmetros auxiliares para aferir a hospedabilidade de plantas aos nematoide-das-galhas. As médias variaram de 1,75 a 5,0; 2,5 a 5,0; 3,75 a 5,0 e 4,75 a 5,0 para o IG. Para o IMO compreendeu de 1,25 a 5,0; 1,75 a 5,0; 2,25 a 5,0; 3,25 a 5,0, respectivamente para as concentrações de 1000, 2000, 4000 e 8000.

e de massa de ovos (IG e IMO) para os diferentes níveis de inóculo variaram de {1,75 e 1,25}; {2,50 e 1,75}; {3,75 e 2,25} e {4,75 e 3,25}, respectivamente (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + eventuais J2) de *M. enterolobii* (**Tabelas 2.4 e 2.5**). O menor índice de galhas de *M. enterolobii* observado, correspondeu ao nível de inóculo 1 mil O+J2, representado com uma média de 3,41; sendo os acessos CNPH 1123, CNPH 0859, CNPH 1290, CNPH 1281, CNPH 1027; 1048 e as duas testemunhas com os menores índices de galhas (IG: 1,75; 2,0; 2,0; 2,50; 2,25; 2,25; 2,50 e 2,50), respectivamente. Quanto ao índice de massa de ovos, não houve diferença estatística na média de todos os acessos nos níveis de inóculo 1 mil O+J2 e 2 mil O+J2 de *M. enterolobii*. Verificou-se no nível de inóculo 1 mil O+J2, com uma média de 2,80 e os acessos CNPH 1123, CNPH 0859, CNPH 1048, CNPH 1027, CNPH 12,90 e a testemunha nemadoro com os menores índices de massa de ovos (IMO: 1,25; 1,50; 1,75; 2,0; 2,0 e 2,0), respectivamente. Por outro lado, o nível de 2 mil O+J2 de *M. enterolobii* apresentou uma média de 3,47 de índice de massa de ovos, sendo os acessos CNPH 1290, CNPH 1123; CNPH 1281; CNPH 0859 e CNPH 1438 com os índices mais baixos (IMO: 2,50; 2,50; 2,25; 1,75 e 2,75).

Tabela 2.4. Reação de acessos de tomateiro sob diferentes níveis de inóculo (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + eventuais J2) de *Meloidogyne enterolobii* com base na variável IG, dos acessos avaliados aos 45 DAI. Brasília, DF, 2023.

Nível de inóculo

Acessos	1000	2000	4000	8000
CNPH 1287	4,75 aA	3,75 cB	5,00 aA	5,00 aA
CNPH 1742	4,00 bB	5,00 aA	5,00 aA	5,00 aA
CNPH 1516	4,00 bB	4,75 aA	4,25 bB	5,00 aA
CNPH 1035	3,00 cC	4,00 bB	5,00 aA	5,00 aA
CNPH 1290	2,00 dC	3,00 dB	4,50 bA	4,75 aA
CNPH 1439	4,25 bB	5,00 aA	4,25 bB	5,00 aA
CNPH 1027	2,25 dC	4,25 bB	3,75 bB	5,00 aA
CNPH 1031	4,00 bB	4,25 bB	4,50 bB	5,00 aA
CNPH 1289	2,50 dB	5,00 aA	5,00 aA	5,00 aA
CNPH 1236	2,75 cB	3,00 dB	4,75 aA	5,00 aA
CNPH 1123	1,75 dC	2,75 dB	4,50 bA	5,00 aA
CNPH 1281	2,50 dB	3,00 dB	4,75 aA	5,00 aA
CNPH 1747	5,00 aA	4,75 aA	5,00 aA	5,00 aA
CNPH 1749	3,50 bB	3,75 cB	4,50 bA	5,00 aA
CNPH 8054	4,25 bB	5,00 aA	5,00 aA	5,00 aA
CNPH 0859	2,00 dC	2,50 dC	4,00 bB	4,75 aA
CNPH 1048	2,25 dB	4,50 bA	4,75 aA	5,00 aA
CNPH 1438	3,25 cC	4,00 bB	4,75 aA	5,00 aA
CNPH 1730	4,25 bB	4,75 aA	4,00 bB	5,00 aA
CNPH 1155	3,50 bB	4,75 aA	4,25 bA	5,00 aA
CNPH 1029	5,00 aA	5,00 aA	4,75 aA	5,00 aA
CNPH 0410	5,00 aA	5,00 aA	5,00 aA	5,00 aA
CNPH 0378	3,00 cB	4,75 aA	5,00 aA	5,00 aA
CNPH 1436	5,00 aA	5,00 aA	5,00 aA	5,00 aA
Rutgers	2,50 dB	4,75 aA	5,00 aA	5,00 aA
Nemadoro	2,50 dB	4,50 bA	5,00 aA	5,00 aA
Média	3,41	4,26	4,66	4,98
CV%	16,92	14,00	11,76	2,72

Médias seguidas por letras diferentes minúsculas na coluna (comparação entre Acessos em cada nível de inóculo) e maiúsculas na linha (comparação entre níveis de inóculo para cada Acessoacessoacesso), diferiram significativamente pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 2.5. Reação de acessos de tomateiro sob diferentes níveis de inóculo (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + eventuais J2) de *Meloidogyne enterolobii* com base na variável IMO, dos acessos avaliados aos 45 DAI. Brasília, DF, 2023.

Acessos	Nível de inóculo			
	1000	2000	4000	8000
CNPH 1287	3,75 bB	3,25 bB	4,75 aA	5,00 aA
CNPH 1742	2,50 cB	3,75 aA	4,75 aA	4,50 aA
CNPH 1516	2,75 cB	3,50 bB	3,75 bB	4,75 aA
CNPH 1035	2,25 cC	3,25 bB	4,50 aA	4,75 aA
CNPH 1290	2,00 dB	2,50 cB	4,25 aA	3,75 bA
CNPH 1439	3,00 cB	4,50 aA	4,25 aA	4,50 aA
CNPH 1027	2,00 dC	3,25 bB	3,50 bB	5,00 aA
CNPH 1031	2,75 cB	4,25 aA	4,00 aA	4,25 bA
CNPH 1289	2,25 cC	3,50 bB	4,50 aA	5,00 aA
CNPH 1236	2,25 cB	3,00 bB	4,25 aA	5,00 aA
CNPH 1123	1,25 dC	2,50 cB	4,25 aA	4,25 bA
CNPH 1281	2,25 cB	2,25 cB	4,25 aA	4,00 bA
CNPH 1747	5,00 aA	4,75 aA	4,50 aA	5,00 aA
CNPH 1749	3,25 bA	3,50 bA	3,25 bA	3,25 bA

CNPH 0854	2,75 cB	3,50 bB	3,50 bB	5,00 aA
CNPH 0859	1,50 dB	1,75 cB	2,25 cB	4,00 bA
CNPH 1048	1,75 dB	3,25 bA	4,00 aA	4,00 bA
CNPH 1438	3,75 bA	2,75 cB	4,25 aA	3,50 bA
CNPH 1730	3,50 bA	4,00 aA	4,00 aA	4,75 aA
CNPH 1155	2,75 cB	4,25 aA	3,75 bA	4,75 aA
CNPH 1029	3,25 bA	3,50 bA	4,25 aA	3,75 bA
CNPH 0410	5,00 aA	5,00 aA	5,00 aA	5,00 aA
CNPH 0378	2,50 cB	3,50 bA	4,00 aA	4,50 aA
CNPH 1436	4,50 aA	4,00 aA	4,25 aA	5,00 aA
Rutgers	2,25 cC	3,50 bB	5,00 aA	4,25 bA
Nemadoro	2,00 dC	3,50 bB	4,75 aA	5,00 aA
Média	2,80	3,47	4,14	4,48
CV%	23,51	21,69	16,79	10,53

Médias seguidas por letras diferentes minúsculas na coluna (comparação entre Acessos em cada nível de inóculo) e maiúsculas na linha (comparação entre níveis de inóculo para cada Acessoacessoacesso), diferiram significativamente pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

O tomateiro CNPH 0410 diferiu estatisticamente sendo o mais suscetível em todos os níveis de inóculo testados, com os seguintes valores: (NOGR: 18402,22; nível 1 mil O+J2); (NOGR: 11300,00; nível 2000); (18110,00; nível 4000) e (NOGR: 22050,49; nível 8000) de *M. enterolobii*. Por outro lado, a testemunha resistente Nemadoro apresentou IG e IMO praticamente idênticos à testemunha suscetível Rutgers. Contudo, quando analisamos a densidade (NOGR) na concentração de 1000, observou-se uma redução de 90,31%. Na concentração de 8000, 79,88%. Importante considerar estes percentuais de redução, afim de demonstrar que IG e IMO não diz muito sobre a população do nematoide (**Tabela 2.6**).

Tabela 2.6. Reação de acessos de tomateiro sob diferentes níveis de inóculo (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + eventuais J2) de *Meloidogyne enterolobii* com base na variável NOGR, dos acessos avaliados aos 45 DAI. Brasília, DF, 2023.

Acessos	Nível de inóculo			
	1000	2000	4000	8000
CNPH 1287	397,71 bA	367,47 bA	1884,63 cA	4432,20 cA
CNPH 1742	635,23 bA	1322,60 bA	2268,64 cA	1845,06 cA
CNPH 1516	614,52 bA	909,70 bA	1420,08 cA	5201,46 cA
CNPH 1035	276,21 bA	773,08 bA	1497,36 cA	1224,54 cA
CNPH 1290	191,13 bA	1093,77 bA	415,08 cA	3391,04 cA
CNPH 1439	1142,81 bB	1631,04 bB	4273,81 cB	12601,02 bA
CNPH 1027	303,51 bA	1719,12 bA	1666,25 cA	4444,54 cA
CNPH 1031	657,54 bA	662,75 bA	2230,85 cA	2096,94 cA
CNPH 1289	642,48 bB	1165,72 bB	2895,95 cB	6853,08 cA
CNPH 1236	326,74 bA	468,59 bA	2315,83 cA	3658,81 cA
CNPH 1123	331,82 bA	767,33 bA	1191,09 cA	1437,59 cA
CNPH 1281	305,03 bA	612,67 bA	2387,69 cA	4730,97 cA
CNPH 1747	514,95 bB	1301,36 bB	2162,99 cB	6516,07 cA
CNPH 1749	1762,02 bB	2056,11 bB	3409,04 cB	10614,45 bA

CNPH 0854	565,41 bA	598,44 bA	1190,87 cA	654,42 cA
CNPH 0859	271,82 bA	193,94 bA	1114,17 cA	2874,78 cA
CNPH 1048	163,25 bA	902,05 bA	1219,92 cA	2075,11 cA
CNPH 1438	547,90 bA	805,95 bA	2271,36 cA	2015,93 cA
CNPH 1730	537,35 bB	1361,80 bB	704,04 cB	8845,75 bA
CNPH 1155	2144,83 bA	1307,69 bA	729,05 cA	3444,93 cA
CNPH 1029	791,67 bC	4198,45 bB	10887,71 bA	5588,50 cB
CNPH 0410	18402,22 aA	11300,00 aB	18110,00 aA	22050,49 aA
CNPH 0378	193,07 bA	638,58 bA	1379,60 cA	3251,39 cA
CNPH 1436	3694,29 bB	5099,21 bB	11334,89 bA	8800,28 bA
Rutgers	3477,75 bA	1937,34 bA	4067,55 cA	4549,48 cA
Nemadoro	336,90 bA	1078,14 bA	1150,03 cA	915,35 cA
Média	1508,77	1702,80	3237,63	5158,24
CV%	170,69	66,86	88,80	82,38
H ² %	0,87	0,93	0,87	0,79

Médias seguidas por letras diferentes minúsculas na coluna (comparação entre Acessos em cada nível de inóculo) e maiúsculas na linha (comparação entre níveis de inóculo para cada Acessoacessoacesso), diferiram significativamente pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

Dos acessos de tomateiro avaliados, todos apresentaram $FR > 1,0$ (Oostenbrink, 1966), sendo assim considerados suscetíveis a *M. enterolobii*. O padrão de susceptibilidade (tomateiro ‘Rutgers’) destacou-se por apresentar o maior fator de reprodução do experimento (FR: 68,03) no menor nível de inóculo de 1 mil O+J2 de *M. enterolobii*. Ou seja, em termos práticos: houve uma multiplicação da população inicial (P_i) do nematoide aproximadamente de 68 vezes até o final do experimento. A cultivar ‘Rutgers’ comportou-se diferentemente nos dois primeiros níveis de inóculo (1 mil O+J2 e 2 mil O+J2) de *M. enterolobii* em comparação com o verificado nos dois últimos níveis (4 mil O+J2 e 8 mil O+J2) de *M. enterolobii* (Fig. 2.4). A cultivar ‘Nemadoro’ reconhecida por portar o gene *Mi 1-2* responsável por conferir resistência a treze espécies de *Meloidogyne* não apresentou diferença significativa nos diferentes níveis de inóculo.

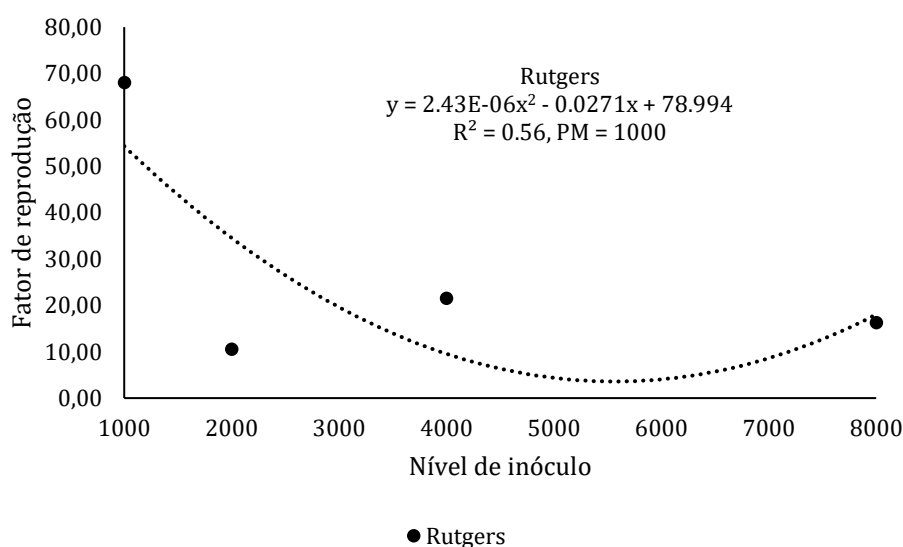


Figura 2.4. Curva de regressão para a variável Fator de Reprodução para a testemunha de suscetibilidade Rutgers em resposta a crescentes níveis de inóculo do nematoide *Meloidogyne enterolobii*. PM = ponto de máxima, ou valor máximo da curva de regressão referente ao eixo x do gráfico. R^2 = coeficiente de determinação.

De forma geral, fator de reprodução de *M. enterolobii* em acessos de tomateiro foram moderados a altos (**Tabela 2.7**) ao comparar com o controle ('Rutgers'). O maior valor para o fator de reprodução foi identificado no primeiro nível de inóculo (1 mil O+J2 de *M. enterolobii*) com o 'Rutgers', que exibiu um FR com um valor de 68,03, apresentando uma diferença estatisticamente significativa em relação aos demais. Além do 'Rutgers', os acessos CNPH 0410, CNPH 1155 e CNPH 1749 também demonstraram valores elevados de FR, registrando 39,77; 37,95 e 27,98, respectivamente.

No menor nível de inóculo (1 mil O+J2 de *M. enterolobii*), os acessos foram agrupados em quatro grupos estatísticos. Nesse caso, o grupo apresentou os menores valores de FR entre $3,65 \leq FR \leq 14,55$. Quando duplicado o nível de inóculo (2 mil O+J2), formaram-se dois grupos estatísticos; o grupo com menor FR compreendeu valores entre $3,79 \leq FR \leq 11,71$. Quando analisado o nível de inóculo 4 mil O+J2, os acessos também foram agrupados em dois grupos, o grupo com os menores valores variou de $2,67 \leq FR \leq 14,35$. Quando os acessos foram inoculados com o máximo nível de inóculo (8 mil O+J2), também se agrupou em dois grupos estatísticos, com menores valores entre $2,09 \leq FR \leq 10,78$. Os valores dos FR baixos quando comparados com os outros acessos pode ser explicado provavelmente devido à destruição de suas raízes ocasionada pelo nematoide e consequentemente a restrição do seu alimento. Nesse contexto, é importante ressaltar que o $FR > 1$ neste grupo já antecipa para uma classificação dos acessos como suscetíveis, de acordo com a categorização proposta por Oostenbrink (1966), justificando a destruição no sistema radicular causado por *M. enterolobii*. Entretanto, a fim de viabilizar uma análise mais precisa, é importante considerar a percentagem de redução a partir do NOGR.

Tabela 2.7. Reação de acessos de tomateiro sob diferentes níveis de inóculo (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + eventuais J2) de *M. enterolobii* com base na variável FR, Brasília, DF, 2023.

Acessos	Nível de inóculo			
	1000	2000	4000	8000
CNPH 1287	7,43 dA	5,63 bA	9,83 bA	8,15 bA
CNPH 1742	8,63 dA	6,25 bA	12,51 bA	3,24 bA
CNPH 1516	12,90 dA	8,36 bA	7,00 bA	13,94 aA

CNPH 1035	4,65 dA	5,06 bA	8,09 bA	3,70 bA
CNPH 1290	4,73 dA	7,95 bA	2,67 bA	11,79 aA
CNPH 1439	6,70 dB	7,03 bB	4,94 bB	19,17 aA
CNPH 1027	8,03 dB	19,13 aA	7,75 bB	6,93 bB
CNPH 1031	12,08 dA	7,20 bA	14,35 bA	7,67 bA
CNPH 1289	6,85 dA	6,04 bA	7,25 bA	5,57 bA
CNPH 1236	6,38 dA	3,79 bA	13,88 bA	8,53 bA
CNPH 1123	8,05 dA	5,27 bA	10,11 bA	4,81 bA
CNPH 1281	3,95 dA	5,63 bA	8,38 bA	10,78 bA
CNPH 1747	6,60 dA	11,71 bA	6,84 bA	13,42 aA
CNPH 1749	27,98 cA	9,30 bC	18,88 aB	16,83 aB
CNPH 0854	11,55 dA	8,33 bA	8,33 bA	2,68 bA
CNPH 0859	6,30 dA	3,83 bA	8,12 bA	9,82 bA
CNPH 1048	3,65 dA	10,65 bA	7,35 bA	8,63 bA
CNPH 1438	10,28 dA	4,65 bB	11,44 bA	3,05 bB
CNPH 1730	11,70 dA	18,60 aA	3,49 bB	13,49 aA
CNPH 1155	37,95 bA	16,13 aB	3,25 bC	10,29 bB
CNPH 1029	4,73 dC	18,94 aA	26,25 aA	12,73 aB
CNPH 0410	39,77 bA	19,31 aB	21,15 aB	18,48 aB
CNPH 0378	5,63 dA	6,23 bA	5,40 bA	7,28 bA
CNPH 1436	14,55 dB	22,35 aA	26,91 aA	19,97 aA
Rutgers	68,03 aA	10,58 bC	21,54 aB	16,30 aB
Nemadoro	7,95 dA	11,51 bA	5,59 bA	2,09 bA
Média	13,35	9,98	10,82	9,97
CV%	63,17	41,62	44,83	36,68

Médias seguidas por letras diferentes minúsculas na coluna (comparação entre Acessos em cada nível de inóculo) e maiúsculas na linha (comparação entre níveis de inóculo para cada acesso), diferiram significativamente pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

Os dados do FR foram também apresentados em equações de regressão (**Figuras 2.5, 2.6 e 2.7**). Observou-se um padrão no desenvolvimento do tomateiro 'Rutgers' (sem o gene *Mi-1.2*), conforme ilustrado (**Fig. 2.5**), em que os valores de FR atingiram um pico notável de 68,03. É digno de nota que esse aumento foi observado partindo de níveis iniciais relativamente baixos de inóculo, especificamente a quantidade de 1 mil O+J2 de *M. enterolobii*.

Tais resultados sugerem fortemente que o nível de inóculo de 1 mil O+J2 pode ser considerado ótimo para alcançar a máxima expressão do FR estimado em 68,03. Notavelmente, uma vez atingido esse limiar de inóculo, observou-se uma subsequente redução nos sintomas manifestados pelo tomateiro 'Rutgers'. Por outro lado, Nemadoro não apresenta diferença estatística entre os níveis de inóculo avaliados. Porém, em termos de valor absoluto, o maior FR é observado no nível 2 mil O +J2. Portanto, é possível inferir que o nível de inóculo está compreendido entre 1 mil e 2 mil O+J2 de *M. enterolobii*, sendo considerado ideal para desencadear a máxima expressão de sintomas na planta de tomate.

Em contrapartida, o comportamento da cultivar ‘Nemadoro’ (portador do gene *Mi-1.2*) mostrou uma dinâmica distinta. A expressão máxima de FR não foi claramente definida nos níveis de inóculo avaliados. Para alcançar o patamar máximo de expressão de FR em ‘Nemadoro’, uma estimativa aponta para a necessidade nível populacional de inóculo maior quando comparada a ‘Rutgers’, mais especificamente, cerca de 2156 O+J2, resultando em um valor de FR de 11,51.

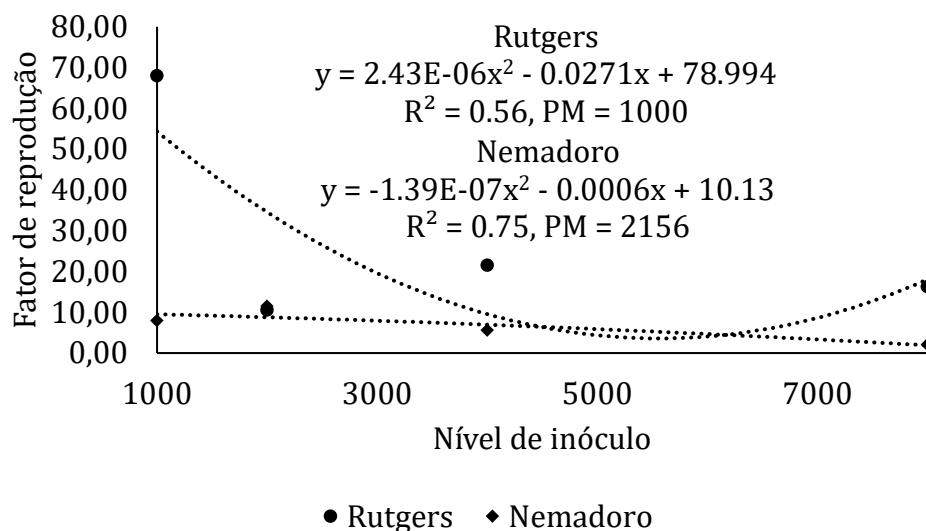


Figura 2.5. Curvas de regressão para a variável Fator de Reprodução para as testemunhas padrões Rutgers e Nemadoro em resposta a crescentes níveis de inóculo do nematoide *Meloidogyne enterolobii*. PM = ponto de máxima, ou valor máximo da curva de regressão referente ao eixo x do gráfico. R^2 = coeficiente de determinação.

No presente estudo, os acessos CNPH 1035 e CNPH 1048 apresentaram baixos FRs, variando de 3,68 a 10,65 em comparação com a testemunha suscetível ‘Rutgers’ (**Fig. 2.6**). A análise estimativa para determinar o nível de inóculo que resultaria em um FR máximo revelou uma inoculação de 4426 O+J2 Para o acesso CNPH 1035. A partir desse ponto específico de inóculo, o FR exibiu um retrocesso. Esse declínio no FR, observado após atingir determinados níveis de inóculo, pode ser explicado pelo fenômeno de competição, no qual níveis mais elevados de inóculo interferem na multiplicação dos nematoides. Este comportamento foi corroborado por uma pesquisa realizada por Kayani et al. (2017), que investigaram diferentes Acessos de pepino submetidos a uma variedade de níveis de inóculo, de 500 a 8 mil O+J2 de *M. incognita*. Em contrapartida, o acesso CNPH 1048 demonstrou um FR máximo quando inoculado com 5526 O+J2, representando uma redução aproximada de 1,1 mil O+J2 de *M. enterolobii* em comparação com o acesso CNPH 1035.

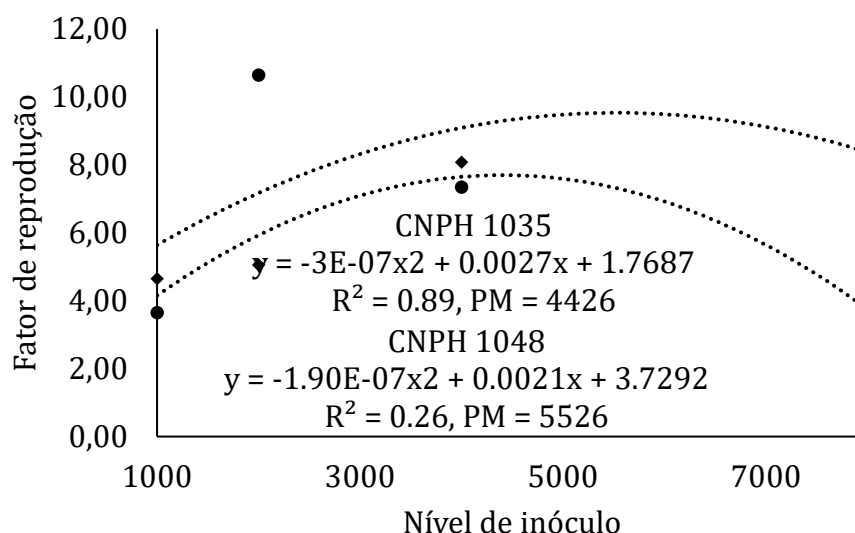


Figura 2.6. Curvas de regressão para o Fator de Reprodução dos acessos CNPH 1035 e CNPH 1048 em resposta a crescentes níveis de inóculo do nematoide-das-galhas *Meloidogyne enterolobii*. PM = ponto de máxima, ou valor máximo da curva de regressão referente ao eixo x do gráfico. R² = coeficiente de determinação.

Ao realizar uma análise comparativa com o estudo conduzido por Pinheiro e colaboradores, é possível observar mais contrastes nos resultados relacionados à resistência de diferentes acessos de tomateiro a *M. enterolobii*. No estudo anterior, os autores identificaram os acessos CNPH 1439, 0859, 1516 e 1048 como moderadamente resistentes. No entanto, nosso estudo revelou nuances interessantes a respeito do acesso CNPH 1439 em particular.

Enquanto Pinheiro et al (2009) indicaram que o acesso CNPH 1439 exibiu um nível moderado de resistência, nessa nova pesquisa foi revelado uma tendência diferente. O acesso CNPH 1439 (Fig. 2.7) apresentou valores de FR variando entre 4,94 a 7,03 nos três primeiros níveis de inóculo (1000, 2000 e 4000 O+J2) de *M. enterolobii*. Ao se examinar a curva de regressão ilustrada na Figura 8, torna-se perceptível que dentro do escopo da pesquisa, ao reduzir o nível de inóculo para 6000 O+J2, o fator de reprodução aproximou-se do valor de 10. Contudo, é importante notar que o valor de FR aumentou consideravelmente para 19,17 quando exposto a um nível de inóculo mais alto, ou seja, 8 mil O+J2 de *M. enterolobii*. Isso sugere que a resistência do acesso CNPH 1439 pode ser comprometido quando submetido a níveis mais elevados de inóculo, particularmente evidente no cenário de 8 mil O+J2. Apesar dessa possibilidade, os resultados são muito variáveis entre ensaios, pois vários fatores interferem.

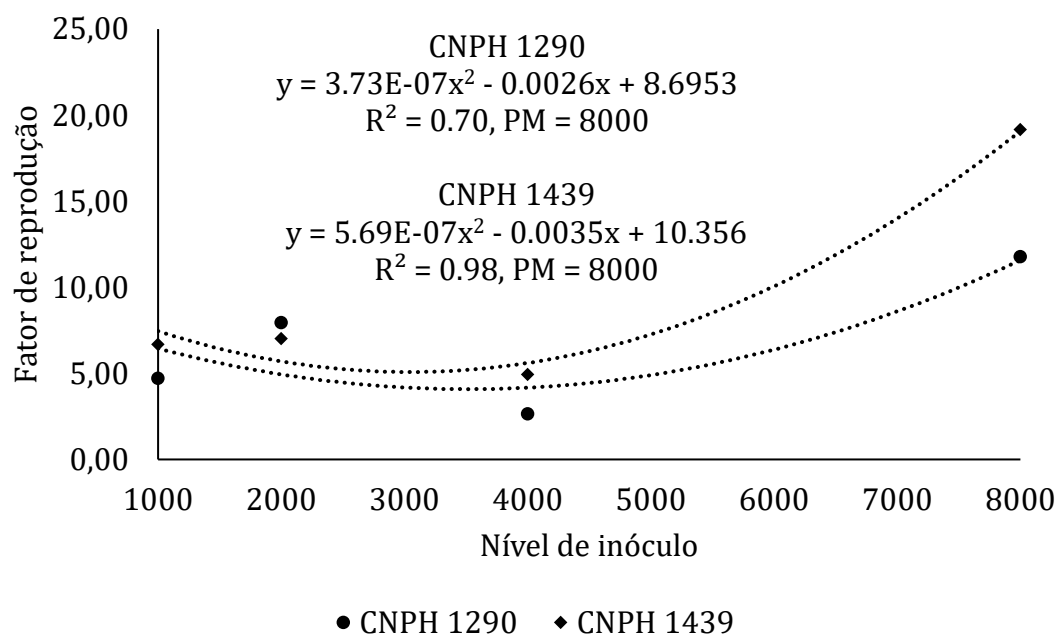


Figura 2.7. Curvas de regressão para o Fator de Reprodução dos acessos CNPH 1035 e CNPH 1048 em resposta a crescentes níveis de inóculo do nematoide-das-galhas *Meloidogyne enterolobii*. PM = ponto de máxima, ou valor máximo da curva de regressão referente ao eixo x do gráfico. R^2 = coeficiente de determinação.

Similarmente, os acessos CNPH 0859, 1516 e 1048 também demonstraram padrões semelhantes, embora com discrepâncias menores. Em contrapartida, no estudo de Pinheiro e colaboradores, esses acessos foram categorizados como moderadamente resistentes, enquanto que nesse novo estudo foi verificada uma possível redução do grau de resistência quando expostos a um nível de inóculo mais elevado.

É válido destacar que a dinâmica do FR nos diferentes níveis de inóculo pode ser explicada pelo fenômeno de competição, no qual a infecção e a multiplicação dos nematoides são influenciadas pela densidade populacional. Quanto maior a densidade populacional, existe uma tendência a competição por sítios de alimentação, e consequentemente destruição de radículas, ocasionando redução nos valores de FR, podendo assim haver uma pseudo-leitura nos resultados das variáveis nematológicas analisadas. Este fenômeno foi previamente documentado por Kayani et al. (2017) em Acessos de pepino submetidos a níveis variados de inóculo de *Meloidogyne incognita*.

Vários estudos na literatura sustentam a validade desta pesquisa, elucidando que o gene *Mi*, embora confira resistência a 13 espécies de *Meloidogyne*, não manifesta eficácia

contra a *M. enterolobi* Gabriel et al., (2020). No trabalho de Silva et al. (2020) todos os acessos de tomate com o gene *Mi* foram suscetíveis a *M. enterolobii*, confirmando assim a capacidade desse nematoide de se reproduzir em plantas portadoras deste gene. Naquele trabalho os indutores de resistência *B. subtilis*, *B. licheniformis* + *B. subtilis* + *T. longibrachiatum* e extrato de *R. sachalinensis* não influenciaram a população final do nematoide em nenhum dos Acessos utilizados.

No estudo de Melo et al. (2011), seis acessos de tomate foram submetidos a uma suspensão contendo 3360 Ovos + eventuais J2 de *M. enterolobii* em casa de vegetação. Os Acessos avaliados consistiam em dois da espécie *Solanum lycopersicum* TOM-584 e TOM-684, dois de *Solanum habrochaites* PI-127826 e PI-134417, um de *Solanum pennellii* LA-716, e um de *Solanum peruvianum* PI-126443. A linhagem de tomate TOM-684 foi empregada como referência de resistência a *Meloidogyne* (*M. incognita* e *M. javanica*). Os resultados revelaram a suscetibilidade de todos os Acessos de tomate avaliados à infestação por *M. enterolobii*. Apesar da linhagem TOM-684 ser portadora do gene dominante *Mi-1.2*, reconhecido por conferir resistência às espécies *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica* (Williamson, 1998), sua resistência demonstrou-se ineficaz à *M. enterolobii*, corroborando observações anteriores de Carneiro et al. (2006b) e Cantu et al. (2009). Adicionalmente, a pesquisa de Melo et al. (2011) constatou que o acesso *S. peruvianum* PI-126443, portador dos genes *Mi* e *Mi-3*, este último responsável por conferir resistência a *M. incognita* em condições de elevadas temperaturas do solo (Devran et al., 2010), também exibiu elevada suscetibilidade a *M. enterolobii*. Estes resultados respaldam os resultados do presente trabalho, indicando que tanto o gene *Mi*, presente em diversas cultivares e porta-enxertos comerciais de tomate, quanto o gene *Mi-3*, que se mostrara promissor para o controle de *Meloidogyne* sob condições de elevada temperatura do solo (Devran et al., 2010), não conferem efetividade no controle de *M. enterolobii*.

5. CONCLUSÕES

- Todos os acessos de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) avaliados se comportaram como suscetíveis sob os quatro níveis de inóculo testados (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + eventuais juvenis de segundo estágio (O+J2) de *Meloidogyne enterolobii*. Todavia, os acessos CNPH 1048, CNPH 1035, CNPH 1289 e CNPH 0378 apresentaram FR baixos e sem grandes variações a medida que aumenta o nível de inóculo.
- Os resultados observados sugerem que uma dose de inóculo entre 1000 a 2000 O+J2 de *Meloidogyne enterolobii* pode ser considerada ótima e muitas vezes suficiente para desencadear a expressão máxima dos sintomas nos tomateiros em estudo, indicando que, em relação à infecção e proliferação de *M. enterolobii*, em níveis mais elevados de inóculo podem não ser necessariamente vantajosos para a manifestação dos sintomas.
- Os dados demonstram que, de forma geral, uma vez atingido esse limiar, observou-se uma subsequente redução nos sintomas manifestados. Desta forma, avaliações ainda mais amplas de coleções de germoplasma de *Solanum (Lycopersicon)* devem ser conduzidas em busca de fontes de resistência (ainda não disponíveis) a esse emergente patógeno do tomateiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BONETI, J.; FERRAZ, J.B.S. (1981) Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira 6:533.
- CRUZ, C.D. (2016) Genes Software-extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. Acta Scientiarum Agronomy 38:547-552.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. (2001) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 1st ed. Imprensa Universitária. Viçosa.
- DAREUS, R.; PORTO, A.C.M.; BOGALE, M.; DIGENNARO, P.; CHASE, C.A.; RIOS, E.F. (2021) Resistance to *Meloidogyne enterolobii* and *Meloidogyne incognita* in cultivated and wild cowpea. HortScience 56 (4):460–468.
- DEVTRAN, Z.; SOGUT, M.A.; MUTLU, N. (2010) Response of tomato rootstocks with the *Mi* resistance gene to *Meloidogyne incognita* race 2 at different soil temperatures. Phytopathologia Mediterranea 49:11-17.
- GABRIEL, M.; KULCZYNSKI, S.M.; MUNIZ, M.F.; BOITEUX, L.S.; CARNEIRO, R.M. (2020) Reaction of a heterozygous tomato hybrid bearing the *Mi*-1.2 gene to 15 *Meloidogyne* species. Plant Pathology 69(5):944-952.
- HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. (1973) A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter 57:1025-1028.
- KOUTSOVOULOS, G.D.; POULLET, M.; ELASHRY, A.; KOZLOWSKI, D.K.; SALLET, E.; DA ROCHA, M.; BARBEOCH, L.P.; JIMENEZ, C.M.; FREY, J.E.; AHRENS, C.H.; KIEWNICK, S.; DANCHIN, E.G.J. (2020) Genome assembly and annotation of *Meloidogyne enterolobii*, an emerging parthenogenetic root-knot nematode. Scientific Data 7(1):324.
- MELO, O.D.; MALUF, W.R.; GONÇALVES, R.J.D.S.; GONÇALVES NETO, A.C.; GOMES, L.A.A.; CARVALHO, R.D.C. (2011) Triagem de Acessos de hortaliças para resistência a *Meloidogyne enterolobii*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 46:829-835.
- MIN, Y.Y.; TOYOTA, K.; SATO, E. (2012) A novel nematode diagnostic method using the direct quantification of major plant-parasitic nematodes in soil by real time PCR. Nematology 14 (3): 265–276.
- MOSLEHI, S.; NIKNAM, G.; SEYED, A.M.; MAGHSOUD, P. (2015) Response of tomato wild species, landraces and commercial cultivars to *Meloidogyne javanica* infection as revealed by molecular and conventional approaches. Journal of Biodiversity and Environmental Science 7(6):80–89.
- ONKENDI, E.M.; KARIUKI, G.M.; MARAIS, M.; MOLELEKI, L.N. (2014) The threat of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in a Africa: A review. Plant Pathology 63 (4):727–737.

OOSTENBRINK, M. (1966) Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mendelingen Landbouwhoghe school Wageningen* 6:01-46.

PINHEIRO, J.B.; BOITEUX, L.S.; LOPES, C.A.; SILVA, G.O. (2009) Identificação de fontes de resistência ao nematóide *Meloidogyne mayaguensis* em acessos de tomateiro (*Solanum* secção *Lycopersicon*) Brasília: Embrapa Hortaliças, 18p. (Embrapa Hortaliças. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 56).

PINHEIRO, J.B.; BOITEUX, L.S.; PEREIRA, R.B.; ALMEIDA, M.R.A.; CARNEIRO, R.M.D.G. (2014) Identificação de espécies de *Meloidogyne* em tomateiro no Brasil. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* no. 102. Brasília, DF, Brazil: Embrapa Hortaliças.

PINHEIRO, J.B.; BOITEUX, L.S.; ALMEIDA, M.R.A.; PEREIRA, R.B.; GALHARDO, L.C.S.; CARNEIRO, R.M.D.G. (2015) First report of *Meloidogyne enterolobii* in *Capsicum* rootstocks carrying the Me1 and Me3/Me7 genes in central Brazil. *Nematropica* 45:184–188.

PINHEIRO, J.B.; DA SILVA, G.O.; DE JESUS, J.G.; BISCAIA, D.; MELO, R.A.D.C. (2020). Resistance sources to root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* in *Solanum* species. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 32(4):303-308.

PINTO, T.J.B.; SILVA, G.O.; VENDRAME, L.P.C.; PINHEIRO, J.B.; SANTOS, L.A.; CUNHA, D.F.; MELO, R.A.C.; CARES, J.E. (2023) Sources of root-knot nematode (*Meloidogyne enterolobii*) resistance in sweetpotato genotypes; *Horticultura Brasileira* 41:1-5.

PHILBRICK, A.N.; ADHIKARI, T.B.; LOUWS, F.J.; GORNY, A.M. (2020) *Meloidogyne enterolobii*, a major threat to tomato production: current status and future prospects for its management. *Frontiers in Plant Science* 11:606395.

SIKANDAR, A., ZHANG, M., WANG, Y., ZHU, X., LIU, X., FAN, H.; XUAN, X.; CHEN, L.; DUAN, Y.X. et al. (2020a) *In vitro* evaluation of *Penicillium chrysogenum* Snef1216 against *Meloidogyne incognita* (root-knot nematode). *Sci. Rep.* 10 (1): 1–9.

SIKANDAR, A.; ZHANG, M.; WANG, Y.; ZHU, X.; LIU, X.; FAN, H.; XUAN, X.; CHEN, L.; DUAN, Y.X. (2020b) Review article: *Meloidogyne incognita* (root-knot nematode) a risk to agriculture. *Applied Ecology and Environmental Research* 18 (1):1679–1690.

SILVA, A.J.; DE OLIVEIRA, G.H.; PASTORIZA, R.J.; MARANHÃO, E.H.; PEDROSA, E.M.; MARANHÃO, S.R.; BOITEUX, L.S.; PINHEIRO, J.B.; DE CARVALHO, J.L.S. (2019) Search for sources of resistance to *Meloidogyne enterolobii* in commercial and wild tomatoes. *Horticultura Brasileira* 37:188-198.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. (1978) Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Raleigh, North Carolina, State University 111p.

WILLIAMSON, V.M. (1998) Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. *Annual Review of Phytopathology* 36:277-293.

CAPÍTULO 3

Estimativa de um potencial efeito residual do gene *Mi-1.2* em *Meloidogyne enterolobii*: Análise empregando linhagens isogênicas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*)

RESUMO

Meloidogyne enterolobii é uma das principais ameaças ao cultivo de muitas espécies vegetais em escala global devido seu amplo perfil de virulência, sendo capaz de “quebrar” o efeito de fatores resistência a outras espécies de *Meloidogyne* em diferentes espécies hospedeiras. Alguns genes de resistência, em diferentes patossistemas, mesmo não apresentando expressão de completo controle do patógeno podem apresentar efeitos “residuais” ou “ghost effects” que podem se expressar por interferências quantitativas na interação com populações do patógeno que superaram essa resistência. *Meloidogyne enterolobii* também representa uma grave ameaça ao cultivo do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) devido a capacidade de “quebrar” a resistência conferida pelo gene *Mi-1.2*. No entanto, potenciais efeitos residuais do gene *Mi-1.2* a *M. enterolobii* ainda não foram investigados. O presente trabalho visou verificar o potencial efeito residual do gene dominante *Mi-1.2* em ensaios comparativos empregando linhagens isogênicas (isolinhas) contrastantes para esse fator de resistência. A reação das linhagens isogênicas foi avaliada empregando diferentes níveis de inóculo (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + J2s) de *M. enterolobii*. O experimento foi conduzido em vasos plásticos (2 L) na casa de vegetação da Embrapa Hortaliças. Foram avaliados (para cada nível de inóculo de *M. enterolobii*) o par contrastante de linhagens isogênicas: ‘Rio Grande’ (homozigoto recessivo; *mi-1.2/mi-1.2*) versus ‘Nemadoro’ (homozigoto dominante; *Mi-1.2/Mi-1.2*), além das isolinhas Europel, Calipso, Itaparica, LAM 133, LAM 135 e LAM 162. A condição alélica de cada planta individual foi confirmada por meio da utilização de marcadores moleculares ligados ao locus *Mi-1.2*. Foram utilizadas as cultivares ‘Rutgers’ (sem o gene *Mi-1.2*) e ‘Tospodoro’ (contendo o gene *Mi-1.2*) como testemunhas. O delineamento experimental empregado foi em blocos casualizados (DBC) com quatro repetições por nível de inóculo. A unidade experimental foi constituída de uma planta por vaso. Avaliou-se as raízes 45 dias após a inoculação (DAI) quanto ao índice de galhas (IG), índice de massa de ovos (IMO), número de ovos por grama de raiz (NOGR) e fator de reprodução (FR). A partir das variáveis FR e nível de inóculo, calculou-se a curva de regressão e as médias foram agrupadas pelo teste de Scott & Knott ($P < 0,05$). Observou-se que a isolinha ‘Nemadoro’ (com *Mi-1.2*) apresentou um FR ligeiramente maior que a sua isolinha contrastante (sem *Mi-1.2*). A partir deste estudo, utilizando cultivares geneticamente relacionadas (com *background* genético similar), foi possível identificar que o gene de resistência *Mi-1.2* não confere um efeito residual significativo a espécie *M. enterolobii*. Conseqüentemente, o gene *Mi-1.2*, embora extremamente efetivo a pelo menos 13 espécies de *Meloidogyne*, não é capaz de interferir no processo de infecção de *M. enterolobii* em raízes do tomateiro.

Palavras-chaves: Nematóide-das-galhas, Resistência genética, Tomate

ABSTRACT

Estimating a potential residual effect of the *Mi-1.2* gene on *Meloidogyne enterolobii*: Analysis using isogenic tomato (*Solanum lycopersicum*) lines

Meloidogyne enterolobii is one of the main threats to the cultivation of many plant species on a global scale due to its broad virulence profile, being able to “break-down” the effect of resistance factors against a wide range of other *Meloidogyne* species. Some resistance genes, in different pathosystems, even if they do not show complete control of the pathogen, may show “residual” or “ghost effects” that can be expressed by quantitative interference in the interaction with populations of the pathogen that have overcome this resistance. *Meloidogyne enterolobii* is also a serious threat to tomato cultivation (*Solanum lycopersicum*) due to its ability to “break-down” the resistance conferred by the *Mi-1.2* gene. However, potential residual effects of the *Mi-1.2* gene against *M. enterolobii* were not yet investigated. The present work aimed to verify the potential residual effect of the dominant *Mi-1.2* gene in comparative assays using isogenic inbred lines (isolines) contrasting for this resistance factor. The reaction of isogenic strains was evaluated using different levels of inoculum (1000, 2000, 4000 and 8000 eggs + J2s) of *M. enterolobii*. The experiment was carried out in plastic pots (2 L) in the greenhouse at Embrapa. The contrasting pair of perfect isogenic lines were evaluated (for each inoculum level of *M. enterolobii*): ‘Rio Grande’ (homozygous recessive, *mi-1.2/mi-1.2*) versus ‘Nemadoro’ (homozygous dominant; *Mi-1.2/Mi-1.2*), in addition to a set of quasi-isogenic lines Europel, Calipso, Itaparica, LAM 133, LAM 135, and LAM 162. The allelic status of each individual plant was confirmed using molecular markers linked to the *Mi-1.2* locus. The cultivars ‘Rutgers’ (without the *Mi-1.2* gene) and ‘Tospodoro’ (containing the *Mi-1.2* gene) were used as controls. The experimental design used was randomized blocks (DBC) with four replications per inoculum level. The experimental unit consisted of one plant per pot. Plants were inoculated with four levels of inoculum (1000, 2000, 4000 and 8000 eggs + J2s) of *M. enterolobii* at 3 days after transplanting (DAT). Roots were evaluated 45 days after inoculation (DAI) for gall index (GI), egg mass index (IMO), number of eggs per gram of root (NOGR) and reproduction factor (FR). From the variables RF and level of inoculum, the regression curve was calculated, and the averages were grouped by the Scott-Knott test ($P < 0.05$) of probability. It was observed that the ‘Nemadoro’ isolate (with *Mi-1.2*) presented a slightly higher FR than its contrasting isolate (without *Mi-1.2*). From this study, using genetically related cultivars (with extremely similar genetic background), it was possible to identify that the *Mi-1.2* resistance gene does not confer a significant residual effect against the *M. enterolobii* species. Consequently, the *Mi-1.2* gene, although extremely effective against at least 13 *Meloidogyne* species, is not capable of interfering with the *M. enterolobii* infection process in tomato roots.

Keywords: Root-knot nematode, Genetic resistance, Tomato

1. INTRODUÇÃO

Os nematoides-das-galhas do gênero *Meloidogyne* Goeldi são organismos endoparasitas obrigatórios, pertencentes ao filo Nematoda, que residem nas raízes de um amplo espectro de plantas, abrangendo mais de 3.000 espécies distintas (Sikandar et al., 2020a). O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma hortaliça produzida em escala global que é frequentemente afetada pelo ataque de diferentes espécies de *Meloidogyne* (Pinheiro et al., 2014). Esses patógenos restringem tanto a quantidade quanto o rendimento de frutos (Tariq-Khan et al., 2017; Mukhtar et al., 2017).

Levantamentos têm indicado *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* como as principais espécies associadas com a cultura do tomateiro no Brasil (Pinheiro et al., 2015). No entanto, *M. enterolobii* (Yang & Eisenback, 1983) representa uma espécie com especial destaque na cultura do tomateiro devido a sua recente expansão geográfica, ampla gama de hospedeiros e pela capacidade de “quebrar” a resistência conferida pelo gene *Mi-1.2* (Tigano et al., 2010; Gabriel et al., 2020; Dareus et al., 2021) bem como outras fontes de resistência em diferentes espécies hospedeiras (Pinheiro et al., 2015; Koutsovoulos et al., 2020). Por exemplo, *M. enterolobii* consegue infectar e causar danos em fontes de resistência reportadas como eficientes a outras espécies de *Meloidogyne*, incluindo o gene *N* em *Capsicum annuum*, o gene *Rk* de *Vigna unguiculata*, o gene *Mir1* em *Glycine max*, o gene *Mh* de *S. tuberosum* e o gene *Mi-1* de *Gossypium hirsutum*, *Ipomoea batatas* e *Solanum lycopersicum* (Schwarz, 2019; Collett et al., 2021).

Vários genes de resistência foram relatados (Jaiteh et al. 2012; Wang et al. 2013; Okorley et al. 2018). No entanto, o gene *Mi-1.2* permanece sendo o principal fator de resistência empregado no melhoramento genético (Gabriel et al., 2020; 2022). Esse gene dominante foi introgridido a partir do parente selvagem do tomateiro *Solanum peruvianum* (Bailey 1941; Gilbert & McGuire 1956). A região genômica no cromossomo 6 onde o gene *Mi-1* está localizado contém um agrupamento de diferentes genes do tipo NBS-LRR (denominados de *Mi-1.1* até *Mi-1.7*) que apresentam elevados níveis de similaridade estrutural entre si. No entanto, estudos adicionais demonstraram que apenas o gene *Mi-1.2* é capaz de codificar um gene de resistência funcional aos NGs (Milligan et al. 1998; Seah et al., 2007). Esta fonte de resistência se mostrou eficaz as três espécies mais importantes de NGs: *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. incognita* (Roberts 1992; Williamson 1998). No entanto, o gene *Mi-1.2* se mostrou inefetivo quando desafiado com populações

de *M. hapla* e *M. enterolobii* e também contra populações virulentas de *M. javanica* coletadas no Sul do Brasil (Gabriel et al., 2022). Esse perfil de virulência de *M. enterolobii* em relação ao gene *Mi-1.2* representa grave ameaça ao cultivo do tomateiro em regiões tropicais e subtropicais.

Alguns genes de resistência, em diferentes patossistemas, mesmo não apresentando expressão de completo controle do patógeno podem apresentar efeitos “residuais” ou “ghost effects” que podem se expressar por interferências quantitativas na interação com populações do patógeno que superaram essa resistência (referencias em vermelho). No entanto, os potenciais efeitos residuais do gene *Mi-1.2* em *M. enterolobii* ainda não foram adequadamente investigados. No presente estudo, considerando que a espécie de nematoide *M. enterolobii* tem demonstrado capacidade de superar a resistência conferida pelo gene *Mi-1.2*, que tem sido amplamente utilizado contra outras espécies de *Meloidogyne*, o objetivo foi investigar o potencial efeito residual do gene *Mi-1.2* em ensaios comparativos utilizando linhagens isogênicas (isolinhas) que diferem apenas nesse fator de resistência.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização da área experimental

Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação e nos Laboratórios de Nematologia, Melhoramento e Genômica na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), na Unidade Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNP/Embrapa Hortaliças). A unidade se localiza na Rodovia BR-060, Km 09 (Brasília/Anápolis), Fazenda Tamanduá, Gama – Distrito Federal, altitude de 996 metros e coordenadas geográficas de 15°56'00" de latitude Sul e 48°08'00" de longitude a Oeste.

2.2 Obtenção, identificação e multiplicação de *Meloidogyne enterolobii*

Fêmeas de *M. enterolobii* coletadas de raízes de pimentão na área de produção de Taquara e Pípiripau no Distrito Federal, Brasil foram multiplicadas em tomateiros cultivar 'Rutgers' e mantidas em casa de vegetação. A espécie do inóculo foi confirmada utilizando-se a técnica bioquímica Eletroforese de Isoenzimas de acordo com o fenótipo de esterase En₂, o qual apresenta duas bandas principais (R_m: 0,7; 0,9) e duas bandas mais fracas (R_m 0,75; 0,95) (Carneiro & Almeida, 2001). Para tal, fêmeas individuais de coloração branco-leitosa foram extraídas das raízes e inseridas nos tubos hematócitos não heparinizados contendo 8 µl de solução de extração (constituída por 5 g de sacarose, 0,25g de Triton X-100 e 15 ml de água destilada). Adicionou-se 2,5 µl da Solução F (azul de bromofenol) em cada tubo contendo as fêmeas maceradas. Até o momento da utilização, os tubos contendo as fêmeas foram mantidos no gelo em recipiente do tipo gerbox e armazenados em freezer (-18° C). Para a produção de inóculo, o nematoide foi multiplicado em plantas de tomate cv. 'Rutgers' em vasos com capacidade de 5 litros contendo uma mistura de solo e areia esterilizada na proporção (2:1). As plantas foram inoculadas com suspensão de 5.000 ovos e eventuais juvenis de segundo estágio (J2) de *M. enterolobii* aos 3 dias após o transplante (DAT). Aos 65 dias após a inoculação, ovos e J2 foram extraídos dos sistemas radiculares das plantas de tomate segundo a técnica de Hussey & Barker (1973) modificada por Bonetti & Ferraz (1981), que consiste em processar todo sistema radicular infectado de cada planta em liquidificador com hipoclorito de sódio a 0,5%. Em seguida, o material processado passou por um conjunto de três peneiras sobrepostas: 42 mesh (0,354 mm), 100 mesh (0,149 mm) e 500 mesh (0,025mm de abertura de malha), para a obtenção da suspensão de inóculo que é constituída pelos ovos e J2 retidos na peneira de 500 mesh. A suspensão de ovos e J2 foi

recolhida em um béquer de vidro para quantificação e calibração do inóculo em câmara de Peter com auxílio de um microscópio óptico (modelo Nikon Eclipse 80i).

2.3 Delineamento experimental

O desenho experimental utilizado foi em delineamento em blocos casualizados (DBC) com quatro repetições por nível de inóculo (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + J2s) de *Meloidogyne enterolobii*. A unidade experimental foi constituída de 1 planta por vaso. Foram avaliados (para cada nível de inóculo de *M. enterolobii*) o par contrastante de linhagens isogênicas: ‘Rio Grande’ (*Mi-1.2/ Mi-1.2*) versus ‘Nemadoro’ (*Mi-1.2/ Mi-1.2*). A cultivar ‘Rutgers’ e “Tosporo” foram utilizadas como testemunhas padrão de suscetibilidade e resistência, respectivamente, afim de verificar a viabilidade do inóculo.

2.4 Instalação e condução dos experimentos

O experimento foi conduzido entre 15 de novembro de 2022 a 30 de janeiro de 2023. Para os ensaios, as sementes dos acessos de espécies de *Solanum* (*Lycopersicon*) oriundos de uma coleção de germoplasma da Embrapa Hortaliças foram semeadas em bandejas de poliestireno com 128 células piramidais invertidas (40 mL/célula) em substrato estéril Bioplant ® e mantidas por 20 dias. Posteriormente, mudas de tomates com aproximadamente 15 cm foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 2 litros, contendo uma mistura de solo e areia esterilizados na proporção (2:1). A irrigação foi feita mediante as necessidades das plantas, sendo realizadas geralmente, três vezes ao dia: início da manhã, início e final da tarde.

2.5 Preparo de suspensão e inoculação das plantas de tomate

O preparo da suspensão foi realizado conforme Hussey & Barker (1973) modificada por Bonetti & Ferraz (1981). *Meloidogyne enterolobii* foi extraído dos sistemas radiculares do tomateiro ‘Rutgers’, sabidamente suscetível a *M. enterolobii*. A cultivar é reconhecida mundialmente para a multiplicação de espécies de *Meloidogyne*. As plantas individuais foram inoculadas com quatro níveis de inóculo (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + eventuais J2) de *M. enterolobii* aos 3 dias após o transplântio (DAT) para os vasos, depositadas em 3 orifícios de 2 cm de profundidade entorno da planta (**Fig. 3.1**).



Figura 3.1. A: Marcação dos orifícios para deposição do inóculo B: Inoculação de suspensão de ovos + J2 de *Meloidogyne enterolobii* em acessos de espécies de *Solanum* (*Lycopersicon*). Foto: Thávio J. B. Pinto

2.6 Material vegetal e confirmação da presença/ausência do gene *Mi-1.2*

Duas cultivares contrastantes de tomateiro foram utilizados nesses ensaios: a cultivar ‘Rio Grande’ (*Mi-1.2/ Mi-1.2*) versus ‘Nemadoro’ (*Mi-1.2/ Mi-1.2*). O DNA foi extraído das dezesseis plantas por cultivar, sendo quatro plantas em cada nível de inóculo de *M. Enterolobii* (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + eventuais J2s) a fim de confirmar a presença/ausência do gene/locus *Mi-1.2*. Uma metodologia CTAB 2 x modificada foi empregada para purificação de ácidos nucléicos (Boiteux et al., 1999), utilizando amostras de folhas apicais jovens (**Fig. 3.2**). O *Pellet* de DNA foi lavado cuidadosamente com etanol a 70%. Os tubos de microcentrífuga foram então colocados em uma estufa a 37 °C por 20 min, e ressuspensos em 100 mL de tampão Tris-EDTA + RNase. As amostras purificadas foram agitadas/homogeneizadas em vórtice e armazenadas em um freezer (-20°C).



Figura 3.2. **A:** Coleta de material vegetal das cultivares contrastantes de tomateiro: cultivar ‘Rio Grande’ (*Mi-1.2/ Mi-1.2*) versus ‘Nemadoro’ (*Mi-1.2/ Mi-1.2*) com auxílio de alicate; **B:** Discos de material vegetal e posterior armazenamento nos tubos de empedorf refrigerados. **Foto:** Dwillian F. Cunha

A PCR foi realizada com o par de iniciadores mi23F (5’-TGG AAA AAT GTT GAA TTT CTT TTG-3’) e mi23R (5’-GCA TAC TAT ATG GCT TGT TTA CCC-3’), considerado o marcador molecular codo minante mais confiável para a detecção de alelos contrastantes no *Mi-1.2* gene/*locus* (Seah et al., 2007; Bhavanaet al., 2019). O volume final da mistura foi de 25 μ L (23 μ L master mix + 2 μ L DNA). O master mix consistiu de 11,32 μ L de água milliQ, 2,5’ μ L de tampão Taq polimerase 10 \times (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3; KCl 500 mM), 5,7 μ L de dNTPs (0,5 mM, Invitrogen), 0,5 μ L de cada primer (0,5 mM), 2,3 μ L de MgCl₂ (25 mM), 0,18 μ L de DNA polimerase *Taq* DNA polimerase (5 U/ μ L, Invitrogen) (**Fig. 3.3**).

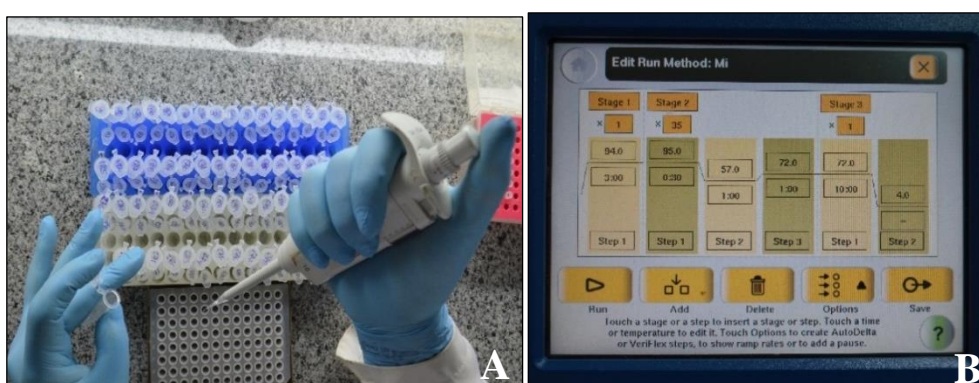


Figura 3.3. **A:** Aplicação do master mix + suspensão de DNA em cada amostra **B:** Parâmetros utilizados nas amplificações da PCR. **Foto:** Dwillian F. Cunha

As amplificações foram realizadas com os seguintes parâmetros: passo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos,

anelamento a 59°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1,5 minutos; e uma etapa final de extensão de 68°C por 10 minutos. Foi adicionado azul de bromofenol (5 µL) em cada amostra, e os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em tampão TBE (Tris-borato 40 mM, EDTA 1 mM), em um gel de agarose a 1,7% suplementado com brometo de etídio, a 80 V por um período de aproximadamente 4 a 5 horas. Os géis foram fotografados sob luz UV. Omarcador 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) foi colocado para localização do perfil de amplificação.

2.7 Avaliação do experimento

Sessenta e cinco dias após a inoculação, os sistemas radiculares das plantas foram coletados e avaliadas as seguintes variáveis nematológicas: Índice de galhas (IG), Índice de massa de ovos (IMO), Número de ovos+J2 por grama de raiz (NOGR) e o Fator de reprodução (FR). Para os índices de galha e massa de ovos, as raízes foram avaliadas conforme escala proposta por Taylor & Sasser (1978): índice 1, de 1 a 2 galhas e massas de ovos; índice 2, de 3 a 10; índice 3, de 11 a 30; índice 4, de 31 a 100 e índice 5 maior que 100 e o cálculo do fator de reprodução (FR) a relação entre população final (Pf) e população inicial (Pi) do nematoide em cada planta. As raízes foram separadas de suas partes aéreas, lavadas e avaliados os seus pesos frescos, para posterior cálculo do número de ovos por grama de raiz. Em seguida, foram coradas com Floxina B (6 mg/L) por 15-20 min (Taylor & Sasser, 1978), a fim de facilitar a visualização das massas de ovos externas dos nematoides e quantificados com o auxílio de uma lupa quanto aos índices de galhas e massas de ovos. Em seguida, processadas separadamente, para extração de ovos e juvenis conforme técnica de Hussey & Barker (1973) modificada por Bonetti & Ferraz (1981) para quantificação e determinação do fator de reprodução (Oostenbrink, 1966).

2.8 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com auxílio do software Genes (Cruz, 2016). Antes da análise, os dados foram verificados quanto à normalidade pelo Teste de Lilliefors, e todos estavam normais. Os dados resultantes foram submetidos a análises de variância; as médias das variáveis foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Nas tabelas as médias apresentadas são as originais sem transformação. Foram estimados também o coeficiente de variação ambiental (CV), coeficiente de variação genotípico (CVg) e o coeficiente de determinação genotípico (H²), de acordo com Cruz & Regazzi (2001).

$$CV = 100 \times \frac{\sqrt{\text{quadrado médio residual}}}{\text{Média}}$$

$$CV(g) = \frac{\sqrt{\sigma^2}}{\text{Média}}, \text{ sendo } \sigma^2 \\ = \frac{\text{quadrado médio dos Acessos} - \text{quadrado médio residual}}{\text{número de repetições}}$$

$$H^2 = \frac{\text{Quadrado médio dos Acessos} - \text{Quadrado médio residual}}{\text{Quadrado médio dos Acessos}}$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que todas as isolinhas estudadas foram consideradas suscetíveis. Observou-se diferenças significativas ($P \leq 0.01$ ou $P \leq 0.05$) entre os níveis de inóculo (NI), entre os Acessos (G) e na interação entre esses dois fatores (NI x G) para índice de galhas (IG), índice de massa de ovos (IMO) e fator de reprodução (FR). Esse fato reflete a alta variabilidade genética entre os Acessos avaliados na reação de resistência ao ataque dos nematoides-das-galhas (*M. enterolobii*) e que os níveis de inóculo interferiram de forma diferente nas expressões das variáveis nematológicas dos Acessos avaliados para IG, IMO e FR.

Os coeficientes de variação foram considerados baixos para a maioria das variáveis avaliadas, porém para o número de ovos por grama de raiz (NOGR) um valor de 158,25 indica que, para essa característica, a precisão experimental foi menor. Isso porque a variação entre repetições para os mesmos tratamentos foi muito grande, o que elevou o coeficiente de variação (CV%). O coeficiente de determinação genotípico (H^2) foi elevado para o fator de reprodução (FR) (H^2 : 91%), o que indica a predominância da variabilidade de ordem genética sobre a variabilidade total, bem como um grau satisfatório de precisão para os resultados obtidos para esse caractere. Em contrapartida, (H^2) foi considerado baixo para o NOGR, (H^2 : 35%), o que demonstra menor predominância de efeitos de ordem genética para essa variável (**Tabela 3.1**).

Tabela 3.1. Resumo da análise de variância, com os quadrados médios e significância de isolinhas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*), submetido a *Meloidogyne enterolobii*, Brasília, DF, 2023.

Fonte variação	GL	Índice de galhas	Índice de massa de ovos	Número de ovos + J2 por grama de raiz	Fator de reprodução
Blocos	3	0,004	0,005	97,98 10 ⁵	167,07
Acessos (G)	9	1,082*	0,97*	27,31 10 ⁶	703,99*
Níveis de inóculo (NI)	3	19,56*	25,27*	59,01 10 ⁶	264,34*
G x NI	14	2,07*	0,85*	16,59 10 ⁶	435,59*
Resíduo	47	2,59	0,84	15,20 10 ⁶	62,60
Média geral	-	4,53	3,85	2464,16	16,52
CV %	-	16,92	14,78	158,25	47,90
H^2 %	-	0,68	0,65	0,35	0,91

* Significativo a 5% pelo teste F. H^2 : coeficiente de determinação genotípico ou herdabilidade no sentido amplo, em porcentagem.

O padrão de suscetibilidade (tomateiro ‘Rutgers’), utilizado como controle, apresentou FRs moderados a altos (sempre $FR > 9$) considerando $P_i = (1000, 2000, 4000 \text{ e } 8000 \text{ ovos} + \text{eventuais J2})$ de *M. enterolobii* comprovando a viabilidade do inóculo. Na média do índice de galhas sob os diferentes níveis de inóculo (1000, 2000, 4000 e 8000 ovos + eventuais J2) de *M. enterolobii*, ficou evidente que no menor nível de inóculo 1000 ocorreu uma elevada variação genética entre os acessos (H^2 : 84%). Em contrapartida, quando nos maiores níveis de inóculo (4000 e 8000 O+J2), quase todas isolinhas apresentaram nota máxima para o índice de galhas (nota 5) e a herdabilidade foi zero (H^2 : 0,0 %). Dessa forma, nesses maiores níveis de inóculo proporcionaram níveis máximos de IG não proporcionando a verificação de diferenças entre os Acessos.

Vale ressaltar que, IG e IMO são parâmetros auxiliares na interpretação dos FRs para aferir a hospedabilidade de plantas aos nematoide-das-galhas. As médias variaram de 2,00 a 4,75; 4,00 a 5,00; 4,75 a 5,00 e 5,00 para o IG. Para o IMO compreendeu de 2,00 a 3,75; 3,25 a 4,75; 3,75 a 5,0; 4,25 a 5,0, respectivamente para as concentrações de 1000, 2000, 4000 e 8000 de *M. enterolobii* (Tabelas 3.2 e 3.3). O menor índice de galhas de *M. enterolobii* observado, correspondeu ao nível de inóculo 1 mil O+J2, representado com média de 3,50; sendo as isolinhas Tospodoro, Rio Grande, ‘Rutgers’ e Calipso com os menores índices de galhas (IG: 2,00; 2,25; 2,50 e 2,50), respectivamente. Quanto ao menor índice de massa de ovos, verificou-se no nível de inóculo 1 mil O+J2, com média de 2,85 e as isolinhas Tospodoro; Rio Grande; Rutgers e Calipso com os menores índices de massa de ovos (IG: 2,00; 2,00; 2,25 e 2,25), respectivamente.

Tabela 3.2. Reação de isolinhas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) inoculadas com diferentes níveis de inóculo de *Meloidogyne enterolobii*, baseada na variável IG, Brasília-DF, 2023.

Acessos	Nível de inóculo			
	1000	2000	4000	8000
Calipso	2,50 bB	4,50 bA	4,75 aA	5,00 aA
Europel	4,00 aB	5,00 aA	5,00 aA	5,00 aA
Itaparica	4,00 aB	5,00 aA	5,00 aA	5,00 aA
LAM 133	4,75 aA	5,00 aA	5,00 aA	5,00 aA
LAM 135	4,25 aA	5,00 aA	4,75 aA	5,00 aA
LAM 162	4,50 aA	5,00 aA	4,75 aA	5,00 aA
Nemadoro	4,25 aA	4,50 bA	5,00 aA	5,00 aA
Rio Grande	2,25 bC	4,25 bB	5,00 aA	5,00 aA
Rutgers	2,50 bB	4,75 aA	5,00 aA	5,00 aA
Tospodoro	2,00 bC	4,00 bB	5,00 aA	5,00 aA
Média	3,50	4,70	4,93	5,00
CV%	24,22	9,06	5,76	0,02

H ² %	0,84	0,67	0,00	0,00
Médias seguidas por letras diferentes minúsculas na coluna (comparação entre Acessos em cada nível de inóculo) e maiúsculas na linha (comparação entre níveis de inóculo para cada acessos), diferiram significativamente pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.				

Tabela 3.3. Reação de isolinhas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) inoculadas com diferentes níveis de inóculo de *Meloidogyne enterolobii*, baseada na variável IMO, Brasília-DF, 2023.

Acessos	Nível de inóculo			
	1000	2000	4000	8000
Calipso	2,25 bC	4,00 aB	3,75 aB	4,75 aA
Europel	3,00 aB	4,25 aA	4,50 aA	4,75 aA
Itaparica	3,75 aA	4,25 aA	4,25 aA	4,75 aA
LAM 133	3,50 aB	4,25 aA	4,50 aA	4,75 aA
LAM 135	3,00 aB	4,75 aA	4,25 aA	4,25 aA
LAM 162	3,25 aB	3,75 bB	4,00 aB	5,00 aA
Nemadoro	3,50 aB	3,50 bB	4,50 aA	4,50 aA
Rio Grande	2,00 bB	4,00 aA	4,50 aA	5,00 aA
Rutgers	2,25 bC	3,50 bB	5,00 aA	4,25 aA
Tospodoro	2,00 bD	3,25 bC	3,75 aB	5,00 aA
Média	2,85	3,95	4,30	4,70
CV%	27,43	12,70	11,67	11,06
H ² %	0,66	0,69	0,58	0,16

Médias seguidas por letras diferentes minúsculas na coluna (comparação entre Acessos em cada nível de inóculo) e maiúsculas na linha (comparação entre níveis de inóculo para cada Acessoacessoacesso), diferiram significativamente pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

Das isolinhas de tomateiro avaliadas, todas apresentaram FR > 1,0 (Oostenbrink, 1966), sendo assim considerados suscetíveis ao *M. enterolobii* (**Tabela 3.4**). O padrão de suscetibilidade (tomateiro ‘Rutgers’) destacou-se por apresentar o maior fator de reprodução do experimento (FR: 59,28) no menor nível de inóculo (1 mil O+J2 de *M. enterolobii*). Além disso, a isolinha Itaparica apresentou um FR muito elevado (FR: 44,69) sob 2 mil O+J2 de *M. enterolobii*.

Tabela 3.4. Reação de isolinhas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) inoculadas com diferentes níveis de inóculo de *Meloidogyne enterolobii*, baseada na variável FR, Brasília-DF, 2023.

Acessos	Nível de inóculo			
	1000	2000	4000	8000
Calipso	9,38 bA	11,66 cA	21,70 aA	9,18 aA
Europel	6,83 bA	12,41 cA	11,11 bA	13,13 aA
Itaparica	13,00 bC	44,69 aA	29,95 aB	14,17 aC
LAM 133	15,60 bA	20,20 cA	17,34 bA	17,44 aA
LAM 135	15,75 bB	28,70 bA	24,58 aA	14,41 aB

LAM 162	14,40 bA	15,68 cA	8,22 bA	15,67 aA
Nemadoro	16,50 bA	15,83 cA	14,33 bA	9,34 aA
Rio Grande	7,80 bA	11,59 cA	11,35 bA	6,31 aA
Rutgers	59,28 aA	17,21 cB	25,13 aB	13,00 aB
Tospodoro	14,48 bA	9,41 cA	10,84 bA	11,39 aA
Média	18,18	18,07	17,09	12,73
CV%	50,21	53,03	46,92	33,94
H ² %	0,93	0,80	0,68	0,64

Médias seguidas por letras diferentes minúsculas na coluna (comparação entre Acessos em cada nível de inóculo) e maiúsculas na linha (comparação entre níveis de inóculo para cada Acessoacessoacesso), diferiram significativamente pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

A isolinha ‘Nemadoro’ (portadora do gene *Mi-1.2*) apresentou 14,33 de FR quando exposta a um nível de inóculo de 4 mil O+J2 de *M. enterolobii*. Em contrapartida, no estudo de Pinheiro et al. (2021), observou-se uma taxa de reprodução significativamente menor, de apenas 0,03 sob o mesmo nível de inóculo. Vale ressaltar que, no contexto deste trabalho, as plantas exibiram bom volume radicular sendo provável que as condições ambientais tenham favorecido o estabelecimento de maior número de sítios de alimentação, resultando em maior multiplicação do nematoide.

No primeiro nível, todas as isolinhas, com exceção da testemunha ‘Rutgers’ não apresentaram diferença estatística no FR. Ao dobrar o nível de inóculo para 2 mil O+J2 de *M. enterolobii*, a ‘Itaparica’ destacou-se, exibindo o maior valor de FR. No nível de inóculo mais alto, ou seja, 8 mil O+J2 de *M. enterolobii*, não foram observadas diferenças significativas nos FRs entre os acessos. A testemunha ‘Nemadoro’, que possui o gene de resistência *Mi-1.2* contra *Meloidogyne* spp., manteve uma resposta estável aos quatro níveis de inóculo de *M. enterolobii*, não demonstrando variações estatisticamente significativas. Os resultados do FR foram apresentados também em equações de regressão.

Observou-se que o tomateiro ‘Rutgers’ (sem o gene *Mi-1.2*) alcançou um pico de 59,28 de FR, partindo de níveis iniciais relativamente baixos de inóculo (1 mil O+J2). Esses resultados conduzem à inferência de que a dose de inoculação de 1 mil O+J2 proporcionaria o máximo valor de FR, estimado em 59,28. Subsequentemente, os sintomas apresentaram redução após a consecução desse determinado nível de inóculo. Provavelmente, esse nível de inóculo seria o ideal para o maior FR na planta de tomateiro. Em contraposição, a linhagem Tospodoro (com o gene *Mi-1.2*) não manifestou expressão máxima nitidamente definida nos níveis de inóculo testados. Para se atingir o patamar

máximo de expressão de FR em ‘Tospodoro’, uma estimativa sugere a necessidade de nível de inóculo de 1 mil O+J2, resultando em valor FR de 14,48 (**Fig. 3.4**).

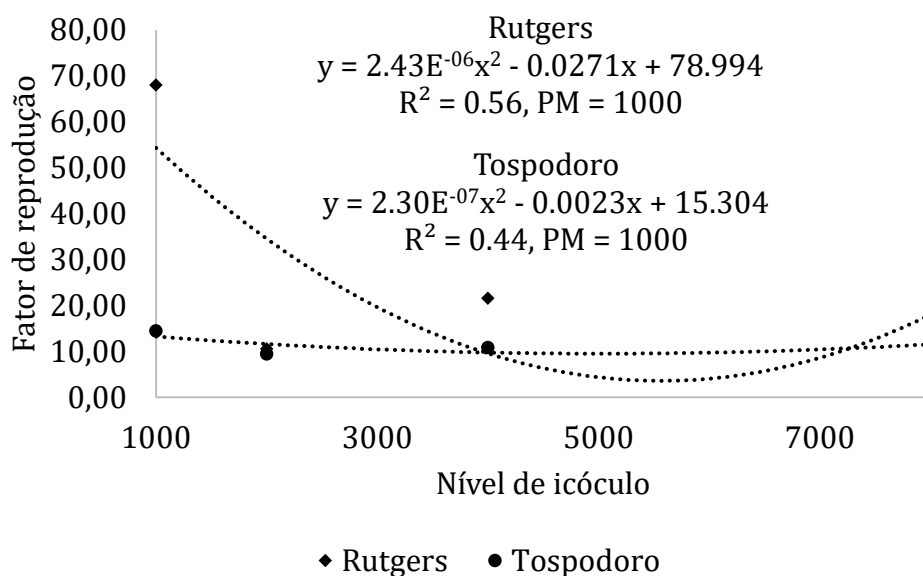


Figura 3.4: Curvas de regressão para a variável Fator de Reprodução para Acessos de tomate em resposta a crescentes níveis de inóculo do nematoide-das-galhas *Meloidogyne enterolobii*. PM = ponto de máxima, ou valor máximo da curva de regressão referente ao eixo x do gráfico. R^2 = coeficiente de determinação.

Em todos os níveis de inóculo a isolinha Nemadoro (com o gene *Mi-1.2*) apresentou maior taxa de multiplicação de *M. enterolobii* em comparação com a linhagem contrastante, Rio Grande (sem o gene *Mi-1.2*) (**Fig. 3.5**). ‘Nemadoro’ demonstrou um pico de 16,30 de FR a partir do menor nível de inóculo, 1 mil O+J2. Por outro lado, para a Rio Grande, foi observada elevada expressão de FR desde níveis relativamente baixos de inóculo, notadamente a 1 mil O+J2, alcançando um pico de 11,34 de FR por volta de 4065 O+J2 de *M. enterolobii*. Assim, a estimativa para o nível de inóculo que resultaria em um FR máximo indica níveis de 4 mil O+J2 inoculados, correspondendo a um valor de FR de 11,34. A partir desse ponto de inóculo, o FR começou a regredir. Esse decréscimo no FR a partir de determinados níveis de inóculo pode ser explicado pelo fenômeno de competição, em que níveis mais elevados interferem na infecção e na multiplicação dos nematoides.

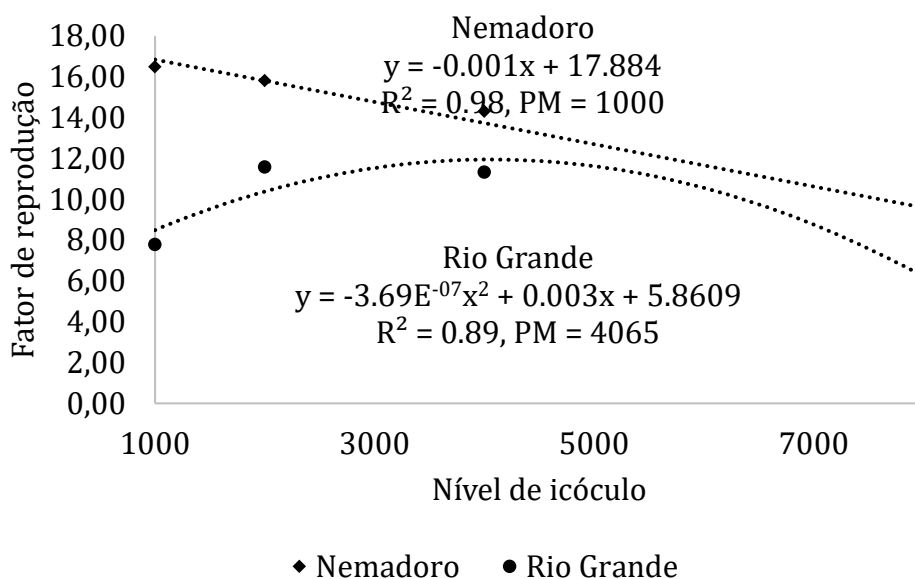


Figura 3.5: Curvas de regressão para a variável Fator de Reprodução para Acessos de tomate em resposta a crescentes níveis de inóculo do nematoide-das-galhas *Meloidogyne enterolobii*. PM = ponto de máxima, ou valor máximo da curva de regressão referente ao eixo x do gráfico. R^2 = coeficiente de determinação.

As isolinhas Calipso (**Fig. 3.6**), Europel (**Fig. 3.7**) e Rio Grande (**Fig. 3.8**) mostraram importantes reduções no FR na concentração de 1 mil O+J2 de *M. enterolobii* com diferença estatística para testemunha de suscetibilidade ‘Rutgers’.

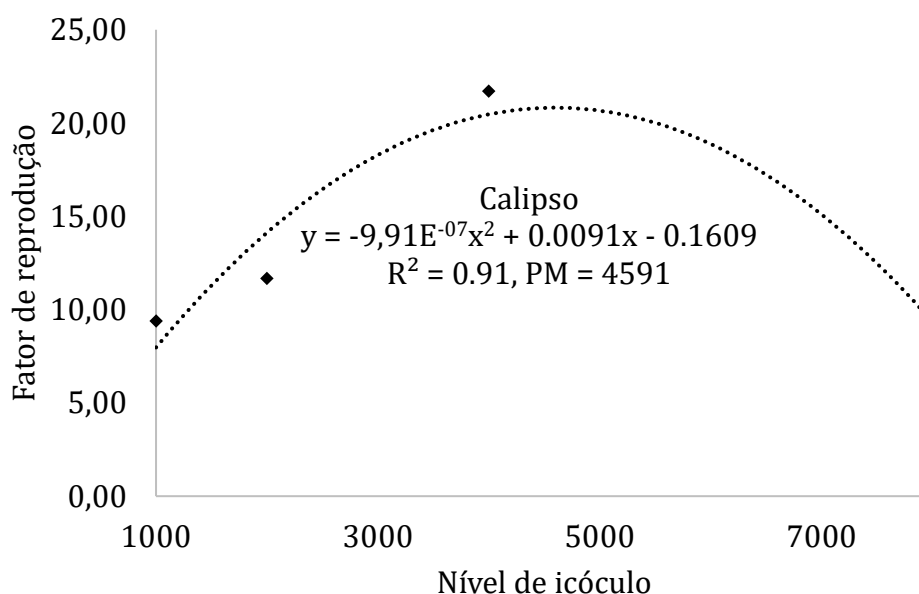


Figura 3.6. Curva de regressão para a variável Fator de Reprodução para a isolinha Calipso em resposta a crescentes níveis de inóculo do nematoide-das-galhas *Meloidogyne enterolobii*. PM = ponto de máxima, ou valor máximo da curva de regressão referente ao eixo x do gráfico. R^2 = coeficiente de determinação.

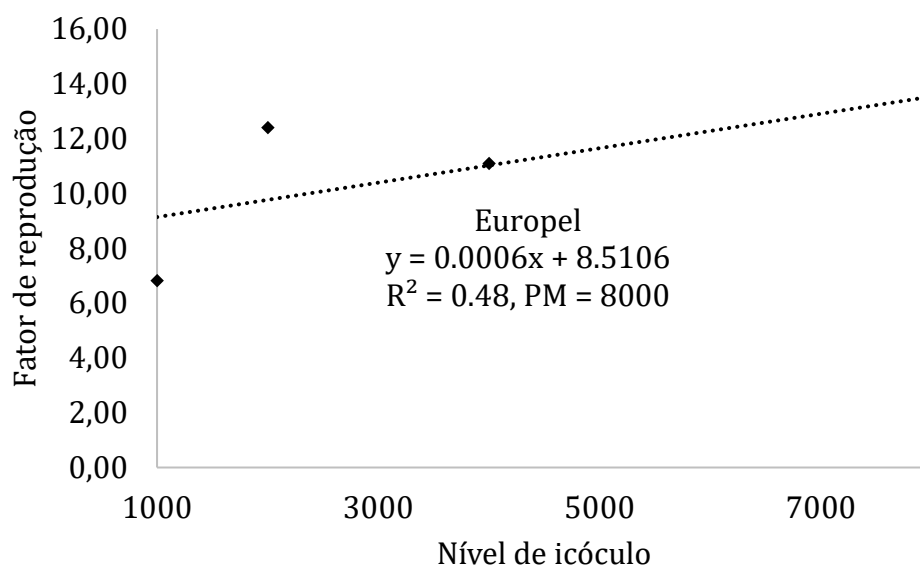


Figura 3.7. Curva de regressão para a variável Fator de Reprodução para a isolinha Europel em resposta a crescentes níveis de inóculo do nematoide-das-galhas *Meloidogyne enterolobii*. PM = ponto de máxima, ou valor máximo da curva de regressão referente ao eixo x do gráfico. R^2 = coeficiente de determinação.

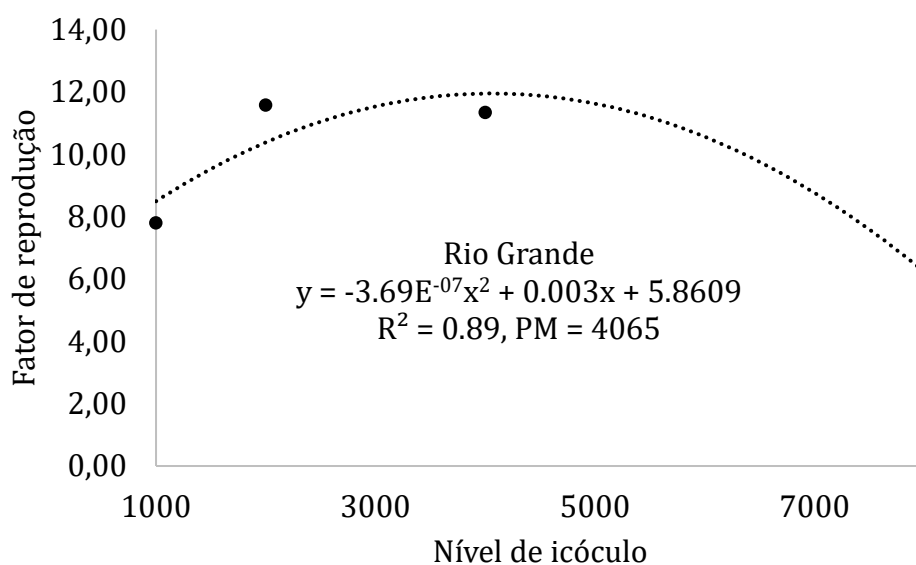


Figura 3.8. Curva de regressão para a variável Fator de Reprodução para a isolinha Rio Grande em resposta a crescentes níveis de inóculo do nematoide-das-galhas *Meloidogyne enterolobii*. PM = ponto de máxima, ou valor máximo da curva de regressão referente ao eixo x do gráfico. R^2 = coeficiente de determinação.

No experimento conduzido por Kiewnick et al. (2009), que utilizou 1000 O+J2 de dois isolados de *M. enterolobii* em um ambiente de casa de vegetação, os pesquisadores verificaram que ambos os isolados provenientes da Suíça foram capazes de se reproduzir em cultivares de tomate portadoras do gene de resistência *Mi-1*. Além disso, os isolados também demonstraram capacidade de reprodução em cultivares de pimenta que possuíam o gene de resistência *N*. Os fatores de reprodução variaram consideravelmente, situando-se entre 12 e 109, dependendo da cultivar de planta utilizada no experimento.

No estudo liderado por Pinheiro et al. (2018), verificou-se que onze acessos de tomateiro *S. stramonifolium* (CNPH-19, CNPH-22, CNPH-23, CNPH-25, CNPH-120, CNPH-122, CNPH-349, CNPH-119, CNPH-24, CNPH-121 e CNPH-336) quando submetidos a 6 mil ovos e eventuais J2 apresentaram resistência total ao nematoide, com fatores reprodutivos (FR) menores que 0,99. Todos os outros acessos apresentaram RF superior a 1,00, sendo considerados suscetíveis.

JMO Rosa et al. (2009) observaram a suscetibilidade de todos os dez híbridos de tomate (Absoluto, Cascade, Cordillera, Donatto, Ellen, Fascínio, Laura, Marguerita, Nicolás e Sanni) e dois genótipos experimentais (05 tom0041 e 08 tom00345) em condições de casa de vegetação e BOD (25°C). Os ensaios foram realizados após a inoculação com 5000 O+J2 de *Meloidogyne enterolobii*, revelando que todos os genótipos e híbridos avaliados foram suscetíveis ao nematoide.

Quanto à análise via PCR das isolinhas, o bioensaio de inoculação em conjunto com a análise de marcadores confirmou que a resistência está fixada na isolinha Nemadoro (com gene *Mi-1.2*) sendo detectados todos os indivíduos resistentes. Por sua vez, os marcadores confirmaram que a resistência não está fixada na isolinha Rio Grande (sem o gene *Mi-1.2*), não sendo detectados indivíduos resistentes (**Fig. 3.9**).

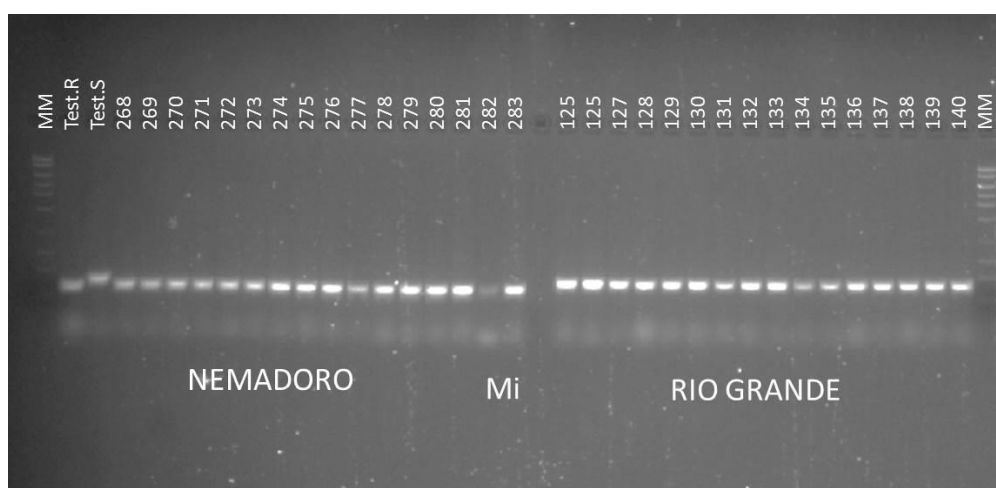


Figura 3.9. Eletroforese em gel de agarose (1,7%) dos marcadores SCAR/STS codominantes previamente identificados em estreita ligação com um locus de resistência a *M. enterolobii* (*Mi-1.2*) em tomateiro. Detecção da presença e ausência do gene *MI-1.2* para resistência a *M. enterolobii* nas isolinhas de tomate. Nemadoro e Rio Grande. Test.R= Testemunha resistente e Test.S= Testemunha suscetível. A PCR foi realizada utilizando o par de iniciadores específicos *MI23F/ Mi23R*. MM= MM marcador molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen). **Foto:** Antonio Francisco Costa

5. CONCLUSÕES

- No estudo de cultivares geneticamente relacionadas (com *background* genético extremamente similar), foi possível identificar que o gene de resistência *Mi-1.2* não confere um efeito residual significativo à espécie de nematoide-das-galhas *Meloidogyne enterolobii*.
- O gene *Mi-1.2*, embora extremamente efetivo contra pelo menos 13 espécies de *Meloidogyne*, não é capaz de interferir no processo de infecção de *Meloidogyne enterolobii* em raízes do tomateiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONETTI, J.I.S.; FERRAZ, S. (1981) Modifications of the Hussey and Barker method for extracting eggs from *Meloidogyne exigua* in coffee roots. *Fitopatologia Brasileira* 6:553.

CRUZ, C.D. (2016) Genes Software-extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Scientiarum Agronomy* 38:547-552.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. (2001) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 1st ed. Imprensa Universitária. Viçosa.

GABRIEL, M.; KULCZYNSKI, S.M.; MUNIZ, M.F.; BOITEUX, L.S.; CARNEIRO, R.M. (2020) Reaction of a heterozygous tomato hybrid bearing the *Mi-1.2* gene to 15 *Meloidogyne* species. *Plant Pathology* 69(5):944-952.

GABRIEL, M.; KULCZYNSKI, S.M.; SANTOS, M.F.; SOUZA, C.F.; MUNIZ, M.F.; BOITEUX, L.S.; CARNEIRO, R.M. (2022) A novel virulent Brazilian pathotype of *Meloidogyne javanica* towards the tomato *Mi-1.2* gene and pathogenicity to resistant rootstock. *Journal of Plant Diseases and Protection* 129(5):1269-1276.

HUSSEY, R.S.; BARKER, KR. (1973) A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp. Including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57:1025-1028.

JAITEH, F.; KWOSEH, C.; AKROMAH, R.; GAMBIA, T. (2012) Evaluation of tomato genotypes for resistance to rootknot nematodes. *African Crop Science Journal* 20:41-49.

MAGRINELLI OSÓRIO ROSA, JULIANA, NOGUEIRA WESTERICH, JULIANA, SICILIANO WILCKEN SILVIA RENATA. (2014) Reaction of tomato genotypes and hybrids to *Meloidogyne enterolobii*. *Ciência Rural*, 44(7): 1166-1171

MILLIGAN, S.B.; BODEAU, J.; YAGHOobi, J.; KALOSHIAN, I.; ZABEL, P.; WILLIAMSON, V.M. (1998) The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* 10:1307-1319.

OKORLEY, B.A.; AGYEMAN, C.; AMISSAH, N.; NYAKU, S.T. (2018) Screening selected *Solanum* plants as potential rootstocks for the management of root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*). *International Journal of Agronomy*, 6: 1-9

OOSTENBRINK, M. (1966) Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mededelingen Landbouw*, 66:1-46.

SEAH, S.; WILLIAMSON, V.M.; GARCIA, B.E.; MEJIA, L.; SALUS, M.S.; MARTIN, C.T.; MAXWELL, D.P. (2007) Evaluation of a co-dominant SCAR marker for detection of the *Mi-1* locus for resistance to root-knot nematode in tomato germplasm. *Tomato Genetic Cooperative Report* 57:37-40.

SIKANDAR, A.; ZHANG, M.; WANG, Y.; ZHU, X.; LIU, X.; FAN, H.; XUAN, X.; CHEN L.; DUAN, Y. (2020a) In vitro evaluation of *Penicillium chrysogenum* Snef1216 against *Meloidogyne incognita* (rootknot nematode). *Scientific Reports* 10(1):1-9.

TARIQ-KHAN, M.; MUNIR, A.; MUKHTAR, T.; HALLMANN, J.; HEUER, H. (2017) Distribution of root-knot nematode species and their virulence on vegetables in northern temperate agro-ecosystems of the Pakistani-administered territories of Azad Jammu and Kashmir. *Journal of Plant Diseases and Protection* 124:201–212.

TAYLOR, D.T.; SASSER, J.N. (1978) Biology identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Raleigh, North Carolina State University. p.111.

WANG, J.F.; HO, F.I.; TRUONG, H.T.H.; HUANG, S.M.; BALATERO, C.H.; DITTAPONGPITCH, V.; HIDAYATI, N. (2013) Identification of major QTLs associated with stable resistance of tomato cultivar ‘Hawaii 7996’ to *Ralstonia solanacearum*. *Euphytica* 190(2):241–252.

CAPÍTULO 4

Panorama atual do emprego do gene *Mi-1.2* de resistência aos nematoides-das-galhas em cultivares comerciais de tomateiro no Brasil e reação a infecção por *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*

RESUMO

A principal medida de manejo dos nematoides-das-galhas do gênero *Meloidogyne* tem sido o emprego do gene de resistência *Mi-1.2*. No entanto, muitas vezes os produtores e extensionistas não dispõem de informações sobre a presença ou não desse gene nas cultivares disponíveis no mercado. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar a reação de híbridos comerciais de tomateiro para resistência ao nematoide-das-galhas, visando elucidar o panorama da reação dessas cultivares bem como a confirmação da presença (ou não) do gene *Mi-1.2*. Quarenta (40) cultivares de tomateiro foram avaliadas em casa de vegetação para a resposta aos nematoides-das-galhas, *M. javanica* e *M. incognita* raça 1. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 40x2 (40 cultivares e duas espécies de *Meloidogyne*), com seis repetições, sendo a unidade experimental uma planta cultivada em um vaso plástico contendo 3 L de substrato. Aos 65 dias após a inoculação foram avaliados o índice de galhas (IG), índice de massa de ovos (IMO), número de galhas por grama de raiz (NOGR) e o fator de reprodução (FR). Os dados foram submetidos à análise de variância individual e conjunta para as duas espécies de nematoides, e agrupamento de médias dos tratamentos por Scott-Knott. Verificou-se que a resistência dos híbridos comerciais de tomateiro a uma das espécies de nematoide é correlacionada com a resistência à outra espécie. Os híbridos mais resistentes às duas espécies de nematoides foram: Meryva, Future, NemoNetta F1, Dulce F1, Shani F1, Big Moon, Tallita, Express Gold, Dominador, Ivety, Lumi, Muralha, Carina Ty, Debora Plus, BRS Couto, BRS Nagai, Magnet, Guardiã, Protetor, Tinto, Pizzadoro, Tarantelly e a testemunha resistente Nemadoro. Os híbridos Ivanhoe RZ, Supera F1 e Serato apresentaram maiores níveis de resistência a *M. javanica* em relação a *M. incognita*; ao passo que o híbrido BRS Nagai apresentou um nível superior de resistência a *M. incognita* em relação a *M. javanica*. O híbrido Ivanhoe RZ, apesar do valor médio de IG para *M. javanica*, também pode ser classificado como bom nível de resistência a ambas as espécies de nematoides. Verificou-se que os níveis de reação foram extremamente variáveis (de imunidade a suscetibilidade) para cultivares contendo o gene *Mi-1.2* em homozigose ou heterozigose, sugerindo que outros fatores genéticos podem modular a expressão da resistência nos diferentes materiais genéticos.

Palavras-chave: *Lycopersicon esculentum* Mill., Resistência genética, Melhoramento genético.

ABSTRACT

Current overview of the use of the root-knot nematode resistance gene *Mi-1.2* in commercial tomato cultivars in Brazil and reaction to *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* infection

The main management measure for root-knot nematodes of the genus *Meloidogyne* has been the use of the *Mi-1.2* resistance gene. However, producers and extension service often do not have information about the presence or absence of this gene in the cultivars available on the market. In this context, the objective of this work was to verify the reaction of commercial tomato hybrids for resistance to the root-knot nematode, aiming to elucidate the panorama of the reaction of these cultivars as well as the confirmation of the presence (or not) of the *Mi-1.2* gene. Forty (40) tomato cultivars were evaluated in a greenhouse for response to root-knot nematodes, *M. javanica* and *M. incognita* race 1. The experiment was conducted in a completely randomized design in a 40 x 2 factorial arrangement (40 cultivars and two *Meloidogyne* species), with six replicates, the experimental unit being a plant grown in a plastic pot containing 3 L of substrate. At 65 days after inoculation, gall index (IG), egg mass index (IMO), number of galls per gram of root (NOGR) and reproduction factor (FR) were evaluated. Data were subjected to individual and joint analysis of variance for the two nematode species, and grouping of treatment means by Scott-Knott. It was verified that the resistance of commercial tomato hybrids to one of the nematode species is correlated with the resistance to the other species. The most resistant hybrids to the two nematode species were: Meryva, Future, NemoNetta F1, Dulce F1, Shani F1, Big Moon, Tallita, Express Gold, Dominador, Ivety, Lumi, Muralha, Carina Ty, Debora Plus, BRS Couto, BRS Nagai, Magnet, Guardian, Protector, Tinto, Pizzadoro, Tarantelly and the tough witness Nemadoro. Hybrids Ivanhoe RZ, Supera F1 and Serato showed higher levels of resistance to *M. javanica* compared to *M. incognita*; while the hybrid BRS Nagai showed a superior level of resistance to *M. incognita* in relation to *M. javanica*. The hybrid Ivanhoe RZ, despite the average GI value for *M. javanica*, can also be classified as having a good level of resistance to both nematode species. It was found that the levels of reaction were extremely variable (from immunity to susceptibility) for cultivars containing the *Mi-1.2* gene in homozygosis or heterozygosis, suggesting that other genetic factors can modulate the expression of resistance in different genetic materials.

Keywords: *Solanum lycopersicum* Mill., Genetic resistance, Genetic improvement

1.INTRODUÇÃO

O tomateiro é a hortaliça mais frequentemente relatada como planta hospedeira dos nematoides-das-galhas, que podem causar até 85% de perdas na produção (Ferraz & Churatamasca, 1983). As perdas variam de acordo com a época de plantio e com as práticas culturais adotadas pelos produtores. As plantas, quando severamente atacadas por *Meloidogyne* spp., apresentam o sistema radicular completamente desorganizado com a formação de galhas e com poucas raízes. Quando a infestação ocorre no estágio de plântula, estas podem morrer após o transplante para o campo e as plantas que sobreviverem tem sua frutificação grandemente afetada em quantidade e qualidade. Além disso, pode ser observada, no final do ciclo do tomateiro, a invasão das galhas por fungos e bactérias que causam apodrecimento, ficando apenas intacto o cilindro central da raiz principal (Vale *et al.*, 2004). As espécies *M. incognita* (raças 1, 2, 3 e 4), *M. javanica* e *M. arenaria* são as mais comumente encontradas no País. Estão presentes em qualquer tipo de solo, com predominância em regiões com solos arenosos e com temperaturas acima de 25° C. Em menor intensidade, ocorre a espécie *M. hapla*, que predomina em clima temperado ou em regiões com temperaturas entre 15° e 25°C (Lopes & Ávila, 2005). Os nematicidas registrados no Brasil para a cultura do tomateiro são granulados do grupo carbofuran, químico altamente tóxico e poluente do ambiente, inclusive da água do subsolo, além de aumentarem o custo de produção. Desta forma constitui-se em uma prática antieconômica, pois, requer mão-de-obra na aplicação, apresenta alto custo e nem sempre tem a eficiência desejada. Outra desvantagem do uso de nematicidas consiste no risco de contaminação do ambiente e do ser humano. Assim, a utilização de variedades resistentes é de grande importância econômica, pois estes organismos reduzem drasticamente a produção de cultivares suscetíveis (Lindsey & Clayshulte, 1982; Fery & Dukes, 1984; Thies *et al.*, 1997). Nesse contexto, a resistência genética aos nematoides do gênero *Meloidogyne* é uma das formas mais eficientes, econômica e de menor impacto ambiental no controle deste endoparasito (Pegard *et al.*, 2005).

Alguns genes de resistência conferem resistência a mais de uma espécie de nematoides. Exemplos incluem o gene *Mi* que confere resistência a *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (Cook, 1991). Assim, entre os métodos de controle utilizados, o uso de cultivares resistentes é uma das medidas mais econômicas com redução considerável dos danos à cultura. A resistência ao nematoide-das-galhas foi identificada há mais de 50 anos em um

acesso (PI 128657) de um tomateiro selvagem. O gene dominante *Mi-1.2*, presente nesse tomateiro, conferiu resistência à *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica* (Gilbert & McGuire, 1956). Estes genes apresentam oito alelos (*Mi1* a *Mi8*), sendo que o alelo *Mi1* é o mais usado nos cruzamentos com cultivares comerciais de *Solanum lycopersicon* (Rossi et al., 1998). Muitos programas de melhoramento usaram esta fonte de resistência genética e o gene *Mi* foi clonado (Milligan et al., 1998). Entretanto, este gene tem pequeno efeito sobre *M. hapla* e sobre alguns isolados virulentos de *M. incognita* e *M. arenaria*, não sendo efetivo em temperaturas acima de 28° C (Roberts & Thomason, 1989). Instituições nacionais e internacionais utilizaram o gene *Mi* para o desenvolvimento de cultivares resistentes, porque a reprodução de *Meloidogyne* spp. em tomate é limitada em plantas com este gene (Charchar et al., 2004).

Plantas geralmente respondem à invasão do nematoide com a ativação de uma série de mecanismos de defesa (Trudgill, 1991). Na relação parasítica nematoide-planta são observadas mudanças na expressão gênica correlacionadas com ferimentos ou resposta de defesa. A resistência a patógenos diferentes, incluindo vírus, bactérias, fungos e nematoides, tem sido demonstrada ser mediada por fatores genéticos dominantes (gene R) em distintas plantas hospedeiras. A principal expressão fenotípica destes genes é a presença de reação de hipersensibilidade (HR). Cada um dos produtos destes genes R interage diretamente ou indiretamente com o produto de um gene correspondente de avirulência (AVR) em agente patogênico em um sistema do tipo gene-a-gene (Flor 1971; Keen, 1990).

A reação de hipersensibilidade (HR) é observada em células vizinhas do nematoide, durante a sua migração no tecido vegetal ou após o estabelecimento do sítio de alimentação (Rodrigues, 2001). Essa reação, provoca mudanças histológicas, como a morte celular próxima ao sítio de infecção do juvenil de segundo estágio de espécies e raças de *Meloidogyne* (Dropkin, 1969). Além da reação de HR, outros estudos têm mostrado que a resistência em plantas parasitadas pelo nematoide-das-galhas pode ocorrer por diversos mecanismos como a produção de fitoalexinas; acúmulo de compostos fenólicos; aumento na atividade da enzima fenilalanina amoniliase; acúmulo de peroxidases; intensificação da produção de inibidores de proteinases e quitinases (Giebel, 1982; Huang, 1985; Ibrain, 1991; Punja & Zhang, 1993).

Vários genes R já foram mapeados ou clonados em plantas resistentes a nematoides. Contudo, os genes vegetais expressos em maior quantidade no sítio de alimentação do nematoide têm sido identificados em clonados. Essa lista de gene inclui, dentre outros, o gene *Mi* em *S. peruvianum*, o gene *Hero* em *S. pimpinellifolium*, o gene *H₁* em *S. tuberosum*, gene *Gro1* em *S. spegazzini*, o gene *Rhg₄* em soja (*Glycine max*) (Gheysen & Fenol, 2002). A clonagem do gene *Mi* revelou que ele codifica um membro da família de proteínas de resistência de plantas caracterizada pela presença de um nucleotídeo ligando ao sítio de repetições ricas em leucina (proteínas do tipo NBS-LRR). Esses elementos estruturais também estão presentes em genes que controlam resistência a vírus, bactérias e fungos (Ilarduya & Kalorshian, 2001).

Vale ressaltar que apesar da existência de cultivares de tomateiros resistentes, as espécies de nematoides-das-galhas prevalentes no Brasil ainda causam prejuízos à cultura. Em tomateiro para processamento industrial no Brasil, por exemplo, cuja totalidade são híbridos importados, a grande maioria se mostra resistente, porém, algumas espécies e raças de *Meloidogyne* possuem a habilidade de “quebrar” a resistência conferida pelo gene *Mi-1.2* (Pinheiro *et al.*, 2009b; Gabriel *et al.*, 2020; 2022). De qualquer maneira, a principal medida de manejo dos nematoides-das-galhas do gênero *Meloidogyne* ainda permanece o emprego de cultivares resistentes contendo o gene *Mi-1.2*. No entanto, muitas vezes os produtores e extensionistas não dispõem de informações sobre a presença ou não desse gene nas cultivares disponíveis no mercado. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar a reação de híbridos comerciais de tomateiro para resistência ao nematoide-das-galhas, visando elucidar o panorama da reação dessas cultivares bem como a confirmação da presença (ou não) do gene *Mi-1.2*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.3 Caracterização da área experimental

O experimento foi realizado na Embrapa Hortaliças no Gama-DF em casa de vegetação em 02 etapas 1ª) Avaliação da reação de cultivares comerciais de tomateiro para resistência ao nematoide-das-galhas, *M. javanica* e *M. incognita* raça 1 e 2ª) Extração de DNA de plantas para confirmação da presença do gene *Mi-1.2*.

2.2 Obtenção, identificação e multiplicação de uma população de *M. incognita* raça 1 e *M. javanica*

Fêmeas dos nematoides-das-galhas pertencentes às espécies *M. incognita* raça 1 e *M. javanica* coletadas de raízes de tomateiro na área experimental da Embrapa Hortaliças e mantidos em casa de vegetação, foram submetidas a cortes perineais e os padrões descritos por Eisenback & Hirschmann-Triantaphyllou (1991) foram tomados como referência para a identificação das espécies. Para análise do padrão da isoenzima esterase foi adaptada técnica com base no protocolo de Carneiro & Almeida (2001). A raça de *Meloidogyne incognita* foi identificada por meio do teste de hospedeiros diferenciadores de acordo com Taylor & Sasser (1978). Para a produção de inóculo, *M. javanica* e *M. incognita* raça 1 foram multiplicados separadamente em plantas de tomate cv. 'Rutgers'. Dez dias após a germinação das sementes nas bandejas de isopor, foi realizado o transplante para vasos com capacidade para 3 litros contendo substrato Plantmax® esterilizado. Oito dias após o transplante foi realizada a inoculação das raízes das plântulas, com suspensão de 5.000 ovos e eventuais juvenis de segundo estágio (J2) de cada espécie isoladamente, em 5 mL de água distribuídos em volta do colo da planta. Aos 60 dias após a inoculação, ovos e J2 das duas espécies de *Meloidogyne* foram extraídos dos sistemas radiculares das plantas de tomate cv. 'Rutgers' segundo metodologia de Hussey & Barker (1973) modificado por Bonetti & Ferraz (1981). Este procedimento foi repetido duas vezes para máxima obtenção de ovos. A suspensão de ovos e J2 foi recolhida com pipeta para um béquer e a contagem e calibração do inóculo foi feita em câmara de contagem, ao microscópio ótico. Para a instalação do experimento realizou-se a semeadura dos híbridos de tomate em vasos plásticos com capacidade para 3L. Trinta dias após a semeadura foi realizado o desbaste deixando apenas uma planta por vaso. A inoculação foi realizada de acordo com o realizado para manutenção das espécies em plantas de tomateiro cv. 'Rutgers'.

2.3 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 40x2 (40 híbridos de tomate e duas espécies de *Meloidogyne*), com seis repetições, sendo a unidade experimental uma planta por vaso.

2.4 Instalação e condução do experimento

Etapa 1: Avaliação da reação de 40 cultivares de tomateiro para *M. incognita* raça 1 e *M. javanica* via inoculação –

Foram avaliadas 40 cultivares de tomateiro comercializadas no Brasil para a resistência ao *M. incognita* raça 1 e *M. javanica*. Os seguintes híbridos experimentais foram avaliados: ‘Caroliny’, ‘Meryva’, ‘Byelsa’, ‘Future F1’, ‘Nemo-Netta F1’, ‘Titanium TY’, ‘Dulce F1 Mini Plum’, ‘Shani F1’, ‘Sensação’, ‘Big Moon’, Tallita’, ‘Express Gold’, ‘Ivanhoe RZ’, ‘Dominador F1’, ‘Paronset F1’, ‘Ellen F1’, ‘Supera F1’, ‘Serato’, ‘Dominador’, ‘Ivety’, ‘Carmen’, ‘Sheila Victory’, ‘Lumi’, ‘Muralha’, ‘Carina TY’, ‘Débora Max’, ‘Débora Plus’, ‘BRS Kiara’, ‘BRS Couto’, ‘BRS Portinari’, ‘BRS Montese’, ‘BRS Nagai’, ‘Magnet’, ‘Guardião, Protetor’, ‘Tinto F1’, ‘Minotauro F1’, ‘Pizzadoro F1’, ‘Tarantelly F1’. Utilizaram-se as cultivares Rutgers e Nemadoro como testemunhas suscetível e resistente, respectivamente.

2.5 Avaliação do experimento

Sessenta e cinco dias após a inoculação as plantas foram avaliadas quanto ao índice de massas de ovos (IMO), índice de galhas (IG), número de ovos por grama de raiz (NOGR) e fator de reprodução (FR). Para o índice de massa de ovos (IMO), as plantas foram coletadas, os sistemas radiculares lavados em água corrente, e as raízes foram coloridas por imersão em solução de Floxina B (0,5 g por L de água) durante 15 minutos. Em seguida, foi realizada a contagem do número de massa de ovos dos nematoides ao microscópio estereoscópio, em todo sistema radicular da planta/repetição (Taylor & Sasser, 1978). O IMO nas raízes foi obtido de acordo com Taylor & Sasser (1978) utilizando-se escala de notas variando de 0 a 5, em que: 0 = raízes sem massas de ovos; 1 = presença de 1 a 2 massas de ovos; 2 = presença de 3 a 10 massas de ovos; 3 = presença de 11 a 30 massas de ovos; 4 = presença de 31 a 100 massas de ovos e 5 = presença de mais de 100 massas de ovos. O IG, que corresponde ao número de galhas em cada sistema radicular de cada planta/repetição, foi quantificado nas raízes e expresso por uma escala de notas de 1 a 5, de acordo Taylor & Sasser (1978), em que: 0 = raiz sem galhas; 1 = 1 a 2 galhas; 2 = 3 a 10 galhas; 3 = 11 a 30 galhas; 4 = 31 a 100 galhas e 5 = mais de 100

galhas. Para avaliação do NOGR, as raízes de todos os tratamentos foram lavadas, secas em temperatura ambiente e pesadas antes de serem processadas de acordo com a técnica de Hussey & Barker (1973), modificada por Bonetti & Ferraz (1981). O FR foi obtido pela relação entre as densidades populacionais finais e iniciais do nematoide ($FR = Pf/Pi$) (Oostenbrink, 1966). Foi considerado como população inicial (Pi) o inóculo extraído, quantificado e calibrado para conter 6.000 ovos e juvenis de segundo estágio (J2) por vaso. Foram consideradas imunes (I) as plantas com $FR=0$, resistentes (R) aquelas com $FR \leq 1$ e suscetíveis (S) aquelas com $FR > 1$, de acordo com Oostenbrink (1966). As variáveis IMO, IG e NOGR foram quantificadas para auxiliarem na interpretação da variável FR.

2.6 Análise estatística

Os dados foram transformados por $\sqrt{x+0,50}$ e submetidos à análise de variância individual e conjunta para as duas espécies de nematoides, e agrupamento de médias dos tratamentos por Scott-Knott (1974), utilizando-se o programa Genes (Cruz, 2006). Antes da análise, os dados foram verificados quanto à normalidade pelo Teste de Lillieford, e todos estavam normais

Etapa (2): Análise com um marcador molecular codominante ligado com o gene de resistência *Mi-1.2* – Foi realizada a semeadura de 16 plantas de cada cultivar em bandejas de poliestireno. Dezoito dias após o semeio o DNA total foi extraído individualmente de cada planta de acordo com a metodologia de CTAB 2X com algumas modificações (Boiteux et al., 1999). Em cada tubo foram colocadas seis esferas metálicas, juntamente com pequena quantidade homogênea de tecido de folhas. Acrescentou-se aos tubos 750 μ L de CTAB e as amostras foram trituradas no Precellys®24. Após 30 segundos a 5000 rpm, as amostras foram retiradas e colocadas em banho-maria a 65°C durante 10 minutos; acrescentou-se, após esse tempo, 750 μ L de clorofil em cada tubo e as amostras foram agitadas em vortex por aproximadamente 30 segundos, seguido de um ciclo de centrifugação à 9000 rpm durante 5 minutos. Cuidadosamente, os tubos foram retirados da centrífuga e 600 μ L do sobrenadante foram retirados e colocados em novos tubos de micro-centrífuga. Foram acrescentados 300 μ L de isopropanol gelado e com a finalidade de homogeneizar, os tubos foram suavemente agitados de forma manual e posteriormente centrifugados a 13000 rpm durante 13 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o ‘pellet’ lavado com álcool 70%, de forma cuidadosa, para evitar a sua ressuspensão. Os tubos foram então colocados em estufa a 37°C por 20 minutos e ressuspensos em 100 μ L de

TE+RNase, armazenando os tubos na geladeira. No dia seguinte, as amostras foram agitadas no vortex e os DNAs então extraídos foram guardados em freezer (-20°C).

O mix da reação constituiu de 1,25 µL de Tampão 10X da enzima *Taq* Polymerase (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 e 500 mM KCl, Invitrogen), 1,25 µL de dNTPs (2,5 mM, Invitrogen), 0,5 µL de cada primer, Mi23F (5'-TGG AAA AAT GTT GAA TTT CTT TTG-3'), Mi23R (5'-GCA TAC TAT ATG GCT TGT TTA CCC-3'), 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen), 0,2 µL da enzima *Taq* Polimerase (5 U/µL, Invitrogen), 5,05 µL de água Milli-Q e 3 µL de DNA (20 ng/µL), totalizando um mix com 12,5 µL de volume final (Gabriel et al., 2020; 2022). As amplificações foram efetuadas em termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler programado para 35 ciclos, sendo cada ciclo constituído pelos seguintes parâmetros: Etapa inicial de desnaturação a 94°C durante 3 minutos, seguida por 35 ciclos – desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 57°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto – e finalização com uma etapa de extensão ajustada para 72°C durante 10 minutos. Foram adicionados 4 µL de azul de bromofenol em cada amostra e estas foram aplicadas em gel de agarose 1,5%, já suplementado com brometo de etídeo. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em tampão TBE (Tris-Borato 45 mM e 1 mM EDTA), a 120V, por um período de aproximadamente 3 horas. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, tendo-se utilizado o marcador 1 Kb Plus DNA Ladder[®] (Invitrogen) para análise dos produtos obtidos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferenças significativas foram observadas para todas as variáveis nas análises de variância individuais e conjunta ($P < 0,05$). Houve também interação significativa para Acessoacessoacesso e espécies de nematoides, indicando que a classificação dos híbridos não foi a mesma para as duas espécies, portanto o agrupamento de médias foi feito para cada espécie. Os coeficientes de variação foram reduzidos para as variáveis índice de massa de ovos (IMO) e índice de galhas (IG), chegando a no máximo 11,42%; no entanto foram altos para as variáveis fator de reprodução (FR), variando de 28,99 a 34,48%, e principalmente para número de ovos por grama de raiz (NOGR), variando de 54,47 a 68,18%. Estes valores para FR estão próximos aos relatados na literatura (Charchar et al., 2003; Pinheiro et al., 2009b) pois é uma característica que é influenciada pelo ambiente. Porém, para o caráter NOGR os valores do coeficiente de variação foram muito elevados, mesmo após transformação dos dados, pois houve variação muito grande dos resultados entre as repetições, e, portanto, neste estudo, as conclusões baseadas nesta característica não seriam confiáveis.

Considerando as variáveis IMO e IG para *M. javanica* (**Tabela 4.1**), os híbridos que foram agrupados entre aqueles pertencentes às duas classes de menor valor para ambas as características, ou seja, que foram mais resistentes, foram: Meryva, Future F1, Nemo - Netta F1, Dulce F1 “Mini Plum”, Shani F1, Big Moon, Tallita, Express Gold, Dominador F1, Dominador, Ivety, Lumi, Muralha, Carina Ty, Debora Max, Debora Plus, BRS Couto, BRS Montese, BRS Nagai, Magnet, Guardiã, Protetor, Tinto F1, Pizzadoro F1, Tarantelly F1 e a testemunha resistente Nemadoro.

Tabela 4.1. Avaliação de cultivares comerciais de tomateiro desafiadas com uma população de *Meloidogyne javanica*. Embrapa Hortaliças.

Cultivares	IMO ¹	IG ²	NOGR ³	FR ⁴ /Reação ⁵
Caroliny	5,00 a	4,33 a	1061,50 c	1,92 d (S)
Meryva	1,00 f	1,50 d	596,33 c	0,08 d (R)
Byelsa	2,67 d	2,67 c	1292,50 c	0,35 d (R)
Future F1	1,00 f	1,50 d	262,00 c	0,18 d (R)
Nemo-Netta F1	1,33 f	2,00 c	3478,00 b	0,73 d (R)
Tytanium TY	5,00 a	4,50 a	733,00 c	2,47 c (S)
Dulce F1	1,17 f	1,67 d	56,83 c	0,18 d (R)
Shani F1	1,00 f	1,17 d	26,50 c	0,02 d (R)
Sensação	4,33 b	4,17 a	755,83 c	1,90 d (S)
Big Moon	1,33 f	1,17 d	74,33 c	0,17 d (R)
Tallita	1,67 e	2,00 c	102,33 c	0,23 d (R)
Express Gold	1,17 f	1,50 d	64,17 c	0,12 d (R)
Ivanhoe RZ	1,67 e	3,00 b	342,00 c	0,83 d (R)
Dominador F1	1,17 f	2,17 c	150,83 c	0,23 d (R)

Paronset F1	5,00 a	5,00 a	4221,67 b	15,10 a (S)
Ellen F1	3,33 c	3,83 b	404,50 c	1,03 d (S)
Supera F1	2,50 d	3,00 b	556,00 c	1,45 d (S)
Serato	3,50 c	3,50 b	1537,50 c	1,83 d (S)
Ivety	1,00 f	1,00 d	161,67 c	0,17 d (R)
Carmen	5,00 a	4,83 a	1627,00 c	8,32 b (S)
Sheila Victory	5,00 a	4,67 a	2026,00 c	9,15 b (S)
Lumi	1,67 e	1,83 c	294,50 c	0,60 d (R)
Muralha	1,00 f	1,00 d	23,67 c	0,05 d (R)
Carina Ty	1,00 f	1,17 d	299,50 c	0,32 d (R)
Debora Max	1,50 e	1,83 c	237,00 c	1,10 d (S)
Debora Plus	1,33 f	2,33 c	73,33 c	0,22 d (R)
BRS Kiara	3,17 c	3,67 b	6326,67 a	5,08 c (S)
BRS Couto	1,00 f	1,17 d	85,50 c	0,30 d (R)
BRS Portinari	3,00 c	3,33 b	778,17 c	1,08 d (S)
BRS Montese	1,67 e	2,50 c	607,17 c	4,02 c (S)
BRS Nagai	1,67 e	2,17 c	207,83 c	0,88 d (R)
Magnet	1,50 e	1,67 d	24,00 c	0,20 d (R)
Guardião	1,00 f	1,00 d	9,17 c	0,05 d (R)
Protetor	1,00 f	1,17 d	17,33 c	0,12 d (R)
Tinto F1	1,00 f	1,17 d	132,67 c	0,32 d (R)
Minotauro F1	2,83 c	2,50 c	376,67 c	1,15 d (S)
Pizzadoro F1	1,00 f	1,83 c	172,17 c	0,48 d (R)
Tarantelly F1	1,00 f	1,17 d	14,67 c	0,05 d (R)
Rutgers	4,50 b	4,00 a	1221,50 c	4,78 d (S)
Nemadoro	1,00 f	1,00 d	11,50 c	0,07 d (R)
Média Geral	2,19	2,40	777,40	1,70
C.V (%)	11,20	11,42	68,18	34,48

¹IMO e ²IG: índice de massa de ovos e de galhas de acordo com Taylor & Sasser (1978) colocar nas referências; ³NOGR: número de ovos por grama de raiz; ⁴FR: Fator de Reprodução = População final/População inicial (5000 ovos e J2); ⁵Reações de resistência de acordo com Oostenbrink (1966): I=Imune (FR=0); R=Resistente (FR < 1) e S=Suscetível (FR > 1). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

Já para *M. incognita* (Tabela 4.2) os mais resistentes para estas duas características foram: Meryva, Future F1, Nemo – Netta F1, Dulce F1 “Mini Plum”, Shani F1, Big Moon, Tallita, Express Gold, Ivanhoe RZ, Dominador F1, Supera F1, Dominador, Ivety, Lumi, Muralha, Carina Ty, Debora Max, Debora Plus, BRS Couto, BR Montese, Magnet, Guardião, Protetor, Tinto F1, Pizzadoro F1, Tarantelly F1, e a testemunha resistente Nemadoro.

Tabela 4.2. Avaliação de cultivares comerciais de tomateiro desafiadas com uma população de *Meloidogyne incognita* raça 1. Embrapa Hortaliças.

Cultivares	IMO ¹	IG ²	NOGR ³	FR ⁴ /Reação ⁵
Caroliny	5,00 a	5,00 a	2562,33 a	23,63 a (S)
Meryva	1,00 d	1,67 e	0,17 d	0,00 d (I)
Byelsa	3,33 b	4,00 b	1126,33 c	1,40 d (S)
Future F1	1,33 d	1,50 e	23,17 d	0,07 d (R)
Nemo – Netta F1	1,00 d	1,00 f	32,67 d	0,02 d (R)
Tytanium TY	5,00 a	4,00 b	877,33 c	4,20 c (S)
Dulce F1	1,00 d	1,17 f	6,50 d	0,03 d (R)
Shani F1	1,00 d	1,00 f	21,00 d	0,02 d (R)
Sensação	5,00 a	5,00 a	737,50 c	6,73 c (S)
Big Moon	1,00 d	1,17 f	34,50 d	0,07 d (R)
Tallita	1,17 d	1,17 f	10,33 d	0,03 d (R)
Express Gold	1,17 d	1,33 f	22,83 d	0,08 d (R)
Ivanhoe RZ	1,17 d	1,83 e	52,33 d	0,17 d (R)
Dominador F1	1,00 d	1,00 f	37,67 d	0,13 d (R)
Paronset F1	5,00 a	5,00 a	887,33 c	5,77 c (S)

Ellen F1	3,00 b	3,50 c	1369,50 b	5,10 c (S)
Supera F1	1,00 d	1,33 f	20,00 d	0,08 d (R)
Serato	1,00 d	1,83 e	52,17 d	0,20 d (R)
Ivety	1,00 d	1,00 f	13,17 d	0,00 d (I)
Carmen	5,00 a	4,67 a	489,17 d	4,25 c (S)
Sheila Victory	5,00 a	4,17 b	565,00 d	2,85 d (S)
Lumi	1,00 d	1,33 f	43,67 d	0,07 d (R)
Muralha	1,00 d	1,00 f	6,00 d	0,02 d (R)
Carina Ty	1,00 d	1,00 f	14,67 d	0,00 d (I)
Debora Max	1,00 d	1,17 f	15,33 d	0,07 d (R)
Debora Plus	1,00 d	1,67 e	10,83 d	0,07 d (R)
BRS Kiara	3,50 b	4,33 b	499,50 d	2,10 d (S)
BRS Couto	1,17 d	1,33 f	40,50 d	0,05 d (R)
BRS Portinari	2,50 c	3,50 c	812,17 c	2,25 d (S)
BRS Montese	1,00 d	1,00 f	18,00 d	0,10 d (R)
BRS Nagai	1,33 d	2,50 d	66,33 d	0,33 d (R)
Magnet	1,00 d	1,00 f	7,83 d	0,02 d (R)
Guardião	1,00 d	1,00 f	9,33 d	0,02 d (R)
Protetor	1,00 d	1,00 f	21,50 d	0,17 d (R)
Tinto F1	1,00 d	1,00 f	1,50 d	0,00 d (I)
Minotauro F1	3,33 b	3,83 b	279,00 d	1,07 d (S)
Pizzadoro F1	1,00d	1,67 e	2,67 d	0,02 d (R)
Tarantelly F1	1,17 d	1,67 e	4,00 d	0,00 d (I)
Rutgers	5,02 a	5,00 a	818,00 c	5,00 d (S)
Nemadoro	1,02 d	1,00 f	41,50 d	0,15 d (R)
Média Geral	2,05	2,25	316,15	1,82
C.V (%)	7,01	8,42	54,47	28,99

¹IMO e ²IG: índice de massa de ovos e de galhas de acordo com Taylor & Sasser (1978); ³NOGR: número de ovos por grama de raiz; ⁴FR: Fator de Reprodução = População final/População inicial (5000 ovos e J2); ⁵Reações de resistência de acordo com Oostenbrink (1966): I=Imune (FR=0); R=Resistente (FR < 1) e S=Suscetível (FR > 1). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

Pode-se verificar que, por estas características, a maioria dos híbridos considerados mais resistentes para uma espécie de nematoide também foi mais resistente para a outra. Com exceção para Ivanhoe RZ, Supera F1 e Serato que foram mais resistentes a *M. incognita* raça 1 do que para *M. javanica* e BRS Nagai que foi o contrário. Portanto, pode-se concluir que a resistência a uma das espécies de nematoide é correlacionada com a resistência à outra espécie. O gene *Mi-1.2* que é uma das fontes mais utilizadas para resistência aos nematoides-das-galhas em tomate sabidamente confere resistência a ambas as espécies estudadas (Cook, 1991).

Considerando a variável FR e a classificação quanto à reação, para ambas as espécies de nematoides houve coincidência na classificação dos híbridos em resistentes (R) e suscetíveis (S) comparando com as observações feitas anteriormente para as variáveis IMO e IG. Indicando que mesmo com os coeficientes de variação maiores, este caractere é eficiente na classificação dos híbridos quanto ao nível de resistência. As exceções para *M. javanica* foram os híbridos Byelsa, Ivanhoe RZ que foram considerados resistentes, e Debora Max e BRS Montese que foram considerados suscetíveis pelo FR. Para *M. incognita* o híbrido BRS Nagai foi considerado resistente por este último caráter. Esta diferença está relacionada às características que são medidas, pois o IMO e IG

quantificam respectivamente o número final de massa de ovos e galhas, enquanto a caráter FR juntamente com a classificação em relação à reação, considera a população inicial e a população final de nematoides, ou seja, o índice de multiplicação da praga (Oostenbrink, 1966; Bonetti & Ferraz, 1981). Pelo fator de reprodução (FR), nenhum híbrido foi imune ao *M. javanica*, enquanto os híbridos Meryva, Ivety, Carina Ty, Tinto F1 e Tarantelly F1 foram considerados imunes ao *M. incognita* raça 1, ou seja, não permitiram a multiplicação dos nematoides.

Os híbridos considerados mais suscetíveis para ambas as espécies de nematoides foram Caroliny, Tytanium TY, Sensação, Paronset F1, Carmen, BRS Iracema, Sheila Victory, BRS Kiara, e a testemunha suscetível Rutgers. Enquanto os seis primeiros mais Ellen F1 foram os mais suscetíveis ao *M. incognita* (**Tabelas 4.1 e 4.2**). Desta forma, podemos concluir que, considerando as variáveis IMO, IG e FR/reação conjuntamente, os híbridos com maiores níveis de resistência a ambas as espécies de nematoides foram: Meryva, Future F1, Nemo - Netta F1, Dulce F1 “Mini Plum”, Shani F1, Big Moon, Tallita, Express Gold, Dominador F1, Dominador, Ivety, Lumi, Muralha, Carina Ty, Debora Plus, BRS Couto, BRS Nagai, Magnet, Guardiã, Protetor, Tinto F1, Pizzadoro F1, Tarantelly F1 e a testemunha resistente Nemadoro. Os híbridos Ivanhoe RZ, Supera F1 e Serato foram mais resistentes a *M. incognita* raça 1 do que para *M. javanica* e para BRS Nagai foi o contrário.

Porém, o híbrido Ivanhoe RZ, que apresentou valor médio de IG para *M. javanica*, também pode ser classificado com bom nível de resistência a ambas as espécies de nematoides. No ensaio de detecção via PCR da presença/ausência do gene *Mi-1.2* nas 40 cultivares de tomateiro comercializadas no Brasil, indicaram uma predominância de cultivares heterozigotas, com poucas cultivares isentas do gene de resistência *Mi-1.2* (**Fig. 4.1**).

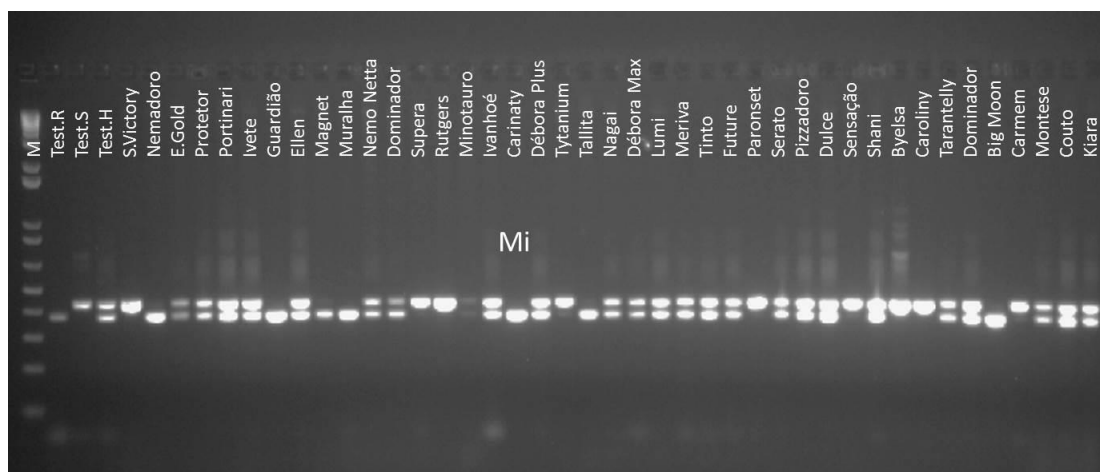


Figura 4.1. Detecção da presença/ausência do gene de resistência *Mi-1.2* em cultivares de tomateiro comercializadas no Brasil. PCR foi realizado usando o par de primers específico Mi23F/Mi23R. MM = marcador molecular 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen). O marcador molecular codominante para o gene de resistência *Mi-1.2* onde: *Mi-1.2/Mi-1.2* (homozigoto resistente; apenas com a banda baixa de 380 bp); *Mi-1.2/mi-1.2* (heterozigoto; com as duas bandas 380 e 430 pb, indica) e *Mi-1.2/Mi-1.2* (homozigoto suscetível; apenas com a banda alta 430bp).

No entanto, nem todas as cultivares com a presença do locus se mostraram resistentes (**Tabela 4.3**).

Tabela 4.3. Reações de imunidade (I), resistência (R) e suscetibilidade (S) de cultivares de tomateiro comercializadas no Brasil em resposta a inoculações com populações de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* raça 1 bem o perfil de um marcador molecular codominante para o gene de resistência *Mi-1.2* onde *Mi-1.2/Mi-1.2* (homozigoto resistente; campo amarelo); *Mi-1.2/mi-1.2* (heterozigoto; campo cinza) e *mi-1.2/mi-1.2* (homozigoto suscetível; campo laranja). A informação sobre a reação aos nematoides das galhas presente nos catálogos da empresas de sementes também é apresentada.

Cultivares	<i>Meloidogyne incognita</i>	<i>Meloidogyne javanica</i>	Informação sobre resistência aos nematoides-de-galhas nos catálogos	Presença do marcador para o gene <i>Mi-1.2</i>
Caroliny	(S)	(S)	X ¹	<i>Mi-1.2/Mi-1.2</i>
Meryva	(I)	(R)	X ¹	<i>Mi-1.2/Mi-1.2</i>
Byelsa	(S)	(R)	X ²	<i>Mi-1.2/Mi-1.2</i>
Future F1	(R)	(R)	X ¹	<i>Mi-1.2/Mi-1.2</i>
Nemo-Netta F1	(R)	(R)	X ¹	<i>Mi-1.2/Mi-1.2</i>
Tytanium TY	(S)	(S)	X ¹	<i>Mi-1.2/Mi-1.2</i>
Dulce F1	(R)	(R)	X ³	<i>Mi-1.2/Mi-1.2</i>
Shani F1	(R)	(R)	X ¹	<i>Mi-1.2/Mi-1.2</i>
Sensação	(S)	(S)	ND	<i>Mi-1.2/Mi-1.2</i>
Big Moon	(R)	(R)	ND	<i>Mi-1.2/Mi-1.2</i>
Tallita	(R)	(R)	X ¹	<i>Mi-1.2/Mi-1.2</i>
Express Gold	(R)	(R)	X ¹	<i>Mi-1.2/Mi-1.2</i>
Ivanhoe RZ	(R)	(R)	X ¹	<i>Mi-1.2/Mi-1.2</i>
Dominador F1	(R)	(R)	X ⁴	<i>Mi-1.2/Mi-1.2</i>
Paronset F1	(S)	(S)	X ⁵	<i>Mi-1.2/Mi-1.2</i>
Ellen F1	(S)	(S)	X ⁶	<i>Mi-1.2/Mi-1.2</i>
Supera F1	(R)	(S)	X ⁴	<i>Mi-1.2/Mi-1.2</i>
Serato	(R)	(S)	X ⁴	<i>Mi-1.2/Mi-1.2</i>

Ivety	(I)	(R)	X ⁷	Mi-1.2/Mi-1.2
Carmen	(S)	(S)	ND	Mi-1.2/Mi-1.2
Sheila Victory	(S)	(S)	X ⁷	Mi-1.2/Mi-1.2
Lumi	(R)	(R)	X ⁷	Mi-1.2/Mi-1.2
Muralha	(R)	(R)	X ⁸	Mi-1.2/Mi-1.2
Carina Ty	(I)	(R)	X ⁷	Mi-1.2/Mi-1.2
Debora Max	(R)	(S)	X ⁷	Mi-1.2/Mi-1.2
Debora Plus	(R)	(R)	X ⁷	Mi-1.2/Mi-1.2
BRS Kiara	(S)	(S)	X ⁹	Mi-1.2/Mi-1.2
BRS Couto	(R)	(R)	X ⁹	Mi-1.2/Mi-1.2
BRS Portinari	(S)	(S)	X ⁹	Mi-1.2/Mi-1.2
BRS Montese	(R)	(S)	X ⁹	Mi-1.2/Mi-1.2
BRS Nagai	(R)	(R)	X ¹	Mi-1.2/Mi-1.2
Magnet	(R)	(R)	X ⁷	Mi-1.2/Mi-1.2
Guardião	(R)	(R)	X ¹⁰	Mi-1.2/Mi-1.2
Protetor	(R)	(R)	X ¹⁰	Mi-1.2/Mi-1.2
Tinto F1	(I)	(R)	X ¹¹	Mi-1.2/Mi-1.2
Mínotauru F1	(S)	(S)	X ¹¹	Mi-1.2/Mi-1.2
Pizzadoro F1	(R)	(R)	X ¹¹	Mi-1.2/Mi-1.2
Tarantelly F1	(I)	(R)	ND	Mi-1.2/Mi-1.2
Rutgers	(S)	(S)	ND	Mi-1.2/Mi-1.2
Nemadoro	(R)	(R)	X ⁹	Mi-1.2/Mi-1.2

Catálogos fontes:

1 <http://www.agrocineo.com.br/2010/produtos.asp#tomate>

2 http://www.semillasfitoworld.com/en/products/vegetable_seeds/tomatoes/index.htm

3 http://www.poscosecha.com/es/empresas/akira-seeds-sl/_id:63042,seccion:catalogodeproductos

4 <http://www.agristar.com.br/premium/produto.htm>;

5 <https://www.syngenta.com.br/frutas-legumes-e-verduras>

6 <https://www.sementesfeltrin.com.br/Produto/tomate-ellen-hibrido-f1>

7 <http://www.sakata.com.br/index.php?action=catalogo&local=br&cultura=4&language=pt;>

8 <http://www.pg.fca.unesp.br/Teses/PDFs/Arq1346.pdf>

9 <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas>

10 <http://www.takii.com.br>;

11 <http://www.nunhems.com>;

12 <http://ashbmcd.com/index.php/HB/article/view/189>

4. CONCLUSÕES

- Verificou-se que a resistência dos híbridos comerciais de tomateiro a uma das espécies de nematoide é correlacionada com a resistência à outra espécie, uma característica que confirma o amplo espectro de resistência associado com o gene *Mi-1.2* (Gabriel et al., 2020);
- Os híbridos mais resistentes as duas espécies de nematoides foram: Meryva, Future, NemoNetta F1, Dulce F1, Shani F1, Big Moon, Tallita, Express Gold, Dominador, Ivety, Lumi, Muralha, Carina Ty, Debora Plus, BRS Couto, BRS Nagai, Magnet, Guardiã, Protetor, Tinto, Pizzadoro, Tarantelly e a testemunha resistente Nemadoro;
- Os híbridos Ivanhoe RZ, Supera F1 e Serato apresentaram maiores níveis de resistência a *M. javanica* em relação a *M. incognita*; ao passo que o híbrido BRS Nagai apresentou um nível superior de resistência a *M. incognita* em relação a *M. javanica*. O híbrido Ivanhoe RZ, apesar do valor médio de IG para *M. javanica*, também pode ser classificado como bom nível de resistência a ambas as espécies de nematoides.
- Verificou-se que os níveis de reação foram altamente variáveis (de imunidade a suscetibilidade) para cultivares contendo o gene *Mi-1.2* em homozigose ou heterozigose, sugerindo que outros fatores genéticos podem modular a expressão da resistência nos diferentes materiais genéticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; SIMON, P.W. (1999) Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124(1): 32-38.

BONETTI, J.I.S.; FERRAZ, S. (1981) Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 6:553.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. (2001) Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira* 25:35-44.

CHARCHAR, J.M.; GONZAGA, V.; GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L.S.; REIS, N.V.B.; ARAGÃO, F.A.S. (2003) Reações de cultivares de tomate à infecção por população mista de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *M. javanica* em estufa plástica e campo. *Nematologia Brasileira* 27:49-54.

CHARCHAR, J.M.; BOITEUX, L.S.; GIORDANO, L.B. (2004) Epidemics of *Meloidogyne brasilienses* on processing tomato hybrids carrying the Mi (root-knot nematode resistance) gene in Central Brazil. *Summa Phytopathologica* 30:108.

COOK, R. (1991) Resistance in plants to cyst and root-knot nematodes. *Agricultural Zoology Reviews* 4:213-240.

CRUZ C.D. (2006) Programa Genes - estatística experimental e matrizes. Viçosa: Editora UFV. 285p.

EISENBACK, J.D.; HIRSCHMANN-TRIANANTAPHYLLOU, H. (1991) Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In: NICKLE W.R. (Ed). *Manual of Agricultural Nematology*, Marcel Dekker, Inc, New York: pp. 191-274.

FERRAZ, L.C.C.B.; CHURATA-MASSA, M.G.C. (1983) Comportamento de cultivares de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*, Mill) de crescimento determinado em relação ao nematoide *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949. *Cientifica* 11:87-91.

FERY, R.L.; DUKES, P.D. (1984) Southern root-knot nematode of pepper. *Studies on value of resistance (abstract)*. *HortScience* 19:211.

FLOR H.H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Reviews of Phytopathology* 9:13-21.

GABRIEL, M.; KULCZYNSKI S.M.; MUNIZ M.F.; BOITEUX L.S.; CARNEIRO R.M. (2020) Reaction of a heterozygous tomato hybrid bearing the *Mi-1.2* gene to 15 *Meloidogyne* species. *Plant Pathology* 69(5):944-952.

GABRIEL M.; KULCZYNSKI S.M.; SANTOS M.F.; SOUZA C.F.; MUNIZ M.F.; BOITEUX L.S.; CARNEIRO R.M. (2022) A novel virulent Brazilian pathotype of *Meloidogyne javanica* towards the tomato *Mi-1.2* gene and pathogenicity to resistant rootstock. *Journal of Plant Diseases and Protection* 129(5):1269-1276.

GHEYSEN, G.; FENOLL, C. (2002) Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Reviews Phytopathology* 40: 191-219.

GIEBEL, J. (1982) Mechanism of resistance to plant nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 20:257-279.

GILBERT, J.C.; McGUIRRE, D.C. (1956) Inheritance of resistance to severe root-knot from *Meloidogyne incognita* in commercial-type tomatoes. *Proceedings of American Society of Horticultural Science*, 68:437-442.

HUANG, C.L. (1985) Mechanisms of resistance to root-knot nematodes. In: Sasser, J.N. & Carter, C.C (Eds.). *An advanced treatise on Meloidogyne: biology and control*. North Caroline State Univ. and Unit. St. Agency for International Development v.1, pp. 143-53.

HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R.A. (1973) Comparasion of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57:1025-1028.

IBRAIN, S.K. (1991) Peroxidase isoenzymes from *Meloidogyne* spp. culture and different host. *Revue de Nematologie* 14:35-44.

KEEN N.T. (1990) Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology* 24:447-463.

LINDSEY, D.L.; CLAYSHULTE, M.S. (1982) Influence of initial population densities of *Meloidogyne incognita* on three chilli cultivars. *Journal of Nematology* 14:353-358.

MILLIGAN, S.B.I.; BODEAU, J.; YAGHOUBI, J.; KALOSHIAN, I.; ZABEL, P.; WILLIAMSON, V.M. (1998) The root-knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine-zipper nucleotid-binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* 10:1307-1319.

OOSTENBRINK, M. (1966) Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mededelingen Landbouw* 66: 1-46.

- PEGARD, A.; BRIZZARD, G.; FAZARI, A.; SOUCAZE, O.; ABAD, P.; DIJAN-CAPORALINO, C. (2005) Histological species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 95:158-165.
- PINHEIRO, J.B.; DUVAL, A.M.Q.; FURUMOTO, O.; LOPES, C.A.; SILVA, G.O. (2009b.) Reprodução de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *Meloidogyne javanica* em linhagens avançadas de tomateiro industrial. Brasília - DF: Embrapa Hortaliças, (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 55).
- PUNJA, Z.K; ZHANG, Y.Y. (1993) Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *Journal of Nematology* 25:526-40.
- ROBERTS, P.A.; THOMASON, I.J. (1989) A review of variability in four *Meloidogyne* spp. measured by reproduction on several hosts including *Lycopersicon*. *Agricultural Zoological Review* 3:225-252.
- RODRIGUES, A.C.F.O.; ABRANTES, I.M.O.; MELILLO, M.T; BLEVEZA C.H.E.O. (2001) Ultrastructural response of coffee roots to root-knot nematodes, *Meloidogyne exigua* and *M. megadora*. *Nematropica* 30:201-210.
- ROSSI, M.; GOGGIN, F.L.; MILLINGAN, S.B.; KALOSHIAN, I.; ULLMAN, D.E.; WILLIAMSON, V.M. (1998) The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proceedings National Academy of Science* 95: p.9750-9754.
- SCOTT AJ; KNOTT M. (1974) A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics* 30:507-512.
- TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. (1978) Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Raleigh: North Carolina University Graphics, 111p.
- THIES, J.A.; MULLER, J.D.; FERRY, R.L. (1997) Effectiveness of resistance to southern root-knot nematode in 'Carolina Cayenne' pepper (*Capsicum annuum* L.) in greenhouse, microplots, a field test. *Journal of American Society of Horticultural Science* 122:2000-2004.
- TRUDGILL, D.L. (1991) Resistance and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. *Annual Review of Phytopathology* 29:167-192.
- VALE, F.X.R., ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E.M.; ALVARENGA, M.A.R. (2004) Manejo integrado das doenças do tomateiro: Epidemiologia e controle. In: ALVARENGA, M.A.R (ed.) Tomate: Produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia. Editora Ufla, p.217-308.

CAPÍTULO 5

Uso de marcadores moleculares SCAR/STS codominantes para seleção de cultivares brasileiras de cenoura (*Daucus carota*) associados à resistência genética a *Meloidogyne javanica*

RESUMO

O parasitismo por nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) é um grande obstáculo na produção de cenoura (*Daucus carota*) em regiões tropicais e subtropicais, causando perdas de produção e qualidade. No Brasil, as espécies com maior importância na cenoura são *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. A cultivar ‘Brasília’ é a principal fonte de resistência a estas duas espécies. No entanto, ainda não estão disponíveis sistemas de marcadores moleculares ligados aos fatores de resistência para as cultivares brasileiras de cenoura, que facilitaria o processo de seleção. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou a validação de marcadores moleculares SCAR/STS codominantes associados à resistência genética em uma população de plantas da cultivar ‘Brasília’. Realizou-se um estudo com uma população F₂ de 108 plantas da cultivar ‘Brasília #83147’ (que segrega para resistência a *M. javanica*). Plantas foram inoculadas com 8000 ovos + eventuais J2 de *M. javanica* aos 30 dias após a semeadura. DNA total foi extraído de amostras foliares e avaliadas (via PCR) com marcadores do tipo SCAR/STS codominantes (SQ1850R / SQ1700S e SQ6650R / SQ6590S) previamente identificados em estreita ligação com um locus de resistência a *M. javanica* (*Mj-1*) em ‘Brasília’. Quanto às análises nematológicas, avaliou-se os sistemas radiculares de plantas individuais aos 120 dias após a inoculação (DAI) quanto ao número de ovos por grama de raiz (NOGR), o fator de reprodução (FR) e a quantificação individual de galhas e massas de ovos. Raízes de plantas individuais contrastantes (resistentes e suscetíveis) foram vernalizadas e submetidas a autofecundação (geração S1). O bioensaio de inoculação em conjunto com a análise de marcadores confirmou que a resistência não está fixada nessa população, com muitos indivíduos suscetíveis sendo detectados. No entanto, foi possível identificar indivíduos com extrema resistência (imunidade) e com a presença de marcadores SCAR/STS codominantes. Esses indivíduos já podem ser utilizados como os pais em estudos genéticos e seleção molecular assistida do fator de resistência, auxiliando no desenvolvimento de novas cultivares brasileiras de cenoura resistentes a *M. javanica*.

Palavras-chaves: *Meloidogyne* spp., Nematoide-das-galhas, Parasitismo, Brasília, Perdas de produção.

ABSTRACT

Employment of molecular markers for selection of Brazilian carrot cultivars (*Daucus carota*) associated with genetic resistance to *Meloidogyne javanica*.

Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) parasitism is a major obstacle in carrot (*Daucus carota*) production in tropical and subtropical regions, causing yield and quality losses. In Brazil, the most important species in carrots are *Meloidogyne javanica* and *M. incognita*. The cultivar 'Brasília' is the major source of resistance against these two species. However, molecular marker systems linked to resistance factors for Brazilian carrot cultivars are still not available, which would facilitate the selection process. In this context, the present work aimed to validate codominant SCAR/STS molecular markers associated with genetic resistance in a plant population of the cultivar 'Brasília'. A study was carried out with an F₂ population of 108 plants of the 'Brasília #83147' cultivar (which segregates for resistance against *M. javanica*). Plants were inoculated with 8000 eggs + eventual J2 of *M. javanica* 30 days after sowing. Total DNA was extracted from foliar samples and evaluated (via PCR) with codominant SCAR/STS-like markers (SQ1_{850R} / SQ1_{700S} and SQ6_{650R} / SQ6_{590S}) previously identified in close connection with a resistance locus to *M. javanica* (*Mj-1*) in the cultivar 'Brasília'. As for the nematological analyses, the root systems of individual plants were evaluated at 120 days after inoculation (DAI) regarding the number of eggs per gram of root (NOGR), the reproduction factor (FR) and the individual quantification of galls and egg masses. Roots of individual contrasting plants (resistant and susceptible) were vernalized and subjected to selfing (S₁ generation). Inoculation bioassay in conjunction with marker analysis confirmed that resistance is not fixed in this population, with many susceptible individuals being detected. However, it was possible to identify individuals with extreme resistance (immunity-like response) and with the presence of codominant SCAR/STS markers. These individuals can now be used or as parents in genetic studies and molecular-assisted selection of the resistance factor, helping in the development of new Brazilian carrot cultivars resistant to *M. javanica*.

Keywords: *Meloidogyne* spp., Root-knot nematode, Parasitism, Brasília, Yield losses.

1 INTRODUÇÃO

A cenoura (*Daucus carota*), pertencente à família Apiaceae, é uma cultura de raízes de grande importância econômica, cultivada em diversos países ao redor do mundo devido à sua riqueza em nutrientes. A parte comestível da cenoura, a raiz principal, é especialmente reconhecida por ser rica em β -caroteno, vitaminas, proteínas e outros nutrientes essenciais (Megueni et al., 2017; Fabiyi, 2021). Atualmente, observa-se uma disseminação significativa do consumo de cenouras no território brasileiro, culminando na colocação do país entre as dez principais nações produtoras desse vegetal em escala global. A produção nacional excede 700 mil toneladas, ocupando aproximadamente 25 mil hectares de área cultivada. Esse notável crescimento posiciona a cenoura como a quinta hortaliça mais cultivada e consumo em âmbito nacional, conforme registros da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) de 2020 e estudos realizados por Dossa & Fuchs, (2017).

Uma das principais ameaças à produção de cenouras são os nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.). Esses organismos estabelecem uma relação parasitária com as plantas infectadas, criando áreas metabólicas que limitam a disponibilidade de fotoassimilados para o crescimento das plantas. Além disso, colonizam a raiz principal, os pelos radiculares e as raízes laterais, formando células gigantes que interrompe a absorção de nutrientes e água, resultando em danos significativos às plantas de cenoura (Hussain et al., 2016; Khan et al., 2018). Além de reduzir o rendimento das culturas, o nematoide provoca a formação de galhas e bifurcações nas raízes infestadas, tornando as cenouras inadequadas para o mercado e resultando em perdas econômicas consideráveis, que podem variar de 20% a até 100% da produção. Em casos de infestações severas, é comum observar rachaduras e deformações radiculares graves, conforme documentado por Pinheiro et al. (2017).

A magnitude das perdas está associada a diversos fatores, incluindo a densidade populacional dos nematoides, a suscetibilidade da cultivar utilizada, a espécie de nematoide presente, o tipo de solo e as condições ambientais, como temperatura e umidade relativa. Tais aspectos foram investigados por Viljoen et al. (2019). A compreensão desses elementos é essencial para a adoção de medidas adequadas de manejo desses microrganismos, visando minimizar seus efeitos negativos na produção de cenouras.

Conforme apontado por Cunha et al. (2021), no contexto específico do Brasil, as principais espécies de nematoide-das-galhas que ocasionam perdas na produção de cenouras são a *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne hapla*. Além disso, em áreas isoladas de cultivo de cenoura no país, também é possível identificar a presença da espécie *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood. Os campos infestados com nematoide-das-galhas podem ser efetivamente manejados por meio de práticas agrícolas, conforme sugerido em estudos científicos. Estas práticas incluem o uso de nematicidas químicos, que demonstraram ser altamente eficazes no controle desses nematoides (Vagelas & Gowen, 2012). No entanto, devido aos enormes efeitos prejudiciais à saúde humana, ao meio ambiente e a organismos não-alvo, o uso de nematicidas químicos não é recomendado (Damalas & Eleftherohorinos, 2011). Além disso, estudos indicam que os nematoides podem desenvolver resistência a nematicidas, o que limita ainda mais sua eficácia como estratégia de manejo (Molinari, 2011; Abd-Elgawad, 2020). Em contrapartida, a aplicação de agentes de biocontrole tem se mostrado promissora no controle desses nematoides (Vagelas & Gowen, 2012). A rotação de culturas e o uso de plantas antagonistas também têm sido recomendados como práticas eficazes para reduzir a população de nematoide-das-galhas no solo (Hussain et al., 2011; Kayania et al., 2012). A resistência genética, identificada em certas variedades de plantas, destaca-se como uma importante estratégia de manejo, proporcionando proteção natural a esses nematoides (Wiratno et al., 2009). A utilização de cultivares com resistência genética representa uma das estratégias mais eficazes, economicamente viáveis e de baixo impacto ambiental para mitigar as perdas ocasionadas por tais organismos (Mattos et al., 2019).

A cultivar 'Brasília' destaca-se como a principal fonte de resistência as espécies do gênero *Meloidogyne* (Simon et al., 1997). Utilizando marcadores moleculares, como RPAD e QTL, foi identificado um loco denominado *Mj-1*, localizado no cromossomo 8 em dois Acessos de cenoura derivados da cv. Brasília (891091 e 971252), como relatado por Boiteux et al. (2000). Esse gene manifesta resistência completa à espécie *M. javanica* e resistência parcial à espécie *M. incognita*. Posteriormente, em 2014, foi mapeado outro locus que confere resistência à espécie *M. javanica*, desta vez na cultivar "PI652188", sendo denominado *Mj-2*. Notavelmente, *Mj-2* também está localizado no cromossomo 8, embora não mapeie para o mesmo local que *Mj-1*, conforme mencionado por Aamir Ali et al. (2013). A descoberta de ambos os loci, *Mj-1* e *Mj-2*, representa um avanço significativo para o desenvolvimento de cenouras resistentes ao nematoide-das-galhas.

Nesse contexto, a identificação desses genes de resistência é de extrema importância para o processo de melhoramento e desenvolvimento de cultivares de cenoura, visando oferecer maior resistência ao nematoide e, conseqüentemente, reduzir as perdas causadas por esses organismos patogênicos.

Os marcadores moleculares representam uma abordagem inovadora para identificar recursos de germoplasma, utilizando polimorfismos de DNA e mRNA como base (Sivolap, 2013). Esses marcadores têm sido extensamente empregados na pesquisa básica e no processo de melhoramento de cenouras. Por meio dos marcadores moleculares, é possível analisar e caracterizar variações genéticas de forma mais precisa e eficiente. No entanto, é importante destacar que, até o momento, não estão disponíveis sistemas de marcadores moleculares associados aos fatores de resistência específicos para as cultivares brasileiras de cenoura. Essa ausência de informações genéticas ligadas aos genes de resistência representa limitação para o processo de seleção de variedades mais resistentes aos nematoides causadores de danos às plantações. Neste contexto, objetivou-se validar marcadores moleculares do tipo SCAR/STS codominantes visando a seleção de cultivares brasileiras de cenoura (*Daucus carota*) associados à resistência genética a *Meloidogyne javanica* em casa de vegetação e identificar indivíduos com resistência extrema (resposta do tipo imunidade) na população F₂ 'Brasília #83147' em casa de vegetação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização do experimento

Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação e nos laboratórios de Nematologia e Melhoramento e Genômica na Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, Brasil (15°55'44"S, 48°08'29"W, altitude de 996 m).

Obtenção, identificação e multiplicação de *Meloidogyne javanica*

Uma população de *Meloidogyne javanica* foi inicialmente estabelecida e mantida em tomateiro suscetível (*Solanum lycopersicum*) cultivar Santa Clara a partir de espécimes obtidas de raízes de soja pela metodologia de Hussey & Barker (1973) modificada por Bonetti & Ferraz (1981). O fenótipo da isoenzima α -esterase (EST) foi determinado utilizando extrato proteico de 15 fêmeas jovens em postura (Carneiro et al. 2000), o qual apresenta 3 bandas principais (Rm: 1,0; 1,4; 1,6) (Carneiro & Almeida, 2001). De cada fêmea identificada na análise bioquímica, foi separada uma única massa de ovos e inoculada em tomate cv. Santa Clara para posterior utilização. As enzimas esterases são consideradas as mais precisas para identificação das espécies de *Meloidogyne*.

2.3 Delineamento experimental

O desenho experimental utilizado foi em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com uma população F2 de 108 plantas da cultivar 'Brasília #83147' (que segrega para resistência a *Meloidogyne javanica*). A unidade experimental foi constituída de uma planta por vaso com capacidade para 2,6 L litros contendo uma mistura de solo e areia esterilizada na proporção (2:1). As cultivares 'Rutgers' (sem *Mi*-1.2) e 'Nemadoro' (com *Mi*-1.2) foram utilizadas como testemunhas, a fim de verificar a viabilidade inóculo. A população de coloração externa roxa Pop-750 (CRO) (sabidamente altamente suscetível a *M. javanica*) também foi empregada como testemunha. Neste estudo, justifica-se não adotar um delineamento experimental com repetições uma vez que cada planta de cenoura é única e portanto pode apresentar particularidade genética.

2.4 Instalação e condução dos experimentos

O experimento (Fig. 5.1 A,B,C e D) foi conduzido entre 02 de julho de 2022 a 31 de Outubro de 2022. Inicialmente, a semeadura da população F2 de 108 plantas da cultivar 'Brasília #83147' foi realizada em vasos de polietileno com capacidade para 2,6 L, contendo uma mistura de solo e areia esterilizados na proporção (2:1). A irrigação foi feita mediante as necessidades das plantas, mantendo o solo úmido, evitando o

encharcamento. Trinta dias após a semeadura foi realizada o desbaste manual das plântulas de cenoura, deixando apenas uma planta por vaso e em seguida foi realizada a inoculação dos nematoides.



Figura 5.1. **A:** Fenotipagem da população F2 de ‘Brasília #83147’ aos 30 dias após a semeadura (DAS) com desbaste; **B:** Plantas adultas com 90 dias após a semeadura (DAS); **C:** Raiz de tomateiro cv. ‘Rutgers’ (suscetível) aos 65 dias após a inoculação com *Meloidogyne javanica*; **D:** Raiz de cenoura ‘Roxa’ (suscetível aos 120 dias após a inoculação com *Meloidogyne javanica*. **Foto:** Dwillian F. Cunha

2.5 Preparo de suspensão e inoculação das plantas de cenoura

O preparo da suspensão foi realizado conforme Hussey & Barker (1973) modificada por Bonetti & Ferraz (1981). *Meloidogyne javanica* foi extraído dos sistemas radiculares do tomateiro “Santa Clara”, sabidamente suscetível a *M. javanica*. Plantas foram inoculadas com 8000 ovos + eventuais J2 de *M. javanica* Carvalho (2020) aos 30 dias após a semeadura, depositadas em 3 orifícios de 2 cm de profundidade entorno da planta (**Fig. 5.2**)



Figura 5.2. A: Marcação dos orifícios para deposição do inóculo B: Inoculação de suspensão de ovos + J2 de *Meloidogyne javanica* em uma população F2 de 'Brasília #83147'. Foto: Dwillian F. Cunha

2.6 Confirmação da associação com um locus de resistência ao *M. javanica* (*Mj-1*)

DNA total foi extraído de amostras foliares e avaliadas (via PCR) com marcadores do tipo SCAR/STS codominantes (SQ1850R / SQ1700S e SQ6650R / SQ6590S) previamente identificados em estreita ligação com um locus de resistência a *M. javanica* (*Mj-1*) em 'Brasília'. Uma metodologia CTAB 2 x modificada foi empregada para purificação de ácidos nucleicos (Boiteux et al., 1999), utilizando amostras de folhas apicais jovens (**Fig. 17a**). O *Pellet* de DNA foi lavado cuidadosamente com etanol a 70%. Os tubos de microcentrífuga foram então colocados em uma estufa a 37 °C por 20 min, e ressuspensos em 100 mL de tampão Tris-EDTA + RNase. As amostras purificadas foram agitadas/homogeneizadas em vórtice e armazenadas em um freezer (-20°C).

O par de primers utilizado para amplificar os marcadores no locus SQ1 (**Fig. 5.3 A e B**) foi [5'-GGA cgA TGG CCA GGG AAA GC-3'] e [5'-AAC CAA GTC ACG CCA ACA GTA ATT-3']. O volume final da mistura foi de 25 µL (23 µL master mix + 2 µL DNA). O master mix consistiu de 11,32 µL de água milliQ, 2,5 µL de tampão Taq polimerase 10 × (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3; KCl 500 mM), 5,7 µL de dNTPs (0,5 mM, Invitrogen), 0,5 µL de cada primer (0,5 mM), 2,3 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,18 µL de DNA polimerase *Taq* DNA polimerase (5 U/ µL, Invitrogen) (**Fig. 17b**). As amplificações foram realizadas com os seguintes parâmetros: passo inicial de desnaturação a 94°C por 2 min; 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 59°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1,5 minutos; e uma etapa final de extensão de 68°C por 10 min. Foi adicionado azul de bromofenol (5 µL) em cada amostra, e os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em tampão TBE (Tris-borato 40 mM, EDTA 1 mM), em um gel de agarose a 1,7% suplementado

com brometo de etídio, a 80 V por um período de aproximadamente 4 a 5 horas. Os géis foram fotografados sob luz UV. O marcador 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) foi colocado para localização do perfil de amplificação.



Figura 5.3. A: Coleta de material vegetal da população F2 de ‘Brasília #83147’; B: Aplicação do master mix + suspensão de DNA em cada amostra. **Foto:** Dwillian F. Cunha

2.7 Avaliação dos experimentos

Aos cento e vinte dias após a inoculação, os sistemas radiculares das plantas foram coletados e avaliadas as variáveis nematológicas: número de ovos por grama de raiz (NOGR) e fator de reprodução (FR), calculado pela relação de Oostenbrink (1966), além do estudo de outras variáveis (**Tabela 5.1**).

Tabela 5.1. Variáveis empregadas na correlação com o fator de reprodução (FR) de acessos de cenoura sob uma suspensão de inóculo de 8 mil ovos + eventuais juvenis de *Meloidogyne javanica* avaliados aos 120 DAI. Brasília, DF, 2023.

Variáveis	Sigla
Preso fresco (g)	PF
Massa da raiz secundária (g)	MR
Massa da casca (g)	MC
Ovos + J2 na raiz secundária	OJ2
Ovos + J2 na casca	OJ2C
J2 no solo	J2S
Número de ovos por grama de raiz secundária	NOR
Número de ovos por grama de casa	NOC
Comprimento (cm)	COM
Diâmetro (cm)	DIA
Tricomas	TRI
Fator de reprodução	FR

Foi realizado o teste de correlação simples entre as variáveis, a fim de verificar quais variáveis que influenciam, ou que estão correlacionados positivamente ou negativamente com o FR. Não foi empregado o índice de galhas (IG) e do índice de massas de ovos (IMO) de cada planta, proposta por Taylor & Sasser (1978) tendo em vista que a metodologia e escala de notas desenvolvidas são empregadas para espécies da família

Solanaceae, não sendo adequadas para plantas da família Apiaceae. Os sistemas radiculares foram lavados em água cuidadosamente (**Fig. 5.4**) e avaliados os seus pesos frescos (g), para posterior cálculo do número de ovos por grama de raiz.



Figura 5.4. A e B: Lavagem do sistema radicular da cenoura em balde com água. **A:** Planta de cenoura com solo nas raízes sendo imersa em água. **B:** Cenoura com o sistema radicular limpo, sem solo. **Foto:** Thávio J. B. Pinto

Em seguida, os sistemas radiculares foram processados separadamente, para extração de ovos e eventuais juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica* conforme técnicas de Hussey & Barker (1973) modificada por Bonetti e Ferraz (1981), a qual foi realizada a extração de ovos e juvenis recém-eclodidos (J2).

Os nematoides foram extraídos do solo pela metodologia da flotação-centrifugação (Jenkins, 1964), que consiste em uma alíquota de solo de 300 ml, peneira de 20 Mesh sobreposta à de 400 Mesh e solução de sacarose com 500 g de açúcar dissolvidos em 500 ml de água.

Quanto a extração de nematoides da casca da cenoura, retirou-se aproximadamente 0,3 cm de espessura de casca da raiz principal, sendo posteriormente realizado a extração de ovos e eventuais juvenis do segundo estágio de *M. javanica* conforme técnicas de Hussey & Barker (1973) modificada por Bonetti e Ferraz (1981),

2.8 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com auxílio do software Genes (Cruz, 2016). Antes da análise, os dados foram verificados quanto à normalidade pelo Teste de Lilliefors, e todos estavam normais. Para o estudo da fenotipagem, os dados foram submetidos a análise simples de média, mediana, variância e desvio padrão. Não foi

possível comparar médias, pois não houve repetições no experimento por serem plantas de uma população F2 onde cada planta é única. Nas tabelas as médias apresentadas são as originais sem transformação. Foram estimados também o coeficiente de variação ambiental (CV), coeficiente de variação genotípico (CVg) de acordo com Cruz & Regazzi (2001).

$$CV = 100 \times \frac{\sqrt{\text{quadrado médio residual}}}{\text{Média}}$$

$$CV(g) = \frac{\sqrt{\sigma^2}}{\text{Média}}, \text{ sendo } \sigma^2 = \frac{\text{quadrado médio dos Acessos} - \text{quadrado médio residual}}{\text{número de repetições}}$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diante da importância socioeconômica da cultura da cenoura no Brasil, bem como dos impactos significativos, como a redução da produtividade, descarte de cenouras e até mesmo o abandono das áreas pelos produtores (Pinheiro et al., 2017), torna-se importante adotar a utilização de cultivares com resistência genética como uma estratégia eficaz, economicamente viável e ambientalmente sustentável para mitigar os danos causados por nematoides-das-galhas (Mattos et al., 2019).

Os coeficientes de variação (CV) do fator de reprodução (FR), do número de ovos por grama de raiz (NOGR) e de ovos+J2 foram maiores em comparação com a variável massa total para a avaliação da viabilidade do inóculo. No entanto, a razão entre o CV genético (CVg) e o CV ambiental (CV) indica a predominância da variação genética sobre a variação ambiental, e essa razão é maior do que a unidade (1,0) para o NOGR e FR, e bem próxima da unidade para ovos+J2 (**Tabela 5.2**).

Tabela 5.2. Viabilidade do inóculo de *Meloidogyne javanica* de acordo com as testemunhas padrões, Brasília, DF, 2023.

Genótipos	Massa Total g	Ovos+J2	NOGR	FR	IG	IMO
Rutgers	17,81 a	142585,75 a	2569764,28a	17,82 a	5	5
Nemadoro	13,06 a	250,00 b	3481,25 b	0,03 b	1	1
Média	15,43	71417,87	1286622,76	8,92	3	3
CV	30,11	48,99	73,91	48,98	-	-
CVg/CV	0,63	0,99	1,87	2,85	-	-

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferiram a 5% pelo teste t.

Ou seja, os resultados desse estudo indicam que as condições ambientais e experimentais tiveram pouca influência na viabilidade do inóculo de *Meloidogyne javanica* (Falconer & Mackay, 1996). Isso sugere que fatores genéticos são mais determinantes para o fator de reprodução (FR), número de ovos por grama de raiz (NOGR) e ovos+J2 em comparação com a variação resultante das condições do ambiente e das técnicas experimentais utilizadas. O estudo da fenotipagem não permitiu comparar médias, pois não há repetições, uma vez que cada planta pode apresentar genética diferente. No entanto, após a análise do desvio padrão de 10,07, foi possível considerar como superiores o grupo formado desde a planta 24 (a primeira da tabela) até a planta 21. Dessa forma, o grupo compreendeu valores entre $0 \leq FR \leq 10,00$ e o menor FR (FR= 0) verificado para 19 plantas de cenoura (**Tabela 5.3**)

Tabela 5.3. Fenotipagem na ordem crescente de FR de cenouras quando submetidas a uma inoculação com 8 mil ovos + eventuais juvenis de *M. javanica* (O+J2) aos 120 DAI, Brasília, DF, 2023.

Gen	FR	Gen	FR	Gen	FR	Gen	FR	Gen	FR
24	0,00	67	0,10	8	0,50	81	2,10	12	9,50
76	0,00	108	0,10	46	0,50	69	2,10	21	10,00
85	0,00	30	0,10	53	0,60	26	2,50	61	10,90
87	0,00	59	0,10	60	0,60	68	2,50	45	12,80
90	0,00	54	0,10	25	0,60	107	2,70	4	13,20
98	0,00	16	0,10	1	0,70	52	2,80	58	14,00
57	0,00	63	0,10	29	0,80	82	2,90	5	14,20
71	0,00	95	0,10	44	0,80	86	3,80	6	14,30
102	0,00	20	0,10	65	0,90	19	3,90	37	14,80
103	0,00	43	0,10	74	0,90	42	4,10	80	15,10
106	0,00	62	0,10	66	1,10	13	4,10	18	16,70
9	0,00	27	0,20	73	1,30	28	4,20	78	31,40
47	0,00	39	0,20	56	1,50	64	4,20	36	38,60
15	0,00	79	0,20	94	1,50	70	4,40	14	51,70
72	0,00	40	0,20	105	1,70	22	4,90	97	101,80
104	0,00	55	0,20	31	1,80	10	5,10	48	295,60
17	0,00	33	0,30	51	1,80	C. roxa	5,20		
50	0,00	7	0,30	92	1,90	77	5,30		
101	0,00	3	0,30	11	2,00	38	5,40		
93	0,10	83	0,30	34	2,10	41	5,40		
100	0,10	84	0,40	32	2,10	99	5,90		
96	0,10	88	0,40	49	2,10	2	6,20		
Média	7,21								
Mediana	0,68								
Variância	922,62								
Desvio P.	10,07								

Gen: acesso; FR: fator de reprodução

O grupo compreendido entre as plantas 24 e 74 ($0 \leq FR \leq 1,00$) consiste em plantas resistentes a *M. javanica*, caracterizadas por apresentarem índice de galhas (IG) e número de ovos por grama de raiz (NOGR) com valores inferiores, além de um valor de fator de reprodução (FR) menor

que 1, conforme descrito por Oostenbrink (1966). Esses resultados indicam que há menor população final do nematoide presente em comparação à população inoculada.

A própria planta 21 não difere de todas as plantas acima, até a 24. A planta 21 está compreendida no mesmo intervalo de confiança pelo desvio padrão, do valor do fator de reprodução (FR) dela, que é 10, mais o desvio padrão de 10,07, ou seja, ela também pertence ao mesmo intervalo, e não difere também da planta 18, que tem valor inferior a 20,07 ($10,00 + 10,07$). O grupo apresentou valores entre $10 \leq FR \leq 16,70$ e o menor FR (FR= 10) notado para a planta 21. O padrão de suscetibilidade (cenoura roxa), utilizada como testemunha, encontra-se no mesmo intervalo de confiança e também não difere de todas as plantas abaixo, até a 80, a qual possui valor inferior a 15,27 ($5,20+10,07$).

O FR da cenoura roxa (FR= 5,20) foi considerado mediano a alto para esse experimento. Também foi observado FRs muito elevados (FR>50) em 3 plantas, ou 2,7% do total, as quais diferem entre si pelo desvio padrão de 10,07. Notavelmente, a planta 48 apresentou um FR de 295,60 (Fig. 5.5 A e B), que na prática, indica que a população final de ovos + eventuais J2 de *M. enterolobii* observada na avaliação do experimento foi cerca de 296 vezes a população inicial do nematoide. Da mesma forma, foi observado para a planta 97 com um FR de 101,80 (Fig. 5.5 C e D). Também foi verificado plantas com bifurcação na raiz principal, o que impacta diretamente na perda de valor comercial da cenoura (Fig. 5.5 E). Por outro lado, esse experimento permitiu a obtenção de plantas com ausência de galhas na raiz principal (Fig. 5.5 F).

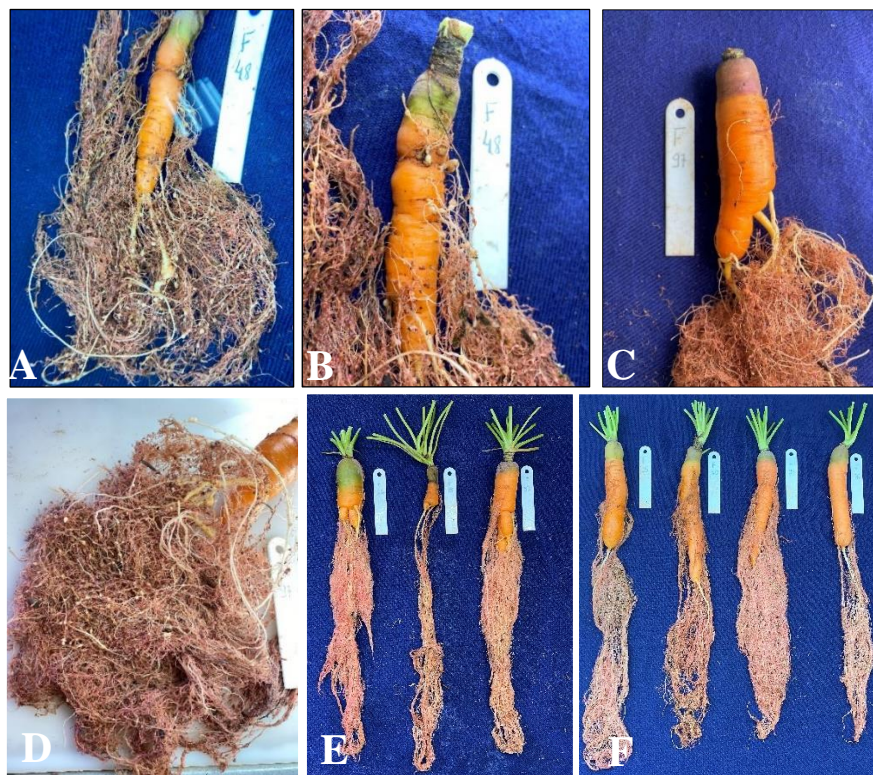


Figura 5.5. A e B: Planta 48 com muitas galhas e deformações, demonstrando alta suscetibilidade a *Meloidogyne javanica*; C e D: Planta 97 também permitiu uma grande multiplicação de *M. javanica*; E: Bifurcação na raiz causada pelo nematoide e F: Plantas com ausência de galhas. Foto: Dwillian F. Cunha

Correlação entre variáveis:

Na quantificação do grau de associação entre variáveis relacionadas à resistência a *Meloidogyne javanica* em uma população F2 de cenouras, buscou-se inferir quais variáveis são significativas, ou que estão correlacionados positiva ou negativamente com o FR (Tabela 5.4)

Tabela 5.4. Correlação simples entre as variáveis e o FR de cenouras quando inoculadas com 8 mil O + J2 de *M. javanica* aos 120 DAI, Brasília, DF, 2023.

	PF	MR	MC	OJ2R	OJ2C	J2S	NOR	NOC	COM	DIA	FR
MR	0,58*										
MC	0,57*	0,35*									
OJ2R	0,07	0,40*	-0,02								
OJ2C	0,04	0,31*	0,02	0,66*							
J2S	-0,14	0,03	-0,04	0,49*	0,61*						
NOR	-0,12	0,19*	-0,09	0,89*	0,75*	0,53*					
NOC	-0,06	0,22*	-0,12	0,70*	0,86*	0,54*	0,74*				
COM							-				
	0,60*	0,25*	0,47*	-0,06	-0,13	-0,13	0,19*	-0,18			
DIA	0,75*	0,35*	0,42*	0,00	0,02	-0,07	-0,15	0,02	0,21*		
FR	0,07	0,39*	-0,02	1,00*	0,66*	0,50*	0,89*	0,71*	-0,06	0,00	
TRI											-
	0,14	0,12	0,07	-0,04	-0,04	-0,11	-0,12	0,00	0,15	0,05	0,03

PF: PesoFresco g, MR: MassaRaizSecundaria g, MC:MassaCasca g, OJ2R: ovos+J2RaizSecundaria, OJ2C: ovos+J2Casca, J2S: J2 solo, NOR: NOGRRaizSecundaria, NOC: NOGRCasca, COM: Comprimento cm, DIA: Diametro cm, FR: FRraizsecundaria+casca+solo, TRI: tricomas, 1 presença e 0 ausência.

* significativos

As correlações significativas (*) com o FR foram: massa da raiz secundária (MR); ovos + J2 na raiz secundária (OJ2R); ovos + J2 na casca (OJ2C); J2 no solo (J2S); número de ovos por grama de raiz secundária (NOR); número de ovos por grama de casca (NOC). Valores iguais a 1,00 indicam correlação perfeita de causa e efeito com o FR, podendo ser positiva ou negativa. Por outro lado, valores abaixo de 1,00 indicam que a correlação reduziu.

Dentre todas as variáveis analisadas, o de maior correlação significativa com o FR foi o OJ2R, o qual apresentou uma correlação perfeita de causa e efeito, ou seja, 1,00 (100%) de correlação. O NOR figurou como a segunda maior correlação significativa, com 0,89 (89%) de causa e efeito com o FR. A menor correlação significativa com o FR foi a MR, com 0,39 (39%) de correlação. Houve também alta relação significativa do NOR com o OJ2R de 0,89 (89%), dessa vez não envolvendo o FR. Além disso, a menor correlação significativa e positiva foi notada na relação do NOR com a MR, a qual apresentou 0,19 (19%). Não foi observado nenhuma variável com correlação significativa e negativa com o FR, porém, a presença ou não de tricomas provavelmente não faz diferença. Por outro lado, verificou-se uma correlação significativa e negativa do COM o NOR de -0,18 (18%), indicando que com o aumento de um fator, o outro é reduzido.

Confirmação da associação com um locus de resistência a *Meloidogyne javanica* (Mj-I)

Além dos estudos moleculares de Boiteux et al. (2000), Simon et al. (1997; 2000) e Huang et al. (1986) com resistência de cenoura ao nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.), ainda não estão disponíveis sistemas de marcadores moleculares ligados aos fatores de resistência para as cultivares brasileiras de cenoura, que facilitaria o processo de seleção.

Quanto à análise via PCR, o bioensaio de inoculação em conjunto com a análise de marcadores confirmou que a resistência não está fixada na população da cultivar 'Brasília #83147', sendo detectados indivíduos suscetíveis. No entanto, foi possível identificar indivíduos com resistência extrema (resposta do tipo imunidade), como a planta 63 e a presença dos marcadores SCAR/STS codominantes (**Fig. 5.6**). A PCR realizada com o par de primers no locus SQ1 [5'-GGA cgA TGG CCA GGG AAA GC-3'] e [5'-AAC CAA GTC ACG CCA ACA GTA ATT-3'] confirmou que as plantas com resistência extrema no experimento em casa de vegetação, planta 63 e 98, e utilizadas como controle,

apresentaram padrões de banda do tipo homocigoto resistente (S-R). Como esperado, Brasília apresentou todos os fenótipos resistentes (S-R). Os resultados corroboram a investigação de Boiteux et al. (2000), revelando que o gene *Mj-1* apresenta resistência total à espécie *M. javanica* nos Acessos de cenoura derivados da cv. Brasília.

Além disso, no estudo conduzido por Aamir Ali et al. (2014), foi possível discernir a presença de um Loci de Características Quantitativas (QTL) de relevância para a resistência ao nematoide-das-galhas *Meloidogyne incognita* no cromossomo 8, em todas as três populações analisadas. Vale destacar que os intervalos de suporte desses QTLs englobaram a mesma região que o locus conhecido como *Mj-1*, o qual confere resistência a *M. javanica*. Cultivares sabidamente suscetíveis (cenoura Roxa e Nantes) foram identificadas como homocigotas suscetíveis e, portanto, apresentaram padrões de banda do tipo (S-S), com exceção de duas amostras (planta 11 e 14). A cultivar Rainbow Mix F1, cenouras coloridas, apresentou fenótipos resistentes (S-R) e heterocigotos (R-S), enquanto a cultivar Carota da Foraggio Jaune Du Doubs, cenoura de cor amarela, apresentou apenas fenótipos resistentes (S-R). Apesar de essas cultivares não serem brasileiras, foram utilizadas devido as características comerciais ainda não presentes no mercado nacional.

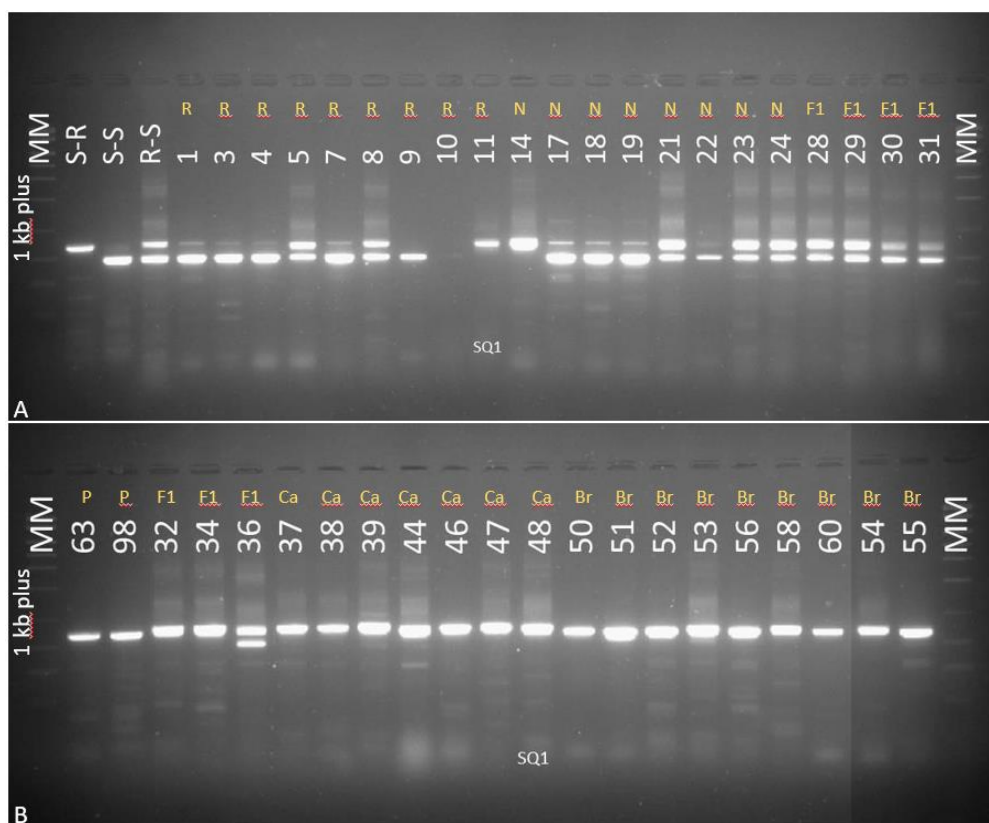


Figura 5.6. Eletroforese em gel de agarose (1,7%) dos marcadores SCAR/STS codominantes previamente identificados em estreita ligação com um locus de resistência a *M. javanica* (*Mj-1*) em ‘Brasília #83147’.

Detecção da presença e ausência do gene *MJ-1* para resistência a *M. javanica* nas cultivares de cenoura: Roxa (R), Nantes (N), Rainbow Mix F1 (F1), Carota da Foraggio Jaune Du Doubs (Ca), Brasília (Br) e nas cultivares controle nº 63 e 98 (P). S-R= Homozigoto Resistente; S-S= Homozigoto Suscetível e R-S= Heterozigoto. Os alelos SQ1800R painel A e painel B resistentes apresentaram uma banda alta simples. Os alelos SQ1700S painel A e painel B suscetíveis são dotados de uma banda baixa simples. A PCR foi realizada utilizando. O par de primers utilizado para amplificar os marcadores no locus SQ1 foi [5'-GGA cga TGG CCA GGG AAA GC-3'] e [5'-AAC CAA GTC ACG CCA ACA GTA ATT-3']. MM marcador molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

Além disso, Simon et al. (2000) também apresentaram evidências de que dois genes bastante próximos em fase de acoplamento explicam a resistência a *M. javanica* no locus *Mj-1*, portanto, há alguma evidência de que mais de um gene afeta a resistência a nematoides.

4. CONCLUSÕES

- Foi possível constatar, por meio de um bioensaio de inoculação em conjunto com uma análise de marcadores, que a resistência não está uniformemente estabelecida na população 'Brasília #83147'. Foram identificados alguns indivíduos suscetíveis. Contudo, destacou-se a identificação de exemplares com resistência extrema, caracterizada como resposta de imunidade. Essa identificação foi viabilizada pela presença dos marcadores SCAR/STS codominantes, cujo desenvolvimento original ocorreu no contexto de uma população de cenouras nos Estados Unidos.
- Esses resultados sugerem que os marcadores SCAR/STS codominantes podem ser valiosos para a seleção de cenouras resistentes a *Meloidogyne javanica* em programas de melhoramento genético no Brasil, permitindo a identificação e transferência mais eficazes de alelos de resistência para diferentes linhagens e acessos genéticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELGAWAD, M.M.M. (2020) Optimizing biological control agents for controlling nematodes of tomato in Egypt. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 30:58-68.

AAMIR ALI, MATTHEWS, W.C.; CAVAGNARO, P.F.; IORIZZO, M.; ROBERTS, P.A.; SIMON, P.W. (2013) Inheritance and mapping of *Mj-2*, a new source of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) resistance in carrot. *Journal of Heredity* 105:288–291.

BOITEUX, L.; BELTER, J.; ROBERTS, P.; SIMON, P. (2000) RAPD linkage map of the genomic region encompassing the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) resistance locus in carrot. *Theoretical and Applied Genetics* 100:439–446.

BONETTI, J.I.S.; FERRAZ, S. (1981) Modifications of the Hussey and Barker method for extracting eggs from *Meloidogyne exigua* in coffee roots. *Fitopatologia Brasileira*, 6:553.

CONAB: (2020) Companhia Nacional de Abastecimento. Boletim Hortigranjeiro, v. 6, n. 7. Brasília: CONAB. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/hortigranjeiros-prohort/boletim-hortigranjeiro>. Consultado em 25 Jul. 2023.

CRUZ, C.D. (2016) Genes Software-extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Scientiarum Agronomy*, 38: 547-552.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. (2001) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 1st ed. Imprensa Universitária. Viçosa.

CUNHA, T.G.D.; VISÔTTO, L.E.; PINHEIRO, L.M.; GOD, P.I.V.G.; ROSA, J.M.O.; OLIVEIRA, C.M.G.; LOPES, E.A. (2021) Distribution of *Meloidogyne* species in carrot in Brazil. *Ciência Rural* 51: e20200552.

DAMALAS, C.A.; ELEFTHEROHORINOS, I.G. (2011) Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8:1402–1419.

DOSSA, D.; FUCHS, F. (2017) CENOURA: Produção, mercado e preços na CEASA-PR. Boletim Técnico 04. CENOURA

FABIYI, O.A. (2021) Manejo sustentável de *Meloidogyne incognita* infectando cenoura (*Daucus carota*): síntese verde de nanopartículas de prata com *Cnidioscolus aconitifolius*. *Vegetos* 34: 277–285.

HUSSAIN, M.A.; MUKHTAR, T.; KAYANI, M.Z. (2011) Efficacy evaluation of *Azadirachta indica*, *Calotropis procera*, *Datura stramonium* and *Tagetes erecta* against root-knot nematodes *Meloidogyne incognita*. *Pakistan Journal of Botany* 43:197–204.

HUSSAIN, N., ABBASI, T.E ABBASI, S.A. (2016) Vermiremediação de uma invasora e pernicioso planta daninha salvinia (*Salvinia molesta*). *Eco. Eng.* 91:432-440.

HUSSEY R.S.; BARKER KR. (1973) A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp. Including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57: 1025-1028.

KHAN, F.; ASIF, M.; KHAN, A.; TARIQ, M.E.; SIDDIQUI, M.A. (2018) Screening of carrot cultivars against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Indian Phytopathology 2: 1-7.

KAYANIA, M.Z.; MUKHTAR, T.; HUSSAIN, M.A. (2012) Evaluation of nematicidal effects of *Cannabis sativa* L. and *Zanthoxylum alatum* Roxb. against root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*. Crop Protection 39:52–56.

MEGUENI, C.; TCHUENTEU, T.L.; NOUBISSIE, E.; MAIMOUNA, A.E.; BACHIROU, H. (2017) Produtividade de campo de cenoura (*Daucus carota*) em Adamawa Camarões e propriedades químicas de raízes de acordo com pré-tratamentos de esterco de galinha e pó de vivianita. Global Journal of Agriculture and Veterinary Sciences 10:16–23.

MOLINARI, S. (2011) Resistência vegetal natural e induzida, como estratégia de controle de nematoides fitoparasitários alternativos a pesticidas. Plant Cell Reports 30:311–323.

OOSTENBRINK, M. (1966) Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Mededelingen Landbouw 66:1-46.

SIMON, P.; ROBERTS, P.; BOITEUX, L.S. (1997) Germplasm sources, inheritance, and marker assisted selection for southern and northern nematodes in carrot. Journal of Applied Genetics 38:57–59.

SIVOLAP, Y.M. (2013) Molecular markers and plant breeding. Cytology and Genetics 47:188–195.

PINHEIRO, J.B. (2017) Nematoides em hortaliças. 1. ed. Brasília-DF: Embrapa. 194p.

TAYLOR, D.T.; SASSER, J.N. (1978) Biology identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Raleigh, North Carolina State University. p.111.

VAGELAS, I.; GOWEN, S.R. (2012). Control of *Fusarium oxysporum* and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) with *Pseudomonas oryzihabitans*. Pakistan Journal of Phytopathology 24:32–38.

VILJOEN, J.J.F.; LABUSCHAGNE, N.; FOURIE, H.; SIKORA, R.A. (2019) Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomatoes and carrots by plant growth-promoting rhizobacteria. Tropical Plant Pathology 44:284-291

WIRATNO.; TANIWIRYONO, D.; VAN DEN BERG, J.H.J.; RIKSEN, A.J.; RIETJENS, I.; DJIWANTIA, S.R.; KAMMENGA, J.E.; MURK, A.J (2009) Nematicidal activity of plant extracts against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. The Open Natural Products Journal 2099:77-85.

CONCLUSÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO

- Todos os acessos de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) avaliados se comportaram como suscetíveis sob os quatro níveis de inóculo testados de *Meloidogyne enterolobii*, demonstrando mais uma vez a rápida necessidade da busca de fontes de resistência e o risco eminente que esse nematoide representa para a agricultura brasileira.
- O estudo sugere que a dose de inóculo compreendida entre 1000 a 2000 ovos + eventuais juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne enterolobii*, em plantas de tomate com 15 dias após a semeadura e com 15 cm de comprimento, durante os meses de primavera e verão, pode ser considerada ótima e muitas vezes suficiente para desencadear a expressão máxima dos sintomas nos tomateiros em estudo. Provavelmente, essa metodologia poderá ser empregada para os futuros trabalhos com *Meloidogyne* no tomateiro.
- Foi possível identificar que o gene de resistência *Mi-1.2* presente nos materiais resistentes as espécies de *Meloidogyne* não confere um efeito residual significativo a espécie de nematoide-das-galhas *Meloidogyne enterolobii*.
- Esse estudo mostrou o panorama atual de vasta gama de híbridos de tomates com resistência aos nematoides-das-galhas com maior ocorrência em campos de produção, *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* raça 1. Estes resultados são importantes para agrônomos, técnicos, extensionistas e produtores na indicação e escolha da melhor cultivar/híbrido com resistência as espécies de nematoide-das-galhas estudadas.
- O trabalho permitiu a identificação de exemplares com resistência extrema na cenoura Brasília e a validação dos primeiros marcadores SCAR/STS codominantes para populações de cenoura no Brasil.