

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA 'JÚLIO DE MESQUITA FILHO'
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**FITONEMATÓIDES NA CULTURA DA BATATA: REAÇÃO
DE GENÓTIPOS A *Meloidogyne* spp., DISTRIBUIÇÃO DE
ESPÉCIES E CARACTERIZAÇÃO DOS SINTOMAS**

Adriana Rodrigues da Silva
Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Março de 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA 'JÚLIO DE MESQUITA FILHO'
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FITONEMATÓIDES NA CULTURA DA BATATA: REAÇÃO
DE GENÓTIPOS A *Meloidogyne* spp., DISTRIBUIÇÃO DE
ESPÉCIES E CARACTERIZAÇÃO DOS SINTOMAS**

Adriana Rodrigues da Silva

Orientador: **Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Março de 2009

S586f Silva, Adriana Rodrigues da
Fitonematóides na cultura da batata: reação de genótipos a *Meloidogyne* spp., distribuição de espécies e caracterização dos sintomas / Adriana Rodrigues da Silva. -- Jaboticabal, 2009
xviii, 96 f.; 28 cm

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Jaime Maia dos Santos
Banca examinadora: Maria Amelia dos Santos, Marineide Mendonça Aguilera, Rita de Cássia Panizzi, Sergio Ademir Calzavara
Bibliografia

1. *Meloidogyne* spp. 2. *Pratylenchus* spp. 3. Fitossanidade. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.21:635.21

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ADRIANA RODRIGUES DA SILVA – Nascida em 11 de setembro de 1975, na cidade de Pato Branco-PR. Em 1995, iniciou o Curso de Graduação em Engenharia Agrônoma na Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em Uberlândia-MG. Obteve o título de Engenheira Agrônoma com a defesa da Monografia, desenvolvida na Área de Nematologia Agrícola, intitulada ‘Hospedabilidade de nematóides de galha em cinco cultivares de arroz de terras altas’, em 2000. Em 2001, iniciou o Curso de Mestrado em Agronomia, com Ênfase em Fitopatologia. Obteve o título de Mestre em Agronomia (Fitopatologia) com a defesa da Dissertação intitulada ‘Métodos de inoculação de *Diplodia maydis* e *Fusarium moniliforme* em três populações de milho’, em fevereiro de 2004. cursou seu Doutorado em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal na Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (Unesp/FCAV), Câmpus de Jaboticabal-SP, no período de agosto de 2005 a março de 2009.

*Fui moço e agora sou velho, mas nunca vi
desamparado o justo, nem a sua
descendência a mendigar o pão.*

Salmo 37: 25

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, pela infra-estrutura e o apoio fornecido durante o curso.

Ao Conselho do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP/FCAV, pela oportunidade que me foi dada para a realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Doutor Jaime Maia dos Santos, pela pronta disposição em receber-me e orientar-me, principalmente, para a vida.

A todos os demais professores que, ao longo da vida acadêmica, contribuíram para o meu crescimento profissional.

A todos os funcionários, em especial aos do Departamento de Fitossanidade, do Laboratório de Nematologia (André, Sandra e Walmir), do Departamento de Biologia, do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (João), do Laboratório de Microscopia Eletrônica (Claudinha) e da Biblioteca.

À Associação Brasileira da Batata – ABBA, com sede no município de Itapetininga-SP, pelo suporte.

Aos Engenheiros Agrônomos Natalino Shimoyama (Diretor Geral da ABBA), Pedro C. R. Hayashi, Dr. Mário M. Inomoto e Erica Hayashi pela inestimável colaboração no desenvolvimento do trabalho.

Ao Engenheiro Químico Doutor Marcelo Teixeira Leite, meu marido, por me dar aquela mãozinha para superar os obstáculos da vida.

Principalmente, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho,

obrigada!

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| LISTA DE TABELAS..... | x |
| LISTA DE FIGURAS..... | xii |
| RESUMO..... | xvi |
| SUMMARY..... | xviii |
| CAPÍTULO I | |
| CONSIDERAÇÕES GERAIS..... | 01 |
| I REFERÊNCIAS..... | 08 |
| CAPÍTULO II | |
| Reação de Genótipos de Batata (<i>Solanum</i> spp. L.) em Casa de Vegetação a <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> e <i>M. mayaguensis</i> e <i>in vitro</i> a <i>M. javanica</i> | 13 |
| RESUMO..... | 13 |
| I INTRODUÇÃO..... | 14 |
| II MATERIAL E MÉTODOS..... | 16 |
| 2.1 Ensaio em casa de vegetação..... | 16 |
| 2.2 Ensaio em laboratório..... | 19 |
| 2.2.1 Efeito das soluções utilizadas na axenização do inóculo na eclosão dos J2..... | 22 |
| 2.2.2 Efeito das soluções utilizadas na axenização do inóculo na viabilidade dos J2..... | 22 |
| 2.3 Análise estatística..... | 23 |
| III RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 24 |
| IV CONCLUSÕES..... | 33 |
| V REFERÊNCIAS..... | 34 |
| CAPÍTULO III | |
| Efeito da Densidade de Inóculo e do Tempo de Incubação na Produção <i>in vitro</i> | |

| | Página |
|---|--------|
| de Ovos de <i>Meloidogyne javanica</i> em Mini-tubérculos Enraizados..... | 37 |
| RESUMO..... | 37 |
| I INTRODUÇÃO..... | 38 |
| II MATERIAL E MÉTODOS..... | 40 |
| 2.1 Produção de ovos como uma função da densidade do inóculo..... | 40 |
| 2.2 Produção de ovos como uma função do período de incubação..... | 41 |
| 2.3 Análise estatística..... | 42 |
| III RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 44 |
| IV CONCLUSÕES..... | 50 |
| V REFERÊNCIAS..... | 51 |
| CAPÍTULO IV | |
| Distribuição das Espécies de Fitonematóides Associadas à Cultura da Batata (<i>Solanum tuberosum</i> L.) nas Principais Regiões Produtoras do Brasil..... | 55 |
| RESUMO..... | 55 |
| I INTRODUÇÃO..... | 56 |
| II MATERIAL E MÉTODOS..... | 58 |
| 2.1 Extração dos fitonematóides de raízes e tubérculos..... | 58 |
| 2.2 Identificação dos fitonematóides extraídos dos tubérculos de batata..... | 61 |
| 2.2.1 Multiplicação <i>in vitro</i> de espécimes de <i>Meloidogyne</i> a partir de massas de ovos..... | 61 |
| 2.2.2 Preparo dos fitonematóides para estudo ao microscópio fotônico..... | 62 |
| 2.2.3 Preparo dos fitonematóides para estudo ao microscópio eletrônico de varredura..... | 63 |
| 2.2.4 Caracterização dos fenótipos isoenzimáticos de espécies de <i>Meloidogyne</i> | 64 |
| 2.3 Caracterização dos sintomas causados pelas espécies-chave da cultura | |

| | Página |
|--|--------|
| em tubérculos e raízes..... | 65 |
| 2.3.1 Coloração de massa de ovos..... | 66 |
| 2.3.2 Coloração de espécimes no interior do tecido vegetal com fucsina ácida..... | 66 |
| 2.3.3 Coloração de espécimes no interior do tecido vegetal com lactofenol..... | 67 |
| III RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 68 |
| IV CONCLUSÕES..... | 92 |
| V REFERÊNCIAS..... | 93 |

LISTA DE TABELAS

| Tabela | | Página |
|-------------|--|--------|
| CAPÍTULO II | | |
| 1 | Genótipos de batata avaliados quanto à reação a <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> e <i>M. mayaguensis</i> e o padrão de suscetibilidade utilizado no ensaio realizado no período de julho a outubro de 2007 e a sua respectiva indicação de uso..... | 17 |
| 2 | Genótipos de batata avaliados quanto à reação a <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> e <i>M. mayaguensis</i> e o padrão de suscetibilidade utilizado no ensaio realizado no período de janeiro a abril de 2008 e a sua respectiva indicação de uso..... | 18 |
| 3 | Reação de genótipos de batata a <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> e <i>M. mayaguensis</i> avaliada no período de julho a outubro de 2007, em casa de vegetação, aos 60 dias após a inoculação de 5.000 ovos de cada espécie..... | 24 |
| 4 | Reação de genótipos de batata a <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> e <i>M. mayaguensis</i> avaliada no período de janeiro a abril de 2008, em casa de vegetação, aos 60 dias após a inoculação de 5.000 ovos de cada espécie..... | 25 |
| 5 | Médias do número de ovos produzidos por <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> e <i>M. mayaguensis</i> em genótipos de batata, em casa de vegetação, em duas épocas..... | 25 |
| 6 | Médias do número de ovos produzidos, <i>in vitro</i> , por <i>Meloidogyne javanica</i> em genótipos de batata em função da axenização com ampicilina 1% e peróxido de hidrogênio 1%, 45 dias após a inoculação com 1.000 ovos | |

| Tabela | Página |
|--|--------|
| 6 contidos em 1 mililitro..... | 26 |
| 7 Médias de eclosão do inóculo, em B.O.D., e de viabilidade, em casa de vegetação, após a desinfestação de ovos de <i>Meloidogyne javanica</i> com ampicilina 1% e com peróxido de hidrogênio 1%..... | 27 |
| 8 Médias do fator de reprodução de <i>Meloidogyne javanica</i> em genótipos de batata <i>in vitro</i> (45 dias após a inoculação de 1.000 ovos) <i>versus</i> casa de vegetação (60 dias após a inoculação de 5.000 ovos)..... | 31 |
| CAPÍTULO III | |
| 1 Médias do número de ovos produzidos <i>in vitro</i> por <i>Meloidogyne javanica</i> em mini-tubérculos de 'HPC 7 B' em função da inoculação com densidade de inóculo de 500, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500 e 3.000 ovos por frasco, avaliado aos 45 dias após a inoculação..... | 47 |
| CAPÍTULO IV | |
| 1 Origem e número de amostras de tubérculos sintomáticos (genótipo, quando identificado) utilizadas no levantamento da ocorrência de fitonematóides associados à cultura da batata nas principais regiões produtoras do País..... | 60 |
| 2 Origem e número de amostras de tubérculos sintomáticos utilizadas no levantamento dos fitonematóides associados à cultura da batata nas principais regiões produtoras do País..... | 69 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------------|--|--------|
| CAPÍTULO II | | |
| 1 | <p>Teste para avaliação de genótipos de batata <i>in vitro</i> quanto à reação a <i>Meloidogyne javanica</i>. A) Mini-tubérculos de ‘HPC 7 B’ desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio 1%; B) Mini-tubérculo no frasco contendo areia com 10% de umidade (m/v), previamente autoclavados; C) Inoculação asséptica de suspensão contendo 1.000 ovos desinfestados, contidos em 1 mililitro; D) Frascos contendo mini-tubérculo inoculado, tampados com papel alumínio e vedados com filme de PVC[®], prontos para serem armazenados em B.O.D.....</p> | 21 |
| 2 | <p>Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Meloidogyne javanica</i> em mini-tubérculo de batata inoculado com 1.000 ovos por frasco, incubado no escuro a 25 ± 1 °C, durante 45 dias. A) Aspecto do fundo dos recipientes contendo os genótipos ‘HPC 7 B’, ‘Cupido’ e ‘Ágata’ (da esquerda para direita), indicando a sanidade do mini-tubérculo; B) Aspecto saudável do tubérculo e das raízes do genótipo ‘HPC 7B’; C e D) Tubérculos de ‘Cupido’ e ‘Ágata’, respectivamente, em avançado processo de decomposição. Areia com excesso de umidade provocado pelo extravasamento do conteúdo celular.....</p> | 28 |
| 3 | <p>Sintomas e sinais da infecção causada por <i>Meloidogyne javanica</i> em raízes de mini-tubérculo ‘HPC 7 B’, após 45 dias de incubação <i>in vitro</i>. A e B) Raiz com galha observada através do frasco (seta); C) Mini-tubérculo com sistema radicular apresentando numerosas galhas (seta denota um micro-tubérculo formado <i>in vitro</i>); D) Sistema radicular apresentando massas de ovos coloridas com fucsina ácida (seta); E e F) Fotomicrografia de massa de ovos em estereoscópio e em microscópio fotônico, respectivamente (barras = 200 μm).....</p> | 29 |
| CAPÍTULO III | | |
| 1 | <p>Sintomas e sinais indicativos do estabelecimento e multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Meloidogyne javanica</i> em mini-tubérculos de ‘HPC 7 B’. A) Intumescimento radicular causado pela hipertrofia e hiperplasia celular nos tecidos ao redor do ponto (seta) onde a fêmea estabeleceu o sítio de</p> | |

| Figura | Página | |
|-----------------|---|----|
| 1 | alimentação, observado através do frasco, 20 dias após a inoculação; B e C) Sistema radicular do mini-tubérculo cultivado <i>in vitro</i> , 60 dias após a inoculação, apresentando galhas (seta) e massas de ovos coloridas com fucsina ácida (pontos vermelhos); D) Ponta de raiz apresentando fêmeas estabelecidas ao redor do floema..... | 45 |
| 2 | Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Meloidogyne javanica</i> em mini-tubérculos de 'HPC 7 B', como uma função da densidade do inóculo, após 60 dias da inoculação. Correlação negativa (91,3%; $P > t = 0,000116$) entre a média do número de ovos produzidos (vermelho) e do fator de reprodução (azul) de <i>M. javanica</i> | 46 |
| 3 | Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Meloidogyne javanica</i> em mini-tubérculos de 'HPC 7 B' como uma função do período de incubação, no escuro a 25 ± 1 °C, após a inoculação com 1.000 ovos..... | 48 |
| CAPÍTULO IV | | |
| 1 | Estados e Municípios amostrados (total de amostras coletadas) para o estudo fitossanitário de distribuição das espécies de fitonematóides associadas à cultura da batata (asterisco denota coleta de amostras também em mercados)..... | 59 |
| 2 | Ocorrência de espécies de fitonematóides nas diferentes regiões produtoras de batata do Sudeste do País..... | 70 |
| 3 | Mapa de distribuição das principais espécies de fitonematóides de galha (<i>Meloidogyne</i> spp.) associadas a cultura da batata em importantes regiões produtoras do Brasil, durante a safra 2007/2008, nos Estados de Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo..... | 72 |
| 4 | Mapa de distribuição das principais espécies de fitonematóides das lesões radiculares (<i>Pratylenchus</i> spp.) associadas a cultura da batata em importantes regiões produtoras do Brasil, durante a safra 2007/2008, nos Estados de Goiás, Minas Gerais, Paraná e São Paulo..... | 73 |
| 5 | Ocorrência de espécies de fitonematóides nas diferentes regiões produtoras de batata do Sul do País..... | 74 |
| 6 | Ocorrência de espécies de fitonematóides na região produtora de batata | |

| Figura | Página |
|--|--------|
| 6 do Centro Oeste do País..... | 75 |
| 7 Ocorrência das principais espécies de fitonematóides encontradas nas 168 amostras coletadas nas principais regiões produtoras de batata do País..... | 77 |
| 8 Sintomas da infecção por <i>Meloidogyne</i> spp. em tubérculos coletados nas principais regiões produtoras de batata do Brasil, na safra 2007/2008. A) Tubérculo severamente infectado e o efeito da lavagem no progresso da podridão pós-colheita; B) Galhas em diferentes genótipos; C) Tubérculos com padrão comercial (esquerda) e infectados, exibindo galhas (direita); detalhe da galha em dois genótipos..... | 78 |
| 9 Sintomas e sinais da infecção por <i>Meloidogyne</i> spp. em tubérculos de batata. A e B) Corte transversal da galha; C) Galhas menores (seta), deprimidas em função do armazenamento; D) Vista interna e externa: pontuações escuras (ao redor do corpo da fêmea) internamente (seta), correspondendo às deformações externas; E, F e G) Pontuações escuras (setas) correspondentes ao local onde as fêmeas estão imersas no tecido..... | 80 |
| 10 Sintomas e sinais da infecção por <i>Meloidogyne</i> spp. em tubérculos de batata. A) Batata-semente infectada apresentando galhas no tubérculo (seta) e também no sistema radicular; B e C) Detalhe de galhas com massa de ovos externa em raízes tenras de um mini-tubérculo, antes e depois de coloração com fucsina ácida, respectivamente; D) Galha com massa de ovos externa (seta cheia) e uma fêmea parcialmente exposta (seta vazada); E e F) Fragmentos de raiz infectada, colorida com fucsina ácida, apresentando juvenis recém-penetrados (a), juvenis 'salsicha' (b) e fêmeas (c), respectivamente..... | 81 |
| 11 Fotomicrografias de cortes transversais de tubérculos infectados por <i>Meloidogyne</i> spp. A e B) Tubérculo colorido com fucsina ácida apresentando fêmeas maduras, esbranquiçadas em seus sítios de alimentação (seta); C e D) Tubérculo <i>in natura</i> apresentando pontuações escuras (seta branca) ao redor do corpo de fêmeas (seta preta); E e F) Fotomicrografia de um corte transversal (a mão livre) do tubérculo colorido com fucsina ácida, onde se pode observar fêmeas (vermelho) e um macho (seta), respectivamente..... | 82 |

| Figura | Página |
|---|--------|
| 12 Subpopulações de <i>Meloidogyne incognita</i> (A, B e C) e <i>M. arenaria</i> (D e E). A) Eletromicrografia de varredura do padrão perineal da fêmea; B) Fotomicrografia da região labial do macho; C) Fenótipo isoenzimático para esterase com uma banda típica da espécie (seta), na altura da de menor mobilidade da de <i>M. javanica</i> ; D) Fotomicrografia do padrão perineal da fêmea; F) Fotomicrografia da região labial do macho; MJ = <i>Meloidogyne javanica</i> , como controle..... | 83 |
| 13 Eletromicrografia de varredura e fotomicrografia de espécimes pertencentes a subpopulação de <i>Meloidogyne javanica</i> coletada no Rio Grande do Sul, com fenótipo para esterase com 2 bandas (J2a). A, B e C) Eletromicrografia de varredura e fotomicrografia, respectivamente, da configuração perineal da fêmea (barra = 10 µm); D) Eletromicrografia de varredura da região labial do macho; E e F) Fotomicrografias da região labial do macho (barra = 13,5 µm); G) Eletromicrografia de varredura mostrando detalhes do campo lateral do macho; H) Fotomicrografia da região caudal do macho apresentando testículo com espermatozóides (seta) (barra = 13,5 µm); I) Fotomicrografia da região anterior de juvenil (barra = 13,5 µm)..... | 84 |
| 14 Qualidade sanitária de amostras de batata-semente com diferentes genótipos. A e B) Sintomas externos da infecção por <i>Meloidogyne</i> spp.; C) Corte longitudinal em um broto infectado por <i>Meloidogyne</i> spp. (setas denotam fêmeas maduras do fitonematóide); D) Vista externa da brotação (setas), sem sintoma visível da infecção..... | 86 |
| 15 Eletroforese da subpopulação de <i>Meloidogyne javanica</i> associada à uma lavoura de batata no Estado do Rio Grande do Sul. A) Fenótipo para alfa esterase sem a banda de mobilidade intermediária característica de <i>M. javanica</i> (seta); B e C) Fenótipos idênticos àquele característico à <i>M. javanica</i> , para superóxido dismutase (JA2) e malato desidrogenase (N3), respectivamente (setas)..... | 87 |
| 16 Fotomicrografias dos principais caracteres para a identificação de <i>Pratylenchus brachyurus</i> (F, G e H), <i>P. coffeae</i> (I, J, L e M) e <i>P. penetrans</i> (A, B, C, D e E). A) Região labial da fêmea com três anéis (setas); B) Espermateca funcional arredondada (seta); C) Saco pós uterino (seta); D e E) Região posterior do macho e da fêmea, respectivamente; F) Região labial da fêmea com dois anéis (seta); G) Vulva (seta) com ovo em estágio | |

| Figura | Página | |
|--------|---|----|
| 16 | embrionário no interior do corpo; H) Região caudal; I) Região labial da fêmea com dois anéis (seta); J) Espermateca funcional ovalada (seta); L) Cauda truncada da fêmea; M) Região posterior do macho com bursa envolvendo toda a cauda..... | 90 |
| 17 | Sintomas da infecção por <i>Pratylenchus</i> spp. em tubérculos coletados nas principais regiões produtoras de batata do Brasil, caracterizado por inúmeras pequenas pontuações necróticas, deprimidas, na superfície externa do tubérculo..... | 91 |

FITONEMATÓIDES NA CULTURA DA BATATA: REAÇÃO DE GENÓTIPOS A *Meloidogyne* spp., DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES E CARACTERIZAÇÃO DOS SINTOMAS

RESUMO - A reação de 'HPC 7 B', 'Lady Rosetta', 'Ágata', 'Cupido', 'Monalisa', 'Panda', 'Itararé', 'Asterix', 'Capiro', 'Atlantic', 'Mayor' e 'Canchan' a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis* foi avaliada em casa de vegetação. Um novo método *in vitro* para testar a reação de genótipos de batata à *M. javanica* foi desenvolvido utilizando mini-tubérculos enraizados. Avaliou-se a reação de 'HPC 1 B', 'HPC 6 B', 'HPC 7 B', 'Ágata' e 'Cupido' a *M. javanica* e a produção de inóculo em função da densidade do inóculo e do período de incubação. Coletaram-se 168 amostras de tubérculos nas principais regiões produtoras do País para levantar os fitonematóides associados e caracterizar os sintomas. Os genótipos avaliados hospedam *M. incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis*. A reação *in vitro* confirma esses resultados. Mini-tubérculos suportam os fitonematóides por até 180 dias, com produção média máxima estimada em 15.990 ovos por frasco. Foram encontradas *Meloidogyne arenaria* no Sul de Minas e Rio Grande do Sul (3,5% das amostras), *M. incognita* em 10% (exceto no Sul do País) e *M. javanica* em todas as regiões amostradas (50%), causando como principal sintoma em tubérculo e raízes, caroços protuberantes, que dão a superfície aspecto áspero. Identificou-se também *Pratylenchus brachyurus* em 40% das amostras (exceto no Rio Grande do Sul), *P. coffeae* em 2,4% (Triângulo Mineiro, Sul de Minas e São Paulo) e *P. penetrans* (3%), em São Paulo, causando lesões em forma de pontos necróticos, deprimidos, na superfície do tubérculo. Encontrou-se *Helicotylenchus dihystera* em todas as regiões amostradas (49%). Conquanto esse fitonematóide seja um ectoparasito migrador, as amostras tenham sido constituídas de tubérculos lavados e nenhum sintoma específico foi observado, essa alta frequência requer um estudo mais acurado do seu hábito de parasitismo e de suas inter-relações com a cultura.

Palavras-chave: *Meloidogyne* spp., multiplicação, *Pratylenchus* spp., resistência

PLANT PARASITIC NEMATODES ON POTATOES CROP: GENOTYPES REACTION TO *Meloidogyne* spp., SPECIES DISTRIBUTION AND CHARACTERIZATION OF TUBERS SYMPTOMS

SUMMARY - The reaction of 'HPC 7 B', 'Lady Rosetta', 'Ágata', 'Cupido', 'Monalisa', 'Panda', 'Itararé', 'Asterix', 'Capiro', 'Atlantic', 'Mayor' and 'Canchan' to *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. mayaguensis* was evaluated at greenhouse. A new *in vitro* method to test the reaction of these genotypes to *M. javanica* was developed using rooted mini-tubers. Were evaluated the reaction of 'HPC 1 B', 'HPC 6 B', 'HPC 7 B', 'Ágata' and 'Cupido' to *M. javanica* and the inoculum production in terms of density of inoculum and the period of incubation. Were collected 168 samples from symptomatic tubers in the Brazil main producing regions (Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul and São Paulo), to raise the species of plant parasitic nematodes associated with the crop and to characterize the symptoms. All the genotypes host *M. incognita*, *M. javanica* and *M. mayaguensis*. The *in vitro* reaction confirms these results. Mini-tubers support the plant parasitic nematodes for up to 180 days, with maximum production of 15,990 eggs per pot. *Meloidogyne arenaria* was found in Sul de Minas and Rio Grande do Sul (3.5% of samples), *M. incognita* by 10% (except in the Sul) and *M. javanica* in all regions sampled (50%), causing knot a major symptom in tuber and roots, giving the surface looks rough. It was also *Pratylenchus brachyurus* in 40% of the samples (except in Rio Grande do Sul), *P. coffeae* at 2.4% (Triângulo Mineiro, Sul de Minas and São Paulo) and *P. penetrans* (3%), in São Paulo, causing lesions in the form of pointed depressed necrotic on the surface of the tuber. *Helicotylenchus dihystera* was found in all regions sampled (49%). Since the samples consist of tubers have been washed, this plant parasitic nematode is a migratory ectoparasite and no specific symptom was observed, this high frequency requires a more accurate study of its habit of parasitism and their interrelationships with the culture.

Key words: *Meloidogyne* spp., multiplication, *Pratylenchus* spp., resistance

CAPITULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS

A batata (*Solanum tuberosum* L.) está entre as plantas mais cultivadas para consumo humano no mundo e, em todo ele, os fitonematóides estão entre os fatores que limitam a sua produtividade (JATALA & BRIDGE, 1990; BRODIE et al., 1993; DI VITO et al., 2003). Diferentes espécies são responsáveis por perdas significativas na cultura, tanto em regiões de clima frio quanto quente (VOVLAS et al., 2005; TORDABLE et al., 2008), sendo atribuídas a elas perdas anuais estimadas em 12,2% (BARKER, 1998). Contudo, essas perdas podem ser extremamente variáveis dependendo das espécies envolvidas, seus níveis populacionais, a suscetibilidade do genótipo plantado, bem como a estação do ano (SILVA & SANTOS, 2007). Os fitonematóides formadores de galha são patógenos polípagos que causam severos danos a plantas cultivadas e/ou oportunistas ao redor do mundo, afetando drasticamente a maioria das solanáceas (DJIAN-CAPORALINO et al., 2007). Algumas espécies, como *Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley, são consideradas pragas quarentenárias em vários Países (praga quarentenária A1 no Brasil, por exemplo) devido ao dano potencial associado a elas (BRASIL, 1999; EPPO, 2004).

Dentre as espécies de *Meloidogyne* que atacam a cultura da batata no País, *M. javanica* (Treub) Chitwood é considerada a de maior importância, seguida de *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *M. hapla* Chitwood e *M. arenaria* (Neal) Chitwood (CHARCHAR & MOITA, 2001). De fato, *M. javanica* é a espécie mais freqüente, apresenta maior capacidade reprodutiva nos genótipos suscetíveis e está amplamente disseminada nas regiões produtoras de batata. A extensão dos danos causados na cultura e em outras a coloca entre as quatro espécies consideradas como as mais destrutivas do gênero (VAN VUUREN & WOODWARD, 2001; HUSSEY & JANSSEN, 2002; VOVLAS et al., 2005).

No solo, estes patógenos infectam o sistema radicular da planta, interferindo severamente em seu desenvolvimento e, também, na qualidade e no rendimento dos tubérculos. Nesses tecidos, os fitonematóides de galha induzem alterações histológicas

variadas. Entre elas se destaca a formação de um sítio de alimentação que consiste em três ou quatro células gigantes hipertrofiadas por fêmea. *Meloidogyne javanica* completa o seu ciclo de vida (de ovo a ovo) em 40 dias (WILLIAMS, 1972), sob condições favoráveis, com produção média de 600 ovos por fêmea. Após a eclosão, juvenis de segundo estágio migram no solo re-infectando as raízes ou entrando nos tubérculos, onde induzem a formação de um sítio de alimentação. Fêmeas produzem massas de ovos internamente ao tubérculo, em volta das quais se observam manchas marrons. Os sintomas externos dessa infecção se tornam visíveis em forma de protuberâncias ou galhas de diferentes tamanhos (VOVLAS et al., 2005).

Em uma única safra de batata pequenas populações iniciais passarão por três ciclos, durante os quais a invasão dos tubérculos pelos juvenis recém eclodidos é contínua, o que causa danos severos (BROWN et al., 2006). Como consequência da perda de qualidade, o tubérculo não é comercializável. Além disso, favorece a disseminação do patógeno em novas áreas, caso este seja usado como batata-mente e, sobretudo, contribui para o aumento da população na área uma vez que a maioria dos produtores ainda prefere deixá-lo na terra a arcar com os custos da colheita, já que estes não se prestam a comercialização (SILVA & SANTOS, 2007; TORDABLE et al., 2008).

Outro grupo de importância no Brasil é composto pelos fitonematóides das lesões radiculares (*Pratylenchus* spp.) (LORDELLO, 1981). Pelo menos 15 espécies já foram relatadas parasitando a batateira ao redor do mundo (BRODIE, 1998). No Brasil, *P. brachyurus* (Godfrey) Goodey, *P. coffeae* (Zimmermann) Filipjev & Schuurmans Stekhoven e *P. penetrans* (Cobb) Chitwood & Oteifa são as espécies de maior importância econômica para a cultura, com predominância de *P. brachyurus* sobre as demais, sendo esta a mais distribuída no País (CAFÉ FILHO & HUANG, 1988). Ela é encontrada em ecossistemas naturais e agroecossistemas, infectando grande número de espécies de plantas (LUC, 1987).

Os espécimes em diferentes estádios de desenvolvimento (machos são raríssimos) penetram as camadas subepidermais (GODFREY, 1929; TIHOHOD, 1993) causando lesões em forma de pontos escuros nos tubérculos. Migram continuamente nos tecidos, intra e intercelularmente. Reproduzem-se chegando a alcançar níveis de

população maiores que 10.000 indivíduos em 10 g de cascas de batata, com cerca de 3 mm de espessura (SILVA & SANTOS, 2007). Nesses casos, geralmente, as lesões são invadidas por organismos secundários do solo, resultando em necroses nos tubérculos. Os tubérculos infectados por *Pratylenchus* spp., quando armazenados, podem apodrecer em menor tempo que tubérculos sadios. *Pratylenchus scribneri* Steiner é considerada praga quarentenária, A1 no Brasil, confirmando o dano potencial associado a ela, bem como a importância do grupo (BRASIL, 1999; EPPO, 2004).

Em raízes e radículas, extensas necroses são usualmente observadas, especialmente nos casos de infecção por *P. penetrans*. Os sintomas iniciais são atraso no desenvolvimento das plantas infectadas, com drástica redução de crescimento em relação às demais. Em geral, essas plantas apresentam florescimento tardio e intensa necrose das radículas, formando reboleiras ou manchas na lavoura (SILVA & SANTOS, 2007).

Os danos causados na cultura da batata pelos fitonematóides, principalmente os de galha, na safra de 2007, foram os mais altos já observados no País, com perdas estimadas em 25% (SHIMOYAMA, 2008¹) no Triângulo Mineiro e Sul de Minas Gerais. Isto representaria uma perda de aproximadamente 250 mil toneladas ao ano, tomando por base a produção média observada nos últimos dez anos. A um preço médio de R\$ 40,00 a saca de 50 kg, isso corresponde a cerca de R\$ 200 milhões de reais de prejuízo causado somente por esses patógenos à cultura no Estado de Minas Gerais (AGRIANUAL, 2008).

A incidência da doença e a perda a ela associada, notadamente causada por fitonematóides de galha, nas principais regiões produtoras do País impulsionou a Associação Brasileira da Batata, com sede em Itapetininga-SP, a procurar Instituições Públicas que desenvolvessem projetos de pesquisa nessa área, com o objetivo de receber apoio científico para identificar as espécies de fitonematóides envolvidas caracterizar os sintomas causados, propor alternativas de controle e também desenvolver um serviço de orientação aos bataticultores associados.

Apesar da existência de centenas de relatos que documentam a perda de produtividade devido ao parasitismo de diferentes espécies de fitonematóides em

¹ SHIMOYAMA, N. Gerente Geral – ABBA. Informação pessoal.

diversas culturas (SASSER & FRECKMAN, 1987), os fitonematóides freqüentemente são subestimados enquanto patógenos ou são considerados de importância secundária. Numerosos fatores contribuem para a ausência generalizada de informação sobre sua atuação como patógenos de planta, incluindo o fato de que o seu parasitismo normalmente afeta a produção da cultura sem ser, obrigatoriamente, associado a outros sintomas visíveis dessa injúria. Se, usualmente, há uma falta de percepção do fitonematóide como patógeno, comumente também ocorre falta de interesse para o desenvolvimento de sistemas de manejo efetivos e econômicos (STARR et al., 2002).

No Brasil, os bataticultores são voltados para problemas multivariados. No tocante ao ambiente, provavelmente a principal prioridade diz respeito à disponibilidade de água ou, com menor freqüência a sua drenagem, seguida de perto pela fertilidade do solo. Tradicionalmente, eles convivem com plantas daninhas, artrópodes pragas e algumas doenças (fúngicas, viróticas e bacterianas), sendo considerados os principais problemas na condução da cultura (STARR et al., 2002).

Segundo VOVLAS et al. (2005), tendo em vista a agressividade de *M. javanica*, o manejo desta espécie deverá ser considerado durante a implementação de lavouras de batata em áreas onde as condições ambientais e/ou as práticas culturais favoreçam o seu desenvolvimento.

As culturas usadas tradicionalmente em rotação nas áreas de produção de batata são hospedeiras tanto de *M. incognita* e *M. javanica*, quanto de *P. brachyurus*, o que não favorece a diminuição da população no solo. A agressividade em genótipos suscetíveis aliada a presença de condições favoráveis ao patógeno durante boa parte do ano faz como que um único juvenil de segundo estágio de *M. javanica* por 250 cm³ de solo, no plantio, seja suficiente para causar dano na cultura (SANTO et al., 1981).

Portanto, as defesas contra esse fitonematóide se resumem ao uso de agrotóxicos efetivos ou ao desenvolvimento de genótipos resistentes através de melhoramento (BROWN et al., 2006). Infelizmente, pouca ou nenhuma atenção tem sido dada a seleção de genótipos resistentes a *Meloidogyne* spp. nos programas de

melhoramento de batata (PHILLIS, 1994; HAYASHI, 2008²).

Embora existam muitos trabalhos voltados para a seleção de cultivares com resistência a *Meloidogyne* sp. (ANTER, 1989; PHILLIS, 1994; GRAMMATIKAKI et al., 1999; VAN DER BEEK et al., 1999; BERTHOU et al., 2003; DI VITO et al., 2003), não há disponibilidade de genótipos resistentes no mercado (VOVLAS et al., 2005). Apesar da falta de cultivares resistentes, alguns programas em estágio avançados de seleção estão avaliando a reação dos genótipos à espécie de *Meloidogyne* (DI VITO et al., 2003).

O tratamento químico é comumente tido como uma forma eficiente de controle dessas pragas. Embora essa supressão da população de fitonematóides não tenha uma longa duração, pode resultar em um aumento na produtividade. Entretanto, o uso de agrotóxicos está sendo restringido por fatores ambientais e pela falta de efetividade no controle de fitonematóides (BROWN et al., 1991), que é extremamente dependente da correta aplicação do produto. Com exceção dos fumigantes, os demais produtos são efetivos somente na zona onde foram aplicados, não apresentando movimento no solo (BRODIE, 1971). Essa limitação relativa à aplicação do produto faz com que o agrotóxico não apresente uma resposta eficiente na solução do problema, além de representar aumento considerável no custo de produção. Uma redução, ou mesmo supressão, no uso do controle químico sob algumas circunstâncias iria melhorar o perfil da produção de batata bem como melhorar a rentabilidade. Adicionalmente ao custo proibitivo, a conscientização global da importância de preservação do ambiente e da saúde tem resultado em um aumento da restrição ao uso destes produtos. Inclusive, com proibição de uso para algumas combinações específicas entre produto e cultura nas quais o período de carência do produto é maior que o ciclo fenológico da planta (STARR et al., 2002; SILVA & SANTOS, 2007).

Plantas resistentes a essas pragas são um método eficiente, economicamente competitivo e não poluente de controle (DJIAN-CAPORALINO et al., 2007). E quando combinada com o manejo utilizando adubação verde ou nematicida de forma paliativa pode ser uma alternativa atraente tanto para o controle quanto para a contenção dos

² HAYASHI, P.C.R. Eng. Agr. Melhorista. Informação pessoal.

custos de produção (CHARCHAR & MOITA, 2001; BROWN et al., 2006; SILVA & SANTOS, 2007).

Segundo ROBERTS (1998), o termo resistência é usado para descrever a habilidade da planta hospedeira em suprimir o desenvolvimento ou a reprodução do fitonematóide. TIHOHOD (1993) menciona que uma planta é resistente a fitonematóides quando uma série de atributos que ela possui atua mais ou menos em detrimento do parasito, inviabilizando, por exemplo, a sua penetração ou o seu desenvolvimento no interior dos tecidos, ou mesmo impedindo que ele se reproduza. A disponibilidade de técnicas para diferenciar as plantas resistentes das susceptíveis se torna tão fundamental quanto o conhecimento das fontes de resistência. Desta forma, as metodologias usadas para esse fim são variáveis (FASSULIOTIS & BHATT, 1982).

Um levantamento feito por STARR et al. (2002) revelou que diferenças na reação de cultivares à espécies de *Meloidogyne* datam do final do século XIX. Contudo, o principal avanço em relação ao uso de resistência como forma de controle de *M. arenaria*, *M. incognita* e *M. javanica* só ocorreu em meados do século XX, com a descoberta e introdução do gene *Mi* de uma espécie de tomate (*S. peruvianum* L.) selvagem para a espécie cultivada.

Os estudos genéticos da resistência aos fitonematóides de galha em diversas culturas mostram que a hereditariedade varia de padrões mais simples aos mais complexos. Estudos realizados em tomate (*S. lycopersicum* L.) sugeriram que a resistência a *M. incognita* foi condicionada por um gene dominante (GILBERT & McGUIRRE, 1956; SIDHU & WEBSTER, 1973). BARHAM & WINSTEAD (1957) concluíram que a resistência a *M. arenaria*, *M. incognita* e *M. javanica* em tomate é controlada pelo mesmo gene.

A resistência a *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* tem sido identificada na espécie selvagem *S. sparsipilum* e parece ser baseada em poucos genes, de acordo com GOMEZ et al. (1983). Esses autores também verificaram que alguns dos genes responsáveis pela resistência a essas espécies são dominantes, sendo que, um maior número de genes é necessário para se obter um clone resistente a *M. arenaria* do que para *M. javanica*, e um menor número de genes é necessário para se ter um clone resistente a *M. incognita*.

Apesar dos genótipos cultivados no Brasil serem, na sua maioria, originários da Europa e dos EUA e os programas para introdução de resistência nos genótipos de batata a *M. chitwoodi*, *M. fallax* Karssen e *M. hapla* conduzidos nesses Países estarem bem adiantados, não resolveria um dos maiores problemas fitossanitários da cultura no nosso País, tendo em vista que a resistência a essas espécies não é efetiva contra as demais espécies tropicais (STARR et al., 2002). Embora as avaliações para identificar resistência às espécies tropicais em genótipos de batata começaram em meados da década de 60, com os primeiros relatos de resistência em genótipos selvagens, somente os programas de prospecção e introdução de resistência aos fitonematóides de clima temperado em genótipos comerciais estão em fase final, reforçando a necessidade da implementação de programas semelhantes para as nossas condições.

Assim sendo, o primeiro passo para o manejo dos fitonematóides na cultura da batata é a determinação das espécies-chave, bem como a caracterização dos sintomas causados pelas diferentes espécies e a avaliação da reação dos genótipos atualmente cultivados. Então, implementar metodologia para as avaliações de resistência nos programas de melhoramento da cultura, de forma que avaliações rápidas e seguras fossem testadas e confirmadas para uso.

I REFERÊNCIAS

AGRIFORUM 2008: **anúário da agricultura brasileira**. São Paulo: Agra FNP Pesquisas LTDA, 2008. 331 p.

ANTER, E.A.M. Susceptibility of certain cultivars of potato, *Solanum tuberosum*, to infection with *Meloidogyne javanica*. **Assint. Journal of Agricultural Sciences**, v. 20, n. 2, p. 295-301, 1989.

BARHAM, W.S.; WINSTEAD, N.N. Inheritance of resistance to root-knot nematodes in tomatoes. **Proc. Amer. Soc. Hortic. Sci.**, v. 69, n. 2, p. 372-377, 1957.

BARKER K. R. Introduction and synopsis of advancements in nematology. In: BARKER, K. R.; PEDERSON, G. A.; WINDHAM, G. L. (Ed.). **Plant and nematode interactions**. Madison: American Society of Agronomy, p.1-20, 1998.

BERTHOUS F.; KOUASSI, A.; BOSSIS, M.; DANTEC, J.P.; EDDAOUDI, M.; FERJI, Z.; PELLÉ, R.; TAGHZOUTI, M.; ELLISÈCHE D.; MUGNIERY, D. Enhancing the resistance of the potato to southern root-knot nematodes by using *Solanum sparsipilum* germplasm. **Euphytica**, v. 132: 57-65, 2003.

BRASIL. Instrução normativa nº 38, de 14 de outubro de 1999. **Diário Oficial da União**, Brasília, seção 1, p. 98, 26 out., 1999.

BRODIE, B. B. Differential vertical movement of non volatile nematicides in soil. **Journal of Nematology**, v. 3, n. 3, p. 292-295, 1971.

BRODIE, B. B. Nematode parasites of potato. In: BARKER, K. R.; PEDERSON, G. A.; WINDHAM, G. L. (Ed.). **Plant and nematode interactions**. Madison: Amer. Soc. Agronomy, 1998. p. 567-594.

BRODIE, B. B.; EVANS, K.; FRANCO, J. Nematode parasites of potatoes. In: EVANS, K

TRUDGILL, D. L.; WEBSTER, J. M. (Ed.). **Plant parasitic nematodes in temperate agriculture**. Wallingford: CAB International, 1993. p. 87-132.

BROWN, C.R.; MOJTAHEDI, H.; SANTO, G.S. Resistance to Columbia root-knot nematode in *Solanum* ssp. and in hybrids of *S. hougasii* with tetraploid cultivated potato. Orono, **American journal Potato**, v.68: 445-452, 1991.

BROWN, C.R.; MOJTAHEDI, H.; JAMES, S.; NOVY, R.G.; LOVE, S. Development and evaluation of potato breeding lines with introgressed resistance to columbia root-knot nematode (*Meloidogyne chitwoodi*). **American Journal of Potato Research**, v. 83, p. 1-8, 2006.

CAFÉ FILHO, A.C.; HUANG, C.S. Nematóides do gênero *Pratylenchus* no Brasil. Piracicaba, **Fitopatologia Brasileira**, v. 13, n. 3, p. 232-235, 1988.

CHARCHAR, J.M.; MOITA, A.W. Resistência de genótipos de batata a *Meloidogyne javanica*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 36, n. 3, p. 535-540, 2001.

DI VITO, M.; GRECO, N.; CARPUTO, D.; FRUSCIANTE, L. Respuesta de clones de papa silvestres y cultivados a poblaciones italianas del nematodo agallador *Meloidogyne* spp. **Nematropica**, v. 33, n. 1, p. 65-72, 2003.

DJIAN-CAPORALINO, C.; FAZANI, A.; ARGUEL, M.J.; VERNIE, T.; VANDECASTEELE, C.; FAURE, I.; BRUNOUD, G.; PIJAROWSKI, L.; PALLOIX, A.; LEFEBVRE, V.; ABAD, P. Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) *Me* resistance genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) are clustered on the P9 chromosome. **Theoretical Applied Genetic**, v. 114, p. 473-486, 2007.

EPPO: European and Mediterranean plant protection organization. *Meloidogyne chitwoodi* and *Meloidogyne fallax*. **EPPO Bulletin**, v. 34, n. 2, p. 315-320, 2004.

FASSULIOTIS, G.; BHATT, D.P. Potential of tissue culture far breeding root-knot nematode resistance into vegetables. **Nematology**, v. 14, p. 10-14, 1982.

- GILBERT, J.C.; McGUIRRE, D.C. Inheritance of resistance to severe root-knot from *Meloidogyne incognita* in commercial type tomatoes. **Proc. Amer. Hortic. Sci.**, v. 68, p. 437-442, 1956.
- GODFREY, G.H. A destructive root disease of pineapples and other plants due to *Tylenchus brachyurus* n.sp. Palo alto, **Phytopathology**, v. 19, n. 6, p. 611-629, 1929.
- GOMEZ, P.L.; PLAISTED, R.L.; BRODIE, B.B. Inheritance of the resistance to *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* in potatoes. Orono, **American Potato Journal**, v. 60, p. 339-351. 1983.
- GRAMMATIKAKI, G.; VOVLAS, N.; KALTSIKES, P.J.; SONNINO, A. Response of potato gametoclones to infection of four root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). LOCAL, **Russian Journal of Nematology**, v. 7, p. 155-159, 1999.
- HUSSEY, R.S.; JANSEN, G.J.W. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: STARR, J.L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant resistance to parasitic nematodes**. Wallingford: CABI, 2002. p. 43-70.
- JATALA, P.; BRIDGE, J. Nematode parasites of root and tuber crops. In: LUC, M. SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CAB International, 1990. p. 137-180.
- LORDELLO, L.G.E. **Nematóides das plantas cultivadas**. São Paulo: Nobel. 1981. 314 p.
- LUC, M. A reappraisal of Tylenchina (Nemata): 7. The family Pratylenchidae Thorne, 1949. Paris, **Revue de Nématologie**, v.10, n. 2, p. 203-218, 1987.
- PHILLIS, M.S. Inheritance of resistance to nematodes. In: BRADSHAW, J.E.; LACKAY, G.R. (Ed.). **Potato genetics**. Wallingford, CAB International. 1994. p. 319-337.
- ROBERTS, P.A. Conceptual and practical aspect of variability in root-knot nematode related to host plant resistance. Palo Alto, **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, p. 199, 1998.

- SANTO G.S.; O'BANNON, J.H.; NYCEZPIR A.P.; PONTI R.P. Ecology and control of root-knot nematodes on potato. **Proceedings of the 20th Annual Washington State Potato Commission**, Moses Lake, WA. p 135-139. 1981.
- SASSER, J.N.; FRECKMAN, D.W. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J.A.; DICKSON, D.W. **Vistas on nematology**. Hyattsville: Society of Nematologists, 1987. p. 7-14.
- SIDHU, G.; WEBSTER, J.M. Genetic control of resistance in tomato. 1. Identification of genes for host resistance to *Meloidogyne incognita*. **Nematologica**, v. 19, p. 546-550. 1973.
- SILVA, A.R.; SANTOS, J.M. **Nematóides na cultura da batata no Brasil**. Itapetininga: ABBA, 2007. 55 p.
- STARR, J.L.; COOK, R.; BRIDGE, J. **Plant resistance to parasitic nematodes**. Wallingford: CABI, 2002. 258 p.
- TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: FUNEP, 1993. 372 p.
- TORDABLE, M.C.; LAX, P.; DOUCET, M.E. Análisis histopatológico en tubérculos de dos genótipos de papa andina (*Solanum tuberosum* subsp *andigenum*) infectadas por especies del género *Meloidogyne*. **Nematropica**, v. 38, n. 1, p. 95-103. 2008.
- VAN DER BEEK, J.G.; MAAS, P.W.T.H.; JANSSEN, G.J.W.; ZIJLSTRA, C.; VAN SILFHOUT, C.H. A pathotype system to describe intraspecific variation in pathogenicity of *Meloidogyne chitwoodi*. Hanover, **Journal of Nematology**, v. 31, n. 4, p. 386-392, 1999.
- VAN VUUREN, R.J.; WOODWARD, B. The response of cassava cultivars to root-knot nematode infestation: an in vitro method. **Euphytica**, v. 120, p. 109-113. 2001.
- VOVLAS, N.; MIFSUD, D.; LANDA B.B.; CASTILLO P. Pathogenicity of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on potato. **Plant Pathology**, v. 54, p. 657-664. 2005.

WILLIAMS, K.J.O. *Meloidogyne javanica*. Commonwealth Agriculture Bureaux, C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes. Set 1, n. 3. 1972. 4p.

CAPITULO II - REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE BATATA (*Solanum* spp. L.) EM CASA DE VEGETAÇÃO A *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* E *M. mayaguensis* E IN VITRO A *M. javanica*

RESUMO - Em casa de vegetação avaliou-se a reação dos genótipos 'HPC 7 B', 'Lady Rosetta', 'Ágata', 'Cupido', 'Monalisa', 'Panda', 'Itararé', 'Asterix', 'Capiro', 'Atlantic', 'Mayor' e 'Canchan' a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis*. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições. Inocularam-se 5.000 ovos e juvenis de segundo estágio (J2) do fitonematóide por planta/vaso. Paralelamente, desenvolveu-se um novo método *in vitro* para avaliar a reação de genótipos de batata à *M. javanica*. Frascos (150 mL) contendo 100 g de areia fina com 10% de umidade (m/v), adubada e autoclavada, onde um mini-tubérculo foi enraizado e inoculado com 1.000 ovos de *M. javanica* contidos em 1 mililitro, foram mantidos no escuro por 45 dias, a 25 ± 1 °C, em B.O.D. O ensaio foi arranjado em DIC, no esquema fatorial 2 x 5, com 10 repetições, sendo o primeiro fator as soluções desinfestantes ampicilina 1% e peróxido de hidrogênio 1% e o segundo os genótipos 'HPC 1 B', 'HPC 6 B', 'HPC 7 B', 'Ágata' e 'Cupido'. Cada repetição foi constituída por um mini-tubérculo/frasco. Em casa de vegetação, 60 dias após a inoculação os genótipos foram avaliados através da extração de ovos e J2 por sistema radicular e de J2 no substrato, sendo o total utilizado para determinar o fator de reprodução (FR). Todos os genótipos hospedaram *M. incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis*. *Meloidogyne mayaguensis* produziu o maior número de ovos. O ensaio *in vitro* confirmou os resultados obtidos em casa de vegetação, sendo a axenização com ampicilina 1% superior à com peróxido de hidrogênio 1%.

Palavras-chave: fitonematóides de galha, reprodução de fitonematóides, *Solanum tuberosum*

I INTRODUÇÃO

Diferentes espécies de fitonematóides de galha já foram associadas a mais de 2.000 espécies de plantas e, no Brasil, devido à extensão dos danos causados a diversas culturas e a sua ampla distribuição *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood e *M. javanica* (Treub) Chitwood são consideradas as de maior importância. Em algumas culturas, como a da batata (*Solanum tuberosum* L.), *M. javanica* se destaca devido a sua dispersão no território brasileiro (CHARCHAR & MOITA, 2001), ao seu grande potencial de dano e à sua capacidade reprodutiva em genótipos suscetíveis (VOVLAS et al., 2005).

Em raízes e tubérculos comestíveis o dano do fitonematóide se verifica no produto, bastando poucas galhas para torná-los inúteis a comercialização, enquanto em outras culturas, a exemplo do tomateiro (*S. lycopersicum* L.), o fitonematóide causa dano ao sistema radicular da planta, mas é o fruto o produto comercializado. Em muitos casos, danos moderados a esta planta não resulta em prejuízos apreciáveis (SILVA & SANTOS, 2007). Recentemente, no Brasil, *M. mayaguensis* Rammah & Hirschmann vem causando preocupação em virtude dos freqüentes relatos da ocorrência em diversas culturas. Considerando que o hospedeiro tipo dessa espécie é uma solanácea [berinjela (*S. melongena* L.)] e que esse fitonematóide já foi registrado em diferentes unidades da federação (CARNEIRO et al., 2006; ALMEIDA et al., 2008), a determinação da reação dos genótipos de batata também a esse fitonematóide se torna estratégica.

Programas de melhoramento visando resistência a fitonematóides, em geral, demandam a avaliação de expressivo número de genótipos. Testes em campo e em casa de vegetação são laboriosos e sujeitos a interferências externas que podem comprometer as avaliações. A determinação das interações patógeno-hospedeiro é um difícil aspecto de qualquer programa de melhoramento vegetal quando se avalia a reação a fitonematóides de um grande número de genótipos, em casa de vegetação, ou quando se tem que conduzir ensaios em campo. Além do custo, esta fase requer

espaço, consome tempo para montagem, condução e avaliação e a causa a destruição de genótipos promissores por ocasião da avaliação (VAN VUUREN & WOODWARD, 2001). Deste modo, desenvolver um teste *in vitro* que demande pouco espaço e proporcione perfeito controle da condução do ensaio, possibilitando maior precisão na avaliação dos materiais é essencial em um programa de melhoramento.

Embora a literatura contenha relatos de diversos métodos de multiplicação de fitonematóides *in vitro*, a utilização de mini-tubérculos para esse propósito ainda não havia sido estudada. Atualmente, variações da técnica de raízes excisadas são apresentadas como opção para a multiplicação de fitonematóides de galha. Segundo VERDEJO et al. (1988), raízes transformadas geneticamente por bactéria são adequadas para manutenção de culturas-estoque desses fitonematóides. Sem dúvida, o desenvolvimento de técnicas práticas para a produção massal destes fitonematóides, de forma axênica e ainda sem risco de perda de patogenicidade é altamente significativo (PAUL et al., 1987).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a reação de genótipos de batata a *M. incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis* pelo método tradicional de inoculação de plantas em vasos mantidos em casa de vegetação e desenvolver um teste para avaliação *in vitro* da reação de genótipos a *M. javanica*, aplicá-lo a alguns genótipos comerciais ou híbridos de um programa de melhoramento de batata, comparando os resultados à avaliação da reação destes em casa de vegetação.

II MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação e no Laboratório de Nematologia do Departamento de Fitossanidade da UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal-SP, no período de julho de 2007 a abril de 2008.

2.1 Ensaio em casa de vegetação

A avaliação da reação de genótipos de batata a *M. incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis* foi realizada em duas épocas. O primeiro ensaio foi realizado no período de julho a outubro de 2007 e o segundo, de janeiro a abril de 2008.

Ambos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, compostas por uma planta por vaso cada, em esquema fatorial onde o primeiro fator foram as espécies de fitonematóide e o segundo, os genótipos de batata e do padrão de suscetibilidade. No ensaio realizado em 2007 utilizou-se um arranjo fatorial 3 x 11 e em 2008, 3 x 7. Os genótipos de batata avaliados estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. As plantas foram obtidas através de mudas ou de mini-tubérculos provenientes de cultura de tecidos, conforme disponibilidade.

Os experimentos foram conduzidos em vasos de cerâmica com capacidade para 10 L, contendo substrato constituído pela mistura de terra e areia (1:2), previamente autoclavado (60 minutos a 120 °C, 1 atm). As plantas foram estaqueadas com bambu, irrigadas diariamente e adubadas semanalmente com Plant Prod[®] (1,3 g), ácido húmico Rootex[®] (1,3 g), uréia (0,5 g) e sulfato de Mg (0,25 g) em solução aquosa, conforme praticado na condução da cultura em vaso (HAYASHI, 2008¹).

O inóculo de *M. incognita* e *M. javanica* foi obtido de tubérculos coletados em duas lavouras localizadas no Município de Vargem Grande do Sul-SP. O inóculo de *M.*

¹ HAYASHI, P.C.R. Eng. Agr. Melhorista. Informação pessoal.

mayaguensis foi obtido de raízes de goiabeira (*Psidium guajava* L.) infectadas pelo fitonematóide, coletadas em Monte Alto-SP. As espécies utilizadas nestes ensaios foram inicialmente identificadas ao microscópio fotônico, em estudo morfo-anatômico de fêmeas e machos (TAYLOR & NETSCHER, 1974; EISENBACK & HIRSCHMANN, 1980) e pelo fenótipo isoenzimático para esterase (ESBENSHADE & TRIANTAPHYLLOU, 1985).

Tabela 1. Genótipos de batata avaliados quanto à reação a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis* e o padrão de suscetibilidade utilizado no ensaio realizado no período de julho a outubro de 2007 e a sua respectiva indicação de uso. UNESP/FCAV, Jaboticabal-SP. 2009.

| Genótipo | Indicação de uso |
|---|------------------|
| 'Capiro' (<i>Solanum andigena</i>) | melhoramento |
| 'HPC 7 B' (<i>S. phureja</i> x <i>S. chacoense</i>) | melhoramento |
| 'Itararé' IAC 5986 | melhoramento |
| 'Ágata' | <i>in natura</i> |
| 'Cupido' | <i>in natura</i> |
| 'Monalisa' | <i>in natura</i> |
| 'Atlantic' | indústria |
| 'Asterix' | indústria |
| 'Lady Rosetta' | indústria |
| 'Panda' | indústria |
| Tomateiro 'Santa Cruz Kada' | - |

Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) das diferentes espécies avaliadas nestes ensaios foram extraídos da superfície externa sintomática de tubérculos (\pm 3 mm de espessura) e de raízes de goiabeira pela técnica de HUSSEY & BARKER (1973), com solução aquosa hipoclorito de sódio 0,5%.

Para tanto, os tubérculos e as raízes foram lavados cuidadosamente para liberar o solo aderido e fragmentados em pedaços com cerca de 2 cm, que foram então colocados em um copo de liquidificador doméstico. Adicionou-se ao liquidificador cerca de 500 mL de solução aquosa de hipoclorito de sódio 0,5% (uma parte de água sanitária com 2,5% de cloro ativo para quatro partes de água de torneira), cobrindo totalmente as partes vegetais. Na menor velocidade do liquidificador os fragmentos

vegetais foram triturados por cerca de 60 segundos. Então, a suspensão resultante foi vertida numa peneira de 200 mesh (malha com abertura de 75 μm) sobreposta a uma peneira de 500 mesh (malha com abertura de 25 μm). O resíduo desta peneira foi então recolhido, com auxílio de jatos de água de uma pisseta, em um bquer.

Tabela 2. Genótipos de batata avaliados quanto à reação a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis* e o padrão de suscetibilidade utilizado no ensaio realizado no período de janeiro a abril de 2008 e a sua respectiva indicação de uso. UNESP/FCAV, Jaboticabal-SP. 2009.

| Genótipo | Indicação de uso |
|---|------------------|
| 'Canchan' CIP 380-389.1 (<i>Solanum andigena</i>) | melhoramento |
| 'Mayor' (<i>S. tuberosum</i>) | melhoramento |
| 'Ágata' | <i>in natura</i> |
| 'Cupido' | <i>in natura</i> |
| 'Asterix' | indústria |
| 'Lady Rosetta' | indústria |
| Tomateiro 'Santa Cruz Kada' | - |

A estimativa da concentração da suspensão resultante foi realizada ao microscópio fotônico, com o auxílio de uma câmara de Peters (SOUTHEY, 1970). A concentração da suspensão foi ajustada para 500 ovos e J2 por mililitro e constituiu o inóculo. Na inoculação foram colocados 10 mL da suspensão do inóculo sobre o sistema radicular de cada planta, totalizando 5.000 ovos e J2 por planta. Para aferir a viabilidade do inóculo utilizaram-se cinco vasos contendo duas mudas de tomateiro cv. 'Santa Cruz Kada' cada, inoculadas com a mesma concentração do inóculo, para cada espécie avaliada.

Sessenta dias após a inoculação os genótipos foram avaliados. A extração de ovos e J2 das raízes foi realizada segundo HUSSEY & BARKER (1973), com hipoclorito de sódio 1% e a extração de J2 de uma alíquota de 100 cm^3 do substrato homogeneizado foi realizada pelo método da flotação centrífuga em solução de sacarose, segundo JENKINS (1964) e detalhada a seguir.

Essa alíquota do substrato foi colocada em um recipiente, e em seguida adicionado 2 L de água. A suspensão resultante foi agitada e, em seguida deixada em

repouso por 15 segundos. Após esse período de tempo, o sobrenadante do recipiente foi então vertido em peneiras sobrepostas de 200 e 500 mesh (abertura de malha de 75 e 25 μm , respectivamente). Com o auxílio de jatos de água de uma pisseta, o resíduo desta peneira foi recolhido em um béquer. A suspensão foi então colocada em tubos de centrífuga, que após balanceados, foram centrifugados por 5 minutos a 1.750 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e ao resíduo de cada tubo adicionou-se solução aquosa de sacarose (454 g), sendo o resíduo re-suspenso com o auxílio de um bastão de vidro. Os tubos foram novamente levados à centrífuga por 1 minuto, na velocidade anterior. Após esse período de tempo, os tubos foram retirados e o sobrenadante foi vertido em uma peneira de 500 mesh (abertura de malha de 25 μm). Os fitonematóides contidos no sobrenadante foram enxaguados com água de torneira para retirar o excesso da solução aquosa de sacarose. O resíduo dessa peneira foi recolhido, com auxílio de jatos de água de uma pisseta, em um béquer. A suspensão obtida foi utilizada para estimar o número de J2 no substrato, em microscópio fotônico com o auxílio de uma câmara de Peters (SOUTHEY, 1970).

O total de ovos e J2 estimado, no substrato e na raiz, foi usado para calcular o fator de reprodução (FR), segundo OOSTENBRINK (1966). Esse fator é definido pela razão entre a população final no substrato e na raiz e a população inicialmente inoculada. Plantas com $\text{FR} < 1$ foram consideradas resistentes, enquanto as com $\text{FR} > 1$ foram tidas como suscetíveis.

2.2 Ensaio em laboratório

A avaliação *in vitro* da reação de mini-tubérculos enraizados dos genótipos 'Cupido', 'Ágata', 'HPC 1 B', 'HPC 6 B' e 'HPC 7 B' a *M. javanica* foi realizada em delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 5, com 10 repetições, sendo o primeiro fator as soluções desinfestantes e o segundo os genótipos de batata. Cada repetição foi constituída por um frasco contendo areia fina com 10% de umidade (m/v), adubada e autoclavada onde um mini-tubérculo desinfestado superficialmente com hipoclorito de sódio 1% foi previamente enraizado.

Frascos de 150 mL de capacidade, contendo 100 g de areia fina seca (diâmetro inferior a 250 μm – peneira de 60 mesh) autoclavada (60 minutos a 120 °C, 1 atm) e misturada a 10 mL de solução aquosa nutritiva autoclavada (20 minutos a 120 °C, 1 atm), composta por mono-amônio fosfato (24 mg) e nitrato de cálcio (10 mg) (HAYASHI, 2008²), foram utilizados no ensaio (Figura 1).

Dez dias antes da inoculação, mini-tubérculos dos genótipos 'Ágata', 'Cupido', 'HPC 7 B', 'HPC 6 B' e 'HPC 1 B' foram desinfestados com solução aquosa de hipoclorito de sódio 1%, por 20 minutos, enxaguados em água de torneira autoclavada e acondicionados, assepticamente, nos recipientes de vidro (Figura 1B) contendo 100 g de areia com 10% de umidade (m/v). Esses frascos foram então fechados com papel alumínio, vedados com filme de PVC[®] (Figura 1D) e mantidos no escuro para promover o enraizamento.

O inóculo de *M. javanica* foi obtido de raízes de batata infectadas, conforme técnica de HUSSEY & BARKER (1973), com solução aquosa de hipoclorito 0,5%. A suspensão resultante foi depositada em tubos de ensaio com capacidade para 45 mL e deixada em repouso por 4 horas. Então, o excesso de água foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. À suspensão concentrada de ovos decantados no fundo do tubo de ensaio adicionou-se solução aquosa desinfestante até completar o volume do tubo, que foi fechado e agitado por 30 segundos. Foram testadas as soluções de ampicilina 1% e de peróxido de hidrogênio 1% (Proxitane[®]). Após 20 minutos, a suspensão contendo ovos foi vertida novamente em peneira de 500 mesh (abertura da malha de 25 μm) e os ovos foram enxaguados com água de torneira autoclavada.

A concentração da suspensão foi ajustada para conter 1.000 ovos.mL⁻¹, conforme descrito anteriormente, e constituiu o inóculo. Inoculou-se um mililitro dessa suspensão sobre os mini-tubérculos enraizados, assepticamente (Figura 1C). Após a inoculação, os frascos foram novamente fechados com papel alumínio, vedados com filme de PVC[®] (Figura 1D) e acondicionados em B.O.D., mantidos no escuro, a 25 \pm 1 °C durante 45 dias.

² HAYASHI, P.C.R. Eng. Agr. Melhorista. Informação pessoal.



Figura 1. Teste para avaliação de genótipos de batata *in vitro* quanto a reação à *Meloidogyne javanica*. A) Mini-tubérculos de 'HPC 7 B' desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio 1%; B) Mini-tubérculo no frasco contendo areia com 10% de umidade (m/v), previamente autoclavados; C) Inoculação asséptica de suspensão contendo 1.000 ovos desinfestados, contidos em 1 mililitro; D) Frascos contendo mini-tubérculo inoculado, tampados com papel alumínio e vedados com filme de PVC®, prontos para serem armazenados em B.O.D. UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP. 2009.

Após esse período, processaram-se as raízes (HUSSEY & BARKER, 1973) e a suspensão resultante foi utilizada para calcular o fator de reprodução (OOSTENBRINK, 1966), conforme descrito anteriormente.

2.2.1 Efeito das soluções utilizadas na axenização do inóculo na eclosão dos J2

Para observar o efeito dos métodos de axenização com solução aquosa de ampicilina 1% e de peróxido de hidrogênio 1% na eclosão dos juvenis foram montadas câmaras de eclosão (CLIFF & HIRSCHMANN, 1985), com cinco repetições. Uma alíquota de 25 mL contendo 1.000 ovos axenizados com cada uma das soluções foi colocada em placa de Petri e acondicionada em B.O.D., no escuro, a 25 ± 1 °C. A estimativa do número de juvenis eclodidos foi realizada após 24 e 48 horas de incubação, conforme descrito anteriormente.

2.2.1 Efeito das soluções utilizadas na axenização do inóculo na viabilidade dos J2

Para aferir a viabilidade do inóculo utilizaram-se cinco vasos de cerâmica com capacidade para 10 L, contendo substrato (terra e areia, 1:2) autoclavado e duas mudas de tomateiro cv. 'Santa Cruz Kada', para cada método de axenização avaliado. Cada planta foi inoculada com 10 mL da suspensão de inóculo calibrada para conter 100 ovos e J2 por mL. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação, com irrigação diária. Após 90 dias, os sistemas radiculares das plantas de tomateiro foram processados e os ovos extraídos pela técnica de HUSSEY & BARKER (1973), com solução aquosa de hipoclorito de sódio 0,5%. A concentração da suspensão resultante foi estimada conforme descrito anteriormente.

2.3 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,01$). Devido à heterogeneidade de variâncias, os dados de fator de reprodução e quantidade de ovos produzidos, em casa de vegetação e também *in vitro*, utilizados na análise estatística foram transformados em $\log_{10}(x + 1)$. Para a análise de variância e demais testes utilizou-se o programa SAS version 8 (SAS Institute Inc., Cary, USA).

III RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o fator de reprodução (FR), apresentado nas Tabelas 3 e 4, todos os genótipos avaliados em casa de vegetação se comportaram como suscetíveis às espécies de fitonematóides de galha avaliadas, apresentando fator de reprodução que variaram de 1,4 a 37,2 no período de julho a outubro e de 1,3 a 50,1 no período de janeiro a abril. Fator de reprodução maior que 1 indica um genótipo suscetível, e, portanto, que os tubérculos produzidos em áreas infestadas com essas pragas, sob condições adequadas ao desenvolvimento do patógeno, serão imprestáveis a comercialização (SILVA & SANTOS, 2007).

Tabela 3. Reação de genótipos de batata a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis*, avaliada no período de julho a outubro de 2007 em casa de vegetação, aos 60 dias após a inoculação de 5.000 ovos de cada espécie. UNESP/FCAV, Jaboticabal-SP. 2009.

| Genótipo | <i>M. incognita</i> | <i>M. javanica</i> | <i>M. mayaguensis</i> |
|-----------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| | | | |
| 'Ágata' | 23,9 | 22,4 | 34,7 |
| 'Asterix' | 19,6 | 17,9 | 34,2 |
| 'Atlantic' | 25,9 | 24,5 | 37,2 |
| 'Capiro' | 7,7 | 7 | 8,8 |
| 'Cupido' | 10,7 | 12 | 19,2 |
| 'HPC 7 B' | 6,9 | 7,3 | 9,6 |
| 'Itararé' | 1,4 | 4,2 | 4,4 |
| 'Lady Rosetta' | 5,3 | 5,2 | 8,8 |
| 'Monalisa' | 12 | 15,4 | 21,3 |
| 'Panda' | 3,3 | 4,7 | 7,6 |
| Tomateiro (indicador) | 29,1 | 26,8 | 31,2 |

¹Fator de reprodução (FR) = população final/população inicial. FR > 1 = genótipo resistente; FR < 1 = genótipo suscetível. Segundo OOSTENBRINK (1966).

Tabela 4. Reação de genótipos de batata a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis*, avaliada no período de janeiro a abril de 2008 em casa de vegetação, aos 60 dias após a inoculação de 5.000 ovos de cada espécie. UNESP/FCAV, Jaboticabal-SP. 2009.

| Genótipo | <i>M. incognita</i> | <i>M. javanica</i> | <i>M. mayaguensis</i> |
|-----------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| | FR ¹ | | |
| 'Ágata' | 31,3 | 50,1 | 34,0 |
| 'Asterix' | 1,4 | 1,3 | 1,4 |
| 'Canchan' | 1,5 | 1,5 | 3,5 |
| 'Cupido' | 4,3 | 5,0 | 5,1 |
| 'Lady Rosetta' | 6,2 | 6,9 | 7,1 |
| 'Mayor' | 1,5 | 1,5 | 1,8 |
| Tomateiro (indicador) | 32,1 | 28,4 | 38,7 |

¹Fator de reprodução (FR) = população final/população inicial. FR > 1 = genótipo resistente; FR < 1 = genótipo suscetível. Segundo OOSTENBRINK (1966).

Houve diferença estatística entre as médias de multiplicação das espécies de fitonematóides avaliadas ($P < 0,01$) neste ensaio, considerando a multiplicação em todos os genótipos, nas duas épocas avaliadas. *Meloidogyne mayaguensis* apresentou a maior média de produção de ovos ($P < 0,01$), diferindo estatisticamente de *M. incognita* e de *M. javanica* (Tabela 5).

Tabela 5. Médias do número de ovos produzidos por *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis* em genótipos de batata, em casa de vegetação, em duas épocas. UNESP/FCAV, Jaboticabal-SP. 2009.

| Espécie | jul-out 2007 | jan-abril 2008 |
|--------------------------------|---------------------------|----------------|
| | Número de ovos produzidos | |
| <i>Meloidogyne mayaguensis</i> | 65.459 a** | 42.426 a |
| <i>M. javanica</i> | 45.259 b | 26.298 b |
| <i>M. incognita</i> | 34.537 b | 22.597 b |
| P > F | 0,0001 | 0,0006 |
| CV (%) | 6,23 | 6,43 |

¹Dados originais. Para análise estatística os dados foram transformados em $\log_{10}(x + 1)$.

**Médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,01$).

A multiplicação média de *M. incognita* e *M. javanica* não diferiu entre si, com produção de 34.537 e 45.259 ovos no período de julho a outubro de 2007 e 22.597 e 26.298 no período de janeiro a abril de 2008, respectivamente. Isto comprova o potencial de *M. mayaguensis* em relação às demais espécies avaliadas, conforme já observado por CARNEIRO et al. (2006) e ALMEIDA et al. (2008). GOMEZ et al. (1983) observaram que, para as mesmas quantidades de massas de ovos, o número de ovos produzidos por *M. incognita* foi menor que o produzido por *M. javanica*. Esta, por sua vez, produz menor número de ovos que *M. arenaria* para o mesmo genótipo de batata avaliado. Esses autores concluíram, com base na herança da resistência a esses três fitonematóides de galha em um genótipo selvagem de batata, que um maior número de genes é necessário para se obter um clone resistente a *M. javanica* em relação a um resistente a *M. incognita*.

Os métodos de axenização dos ovos de *M. javanica* e o número de ovos produzidos nos genótipos de batata avaliados *in vitro* diferiram estatisticamente entre si ($P < 0,01$). A axenização dos ovos de *M. javanica* com solução aquosa de ampicilina 1% permitiu uma produção de ovos *in vitro* 60% maior que a daqueles com solução aquosa de peróxido de hidrogênio 1%, como pode ser deduzido a partir dos dados apresentados na tabela 6.

O efeito do peróxido de hidrogênio 1% na eclosão dos juvenis foi observado após 24 e 48 horas de incubação. Houve redução de mais de 78% no número médio de J2 eclodidos a 24 e 48 horas após a incubação quando o inóculo foi axenizado com solução aquosa de peróxido de hidrogênio 1% em relação ao número de J2 eclodidos após o uso da solução aquosa de ampicilina 1%, como pode ser observado na tabela 7.

Após 90 dias, plantas de tomateiro inoculadas com a suspensão contendo 1.000 ovos desinfestados com solução aquosa de peróxido de hidrogênio 1% e mantidas em casa de vegetação apresentaram redução de mais de 95% na população final de *M. javanica* em relação às inoculadas com a suspensão tratada com solução aquosa de ampicilina 1%.

Meloidogyne javanica apresentou menor multiplicação *in vitro* no genótipo 'Cupido' (Figura 2), diferindo estatisticamente dos demais genótipos quando o inóculo

Tabela 6. Médias do número de ovos produzidos, *in vitro*, por *Meloidogyne javanica* em genótipos de batata em função da axenização com ampicilina 1% e peróxido de hidrogênio 1%, 45 dias após a inoculação com 1.000 ovos contidos em 1 mililitro. UNESP/FCAV, Jaboticabal-SP. 2009.

| Genótipo | Ampicilina | Peróxido de hidrogênio | Média Geral |
|--------------------|-------------------------|------------------------|-------------|
| 'HPC 7 B' | 29.914 [†] A** | 21.260 A | 25.587 A |
| 'HPC 6 B' | 24.760 A | 17.979 A | 21.370 A |
| 'HPC 1 B' | 22.614 A | 13.735 A | 18.174 A |
| 'Ágata' | 22.925 A | 10.200 AB | 16.563 A |
| 'Cupido' | 10.295 B | 05.636 B | 07.966 B |
| Média Geral | 22.102 a | 13.762 b | |
| P > F | 0,00002 | 0,00002 | 0,00001 |
| CV (%) | 4,28 | 5,96 | 5,28 |

†Dados originais. Para análise estatística os dados foram transformados em $\log_{10}(x + 1)$.

**Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na linha e maiúsculas nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,01$).

foi axenizado com solução aquosa de ampicilina (Tabela 6). Contudo, não houve diferença estatística entre 'Cupido' e 'Ágata' quando o inóculo de *M. javanica* foi axenizado com solução aquosa de peróxido de hidrogênio.

Tabela 7. Médias de eclosão do inóculo, em B.O.D., e viabilidade, em casa de vegetação, após a desinfestação de ovos de *Meloidogyne javanica* com ampicilina 1% e com peróxido de hidrogênio 1%. UNESP/FCAV, Jaboticabal-SP, 2009.

| Viabilidade de inóculo | Ampicilina | Peróxido de hidrogênio | Viabilidade relativa (%) |
|----------------------------|-------------------|------------------------|--------------------------|
| Câmara de eclosão 24 horas | 14 ¹ | 3 | 78,57 |
| Câmara de eclosão 48 horas | 280 | 60 | 78,57 |
| Média geral | 394 | 63 | 78,57 |
| Tomateiro (indicador) | 4002 ² | 100 | 97,50 |

Redução na viabilidade de ovos resultante da axenização com peróxido de hidrogênio 1% comparada a axenização com ampicilina 1%. ¹Número de juvenis de segundo estágio. ²Número de ovos e juvenis de segundo estágio.

Independentemente da solução utilizada na axenização dos ovos de *M. javanica* usados como inóculo no ensaio *in vitro*, os genótipos da série 'HPC' proporcionaram as maiores médias de multiplicação do fitonematóide, na condição de incubação utilizada neste ensaio. Segundo HAYASHI (2008³), esses genótipos apresentam alta produtividade e

³ HAYASHI, P.C.R. Eng. Agr. Melhorista. Informação pessoal.

são adaptados às condições tropicais, ao contrário dos demais genótipos avaliados, que são, em sua maioria, de origem européia (Figura 3), que necessitam de temperaturas menores para produzir.

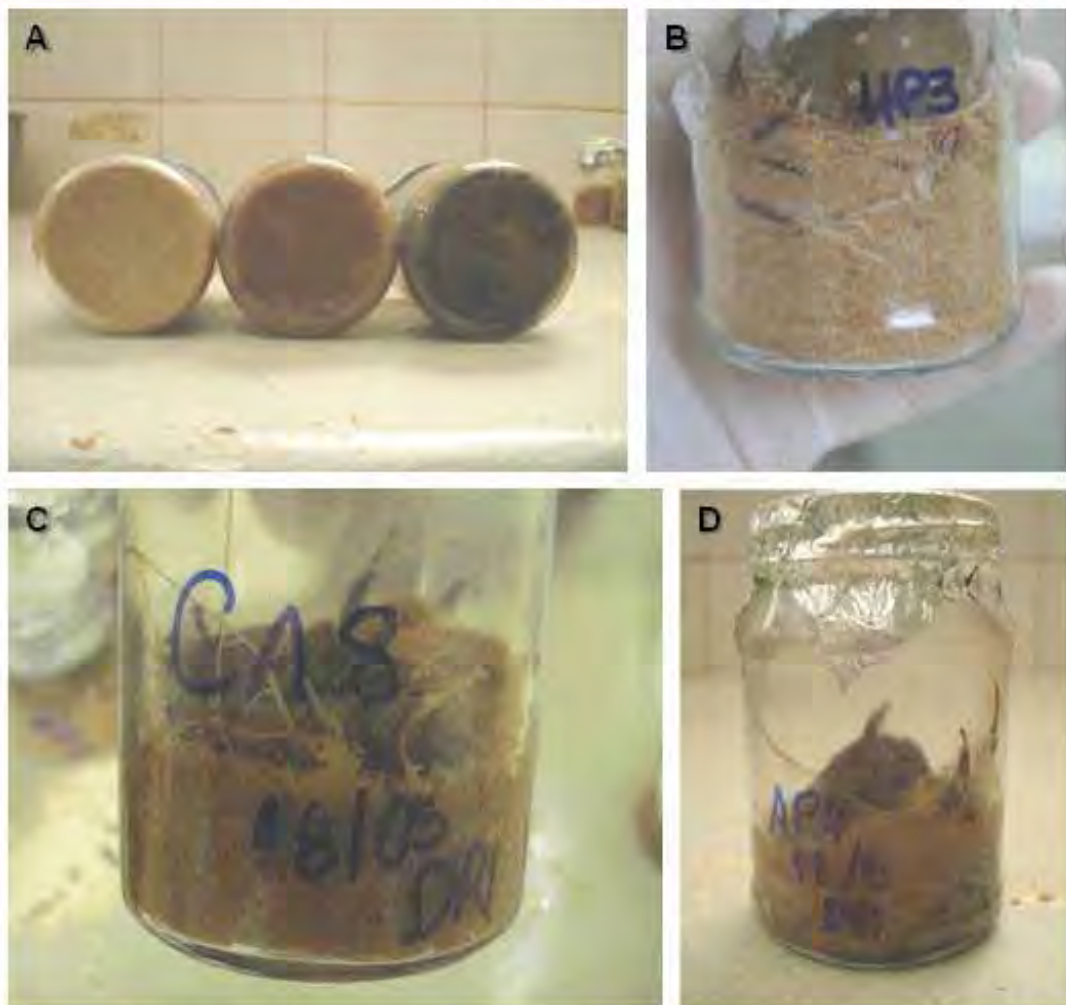


Figura 2. Multiplicação *in vitro* de *Meloidogyne javanica* em mini-tubérculo de batata inoculado com 1.000 ovos por frasco, incubado no escuro a 25 ± 1 °C, durante 45 dias. A) Aspecto do fundo dos recipientes contendo os genótipos 'HPC 7 B', 'Cupido' e 'Ágata' (da esquerda para direita), indicando a sanidade do mini-tubérculo; B) Aspecto saudável do tubérculo e das raízes do genótipo 'HPC 7B'; C e D) Tubérculos de 'Cupido' e 'Ágata', respectivamente, em avançado processo de decomposição. Areia com excesso de umidade provocado pelo extravasamento do conteúdo celular. UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP. 2009.

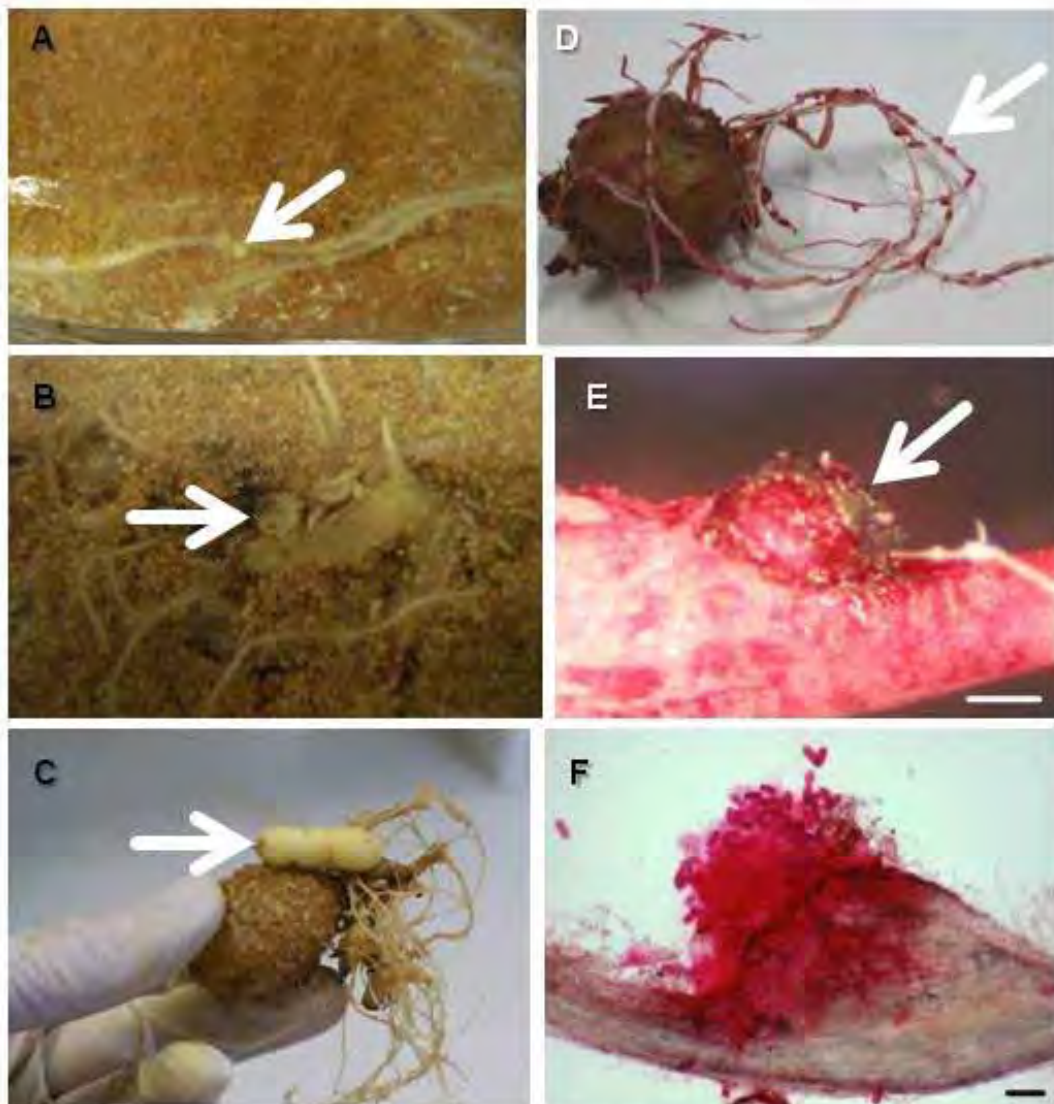


Figura 3. Sintomas e sinais da infecção causada por *Meloidogyne javanica* em raízes de mini-tubérculo 'HPC 7 B', após 45 dias de incubação *in vitro*. A e B) Raiz com galha observada através do frasco (seta); C) Mini-tubérculo com sistema radicular apresentando numerosas galhas (seta denota um micro-tubérculo formado *in vitro*); D) Sistema radicular apresentando massas de ovos coloridas com fucsina ácida (seta); E e F) Fotomicrografia de massa de ovos em estereoscópio e em microscópio fotônico, respectivamente (barras = 200 μ m). UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP. 2009.

Segundo RIVERA-SMITH et al. (1991), o método de raízes excisadas não foi eficiente para a avaliação de reação de genótipos de batata aos fitonematóides de galha devido a não discriminação da suscetibilidade em genótipos que se mostraram suscetíveis em testes em casa de vegetação.

O meio de cultura usado na manutenção dessas raízes pode influenciar o crescimento vegetal e a reação ao fitonematóide. De acordo com MJUGE & VIGLIERCHIO (1974), foi observada diferença no número de espécimes em populações assépticas de *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen quando estes foram inoculados em discos de cenoura (*Daucus carota* L.) tratados com diferentes hormônios vegetais. De acordo com GOVERSE et al. (2000), a alimentação dos fitonematóides de hábito sedentário em células vegetais está, possivelmente, ligada a ativação do ciclo celular e a modificações induzidas por eles nos níveis de auxina.

Além disso, falhas no estabelecimento do sítio de alimentação desses patógenos nos tecidos excisados podem ocorrer ainda, em função da ausência de fluxo de fotoassimilados nos vasos do floema ou, ainda, por possível efeito remoto em função das injúrias sofridas pelo tecido radicular excisado, conhecido como reação de resistência sistêmica adquirida (BERGAMIN et al., 1995; AGRIOS, 2005). *Meloidogyne javanica* se alimenta em sítios induzidos em células adjacentes ao floema, mantidas as expensas do fluxo contínuo de seiva desse vaso, uma vez que o seu desenvolvimento é uma função dos índices relativos de síntese e hidrólise de proteínas e carboidratos (AGRIOS, 2005).

Além desses efeitos diretos, a ausência de uma superfície de contato para servir como suporte aos movimentos do corpo do fitonematóide durante a tentativa de penetração no tecido vegetal é outro fator importante no estabelecimento do patógeno. VERDEJO et al. (1988) observaram que a penetração de fitonematóides *in vitro* é maior em raízes que estão dentro do meio de cultura que naquelas que estão na superfície do mesmo.

O FR dos genótipos avaliados *in vitro* diferiu estatisticamente (Tabela 8) daqueles observados nos genótipos avaliados em casa de vegetação. Contudo, o método para avaliar a reação dos genótipos *in vitro*, proposto neste trabalho, não falhou

em demonstrar a suscetibilidade dos genótipos. Mini-tubérculo de batata parece ser uma excelente opção de substrato para a multiplicação *in vitro* de *Meloidogyne* spp. Por ser um órgão de reserva, os mini-tubérculos provenientes de cultura de tecidos, livre de outros patógenos, permitem a condução asséptica, com alto padrão de sanidade, além de manter fluxo constante de seiva do tubérculo para as raízes.

Tabela 8. Médias do fator de reprodução de *Meloidogyne javanica* em genótipos de batata *in vitro* (45 dias após a inoculação de 1.000 ovos) versus casa de vegetação (60 dias após a inoculação de 5.000 ovos). UNESP/FCAV, Jaboticabal-SP. 2009.

| Genótipo | <i>In vitro</i> | Casa de vegetação |
|--------------|-----------------|-------------------|
| 'HPC 7 B' | 17,27* A a** | 11,54 B b |
| 'Ágata' | 14,46 A b | 22,01 A a |
| 'Cupido' | 18,80 A a | 07,15 C b |
| Total | 16,75 a | 12,30 b |

*Dados originais. Para análise estatística os dados foram transformados em $\log_{10}(x + 1)$.

**Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,01$).

A sobrevivência de fitonematóides em condições ambientais adversas varia entre as espécies e mesmo entre os seus estádios de desenvolvimento. A temperatura é um fator extremamente importante para o sucesso do desenvolvimento e da manutenção da população do fitonematóide dentro ou fora da planta (EVANS, 1987). Embora a maioria das espécies de *Meloidogyne* necessite de temperatura entre 15 e 30 °C para completar o seu ciclo de vida, a flutuação de temperatura entre o dia e a noite ou durante períodos de predominância de massas polares afeta drasticamente os processos envolvidos no desenvolvimento embrionário, refletindo diretamente no período necessário para que o fitonematóide complete o seu ciclo de vida (CAMPOS et al., 2008) e pode explicar as diferenças entre os FR obtidos em casa de vegetação e *in vitro*.

Segundo ALVES & CAMPOS (2001), em solo aquecido o número de galhas e ovos produzidos por *M. javanica* foi maior do que o obtido em casa de vegetação ou sala climatizada para o mesmo genótipo de planta hospedeira. Segundo esses autores, a temperatura no solo aumenta a atividade do fitonematóide, que pode ser mensurada

pelo aumento no número de J2 após uma semana da inoculação. Esses autores demonstraram que, para patógenos de solo, temperaturas entre 23 e 30 °C é o intervalo em que tornam a resposta do hospedeiro e a reprodutividade do fitonematóide mais pronunciada, devendo ser levada em conta nos testes para melhoramento ou avaliação da reação.

Além de não afetar a multiplicação de *M. javanica* em genótipos suscetíveis de batata, a técnica proposta para avaliação *in vitro* de genótipos se mostrou satisfatória para a multiplicação e manutenção de populações axênicas. Ela simula condições ideais para o desenvolvimento do fitonematóide, economiza tempo, espaço, substrato e não requer tratos diários. Também permite a realização de testes durante todo o ano, independentemente da temperatura ambiente não ser favorável ao patógeno.

IV CONCLUSÕES

- ✓ Todos os genótipos avaliados em casa de vegetação se comportam como suscetíveis às espécies *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis*;
- ✓ Todos os genótipos avaliados *in vitro* se comportam como suscetíveis à espécie *M. javanica*;
- ✓ O novo método *in vitro* proposto para avaliar a reação de genótipos de batata a *M. javanica* não afeta a multiplicação do fitonematóide em genótipos suscetíveis e mostra-se satisfatório também para a manutenção de populações axênicas.

V REFERÊNCIAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. Boston: Elsevier, 2005. 921 p.

ALMEIDA, E.J.; SILVA, A.R.; SOARES, P.L.M.; SANTOS, J.M. Novos registros sobre *Meloidogyne mayaguensis* no Brasil e estudo morfológico comparativo para distinção dessa espécie de *Meloidogyne incognita*. Piracicaba, **Nematologia Brasileira**, v. 32, n. 3, 2008 (no prelo).

ALVES, F.R.; CAMPOS, V.P. Efeito do aquecimento do solo na resistência de plantas a *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* raça 3. Piracicaba, **Nematologia Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 153-162. 2001.

BERGAMIN, A.F.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, 1995. 919 p.

CHARCHAR, J.M.; MOITA, A.W. Resistência de genótipos de batata a *Meloidogyne javanica*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 3, p. 535-540. 2001.

CAMPOS, H.D.; CAMPOS, V.P.; POZZA, E.A. Efeito da temperatura na multiplicação celular, no desenvolvimento embrionário e na eclosão de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 1, p. 29-33. 2008.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; BRAGA, R.S.; ALMEIDA, C.A.; GIORIA, R. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* parasitando plantas de tomate e pimentão resistentes a Meloidoginose no estado de São Paulo. Piracicaba, **Nematologia Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 81-86. 2006.

CLIFF, G.M.; HIRSCHMANN, H.H. Evaluation of morphological variability in *Meloidogyne arenaria*. Lawrence, **Journal of Nematology**, v. 17, n. 4, p. 445-459. 1985.

EISENBACK, J.D.; HIRSCHMANN, H.H. Morphological comparison of *Meloidogyne* males by electron microscopy. DeLeon Springs, **Journal of Nematology**, v.12, p.12-23. 1980.

ESBENSHADE, P.R.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. Lawrence, **Journal of Nematology**, v. 17, p. 6-10. 1985.

EVANS, A.A.F. Diapause in nematodes as a survival strategy. In: VEECH, J.A. & D.W. DICKSON. **Vistas on nematology**. Hyattsville: Society of Nematologists, 1987. p. 180-187.

GOMEZ, P.L.; PLAISTED, R.L.; BRODIE, B.B. Inheritance of the resistance to *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, and *M. arenaria* in potatoes. **American Potato Journal**, v. 60, p. 339-351. 1983.

GOVERSE, A.; ENGLER, J.A.; VERHEES, J.; VAN DER KROL, S.; HELDER, J.; GHEYSEN, G. Cell cycle activation by plant parasitic nematodes. Netherlands, **Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 747-761. 2000.

HIRSCHMANN, H.H. The genus *Meloidogyne* and morphological characters differentiating its species. In: SASSER, J.N.; CARTER, CC. **An advanced treatise on Meloidogyne**. Volume I. Biology and control. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. p.79-93.

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

JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v. 48, p. 692. 1964.

MJUGE, S.G.; VIGLIERCHIO, D.R. Physiological therapy methods for plants parasitized by nematodes. **Journal of Nematology**, v. 6, n. 4, p. 147-152. 1974.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Wageningen, **Mededelingen Landbouwhogeschool**, v. 66, p. 1-46. 1966.

PAUL, H.; ZIJLSTRA, C.; LEEUWANGH, J.E.; KRENS, F.A.; HUIZING, H.J. Reproduction of the cyst nematode *Heterodera schachtii* Schm. on transformed root cultures of *Beta vulgaris* L. **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 379-381. 1987.

RIVERA-SMITH, C.E.; FERRIS, H.; VOSS, R.E. The application of an excised root assay for the determination of susceptibility or resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp. Goeldi) in potatoes (*Solanum* spp. L.). **American Potato Journal**, v. 68, p. 133-142. 1991.

SILVA, A.R.; SANTOS, J.M. **Nematóides na cultura da batata no Brasil**. Itapetininga: ABBA, 2007. 55 p.

SOUTHEY, J.F. **Laboratory methods for work with plant and soil nematodes**, 5 ed. London: Ministry of Agriculture Fisheries, and Food. 148 p. (Bulletin, 2). 1970.

TAYLOR, D.P.; NETSCHER, C. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Nematropica**, v. 20, p. 268. 1974.

VAN VUUREN, R.J.; WOODWARD, B. The response of cassava cultivars to root-knot nematode infestation: an *in vitro* method. **Euphytica**, v. 120, p. 109-113. 2001.

VERDEJO, S.; JAFFEE, B.A.; MANKAU, R. Reproduction of *Meloidogyne javanica* on plant roots genetically transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. **Journal of Nematology**, v. 20, p. 599-604. 1988.

VOVLAS, N.; MIFSUD, D.; LANDA B.B.; CASTILLO, P. Pathogenicity of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on potato. **Plant Pathology**, v. 54, p. 657-664. 2005.

CAPITULO III - EFEITO DA DENSIDADE DE INÓCULO E DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE OVOS DE *Meloidogyne javanica* EM MINI-TUBÉRCULOS ENRAIZADOS

RESUMO - A reprodução *in vitro* de uma subpopulação de *Meloidogyne javanica* em mini-tubérculos de 'HPC 7 B' (*Solanum phureja* x *S. chacoense*) foi avaliada como uma função da densidade do inóculo e do tempo de incubação, em dois experimentos, no Laboratório de Nematologia da UNESP/FCAV. Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições. Cada repetição foi constituída por um frasco (150 mL) contendo 100 g de areia fina com 10 % de umidade (m/v) autoclavada onde um mini-tubérculo foi enraizado. Para avaliar o efeito da produção *in vitro* de ovos de *M. javanica* em função da densidade de inóculo, populações de 500, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500 e 3.000 ovos e J2 contidos em 1 mililitro foram inoculadas, assepticamente. Os frascos foram mantidos em B.O.D., no escuro, a 25 ± 1 °C e avaliados após 45 dia. Para avaliar a produção *in vitro* de ovos de *M. javanica* em função do tempo de incubação cada mini-tubérculo enraizado *in vitro* foi inoculado, assepticamente, com 1.000 ovos e J2 desinfestados superficialmente com solução aquosa de ampicilina 1% e contidos em 1 mililitro. Esses frascos foram mantidos em B.O.D., no escuro, a 25 ± 1 °C e avaliados em intervalos de 45 dias, até o 180º dia. Quanto à densidade do inóculo, observou-se que a produção de ovos na menor densidade de população inicial (500 ovos) não diferiu, estatisticamente, da de 1.000 ovos. Por sua vez, a produção desta não diferiu da produção das demais densidades avaliadas. Os mini-tubérculos suportaram os fitonematóides por 180 dias *in vitro*, com produção média máxima de 15.990 ovos por frasco, aos 117 dias da inoculação.

Palavras-chave: fitonematóide de galha, inóculo, multiplicação, *Solanum tuberosum*

I INTRODUÇÃO

Dentre os mais importantes fitonematóides associados à cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.) no Brasil encontra-se *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. Além do grande número de plantas cultivadas suscetíveis a essa praga, ela se mostra a espécie de fitonematóide de galha mais dispersa em áreas cultivadas no País (CHARCHAR & MOITA, 2001; CASTRO et al., 2003; COFCEWICZ et al., 2004; SILVA, 2009), sendo a espécie prevaiente até mesmo em áreas preservadas da mata atlântica do Estado do Rio de Janeiro (LIMA et al., 2005).

Esse fitonematóide penetra nas raízes e tubérculos e estabelece um sítio de alimentação. Durante esse processo, ocorre a formação da galha que é resultado do aumento no número e tamanho de células nessa região. Raízes e tubérculos de plantas atacadas exibem numerosas galhas e massas de ovos dos fitonematóides (SILVA & SANTOS, 2007). No Brasil, a principal forma de consumo da batata é *in natura* (PEREIRA et al., 2005) e, como consequência os tubérculos deformados são imprestáveis para o mercado. A indústria também rejeita tubérculos infectados, pois a alta temperatura durante o processamento faz com que açúcares redutores e aminoácidos livres nos pontos onde ocorre a infecção pelos fitonematóides iniciem a reação do escurecimento não enzimático (reação de Maillard), que altera a cor e o sabor nesses pontos (SILVA & SANTOS, 2007).

Avaliações de hospedabilidade envolvendo os principais genótipos plantados atualmente no País e outros pertencentes a programas de melhoramento (SILVA, 2009) apontaram a ausência de resistência nesses genótipos a essa praga. Isto evidencia a necessidade de introdução de fontes de resistência nesses programas, assim como o aprimoramento das técnicas de avaliação da reação dos clones obtidos (CAMPOS & CAMPOS, 2005), assim como obtenção e manutenção de populações puras desse patógeno para as rotinas de laboratório (LIMA et al., 2005; SILVA, 2009).

A multiplicação axênica de fitonematóides em raízes de plantas tem sido usada com sucesso em laboratório (VERDEJO et al., 1988; REVERSAT et al., 1999), nas

quais grande número de espécimes de certas espécies foi observado *in situ*. A multiplicação de espécies de *Meloidogyne* em raízes excisadas tem sido utilizada para estudo da resistência (LAURITIS et al., 1982), de fatores ambientais e nutricionais que afetam o desenvolvimento do fitonematóide (McCLURE & VIGLIERCHIO, 1966; JOHNSON & VIGLIERCHIO, 1969), da histologia e ultra-estrutura do sítio de alimentação (GLAZER & ORION, 1984) e outros aspectos biológicos da relação parasito-hospedeiro (ORION et al., 1979). Na década de 80, raízes de plantas geneticamente transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* foram utilizadas para a manutenção de culturas axênica em laboratório (VERDEJO et al., 1988).

Contudo, o teste *in vitro* utilizando mini-tubérculos enraizados em areia adubada e autoclavada, além de ter baixo custo, ser de fácil execução, necessitar de pouco espaço e propiciar perfeito controle da condução do ensaio parece ser mais promissor que os anteriormente citados devido à maior precisão na avaliação dos genótipos, que é essencial em um programa de melhoramento. Além disso, se mostra promissor para a manutenção de populações puras de fitonematóides de galha uma vez que a adição de solução aquosa nutritiva prove os minerais necessários para o desenvolvimento satisfatório do sistema radicular (SILVA, 2009).

Sem dúvida, o desenvolvimento de técnicas práticas para a produção massal de *M. javanica*, de forma axênica e sem risco de perda de patogenicidade é altamente significativo (PAUL et al., 1987) e tem como vantagem adicional a possibilidade de manutenção de outras espécies importantes desse grupo, uma vez que a maioria dos genótipos de batata é suscetível às principais espécies de *Meloidogyne*, bem como a *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira (SILVA & SANTOS, 2007).

Portanto, avaliar a produção de ovos e manutenção da subpopulação de *M. javanica in vitro* em 'HPC 7 B' em função da densidade de inóculo e do tempo de incubação foram os objetivos deste trabalho.

II MATERIAL E MÉTODOS

Dois ensaios separados foram conduzidos no Laboratório de Nematologia do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal-SP, no período de maio a dezembro de 2008.

Em ambos os experimentos, os frascos contendo areia autoclavada e um mini-tubérculo enraizado foram arrançados em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições.

2.1 Produção de ovos como uma função da densidade do inóculo inicial

Frascos com 150 mL de capacidade contendo 100 g de areia fina seca (diâmetro médio de 250 μ m) autoclavada (60 minutos a 120 °C, 1 atm) e misturada a 10 mL de solução aquosa nutritiva esterilizada (20 minutos a 120 °C, 1 atm), composta por mono-amônio fosfato (24 mg) e nitrato de cálcio (10 mg), foram utilizados no ensaio, conforme SILVA (2009).

Em câmara de fluxo laminar, os mini-tubérculos de 'HPC 7 B' foram desinfestados com solução aquosa de hipoclorito de sódio 1%, por 20 minutos, enxaguados em água de torneira autoclavada e acondicionados nos recipientes de vidro. Esses frascos foram então fechados com papel alumínio, vedados com filme de PVC[®] e mantidos no escuro para promover o enraizamento do mini-tubérculo, 10 dias antes da inoculação.

O inóculo de *M. javanica* foi obtido de raízes de batata infectadas, conforme técnica de HUSSEY & BARKER (1973), com solução aquosa de hipoclorito 0,5%. As raízes foram lavadas cuidadosamente para liberar solo aderido e então foram cortadas em fragmentos de cerca de 2 cm, que foram colocados em um copo de liquidificador doméstico. Foram adicionados 500 mL de solução aquosa de hipoclorito de sódio 0,5% (uma parte de água sanitária com 2,5% de cloro ativo para quatro partes de água de

torneira), cobrindo totalmente as partes vegetais. Na menor velocidade, as raízes foram trituradas por cerca de 60 segundos. Então, a suspensão resultante foi vertida sobre duas peneiras sobrepostas, de 200 e 500 mesh (abertura de malha de 75 e 25 μm , respectivamente) e o resíduo desta peneira foi então recolhido, com auxílio de jatos de água de uma pisseta, em um béquer.

A suspensão resultante foi depositada em tubos de ensaio com capacidade para 45 mL e deixada em repouso por 4 horas. Então, o excesso de água foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. À suspensão concentrada de ovos decantados no fundo do tubo de ensaio adicionou-se a solução aquosa desinfestante a base de ampicilina 1% até completar o volume do tubo, que foi fechado e agitado por 30 segundos. Após 20 minutos a suspensão contendo ovos foi vertida, novamente, em peneira de 500 mesh (abertura de malha de 25 μm), e os ovos retidos nessa peneira foram enxaguados com água de torneira autoclavada.

Com o auxílio de uma câmara de Peters, ao microscópio fotônico, a concentração da suspensão foi ajustada (SOUTHEY, 1970) para conter 500, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500 e 3.000 ovos.mL⁻¹ e constituiu o inóculo.

Inoculou-se, assepticamente, 1 mililitro dessa suspensão sobre o mini-tubérculo enraizado. Após a inoculação com as diferentes densidades de inóculo, os frascos foram novamente fechados com papel alumínio, vedados com filme de PVC[®] e acondicionados em B.O.D., mantidos no escuro, a 25 ± 1 °C, durante 45 dias.

Após esse período, procedeu-se a extração de ovos e juvenis das raízes segundo HUSSEY & BARKER (1973), com hipoclorito de sódio 1%. A suspensão obtida foi utilizada para estimar o número de J2 no substrato, em microscópio fotônico com o auxílio de uma câmara de Peters (SOUTHEY, 1970).

O total de ovos e J2 estimado, no substrato e na raiz, foi usado para calcular o fator de reprodução (FR), segundo OOSTENBRINK (1966). Esse fator é definido pela razão entre a população final no substrato e na raiz e a população inicialmente inoculada. Plantas com $FR < 1$ foram consideradas resistentes, enquanto as com $FR > 1$ foram tidas como suscetíveis.

2.2 Produção de ovos como uma função do período de incubação

Frascos de 150 mL de capacidade contendo 100 g de areia fina seca, autoclavada e adubada receberam um mini-tubérculo de 'HPC 7 B' desinfestado com solução aquosa de hipoclorito de sódio 1%, conforme descrito anteriormente. Esses frascos foram então fechados com papel alumínio, vedados com filme de PVC[®] e mantidos no escuro para promover o enraizamento do mini-tubérculo, 10 dias antes da inoculação (SILVA, 2009).

O inóculo de *M. javanica* foi obtido de raízes de batata infectadas, conforme técnica de HUSSEY & BARKER (1973), com solução aquosa de hipoclorito 0,5% e axenizado com solução aquosa de ampicilina 1%, conforme descrito anteriormente.

Com o auxílio de uma câmara de Peters, ao microscópio fotônico, a concentração da suspensão foi ajustada para 1.000 ovos.mL⁻¹ e constituiu o inóculo (SOUTHEY, 1970).

Inoculou-se, assepticamente, 1 mililitro dessa suspensão sobre o mini-tubérculo enraizado. Após a inoculação, os frascos foram novamente fechados com papel alumínio, vedados com filme de PVC[®] e acondicionados em B.O.D., mantidos no escuro, a 25 ± 1 °C e avaliados em quatro épocas, em intervalos de 45 até 180 dias após a inoculação (45, 90, 135 e 180), de acordo com o ciclo de vida do fitonematóide (WILLIAMS, 1972).

A extração de ovos e juvenis das raízes em cada intervalo de tempo foi realizada segundo HUSSEY & BARKER (1973), com hipoclorito de sódio 1%. A suspensão resultante foi utilizada para estimar o número de ovos e juvenis na raiz e o FR, conforme descrito anteriormente.

2.3 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,01). Devido à heterogeneidade de variâncias, os dados utilizados

na análise estatística foram transformados em $\log_{10}(x + 1)$. Complementando a análise de variância dos dados realizaram-se o teste de Tukey, a análise de regressão polinomial e de correlação das variáveis. Para a análise de variância e demais testes utilizou-se o programa SAS version 8 (SAS Institute Inc., Cary, USA).

III RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em geral, 20 dias após a inoculação do mini-tubérculo de 'HPC 7 B' com ovos de *M. javanica*, foi observado intumescimento em alguns fragmentos de raiz que estavam em contato com a parede do recipiente (Figura 1A), correspondendo aos pontos onde as fêmeas haviam estabelecido o sítio de alimentação (Figura 1D), indicando o estabelecimento da população (Figuras 1B e C).

No primeiro experimento, o número de ovos produzido *in vitro* por *M. javanica* em mini-tubérculos de 'HPC 7 B' aumentou com o acréscimo na densidade do inóculo (Figura 2). A produção de ovos de *M. javanica* como uma função da densidade do inóculo, avaliado neste ensaio, se ajusta ($P < 0,03$) ao modelo $y = -3,56 + 15,6196771 x - 0,0216289 x^2$, apresentando coeficiente de determinação superior a 0,99.

Portanto, até a densidade média máxima estimada de 3.611 ovos de *M. javanica* inoculados *in vitro* em 1 mini-tubérculo de 'HPC 7 B', espera-se um aumento no número de ovos produzidos, com produção média máxima de 28.196 ovos por frasco e, a partir desse ponto, é esperado um decréscimo na produção de ovos. Além disso, 99,5% da variação no número de ovos produzidos *in vitro* por *M. javanica* foi devido ao aumento na densidade do inóculo.

A menor média de ovos de *M. javanica* produzidos *in vitro*, quarenta e cinco dias após a inoculação, foi observada na densidade de inóculo de 500 ovos por frasco ($P < 0,01$). Apesar do acréscimo de 40% na produção de ovos proporcionado pela inoculação de 1.000 ovos por frasco, não houve diferença estatística entre esta densidade de inóculo e a de 500 ovos por frasco (Tabela 1). A produção média de ovos *in vitro* teve aumento significativo quando passou de 7.803 para 17.946 ovos por frasco, obtida, respectivamente, nas densidades de inóculo de 500 e 1.500 ovos por frasco. Acréscimos na produção média de ovos observados nas densidades de inóculo superiores a 1.500 ovos por frasco não foram significativos estatisticamente.

A menor média do fator de reprodução de *M. javanica* *in vitro* em mini-tubérculos, aos 45 dias após a inoculação, foi obtida na maior densidade inicial ($P < 0,05$), diferindo

estatisticamente do FR observado na menor densidade de inóculo avaliada (Tabela 1). O fator de reprodução de *M. javanica* como uma função da densidade de inóculo pode ser descrito ($P < 0,01$) pela equação $y = 15,96 - 0,0023486 x$, com coeficiente de determinação superior a 0,97 (Figura 2). Além disso, 97,5% da variação no fator de reprodução de *M. javanica* foi devido ao aumento na densidade do inóculo.

Observa-se na figura 2, que as variáveis produção de ovos e FR se correlacionam negativamente ($r = -0,9132$; $P = 0,0001$) com a densidade de inóculo.

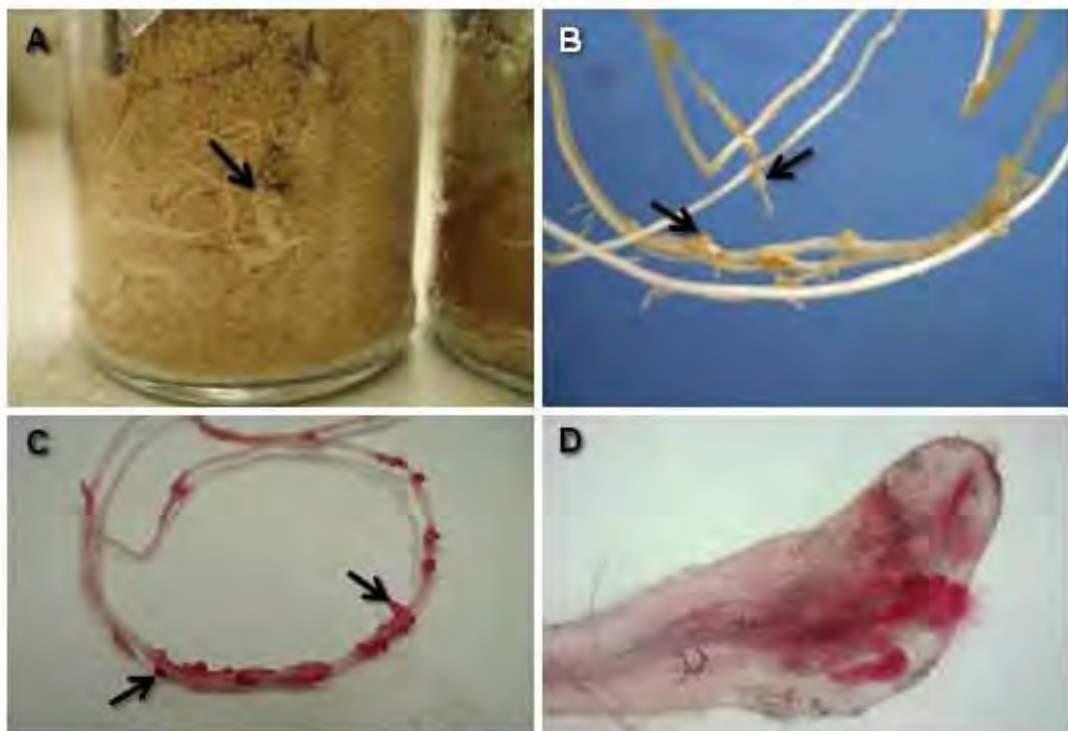


Figura 1. Sintomas e sinais indicativos do estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Meloidogyne javanica* em mini-tubérculos de 'HPC 7 B'. A) Intumescimento radicular causado pela hipertrofia e hiperplasia celular nos tecidos ao redor do ponto (seta) onde a fêmea estabeleceu o sítio de alimentação, observado através do frasco, 20 dias após a inoculação; B e C) Sistema radicular do mini-tubérculo cultivado *in vitro*, 60 dias após a inoculação, apresentando galhas (seta) e massas de ovos coloridas com fucsina ácida (pontos vermelhos); D) Ponta de raiz apresentando fêmeas estabelecidas ao redor do floema. UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP. 2009.

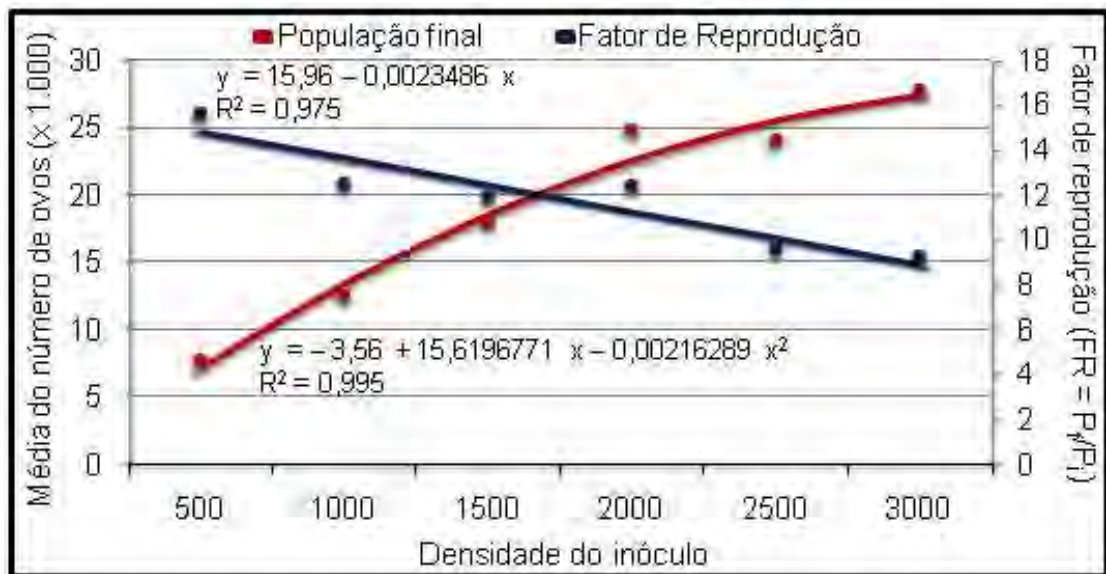


Figura 2. Multiplicação *in vitro* de *Meloidogyne javanica* em mini-tubérculos de 'HPC 7 B', como uma função da densidade do inóculo, após 60 dias da inoculação. Correlação negativa (91,3%; $P > t = 0,000116$) entre a média do número de ovos produzidos (vermelho) e o fator de reprodução (azul) de *M. javanica*. UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP. 2009.

VERDEJO *et al.* (1988) observaram que o aumento na densidade de inóculo resultou em um maior número de fêmeas por placa, contribuindo para um aumento na competição intra-específica, além de resultar numa maior coalescência de galhas. Esses autores observaram também que, o aumento na densidade de inóculo e a diminuição no número de ovos produzidos foi resultado de um grande aumento na percentagem de fêmeas inférteis em vez da diminuição no número de ovos por massa de fêmeas férteis. Segundo STOFFELEN *et al.* (1999), o decréscimo observado nas médias do fator de reprodução em função do aumento na densidade de inóculo pode ser explicado pela exaustão da fonte de nutrientes.

Tabela 1. Médias do número de ovos produzidos *in vitro* por *Meloidogyne javanica* em mini-tubérculos de 'HPC 7 B' em função da inoculação com densidade de inóculo de 500, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500 e 3.000 ovos por frasco, avaliado aos 45 dias após a inoculação. UNESP/FCAV, Jaboticabal-SP. 2009.

| Densidade do inóculo | Média de ovos produzidos | Fator de reprodução ¹ |
|----------------------|--------------------------|----------------------------------|
| 3.000 | 27704 ^{* **} A | 9,2 A |
| 2.500 | 24006 A | 9,6 AB |
| 2.000 | 24858 A | 12,4 AB |
| 1.500 | 17946 A | 12,0 AB |
| 1.000 | 12485 AB | 12,5 AB |
| 500 | 7803 B | 15,6 B |
| P > F | 0,00006 ² | 0,04 ³ |
| CV (%) | 5,19 | 16,2 |

¹Fator de reprodução = população final/população inicial. Segundo Oostenbrink (1966).

^{*}Dados originais. Para análise estatística os dados foram transformados em $\log_{10}(x + 1)$.

^{**}Médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,01$)² e ($P < 0,05$)³.

O enraizamento *in vitro* de mini-tubérculo em areia fina permite a produção de raízes tenras, com grande número de raízes secundárias, suportando a alta reprodução do fitonematóide. A granulometria e o tipo de substrato, assim como a localização das raízes nesse substrato, afetam a capacidade de invasão dos tecidos vegetais e a reprodução dos fitonematóides (ROBBINS & BARKER, 1974; VERDEJO et al., 1988). Segundo ROBBINS & BARKER (1974), o diâmetro médio da areia entre 120 e 370 μm propiciou a maior invasão dos tecidos por fitonematóides, nas temperaturas entre 25 a 30 °C e com umidade em torno de 7%.

A produção média de ovos *in vitro* por *M. javanica* em mini-tubérculos de 'HPC 7 B' como uma função do período de incubação (Figura 3) avaliado neste ensaio se ajusta ($P < 0,01$) ao modelo $y = 1090,59 + 253,867 x - 1,08 x^2$, apresentando coeficiente de determinação superior a 0,95. Portanto, a produção de ovos de *M. javanica in vitro* em mini-tubérculos de 'HPC 7 B' aumenta até o 117º dia após a inoculação, com produção média máxima de 15.991 ovos por frasco e a partir desse ponto é esperado um decréscimo na produção de ovos. Além disso, 99,5% da variação no número de ovos produzidos *in vitro* por *M. javanica* foi devido ao aumento no número de dias de incubação.

Segundo GOVERSE *et al.* (2000), a alimentação dos fitonematóides de hábito sedentário em células vegetais está possivelmente ligada à ativação do ciclo celular e em modificações induzidas por eles nos níveis de auxina. *Meloidogyne javanica* se alimenta em sítios induzidos em células adjacentes ao floema (Figura 1D) e que são mantidas as expensas do fluxo contínuo de seiva destes vasos (AGRIOS, 2005).

A multiplicação *in vitro* de *M. javanica* em mini-tubérculos reduz os efeitos das condições ambientais adversas que afetam o fitonematóide, principalmente a temperatura, que é um fator extremamente importante

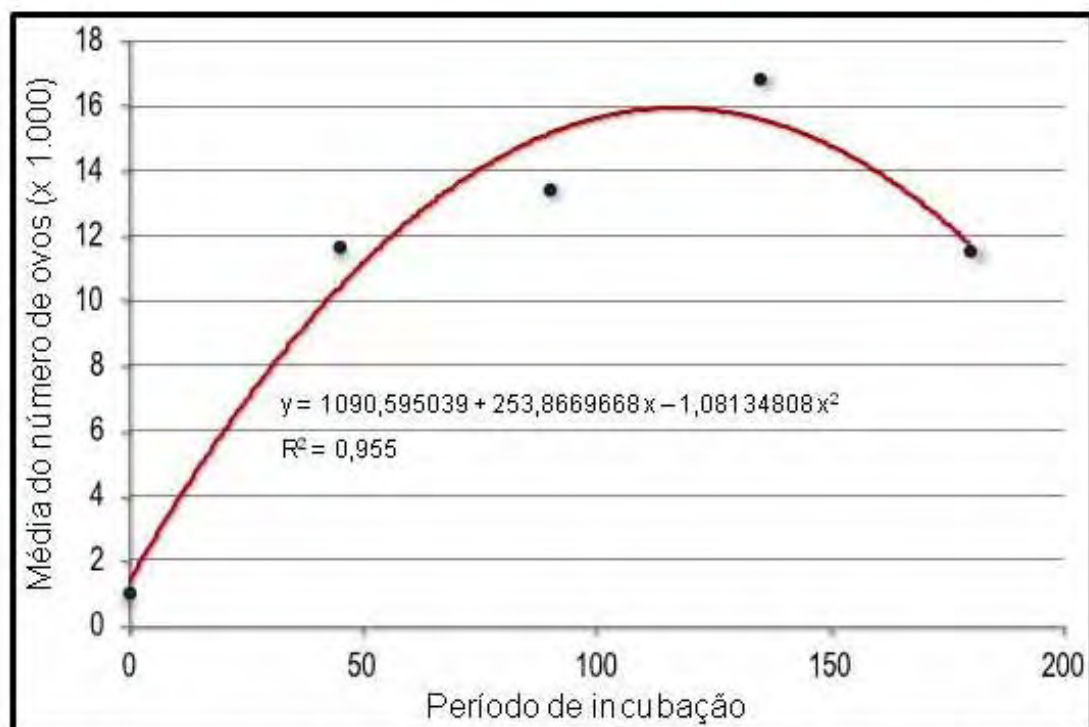


Figura 3. Multiplicação *in vitro* de *Meloidogyne javanica* em mini-tubérculos de 'HPC 7 B' como uma função do período de incubação, no escuro a 25 ± 1 °C, após a inoculação com 1.000 ovos. UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP. 2009.

para o sucesso do desenvolvimento e da manutenção da população do fitonematóide dentro ou fora da planta (EVANS, 1987). A temperatura constante de 25 ± 1 °C contribui para a continuidade dos processos envolvidos no desenvolvimento embrionário, refletindo diretamente no período necessário para que o fitonematóide complete o seu ciclo de vida (CAMPOS et al., 2008). Ao contrário do que ocorre em casa de vegetação, onde os fitonematóides estão sujeitos a flutuação de temperatura entre o dia e a noite ou durante períodos de predominância de massas polares.

Além disso, segundo VERDEJO et al. (1988), a técnica de raízes excisadas, apesar de adequada a multiplicação de espécies de *Meloidogyne*, apresenta como desvantagem o fato de que o desenvolvimento da raiz e do fitonematóide pode ser, eventualmente, afetado pelos ingredientes e a concentração do meio de cultura. Segundo esses autores, a formulação original do meio MS, que é padrão para a manutenção de tecidos vegetais, inibiu a formação de células gigantes pelo fitonematóide. A inibição foi atribuída à elevada concentração de NH_4NO_3 nesse meio (ORION et al., 1979). Já o meio Gamborg's B5 com adição de vitaminas, nas quais todo o nitrogênio foi fornecido na forma de KNO_3 , apresentou bons resultados no cultivo de fitonematóides endoparasitos.

Segundo VAN DER BERGH (2007) e VERDEJO et al. (1988), o método de raízes excisadas usando raízes geneticamente modificadas é adequado para manter culturas-estoque de populações de *Meloidogyne* sp., mas para a produção massal de inóculo se torna necessário a multiplicação com uso de plantas de tomate em vaso. A multiplicação em mini-tubérculos enraizados *in vitro*, além de permitir a produção massal de inóculo, pode ser útil para estudar interações entre fitonematóides e outros organismos de solo, para manutenção de coleção com diferentes espécies como *M. arenaria*, *M. incognita* e *M. hapla* (VAN VUUREM & WOODWARD, 2001), inclusive aquelas de uso rotineiro, como as espécies padrão usadas para a realização de técnicas como eletroforese ou biologia molecular e até acompanhamento da estabilidade da resistência a fitonematóides de galha em batata em diferentes temperaturas de solo, por ser esse um fator importante afetando a expressão da resistência a fitonematóides.

IV CONCLUSÕES

- ✓ O número de ovos produzidos *in vitro* por *Meloidogyne javanica* em mini-tubérculo enraizado em areia aumenta em função do aumento na densidade do inóculo, com produção média máxima de 15.991 ovos por frasco, e do tempo de incubação, até o 117º dia após a inoculação;
- ✓ A produção média de ovos *in vitro* aumenta significativamente quando a densidade de inóculo passa de 500 para 1.500 ovos por frasco, com produção média de 17.946 ovos por frasco;
- ✓ Não há acréscimos significativos na produção média de ovos nas densidades de inóculo superiores a 1.500 ovos por frasco.

V REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. 2005. **Plant Pathology**. Elsevier, Boston MA, 921 p.

CAMPOS, H.D.; CAMPOS, V.P. Estudos de inóculo, inoculação e de extração do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*). **Nematologia Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 75-82. 2005.

CAMPOS, H.D.; CAMPOS, V.P.; POZZA, E.A. Efeito da temperatura na multiplicação celular, no desenvolvimento embrionário e na eclosão de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 1, p. 29-33. 2008.

CASTRO, J.M.C.E.; SOUZA, R.M.; CARNEIRO, R.M.D.C. Variabilidade isoenzimática de populações de *Meloidogyne* spp. proveniente de regiões brasileiras produtoras de soja. **Nematologia Brasileira**, v. 27, p. 1-12. 2003.

CHARCHAR, J.M.; MOITA, A.W. Resistência de genótipos de batata a *Meloidogyne javanica*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 3, p. 535-540. 2001.

COFCEWICZ, E.T.; CARNEIRO, R.M.D.C.; CASTAGNONE-SERENO, P. QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotypes and genetic diversity of root-knot nematodes parasiting *Musa* in Brazil. **Nematology**, v. 6, p. 85-95. 2004.

EVANS, A.A.F. Diapause in nematodes as a survival strategy. In: VEECH, J.A. & D.W. DICKSON. **Vistas on nematology**. Society of Nematologists, Hyattsville, 1987. p. 180-187.

GLAZER, I.; ORION, D. Influence of urea, hydroxyurea, and thiourea on *Meloidogyne javanica* and infected excised tomato roots in culture. **Journal of Nematology**, v. 16, p. 125-130. 1984.

GOVERSE, A.; ENGLER, J.A.; VERHEES, J.; VAN DER KROL, S.; HELDER, J.; GHEYSEN, G. Cell cycle activation by plant parasitic nematodes. **Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 747-761. 2000.

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

JOHNSON, R.N.; VIGLIERCHIO, D.R. Sugar beet nematode (*Heterodera schachtii*) reared on axenic *Beta vulgaris* root explants. II. Selected environmental and nutritional factors affecting development and sex-ratio. **Nematologica**, v. 15, p. 144-152. 1969.

LAURITIS, J.A.; REBOIS, R.V.; GRANNEY, L.S. Screening soybean for resistance to *Heterodera glycines* Ichinohe using monoxenic cultures. **Journal of Nematology**, v. 14, p. 595-594. 1982.

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

McCLURE, M.A.; VIGLIERCHIO, D.R. Influence of host nutrition and intensity of infection on the sex ratio and development of *Meloidogyne incognita* in sterile agar cultures of excised cucumber roots. **Nematologica**, v. 12, p. 248-258. 1966.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Wageningen, **Mededelingen Landbouwhogeschool**, v. 66, p. 1-46. 1966.

ORION, D.; WERGIN, W.P.; ENDO, B.Y. Inhibition of syncytia formation and root-knot nematode development on cultures of excised tomato roots. **Journal of Nematology**, v. 12, p. 196-203. 1979.

PAUL, H.; ZIJLSTRA, C.; LEEUWANGH, J.E.; KRENS, F.A.; HUIZING, H.J. Reproduction of the cyst nematode *Heterodera schachtii* Schm. on transformed root cultures of *Beta vulgaris* L. **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 379-381. 1987.

PEREIRA, E.M.S; LUZ, J.M.Q.; MOURA, C.C. **A batata e seus benefícios nutricionais**. Uberlândia: EDUFU, 2005. 58 p.

REVERSAT, G.; BOYER, J.; SANNIER, C.; PANDO-BAHUON, A. Use of the a mixture of sand and water-absorbent synthetic polymer as substrate for xenic culturing of plant-parasitic nematodes in the laboratory. **Nematology**, v. 1, n. 2, p. 209-212. 1999.

ROBBINS, R.T.; BARKER, K.R. The Effects of Soil Type, Particle Size, Temperature, and Moisture on Reproduction of *Belonolaimus longicaudatus*. **Journal of Nematology**, v. 6, n. 1, p. 1-6. 1974.

SILVA, A.R.; SANTOS, J.M. **Nematóides na cultura da batata no Brasil**. ABBA, Itapetininga SP, 2007. 55 p.

SILVA, A.R. Fitonematóides na cultura da batata: reação de genótipos a *Meloidogyne* spp., distribuição de espécies e caracterização dos sintomas. Tese de Doutorado. 95 p. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Unesp. Jaboticabal, 2009.

SOUTHEY, J.F. **Laboratory methods for work with plant and soil nematodes**, 5 ed. London: Ministry of Agriculture Fisheries, and Food. 148 p. (Bulletin, 2). 1970.

STOFFELEN, R.; JIMENEZ, M.I.; DIERCXSENS, C.; TAM, V.T.T.; SWENNEN, R. WAELE, D.D. Effect of time and inoculum density on the reproductive fitness of *Pratylenchus coffeae* and *Radopholus similis* populations on carrot disks. **Nematology**, v. 1, n. 3, p. 243-250. 1999.

VAN DER BERGH, I. **Culturing and mass propagation of *Musa* nematodes**. Disponível em: <http://musalit.inibap.org/pdf/IN050680_en.pdf>. Acesso em: 11 jul. 2007. 27-29 p.

VAN VUUREN, R.J.; WOODWARD, B. The response of cassava cultivars to root-knot nematode infestation: an *in vitro* method. **Euphytica**, v. 120, p. 109-113. 2001.

VERDEJO, S.; JAFFEE, B.A.; MANKAU, R. Reproduction of *Meloidogyne javanica* on plant roots genetically transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. **Journal of Nematology**, v. 20, p. 599-604. 1988.

WILLIAMS, K.J.O. ***Meloidogyne javanica***. Commonwealth Agriculture Bureaux, C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes. Set 1, 3: 4 p. 1972.

CAPITULO IV - DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DE FITONEMATÓIDES ASSOCIADAS À CULTURA DA BATATA (*Solanum tuberosum* L.) NAS PRINCIPAIS REGIÕES PRODUTORAS DO BRASIL

RESUMO - Em função da preocupação com o expressivo descarte em consequência de danos causados por fitonematóides em tubérculos, a Associação Brasileira da Batata (ABBA) contatou o Laboratório de Nematologia da UNESP/FCAV para realizar um levantamento nas principais regiões produtoras do País, na safra 2007/08. Coletaram-se 168 amostras, em lavadoras e mercados. Tubérculos foram documentados para observação *in situ*, visando à caracterização de sintomas e sinais, e os fitonematóides foram extraídos para identificação das espécies. Foram encontradas *Meloidogyne arenaria* no Sul de Minas Gerais e Rio Grande do Sul (3,5% das amostras), *M. incognita* em 10% (exceto no Sul do País) e *M. javanica* em todas as regiões amostradas (50%). O principal sintoma observado no tubérculo e nas raízes foi a presença de caroços protuberantes, deixando a superfície com aspecto áspero. No grupo dos fitonematóides das lesões radiculares foram identificados *Pratylenchus brachyurus* em 40% das amostras (exceto no Rio Grande do Sul), *P. coffeae* no Triângulo Mineiro, Sul de Minas e São Paulo (2,4%) e *P. penetrans* (3%), em São Paulo. Os principais sintomas observados no tubérculo foram inúmeras lesões em forma de pontos necróticos, deprimidos, na superfície dos tubérculos. O fitonematóide espiralado *Helicotylenchus dihystera* foi encontrado em todas as regiões amostradas, (49%). Conquanto esse fitonematóide seja um ectoparasito migrador, as amostras tenham sido constituídas de tubérculos lavados e nenhum sintoma específico tenha sido observado, essa alta frequência do parasito requer um estudo mais acurado do hábito de parasitismo e de suas inter-relações com a cultura.

Palavras-chave: fitonematóides de galha, fitonematóides das lesões radiculares, *Helicotylenchus dihystera*, *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp.

I INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma olerícola de grande expressão econômica no Brasil, que produziu 3,4 milhões de toneladas de batata em 2008. Nos últimos sete anos observou-se o deslocamento das áreas de plantio do Sul do País para o Centro Oeste e Nordeste. Nos Estados da Bahia e Goiás observou-se um acréscimo de 300 e 350% na área plantada. A produção de batata nas principais regiões produtoras foi da ordem de 1,13 milhão de toneladas no Sul de Minas e no Triângulo Mineiro, 600 mil no Paraná, 386 mil no Rio Grande do Sul, 256 e 214 mil toneladas na Bahia e em Goiás, respectivamente, e 100 mil em São Paulo. Estas regiões respondem em conjunto por 80% da produção brasileira, sendo que Minas Gerais ocupa a liderança nacional em produção e produtividade (AGRIANUAL, 2008).

A produção total de batata corresponde aproximadamente ao consumo nacional, sendo que cerca de 90% são consumidas *in natura* e o restante na forma industrializada como pré-fritas, chips e pré-cozidas (FERREIRA & NETTO, 2007). Atualmente, a totalidade dos tubérculos consumidos *in natura* é lavada, sendo esse processo exigido por lei (ABBA, 2008).

Para o beneficiamento e classificação das batatas, os tubérculos são arrancados e expostos na superfície do solo. Em seguida, passam por um processo de seleção manual no campo, são ensacados, colocados em caminhões e transportados até as lavadoras. Lá, são lavados, secos, classificados mecânica e manualmente, ensacados e então armazenados ou distribuídos ao mercado consumidor, conforme demanda (FERREIRA & NETTO, 2007).

FINGER & FONTES (1999) mostraram que a lavagem dos tubérculos é questionável, pois aumenta o descarte pós-colheita dos tubérculos em até 90%, comparado àqueles não lavados, acentua os defeitos e ainda torna-os mais suscetíveis à deterioração, tendo as doenças papel fundamental em relação aos impactos sofridos e às perdas pós-colheita.

Nesse aspecto, das doenças causadas por fitonematóides os de galha ocupam o primeiro lugar em ordem de importância, podendo causar severos danos e perdas significativas na cultura da batata, seguidos dos nematóides das lesões radiculares (CHARCHAR & MOITA, 2001; SILVA & SANTOS, 2007).

Além dos danos diretos, esses fitonematóides podem causar danos indiretos pois as galhas e as lesões secundárias são esfoladas durante a lavagem dos tubérculos, favorecendo as podridões causadas por bactérias (VOVLAS et al., 2005). Além das perdas citadas acima, esses tubérculos ainda podem atuar como disseminadores desses patógenos para novas áreas, ressaltando a importância da sanidade da batata-semente (SILVA & SANTOS, 2007).

As informações disponíveis sobre a ocorrência e distribuição dos fitonematóides de galha na cultura da batata no Brasil foram obtidas na década de 90, e quase nenhuma referência é feita aos genótipos atualmente usados no País (CHARCHAR, 1997). Em relação aos fitonematóides das lesões radiculares, apenas a ocorrência de espécies associadas a cultura são encontradas, sem maiores informações sobre a sua distribuição nas áreas produtoras de batata no País.

Produtores de batata filiados a Associação Brasileira da Batata (ABBA), de diferentes regiões produtoras do País, levaram à entidade suas preocupações com relação ao expressivo descarte constatado nas lavadoras, em decorrência dos danos causados por fitonematóides. O Laboratório de Nematologia da UNESP/FCAV foi contatado pela ABBA e, então, decidiu-se realizar um levantamento nas principais regiões produtoras do País, nos Estados de Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo das espécies de fitonematóides associados à cultura.

Visando a atualizar informações sobre a ocorrência e distribuição das principais espécies de fitonematóides que atacam a cultura da batata, tubérculos sintomáticos foram coletados e documentados para caracterizar os danos causados e, posteriormente, processados para a identificação das espécies de fitonematóides associados a eles.

II MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de tubérculos provenientes das principais regiões produtoras de batata do País (Figura 1) foram coletadas em lavadoras e analisadas quanto à ocorrência de fitonematóides. Tubérculos de diferentes genótipos, totalizando 168 amostras (Tabela 1), procedentes de municípios dos Estados de Goiás (2 municípios), Minas Gerais (11 municípios no Triângulo Mineiro e 6 municípios no Sul de Minas), Paraná (5 municípios), Rio Grande do Sul (3 municípios) e São Paulo (10 municípios) foram examinados no Laboratório de Nematologia do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal-SP, no período de janeiro de 2008 a fevereiro de 2009.

O material coletado foi acondicionado em redes de nylon, devidamente identificado, acondicionado em caixas de poliestireno expandido e enviado ao laboratório através de entrega expressa, face à natureza do material, pelo Eng. Agr. Natalino Shimoyama, Diretor Geral da Associação Brasileira da Batata - ABBA.

Além destas amostras, fizeram parte deste levantamento amostras enviadas ao Laboratório de Nematologia para consulta e amostras enviadas ao Laboratório de Nematologia da ESALQ/USP, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Mário M. Inomoto.

2.1 Extração dos fitonematóides de raízes e tubérculos

No laboratório, essas amostras foram mantidas em refrigerador até o momento da análise. Inicialmente, os tubérculos com sintomas tais como: galhas, rachaduras na casca, pontos necróticos e deformações diversas foram fotografados. Fragmentos superficiais de regiões sintomáticas foram processados segundo COOLEN & D'HERDE (1972), para extração de espécimes de fitonematóides.

Fêmeas maduras de *Meloidogyne* spp. foram removidas dos tecidos infectados, uma a uma, ao estereoscópio, para o preparo de cortes perineais, segundo a técnica de TAYLOR & NETSCHER (1974) e para eletroforese, segundo ESBENSHADE & TRIANTAPHYLLOU (1985). Machos de *Meloidogyne* spp. foram obtidos através da

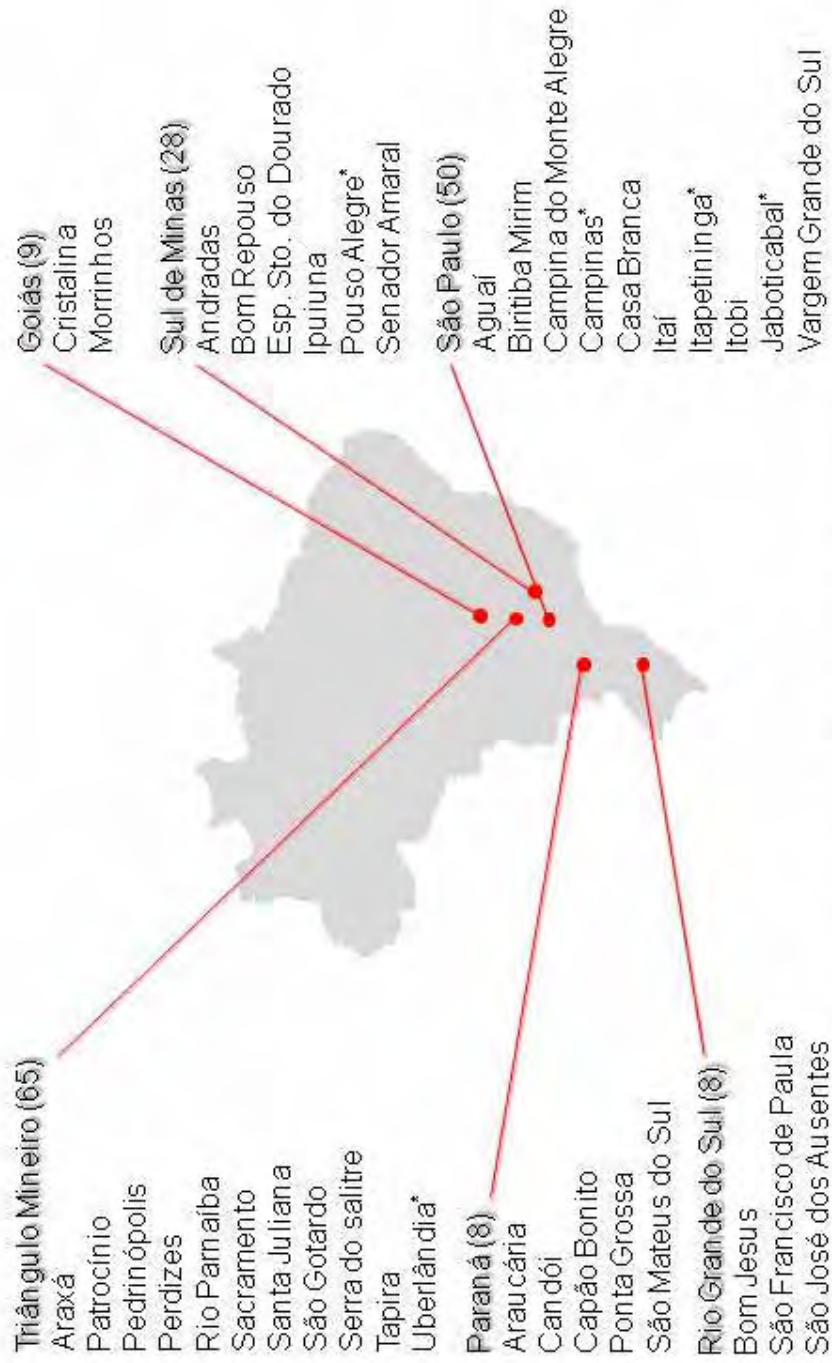


Figura 1. Estados e Municípios amostrados (total de amostras coletadas) para o estudo fitossanitário de distribuição das espécies de fitonematóides associadas à cultura da batata (asterisco denota coleta de amostras também em mercados). UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP, 2009.

Tabela 1. Origem e número de amostras de tubérculos sintomáticos (genótipo, quando identificado) utilizadas no levantamento da ocorrência de fitonematóides associados à cultura da batata nas principais regiões produtoras do País. UNESP/FCAV, Jaboticabal-SP. 2009.

| Local | Quantidade | Genótipo |
|------------------------------|-------------------|-----------------------------------|
| Região Sudeste | | |
| Andradas-MG | 2 | - |
| Araxá-MG | 31 | - |
| Bom Repouso-MG | 8 | Asterix |
| Espírito Santo do Dourado-MG | 2 | Cupido, Asterix |
| Ipuiuna-MG | 5 | Ágata, Cupido |
| Patrocínio-MG | 2 | Ágata |
| Pedrinópolis-MG | 1 | - |
| Perdizes-MG | 10 | Ágata |
| Pouso Alegre-MG | 21 | Monalisa, Ágata, Vivaldi, Asterix |
| Rio Parnaíba-MG | 1 | Ágata |
| Sacramento-MG | 4 | - |
| Santa Juliana-MG | 2 | Cupido |
| São Gotardo-MG | 5 | - |
| Senador Amaral-MG | 2 | Asterix |
| Serra do salitre-MG | 1 | Asterix, Ágata, Marink |
| Tapira-MG | 6 | FL1806, Cupido |
| Uberlândia-MG | 1 | - |
| Aguaí-SP | 2 | - |
| Biritiba Mirim-SP | 5 | - |
| Campina do Monte Alegre-SP | 4 | - |
| Campinas-SP | 1 | - |
| Capão Bonito-SP | 1 | - |
| Casa Branca-SP | 4 | Ágata |
| Itaí-SP | 8 | - |
| Itapetininga-SP | 16 | - |
| Itobi-SP | 4 | Asterix, Ágata |
| Jaboticabal-SP | 1 | - |
| São João da Boa Vista-SP | 1 | - |
| Vargem Grande do Sul-SP | 11 | Asterix, Ágata |
| Região Sul | | |
| Araucária-PR | 1 | - |
| Candói-PR | 1 | - |
| Ponta Grossa-PR | 1 | Ágata |
| São Mateus do Sul-PR | 2 | Ágata |
| Bom Jesus-RS | 1 | - |
| São Francisco de Paula-RS | 4 | Asterix |
| São José dos Ausentes-RS | 3 | Asterix |
| Região Centro Oeste | | |
| Cristalina-GO | 8 | - |
| Morrinhos-GO | 1 | - |

técnica de incubação de fragmentos superficiais sintomáticos, segundo YOUNG (1954).

2.2 Identificação dos fitonematóides extraídos dos tubérculos de batata

Para a identificação dos fitonematóides extraídos de tubérculos, as características morfológicas de espécimes foram documentadas através de fotomicrografia e/ou eletromicrografia de varredura. Adicionalmente, espécies de *Meloidogyne* foram identificadas, também, pelos caracteres morfológicos e morfométricos da região labial e estilete de machos (HIRSCHMANN, 1985), análise da configuração perineal de fêmeas (TAYLOR & NETSCHER, 1974) e a identificação do fenótipo isoenzimático para esterase (EST), malato desidrogenase (MDH) e superóxido dismutase (SOD) por meio de eletroforese de isoenzimas (ESBENSHADE & TRIANTAPHYLLOU, 1985).

A obtenção dos espécimes, assim como, as técnicas de preparo para aquisição de imagens serão detalhadas a seguir:

2.2.1 Multiplicação *in vitro* de espécimes de *Meloidogyne* a partir de massas de ovos

O principal problema causado por fitonematóides em tubérculos, no Brasil, são as galhas causadas por espécies de *Meloidogyne* e, contudo, os tubérculos produzidos nas épocas mais frias do ano, geralmente, apresentam ausência de indivíduos adultos, dificultando a identificação da espécie. A multiplicação desses fitonematóides *in vitro* possibilita os estudos de identificação. Portanto, algumas das populações encontradas foram previamente multiplicadas no Laboratório de Nematologia da UNESP/FCAV com o intuito de obter indivíduos adultos para as observações microscópicas e para as técnicas bioquímicas.

Massas de ovos de ± 10 fêmeas de cada subpopulação foram coletadas com auxílio de uma ponteira e lavadas com solução aquosa de hipoclorito de sódio 0,5 %. Os ovos foram axenizados em solução aquosa de ampicilina 1% (SILVA, 2009). Então,

foram assepticamente inoculados em mini-tubérculos enraizados *in vitro* em frascos contendo 100 g de areia e 10 mL de solução aquosa nutritiva composta por mono-amônio fosfato (24 mg) e nitrato de cálcio (10 mg), segundo SILVA (2009). A seguir foram incubados em B.O.D. a 25 ± 1 °C, no escuro. Sessenta dias após, efetuou-se a extração individual de fêmeas maduras para eletroforese (ESBENSHADE & TRIANTAPHYLLOU, 1985), configuração perineal (TAYLOR & NETSCHER, 1974) e de J2 e machos (HIRSCHMANN, 1985).

2.2.2 Preparo dos fitonematóides para estudo ao microscópio fotônico

Os espécimes obtidos na extração foram coletados um a um das suspensões, com pincel de cerda única (preparado com um pêlo de suíno), ao estereoscópio, e transferidos para lâminas temporárias.

Essas montagens foram preparadas transferindo-se 10 a 15 espécimes vivos de cada amostra, um a um, para uma gota de água filtrada colocada no centro de uma lâmina de vidro, ao estereoscópio. Os espécimes foram relaxados sob a chama de uma lamparina à álcool e, em seguida, foram centralizados lado a lado no fundo da gota. Então, depositou-se uma lamínula de 22 x 22 mm e efetuou-se a lutagem com esmalte incolor (COBB, 1918). As observações e fotomicrografias foram efetuadas no espaço de até 3 horas após a montagem. Foram examinados e documentados juvenis, fêmeas e machos.

Para a confecção dos cortes perineais de fêmeas de *Meloidogyne* spp. porções do tecido de tubérculos apresentando galhas foram dissecadas sob estereoscópio, com auxílio de pinça e ponteira, para expor as fêmeas imersas em seu sítio de alimentação. A epiderme e o córtex do tubérculo na região da galha foram escarificados, cuidadosamente, com a ponteira até que a cutícula lisa, branca e brilhante da fêmea fosse exposta e, então, a escarificação passou a ser feita nos tecidos ao redor da fêmea, nunca tocando-a diretamente, para evitar a ruptura da cutícula. Depois da remoção dos tecidos vegetais adjacentes, a fêmea solta foi coletada e transferida para uma gota de solução aquosa salina 0,9% sobre uma superfície plástica (tampa de uma

placa de Petri plástica). O 'pescoço' das fêmeas foi cortado e, em seguida, elas foram transferidas para uma gota lateral contendo ácido láctico 45%. Com leves compressões as cutículas das fêmeas foram limpas e cortadas com auxílio de um bisturi, de modo a obterem-se porções quadradas ou retangulares da cutícula com a vulva no centro. Essas seções das cutículas foram transferidas para uma gota de glicerina anidra, sobre o centro de uma lâmina, seguida da deposição, selagem da lamínula e identificação da amostra sobre a lâmina (TAYLOR & NETSCHER, 1974).

Espécimes vermiformes (macho, fêmea ou juvenis) e o padrão perineal de fêmeas de *Meloidogyne* spp. foram examinados em campo claro e documentados. Objetivas de 10x, 20x e 40x e objetivas de imersão de 60x e 100x foram utilizadas para o exame dos espécimes, que foram fotomicrografados em um sistema de aquisição de imagens constituído por uma câmera digital Sony Hiper HAD[®], montada sobre um microscópio Olympus BX50[®] e acoplada a um computador. As imagens digitalizadas adquiridas foram gravadas para serem posteriormente medidas. Pelo menos 10 espécimes de cada população foram documentados. As mensurações nas imagens digitalizadas foram feitas utilizando-se o software ImagePro[®] Plus 4.1, da Media Cybernetics.

2.2.3 Preparo dos fitonematóides para estudo ao microscópio eletrônico de varredura

Espécimes de *Meloidogyne* spp., recém-extraídos, e porções de tecido vegetal sintomáticos de tubérculos foram transferidos como descrito no item anterior para vidros contendo $\frac{3}{4}$ de seus volumes preenchidos com água filtrada. A seguir, os vidros foram agitados manualmente por cerca de 5 minutos e deixados em repouso, em refrigerador, a 5 °C, por cerca de 1 hora. Subseqüentemente, o volume de água de cada vidro foi reduzido a 0,5 mL com uma seringa hipodérmica, e os vidros foram novamente deixados em geladeira por 20 minutos. A seguir, o volume de cada vidro foi preenchido com a solução fixadora constituída de glutaraldeído 3% e formaldeído 2% (preparado com paraformaldeído), em solução tampão de fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4 e

resfriada a 1 °C. Os vidros foram mantidos em geladeira para que os fitonematóides se mantivessem relaxados durante todo o processo de fixação. Após o período mínimo de 72 horas, o processo prosseguiu com a transferência dos fitonematóides em suspensão, com auxílio de uma pipeta de Pasteur, para câmaras preparadas com cápsulas de polietileno utilizadas em inclusão de amostras para microscopia eletrônica de transmissão e tela de *silk-screen*, com poros de 25 µm, conforme descrito por EISENBACK (1991).

Posteriormente, essas amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 2%, no mesmo tampão, por 12 horas. Após o tratamento com tetróxido de ósmio, as amostras foram lavadas quatro vezes consecutivas em solução tampão pura, num intervalo de 15 minutos, desidratadas em série gradual de acetona 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 100% e 100%, por 30 minutos em cada passo, e secas em secador de ponto crítico, utilizando-se CO₂. Em seguida, foram montadas e recobertas com 35 nm de ouro. Finalmente, os fitonematóides foram observados e eletromicrografados em microscópio eletrônico JEOL JSM 5410, operado em 15kV. Foram documentadas a morfologia da região labial, em vista lateral, do campo lateral de machos e da região perineal de fêmeas.

2.2.4 Caracterização dos fenótipos isoenzimáticos de espécies de *Meloidogyne*

Dez fêmeas de *Meloidogyne* spp. em início de postura de ovos e com coloração branco-leitosa foram retiradas de tubérculos infectados ou de raízes de mini-tubérculos enraizados *in vitro* que foram usados para a multiplicação e manutenção de populações de *Meloidogyne* spp. Então, colocadas em microtubos (do tipo *Eppendorf* com capacidade para 0,5 mL) contendo 20 µL de solução extratora resfriada (2 g de sacarose, 200 µL de triton X100, 7,8 mL de água e 2 a 3 gotas de bromofenol blue), tomando-se o cuidado para não estourá-las. Com auxílio de pistilo para microtubo, as fêmeas foram trituradas sobre um recipiente contendo raspas de gelo.

Após a montagem da forma, a solução de poliacrilamida 8% [3,85 mL de Tris-HCl 2,25 N, pH 8.8, 6,16 mL de solução aquosa de acrilamida (30 g de acrilamida e 0,8 g de bis-acrilamida), 12,8 mL de água destilada, 20 μ L de TEMED e 200 μ L de persulfato de amônio] foi vertida, tomando-se o cuidado de evitar a formação de bolhas e, em seguida, colocou-se o pente de 0,75 mm entre na parte superior da forma para moldar as cavidades individuais e/ou poços durante a polimerização do gel. Então, depois da retirada do pente e montagem da cuba, adicionou-se a solução tampão do eletrodo (1,5 g de tris e 7,1 g de glicina) preenchendo toda a cuba, inclusive os poços. Após a maceração das fêmeas, com o auxílio de uma micropipeta, 10 μ L do extrato protéico obtido de cada amostra foi aplicado nas cavidades do gel, para subsequente corrida eletroforética. Utilizou-se uma ponteira nova para cada amostra.

A eletroforese foi conduzida a 5 °C (câmara fria), sob voltagem constante de 100 volts. A migração foi monitorada por meio do deslocamento da linha frontal de azul de bromofenol. A eletroforese foi interrompida quando a linha frontal estava a 1 cm do final da forma, cerca de 4 horas após o início da corrida. Ao final da corrida, o gel foi retirado da forma e então transferido para a solução de detecção da enzima α -esterase (EST), malato desidrogenase (MDH) e superóxido dismutase (SOD).

2.3 Caracterização dos sintomas causados pelas espécies-chave da cultura em tubérculos e raízes

Antes do processamento no laboratório, os sintomas externos e internos de cada tubérculo foram documentados através de fotografias e/ou fotomicrografias adquiridas através de uma câmera digital profissional Sony[®], modelo α 100. As imagens digitalizadas foram gravadas em computador e, posteriormente, tratadas utilizando-se o software Photoshop[®], da Adobe.

Após a documentação dos sintomas em tubérculos e raízes infectadas por *Meloidogyne* spp. e em tubérculos infectados com *Pratylenchus* spp., os tecidos vegetais foram submetidos a coloração para a detecção do ponto de penetração,

observação do desenvolvimento dos fitonematóides *in situ* e para determinar a profundidade das fêmeas no tubérculo.

Utilizou-se o método de coloração de massas de ovos de *Meloidogyne* spp. com fucsina ácida, segundo SILVA et al. (1988), o método de coloração de fitonematóides no interior de tecidos vegetais com fucsina ácida, segundo BYRD JR et al. (1983) e com lactofenol, segundo Franklin & Goodey (1959) e Marks & McKenna (1981) citados por DAYKIN & HUSSEY (1985).

2.3.1 Coloração de massas de ovos

Para a coloração de massas de ovos de *Meloidogyne* spp., fragmentos de raízes foram colocados em um béquer contendo 30 mL de água e 1 mililitro da solução corante a base de fucsina ácida (0,35 g de fucsina ácida, 25 mL de ácido acético e 75 mL de água destilada) por aproximadamente 10 minutos, conforme SILVA et al. (1988). Decorrido esse tempo, as massas de ovos coradas de vermelho foram documentadas.

2.3.2 Coloração de espécimes no interior do tecido vegetal com fucsina ácida

Para a coloração de fitonematóides no interior do tubérculo, estes foram gentilmente lavados em água corrente retirando-se todo o solo, sem danificá-los. O tubérculo foi então cortado ao meio no sentido do maior comprimento. Então, foram cortadas fatias transversais com 2 cm de largura e aproximadamente 3 cm de profundidade. Esses fragmentos foram colocados em um béquer contendo 30 mL de água e 1 mililitro da solução corante a base de fucsina ácida (0,35 g de fucsina ácida, 25 mL de ácido acético e 75 mL de água destilada). O béquer foi deixado em fogo brando sobre tela de amianto até atingir o ponto de ebulição, permanecendo sob a chama por mais trinta segundos. O béquer foi então retirado do fogo, ficando em temperatura ambiente até estabilizar a temperatura do líquido. Removeu-se o excesso

de corante através de lavagem em água corrente, conforme BYRD JR et al. (1983). Os fragmentos foram então deixados em glicerina acidificada (1 mL.L^{-1} de HCl 5N) até o momento da documentação em microscópio fotônico e estereoscópio.

2.3.3 Coloração de espécimes no interior do tecido vegetal com fucsina lactofenol

Cortes a mão livre de fragmentos de tubérculos sintomáticos foram colocados em um béquer contendo 50 ml de solução de lactofenol (50 mL de fenol, 50 mL de ácido láctico, 50 mL de água destilada, 10 mL de glicerina) e 2,5 mL da solução estoque do corante a base de cotton blue 1%. O béquer foi então levado ao fogo brando até atingir o ponto de ebulição, permanecendo sob a chama por mais 60 segundos. Então, foram enxaguados em água corrente e imersos em solução pura de lactofenol até se obter o máximo contraste entre o fitonematóide e o tecido (DAYKIN & HUSSEY, 1985). Posteriormente, foram observados e documentados ao microscópio fotônico e estereoscópio.

III RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram identificadas as espécies de fitonematóides de galha *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood, *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *M. arenaria* (Neal) Chitwood, de fitonematóides das lesões radiculares *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Goodey, *P. coffeae* (Zimmermann) Filipjev & Schuurmans Stekhoven e *P. penetrans* (Cobb) Chitwood & Oteifa e do fitonematóide espiralado *Helicotylenchus dihystra* (Cobb) Sher associadas a diferentes lavouras de batata no Brasil e, como resultado, foi gerado um quadro da distribuição das principais espécies de fitonematóides associadas à cultura no País, apresentado na Tabela 2.

Conforme se observa na Figura 2, na Região Sudeste a freqüência de *M. javanica* nas amostras sintomáticas avaliadas neste trabalho foi menor nas áreas produtoras do Estado de São Paulo do que naquelas do Triângulo Mineiro e Sul de Minas. Está espécie foi encontrada em cerca de 50% das amostras coletadas nos municípios do Estado de Minas Gerais e em apenas 30% daquelas coletadas em regiões de São Paulo.

Já *M. incognita* apresenta freqüência três vezes maior nos municípios produtores de São Paulo (30%) que nas áreas produtoras de batata do Estado de Minas Gerais (10% das amostras, tanto no Triângulo Mineiro, quanto no Sul de Minas). Em amostras coletadas no Sul de Minas também foi observada a presença de *M. arenaria*. A freqüência desta espécie no Sul de Minas é superior a de *M. incognita*.

Dentre as amostras exibindo galhas coletadas nos municípios produtores de batata da região Sudeste, 10% das provenientes do Triângulo Mineiro e 18% das provenientes de São Paulo as espécies de *Meloidogyne* não puderam ser identificadas devido à ausência de fêmeas e/ou machos ou pela dificuldade em multiplicá-las em casa de vegetação.

Pratylenchus brachyurus foi observado em mais de 70% das amostras sintomáticas coletadas em São Paulo, em cerca de 60% daquelas oriundas do Triângulo Mineiro e em menos de 40% daquelas oriundas do Sul de Minas. *Pratylenchus coffeae* foi

Tabela 2. Origem e número de amostras de tubérculos sintomáticos utilizadas no levantamento dos fitonematóides associados à cultura da batata nas principais regiões produtoras do País. UNESP/FCAV, Jaboticabal-SP. 2009.

| LOCAL (nº de amostras) | Mj | Mi | Ma | M* | Pb | Pc | P** | Pp | Hd |
|----------------------------|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|
| Região Sudeste | | | | | | | | | |
| Andradas-MG (1) | 1 | | | | | | | | 1 |
| Araxá-MG (31) | 16 | 2 | | 1 | 21 | | 2 | | 20 |
| Bom Repouso-MG (8) | 3 | 1 | 2 | | 3 | 1 | | | 1 |
| Espírito S. Dourado-MG (2) | 2 | 1 | | | | | | | 1 |
| Ipuiuna-MG (5) | 4 | 1 | | | 3 | | | | 1 |
| Patrocínio-MG (2) | 2 | | | | | | | | |
| Pedrinópolis-MG (1) | | | | 1 | 1 | | | | 1 |
| Perdizes-MG (10) | 5 | 3 | | 1 | 7 | 1 | | | 9 |
| Pouso Alegre-MG (13) | 5 | | | | 5 | | | | 4 |
| Rio Parnaíba-MG (2) | 1 | | | 1 | 1 | | | | 2 |
| Sacramento-MG (4) | | | | 1 | 2 | | | | 4 |
| Santa Juliana-MG (2) | 2 | | | | 2 | | | | 1 |
| São Gotardo-MG (5) | 1 | | | 1 | | | 1 | | 3 |
| Senador Amaral-MG (2) | | | 2 | | | | | | 1 |
| Serra do salitre-MG (1) | 1 | | | | | | | | |
| Tapira-MG (6) | 2 | 2 | | | 5 | | | | 6 |
| Uberlândia-MG (1) | | | | | 1 | | | | 1 |
| Aguai-SP (2) | | | | | 2 | | | | 2 |
| Biritiba mirim-SP (5) | | | | 5 | | | | 4 | 5 |
| Campina M. Alegre-SP (4) | 1 | | | | 3 | | | | 4 |
| Campinas-SP (1) | | | | | | 1 | | 1 | |
| São J. B. Vista-SP (1) | | 1 | | | 1 | | | | |
| Capão Bonito-SP (1) | | | | | | | | | |
| Casa Branca-SP (3) | | | | 3 | 1 | | | | 3 |
| Itaí-SP (9) | | 8 | | 1 | 9 | | | | 9 |
| Itapetininga-SP (16) | 5 | 1 | | | 10 | | | | 1 |
| Itobi-SP (4) | 2 | 3 | | | 4 | | | | 4 |
| Jaboticabal-SP (1) | 1 | | | | 1 | 1 | | | 1 |
| Vargem G. do Sul-SP (11) | 7 | 2 | | | 6 | | | | 10 |
| Região Sul | | | | | | | | | |
| Araucária-PR (2) | | | | | | | | | |
| Candói-PR (1) | 1 | | | | | | | | 1 |
| Ponta Grossa-PR (1) | | | | | 1 | | | | |
| São F. Paula-RS (3) | 3 | | | | | | | | 3 |
| Bom Jesus-RS (1) | 1 | | | | | | | | 1 |
| São J. Ausentes-RS (4) | 2 | | 1 | | | | | | 1 |
| São Mateus do Sul-RS (5) | 2 | | | | 2 | | | | 2 |
| Região Centro Oeste | | | | | | | | | |
| Cristalina-GO (8) | 6 | 2 | | | 2 | | | | 1 |
| Morrinhos-GO (1) | | | | | | | | | 1 |

Mj: *Meloidogyne javanica*; Mi: *M. incognita*; Ma: *M. arenaria*; M*: espécies de *Meloidogyne* que não puderam ser identificadas por falta de fêmeas e/ou machos; Pb: *Pratylenchus brachyurus*; Pc: *P. coffeae*; P**: espécies de *Pratylenchus* que não puderam ser identificadas devido a condição do material; Pp: *P. penetrans* e Hd: *Helicotylenchus dihystra*.

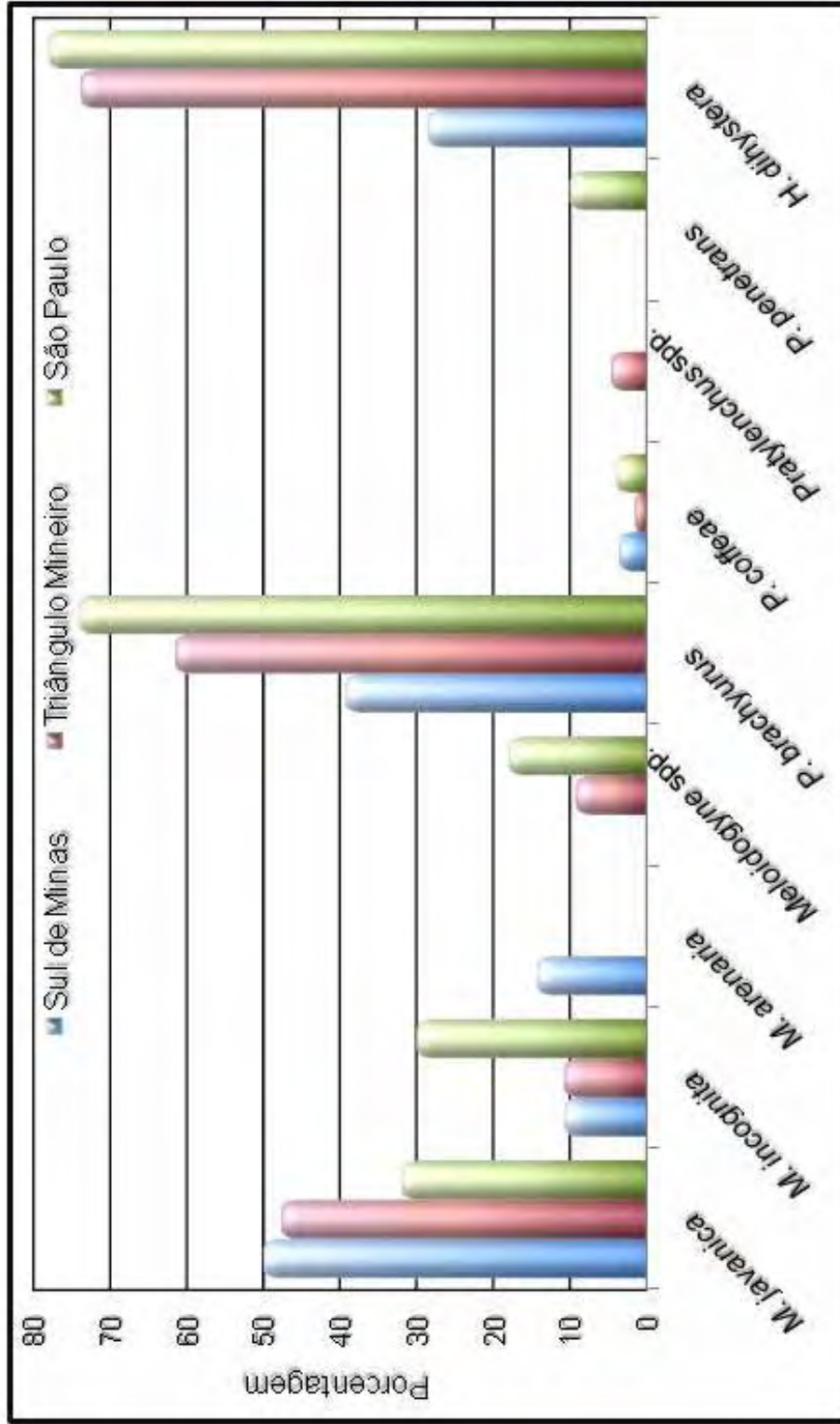


Figura 2. Ocorrência de espécies de fitonematóides nas diferentes regiões produtoras de batata do

Sudeste do País. UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP, 2009.

observado em todas as áreas amostradas, porém numa frequência muito baixa. *Pratylenchus penetrans* foi observado somente em amostras coletadas no Estado de São Paulo. Contudo, essas amostras foram obtidas em mercados da cidade de Campinas e não foi possível determinar a sua origem.

A presença das principais espécies de fitonematóides de galha e de fitonematóides das lesões radiculares nas principais regiões produtoras de batata do País estão assinaladas nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Além de *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria*, *P. brachyurus*, *P. coffeae* e *P. penetrans*, que são espécies consideradas chave para a cultura no País, *H. dihystra* foi encontrada em mais de 70% das amostras coletadas em São Paulo e no Triângulo Mineiro e em cerca de 30% daquelas coletadas no Sul de Minas Gerais. Apesar dessa frequência significativa, não foi possível determinar os sintomas associados a essa praga nos tubérculos infectados.

Na Figura 5 estão apresentadas as frequências observadas para as espécies encontradas associadas à cultura da batata nos Estados amostrados na Região Sul do País. *Meloidogyne javanica* foi observada em cerca de 70% das amostras sintomáticas coletadas nos municípios produtores do Rio Grande do Sul. *Meloidogyne arenaria* também foi observada no Rio Grande do Sul, mais ou menos na mesma frequência em que foi registrada no Sul de Minas Gerais. *Meloidogyne incognita* não foi encontrada em nenhuma das amostras coletadas nesse Estado.

Das espécies de fitonematóides das lesões radiculares que atacam a cultura no País, somente *P. brachyurus* foi encontrado associado a tubérculos nas amostras sintomáticas coletadas na Região Sul, sendo observado em 36% das amostras coletadas no Estado do Paraná. Nenhuma amostra sintomática foi coletada no Estado do Rio Grande do Sul.

Como ocorreu nas regiões amostradas no Sudeste, no Sul do País *H. dihystra* também foi encontrada associada a tubérculos. Essa espécie foi observada em cerca de 60% das amostras coletadas no Rio Grande do Sul e em quase 40% daquelas coletadas no Paraná.

Na Região Centro Oeste (Figura 6) a espécie predominante é *M. javanica* (65%), seguida de *M. incognita* e *P. brachyurus* com cerca de 20% de frequência e *H.*



Figura 3. Mapa de distribuição das principais espécies de fitonematóides de galha (*Meloidogyne* spp.) associadas a cultura da batata em importantes regiões produtoras do Brasil, durante a safra 2007/2008, nos Estados de Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo. UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP. 2009.

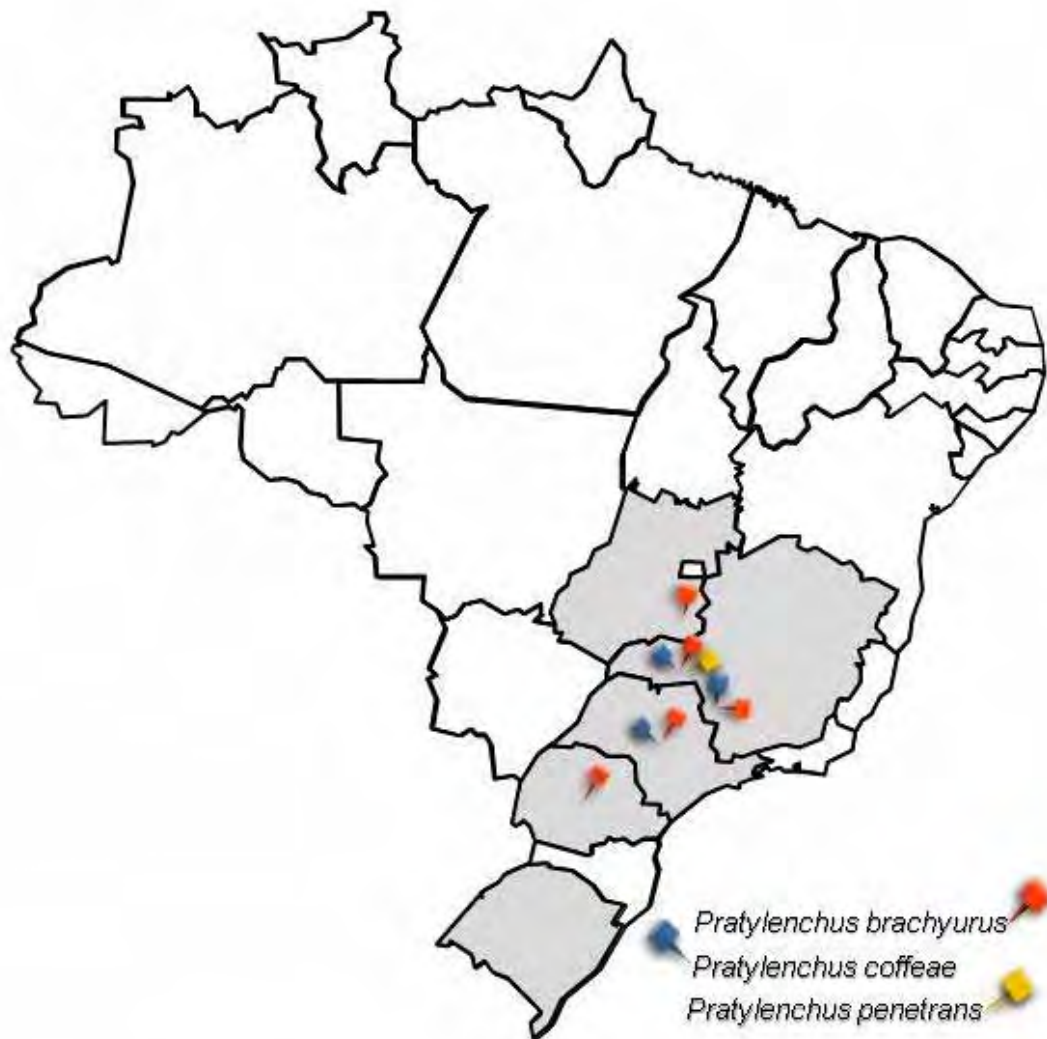


Figura 4. Mapa de distribuição das principais espécies de fitonematóides das lesões radiculares (*Pratylenchus* spp.) associadas a cultura da batata em importantes regiões produtoras do Brasil, durante a safra 2007/2008, nos Estados de Goiás, Minas Gerais, Paraná e São Paulo. UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP. 2009.

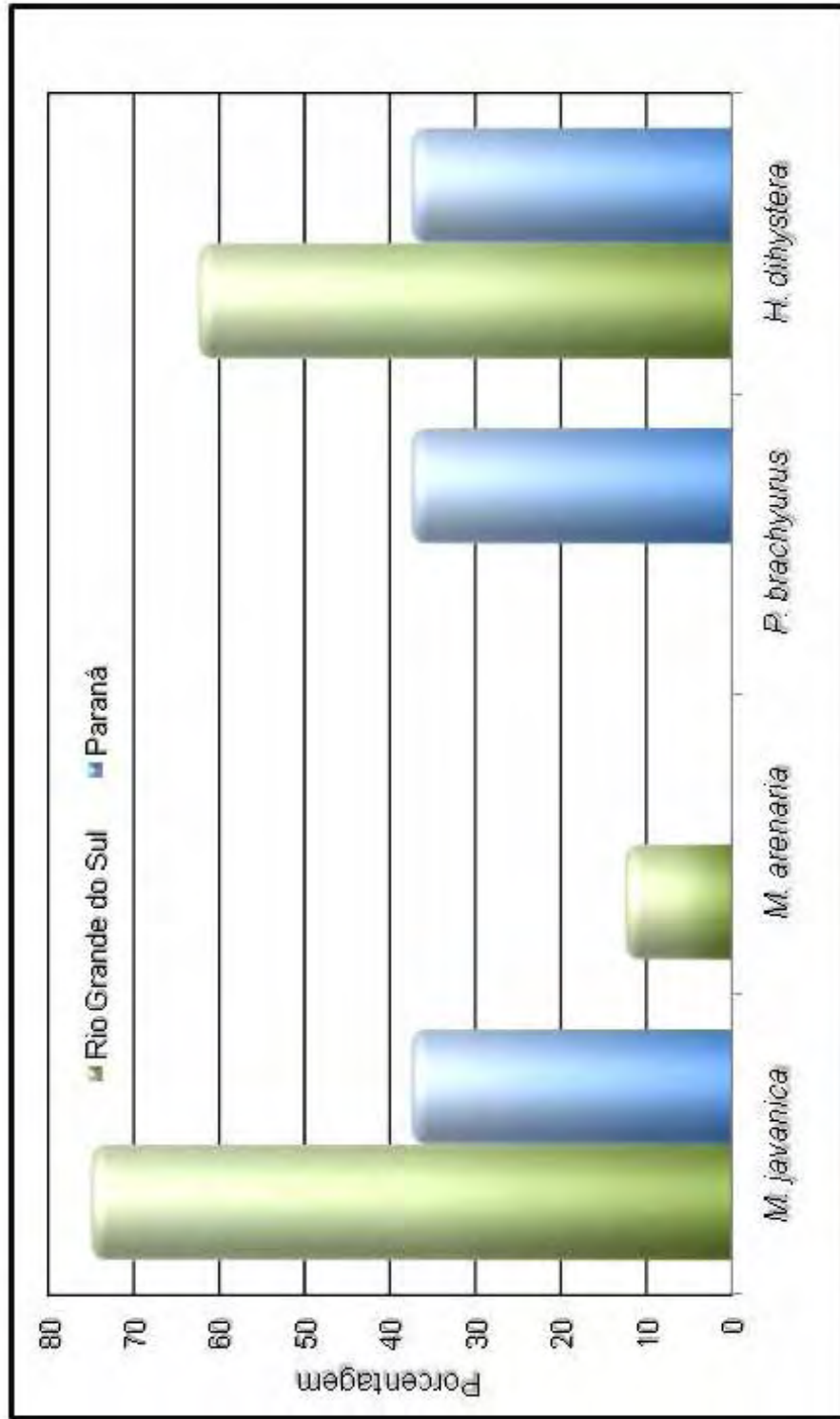


Figura 5. Ocorrência de espécies de fitonematóides nas diferentes regiões produtoras de batata do Sul do País. UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP, 2009.

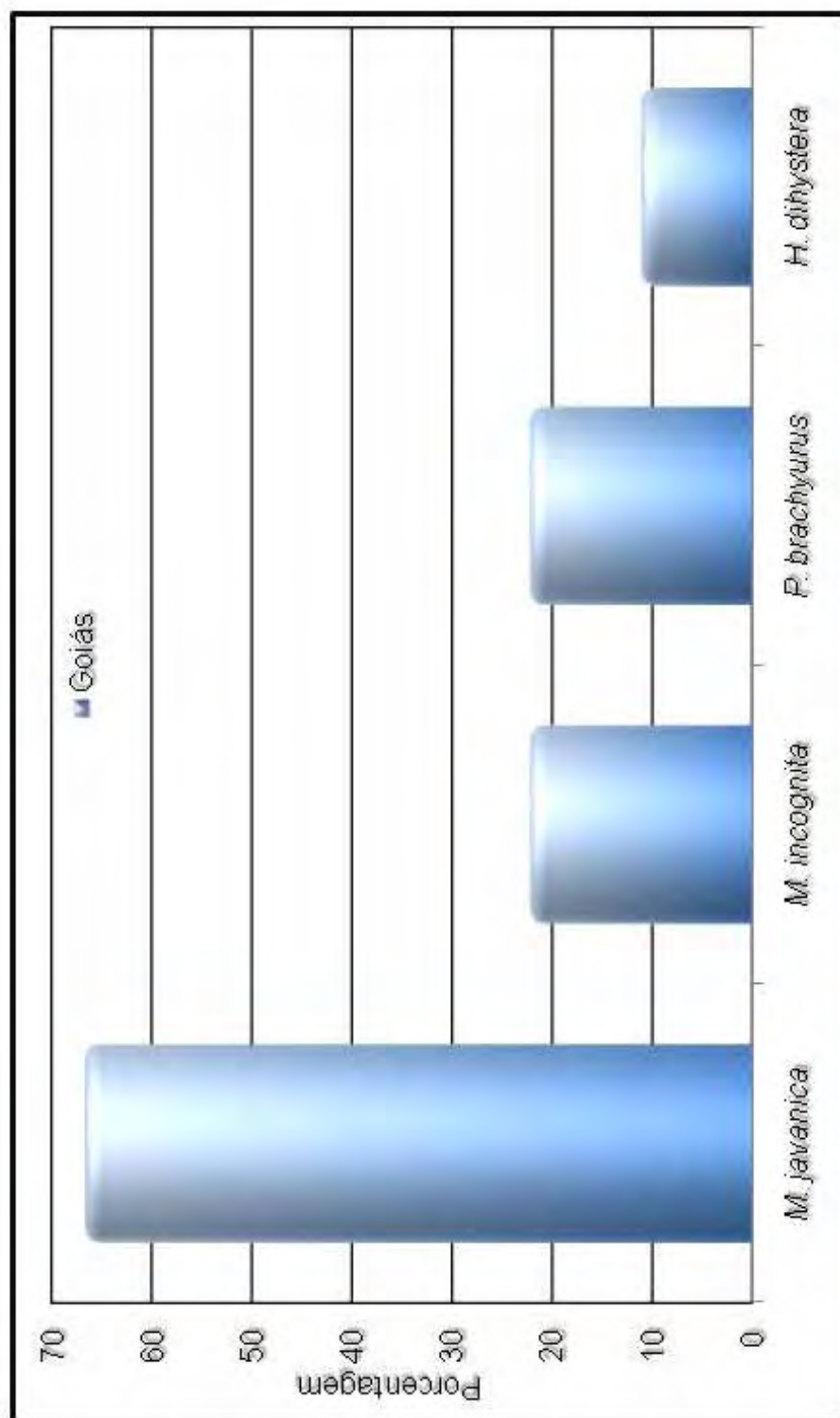


Figura 6. Ocorrência de espécies de fitonematóides na região produtora de batata do Centro Oeste do País. UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP, 2009.

dihystera, com 10%.

A ocorrência das espécies encontradas associadas à cultura da batata no considerando todas as regiões produtoras está apresentada na Figura 7. Nesse levantamento, 50% das amostras sintomáticas estavam infectadas por *M. javanica*, 49% estavam infectadas por *H. dihystera* e 40% por *P. brachyurus*.

A alta frequência de *H. dihystera* associada a culturas comerciais não é novidade. Contudo, considerando que esse fitonematóide é tido como ectoparasito migrador (SIDDIQI, 1972), as amostras avaliadas foram constituídas de batata lavadas e não havia sintoma no tubérculo que pudesse ser associado a presença dessa praga, essa alta frequência do parasito nas amostras requer um estudo mais acurado do hábito de parasitismo dessa espécie e de suas inter-relações com a cultura da batata.

Devido ao fato de que, no Brasil a principal forma de consumo da batata é *in natura*, a aparência geral, o formato, o tamanho e a cor da periderme dos tubérculos influenciam diretamente a escolha feita pelos consumidores, tornando os tubérculos deformados imprestáveis para o mercado.

Mesmo visando ao abastecimento das indústrias de batata frita, aonde características como alto teor de matéria seca, gemas pouco profundas e baixo teor de açúcares redutores são mais importantes que a aparência externa do tubérculo (SILVA & SANTOS, 2007), aqueles exibindo galhas são rejeitados pois a alta temperatura a que eles são submetidos durante o processamento inicia uma reação de escurecimento não enzimático que confere cor escura e sabor amargo ao produto final.

A importância de espécies de *Meloidogyne* para a cultura da batata é bem documentada na literatura. *Meloidogyne javanica* é considerada a principal espécie do gênero causando danos econômicos no Brasil em diversas culturas, inclusive, apresentando subpopulações mais agressivas a cultura da soja (RIBEIRO, 2005). Levantamentos realizados em áreas produtoras de soja (CARNEIRO et al., 1998; CASTRO et al., 2003; RIBEIRO, 2005), de banana (COFCEWICZ et al., 2004), de quiabo (OLIVEIRA et al., 2007) e até mesmo em áreas preservadas de Mata Atlântica (LIMA et al., 2005) confirmam a sua predominância e, de certo modo, a afirmação de VAN GUNDY (1985) em relação à tolerância a baixas temperaturas que as principais espécies que atacam a batata em todo o mundo apresentam. Segundo esse autor, *M.*

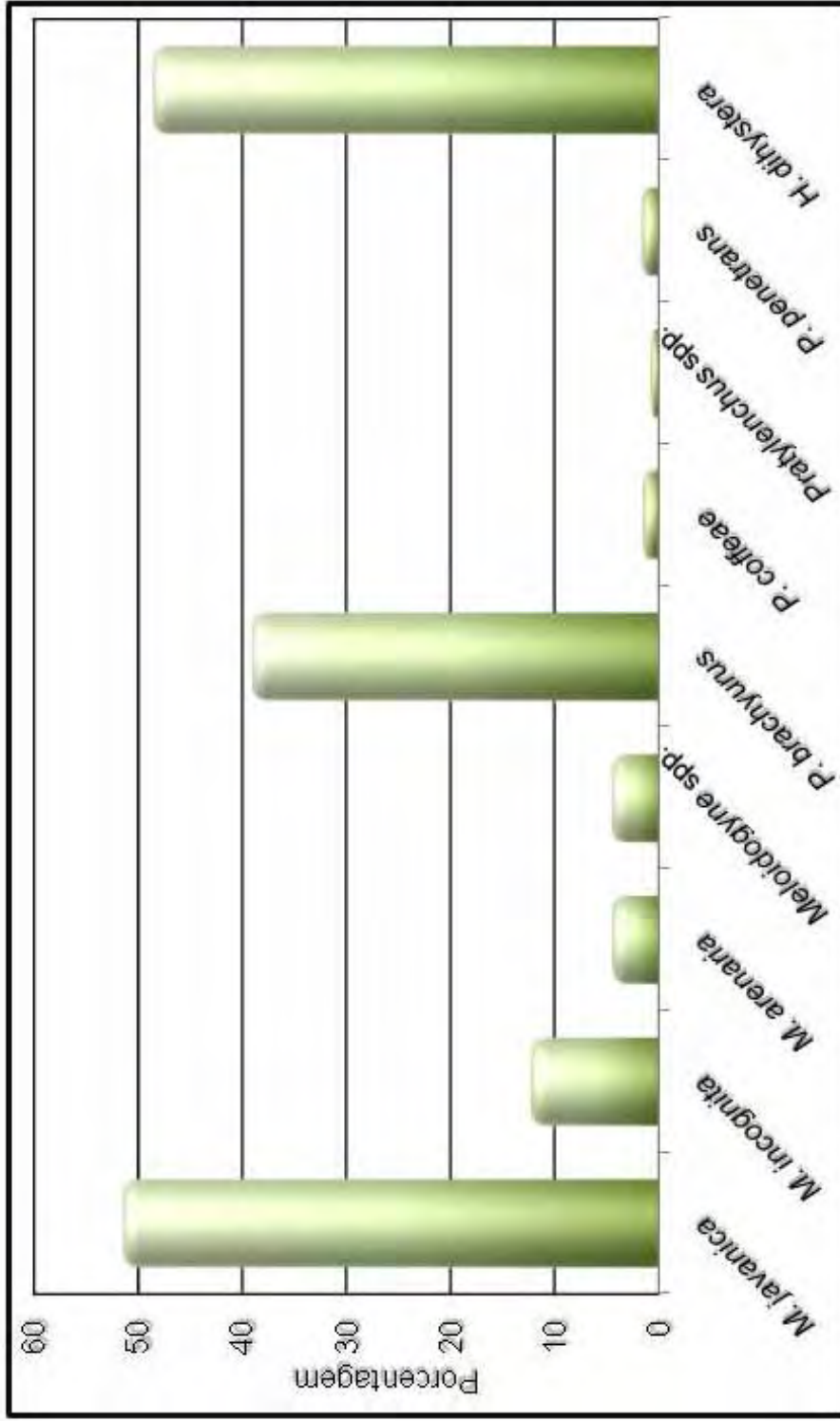


Figura 7. Ocorrência das principais espécies de fitonematóides encontradas nas 168 amostras coletadas nas principais regiões produtoras de batata do País. UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP. 2009.



Figura 8. Sintomas da infecção por *Meloidogyne* spp. em tubérculos coletados nas principais regiões produtoras de batata do Brasil, na safra 2007/2008. A) Tubérculo severamente infectado e o efeito da lavagem no progresso da podridão pós-colheita; B) Galhas em diferentes genótipos; C) Tubérculos com padrão comercial (esquerda) e infectados, exibindo galhas (direita); detalhe da galha em dois genótipos. UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP. 2009.

javanica apresenta a menor tolerância ao frio, seguida por *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. hapla* Chitwood e *M. chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley.

Essa predominância de *M. javanica* não foi, contudo, observada no levantamento que CHARCHAR & MOITA (2001) realizaram em áreas de cultivo de batata. Segundo esses autores, *M. javanica* tinha importância secundária a *M. incognita*, tendo em vista a frequência desta espécie em relação àquela.

Nos locais onde as fêmeas de *Meloidogyne* induziram sítios de alimentação, caracterizados pela hiperplasia e hipertrofia celular, resultou em galhas protuberantes, contendo pelo menos uma fêmea madura com ovos (Figuras 8 e 9).

Nessa espécie, os juvenis de segundo estágio, vermiformes e migradores, eclodem dos ovos no solo e penetram nas raízes e tubérculos. Tornam-se sedentários e iniciam o processo de alimentação. À medida que se desenvolvem, vão aumentando em diâmetro, passando pela forma referida como 'salsicha' (Figura 10E) até que na fase adulta, as fêmeas assumem o formato de pêra (Figura 11).

A região posterior das fêmeas exibe estrias em volta do períneo que se assemelham a uma impressão digital, usualmente referida como configuração perineal, contendo caracteres relevantes para identificação da espécie, conforme ilustrado nas Figuras 12A e D e 13A, B e C. A presença de estrias transversais na região labial dos machos (Figura 12B) constitui um dos caracteres morfológicos mais marcantes para identificação de *M. incognita*, uma vez que, entre as espécies do grupo que ocorrem no Brasil, essa é a única que exibe tal característica. O fenótipo isoenzimático para esterase constituído por uma única banda na altura da banda de menor mobilidade do fenótipo de *M. javanica*, utilizado como padrão e ilustrado na Figura 12C, é o caractere de maior peso para a identificação da espécie.

Após a penetração dos juvenis de segundo estágio nas raízes e tubérculos, enquanto se desenvolvem, ocorre aumento em número e tamanho das células dos tecidos da planta, em volta do ponto de penetração, em resposta à introdução de substâncias produzidas pelas glândulas esofagianas dos fitonematóides, resultando na protuberância a que chamamos de galha. As galhas nos tubérculos variam de pequenas e numerosas, dando um aspecto áspero à superfície (Figuras 8, 9, 10 e 14),

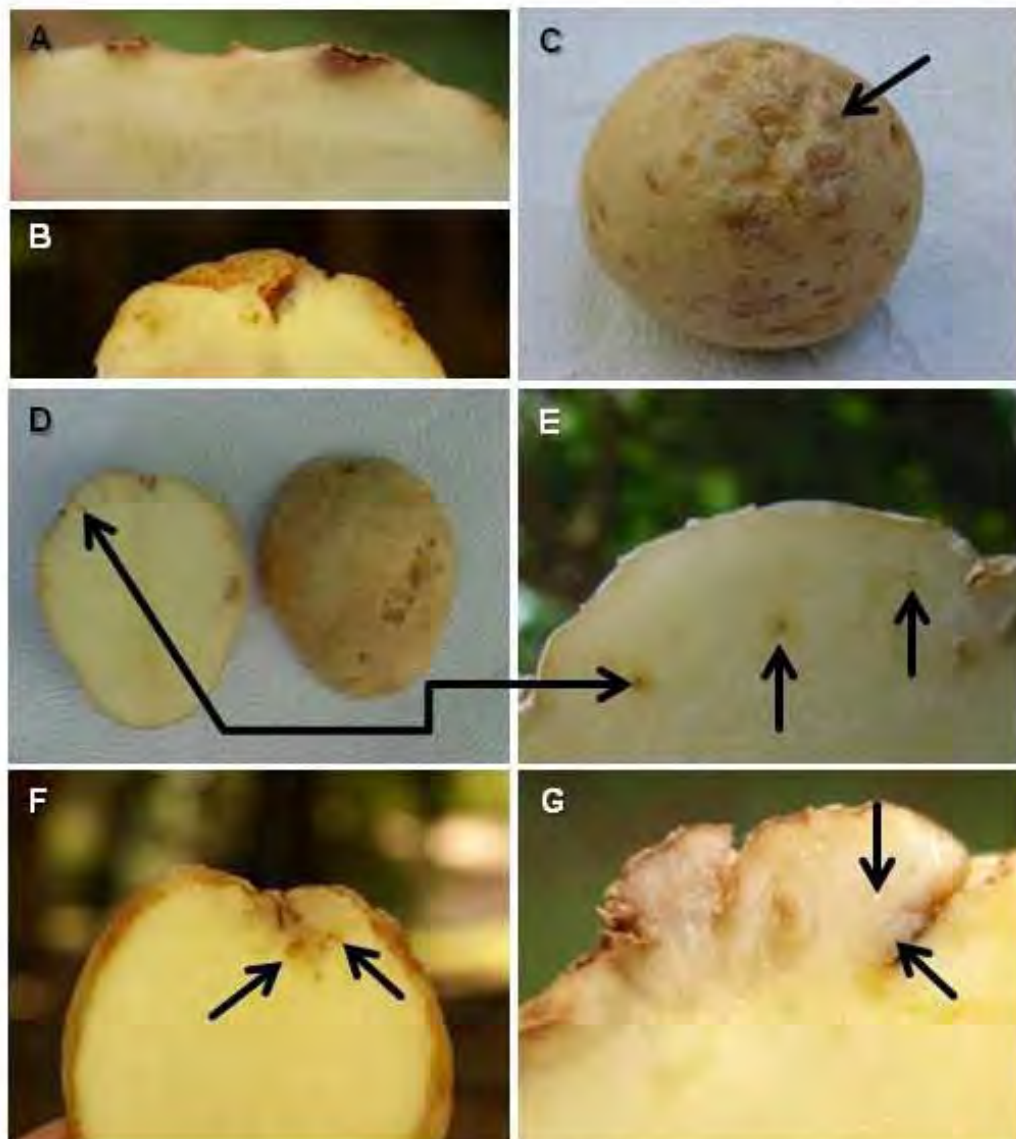


Figura 9. Sintomas e sinais da infecção por *Meloidogyne* spp. em tubérculos de batata. A e B) Corte transversal da galha; C) Galhas menores (seta), deprimidas em função do armazenamento; D) Vista interna e externa: pontuações escuras (ao redor do corpo da fêmea) internamente (seta), correspondendo às deformações externas; E, F e G) Pontuações escuras (setas) correspondentes ao local onde as fêmeas estão imersas no tecido. UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP. 2009.

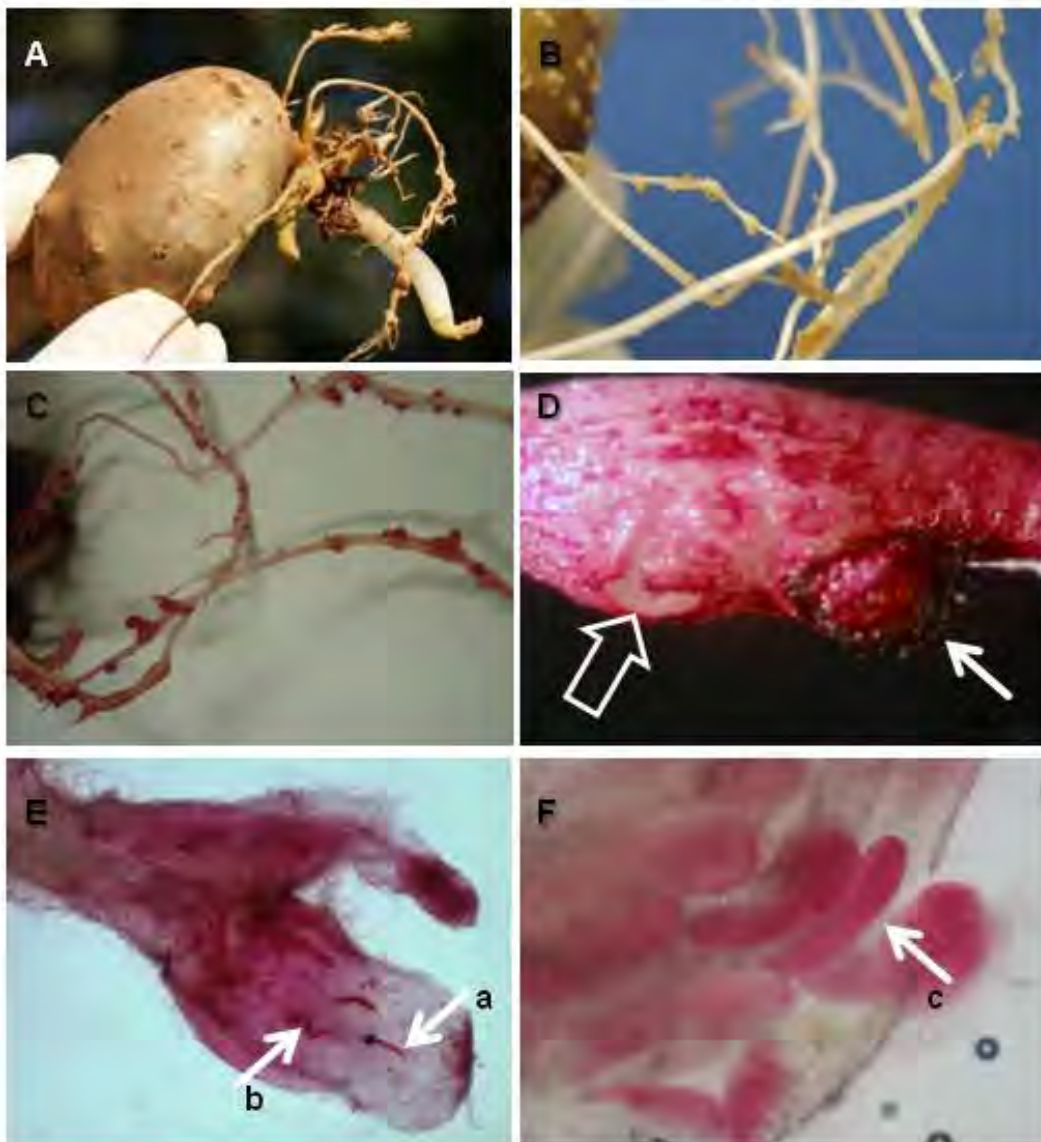


Figura 10. Sintomas e sinais da infecção por *Meloidogyne* spp. em tubérculos de batata. A) Batata-semente infectada apresentando galhas no tubérculo (seta) e também no sistema radicular; B e C) Detalhe de galhas com massa de ovos externa em raízes tenras de um mini-tubérculo, antes e depois de coloração com fucsina ácida, respectivamente; D) Galha com massa de ovos externa (seta cheia) e uma fêmea parcialmente exposta (seta vazada); E e F) Fragmentos de raiz infectada, colorida com fucsina ácida, apresentando juvenis recém-penetrados (a), juvenis 'salsicha' (b) e fêmeas (c), respectivamente. UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP. 2009.

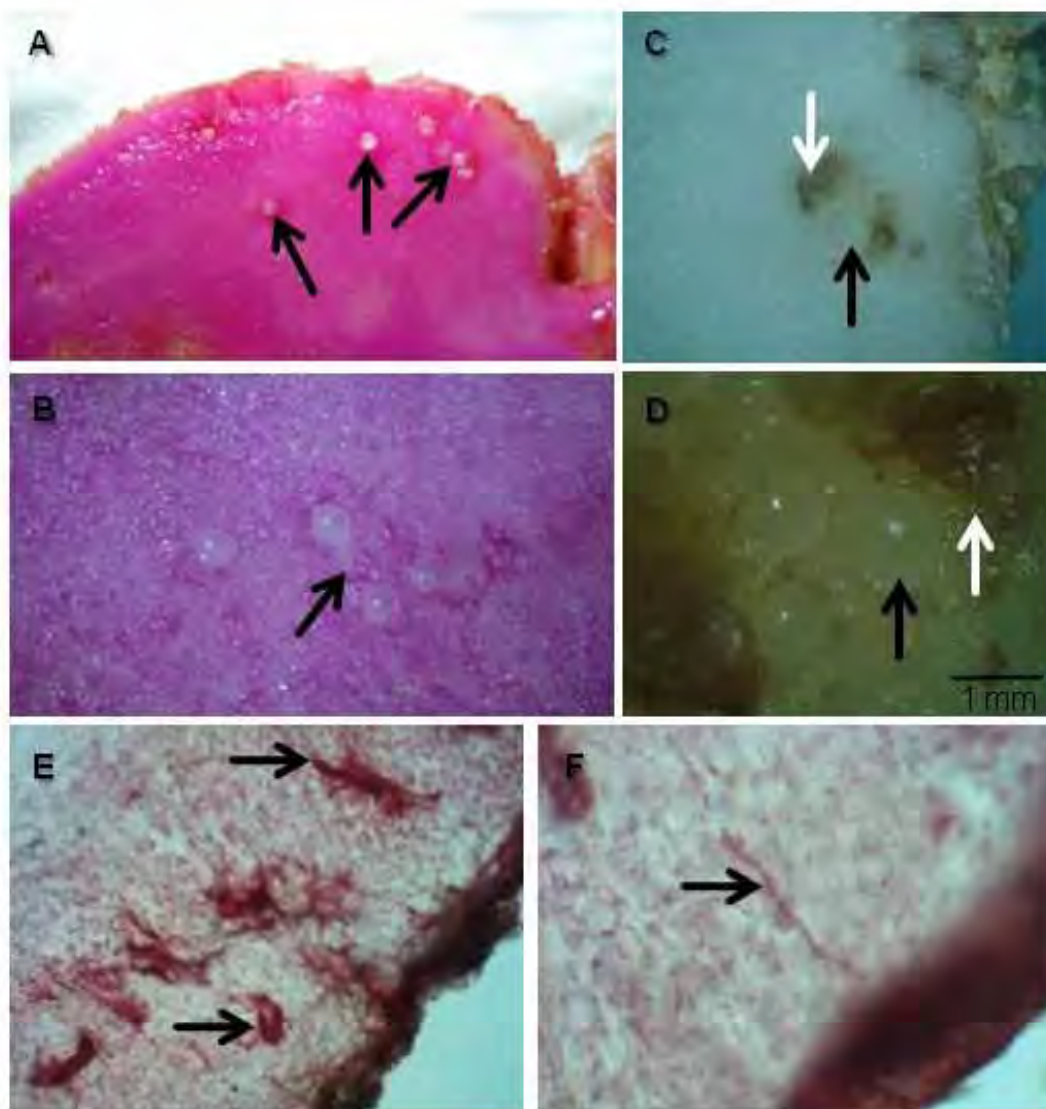


Figura 11. Fotomicrografias de cortes transversais de tubérculos infectados por *Meloidogyne* spp. A e B) Tubérculo colorido com fucsina ácida apresentando fêmeas maduras, esbranquiçadas em seus sítios de alimentação (seta); C e D) Tubérculo *in natura* apresentando pontuações escuras (seta branca) ao redor do corpo de fêmeas (seta preta); E e F) Fotomicrografia de um corte transversal (a mão livre) do tubérculo colorido com fucsina ácida, onde se pode observar fêmeas (vermelho) e um macho (seta), respectivamente. UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP. 2009.

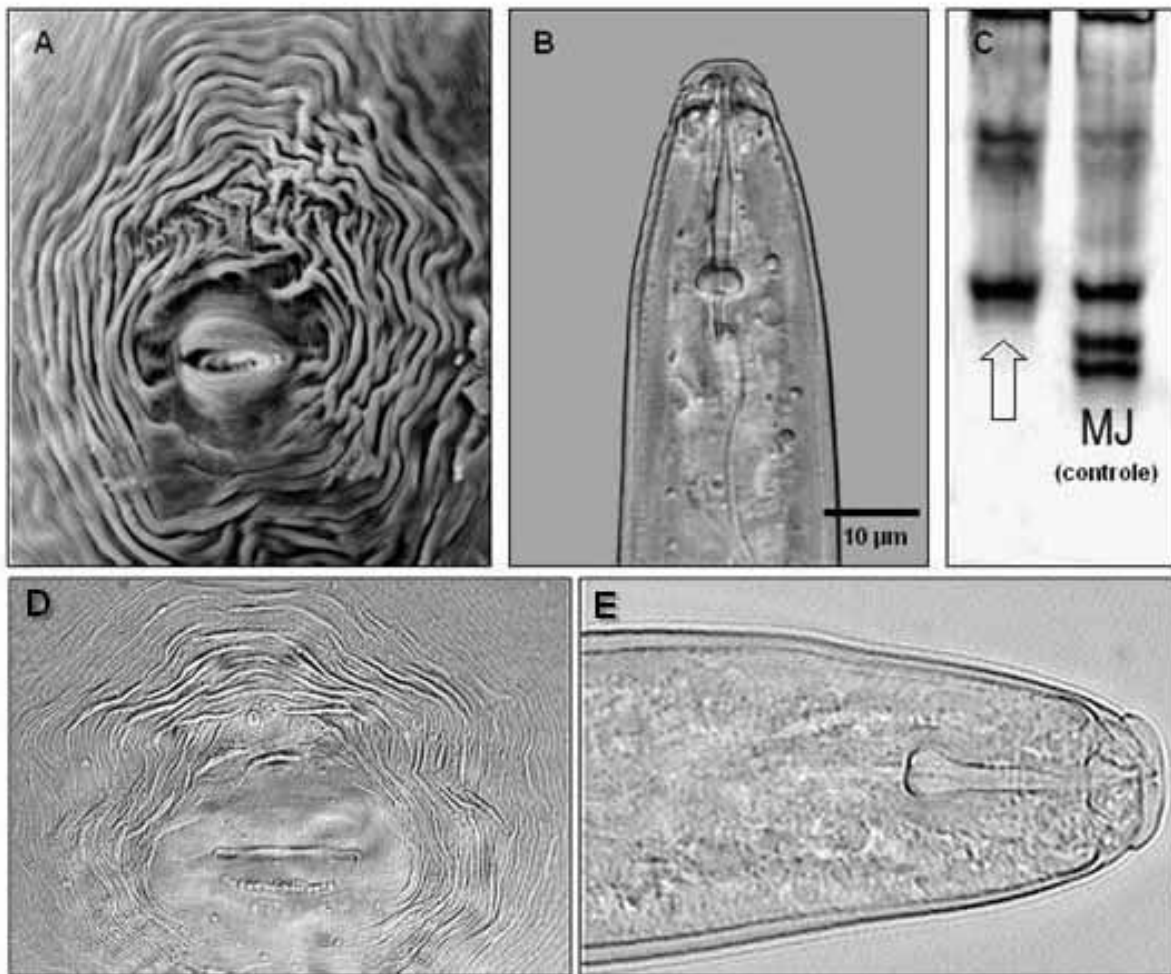


Figura 12. Subpopulações de *Meloidogyne incognita* (A, B e C) e *M. arenaria* (D e E). A) Eletromicrografia de varredura do padrão perineal da fêmea; B) Fotomicrografia da região labial do macho; C) Fenótipo isoenzimático para esterase com uma banda típica da espécie (seta), na altura da de menor mobilidade da de *M. javanica*; D) Fotomicrografia do padrão perineal da fêmea; E) Fotomicrografia da região labial do macho; MJ = *Meloidogyne javanica* como controle. UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP. 2009.

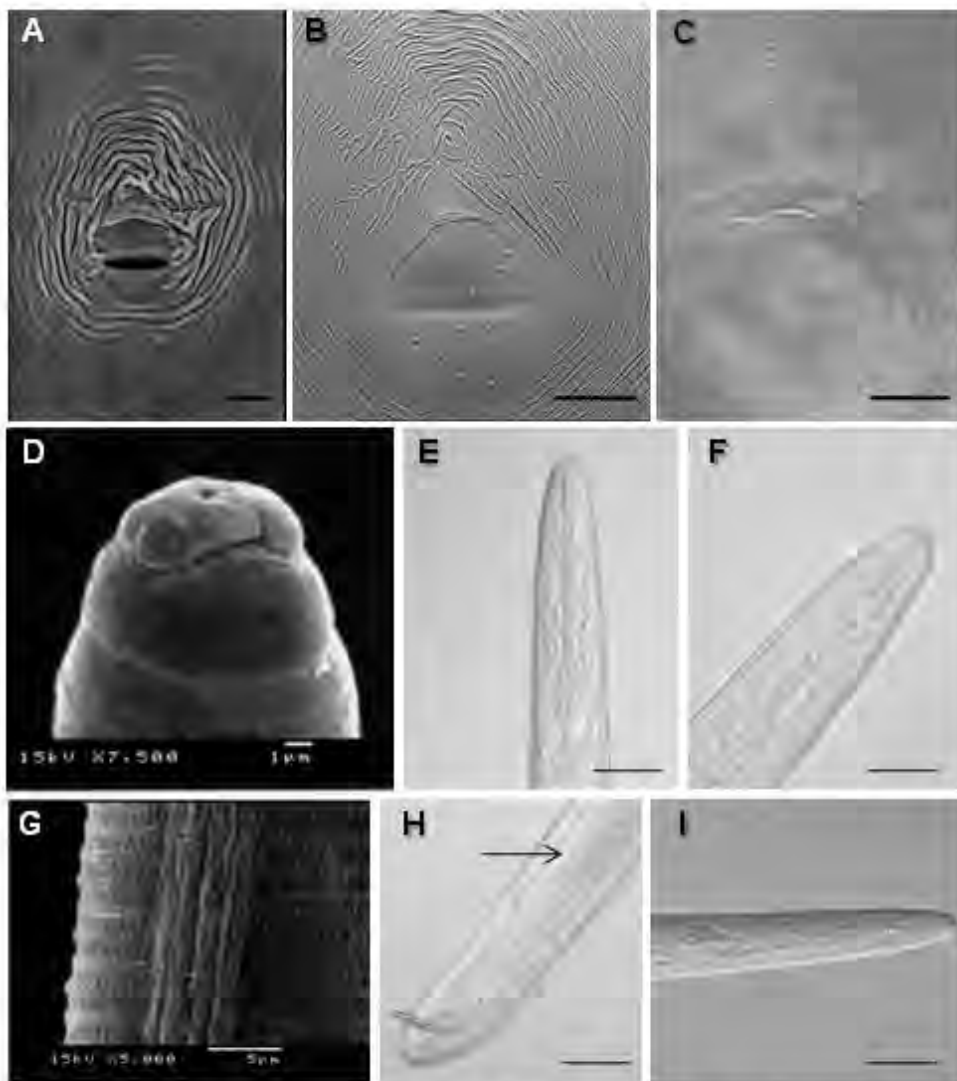


Figura 13. Eletromicrografia de varredura e fotomicrografia de espécimes pertencentes a subpopulação de *Meloidogyne javanica* coletada no Rio Grande do Sul, com fenótipo para esterase com 2 bandas (J2a). A, B e C) Eletromicrografia de varredura e fotomicrografia, respectivamente, da configuração perineal da fêmea (barra = 10 μm); D) Eletromicrografia de varredura da região labial do macho; E e F) Fotomicrografias da região labial do macho (barra = 13,5 μm); G) Eletromicrografia de varredura mostrando detalhes do campo lateral do macho; H) Fotomicrografia da região caudal do macho apresentando testículo com espermatozoides (seta) (barra = 13,5 μm); I) Fotomicrografia da região anterior de juvenil (barra = 13,5 μm). UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP. 2009.

podendo ser acompanhadas de rachaduras até grandes caroços coalescentes (Figura 13). As fêmeas de *Meloidogyne* spp. ficam imersas nos tecidos (Figuras 10 e 11).

Nas raízes da planta também são observadas numerosas galhas e massas de ovos dos fitonematóides (Figura 10).

Esses sintomas e sinais se aplicam a todas as espécies de fitonematóides de galha (*Meloidogyne* spp.). Os caracteres morfológicos e bioquímico que identificam *M. javanica* estão apresentados na Figura 15.

Os machos desses fitonematóides são vermiformes, migradores e não se alimentam. Sobrevivem das reservas de alimento em seus corpos, obtidas dos tecidos da planta quando estes eram juvenis (Figura 11F).

Uma subpopulação de *M. javanica* encontrada associada à batata no Rio Grande do Sul apresentou fenótipo para a esterase com duas bandas (Figura 15), correspondendo a banda de menor e a de maior mobilidade (fator de corrida de 27,7 e 36,1, respectivamente). Esse fenótipo atípico corresponde àquele relatado pela primeira vez em uma subpopulação de *M. javanica* encontrada associada à cultura de fumo, em um município da Província de Yunnan, China, por YU & CHEN (1998) e denominado de 'J2a', baseado na nomenclatura sugerida por ESBENSHADE & TRIANTAPHYLLOU (1985). Esse fenótipo foi assim denominado porque em 1994, TOMASZEWSKI et al. haviam usado a denominação 'J2' para designar outro fenótipo atípico para alfa esterase de uma subpopulação de *M. javanica* encontrada associada a cultura do amendoim nos EUA, também com duas bandas, porém com ausência da banda de maior mobilidade. Ambos os fenótipos diferem daquele denominado 'J3', que foi associado a alfa esterase de *M. javanica* em um levantamento realizado por ESBENSHADE & TRIANTAPHYLLOU (1985) compreendendo 46 subpopulações dessa espécie, provenientes de 27 países.

O fenótipo 'J2', caracterizado pela ausência da banda de maior mobilidade foi relatado no Brasil por CARNEIRO et al. (1996), CARNEIRO et al. (1998), CARNEIRO et al. (2000), CASTRO et al. (2003), COFCEWICZ et al. (2004) e OLIVEIRA et al. (2007) em subpopulações de *M. javanica* associadas a cultura do tomate, da soja e da banana provenientes de Paracatu-MG, Lagoa Grande-PE, Registro-SP e Janauba-MG,

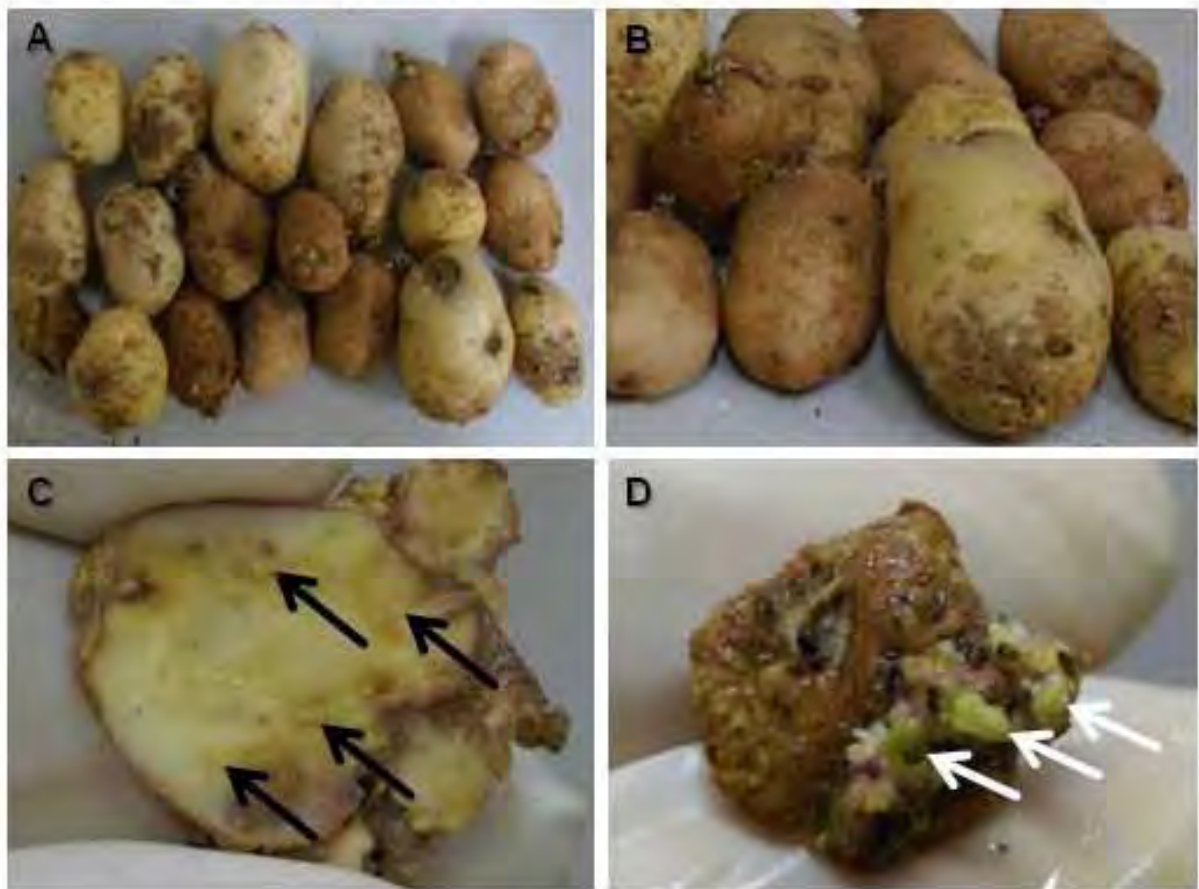


Figura 14. Qualidade sanitária de amostras de batata-semente com diferentes genótipos. A e B) Sintomas externos da infecção por *Meloidogyne* spp.; C) Corte longitudinal em um broto infectado por *Meloidogyne* spp. (setas denotam fêmeas maduras do fitonematóide); D) Vista externa da brotação (setas), sem sintoma visível da infecção. UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP, 2009.

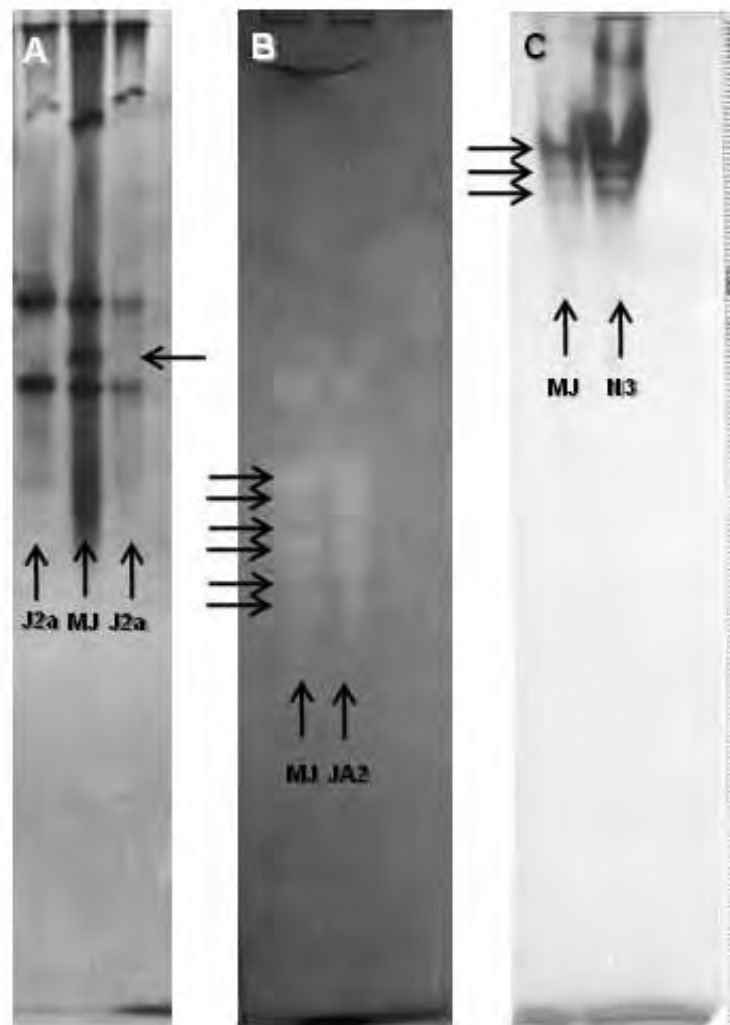


Figura 15. Eletroforese da subpopulação de *Meloidogyne javanica* associada à uma lavoura de batata no Estado do Rio Grande do Sul. A) Fenótipo para alfa esterase sem a banda de mobilidade intermediária característica de *M. javanica* (seta); B e C) Fenótipos idênticos àquele característico à *M. javanica*, para superóxido dismutase (JA2) e malato desidrogenase (N3), respectivamente (setas). UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP, 2009.

respectivamente, e a do quiabo proveniente de São João do Oriente-MG.

Já o fenótipo 'J2a', caracterizado pela ausência da banda de mobilidade intermediária, foi relatado no País em subpopulações de *M. javanica* associadas a lavouras de soja por CASTRO et al. (2003) e RIBEIRO (2005) em Rio Verde-GO e Tangará da Serra-MT, respectivamente, e a uma de banana em Cruz das Almas, BA por COFCEWICZ et al. (2004).

O consenso entre os autores que associaram os fenótipos 'J2' e 'J2a' a *M. javanica* é de que esses fenótipos atípicos apresentando somente 2 podem pertencer a subpopulações da espécie ou são resultados de condições especiais a que a espécie esta submetida. Segundo eles, fêmeas em má condição fisiológica implicam na ausência ou falta de resolução das bandas (TOMASZEWSKI et al., 1994; YU & CHEN, 1998; CARNEIRO et al., 1998; COFCEWICZ et al., 2004). Essa menor tolerância ao frio também pode ser relacionada ao estresse que poderia resultar na ausência de uma banda no fenótipo para esterase, devido à condição climática predominante no Rio Grande do Sul, de onde a amostra foi coletada (VAN GUNDY, 1985).

Os caracteres morfológicos que caracterizam os espécimes de *Pratylenchus* em diferentes estádios de desenvolvimento (machos são raríssimos) estão apresentados na Figura 16.

Esses fitonematóides penetram as camadas subepidermais causando lesões em forma de pontos necróticos deprimidos na casca dos tubérculos (Figura 17). Migram continuamente nos tecidos intra e intercelularmente e se reproduzem chegando a alcançar níveis de população maiores que 10.000 indivíduos em 10 g de cascas de batata com cerca de 3 mm de espessura (SILVA & SANTOS, 2007).

Nesses casos, geralmente, as lesões que se formam na superfície do tubérculo assumem um aspecto rugoso, semelhante àquele causado por outras doenças (sarna) e são invadidas por organismos secundários do solo, resultando em necroses nos tubérculos.

Os tubérculos infectados por *Pratylenchus* spp., quando armazenados, podem apodrecer em menor tempo que tubérculos sadios (SILVA & SANTOS, 2007).

As espécies *Globodera pallida* (Stone) Behrens e *G. rostochiensis* (Wollenweber) Behrens, reconhecidas como pragas devastadoras da cultura, apesar de estarem distribuídas em quase todas as regiões do mundo onde a batata é cultivada, inclusive sendo amplamente disseminadas nos Países da América do Sul que fazem divisa com o Brasil, não foram encontradas nesse levantamento nas regiões amostradas.

Também não foi encontrado o falso nematóide de galha *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne & Allen, é outro fitonematóides de grande importância. Embora de distribuição mais localizada, está presente em Países fronteiriços.

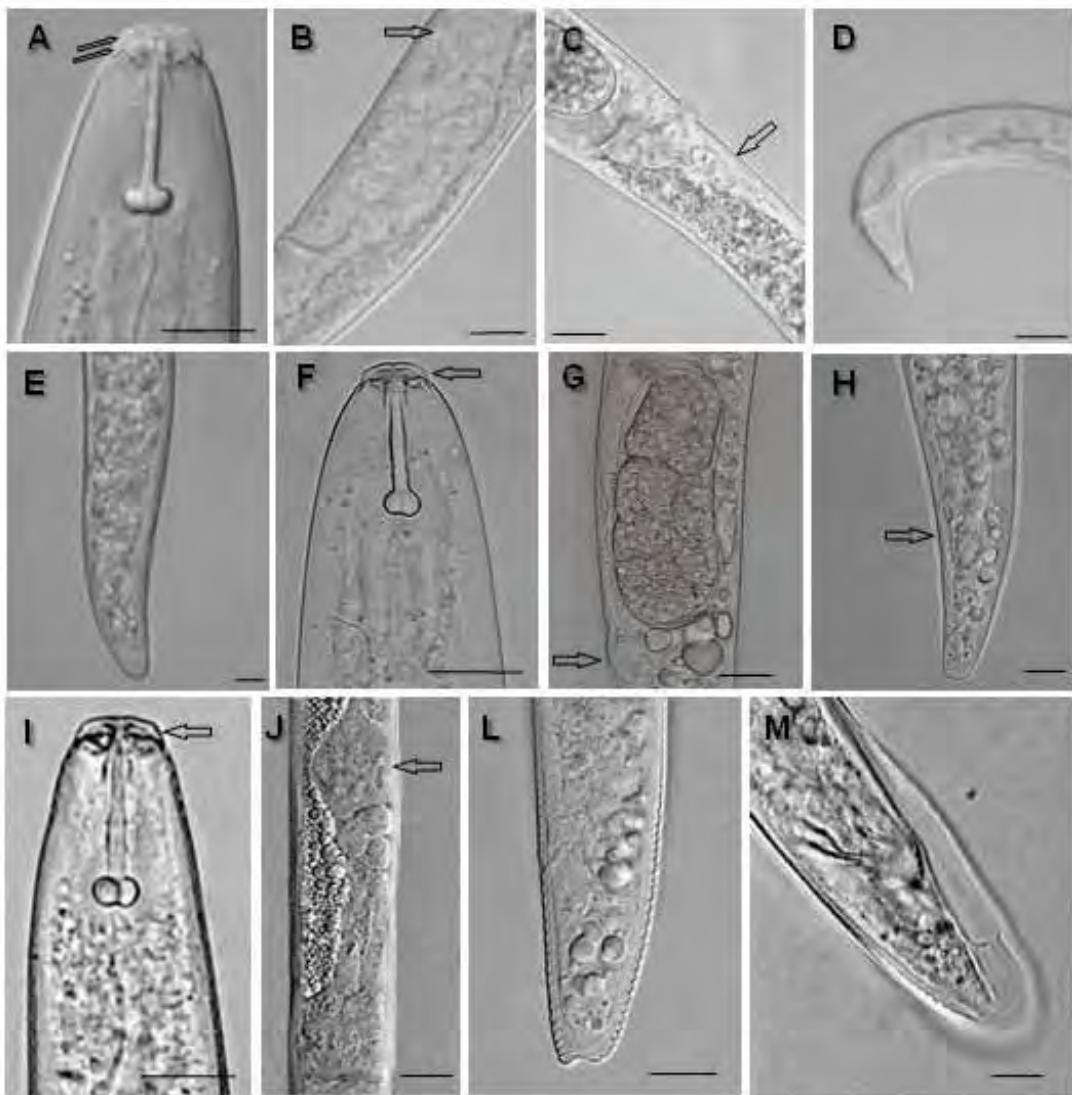


Figura 16. Fotomicrografias dos principais caracteres para a identificação de *Pratylenchus brachyurus* (F, G e H), *P. coffeae* (I, J, L e M) e *P. penetrans* (A, B, C, D e E). A) Região labial da fêmea com três anéis (setas); B) Espermateca funcional arredondada (seta); C) Saco pós uterino (seta); D e E) Região posterior do macho e da fêmea, respectivamente; F) Região labial da fêmea com dois anéis (seta); G) Vulva (seta) com ovo em estágio embrionário no interior do corpo; H) Região caudal; I) Região labial da fêmea com dois anéis (seta); J) Espermateca funcional ovalada (seta); L) Cauda truncada da fêmea; M) Região posterior do macho com bursa envolvendo toda a cauda. UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP. 2009.



Figura 17. Sintomas da infecção por *Pratylenchus* spp. em tubérculos coletados nas principais regiões produtoras de batata do Brasil, caracterizado por inúmeras pequenas pontuações necróticas, deprimidas, na superfície externa do tubérculo. UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP. 2009.

IV CONCLUSÕES

- ✓ Nas principais regiões produtoras de batata no Brasil ocorrem as seguintes espécies de fitonematóides: *Meloidogyne javanica* (presente em 50% do total de amostras), *M. incognita* (10%), *M. arenaria* (3,5%), *Pratylenchus brachyurus* (presente em 40% do total de amostras), *P. penetrans* (3%), *P. coffeae* (2,4%) e *Helicotylenchus dihystera* (presente em 49% do total de amostras);
- ✓ Os principais sintomas causados no tubérculo e nas raízes pelos fitonematóides de galha são caracterizados pela presença de caroços protuberantes, deixando a superfície com aspecto áspero. Estes podem coalescer, formando grandes galhas, contendo pelo menos uma fêmea madura com ovos;
- ✓ Os principais sintomas causados no tubérculo pelos fitonematóides das lesões radiculares são lesões em forma de pontos necróticos deprimidos na superfície dos tubérculos.

V REFERÊNCIAS

ABBA. História da batata. Disponível em: <<http://abbabatatabrasileira.com.br/2008/consuvidor/historia.asp>>. Acesso em: 09 ago. 2008.

AGRIANUAL 2008: **anúário da agricultura brasileira**. São Paulo: Agra FNP Pesquisas LTDA, 2008. 331 p.

BYRD Jr, D.W.; KIRKPATRICK, J.; BARKER, K.R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology**, v. 15, n. 1, p. 142-143. 1983.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, A.R.A.; CARNEIRO, R.G. Enzyme phenotypes of Brazilian isolates of *Meloidogyne* spp. **Fundamental and applied Nematology**, v. 19, n. 3, p. 555-560. 1996.

CARNEIRO, R.M.D.G.; CASTAGNONE-SERENO, P.; DICKSON, D.W. Variability among isolates of *Meloidogyne javanica* of Brazil. **Fundamental and applied Nematology**, v. 21, n. 2, p. 319-326. 1998.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. **Nematology**, v. 2, n. 6, p. 645-654. 2000.

CASTRO, J.M.C.E.; SOUZA, R.M.; CARNEIRO, R.M.D.C. Variabilidade isoenzimática de populações de *Meloidogyne* spp. proveniente de regiões brasileiras produtoras de soja. **Nematologia Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 1-12. 2003.

CHARCHAR, J.M. Nematóides fitoparasitas associados a cultura da batata nas principais regiões de produção do Brasil. **Nematologia Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 49-60. 1997.

CHARCHAR, J.M.; MOITA, A.W. Resistência de genótipos de batata a *Meloidogyne javanica*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 3, p. 535-540. 2001.

COBB, N.A. **Estimating the nema population of the soil, with special reference to the sugar-beet and root-gall nemas, *Heterodera schachtii* Schmidt and *Heterodera radiculicola* (Greef) Muller, and with a description of *Tylencholaimus aequalis* n. sp.** USDA, Agricultural Technology Circular, Bureau Plant Industry, United States Department of Agriculture, p. 1-48. 1918.

COFCEWICZ, E.T.; CARNEIRO, R.M.D.C.; CASTAGNONE-SERENO, P.; QUÉNÉHERVÉ, P. 2004. Enzyme phenotypes and genetic diversity of root-knot nematodes parasiting *Musa* in Brazil. **Nematology**, v. 6, p. 85-95.

COOLEN, W.A.; D'HERDE, C.J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue.** Ghent: State Agricultural Research Center, 1972. 77p.

DAYKIN, M.E.; HUSSEY, R.S. Staining and histopathological techniques in nematology. In: BARKER, K.R.; CARTER, C.C.; SASSER, J.N. **An advanced treatise on *Meloidogyne*.** Volume II. Methodology. International Meloidogyne Project. Raleigh, NC: North Carolina State University Graphics, 1985. p. 39-48.

EISENBACK, J.D. Preparation of nematodes for scanning electron microscopy. In: NICKLE, W.R. **Manual of agricultural nematology.** New York: Marcel Dekker, Inc., 1991. p. 87-96.

ESBENSHADE, P.R.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. Lawrence, **Journal of Nematology**, v. 17, p. 6-10. 1985.

HIRSCHMANN, H.H. The genus *Meloidogyne* and morphological characters differentiating its species. In: SASSER, J.N.; CARTER, CC. **An advanced treatise on *Meloidogyne*.** Volume I. Biology and control. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. p.79-93.

FERREIRA, M.D.; NETTO, L.H. Avaliação de processos nas linhas e classificação de batatas. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 279-285. 2007.

FINGER, F.L.; FONTES, P.C.R. Manejo pós-colheita da batata. **Informe agropecuário**, v. 20, p. 105-111. 1999.

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

OLIVEIRA, R.D.L.; SILVA, M.B.; AGUIAR, N.D.C.; BÉRGAMO, F.L.K.; COSTA, A.S.V.; PREZOTTI, L. Nematofauna associada à cultura do quiabo na região leste de Minas Gerais. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 88-93. 2007.

RIBEIRO, N.R. Variabilidade intraespecífica de *Meloidogyne javanica* (Nematoda: Meloidogyne) em soja no Brasil. Dissertação de Mestrado. 87 p. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Unesp. Jaboticabal, 2005.

SIDDIQI, M.R. *Helicotylenchus dihystera*. Commonwealth Agriculture Bureaux, C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes. Set 1, 9: 3 p. 1972.

SILVA, A.R.; SANTOS, J.M. **Nematóides na cultura da batata no Brasil**. Itapetininga: ABBA, 2007. 55 p.

SILVA, G.S.; SANTOS, J.M.; FERRAZ, S. Novo método de coloração de ootecas de *Meloidogyne* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 12. Dourados. **Resumos...** Dourados, MS, p. 7. 1988.

SILVA, A.R. Fitonematóides na cultura da batata: reação de genótipos a *Meloidogyne* spp., distribuição de espécies e caracterização dos sintomas. Tese de Doutorado. 95 p. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Unesp. Jaboticabal, 2009.

TAYLOR, D.P.; NETSCHER, C. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Nematropica**, v. 20, p. 268. 1974.

TOMASZEWSKI, E.K.; KHALIL, M.A.M.; EI-DEEB, A.A.; POWERS, T.O.; STARR, J.L. *Meloidogyne javanica* parasitic on peanut. **Journal of Nematology**, v. 26, n. 4, p. 436-441. 1994.

YOUNG, T.W. An incubation method for collecting migratory endoparasitic nematodes. **Plant Disease Reporter**, v. 38, n. 794-795. 1954.

YU, S.F.; CHEN, Y.F. Discovery of a new esterase phenotype in *Meloidogyne javanica*. **Biodiversity Science**, v. 6, n. 1, p. 27-30. 1998.

VAN GUNDY, S.D. Ecology of *Meloidogyne* spp. Emphasis on environmental factors affecting survival and pathogenicity. In: SASSER, J.N.; CARTER, C.C. **An advanced treatise on *Meloidogyne***. Volume I. Biology and control. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. p. 177-182.

VOVLAS, N.; MIFSUD, D.; LANDA, B.B.; CASTILLO, P. Pathogenicity of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on potato. **Plant Pathology**, v. 54, p. 657-664. 2005.