

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE ESPÉCIES DOS NEMATOIDE-DAS-GALHAS (*Meloidogyne* spp.) EM TABACO.

EDUARDO HELLER¹;
ESMAEL NEUSCHANK²; CIEL PAMELA MACHACA CALSIN³; LUCIANE
DOMINGUES SANTOLIN⁴; CESAR BAUER GOMES⁵;

¹Bolsista IC CNPq, Faem/UFPeI, Capão do Leão, RS; eduardok.heller@hotmail.com

²Bolsista IC FAPEG, Faem/UFPeI, Capão do Leão, RS; esmael.l.neuschrack@gmail.com

³PPGFS, Faem/UFPeI, Capão do Leão, RS; machacacalsinpamela@gmail.com

⁴Universal Leaf Tabacos Ltda, Santa Cruz do Sul-RS; lsantoli@unileaf.com.br

⁵Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS – cbauergbr@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de tabaco (*Nicotiana* spp.) e líder em exportações, destacando-se pelo crescimento de área plantada e produção total em níveis superiores aos maiores produtores globais nas últimas décadas, empregando diretamente 678.440 pessoas (SINDITABACO; AFUBRA 2018).

Assim como outras culturas, o tabaco vem de uma estreita base genética, possuindo uma evolução significativa apenas fenotipicamente (SANTOS, 2002), o que pode favorecer diversos patógenos, dentre eles os fitonematoides.

Os nematoides–das- galhas (*Meloidogyne* spp.) estão entre os patógenos de solo mais destrutivos em todo o mundo, possuem uma ampla variedade de hospedeiros e causam consideráveis perdas em diferentes espécies de plantas cultivadas (ZHANG *et al.*, 2013). Esses patógenos penetram no sistema radicular das plantas e estabelecem sítios de alimentação, induzindo a formação de células gigantes, e, logo após, engrossamentos denominados de galhas. O parasitismo das raízes por tais organismos afeta diretamente a absorção de água e nutrientes diminuindo significativamente o rendimento e qualidade das culturas (NAZ *et al.*, 2013).

Para tomada de decisão quanto ao manejo de nematoides a ser adotado, o primeiro passo é a identificação ao nível de espécie desses fitoparasitas. Várias espécies de nematoides parasitas de plantas já foram relatadas em associação ao tabaco (JOHNSON *et al.*, 2005). No entanto, mesmo a fumicultura sendo considerada de grande importância social no Brasil, poucos estudos nematológicos foram realizados além daquele conduzido por ARAUJO-FILHO (2012).

Considerando a importância econômica que a fumicultura representa para o Rio Grande do Sul e o Brasil, e, a necessidade de estudos sobre a diversidade de espécies de *Meloidogyne* no tabaco., objetivou-se nesse trabalho, caracterizar bioquimicamente espécies de *Meloidogyne* que ocorrem em amostras de fumo provenientes de lavouras infestadas pelo patógeno.

2. METODOLOGIA

Amostras de fumo de lavouras com plantas exibindo raízes com galhas nas raízes, provenientes de Candelária-RS, foram encaminhadas ao laboratório de Fitopatologia/Nematologia da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS para identificação das respectivas espécies. A identificação das espécies do nematoide-das-galhas foi realizada por eletroforese utilizando-se a isoenzima

esterase (Est) em gel de poliacrilamida 7% (CARNEIRO; ALMEIDA 2001). Para isso, 20 fêmeas de coloração branco-leitosa de *Meloidogyne* sp. foram extraídas individualmente das raízes de cada amostra com o auxílio de um estilete, sob microscópio estereoscópico, e, a seguir, transferidas para tubos microhematócrito, contendo 3 µL do tampão de extração (Sacarose/Triton X-100). Logo após, as fêmeas foram maceradas com um bastão de aço de extremidade arredondada, sendo o extrato obtido de cada subamostra, aplicado com o auxílio de uma seringa (Hamilton) sobre papel Whatman 3 mm (1,5 x 4,0 mm) em placa de porcelana, e, a seguir, transferido para a respectiva cavidade do gel de poliacrilamida. Extratos proteicos de fêmeas de *M. javanica* foram incluídos em cada gel como fenótipo padrão para a caracterização da esterase. Gotas de azul bromofenol (0,1%) foram colocadas nas extremidades do gel, para acompanhamento da migração, que seguiu a voltagem de 120V, em temperatura média de 4 °C por 2 horas. Os padrões de bandas no gel de poliacrilamida foram obtidos com a imersão do gel em soluções reveladoras específicas para a isoenzima esterase (α -naftilacetato, Fast Blue RR Salt e tampão fosfato de sódio) preparadas no momento do uso.

Logo após, o material foi levado à incubação onde permaneceu em estufa a 37°C por 30 minutos, até que as bandas esterásticas aparecessem em fundo claro. Os mesmos foram lavados em água corrente e fixados em solução (água destilada, álcool metílico e ácido acético) na proporção (5:5:1) (v/v) por 30 minutos. Em seguida, o gel foi disposto entre duas folhas de papel celofane, e seco a temperatura ambiente. A identificação dos fenótipos de cada amostra foi realizada através do cálculo da mobilidade relativa (R_m) de cada banda em relação ao padrão. Os fenótipos de esterase identificados foram designados pelas letras sugestiva do nome da espécie, acompanhados de um número que indica o número de bandas obtido, e também realizada a frequência de ocorrência de espécies de *Meloidogyne* em cada amostra (ESBENSHADE; TRIANTAPHYLLOU, 1985, 1990; CARNEIRO; ALMEIDA, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da revelação dos geis, foi possível identificar as espécies *Meloidogyne incognita* (KOFOID & WHITE, 1919), com os fenótipos esterásticos I1 (R_m : 0,97) e I2 (R_m : 1,05, 1,15), *Meloidogyne arenaria* (NEAL, 1889) (R_m : 1,19, 1,28) com o fenótipo A2 e *Meloidogyne konaensis* (EISENBACK; BERNARD; SCHMITT, 1994) com os fenótipos esterásticos K3 (R_m : 1,06, 1,22, 1,31) nas amostras de fumo, conforme observado na tabela 1.

De acordo com os resultados (tabela 1), nota-se que houve mistura de espécies em todas as amostras analisadas. Na amostra 1, 35,7 % das bandas esterásticas resultaram em *M. arenaria* (Est. A2) com predominância de *M. konaensis* (Est. K3) com 64,35% das bandas. Para amostra 2 obteve-se 18,75% de *M. incognita* (Est. I2), 37,5% de *M. konaensis* (Est. K3) com predominância de *M. incognita* (Est. I1) com 43,8% das bandas. Já para a amostra 3, *M. arenaria* (Est. A2) constituiu 20% das bandas, *M. konaensis* (Est. K3) também 20%, e com predominância de *M. incognita* (Est. I2) com 60%.

Meloidogyne incognita e *M. arenaria* são relatados frequentemente na cultura (ARAUJO-FILHO, 2012). No entanto, o fenótipo K3 com três bandas (R_m : 1,06, 1,22, 1,31) foi o mais comum encontrado nas amostras analisadas no presente estudo. O padrão de esterase K3 é único e específico da espécie, com três bandas principais (R_m : 1,0, 1,17, 1,27) (CARNEIRO et al., 2000). Nesse

sentido,tudo indica que tal fenótipo esterástico identificado seja correspondente a espécie *M. konaensis*, cuja mobilidade relativa (Rm) encontrada possui coerência com os estudos realizados por (EISENBACK; BERNARD; SCHMITT, 1994), e, complementarmente por(MONTEIRO et al. (2016) ao detectar o nematoide em três culturas e uma espécie de planta daninha em quatro localidades do Estado do Ceará. Dessa forma, relatando-se, pela primeira vez em fumo o fenótipo esterástico K3, típico de *M. konaensis*, no Brasil. No entanto, Sabendo-se que a indetificação precisa de um patógeno requer o emprego da taxonomia integrativa, estudos morfológicos, morfométricos e moleculares com tais populações precisam ser feitos para confirmação da referida espécie.

Tabela 1 - Fenótipos isoenzimáticos de esterase e suas respectivas percentagens de ocorrência associados a amostras de raízes de fumo infectadas pelo nematoide das galhas.

Amostra	Meloidogyne spp./ Fenótipo de esterase	Ocorrência (%)
1	<i>M. arenaria</i> (Est A2)	35,7
	<i>M. konaensis</i> (Est. K3)	64,3
2	<i>M. incognita</i> (Est. I2)	18,7
	<i>M. incognita</i> (Est. I1)	43,8
	<i>M. konaensis</i> (Est. K3)	37,5
3	<i>M. incognita</i> (Est. I2)	60
	<i>M. arenaria</i> (Est. A2)	20
	<i>M. konaensis</i> (Est. K3)	20

4. CONCLUSÕES

Diferentes espécies de *Meloidogyne* parasitam a cultura do tabaco. Uma população atípica (Est. k3) detectada pela enzima esterase, ocorre em tabaco, no Rio Grande do Sul.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFUBRA. **Associação dos fumicultores do Brasil**. Acessado em 01 set. 2019. Online. Disponível em: <https://afubra.com.br/fumicultura-brasil.html>
- ALMEIDA, M. R. et al. Diversity of *Meloidogyne arenaria* using morphological, cytological and molecular approaches. **Nematology**, v. 10, n. 6, p. 819-834, 2008.
- ARAUJO FILHO, J. V. D. **Meloidoginoses da cultura do tabaco: identificação de espécies, caracterização de isolados e reação de genótipos de Nicotiana spp. a Meloidogyne enterolobii**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides das galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**. v.25, n.1, p.35-44, 2001.
- CARNEIRO,R.M.D.G.;ALMEIDA,M.R.A.; &QUÉNÉHERVÉ,P. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. **Nematology** 2, p. 645-654, 2000.
- EISENBACK, J. D.; BERNARD, E. C.; SCHMITT, D. P. Description of the Kona

- Coffee Root-knot Nematode, *Meloidogyne konaensis* n. sp. **Journal of Nematology**, v. 26, n. 4, p. 363, 1994.
- ESBENSHADE, P.R. & A.C. TRIANTAPHYLLOU. Use of enzyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, v.17, n.1, p.6–20, 1985.
- ESBENSHADE, P.R. & A.C. TRIANTAPHYLLOU. Isozyme phenotypes for the identifications of *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, v.22, n. 1, p.10–15, 1990.
- EISENBACK, J. D.; BERNARD, E. C.; SCHMITT, D. P. Description of the Kona coffee root-knot nematode, *Meloidogyne konaensis* n.sp. **Journal of Nematology**, v. 26, n. 4, p. 363–374, 1994.
- JOHNSON C. S. et al. Nematodes parasites of tobacco. **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**, p. 675–708, 2005.
- KOFOID, C. A.; WHITE, W.A. A new nematode infection in man. J. Amer. Med. Assoc., 72: 567-569, 1919.
- MONTEIRO, J. M. S. et al. First report of, and additional information on, *Meloidogyne konaensis* (Nematoda: Meloidogyninae) parasitising various crops in Brazil. **Nematology**, v. 18, n. 7, p. 831–844, 2016.
- NAZ, I. et al. In vitro and in planta nematocidal activity of *fumaria parviflora* (fumariaceae) against the southern root-knot nematode *meloidogyne incognita*. **Plant Pathology**, v. 62, n. 4, p. 943–952, 2013.
- NEAL, J. C. et al. The root-knot disease of the peach, orange and other plants in Florida due to the work of *Anguillula*. **Bulletin US Bureau of Entomology**, n. 20, 1889.
- SINDITABACO. **Sindicato interestadual da indústria do tabaco**. Acessado em 25 ago. 2019. Online. Disponível em: <http://www.sinditabaco.com.br/sobre-o-setor/relevancia-do-setor-de-tabaco/>
- ZHANG, H. et al. Long non-coding genes implicated in response to stripe rust pathogen stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 11, p. 6245–6253, 2013.