

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

EDUARDO HELLER<sup>1</sup>;  
ESMAEL NEUSCHANK<sup>2</sup>; CIEL PAMELA MACHACA CALSIN<sup>3</sup>; LUCIANE  
DOMINGUES SANTOLIN<sup>4</sup>; CESAR BAUER GOMES<sup>5</sup>;

<sup>1</sup>Bolsista IC CNPq, Faem/UFPeI, Capão do Leão, RS; [eduardok.heller@hotmail.com](mailto:eduardok.heller@hotmail.com)

<sup>2</sup>Bolsista IC FAPEG, Faem/UFPeI, Capão do Leão, RS; [esmael.l.neuschrack@gmail.com](mailto:esmael.l.neuschrack@gmail.com)

<sup>3</sup>PPGFS, Faem/UFPeI, Capão do Leão, RS; [machacacalsinpamela@gmail.com](mailto:machacacalsinpamela@gmail.com)

<sup>4</sup>Universal Leaf Tabacos Ltda, Santa Cruz do Sul-RS; [lsantoli@unileaf.com.br](mailto:lsantoli@unileaf.com.br)

<sup>5</sup>Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS – [cbauergbr@gmail.com](mailto: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 fumicultra 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 da 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  $\mu$ L 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 ( $\alpha$ -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 (Rm) 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 (Rm: 0,97) e I2 (Rm: 1,05, 1,15), *Meloidogyne arenaria* (NEAL, 1889) (Rm: 1,19, 1,28) com o fenótipo A2 e *Meloidogyne konaensis* (EISENBACK; BERNARD; SCHMITT, 1994) com os fenótipos esterásticos K3 (Rm: 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 (Rm: 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 (Rm: 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.