UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Márcia Gabriel

ESPECTRO DE AÇÃO DO GENE MI-1.2 A *Meloidogyne* spp. E ESTUDO DE POPULAÇÕES VIRULENTAS E AVIRULENTAS EM TOMATEIRO: CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA INTERAÇÃO PLANTA-NEMATOIDE.

Santa Maria - RS

2020

Márcia Gabriel

ESPECTRO DE AÇÃO DO GENE MI-1.2 A *Meloidogyne* spp. E ESTUDO DE POPULAÇÕES VIRULENTAS E AVIRULENTAS EM TOMATEIRO: CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA INTERAÇÃO PLANTA-NEMATOIDE.

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM/RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Agronomia.**

Orientadora: Dra. Marlove Fátima Brião Muniz

Santa Maria- RS

2020

Gabriel, Márcia
ESPECTRO DE AÇÃO DO GENE MI-1.2 A Meloidogyne spp. E ESTUDO DE POPULAÇÕES VIRULENTAS E AVIRULENTAS EM TOMATEIRO: CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA INTERAÇÃO PLANTA-NEMATOIDE. / Márcia Gabriel.- 2020.
140 p.; 30 cm

Orientadora: Marlove Fátima Brião Muniz
Coorientadores: Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro, Alessandro Dal Col Lúcio
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Agronomia, RS, 2020

1. Solanum lycopersicum 2. Quebra de resistência 3. Suscetibilidade 4. Nematoide-das-galhas I. Brião Muniz, Marlove Fátima II. Dechechi Gomes Carneiro, Regina Maria III. Dal Col Lúcio, Alessandro IV. Título.

© 2020

Todos os direitos autorais reservados a Márcia Gabriel. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediente a citação da fonte.
Endreço: Av. Roraima nº 1000 Cidade Universitária Bairro - Camobi, Santa Maria - RS, 97105-900- Santa Maria, RS, Brasil. Endereço eletrônico: gabriel.marcia@gmail.com

Márcia Gabriel

"ESPECTRO DE AÇÃO DO GENE *Mi*-1.2 A *Meloidogyne* spp. E ESTUDO DE POPULAÇÕES VIRULENTAS E AVIRULENTAS EM TOMATEIRO: CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA INTERAÇÃO PLANTA-NEMATOIDE."

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM/RS), como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Aprovada em 19 de agosto de 2020

Drª. Marlove Fátima Brião Muniz
(Presidente/ Orientadora)

Dr. Leonardo Silva Boiteux (Embrapa)

Dr. Jadir Borges Pinheiro (Embrapa)

Drª. Stela Maris Kuiczynski (UFSM)

Dr. Jansen Rodrigo Pereira Santos (UFSM)

Santa Maria – RS
2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, que sempre esteve presente iluminando meu caminho e dando-me a sabedoria necessária para realizar os meus sonhos, e aos meus pais, Avelino e Ivanir, que me ensinaram desde a infância princípios e reais valores da vida. Que sempre me incentivaram a ir atrás dos meus sonhos e realizá-los.

AGRADECIMENTOS

A vida é cheia de momentos especiais, momentos estes que só tem esse caráter pelas pessoas inseridas nesse contexto e que dão sentido a uma caminhada. Essas pessoas merecem meu reconhecimento e apreço em momento tão especial de minha vida.

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e inigualável amor, obrigada por mais essa etapa vencida e por todas as pessoas maravilhosas que colocaste em meu caminho. Gratidão a ti!

À toda a minha família, especialmente meus pais, pelo incentivo, por acreditarem em mim e por, principalmente acreditarem que este dia chegaria! Obrigado pelo amor, amizade e torcida, apesar de nem sempre concordarem com as minhas escolhas!

Àprofessora orientadora Dra. Marlove Fatima Brião Muniz pelo apoio, confiança, orientação, acolhimento na Universidade de Santa Maria e ensinamentos proporcionados.

À Pesquisadora orientadora Dra. Regina Carneiro pela orientação, incentivo, conhecimentos transmitidos e apoio constante na realização deste trabalho. Em especial, agradeço imensamente por ter acreditado em mim e me proporcionado todo o crescimento profissional adquirido até hoje. Muito obrigada!

À professora Dra. Stela Maris Kulczynski por me apoiar e estar sempre disposta a contribuir para meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço profundamente.

As minhas eternas amigas de longa jornada, Vanessinha, Marcilene, Daniela Aguiar, Daniela Stefanello, Raycenne, Ana Cristina, Janaina, Jessica e Clair pelo apoio e amizade todo esse tempo. Obrigado por proporcionarem momentos de descontração, por todo carinho, amizade e torcerem por mim. Muito obrigada!

Aos companheiros de laboratório da Embrapa CENARGEN e UFSM, que direta ou indiretamente, contribuíram na realização dos trabalhos, por todas as ajudas e contribuições no desenvolvimento dos mesmos, Vanessa, Marcilene, Raycenne, William, Caio, Ana Cristina, Janaina, Jessica, Lucas, Clair, Maria Neves, Vinicius, Tales. Obrigado pela amizade e parceria. Foi um enorme prazer trabalhar com vocês, e que nossa sintonia e amizade continue assim! Obrigada por tudo!

Ao meu namorado, Arnaldo, por me apoiar e estar do meu lado sempre. Amo você!

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade e à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Cenargen pela realização dos trabalhos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Enfim, a todas aquelas pessoas que mesmo não mencionadas torceram e participaram, de alguma forma nessa trajetória. Agradeço.

A todos vocês, MUITO OBRIGADA.

"...Nossa vida é tão entrelaçada com a de outros, que ninguém é capaz de conseguir o sucesso por si mesmo. Praticamente tudo o que sabemos, aprendemos de outros. Quase tudo o que fazemos está construído sobre o fundamento colocado por outros."

(Alf Lohne)

RESUMO

ESPECTRO DE AÇÃO DO GENE *Mi*-1.2 A *Meloidogyne* spp. E ESTUDO DE POPULAÇÕES VIRULENTAS E AVIRULENTAS EM TOMATEIRO: CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA INTERAÇÃO PLANTA-NEMATOIDE.

AUTOR: Márcia Gabriel
ORIENTAÇÃO: Marlove Fátima Brião Muniz e Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro

A cultura do tomateiro é afetada por diferentes patógenos, entre eles os nematoides das galhas (gênero *Meloidogyne*) que apresentam uma distribuição geográfica ampla, alta capacidade reprodutiva no tomateiro e causam grandes danos à cultura com perdas variando de 25-100%. Entre os métodos de controle de espécies de *Meloidogyne* em tomateiro, o emprego de cultivares e porta-enxertos com resistência genética é a mais eficiente das medidas preconizadas uma vez que não exige mudanças drásticas no manejo da cultura e apresenta um baixo impacto ambiental no controle desse endoparasita. A presente Tese teve como objetivo geral estudar o espectro de resistência do gene *Mi*-1.2 contra uma amapla gama de espécies de *Meloidogyne* e confirmar uma possível suplantação da resistência desse gene por uma população de *Meloidogyne* obtida na Rio Grande do Sul. Outros objetivos foram os de estimar os efeitos da dosagem alélica do gene *Mi*-1.2 em sete porta–enxertos de tomateiro e avaliar a reação contra populações de *Meloidogyne* de um acesso da espécie *Solanun arcanum* contendo o gene *Mi*-9. As interações entre o porta-enxerto 'Guardião' (contendo o gene *Mi*-1.2) e duas populações de *M. javanica* virulentas e avirulentas também foram caracterizadas via análise histológica. Os experimentos foram realizados em laboratório e casa de vegetação. No primeiro estudo, a resistência conferida pelo gene/*locus* *Mi*-1.2 foi avaliada em populações de 15 espécies de *Meloidogyne* ocorrentes no Brasil, empregando cultivares de tomateiro Santa Clara (homozigoto suscetível) e Debora Plus (heterozigoto resistente). Além das espécies *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria*, a resistência mediada pelo gene *Mi*-1.2 se mostrou também efetiva para: *M. ethiopica*, *M. exigua*, *M. hispanica*, *M. inornata*, *M. izalcoensis*, *M. konaensis*, *M. luci*, *M. morocciensis*, *M. paranaensis* e *M. petuniae*. Os resultatos também confirmaram que o gene *Mi*-1.2 nãoe é efetivo contra *M. enterolobii* e *M. hapla*. No segundo estudo, através da caracterização bioquímica da α-esterase, do padrão perineal e teste de patogenicidade em porta-enxerto resistente 'Guardião', foi possível identificar, pela primeira vez no país, uma população de *M. javanica* virulenta ao gene *Mi*-1.2 em área de produção no Rio Grande do Sul. No terceiro estudo, sete porta-enxertos de tomateiro caracterizados pela técnica de PCR como homozigotos ou heterozigotos para o gene *Mi*-1.2, quando inoculados com populações avirulentas e virulentas de *Meloidogyne* spp., mostraram que a dosagem de alelos *Mi*-1.2 está associada à redução do fator de reprodução (FR) apenas em resposta a populações avirulentas. Além disso, a variabilidade observada nos valores do FR das populações avirulentas de *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* detectadas dentro das condições alélicas *Mi*-1.2, indica um efeito de dosagem do gene, bem como uma influência do fundo genético da cultivar/acesso. No estudo dos mecanismos de resistência/incompatibilidade (= populações de *Meloidogyne* avirulentas) e suscetibilidade/compatibilidade (= população de *Meloidogyne* virulentas), os juvenis do segundo estádio (J2) da população de *M. javanica* virulenta penetraram, sofreram três ecdises e completaram o ciclo se desenvolvendo em adultos férteis de maneira similar nos dois genótipos contrastantes (suscetível e resistente), enquanto que na população avirulenta de *M. javanica*, poucos J2s conseguiram penetrar no genótipo resistente e foi visualizada morte celular e reação de hipersensibilidade nos sítios da infecção do nematoide. No quarto estudo, envolvendo a avaliação de um novo gene de resistência (*Mi*-9), os resultados indicaram resistência contra populações de *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* avirulentas em relação ao gene *Mi*-1.2 e suscetibilidade contra populações de *M. enterolobii* e de *M. javanica* virulenta ao gene *Mi*-1.2, indicando que a resistência mediada pelo gene *Mi*-9 não difere inteiramente da controlada pelo gene *Mi*-1.2 em temperaturas de 25-28ºC. Esses resultados mostram que a busca contínua por novas fontes de resistência é indispensável, uma vez que plantas com resistência a *M. enterolobii* e a populações de *M. javanica* virulentas ao gene *Mi*-1.2 ainda não foram identificadas.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*, Quebra de resistência, Suscetibilidade, Nematoide-das-galhas.

ABSTRACT

ACTION SPECTRUM OF *Mi*-1.2 GENE TOWARD *Meloidogyne* spp. AND STUDY OF THE RESISTANCE OF VIRULENT AND AVIRULENT POPULATIONS IN TOMATO: HISTOPATHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF PLANT-NEMATODE INTERACTION.

AUTOR: Márcia Gabriel
ORIENTAÇÃO: Marlove Fátima Brião Muniz e Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro

The tomato crop is parasitized by different pathogens, among them Root-knot nematodes (RKN), genus *Meloidogyne*, which have a wide geographical distribution, high reproductive capacity and cause great damage to the tomato crop, with losses ranging from 25-100%. Among the control methods against *Meloidogyne* spp., genetic resistance, with the use of resistant tomato cultivars and rootstocks, is the most efficient and recommended measure, in addition to not requiring a drastic change in crop management and to causing less environmental impact in the control of this endoparasite. The present thesis has as its general objective the study of the resistance spectrum of the *Mi*-1.2 gene and a possible suppression in tomato rootstocks of this gene's resistance to *Meloidogyne* spp. in Rio Grande do Sul. It also aims to measure the resistance of seven tomato rootstocks with the *Mi*-1.2 gene and evaluate the reaction of a plant of the species *Solanun arcanum*, with *Mi*-9 gene *Meloidogyne* spp. populations, furthermore characterizing histologically the interaction between the rootstock - 'Guardião' and two populations of *M. javanica* (virulent and avirulent). The experiments were carried out in laboratory and greenhouse facilities. In the first study, the resistance conferred by the *Mi*-1.2 gene/locus was evaluated in populations of 15 *Meloidogyne* species occurring in Brazil, using tomato cultivars Santa Clara (susceptible homozygote) and Debora Plus (resistant heterozygote). Thus, it was possible to verify that in addition to the species *M. javanica, M. incognita* and *M. arenaria,* resistance mediated by the *Mi*-1.2 gene was also effective for *M. ethiopica*, *M. exigua*, *M. hispanica*, *M. inornata*, *M izalcoensis*, *M. konaensis*, *M. luci*, *M. morocciensis*, *M. paranaensis* and *M. petuniae* and ineffective for *M. enterolobii* and *M. hapla*. In the second study, through the biochemical characterization of α-esterase, the perineal pattern and pathogenicity test in a resistant rootstock, it was possible to identify a virulent population of *M. javanica,* infecting the root system of 'Guardião' rootstock, in a production area of tomato in Rio Grande do Sul. In the third study, seven tomato rootstocks characterized by PCR technique as homozygous and heterozygous at the *Mi* locus, when inoculated with avirulent and virulent populations of *Meloidogyne* spp., showed that the dosage of *Mi* alleles is associated with a reduced reproductive factor (RF), only for avirulent populations. Besides that, the variability observed in the RF values of *M. javanica*, *M. incognita* and *M. arenaria* avirulent populations, within the *Mi*-1.2 allelic conditions, indicates a gene dosing effect, as well as influence from the genetic background of the plant. In the study of the mechanisms of resistance (avirulent populations) and susceptibility (virulent populations), the second-stage juveniles (J2) of *M. javanica* virulent population penetrated, underwent three moults and completed the cycle developing in fertile adults, equally in both genotypes (susceptible and resistant), while for the avirulent population of *M. javanica*, few J2s managed to penetrate the resistant genotype, and cell death and hypersensitivity reaction were visualized at the nematode infection site. In the fourth study, when evaluating the resistance of a new *Mi*-9 resistance gene, the results indicated resistance of the gene to *M. javanica*, *M. incognita* and *M. arenaria* populations. They also indicated susceptibility with population reduction for *M. enterolobii* and virulent *Mi*-1.2 of *M. javanica*, indicating that the resistance mediated by the *Mi*-9 gene does not differ completely from the *Mi*-1.2 gene at a temperature of 25-28ºC. These results show that the continuous search for new sources of resistance is indispensable, since plants with resistance to *M. enterolobii* and virulent *Mi*-1.2 RKN populations have not yet been found.

Keywords: *Solanum lycopersicum*, Resistance breakdown, Susceptibility, Root-knot nematode

LISTAS DE ILUSTRAÇÔES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Ciclo de vida do nematoide das galhas em raízes do tomateiro. Fonte: Pereira, Ricardo. Adaptado de Agrios (2005).....26

CAPITULO I

REAÇÃO DE UM HÍBRIDO HETEROZIGOTO DE TOMATEIRO PORTADOR DO GENE *Mi*-1.2 A 15 ESPÉCIES DE *Meloidogyne.*

Figura 1. Fenótipos de esterase (EST) observados em populações de *Meloidogyne* spp., coletadas no Brasil. a) EST J3 = *M. javanica*, a população de referência; (b) EST I2 = *M. incognita*; (c) EST A2 = *M. arenaria*; (d) EST A3 = *M. morocciensis;* (e) EST H1 = *M. hapla*; (f) EST E3 = *M. ethiopica*; (g) EST 13 = *M. inornata*; (h) EST L3 = *M. luci*; (i) EST Ko3 = *M. konaensis*; (j) EST P1 = *M. paranaensis*; (k) EST I4 = *M. izalcoensis*; (l) EST Hi3 = *M. hispanica*; (m) EST Pe2 = *M. petuniae*; (n) EST E1 = *M. exigua*; (o) EST En2 = *M. enterolobii*.....47

Figura 2. Detecção da presença/ausência do gene *Mi*-1.2 para resistência a *Meloidogyne* spp., nas cultivares de tomate Debora Plus (DP) e Santa Clara (SC) e nas cultivares controle Viradouro (HR; homozigoto resistente), BRS Zamir (HS; homozigoto suscetível) e BRS Nagai (HZ; heterozigotos resistentes). A PCR foi realizada utilizando o par de iniciadores específico Mi23F/Mi23R. MM, marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) A PCR do DNA do Debora Plus produziu duas bandas de 380 e 430 pb, indicando que esta cultivar é heterozigótica *Mi*-1.2/*mi*-1.2 neste locus e Santa Clara produziu uma única amplificação de 430 pb, indicando que esta cultivar é homozigoto suscetível para o alelo *Mi*-1.2.....48

CAPITULO II

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE UMA POPULAÇÃO DE *Meloidogyne javanica* VIRULENTA AO GENE *Mi*-1.2 EM TOMATEIROS NO BRASIL.

Figura 1. (A-B) Fenótipos de esterase (EST) de *Meloidogyne javanica* (EST J3 e J2) e **C)** de *Meloidogyne incognita* (EST I2). **D)** Padrões perineais da espécie *Meloidogyne javanica* encontradas em porta-enxerto ‘Guardião’ de tomateiro no Rio Grande do Sul.

J3*: fenótipo de *M. javanica* utilizado como padrão de comparação. Fonte: Márcia Gabriel.....65

CAPITULO III

IMPACTO DA DOSAGEM ALÉLICA DO GENE *Mi*-1.2 NOS NÍVEIS DE RESISTÊNCIA DE PORTA-ENXERTOS DE TOMATEIRO A DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Meloidogyne* spp. E HISTOPATOLOGIA COMPARADA EM ACESSOS RESISTENTES E SUSCETÍVEIS À INFECÇÃO DE POPULAÇÕES DE *Meloidogyne javanica* AVIRULENTA E VIRULENTA.

Figura 1. (**A**) *Meloidogyne javanica* EST J3; (**B**) *Meloidogyne incognita* EST I2. (**C**) *Meloidogyne arenaria* EST. A2. J3*: fenótipo de *M. javanica* utilizado como padrão de comparação. Fonte: Márcia Gabriel.....87

Figura 2. Amplificações da PCR obtidos com o par de iniciadores 'Mi23F' e 'Mi23R', empregando como modelo o DNA total extraído de três amostras de controle e das cultivares 'hibridos portadores do gene *Mi*-1.2. MM = marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen); **HR** = amostra controle resistente e homozigotos = cultivar 'Viradoro' (banda com 380 pb); **HS** = amostra de controle suscetível homozigoto = cultivar 'BRS Zamir' (banda com 430 pb); **HZ** = amostra de controle heterozigoto = cultivar 'BRS Nagai' (com ambas as bandas de 380 e 430 pb); **DR**: DR 6632TX, hibrido (uma banda – 430 pb - indicando que esse porta-enxerto é homozigoto suscetível ao *Mi*-1.2 (*mi*/*mi*), **GU:** Guardião, **MU**: Muralha e **TD**: TD1 (com uma banda – 380 pb – indicando que esses porta-enxertos são homozigoto resistente ao *Mi*-1.2 (*Mi*/*Mi*) e os híbridos **DE**: Defensor, **BS**: BSPE 0041 e **AF**: 26296 (duas bandas – 380 pb e 430 pb – indicando que esses porta-enxertos são heterozigoto para o gene *Mi*-1.2 (*Mi*/*mi*).....88

Figura 3. **A**: Sistema radicular de planta de tomateiro resistente porta-enxerto 'Guardião' com galhas pequenas; **B**: Sistema radicular de planta de tomateiro suscetível cv. 'Santa Clara' com galhas grandes inoculadas com *M. javanica* virulento aos 34 DAI. Fonte: Márcia Gabriel.....93

Figura 4. Interação de compatibilidade observada na planta suscetível. Raízes da cv. Santa Clara (controle) infectadas com *Meloidogyne javanica* avirulento. **A**, **B**, **E**, **G** e **I** = observações em microscopia de campo claro (LM) de fragmentos de raiz corados com fucsina ácida. Secções **C**, **D**, **F** e **H** = Raízes coradas com azul de toluidina. **A =** J2s no córtex e cilindro central, e **B** = J2s alimentado no cilindro central. **C** = secções mostrando inicio da formação das células gigantes; **D** = juvenil de terceiro estádio (J3) ao lado de células gigantes; **E** = juvenil de terceiro estádio (J3) no cilindro central e alargamento da raiz; **F** = células gigantes em formação ao lado ao lado de J4; **G** = Fêmeas jovem; **H** = Fêmea adulta e células gigantes com vários núcleo e parede espessa e **I** = Massa de ovos. **DAI** = dias após a inoculação, **N** =

nematoide, **GC** = célula gigante, **IGC**= Célula gigante inicial **EG** = massa de ovo, **YF** = Fêmeas jovem CC= cilindro central.....95

Figura 5. Interação incompatível observada na planta resistente. Raízes do hibrido 'Guardião' infectadas com *Meloidogyne javanica* avirulento. **A** = observações em microscopia de campo claro de fragmento de raiz corado com fucsina ácida. Seções **B** e **C** = secções não coradas visualizadas ao UV; **D** = seção corada com azul de toluidina, mostrando morte celular (CD). **A** = juvenil de segundo estádio (J2) dentro da raiz aos 7DAI; **B** e **C** = reação de hipersensibilidade (HR). **DAI =** dias após inoculação, **HR** = reação de hipersensibilidade, **CD =** morte celular.....96

Figura 6. Interação de compatibilidade. Raízes da cv. 'Santa Clara' suscetível, infectadas com *Meloidogyne javanica* virulento. **A**, **C**, **D**, **F**, **H** e **I** = observações em microscopia de campo claro de fragmentos de raiz corados com fucsina ácida. Secções **B**, **E** e **G** = coradas com azul de toluidina. **A** = Juvenis do segundo estádio (J2s) já dentro das raízes aos 4 DAI; **B** = formação de célula gigante iniciais no cilindro central; **C** = juvenil de terceiro estádio (J3); **D** = juvenil de quarto estádio (J4) no cilindro central. **E** = grande número de células gigantes no cilindro central; **F** = fêmea jovem se alimentando no cilindro central em raiz bem engrossada; **G** = células gigantes bem formadas; **H** = presença de machos em grande número e **I** = fêmeas adultas em ovoposição. **DAI** = dias após a inoculação; **GC**= células gigantes; **male** = macho; **F** = Fêmea. **CC** = cilindro central.....99

Figura 7. Interação resistente. Raízes do porta-enxerto 'Guardião' infectadas com *Meloidogyne javanica* virulento. **A**, **C**, **F**, **G**, **H** e **I** = Observações por microscopia de campo claro de um fragmento de raiz corado com fucsina ácida. Seções **B** e **E** coradas com azul de toluidina. **D** = secções não coradas visualizadas ao UV; **A** = juvenil de segundo estádio (J2) penetrando pela região apical da raiz; **B** = célula gigante em formação; **C** = presença de J3/J4 no cilindro central; **D** = sitio de alimentação bem formada sem a presença de HR; **E** = células gigantes com parede espessa; **F** = fêmea alimentando no cilindro central; **G** = massa de ovos; **H** = macho se libertando da cutícula do J4 e **I** = presença de grande número de macho em diferentes regiões da raiz: córtex, cilindro central.....100

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

REAÇÃO DE UM HÍBRIDO HETEROZIGOTO DE TOMATEIRO PORTADOR DO GENE *Mi*-1.2 A 15 ESPÉCIES DE *Meloidogyne.*

Tabela 1. Populações brasileiras de *Meloidogyne* spp., usadas neste estudo.....43

Tabela 2. Massa fresca da raiz, número de ovos por grama de raiz, fator de reprodução (FR) e reação das cultivares de tomateiro Santa Clara (homozigoto suscetível; mi-1,2/mi-1,2) e Debora Plus (heterozigoto resistente; Mi-1,2/mi-1,2) quando inoculado com 5.000 ovos / J2 de 15 *Meloidogyne* spp., durante o verão (dezembro a fevereiro, 20–28 °C) em Brasília, DF, Brasil.....49

Tabela 3. Massa fresca da raiz, número de ovos por grama de raiz, fator de reprodução (FR) e reação das cultivares de tomateiro Santa Clara (homozigoto suscetível; *mi*-1,2/*mi*-1,2) e Debora Plus (heterozigoto resistente; *Mi*-1,2/*mi*-1,2) quando inoculado com 5.000 ovos/J2 de 15 *Meloidogyne* spp., no inverno (junho a agosto, 14–25 °C) em Brasília, DF, Brasil.....50

CAPITULO II

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE UMA POPULAÇÃO DE *Meloidogyne javanica* VIRULENTA AO GENE *Mi-1.2* EM TOMATEIROS NO BRASIL.

Tabela 1. Amostras, origem geográfica no Rio Grande do Sul e plantas hospedeiras...61

Tabela 2. Números médios de *Meloidogyne incognita e M. javanica* encontrados em solo e raiz, provenientes de áreas de produção de tomate na região noroeste do RS.....66

Tabela 3. Massa fresca de raiz (MFR), número de nematoide por grama de raiz (Nº N/R), índice de galhas (IG) índice de massa de ovos (IMO) fator de reprodução (FR) do porta-enxerto Muralha (padrão resistente) e cultivar Santa Clara (padrão suscetível) inoculadas com *M. javanica*.....66

Tabela 4. Número de nematoide por grama de raízes (NNGR), índice de galhas (IG) e fator de reprodução (FR) de *Meloidogyne javanica* virulento, em raízes do porta-enxerto 'Guardião' submetidas a diferentes concentrações de inóculo (PI), 65 dias após inoculação.....67

CAPITULO III

IMPACTO DA DOSAGEM ALÉLICA DO GENE *Mi*-1.2 NOS NÍVEIS DE RESISTÊNCIA DE PORTA-ENXERTOS DE TOMATEIRO A DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Meloidogyne* spp. E HISTOPATOLOGIA COMPARADA EM ACESSOS RESISTENTES E SUSCETÍVEIS À INFECÇÃO DE POPULAÇÕES DE *Meloidogyne javanica* AVIRULENTA E VIRULENTA.

Tabela 1. Código, espécie, origem geográfica, hospedeira e perfil enzimático das populações de *Meloidogyne* spp.....82

Tabela 2. Reação de sete porta-enxertos (DR 6632 TX, Guardião, Muralha, TD1, Defensor, BSPE 0041, AF 26296) e uma cultivar (Santa Clara) de *Solanum lycopersicum* a três populações de *M. javanica*, *M. incognita* e uma população de *M. arenaria*.....91

Tabela 3. Índice de galhas e massa de ovos de sete porta-enxertos e uma cultivar de *Solanum lycopersicum* a três populações de *M. javanica* e *M. incognita* e uma população de *M. arenaria*.....92

Tabela 4. Avaliação da penetração e desenvolvimento de *M. javanica a*virulento em raízes de tomateiro na cultivar "Santa Clara" e doporta-enxerto "Guardião" inoculadas com 10000 J2s.....96

Tabela 5. Avaliação da penetração e desenvolvimento de *M. javanica* virulento em raízes de tomateiro na cultivar "Santa Clara" e do Porta-enxerto "Guardião" inoculadas com 1000 J2s.....100

CAPITULO IV

EFEITO DO GENE *Mi*-9 NA REPRODUÇÃO DE POPULAÇÕES *Mi*-1.2 VIRULENTA E AVIRULENTAS DE *Meloidogyne* spp.

Tabela 1. Código, espécie, origem geográfica, hospedeira, perfil enzimático e reação ao gene *Mi*-1.2 das populações de *Meloidogyne* spp.....115

Tabela 2. Valores médios da massa fresca de raiz, índice de galhas (IG), índice de massa de ovos (IMO), número de ovos por grama de raiz, fator de reprodução (FR) e reação do acesso LA 2157 de *Solanum arcanum* portador do gene *Mi*-9 e da cultivar suscetível 'Santa Clara' de S. *lycopersicum* a duas populações de *M. javanica* (uma virulenta e outra avirulenta ao gene *Mi*-1.2) e uma de *M. incognita*, *M. arenaria* (ambas avirulentas ao gene *Mi*-1.2) e *M. enterolobii* (virulenta ao gene *Mi*-1.2).....119

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 18
1.2 OBJETIVO GERAL. 20
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS. 21
2 REVISÃO DE LITERATURA 21
2.1 CULTURA DO TOMATEIRO 21
2.1.1 Origem e classificação taxonômica 21
2.1.2 Importância econômica do tomateiro 23
2.2. Principais espécies de *Meloidogyne* parasitas do tomateiro 24
2.3 Ciclo de vida, comportamento e sintomas de *Meloidogyne* spp 25
2.3 Identificação de *Meloidogyne* spp 29
2.4 Medidas de manejo dos nematoides-das-galhas 31
2.4.1 Resistência genética do tomateiro aos nematoides-de-galhas 32
2.4.2 Virulencia 34
2.4.4 Resposta de defesa 37
2.4.2 Disponibilidade do gene *Mi*-1.2 em porta-enxertos comerciais 37
3 CAPITULO I: REAÇÃO DE UM HÍBRIDO HETEROZIGOTO DE TOMATEIRO PORTADOR DO GENE *Mi*-1.2 A 15 ESPÉCIES DE *Meloidogyne*. 39
REACTION OF A HETEROZYGOUS TOMATO HYBRID BEARING THE *Mi-1.2* GENE TO 15 *Meloidogyne* SPECIES. 39
3.1 INTRODUÇÃO 40
3.2 MATERIAL E MÉTODOS 43
3.2.1 Populações de NGs e caracterização das espécies pela enzima esterase 43
3.2.2 Material vegetal e confirmação da presença/ausência do gene *Mi*-1.2 44
3.2.3 Condições de crescimento do tomateiro, delineamento experimental, inoculação e procedimentos de avaliação 45
3.3 RESULTADOS 46
3.4 DISCUSSÃO 50
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 53
4 CAPITULO II: CARACTERIZAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE UMA POPULAÇÃO DE *Meloidogyne javanica* VIRULENTA AO GENE *Mi*-1.2 EM TOMATEIROS NO BRASIL 58
4.1 INTRODUÇÃO 59

4.2 MATERIAL E MÉTODOS 60
4.2.1 Obtenção das populações de *Melodogyne* spp 61
4.2.2 Caracterização bioquímica 61
4.2.3 Caracterização morfológica 62
4.3 RESULTADOS 64
4.3.1 Análise bioquímica: Esterase (EST) 64
4.3.2 Determinação do nível populacional em solo e raiz provenientes das amostras de campo. 65
4.3.3 Teste de patogenicidade 66
4.3.4 Densidade populacional 66
4.2 DISCUSSÃO 67
4.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 71
5 CAPITULO III: IMPACTO DA DOSAGEM ALÉLICA DO GENE *Mi*-1.2 NOS NÍVEIS DE RESISTÊNCIA DE PORTA-ENXERTOS DE TOMATEIRO A DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Meloidogyne* spp. E HISTOPATOLOGIA COMPARADA EM ACESSOS RESISTENTE E SUSCETÍVEIS À INFECÇÃO DE POPULAÇÕES DE *Meloidogyne javanica* AVIRULENTA E VIRULENTA. . 76
5.1 INTRODUÇÃO 78
5.2 MATERIAL E MÉTODOS 80
5.2.1 Populações de *Meloidogyne* spp., utilizadas no presente estudo 80
5.2.2 Material vegetal utilizado e condições de crescimento 83
5.2.3 Preparo do inóculo e teste de agressividade e virulência de populações de *Meloidogyne* spp. em porta-enxertos de tomateiro 84
5.2.4 Estudos histopatológicos das interações compatíveis e incompatíveis entre tomateiros resistente e suscetível e populações de *M. javanica Mi*-1.2 avirulenta e *Mi*-1.2virulenta 85
5.3 RESULTADOS 86
5.3.1 Caracterização de espécies de *Meloidogyne* 86
5.3.2 Detecção dos alelos do gene *locus Mi-1.2* 87
5.3.3 Agressividade e virulência de populações de *Meloidogyne* spp. em porta-enxertos de tomateiro 88
5.3.4 Análise histopatológica 93
5.3.4.1 *Meloidogyne javanica avirulento* 94
5.3.4.2 *Meloidogyne javanica virulento* 97
5.4 DISCUSSÃO 101
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. 106

6 CAPITULO IV: EFEITO DO GENE *Mi*-9 NA REPRODUÇÃO DE POPULAÇÕES *Mi*-1.2 VIRULENTA E AVIRULENTAS DE *Meloidogyne* spp. 111
6.1 INTRODUÇÃO 112
6.2 MATERIAL E MÉTODOS 113
6.2.1 Material vegetal 113
6.2.3 Preparo do inóculo 114
6.2.4 Preparo do material vegetal e inoculação 116
6.3 RESULTADOS 117
6.4 DISCUSSÃO 120
6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 122
7 DISCUSSÃO GERAL 127
8 CONCLUSÕES GERAIS 131
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS 133

1 **INTRODUÇÃO GERAL**

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma solanácea originária da América do Sul, e a sua domesticação se deu no México, sendo considerado o centro de origem secundário do tomateiro (BLANCA et al., 2015). Pode ser cultivado em regiões tropicais e subtropicais no mundo inteiro, para consumo “in natura” ou para a indústria. Entre as hortaliças é a mais importante em termos de produção e valor socioeconômico, uma vez que ocupa o segundo lugar em volume de produção mundial, ficando abaixo apenas da batata (ABREU, 2006).

A cultura do tomateiro é atacada por diferentes patógenos, entre eles os nematoides, destacando-se, em áreas de cultivo no Brasil, as espécies pertencentes ao gênero *Meloidogyne* (nematoide-das-galhas), que apresentam uma distribuição geográfica ampla, uma grande gama de hospedeiros, alta capacidade reprodutiva e causam grandes danos à cultura com perdas variando de 25-100% (NAIKA et al., 2006; JABLONSKA et al. 2007; SEID et al., 2015).

Em levantamentos realizados em diferentes regiões do Brasil é registrada a ocorrência de várias espécies de *Meloidogyne* associadas à rizosfera do tomateiro. Além da presença predominante de *M. javanica* e *M. incognita*, as espécies *M. arenaria, M. ethiopica*, *M. enterolobii*, *M. morocciensis* e *M. hapla* foram também relatadas (ROSA et al., 2013; PINHEIRO et al., 2014).

As plantas de tomateiro, quando severamente atacadas por *Meloidogyne* spp., apresentam o sistema radicular completamente desorganizado e com poucas raízes funcionais, interferindo no desenvolvimento da planta, refletindo na redução na produção e depreciação da qualidade do produto a ser comercializado (OLIVEIRA 2007a). De acordo com Alvarenga (2004), altas infestações pelo nematoide na fase inicial da cultura pode ocorrer a morte de mudas no campo.

Entre os métodos de controle de nematoides em tomateiro, o uso de cultivares e porta-enxertos com resistência genética é a medida mais eficiente e preconizada, além de ser uma técnica rápida que não exige uma mudança drástica no manejo da cultura (GOTO et al., 2003) e de causar menor impacto ambiental no controle desse endoparasita (PEGARD et al., 2005).

Resistência da planta a patógenos é definida como a habilidade da planta em inibir, diminuir ou superar o ataque dos mesmos MAC KEY (1986). Segundo Roberts (2002),

plantas resistentes a nematoides têm seus mecanismos de defesa expressos de modo a interferir nas diversas fases do ciclo de vida e do parasitismo, restringindo ou prevenindo a sua multiplicação.

Na cultura do tomate, a resistência a *M. arenaria*, *M. incognita* e *M. javanica* é conferida pelo gene *Mi*-1.2 introgredido a partir da de Cruzamentos interespecíficos entre *S. peruvianum* a *S. lycopersicum* (SMITH, 1944). Esse gene é altamente eficaz na supressão da reprodução de nematoides-das-galhas (ROBERTS e THOMASON, 1986; SORRIBAS et al., 2005).

Estudos sobre o mecanismo de resistência mediada por esse gene têm mostrado uma reação de hipersensibilidade (RH) e morte celular no local ou próximo ao local onde a alimentação normalmente seria iniciada pelo J2s (juvenis de segundo estágio). (DROPKIN, 1969; PAULSON e WEBSTER, 1972; HO et al., 1992). No entanto, essa resistência não é efetiva em temperaturas do solo acima de 32 ºC (WILLIAMSON et al., 2000; WILLIAMSON 1998), apesar de que algumas cultivares terem apresentado resistência ativa em temperatura de 34 ºC (ABDUL-BAKI et al., 1996; VERDEJO-LUCAS et al., 2009).

A resistência mediada pelo gene *Mi*-1.2 também não se mostra efetivo contra algumas contra algumas populações de espécies de *Meloidogyne.* (CASTAGNONE-SERENO et al., 1993, 1994; ROBERTS, 1995; DEVRAN e SÖGÜT, 2010; VERDEJO-LUCAS et al., 2012). Além disso, outras espécies de *Meloidogyne* podem se reproduzir em plantas com gene *Mi*-1.2, como é o caso de *M. enterolobii* (GUIMARÃES et al., 2003; CARNEIRO et al., 2006; WESTERICH, 2012; ROSA et al., 2014) e *M. hapla* (BROWN et al., 1997). No caso de populações avirulentas, o gene *Mi*-1.2 é mais eficaz em genótipos homozigotos do que em heterozigotos de tomateiro (JACQUET et al. 2005; MALEITA et al., 2011).

Populações virulentas de Meloidogyne spp., podem ocorrer naturalmente, ou seja, sem exposição prévia a tomateiros portadores do gene Mi (CASTAGNONE-SERENO, 2002; BLEVE-ZACHEO et al., 2007; IBERKLEID et al., 2014; SILVA et al., 2019), como também podem resultar da seleção após exposições repetidas de tomateiros com resistência ao gene *Mi*-1.2, tanto em casa de vegetação quanto em condições de campo (ROBERTS, 1995; ROBERTS e THOMASON, 1989; CASTAGNONE-SERENO et al., 1993; XU et al., 2001).

Os mecanismos pelos quais os nematoides fitoparasitas são capazes de superar os genes de resistência ainda não foram elucidados. No entanto, estudos mais recentes sugerem que a variação do número de cópias de genes pode ser responsável pela variação genética e adaptação de populações virulentas do nematoide das galhas ao gene *Mi*-1.2. Castagnone-Sereno et al., (2019) ao analisar duas populações de nematoides das galhas *Mi*-1.2 virulentas e outras duas populações avirulentas, quase isogênicas, identificaram 33 genes que mostraram diminuições no número de cópias nas populações virulentas em comparação com as avirulentas.

Atualmente, um novo gene de resistência *Mi*-9, que foi introgredido de um acesso da espécie selvagem *S. arcanum* 'LA 2157' (JABLONSKA et al. 2007). A expressão fenotípica dessa resistência se diferencia da resistência mediada por *Mi*-1.2, sendo efetiva em altas temperaturas (AMMIRAJU et al., 2003). Ainda pouco se conhece sobre a resposta de acessos contendo o gene *Mi*-9 contra uma ampla gama de espécies de *Meloidogyne*.

A enxertia do tomateiro tornou-se uma técnica popular para produzir variedades de tomate comercialmente atraentes, em áreas com restrições edáficas ou ambientais e, em solos infestados por patógenos. A maioria dos porta-enxertos de tomateiro são híbridos interespecíficos complexos entre *S. lycopersicon* e espécies selvagens de *Solanum*, como *S. habrochaites* (ex- *Lycopersicon hirsutum*) ou *S. chilense*. Os porta-enxertos reduzem os danos dos patógenos porque carregam genes de resistência contra vírus, fungos, bactérias e nematoides-das-galhas (IOANNOU, 2001; MIGUEL, 2002; LOUWS et al., 2010). Além disso, promovem o crescimento das plantas, aumentam o rendimento e são tolerantes a temperaturas adversas.

A catalogação da diversidade e caracterização de populações virulentas de *Meloidogyne* spp., a fenotipagem e genotipagem de porta-enxertos comerciais resistentes, em relação a diferentes espécies do nematoide das galhas, e o estudo dos mecanismos de resistência envolvidos na relação planta-patógeno podem contribuir para as estratégias de manejo a esses nematoides na cultura do tomateiro.

1.2 OBJETIVO GERAL.

O presente trabalho teve como objetivo estudar o espectro de resistência do gene *Mi*-1.2 e confirmar uma possível suplantação da resistência conferida por esse gene em porta-enxertos de tomateiro comerciais por *Meloidogyne* spp., no Rio Grande do Sul.

Visa também dosar a resistência de sete porta–enxertos de tomateiro com gene *Mi*-1.2 e avaliar a reação de um acesso da espécie *Solanun arcanum*, com gene *Mi*-9 a populações de *Meloidogyne* spp., além de caracterizar histologicamente a interação entre o porta-enxerto 'Guardião' à duas populações de *M. javanica* (virulenta e avirulenta).

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- ✓ Avaliar o espectro de resistência do gene *Mi*-1.2 contra quinze espécies de *Meloidogyne* ocorrentes no Brasil.
- ✓ Identificar as espécies de *Meloidogyne* spp. em lavouras de tomate na região Noroeste do Rio Grande do Sul e comprovar a suplantação da resistência conferida pelo gene *Mi*-1.2 por *Meloidogyne* sp., em tomateiro na região noroeste do estado.
- ✓ Estudar os efeitos de dosagem alélica (homozigose e heterozigose) na expressão da resistência de porta-enxertos de tomateiros comerciais com gene *Mi*-1.2 a *M. javanica, M. incognita* e *M. arenaria.*
- ✓ Estudar as alterações histológicas associadas à infecção por população *Mi*-1.2 avirulenta e *Mi*-1.2 virulenta de *M. javanica* em porta-enxertos de tomateiro com gene *Mi*-1.2, a fim de conhecer os mecanismos de resistência e a interação planta-patógeno.
- ✓ Avaliar a resposta do acesso de tomateiro portador do gene *Mi*-9 a populações de *M. javanica* virulenta e avirulenta, *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. enterolobii*.

2 **REVISÃO DE LITERATURA**

2.1 CULTURA DO TOMATEIRO

2.1.1 Origem e classificação taxonômica

As espécies selvagens de tomateiro são nativas da região Andina que abrange parte do Chile, Colômbia, Equador, Bolívia e Peru e a sua domesticação se deu em duas etapas, iniciada na América do Sul e concluída no Sul do México (BLANCA et al., 2015). No Brasil, a introdução do tomateiro deve-se a imigrantes europeus no final do

século XIX (ALVARENGA, 2004), sendo que hoje a cultura está espalhada por todo o mundo.

A evolução da domesticação da espécie foi baseada no aumento da massa média dos frutos e foram usados *Solanum pimpinellifollium* L. e *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* L. até a planta atualmente cultivada em todo o mundo (BLANCA et al., 2015). Juntamente com outras 13 espécies silvestres, o tomateiro integra a seção Lycopersicon que se subdivide nos grupos Lycopersicon, Neolycopersicon, Eriopersicon e Arcanum (PERALTA et al., 2008).

O interesse por maior homogeneidade de produção nas cultivares modernas resultou em uma redução nos caracteres relacionados a estresses bióticos e abióticos (NIK e SILVA, 2018). Dessa forma, fez-se necessário a busca por resistência disponível nas espécies silvestres e sua posterior introgressão (NIK e SILVA, 2018). Isso fez com que as espécies silvestres tenham desempenhado importante papel na evolução da tomaticultura mundial. Entre os alelos de resistência introgredidos no tomateiro a partir das espécies silvestres está o gene *Mi* que controla nematoide-das-galhas, pulgões (*Macrosiphum euphorbiae*) e moscas-branca (*Bemisia tabaci*).

O tomateiro *Solanum lycopersycum* L. (= *Lycopersycum esculentum* Mill.) pertence à família Solanaceae, à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Solanales e gênero *Solanum*. É uma planta herbácea, de caule flexível, piloso, com abundante ramificação lateral e sua arquitetura é caracterizada por dois tipos de hábito de crescimento: determinado e indeterminado (NIK e SILVA, 2018). O tipo indeterminado é caracterizado pelo maior crescimento da haste principal em relação às ramificações laterais, sendo que esse maior crescimento deve-se à ocorrência da dominância apical nas cultivares de frutos para mesa. Nas plantas de hábito determinado, o crescimento da haste principal termina com uma florescência que ocorre nas cultivares de frutos destinados para agroindústria (MELO, 2017). Plantas com crescimento determinado apresentam maior precocidade e homogeneidade da maturação dos frutos (MELO, 2017).

As flores do tomateiro são hermafroditas, com corola e estames de tamanho reduzido. As flores são compostas em número médio por cinco pétalas, cinco sépalas e seis anteras por flor, podendo uma única planta produzir aproximadamente 20 inflorescências, com quatro a oito flores cada, em formato de cachos ou racemos, o que favorece a autopolinização (NIK e SILVA, 2018).

O florescimento do tomateiro inicia-se em condições de alta luminosidade e de temperatura por volta dos 45 dias após a semeadura, e em algumas regiões como o Sudoeste do Brasil por volta dos 65 dias (ALVARENGA, 2013).

Os frutos são do tipo baga carnosa, com diferentes tamanhos, formatos e massa. Segundo Ferreira et al. (2004) é o formato do fruto que define os tipos varietais, e atualmente, no mercado brasileiro de tomate de mesa, os principais segmentos são: Santa Cruz, Salada, Caqui, Saladete (italiano) e Cereja (mini ou grape).

O tomateiro apresenta melhor desempenho produtivo em temperaturas diurnas de 25 °C a 27 °C e noturnas de 17 °C a 20 °C, e em caso de ocorrência de temperaturas abaixo ou acima dos limites indicados, tanto a qualidade como a quantidade dos frutos são afetadas (MELLO, 2018).

2.1.2 Importância econômica do tomateiro

O tomate é considerado uma das hortaliças de maior importância econômica no mundo, estando o Brasil em nono lugar no ranking de produção mundial desta hortaliça, com produção de 4.084,940 milhões de toneladas, plantado numa área de 59,726 mil hectares no ano de 2018 (WPTC, 2019). Seu cultivo é formado por duas cadeias produtivas, caracterizadas pelos segmentos de mesa (consumo *in natura)* e de indústria (processamento).

De acordo com os dados da Faostat (2019), a produção mundial de tomates é liderada pela China, Índia e Estados Unidos, que ocupam as primeiras posições, respondendo por aproximadamente por 31%, 11% e 8%, respectivamente, enquanto que a produção brasileira corresponde à aproximadamente, 2,5 % da produção mundial, e essa é destinada ao mercado interno. No Brasil, o tomateiro é cultivado praticamente, em todos os estados, mas sua produção destaca-se nos estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais, que concentram mais da metade da área e produção nacional e onde se encontram as principais indústrias processadoras de tomate (BRASIL, 2019). Tendo o período de plantio peculiar para cada região geográfica, em função das condições climáticas (FILGUEIRA, 2000). Do total da área produzida (59,726 mil hectares) na safra de 2018, cerca de 73,3 % foram destinadas para a produção de tomate para consumo *in natura* (BRASIL, 2019). No Rio Grande do Sul, na safra de 2017, o volume de produção foi em torno de 116 mil toneladas, produzidos em uma área de 2.283

hectares, o que corresponde a uma média de 65 toneladas por hectare. O número total de produtores é de cerca de 3.200 no Rio Grande do Sul (IBGE, 2018).

2.2. Principais espécies de *Meloidogyne* parasitas do tomateiro

Os nematoides-das-galhas (NGs), pertencentes ao gênero *Meloidogyne* são cosmopolitas e polífagos (FREITAS et al., 2009), e em olerícolas é o gênero mais importante devido à sua ampla distribuição e ocorrência na maioria das espécies cultivadas (ROSA et al., 2013). São espécies endoparasitas obrigatórios de plantas, sendo os mais prejudiciais do mundo a uma ampla gama de espécies vegetais (JONES et al., 2013).

O gênero *Meloidogyne*, faz parte do filo Nematoda e está incluído dentro da classe Chromadorea, Ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Infraordem Tylenchomorpha, Superfamília Tylenchoidea e família Meloidogynidae (DE LEY e BLAXTER, 2002; KARSSEN e MOENS, 2006). Tem ocorrência em toda região tropical e sub-tropical. Parasita uma ampla variedade de plantas como algodão, batata, café, cana-de-açúcar, feijão, milho, soja, tomate, alface, cenoura e beterraba, entre muitas outras. O gênero *Meloidogyne* teve o seu primeiro relato no Brasil, na antiga província do Rio de Janeiro em 1887, parasitando raízes de cafeeiro; o naturalista Goeldi denominou essa espécie como *M. exigua* (MOURA, 1987).

Entre as mais de 100 espécies incluídas neste gênero, *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. hapla*, *M. enterolobii* e *M. chitwoodi* estão entre as que causam a grande maioria dos danos às culturas (MOENS et al., 2009; HALLMAN e MERESSA, 2018). As perdas variam de 25 a 100% (JABLONSKA et al. 2007; SEID et al. 2015) e dependem da época de plantio e das práticas culturais adotadas pelos produtores.

As espécies de *Meloidogyne* predominantes no cultivo de tomateiro no Brasil são *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 (raças 1 a 4), *M. javanica* (Treub, 1885) (Chitwood, 1949), *M. enterolobii* (Yang e Einseback, 1983), *M. ethiopica* (Whitehead 1968), *M. morocciensis* (Rammah e Hirschmann, 1990) e *M. hapla* Chitwood (1949), sendo *M. javanica* e *M. incognita*, as mais comumente encontradas (ROSA et al., 2013; PINHEIRO et al., 2014). Segundo Pinheiro, (2014) essas espécies podem ocorrer em vários tipos de solo, mas causam prejuízos econômicos com maior intensidade em regiões quentes e que apresentam solos arenosos e com baixos teores de

matéria orgânica.

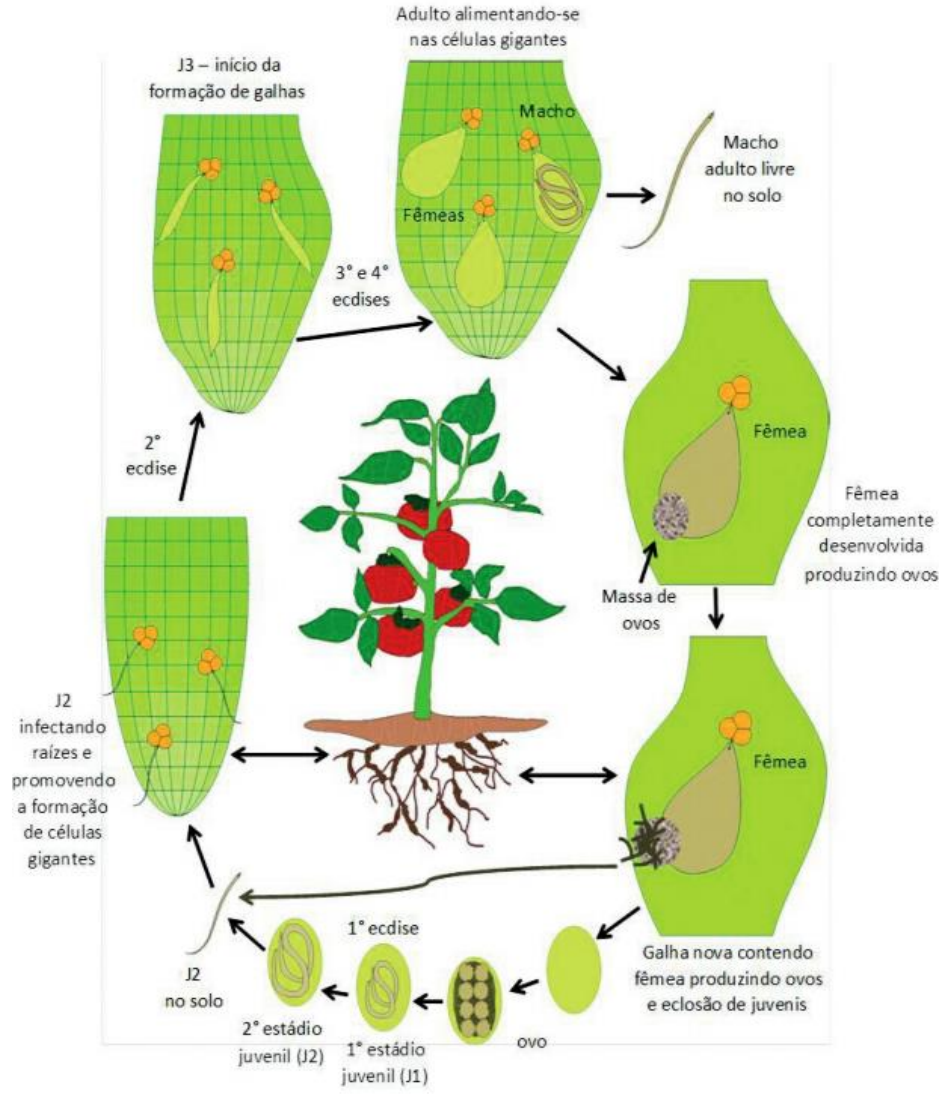
As plantas de tomate, quando severamente atacadas por *Meloidogyne* spp., apresentam aspecto clorótico, diminuição no crescimento, sistema radicular completamente desorganizado, e com poucas raízes e forte presença de galhas, reduzindo o número e a qualidade dos frutos. Quando a infecção ocorre no estádio de plântula, essas podem morrer no transplante para o campo e as plantas que sobrevivem podem ter a frutificação grandemente afetada, em quantidade e qualidade (ALVARENGA, 2004).

2.3 Ciclo de vida, comportamento e sintomas de *Meloidogyne* spp

Nematoides do gênero *Meloidogyne* completam seu ciclo de vida, em temperaturas ideais do solo de 25 a 30 °C, geralmente entre 22 a 30 dias, que compreende o ovo, quatro estádios juvenis (J1, J2, J3 e J4) e a forma adulta (macho ou fêmea) (Figura 1). Porém, suas atividades reduzem ou até mesmo cessam por completo em temperaturas superiores a 40 ºC ou inferiores a 5 ºC (FERRAZ, 2001).

Cada fêmea de *Meloidogyne* deposita em média 400 a 500 ovos durante o ciclo de vida, sendo esses depositados em uma massa gelatinosa, a ooteca, que começa a ser expelida pelo ânus antes da oviposição, o que protege os ovos durante a postura (TIHOHOD, 1993).

Figura 1- Ciclo de vida do nematoide das galhas em raízes do tomateiro. Fonte: Pereira, Ricardo. Adaptado de Agrios (2005).



No seu período de desenvolvimento (estádios juvenis até adulto), os nematoides passam por quatro ecdises, ou seja, por trocas periódicas da cuticula. No interior dos ovos, o desenvolvimento embrionário resulta no juvenil de primeiro estádio (J1) que passa por uma ecdise dentro do ovo, dando origem ao juvenil de segundo estádio (J2). De maneira geral, o J2 eclode quando há condições ambientais favoráveis à sua sobrevivência. Fatores químicos e físicos como umidade e a aeração do solo, o pH e os produtos químicos orgânicos e inorgânicos contidos na água do solo, também

influenciam no processo de eclosão (TIHOHOD, 2000). Esse estádio móvel, vermiforme, infectante migra através do solo em busca de alimento e são atraídos por exsudatos radiculares, penetrando nas raízes da planta hospedeira. Após a penetração na raiz, os J2 movem-se intercelularmente no córtex na região de diferenciação celular, onde estabelecem seus sítios de alimentação no parênquima vascular (TAYLOR e SASSER, 1983). O início da alimentação do J2, em células do protoxilema e protofloema, induz a diferenciação dessas células em células especializadas, chamadas células gigantes ou células nutridoras (MOENS et al., 2009).

Uma vez iniciada a alimentação, o J2 perde sua capacidade de se mover, ou seja, torna-se sedentário e durante o desenvolvimento, os juvenis gradualmente assumem um formato salsichoide e ocorre então a segunda (J2 para J3), a terceira (J3 para J4) e a quarta ecdises (J4 para fêmea jovem ou macho) (EISENBACK e TRIANTAPHYLLOU, 1991; MOENS et al., 2009). Na última ecdise, o macho se apresenta como um nematoide longo e filiforme dentro da cutícula do quarto estádio juvenil (J4), retida como revestimento, enquanto que a fêmea no início mantém o mesmo formato do último estádio juvenil, mas aumenta quando adulta e torna-se piriforme (KARSSEN e MOENS, 2006). Após ocorrer a diferenciação sexual entre macho e fêmea, o macho sai da raiz e não se alimenta, enquanto que a fêmea continua na raiz, alimentando-se até completar seu ciclo de vida (KARSSEN e MOENS, 2006). As condições climáticas e alimentícias influenciam diretamente na reversão sexual, pois em condições de estresse, os J4 femininos sofrem reversão e transformam-se em machos (FERRAZ e MONTEIRO, 2011).

As fêmeas de *Meloidogyne* spp., medem de 0,3 a 3 mm e possuem diâmetro de 15 a 50 µm. Além disso, apresentam estilete que atua como uma agulha hipodérmica, pela qual as substâncias produzidas por elas são injetadas na célula da planta, para manutenção do sítio de alimentação (TIHOHOD, 1989).

A maioria das espécies de *Meloidogyne* é partenogenética. Algumas se reproduzem por partenogênese meiótica facultativa, mas várias das espécies mais comumente encontrada na cultura do tomate, tais como *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria*, possuem modo de reprodução partenogenético mitótico obrigatório (CASTAGNONE-SERENO, 2006).

Nas espécies anfimíticas, a presença dos machos é frequente e a reprodução pode ser sexual, mas também podem ser encontrados machos em espécies

partenogenéticas, quando as condições ambientais são desfavoráveis ao desenvolvimento de fêmeas, como altas densidades populacionais e alimentos limitados (MOENS et al., 2009).

Os sintomas de *Meloidogyne* spp., são classificados em diretos e reflexos. O sintoma direto é a formação de galhas nas raízes que são engrossamentos observados tanto na raiz principal como nas secundárias. As galhas são oriundas das mudanças morfológicas e fisiológicas causadas pelas secreções produzidas pelo J2 para formação do sítio de alimentação. As plantas quando severamente atacadas por *Meloidogyne* spp., apresentam o sistema radicular completamente desorganizado e com poucas raízes funcionais, o que dificulta a absorção e translocação de água e nutrientes para a planta, causando sintomas semelhantes aos de deficiência nutricional, identificados como sintomas reflexos (VALE et al., 2013).

Há outros sintomas diretos em que as raízes sofrem severa destruição do tecido cortical, ou descorticamento, e ficam quase reduzidas ao cilindro central tal ocorre em ataques de *M. coffeicola*, *M. incognita* e *M. paranaensis* em cafeeiros (VILLIAN et al., 2018). Na cultura da cenoura, além das galhas nas raízes laterais, podem se verificar deformações diversas chamadas digitamento, isto é, as cenouras ficam bifurcadas ou trifurcadas, perdendo o valor comercial. Tubérculos, rizomas entre outros órgãos subterrâneos também sofrem danos diretos, exibindo rachaduras ou crescimentos anormais na superfície, como as conhecidas “pipocas” em batata, que depreciam totalmente o produto para venda. Já os sintomas reflexos, aparecem na parte aérea das plantas, através do mau crescimento das plantas (nanismo) murcha, amarelecimento e clorose. Devido à baixa mobilidade dos nematoides no solo os sintomas na parte aérea normalmente ocorrem em reboleira (PINHEIRO, 2017).

As galhas radiculares podem variar entre as espécies de *Meloidogyne* e as plantas hospedeiras. *Meloidogyne. hapla*, geralmente produz galhas pequenas e discretas em tomateiro, enquanto que *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. enterolobii* causam galhas grandes e irregulares (PINHEIRO, 2017). Em algumas hospedeiras, as galhas podem ser pequenas ou indistintas, resultando muitas vezes na não identificação do parasitismo (MOENS et al., 2009).

2.3 Identificação de *Meloidogyne* spp

As diferentes espécies podem ser caracterizadas, através de métodos morfológicos (configuração da região perineal de fêmeas, morfologia e morfometria da região anterior e do estilete de machos, fêmeas e juvenis de segundo estádio (J2), bioquímicos (padrões de esterase de fêmeas) e moleculares (PCR-SCAR), utilizando fêmeas, ovos e J2s. Os métodos bioquímico e molecular os mais recomendados para uma identificação rápida e precisa (CARNEIRO et al. 2016)

A identificação através da configuração perineal das fêmeas adultas baseia-se na região compreendida entre a vulva e o ânus e que contém marcas cuticulares características de cada espécie (TIHOHOD, 1989). Essa técnica se tornou inapropriada por ser considerada subjetiva, devido à grande variabilidade interespecífica e similaridade entre alguns tipos de padrões e, por ser dependente do conhecimento técnico e da habilidade do operador, tornando os erros de interpretação mais frequentes (RANDIG et al., 2004).

As técnicas bioquímicas que utilizam o polimorfismo de isoenzimas baseiam-se na avaliação da mobilidade dessas proteínas mediante carga elétrica, de acordo com seu peso molecular, o que resulta na visualização das bandas no gel (ESBENSHADE e TRIANTAPHYLLOU, 1985). Podem ser avaliadas por diversos métodos, sendo a eletroforese vertical e horizontal as mais utilizadas, pois oferece alto grau de resolução, rapidez e ampla aplicabilidade, permitindo ainda o reconhecimento de *Meloidogyne* spp., mesmo em mistura, identificação de populações atípicas, eficiência, confiabilidade (CARNEIRO et al., 2000; BLOK e POWERS, 2009). Entretanto, possui a desvantagem de ter que utilizar fêmeas adultas e não ovos ou J2s do solo (MANSO e TENENTE, 1994).

Nos últimos anos, estudos utilizando marcadores enzimáticos, sobretudo as esterases (EST) e malato desidrogenases (MDH) tem identificado cerca de 800 populações de *Meloidogyne* spp., originarias de diferentes países (ESBENSHADE e TRIANTAPHYLLOU, 1985, CARNEIRO et al., 2000, CARNEIRO et al., 2016).

Com base na técnica do PCR, o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é utilizado atualmente para os estudos genéticos e para a diferenciação de espécies de *Meloidogyne*, a partir de perfis gerados com o auxílio de primers aleatórios (CENIS, 1993; CASTAGNONE-SERENO et al., 1994; BLOK et al., 1997; RANDIG et al., 2002). A

análise de RAPD utiliza pequenas quantidades de material genético (6 - 30 ng DNA), não necessita do conhecimento prévio do genoma a ser estudado e utilizam primers de sequência aleatória (WILLIAMS et al., 1990), além de ser considerada menos complexa, mais rápida e de menor custo, quando comparada a RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

De acordo com Ferreira e Grattapaglia (1998) a limitação dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informação genética por locus, pois apenas um alelo é detectado, o segmento que é amplificado, enquanto que as demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como um alelo nulo, ou seja, esses marcadores comportam-se como dominantes: os dados têm natureza binária (presença ou ausência de fragmentos).

A técnica de AFLP (Amplified fragment length polymorphism), de forma semelhante à análise de RAPD (SEMBLAT et al., 1998), permite a detecção de polimorfismo a nível específico e/ou subespecífico em *Meloidogyne* spp. As vantagens dessa técnica ficam por conta do grande número de fragmentos gerados em um único gel e do grande poder de detecção de variabilidade genética (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Esta explora simultaneamente o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição, tal como no ensaio de RFLP, e a ocorrência ou não de amplificação a partir de sequências arbitrárias, tal como o ensaio RAPD, caracterizando-se uma flexibilidade significativa na obtenção de marcadores polimórficos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). A limitação fica por conta do baixo conteúdo de informação genética por loco, semelhante aos marcadores RAPD, além de envolver maior número de etapas.

Nos nematoides-das-galhas, marcadores SCAR já foram desenvolvidos para identificar duas espécies quarentenárias, *M. chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo; Finley, 1980 e *M. fallax* Karssen, 1996, ou ainda, para separar as três espécies: *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, presentes principalmente em regiões tropicais e subtropicais ou em plantios em sistema protegido (ZIJLSTRA, 2000a; ZIJLSTRA et al., 2000b; FOURIE et al., 2001; MENG et al., 2004). Marcadores SCAR espécie–específicos foram definidos para as três principais espécies de *Meloidogyne* do cafeeiro: *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* (RANDIG et al. 2002) e para outras espécies também (CARNEIRO et al., 2016).

Os marcadores SCAR são obtidos a partir das bandas de RAPD presentes apenas nas populações afim, essas são cortadas do gel de agarose e posteriormente clonados. Para cada fragmento clonado, o sequenciamento do inserto é realizado em dois clones

independentes. A partir de cada sequência obtida, um par de primers espécie-específico de temperatura de anelamento (Tm) elevada e maior quantidade de G + C é estabelecido com base nas sequências de consenso, utilizando o software expecifico. (ROZEN e SKALETSKY, 2000).

A variabilidade intraespecífica ou infraespecifica de *Meloidogyne* spp. também pode ser evidenciada na existência/identificação das raças fisiológicas. Essas não podem ser diferenciadas morfologicamente, sendo necessária a reprodução das populações nas seguintes cultivares previamente estabelecidas: fumo (*Nicotiana tabacum* L.) 'NC 95', pimentão (*Capsicum annuum* L.) 'Early California Wonder', algodão (*Gossypium hirsutum* L.) 'Deltapine 16', melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum e Nakai) 'Charleston Gray', amendoim (*Arachis hypogaea* L.) 'Florunner' e tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) 'Rutgers', chamadas de hospedeiras diferenciadoras e padronizadas internacionalmente, identificando as raças através da avaliação de suscetibilidade ou resistência (HARTMAN e SASSER, 1985). Recentemente, não foi encontrada variabilidade genética entre as quatro raças de*M. incognita*, através do sequenciamento total do genoma. Dessa maneira, não foi ainda demontrado o determinismo genético no conceito de raças fisiológicas (KOUTSOVOULOS et al., 2019).

2.4 Medidas de manejo dos nematoides-das-galhas

Os nematoides do gênero *Meloidogyne* são de difícil controle e altamente polífagos, apresentando uma ampla gama de hospedeiros suscetíveis. Esses nematoides induzem sérios danos à cultura do tomateiro, limitando a produtividade da cultura devido a formação de galhas no sistema radicular, fazendo com que esses apresentem baixo desenvolvimento e pouco eficiência na absorção de água e nutrientes, que consequentemente reduz a produção. Áreas com cultivos sucessivos de tomateiros podem acarretar em um aumento da população dos nematoides e dificultar a adoção de estratégias eficientes de controle (ROBERTS, 1992).

Métodos de controle como rotação de culturas com plantas não hospedeiras, incorporação de matéria orgânica, plantas antagônicas, aplicação de nematicidas sistêmicos, controle biológico e cultivares resistentes são recomendadas como forma de reduzir a população dos nematoides no solo e tornar a área de cultivo produtiva. Dentre esses métodos, o uso de variedades resistentes, vem ganhando espaço no controle desse

patógeno por proporcionar menos impactos ao meio ambiente.

2.4.1 Resistência genética do tomateiro aos nematoides-de-galhas

A resistência de plantas a nematoides foi relatada pela primeira vez em plantas de feijão-caupi por Webber e Orton (1902). Nas plantas, a resistência pode ser mediada por um único gene (resistência vertical) ou por vários genes (resistência horizontal). Devido à resistência horizontal ser conferida por vários genes, ela é mais durável no campo, enquanto que a vertical por ser conferida por um ou um par de genes é mais fácil de ser suplantada (PASCHOLATI, 2011). Essa resistência pode se manifestar de duas formas: pré-infectiva e pós-infectiva.

A pré-infectiva também conhecida como primeira linha de defesa da planta, ocorre antes que o nematoide penetre na raiz da planta (HUANG, 1985), e está associada à produção de substâncias químicas, que tem efeitos repelentes e ou nematicida por proteínas receptoras extracelular do tipo quinases (RLK) e as proteínas do tipo receptor (RLP), enquanto que a resistência pós-infectiva também conhecida como segunda linha de defesa da planta é desencadeada por proteínas intracelulares que contêm um local de ligação a nucleotídeos (NBS), um receptor de interleucina do tipo pedágio (TIR) e repetições ricas em leucina (LRRs) (CHISHOLM et al., 2006) que se manifesta após a penetração do J2. Na defesa pós-infectiva, existem dois modos de interação do patógeno: direto e indireto (CAPLAN et al., 2009).

O primeiro modo de defesa (direto) depende de uma interação do tipo gene-a-gene (FLOR, 1971), ou seja, a proteína receptora do tomateiro interage diretamente com os nematoides (BAKKER et al., 2006). Assim, o produto de um gene de resistência no tomateiro, tal como o gene *Mi*-1.2, identifica o produto de um gene do nematoide-das-galhas [chamado de gene de avirulência (Avr)]. Uma das respostas desse tipo de defesa da planta hospedeira é a morte celular, conhecida como reação de hipersensibilidade (RH) (BAKKER et al., 2006; HEATH, 2000). Depois que o nematoide entra na raiz das plantas; os produtos dos genes Avr do nematoide acionam a produção e a expressão de genes resistentes da planta, resultando em uma interação incompatível, impedindo a formação de um local de alimentação (célula gigante).

O segundo modo de defesa (indireto) não é uma interação direta gene-a-gene, mas um modo alternativo chamado hipótese de guarda. Nesta teoria, o mecanismo

consiste em efetores do patógeno que desencadeiam a reação de fatores e proteínas das plantas, e que estas por sua vez irão induzir a resistência (genes-R). Nesses casos os fatores de avirulência dos nematoides (Genes Avr) interagem com as proteínas acessórias do tomateiro, resultando em algumas modificações dessa, o que permite o seu reconhecimento pelas proteínas NBS-LRR da planta, que monitoram a infecção. O resultado dessa interação indireta também é a prevenção da reprodução e desenvolvimento do nematoide pela inibição da formação de sítios de alimentação (DANGL e JONES, 2001).

Mecanismos de resistência pós-infectivos têm sido relatados em plantas parasitadas por nematoide das galhas, entre eles, a reação de hipersensibilidade que se deve ao acúmulo de compostos fenólicos, formação de fitoalexinas e a atividade das enzimas fenilalanina amônia liase (PAL), b-glucanase, peroxidase e polifenoloxidase, dentre outras (GIEBEL, 1982; HUANG, 1985; FRAGOSO et al., 2007).

Segundo Dias e Rangel (2007), a reação de hipersensibilidade é uma resistência local, que provoca aumento de agentes oxidativos no interior da célula, ocorrendo perda de potássio e ganho de hidrogênio, levando à morte celular, induzindo à síntese de fitoalexinas e de proteínas de defesa. Essa é considerada um dos mecanismos de defesa mais importante e estudado para fitonematoides, por promover a morte das células do hospedeiro ao redor do sitio de alimentação do nematoide (DROPKIN, 1969, PASCHOLATI, 2011).

As reações de resistência podem ser de baixa, moderada ou alta eficiência, permitindo ou não a reprodução do patógeno em diferentes níveis, sempre em comparação com plantas suscetíveis, que permitem o desenvolvimento normal do nematoide com alta reprodução (GOMES, 2006).

No contexto nematológico, a resistência é definida como capacidade da planta em restringir ou impedir a invasão, desenvolvimento e multiplicação do nematoide (TRUDGILL, 1986). No tomateiro pode ser expressa em cultivares ou porta–enxertos portadores do gene de resistência *Mi*-1.2. Esse gene foi identificado, originalmente, em acessos da espécie de tomateiro selvagem *S. peruvianum* (BAILEY, 1941) e vem sendo usado há mais de 70 anos. Esse gene foi transferido para a espécie *S. lycopersicum* (PI 128657) pelo resgate de embriões seguido pelo melhoramento tradicional (SMITH, 1944). O gene *Mi*-1.2 está localizado no braço curto do cromossomo 6 e confere resistência ativa contra várias espécies do gênero *Meloidogyne*, especialmente contra *M.*

arenaria, *M. incognita* e *M. javanica* (DROPKIN, 1969). Cultivares portadoras do gene *Mi-1.2* podem ser cultivadas na maioria das áreas infestadas, sem perda significativa de rendimento, porque suprimem a reprodução de nematoides (RICH e OLSON, 1999; SORRIBAS et al., 2005).

2.4.2 Virulencia

Embora o gene *Mi*-1.2 tenha sido eficiente no controle dos nematoide-das-galhas, ele não confere imunidade total (ROBERTS e THOMASON, 1986). A resistência mediada pelo gene *Mi*-1.2 não é efetiva em temperaturas do solo acima de 28 °C (AMMATI, et al., 1986), e também não tem efeito contra populações de *M. hapla*, *M. enterolobii* (WILLIAMSON, 1998; MALEITA et al., 2011; CASTAGNONE-SERENO, 2012) bem como contrapopulações virulentas de *Meloidogyne* spp. (CASTAGNONE-SERENO et al. 1993, 1994; ROBERTS, 1995; DEVRAN e SÖGÜT, 2010; VERDEJO-LUCAS et al., 2012). Estas populações virulentas de *Meloidogyne* spp., podem ocorrer naturalmente, ou seja, sem exposição prévia a tomateiros portadores do gene *Mi-1.2* (CASTAGNONE-SERENO, 2002; BLEVE-ZACHEO et al., 2007; IBERKLEID et al., 2014; SILVA et al., 2019). Essas também podem resultar da seleção após exposições repetidas de tomateiros com resistência ao gene *Mi-1.2,* tanto em casa de vegetação quanto em condições de campo (ROBERTS, 1995; ROBERTS e THOMASON, 1989; CASTAGNONE-SERENO et al., 1993; XU et al., 2001).

Os mecanismos pelos quais os nematoides fitoparasitas são capazes de superar os genes de resistência ainda não foram elucidados. No entanto, em uma análise comparativa de linhagens isogênicas de *M. incognita*, selecionadas por sua avirulência ou virulência ao gene *Mi*-1.2 por 25 gerações, permitiu a identificação de um gene, (denominado como *map-1*) que codifica uma proteína secretada por anfídios do nematoide, presente nas linhas avirulentas e ausentes nas correspondentes linhas virulentas (SEMBLAT et al, 2001). Foi especulado que esse gene pode estar localizado em uma região instável do genoma do nematoide, podendo ser excluída sem afetar o nematoide. Além disso, o *map*-1 pode estar envolvido nas etapas iniciais do reconhecimento entre plantas resistentes e nematoides avirulentos (SEMBLAT et al, 2001).

Estudos mais recentes sugerem que a variação do número de cópias de genes

pode ser responsável pela variação genética e adaptação de populações virulentas do nematoide das galhas ao gene *Mi*-1.2. Castagnone-Sereno et al., (2019) ao analisar duas populações de nematoides-das-galhas *M. incognita Mi*-1.2 virulentas e outras duas populações de *M. incognita* avirulentas, quase isogênicas, identificaram 33 genes que mostraram diminuições no número de cópias nas populações virulentas em comparação com as avirulentas. Variações no número de cópias de genes já foram observadas em outros organismos assexuais e acredita-se ser um dos mecanismos genômicos usados por esses organismos para lidar com a pressão seletiva e a adaptação aos seus ambientes (DUVAUX et al. 2015; MINNING et al. 2011; SPRING et al. 2013).

Por fim, outro fator que apresenta influência na expressão da resistência é a dosagem alélica do gene *Mi*-1.2 em cultivares de tomateiro. Jacquet et al., (2005) ao analisarem genótipos de tomateiro homozigotos e heterozigotos para o gene *Mi*-1.2 observaram reprodução significativamente maior nos genótipos heterozigotos em relação aos homozigotos. Da mesma forma, Maleita et al., (2011) demonstraram que um maior número de alelos do gene *Mi-1.2* está associado a uma diminuição no fator de reprodução de *M. hispanica* em tomateiro. Em outro estudo, Iberkleid et al., (2014), verificaram que populações avirulentas de *M. javanica* não conseguiram se reproduzir em genótipos homozigotos, sendo observado reprodução apenas nos genótipos heterozigotos.

Além do gene *Mi*-1.2, outros nove genes de resistência foram geneticamente caracterizados e provaram ser estáveis ao calor a temperaturas acima de 28 °C (*Mi*-2, *Mi*-4, *Mi*-5, *Mi*-6 e *Mi*-9) (CAP et al. 1993; VEREMIS e ROBERTS, 1996a, 1996b; VEREMIS et al., 1999), resistentes a populações virulentas ao *Mi*-1.2 (*Mi*-7, *Mi*-8) (VEREMIS e ROBERTS. 1996a), ou compartilharem ambas as propriedades (*Mi*-3) (YAGHOOBI et al., 1995). Entre esses genes com potencial uso em melhoramento apenas os genes *Mi*-3 e *Mi*-9 foram mapeados e clonados YAGHOOBI et al. (1995).

O gene *Mi*-3 foi mapeado no braço curto do cromossomo 12 de plantas de *S. peruvianum* (YAGHOOBI et al., 1995; HUANG et al., 2004) e confere resistência às populações de nematoides-das-galhas virulentas *Mi-.1.2,* e a temperaturas acima de 30 °C (YAGHOOBI et al. 1995; VEREMIS e ROBERTS, 1996c). No entanto, a introdução dessa característica por meio de esquemas tradicionais (popinização) não tem apresentado sucesso (DOGANLAR et al., 1997; MORETTI et al., 2002). Dessa forma, a estratégia é clonar o gene *Mi*-3 de *S. peruvianum* e transferir o gene para tomates

cultivados por transformação de plantas DOGANLAR et al. (1997).

O gene *Mi*-9 foi introgredido da espécie selvagem do tomateiro, *S. arcanum*, acesso LA 2157 e está localizado no braço curto do cromossomo 6, no mesmo intervalo genético que o *Mi-1*.2 (JABLONSKA et al., 2007). *S. O* acesso LA 2157 pertence pertencente ao antigo complexo racial *S. peruvianum* 'Maranon' (PERALTA et al., 2005). Recentemente, uma análise genética molecular do locus *Mi*-9 identificou sete homólogos de *Mi*-1.2 na região cromossômica correspondente e outras experiências de silenciamento de genes induzidos por vírus mostraram que o *Mi*-9 é de fato um homólogo do *Mi*-1.2 (JABLONSKA et al., 2007).

Estudos têm mostrado que o gene *Mi*-9 presente no acesso LA 2157 controla resistência contra populações avirulentas ao *Mi*-1.2 a 25 °C e 32 °C, indicando que o acesso apresentaa resistência estável ao calor (AMMIRAJU et al., 2003; VEREMIS e ROBERTS, 1996c). Por outro lado, Jablonska et al., (2007) em seu estudo verificou que a maioria das plantas LA 2157 (*Mi*-9) apresentaram resistência comprometida a 32 °C, indicando que a resistência estável ao calor é mediada por um outro homólogo do *Mi*-1.2.

Embora estudos mostrem que outros genes controlem resistência aos nematoides-das-galhas, o único disponível comercialmente é o gene *Mi*-1.2 (ROSSI et al., 1998). O gene *Mi*-1.2 apresenta múltiplos efeitos, pois além de controlar nematoides-das-galhas, o gene apresenta resistência contra certos biótipos de pulgões da batata (*Macrosiphum euphorbiae)* e a moscas-branca (*Bemisia tabaci)* (ROSSI et al., 1998; VOS et al., 1998; KALOSHIAN et al., 1995; NOMBELA et al., 2003). Outro aspecto positivo associado ao *locus* contendo o gene *Mi*-1.2 é a presença de uma estreita ligação com outros genes de interesse, entre eles; os genes *Cf*-2 e *Cf*-5 que agregam resistência a algumas raças do fungo *Cladosporium fulvum*, *Ol*-4/*Ol*-6 que controlam *Oidium neolycopersici* e o gene *Am* que controla o vírus do mosaico da alfafa (DIXON et al., 1996, 1998; SEIFI et al., 2011; PARRELLA et al., 2004). Além disso, a resistência ao tomato yellow leaf curl virus (*TY*1/ *TY*3) e *Ralstonia solanacearum* (*Bw*-5) também foram mapeados próximos dessa região mas em repulsão em relação a cópia ativa do gene *Mi*-1.2 (VERLAAN et al., 2013; THOQUET et al., 1996).

2.4.4 Resposta de defesa

Estudos têm mostrado que a expressão fenotípica da resistência mediada pelo gene *Mi-1.2* é caracterizada por uma reação hipersensível (RH) precoce que envolve necrose localizada de células da hospedeira, desorganização celular e desenvolvimento restrito de nematoides no local da infecção (DROPKIN, 1969; WILLIAMSON e HUSSEY, 1996). Segundo Paulson e Webster (1972) as primeiras indicações visíveis da resposta hipersensível ocorrem às 42 horas após a inoculação das raízes com juvenis de segundo estádio (J2s). A expressão fenotípica de incompatibilidade do nematoide-das-galhas através da reação hipersensível precoce também foi observada em raízes de tomateiro portador do gene *Mi*-3 (REGAIEG e HORRIGUE-RAOUANI, 2012).

2.4.2 Disponibilidade do gene *Mi*-1.2 em porta-enxertos comerciais

Além das cultivares resistentes, outra forma de obter plantas de tomateiro com resistência a nematoide-das-galhas é através do uso de porta-enxerto portador do gene *Mi-1.2.* A enxertia nada mais é do que a união de duas porções de tecido vegetal vivo, visando o crescimento e desenvolvimento de uma única planta. Para que se tenha sucesso na técnica é fundamental que o câmbio do enxerto fique em contato estreito com o câmbio do porta-enxerto (GOTO et al., 2003). A técnica de enxertia começou na Coréia e no Japão no início do século 20 a partir de trabalhos que tinham por objetivo prevenir a fusariose na melancia e somente na década de 80, essa prática chegou ao Brasil com o objetivo de controlar *Ralstonia solanacearum, Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici, Meloidogyne* spp. e *Verticillium dahliae.*

Além de reduzir os danos aos nematoides, os porta-enxertos resistentes são cultivados para ajudar a melhorar a aptidão e o rendimento das plantas (IOANNOU 2001; MIGUEL 2002; RIVARD et al., 2010; OKORLEY et al., 2018). Além disso, o porta-enxerto resistente também foi eficaz na superação de estresses abióticos, como salinidade (CUARTERO et al., 2006; ESTAN et al., 2005; RIVERO et al., 2003), estresse térmico (ABDELMAGEED et al., 2004) e excesso umidade do solo (BLACK et al., 2003). Outro aspecto positivo do uso dos porta-enxertos é que esses apresentam diferentes genes de resistência (MARÍN RODRÍGUEZ, 2005).

Embora o uso de hortaliças enxertadas esteja associado à redução de doenças

e/ou estresses abióticos, também são utilizados em áreas livres de patógenos visando o aumento de produtividade (RUIZ e ROMERO, 1999; YETISIR e SARI, 2003) e elevação da produção tem sido proporcionada pelo aumento da captação de água e nutrientes pelos porta-enxertos FERNANDEZ-GARCIA et al. (2002). Segundo Fernandez-Garcia et al., 2002, a condutância estomática é melhorada em tomateiros com determinados porta-enxertos. Do mesmo modo, a captação de macronutrientes, como fósforo e cálcio, pode ser aumentada usando certos genótipos de porta-enxertos (LEONARDI e GIUFFRIDA, 2006; RUIZ et al., 1996).

De maneira geral, para cultivares como porta-enxertos resistentes, um aspecto que deve ser levado em consideração é a durabilidade dessa resistência, pois se utilizada continuamente por vários anos consecutivos, a probabilidade de perda de resistência se torna maior, podendo surgir suscetibilidade a raças de patógenos que antes não atingiam essas plantas (KOBORI e SANTOS, 2003) ou no caso dos nematoides, até mesmo o surgimento de populações virulentas.

3 CAPITULO I: REAÇÃO DE UM HÍBRIDO HETEROZIGOTO DE TOMATEIRO PORTADOR DO GENE *Mi*-1.2 A 15 ESPÉCIES DE *Meloidogyne.*

REACTION OF A HETEROZYGOUS TOMATO HYBRID BEARING THE *Mi-1.2* GENE TO 15 *Meloidogyne* SPECIES.

GABRIEL[1], M.; KULCZYNSKI[3], S. M.; MUNIZ[1], M. F. B.; BOITEUX[4], L. S.; CARNEIRO[2], R. M. D. G. **Plant Pathology,** v. 69, n.5, p. 944-952, 2020.

[1]Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil
[2]Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF, Brasil
[3]Departamento de Ciências Agronômicas e Ambientais, Universidade Federal de Santa Maria, Frederico Westphalen, RS, Brasil
[4]Embrapa Hortaliças (CNPH), Brasília, DF, Brasil

Resumo: A maioria das espécies de nematoides-das-galhas (NG) (*Meloidogyne* spp.) são polífagas e o tomateiro cultivado (*Solanum lycopersicum*) é um de seus hospedeiros preferenciais, resultando em perdas significativas. Sabe-se que o gene dominante *Mi-1.2* do tomateiro confere resistência às três espécies mais importantes de NGs (*M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria)* e às espécies secundárias tais como *M. ethiopica*, *M. hispanica* e *M. luci*. No entanto, pouca informação está disponível sobre a resistência de tomateiros portadores desse gene contra outras espécies de NGs que infectam o tomateiro no Brasil. Neste estudo, a resistência conferida pelo gene/locus *Mi*-1.2 foi avaliada em populações de 15 espécies de *Meloidogyne*, empregando cultivares de tomateiro Santa Clara (homozigoto recessivo *mi*-1.2/*mi*-1.2, suscetível) e Debora Plus (heterozigoto *Mi*-1.2/*mi*-1.2, resistente). 'Debora Plus' foi suscetível apenas a *M. enterolobii* e *M. hapla*, mas foi resistente a populações brasileiras de *M. arenaria*, *M. ethiopica*, *M. exigua*, *M. hispanica*, *M. incognita*, *M. inornata*, *M. izalcoensis*, *M. javanica*, *M. konaensis*, *M. luci*, *M. morocciensis*, *M. paranaensis* e *M. petuniae*. O gene *Mi*-1.2 está localizado no cromossomo 6 do tomateiro em um cluster de sete genes homólogos da família gênica (NBS-LRR). Dessa for; mais pesquisas são necessárias para confirmar se esse fenótipo de resistência múltipla de *Meloidogyne* spp., é controlado exclusivamente pelo *Mi*-1.2 ou por ação combinada de outros genes em estreita ligação. Esta avaliação da resistência da cultivar Debora Plus a várias espécies de *Meloidogyne* sugere que o gene/locus *Mi*-1.2 pode reduzir as perdas induzidas por uma ampla variedade de *Meloidogyne* spp. Mais estudos utilizando diferentes cultivares resistentes e outras populações de *Meloidogyne* spp., são necessários para confirmar esses resultados.

Palavras chave: Agressividade, Espécies de nematoides-das-galhas, *Solanum lycopersicum*, Suscetibilidade.

Abstract: Many root-knot nematode (RKN) species (*Meloidogyne* spp.) are polyphagous and cultivated tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of their preferential hosts, leading to significant losses. It is known that the dominant *Mi-1.2* gene in tomato confers resistance to the three most important RKN species *M. incognita*, *M. javanica*, and *M. arenaria*, and minor species *M. ethiopica*, *M. hispanica*, and *M. luci*. However, little information is available about resistance of tomatoes carrying this gene to other tomato infecting RKN species. In this study, resistance conferred by the *Mi-1.2* gene/ locus was evaluated against populations of 15 *Meloidogyne* species, employing tomato

cultivars Santa Clara (homozygous recessive *mi-1.2*/*mi-1.2*, susceptible) and Debora Plus (heterozygous *Mi-1.2*/*mi-1.2*, resistant). Debora Plus was susceptible only to *M. enterolobii* and *M. hapla*, and was resistant to the other Brazilian populations of *M. arenaria*, *M. ethiopica*, *M. exigua*, *M. hispanica*, *M. incognita*, *M. inornata*, *M. izalcoensis M. javanica*, *M. konaensis*, *M. luci*, *M. morocciensis*, *M. paranaensis*, and *M. petuniae*. *Mi-1.2* is located on tomato chromosome 6 within a cluster of seven homologous genes of the nucleotide-binding site leucine-rich repeat (NBS-LRR) family; further research is required to confirm if this multiple *Meloidogyne* spp. Resistance phenotype is controlled exclusively by *Mi-1.2* or by combined action of other closely linked genes. This evaluation of resistance of the Debora Plus cultivar to several *Meloidogyne* species suggests that the *Mi-1.2* gene/locus may reduce losses induced by a wide range of *Meloidogyne* spp. Further studies using additional resistant cultivars and other populations of *Meloidogyne* spp. are needed to confirm these results.

Keywords: Aggressiveness, Root-knot nematode species, *Solanum lycopersicum*, Susceptibility

3.1 INTRODUÇÃO

Os nematoides-das-galhas (NGs) do gênero *Meloidogyne* estão entre os principais problemas sanitários da cultura do tomate (*Solanum lycopersicum L)* em todo o mundo (SEID et al., 2015). Até o momento, 18 espécies de *Meloidogyne* foram detectadas no Brasil afetando uma ampla gama de culturas, incluindo o tomateiro, outras hortaliças, frutíferas, soja, café, algodão e feijão (CARNEIRO et al., 2016). A maioria dessas espécies de NG pode infectar naturalmente plantas de tomate, em grandes regiões geográficas ou em áreas mais restritas. No entanto, as espécies predominantes de *Meloidogyne* que infectam o tomateiro no mundo são *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. hapla*, e mais recentemente, *M. enterolobii* (= *M. mayaguensis*) (CARNEIRO et al., 2006: BRITO et al., 2007; EL SAPPAH et al., 2019).

Entre as 18 principais espécies de *Meloidogyne* detectadas no Brasil (CARNEIRO et al., 2016; STEFANELO et al., 2019), *M. exigua*, *M. paranaensis* e *M. incognita* são as mais comuns na cultura do café (*Coffea arabica*), seguida de *M. izalcoensis*, que foi recentemente detectada na região do Triângulo Mineiro (STEFANELO et al., 2019). Essas espécies também têm o tomateiro como hospedeiro. *Meloidogyne enterolobii* foi detectada pela primeira vez no Brasil matando plantas de goiaba (*Psidium guajava*) nos estados de Pernambuco e Bahia (CARNEIRO et al., 2001a e 2016. Posteriormente, essa espécie foi registrada na goiabeira, em diferentes estados brasileiros. Infecções naturais também foram observadas em plantas de tomate

e pimentão (*Capsicum annuum*) resistentes; assim, essa espécie foi considerada virulenta a esses hospedeiros, uma vez que essas plantas são portadoras de genes de resistência aos NGs (CARNEIRO et al., 2006; PINHEIRO et al., 2015). Embora *M. ethiopica* tenha sido detectado no Brasil em plantas de kiwi (*Actinidia deliciosa*) em 2003 (CARNEIRO et al., 2003), é considerado uma espécie extremamente patogênica à videira (*Vitis vinifera*) no Chile (CARNEIRO et al., 2007).

No Brasil também foi relatada parasitando plantas de tomateiro (PINHEIRO et al., 2014). *Meloidogyne hispanica* foi detectada em plantas de abóbora (*Curcubita moscata*) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), nos estados brasileiros da Bahia e Pernambuco (CARNEIRO et al., 2004); o tomateiro também é um dos seus hospedeiros preferenciais. *Meloidogyne inornata* foi registrada na cultura do yacon (*Polymnia sonchifolia*) no estado de São Paulo e, novamente, o tomateiro também foi ientificado como um hospedeiro altamente suscetível (CARNEIRO et al., 2008).

Meloidogyne konaensis foi detectada no estado do Ceará, parasitando quatro culturas: repolho (*Brassica oleracea*), mamão (*Carica papaya*), noni (*Morinda citrifolia*) e feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). Essa espécie não foi capaz de parasitar o cafeeiro, mas o tomateiro também foi identificado como um bom hospedeiro (MONTEIRO et al., 2015). *Meloidogyne luci* foi detectado em infecções naturais, em várias culturas no Brasil, incluindo lavanda (*Lavandula spica*) e descrito por Carneiro et al., (2014); afetando videira, pepino (*Cucumis sativus*), alface (*Lactuca sativa*), brócolis (*B. oleracea* var. *italica*), quiabo (*Abelmoschus esculentus*), soja (*Glycine max*), feijão verde (*Phaseolus vulgaris*), yacon e tomateiro (BELLÉ et al., 2016; CARNEIRO et al., 2016; DIVERS et al., 2019).

Meloidogyne morocciensis foi descrita em porta-enxertos de pêssego (*Prunus persica*) no Marrocos e no Brasil (CARNEIRO et al., 2016; SILVA et al., 2020) é uma espécie polífaga, incluindo o tomateiro como um bom hospedeiro (CARNEIRO et al., 2016). No Brasil, uma população de *M. morocciensis* de Santa Rosa (RS) foi caracterizada como altamente agressiva à soja (MATTOS et al., 2016).

Meloidogyne petuniae foi descrita infectando *Petunia hybrida* no Distrito Federal. Embora tenha tomate, tabaco, ervilha (*Pisum sativum*) e feijão como bons hospedeiros (CHARCHAR et al., 1999), essa espécie não foi mais detectada em levantamentos recentes no Brasil (PINHEIRO et al., 2014).

No Brasil, entre todas estas espécies de *Meloidogyne* previamente descritas que

infectam tomateiros, *M. javanica* e *M. incognita* foram as mais prevalentes. *Meloidogyne ethiopica*, *M. enterolobii* e *M. luci* são outras espécies com menor distribuição nesse hospedeiro (PINHEIRO et al., 2014; CARNEIRO et al., 2016).

No tomateiro, o gene dominante *Mi*-1.2, introgredido a partir do acesso de tomateiro selvagem, *Solanum peruvianum* 'PI 128657' é agora amplamente utilizado comercialmente, sendo uma das fontes de resistência mais estudadas para os nematoides parasitas de plantas (SEID et al., 2015). A reação de hipersensibilidade (HR) é o mecanismo de resistência primário desencadeado pela ação do gene *Mi*-1.2, em resposta à penetração dos tecidos radiculares por juvenis de segundo estádio (J2s), resultando em morte celular localizada ao redor do local da infecção (DROPKIN, 1969a).

O gene *Mi*-1.2 está localizado no braço curto do cromossomo 6 do tomateiro, pertencente a um agrupamento (‘cluster’) de sete genes homólogos da família de NBS-LRR (NBS-LRR) (ROSSI et al., 1998; WILLIAMSON, 1998; 1999). Esse agrupamento de genes introgredidos abrange uma região cromossômica de cerca de 400 kb, que quase sempre é transmitida intacta à progênie (ROSSI et al., 1998). Está bem estabelecido que o gene homólogo *Mi*-1.2 é aquele que confere o fenótipo de resistência à maioria das raças/populações de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (WILLIAMSON, 1999; BRITO et al., 2007; THIES et al., 2008) e também às populações de *M. ethiopica* e *M. luci* (SANTOS et al., 2019), além de população do pulgão da batata (*Macrosiphum euphorbidae*) (KALOSHIAN et al., 2000).

Por outro lado, a resistência mediada por *Mi*-1.2 não é expressa em temperaturas do solo acima de 28 °C (DROPKIN, 1969b) e não é eficaz contra o pulgão *Myzus persicae* (GOGGIN et al., 2001). Além disso, gene *Mi*-1.2 não é eficaz contra algumas espécies de NGs, incluindo *M. hapla* e *M. enterolobii*, e é apenas parcialmente eficaz contra *M. hispanica* (MALEITA et al., 2011; ELLING, 2013). Todavia, populações virulentas de *M. incognita* e *M. javanica* que quebram a resistência do *Mi*-1.2 (DEVRAN e SOGUT, 2010; TZORTZAKAKIS et al., 2014) foram relatadas como emergentes sob distintas circunstâncias de pressão de seleção: envolvendo nenhuma exposição prévia (IBERKLEID et al., 2014) ou após exposição persistente a plantas resistentes (XU et al., 2001).

Como mencionado anteriormente, muitas espécies de NGs são polifágicas e o tomateiro é um de seus hospedeiros preferenciais e/ou primários, levando a perdas significativas de produtividade e qualidade, especialmente em cultivo protegido. No

entanto, pouca informação está disponível sobre a reação de cultivares de tomateiro portando o gene/*locus Mi*-1.2 em relação a populações de espécies de *Meloidogyne* que foram detectadas no Brasil (CARNEIRO et al., 2016). Nesse contexto, o principal objetivo do presente estudo foi avaliar a resistência conferida pelo gene/*locus Mi*-1.2 da cultivar de tomateiro 'Debora Plus' a 15 espécies de *Meloidogyne* que ocorrem no Brasil e em muitas áreas tropicais e subtropicais.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Populações de NGs e caracterização das espécies pela enzima esterase

As populações utilizadas no presente estudo fazem parte de uma coleção de *Meloidogyne* spp., obtidas em estudos anteriores e provenientes de diferentes áreas de produção do Brasil, sendo purificadas (CARNEIRO e ALMEIDA, 2001b) e mantidas em tomateiro suscetível cv. Santa Clara (Sakata), em casa de vegetação. A identificação das 15 espécies selecionadas para este estudo (Tabela 1) foi confirmada pelo fenótipo da enzima esterase (EST), segundo Carneiro e Almeida (2001b) e Carneiro et al., (2016), utilizando uma população de como referência em cada gel. As populações de *Meloidogyne* spp. foram obtidas a partir de raízes infectadas de tomateiro 'Santa Clara' mantidas em casa de vegetação, com exceção de *M. exigua*, a qual foi proveniente de raízes infectadas de cafeeiro 'Mundo Novo'.

Tabela 1 - Populações brasileiras de *Meloidogyne* spp., usadas no presente estudo.

Código	Espécie de *Meloidogyne*	Hospedeiro original	Origem geográfica	Fenótipo de esterase [a]
1	*M. javanica*	*Nicotiana tabacum*	Londrina, PR	J3
2	*M. incognita* raça 3	*Gossypium hirsutum*	Luiz Eduardo Magalhães, BA	I2
3	*M. arenaria* raça 2	*Solanum lycopersicum*	Londrina, PR	A2
4	*M. morocciensis*	*Glycine max*	Santa Rosa, RS	A3
5	*M. hapla*	*Fragaria ananassa*	Pelotas, RS	H1
6	*M. ethiopica*	*Actinidia deliciosa*	Farroupilha, RS	E3
7	*M. inornata*	*Smallanthus sonchifolius*	Capão Bonito, SP	I3
8	*M. luci*	*Cucumis sativus*	Vargem Bonita, DF	L3
9	*M. konaensis*	*Brassica oleracea*	Serra da Ibiapaba, CE	Ko3
10	*M. paranaensis*	*Coffea arabica*	Rolândia, PR	P1
11	*M. izalcoensis*	*C. arabica*	Indianópolis, MG	I4

12	*M. hispanica*	*Cucurbita moschata*	Várzea da roça, BA	Hi 3
13	*M. petuniae*	*Petunia hybrida*	Brasília, DF	Pe 2
14	*M. exigua* raça 2	*C. arabica*	Varginha, MG	E1
15	*M. enterolobii*	*Psidium guajava*	Petrolina, PE	En 2

Estados brasileiros: PR, Paraná; BA, Bahia; RS, Rio Grande do Sul; SP, São Paulo; DF, Distrito Federal; CE, Ceará; MG, Mato Grosso; PE, Pernambuco.
[a]: Fenótipo de esterase segundo Carneiro et al. (2016).

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

Duas cultivares contrastantes de tomateiro foram utilizados nesses ensaios: o 'Santa Clara' (cv. brasileira) de polinização aberta (como padrão suscetível) e o híbrido 'Debora Plus' (Sakata) como fonte de resistência. Três outras cultivares de tomateiro foram utilizadas como controle: Viradooro (Embrapa; homozigoto resistente), BRS Zamir (Agrocinco Embrapa; homozigoto suscetível) e BRS Nagai (Agrocinco Embrapa; heterozigoto resistente). O DNA total foi extraído de três plantas por cultivar, a fim de confirmar a presença/ausência do gene/*locus Mi*-1.2. Uma metodologia CTAB 2 x modificada foi empregada para purificação de ácidos nucléicos (BOITEUX et al., 1999), utilizando amostras de folhas apicais jovens de diferentes cultivares. O *Pellet* de DNA foi lavado cuidadosamente com etanol a 70%. Os tubos de microcentrífuga foram então colocados em uma estufa a 37 °C por 20 min, e ressuspensos em 100 mL de tampão Tris-EDTA + RNase. As amostras purificadas foram agitadas/homogeneizadas em vórtice e armazenadas em um freezer (-20°C).

Os ensaios de PCR foram realizados com o par de iniciadores Mi23F (5'-TGG AAA AAT GTT GAA TTT CTT TTG-3') e Mi23R (5'-GCA TAC TAT ATG GCT TGT TTA CCC-3'), que foi considerado o marcador molecular codominante mais confiável para a detecção de alelos contrastantes no *Mi*-1.2 gene/*locus* (Seah et al., 2007; Bhavana et al., 2019). O volume final da reação foi de 12,5 μL e consistiu em 1,25 μL de tampão Taq polimerase 10 × (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3; KCl 500 mM), 1,25 μL de dNTPs (2,5 mM, Invitrogen), 0,5 μL de cada primer (0,4 mM), 0,75 μL de MgCl2 (50 mM), 0,2 μL de DNA polimerase *Taq* DNA polimerase (5 U/ μL, Invitrogen), 0,5 μL de água milli-Q e 3 μL de suspensão de DNA (ajustado para 20 ng/ μL). As amplificações foram realizadas com os seguintes parâmetros: passo inicial de desnaturação a 94°C por 3 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 57°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto; e uma etapa final de extensão de 72°C por 10 min. Foi adicionado azul de bromofenol (4 μL) em cada amostra, e os fragmentos de DNA amplificados

foram separados por eletroforese em tampão TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM), em um gel de agarose a 1,5% suplementado com brometo de etídio, a 120 V por um período de aproximadamente 3 horas. Os géis foram fotografados sob luz UV. O marcador 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) foi colocado para localização do perfil de amplificação

3.2.3 Condições de crescimento do tomateiro, delineamento experimental, inoculação e procedimentos de avaliação

Dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), durante o inverno (de junho a agosto, de 14 a 25 °C, temperatura do ar) e no verão (de dezembro a fevereiro, de 20 a 28 °C, temperatura do ar). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 8 repetições. A unidade experimental consistiu de uma planta por vaso de 5L, contendo uma mistura 2:1 (vol/vol) de solo e substrato Bioplant, previamente autoclavada. Quinze dias após o transplante, as mudas de ‘Santa Clara’ e ‘Debora Plus’ foram inoculadas com 5.000 ovos + juvenis de segundo estágio (J2). Noventa dias após a inoculação, as raízes foram lavadas e avaliadas quanto ao peso fresco. Posteriormente, as raízes foram processadas, de acordo com a metodologia de Hussey e Barker (1973), usando um liquidificador em vez de agitação manual por 30 segundos. Os ovos e J2s foram contados, determinando o número total de nematoides (população final), e o fator de reprodução (FR = população final/5.000) foi calculado, de acordo com OOSTENBRINK (1966).

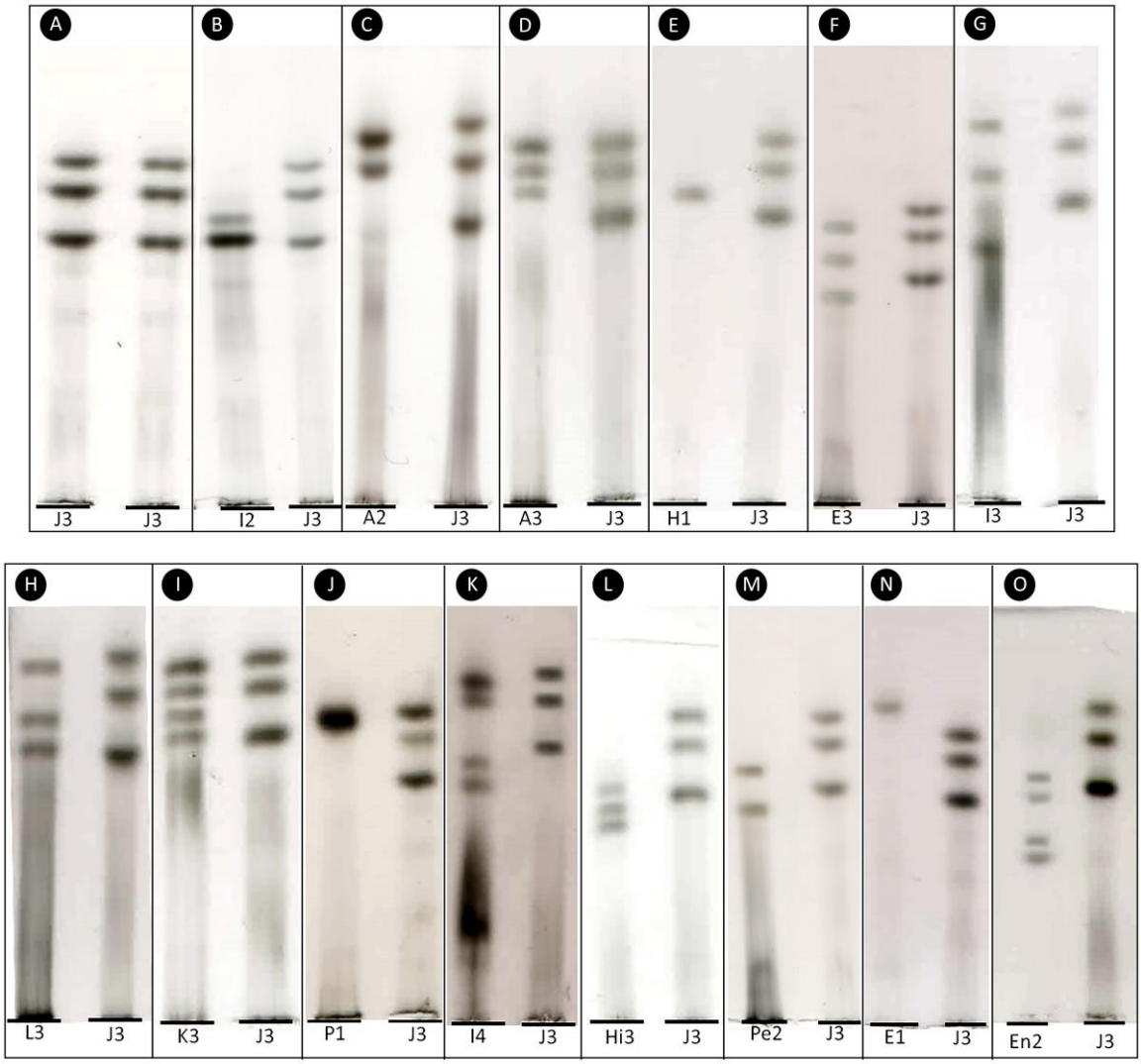
As reações das variedades de tomateiro foram classificadas de acordo com os conceitos de Hussey e Janssen (2002), que consideram resistentes plantas com redução do FR acima de 90% em relação à planta suscetível (controle). Em ambos os experimentos foram realizadas análises estatísticas para os valores de massa fresca da raiz, número de ovos por grama de raiz e FR. Inicialmente, foi verificado se os dados apresentavam distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados que não atenderam os pressupostos de normalidade foram transformados em log (x+1) antes da análise da variância. A análise de variância foi realizada para os experimentos após a transformação dos dados e o teste de Scott-Knott ($p<0,05$) foi usado para avaliar as diferenças entre as espécies de NGs, usando o pacote estatístico SAS.

3.3 RESULTADOS

Quinze populações de *Meloidogyne* spp., (Tabela 1) foram previamente confirmadas quanto ao status taxonômico, através dos perfis da enzima esterase (EST). Estas espécies apresentaram fenótipos de EST típicos de: *M. javanica* (EST J3, Rm: 1,00, 1,25, 1,40), *M. incognita* (EST I2, Rm: 1,00, 1,05), *M. arenaria* (EST A2, Rm: 1,20, 1,30), *M. morocciensis* (EST A3, Rm: 1,10, 1,20, 1,30), *M. hapla* (EST H1, Rm: 1,10), *M. ethiopica* (EST E3, Rm: 0,90, 1,05, 1,20), *M. inornata* (EST I3, Rm: 0,80, 1,10, 1,25), *M. luci* (EST L3, Rm: 0,95, 1,10, 1,25), *M. konaensis* (EST Ko3, Rm: 1,00, 1,10, 1,15, 1,30), *M. paranaensis* (EST P1, Rm: 1,30), *M. izalcoensis* (EST I4, Rm: 0,86, 0,96, 1,24, 1,30), *M. hispanica* (EST Hi3, Rm: 0,80, 0,90, 1,05), *M. petuniae* (EST Pe2, Rm : 0,95, 1,10), *M. exigua* (EST E1, Rm: 1,5) e *M. enterolobii* (EST En2, Rm: 0,7, 0,75, 0,9, 0,95) (Figura 1).

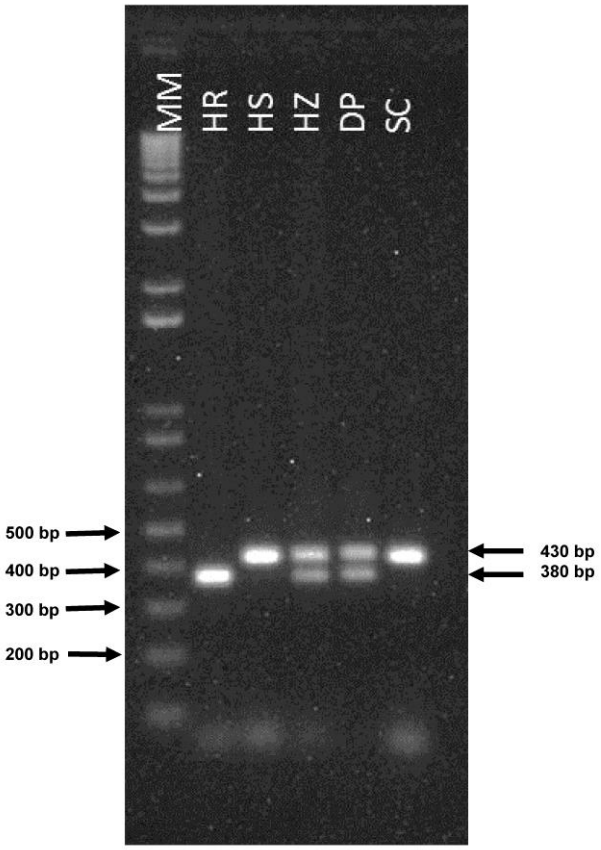
Os ensaios da PCR realizados com o par de iniciadores *Mi23F*/*Mi23R* confirmaram que as cultivares Viradooro, BRS Zamir e BRS Nagai (utilizadas como controle) mostraram padrões de bandas do tipo homozigoto homozigotos resistente (somente com a banda de 380 pb), homozigoto suscetível (somente com a banda de 430 pb) e heterozigoto resistente (apresentando ambas bandas de 380 e 430 pb), respectivamente (Figura 2). A cultivar Santa Clara foi identificada como homozigota suscetível com banda de 430 pb e o híbrido Debora Plus como heterozigoto resistente, apresentando duas bandas de 380 e 430 pb (Figura 2).

Figura 1 - Fenótipos de esterase (EST) observados em populações de *Meloidogyne* spp., coletadas no Brasil. a) EST J3 = *M. javanica*, a população de referência; (b) EST I2 = *M. incognita*; (c) EST A2 = *M. arenaria*; (d) EST A3 = *M. morocciensis;* (e) ESTH1 = *M. hapla*; (f) EST E3 = *M. ethiopica*; (g) EST 13 = *M. inornata*; (h) EST L3 = *M. luci*; (i) EST Ko3 = *M. konaensis*; (j) EST P1 = *M. paranaensis*; (k) EST I4 = *M. izalcoensis*; (l) EST Hi3 = *M. hispanica*; (m) EST Pe2 = *M. petuniae*; (n) EST E1 = *M. exigua*; (o) EST En2 = *M. enterolobii.*



Portanto, essas duas cultivares foram usadas como materiais genéticos contrastantes em todos os ensaios de resistência subsequentes com as 15 espécies selecionadas de *Meloidogyne* spp.

Figura 2 - Detecção da presença/ausência do gene *Mi*-1.2 para resistência a *Meloidogyne* spp., nas cultivares de tomate Debora Plus (DP) e Santa Clara (SC) e nas cultivares controle Viradooro (HR; homozigoto resistente), BRS Zamir (HS; homozigoto suscetível) e BRS Nagai (HZ; heterozigoto resistente). A PCR foi realizada utilizando o par de iniciadores específico Mi23F/Mi23R. MM = marcador molecular1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). A PCR do DNA do Debora Plus produziu duas bandas de 380 e 430 pb, indicando que esta cultivar é heterozigótica *Mi*-1.2/*mi*-1.2 neste locus e 'Santa Clara' produziu uma única amplificação de 430 pb, indicando que esta cultivar é homozigota suscetível (*mi*-1.2/*mi*-1.2).



As Tabelas 2 e 3 ilustram a variabilidade observada na agressividade das 15 espécies de *Meloidogyne*. Houve variação na massa fresca da raiz, número de ovos por grama de raiz e FR no ensaio nº 1 (verão, 20–28°C) e no ensaio nº 2 (inverno, 14–25°C) no 'Debora Plus' e 'Santa Clara'. Houve uma diferença evidente entre resistência e suscetibilidade, o que significa que a análise estatística não foi necessária para sua distinção. As diferenças nos valores de FRs foram significativas entre a cultivar suscetível e resistente. Nos dois ensaios, 'Debora Plus' foi suscetível apenas a *M. enterolobii* (FR: 105,0 e 78,6) e *M. hapla* (FR: 22,5 e 28,5) e apresentou reação resistente (R) com FR muito baixo para todas as outras 13 espécies (*M. javanica*, *M.*

incognita, *M. arenaria*, *M. morocciensis*, *M. ethiopica*, *M. inornata*, *M. luci*, *M. konaensis*, *M. paranaensis*, *M. izalcoensis*, *M. hispanica*, *M. petuniae* e *M. exigua*).

Todas as espécies de *Meloidogyne* foram capazes de se reproduzir no controle suscetível 'Santa Clara' nos dois ensaios. No ensaio nº 1, os valores de FR em Santa Clara variaram de 18,9 a 148,7, sendo *M. enterolobii* (RF: 148,7) a espécie mais agressiva, seguida por *M. ethiopica* (FR: 134,5) e *M. javanica* (FR: 123,1) (Tabela 2); no ensaio nº 2, os valores de FR variaram de 10,2 a 99,9 e *M. enterolobii* foi novamente a espécie com maior agressividade (Tabela 3).

No experimento nº 1, *M. enterolobii* exibiu FR de 148,7 e *M. hapla* apresentou FR de 55,7. No nº 2, os valores de FR dessas espécies de NGs foram 99,9 e 23,2, respectivamente. Nos dois experimentos, os menores valores de FR foram obtidos para a espécie *M. exigua*, em ambas as cultivares, reforçando a noção de que o tomateiro não é um hospedeiro preferencial dessa espécie do NGs.

Tabela 2 - Massa fresca da raiz, número de ovos por grama de raiz, fator de reprodução (FR) e reação das cultivares de tomateiro Santa Clara (homozigota suscetível; *mi*-1,2/*mi*-1,2) e Debora Plus (híbrido heterozigoto resistente; *Mi*-1,2/*mi*-1,2) quando inoculados com 5.000 ovos / J2 de 15 *Meloidogyne* spp., durante o verão (dezembro a fevereiro, 20–28 °C) em Brasília, DF, Brasil.

Espécie de *Meloidogyne*	Santa Clara				Debora Plus			
	Massa fresca de raiz	ovos /g/raiz	FR	Reação[a]	Massa fresca de raiz	ovos /g/raiz	FR	Reação[a]
M. javanica	120,5 a	5107,9 a	123,1a	S	73,6 a	54,2 c	0,8c	R
M.incognita raça 3	98,0 b	4561,2 a	89,0b	S	70,5 a	63,8 c	0,9c	R
M. arenaria raça 2	105,3 a	4686,6 a	98,7b	S	65,4 b	45,9 c	0,6c	R
M. morocciensis	85,4 b	4648,7 a	79,4b	S	58,7 b	25,6 c	0,3c	R
M. hapla	78,7 c	3538,8 b	55,7c	S	55,9 b	2012,5 b	22,5b	S
M. ethiopica	142,5 a	4719,3 a	134,5a	S	64,2 b	93,5 c	1,2c	R
M.inornata	122,0 a	4004,1 a	97,7b	S	60,3 b	66,3 c	0,8c	R
M. luci	93,8 b	4488,0 a	84,2b	S	78,4 a	31,9 c	0,5c	R
M. konaensis	107,7 a	3899,7 b	84,0b	S	75,5 a	59,6 c	0,9c	R
M. paranaensis	75,3c	2343,9 b	35,3d	S	59,8 b	50,2 c	0,6c	R
M. izalcoensis	65,4c	3470,9 b	45,4c	S	68,2 a	51,3 c	0,7c	R
M. hispanica	84,4 b	2286,7 b	38,6d	S	56,7 b	17,6 d	0,2c	R
M. petunia	95,5 b	1287,9 c	24,6d	S	71,4 a	21,0 d	0,3c	R
M. exigua raça 2	73,4 c	1287,5 c	18,9e	S	69,7 a	0,72 e	0,1c	R
M. enterolobii	138,9 a	5352,8 a	148,7a	S	89,9 a	5867,6 a	105,0a	S
CV%	35,4	32,7	38,05		32,5	2,4	18,05	

Os valores médios seguidos pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste

de Scott–Knott com 5% de probabilidade. Abreviação: CV%, coeficiente de variação. ª S, suscetível; R, resistente.

Tabela 3 - Massa fresca da raiz, número de ovos por grama de raiz, fator de reprodução (FR) e reação das cultivares de tomateiro Santa Clara (homozigota suscetível; *mi*-1,2/*mi*-1,2) e Debora Plus (híbrido heterozigoto resistente; *Mi*-1,2/*mi*-1,2) quando inoculado com 5.000 ovos/J2 de 15 *Meloidogyne* spp., no inverno (junho a agosto, 14–25 °C) em Brasília, DF, Brasil.

Espécie de *Meloidogyne*	Santa Clara				Débora			
	Massa fresca de raiz	Ovos /g/raiz	FR	Reação[a]	Massa fresca de raiz	Ovos /g/raiz	FR	Reação[a]
M. javanica	48,2 b	5435,7a	52,4b	S	34,7 a	57,6 b	0,4c	R
M.incognita raça 3	50,7 a	3816,6 b	38,7c	S	38,5 a	39,0 b	0,3c	R
M. arenaria raça 2	60,6 a	2871,3c	34,8c	S	28,6 b	139,9 b	0,8c	R
M. morocciensis	66,4 a	3131,0b	41,6 d	S	35,5 a	98,6 b	0,7c	R
M. hapla	54,8 a	2116,8c	23,2d	S	37,8 a	3769,8 a	28,5b	S
M. ethiopica	45,4 b	5143,2 a	46,7b	S	29,4 b	85,04 b	0,5c	R
M.inornata	66,7 a	3579,3b	32,5c	S	36,6 a	81,9 b	0,6c	R
M. luci	39,4 b	3515,2b	26,7d	S	27,9 b	71,7 b	0,4c	R
M. konaensis	43,4 b	5530,0a	48,0b	S	32,4 a	108,03 b	0,7c	R
M. paranaensis	52,7 a	1783,7c	18,8e	S	28,6 b	87,4 b	0,5c	R
M. izalcoensis	43,3 b	3221,7b	27,9d	S	27,8 b	125,9 b	0,7c	R
M. hispanica	39,4 b	2512,7c	19,8e	S	37,7 a	13,27 c	0,1c	R
M. petunia	44,5 b	1404,5c	12,5e	S	28,7 b	69,7 b	0,4c	R
M. exigua raça 2	47,4 b	1075,9c	10,2e	S	29,2 b	1,72 c	0,01b	R
M. enterolobii	68,8 a	7260,2 a	99,9a	S	48,2a	8153,5 a	78,6 a	S
CV%	36,3	38,4	36,05		33,5	38,6	16,5	

Os valores médios seguidos pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott – Knott com 5% de probabilidade. Abreviação: CV%, coeficiente de variação.
[a]S, suscetível, R, resistente.

3.4 DISCUSSÃO

As espécies do gênero *Meloidogyne* compõem um grupo de nematoides altamente agressivos e economicamente importantes, pois pode infectar uma ampla gama de culturas: hortaliças, fruteiras, soja, café, algodão e feijão, entre outros. Atualmente, mais de 100 espécies de *Meloidogyne* foram descritas em todo o mundo (HUNT e HANDOO, 2009). No Brasil, *M. javanica, M. incognita* e algumas espécies como *M. ethiopica*, *M. enterolobii* e *M. hapla* com menor distribuição são predominantes em solos cultivados, principalmente em associação com a cultura do tomateiro

(PINHEIRO et al., 2014).

Nossos resultados demonstraram pela primeira vez que, além da resistência a *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. ethiopica*, *M. hispanica* e *M. luci*, o gene/*locus Mi*-1.2 de 'Debora Plus' confere resistência a sete outras espécies de NGs encontradas no Brasil: *M. exigua*, *M. inornata*, *M. izalcoensis*, *M. konaensis*, *M. morocciensis*, *M. paranaensis* e *M. petuniae*. A virulência das populações de *M. enterolobii* e *M. hapla* no híbrido de tomateiro portador do gene/*locus Mi*-1.2 está de acordo com relatos anteriores no Brasil (BRITO et al., 2007) e em outros países como Suíça KIEWNICK et al., 2009 e na Tunisia MOLINARI.e MIACOLA, 1997).

O ensaio de PCR com os iniciadores Mi23F/Mi23R mostrou que o marcador molecular codominante é um método confiável para a detecção dos alelos contrastantes no gene/*locus Mi*-1.2 (BHAVANA et al., 2019). Curiosamente, *M. enterolobii* e *M. hapla* que quebraram a resistência do gene/*locus Mi*-1.2 são filogeneticamente distantes de outras espécies de *Meloidogyne*, com base na região 18S rDNA e na região intergênica das sequências mitocondriais de DNA (TIGANO et al., 2010), sugerindo a presença de distintos processos coevolutivos associados ao reconhecimento das proteínas efetoras do NGs pelo produto do gene/*locus Mi*-1.2.

Nos dois experimentos, *M. enterolobii* se comportou como a espécie mais agressiva e virulenta a ambas as cultivares de tomateiro (Santa Clara e Debora Plus). Esse resultado está de acordo com Cetintas et al. (2007) que observaram galhas radiculares mais severas induzidas por *M. enterolobii* do que nas populações de *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. floridensis*. Vale ressaltar que embora ambas as cultivares de tomateiro tenham sido classificadas como suscetíveis a *M. enterolobii*, o FR do' Santa Clara' foi significativamente maior que o FR do 'Debora Plus' (portadora do gene/*locus Mi*-1.2); esse efeito residual que alterou a capacidade de reprodução de *M. enterolobii*, em variedades de tomateiro portadoras do gene/*locus Mi*-1.2 já foi relatado anteriormente por Brito et al. (2007). No presente estudo, observou-se que ambas as cultivares de tomateiro inoculadas com *M. enterolobii* apresentaram maior massa fresca da raiz do que quando inoculadas com outras espécies de *Meloidogyne*. Esse resultado era de alguma forma esperado e deve estar relacionado ao alto número de galhas grandes e à alta taxa de reprodução causada por essa espécie de NG.

Meloidogyne exigua foi a espécie com os menores níveis de multiplicação no tomateiro suscetível 'Santa Clara'. Essa espécie de NG tem o cafeeiro como hospedeiro

preferencial, embora tenha sido relatada a capacidade de *M. exigua* raça 2 de se reproduzir em tomateiros (MUNIZ et al., 2008). Silva et al. (2008) demonstraram que linhagens de tomateiro portadoras do gene *Mi*-1.2 eram suscetíveis a *M. exigua*. Isso contrasta com os resultados obtidos no presente estudo, onde uma reação resistente associada à presença do gene/*locus Mi*-1.2 foi observada para a população de *M. exigua* aqui estudada. A alta diversidade genética encontrada nas populações de *M. exigua* (MUNIZ et al., 2008) pode explicar a discrepância entre esses dois estudos.

O gene/*locus Mi*-1.2 foi previamente avaliado por seus efeitos de controle em relação a *M. ethiopica* (posteriormente identificado como *M. luci* por Gerič Stare et al., 2017). No estudo de Strajnar e Širca (2011), *M. luci* não foi capaz de se reproduzir no tomateiro resistente cv. Venezia, corroborando com os nossos resultados. O mesmo foi observado para *M. hispanica*, que não foi capaz de se reproduzir no tomateiro cv. Rapid, heterozigoto para o gene/*locus Mi*-1.2 (MALEITA et al., 2011). Santos et al. (2019) também confirmaram que esse mesmo gene confere resistência a *M. ethiopica* e *M. luci*. Os altos níveis de resistência às espécies *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenari*a observados em tomateiros com o gene *Mi*-1.2 por El-Sappah et al. (2019), foram confirmados no presente estudo para populações brasileiras. Vários estudos realizados na Europa e em outros países afirmaram o surgimento de populações virulentas, principalmente de *M. javanica* e *M. incognita*, com reprodução em tomateiro previamente resistente (DEVRAN e SOGUT, 2010; TZORTZAKAKIS et al., 2014). No entanto, nenhuma das populações de *M. javanica* e *M. incognita* empregadas aqui foi capaz de quebrar a resistência controlada pela presença do gene/*locus Mi*-1.2.

Por mais de 60 anos, o gene *Mi*-1.2 tem sido usado efetivamente em cultivares comerciais de tomateiro para reduzir os danos causados por *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* (SEID et al., 2015). Nossos resultados expandiram o espectro de resistência conhecido do gene/*locus Mi*-1.2 para um total de 13 espécies/populações de *Meloidogyne*. Como o *Mi*-1.2 está localizado no cromossomo 6 do tomateiro, em um cluster de sete genes homólogos da família NBS-LRR, pesquisas adicionais devem ser realizadas para confirmar se esse fenótipo a múltiplas espécies de *Meloidogyne* é controlado exclusivamente pelo gene *Mi*-1.2 ou pela ação combinada de outros genes NBS-LRR presentes nesse agrupamento (‘cluster’). Linhagens transgênicas de tomateiro que possuem apenas o gene homólogo *Mi*-1.2 em seus genomas já estão disponíveis (WILLIAMSON, 1999) e poderiam ser usadas para investigar melhor esse

fato.

O presente estudo demonstrou que o gene/*locus Mi*-1.2 no tomateiro 'Debora Plus' conferiu resistência a várias espécies de NGs que são tropicais e subtropicais e infectam várias culturas no Brasil e no mundo. Como mencionado anteriormente, essas espécies NGs são relatadas causando danos econômicos ao tomateiro e outras plantas solanáceas, mas também a uma ampla variedade de culturas economicamente importantes, como café, soja, feijão verde, feijão caupi, kiwi, videira, cucurbitácea, várias espécies de Brassicaceae, cana-de-açúcar, mamão, alface, quiabo e pêssego. Portanto, a ação do amplo espectro do gene/*locus Mi*-1.2 seria interessante no sentido de transferir transgenicamente esse gene de resistência do tomateiro para essas culturas por meio da biotecnologia. Além disso, nossos resultados também sugerem que plantas de tomateiro com o gene/*locus Mi*-1.2 podem ser empregadas em sistemas de rotação e/ou consorciação com uma ampla gama de culturas hospedeiras de NGs, com o objetivo de reduzir a densidade populacional inicial em solos infestados. No entanto, para corroborar esses resultados são necessários mais estudos com outras cultivares resistentes de tomateiro e com mais populações de *Meloidogyne* spp.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELLÉ, C. et al. First report of *M. luci* parasitizing *Glycine max* in Brazil. **Plant Disease,** v. 100, p. 2174, 2016.

BHAVANA, P. et al. Identification of resistance in tomato against root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and comparison of molecular markers for *Mi* gene. **Australasian Plant Pathology**, v. 48, p. 93–100, 2019.

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

BRITO, J.A. et al. Effects of the *Mi-1*, *N* and *Tabasco* genes on infection and reproduction of *Meloidogyne mayaguensis* on tomato and pepper genotypes. **Journal of Nematology,** v. 39, p. 327–332, 2007.

CARNEIRO, R. M. D. G.; MONTEIRO, J. M. S.; SILVA, U. C.; GOMES, G. Gênero *Meloidogyne*: diagnose através de eletroforese de isoenzimas e marcadores SCAR. In: OLIVEIRA, C. M. G.; SANTOS, M. A.; CASTRO, L. H. S. (Ed.) **Diagnose de Fitonematoides.** Campinas, Brazil: Millennium Editora Ltda, p. 47–70, 2016.

CARNEIRO, R. M. D. G. et al. *Meloidogyne luci* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising different crops in Brazil, Chile and Iran. **Nematology,** v. 16, p. 289-301, 2014.

CARNEIRO, R.M.D.G. et al. Additional information on *Meloidogyne inornata* Lordello, 1956 (Tylenchida: Meloidogynidae) and its characterisation as a valid species. **Nematology,** v. 10, p. 123–136, 2008.

CARNEIRO, R.M.D.G. et al. *Meloidogyne ethiopica*, a major root-knot nematode parasitising *Vitis vinifera* and other crops in Chile. **Nematology,** v. 9, p. 635-641, 2007.

CARNEIRO, R. M. D. G. et al. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* parasitando plantas de tomate e pimentão resistentes à meloidoginose no estado de São Paulo. **Nematologia Brasileira,** v. 30, p. 81–86, 2006.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; GOMES, A. C. M. M. Primeiro registro de *Meloidogyne hispanica* Hirschmann, 1986 em abóbora no Estado da Bahia, Brasil. **Nematologia Brasileira,** v. 28, n. 2, p. 215-218, 2004.

CARNEIRO, R.M.D.G. et al. Primeiro registro de *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968, em plantas de quivi no Brasil e reação de diferentes plantas hospedeiras. **Nematologia Brasileira,** v. 27, p. 151-158, 2003.

CARNEIRO, R. M. D. G.; MOREIRA, W. A.; ALMEIDA, M. R. A.; GOMES, A. C. M. M. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Brasil. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 25, n. 2, p. 223-228, 2001a.

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, p. 35–44, 2001b.

CETINTAS, R. et al. Pathogenicity and reproductive potential of *Meloidogyne mayaguensis* and *M. floridensis* compared with three common *Meloidogyne* spp. **Nematropica,** v. 37, p. 21–32, 2007.

CHARCHAR, J. M.; EISENBACK J. D.; HIRSCHMANN, H. *Meloidogyne petuniae* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitic on petunia in Brazil. **Journal of Nematology**, v. 31, p. 81–91, 1999.

DEVRAN, Z.; SOGUT, M. A. Occurrence of virulent root-knot nematode populations on tomatoes bearing the *Mi* gene in protected vegetable-growing areas of Turkey. **Phytoparasitica,** v. 38, p. 245–251, 2010.

DIVERS, M. et al. Diversity of plant-parasitic nematodes parasitizing grapes in southern Brazil. **Tropical Plant Pathology,** v. 44, p. 401–408, 2019.

DROPKIN, V. H. Cellular responses of plants to nematode infections. **Annual Review of Phytopathology,** v. 7, p. 101–122, 1969a.

DROPKIN, V. H. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. **Phytopathology,** v. 59, p. 1632–1637, 1969b.

ELLING, A. A. Major emerging problems with minor *Meloidogyne* species. **Phytopathology,** v. 103, p. 1092–1102, 2013.

EL-SAPPAH, A. H. et al. Tomato natural resistance genes in controlling the root-knot nematode. **Genes,** v. 10, p. 925, 2019.

GERIČ STARE, B. G. et al. Reported populations of *Meloidogyne ethiopica* in Europe identified as *Meloidogyne luci*. **Plant Disease,** v. 101, p. 1627–1632, 2017.

GOGGIN, F. L.; WILLIAMSON, V. M.; ULLMAN, D. E. Variability in the response of *Macrosiphum euphorbiae* and *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) to the tomato resistance gene *Mi*. **Environmental Entomology,** v. 30, p. 101–106, 2001.

HUNT, D. J.; HANDOO, Z. A. Taxonomy, identification and principal species. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Ed.) **Root-knot Nematodes**. Cambridge, USA: CABI International, p. 55–97, 2009.

HUSSEY, R. S.; JANSSEN, G. J. W. Root-knot nematode: *Meloidogyne* species. In: STARR, J.L., COOK, R.; BRIDGE, J. (Ed) **Plant Resistance to Parasitic Nematodes.** Wallingford, UK: CAB International, p. 43–70, 2002.

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

IBERKLEID, I. et al. Responses of tomato genotypes to avirulent and *Mi*-virulent *Meloidogyne javanica* isolates occurring in Israel. **Phytopathology**, v. 104, p. 484–496, 2014.

KIEWNICK, S; DESSIMOZ, M; FRANCK, L. Effects of the *Mi*-1 and the N root-knot nematode-resistance gene on infection and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and pepper cultivars. **Journal of Nematology**, v. 41, n. 2, p. 134, 2009.

KALOSHIAN, I.; KINSEY, M.G.; WILLIAMSON, V.M.; ULLMAN, D. E. *Mi*-mediated resistance against the potato aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae) limits sieve element ingestion. **Environmental Entomology,** v. 29, p. 690–695, 2000.

MALEITA, C. M. et al. Effect of the *Mi* gene on reproduction of *Meloidogyne hispanica* on tomato genotypes. **Nematology**, v. 13, p. 939–949, 2011.

MATTOS, V. D. S. et al. *Meloidogyne* spp. populations from native Cerrado and soybean cultivated areas: genetic variability and aggressiveness. **Nematology,** v. 18, p. 505–515, 2016.

MONTEIRO, J. M. S. et al. Primeiro relato de *Meloidogyne konaensis* parasitando

hortaliça e fruteira no estado do Ceará. In: **XXXII Congresso Brasileiro de Nematologia**, Londrina, PR, p. 84, 2015.

MUNIZ, M.F.S. et al. Diversity of *Meloidogyne exigua* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations from coffee and rubber tree. **Nematology,** v. 10, p. 897-909, 2008.

MOLINARI, S.; MIACOLA, C. Interactions between resistant tomato cys and *Meloidogyne* spp. in vitro. **Nematologia mediterranea**, v. 25, p. 63-72, 1997.

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

PINHEIRO, J. B. et al. First report of *Meloidogyne enterolobii* in *Capsicum* rootstocks carrying the *Me1* and *Me3*/*Me7* genes in central Brazil. **Nematropica,** v. 45, p. 184–188, 2015.

PINHEIRO, J. B. et al. Identificação de espécies de *Meloidogyne* em tomateiro no Brasil. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento nº 102.** Brasília, DF, Brazil: Embrapa Hortaliças, 2014.

ROSSI, M. et al. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 95, p. 9750–9754, 1998.

SANTOS, D. et al. Tomato *Mi-1.2* gene confers resistance to *Meloidogyne luci* and *M. ethiopica*. **European Journal of Plant Pathology,** p. 156, 571–580, 2019.

SEAH, S. et al. Evaluation of a codominant SCAR marker for detection of the *Mi-1* locus for resistance to root-knot nematode in tomato germplasm. **Tomato Genetics Cooperative Report, v.** 57, p. 37–40, 2007.

SEID, A. et al. Tomato (*Solanum lycopersicum*) and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) – a century-old battle. **Nematology, v.** 17, p. 995–1009, 2015.

SILVA, W. R.; MACHACA-CALSIN, GOMES, C. B. First report of the root-knot nematode *Meloidogyne morocciensis* infecting peach in Southern Brazil. ***Journal of Nematology***, v. 52, 2020.

SILVA, R. V.; OLIVIERA, R. D. L.; FERREIRA, O. S.; CASTRO, D. B. Efeito do gene *Mi* na reprodução de populações de *Meloidogyne exigua* em tomateiro. **Nematologia Brasileira,** v. 32, p.150–153, 2008.

STEFANELO, D. R. et al. *Meloidogyne izalcoensis* parasitizing coffee in Minas Gerais state: the first record in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, p. 209–212, 2019.

STRAJNAR, P.; ŜIRCA, S. The effect of some insecticides, natural compounds and tomato cv. Venezia with *Mi* gene on the nematode *Meloidogyne ethiopica* (Nematoda) reproduction. **Acta Agriculturae Slovenica,** v. 97, p. 5, 2011.

THIES, J. A.; DICKSON, D. W.; FERY, R. L. Stability of resistance to root-knot nematodes in ‘Charlston Belle’ and ‘Carolina Wonder’ bell pepper in a sub-tropical environment. *HortScience*, v. 43, p. 188–190, 2008.

TIGANO, M. et al. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* and development of a SCAR marker for this guava-damaging species. **Plant Pathology,** v. 59, p. 1054–1061, 2010.

TZORTZAKAKIS, E.A.; CONCEIÇÃO, I.; DIAS, A.M.; SIMOGLOU, K.B.; ABRANTES, I. Occurrence of a new resistant breaking pathotype of *Meloidogyne incognita* on tomato in Greece. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 121, p. 184–186, 2014.

XU, J.; NARABU, T.; MIZUKUBO, T.; HIBI, T. A molecular marker correlated with selected virulence against the tomato resistance gene *Mi* in *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. **Phytopathology,** v. 91, p. 377–382, 2001.

WILLIAMSON, V. M. Plant nematode resistance genes. **Current Opinion in Plant Biology,** v. 2, p. 327–331, 1999.

WILLIAMSON V. M. Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. **Annual Review Phytopathology,** Palo Alto, v. 36, n. 1, p. 277-293, 1998.

4 CAPITULO II: CARACTERIZAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE UMA POPULAÇÃO DE *Meloidogyne javanica* VIRULENTA AO GENE *Mi*-1.2 EM TOMATEIROS NO BRASIL

Resumo: Na cultura do tomateiro, *Solanum lycopersicum* L., os problemas causados pelos nematoides do gênero *Meloidogyne* podem ser controlados através da resistência genética. Ouso de cultivares resistentes é uma das medidas mais eficientes no controle desse patógeno além de apresentar menor impacto ambiental. No entanto, plantas do tomateiro porta-enxerto 'Guardião' (portadoras do gene *Mi*-1.2) (porta-enxerto Guardião) foram encontradas com o sistema radicular apresentando sintomas severos, típicos de nematoides-das- galhas, em um cultivo protegido no munícipio de Frederico Westphalen/RS. Raízes severamente afetadas foram levadas ao laboratório e fêmeas foram retiradas para a caracterização bioquímica da α-esterase e do padrão perineal. Estudo complementar foi realizado com objetivo de confirmar a quebra da resistência empregando um com teste de patogenicidade, medindo a densidade populacional do nematoide, foi realizado. A espécie da população coletada infectando o sistema radicular do porta-enxerto Guardião foi identificada como *Meloidogyne javanica* (Est J3, J2), sendo este o primeiro relato de uma população virulenta desse nematoide no Brasil. O teste de patogenicidade confirmou a quebra da resistência do gene *Mi*-1.2 pela população virulenta de *M. javanica*, além disso, foi possível comprovar que não houve influência da densidade populacional do patógeno na quebra da resistência. De maneira geral, é de extrema importância o monitoramento e caracterização de populações virulentas em áreas de produção de tomate a fim de se planejar corretamente o manejo da doença.

Palavras Chave: *Solanum* spp., Resistência, Virulência, Nematoides-das-galhas.

DETECTION AND CHARACTERIZATION OF THE PATHOGENICITY OF A *Meloidogyne javanica* POPULATION VIRULENT TOWARD THE *Mi*- 1.2 GENE IN TOMATO PLANTS IN BRAZIL.

Abstract: When planting tomato, *Solanum lycopersicum* L., problems caused by nematodes of the genus *Meloidogyne* can be controlled by genetic resistance. Therefore, of resistant cultivars being one of most efficient measures in the control of this pathogen, besides presenting less environmental impact. However, plants of the 'Guardian' rootstock tomato (carriers of the Mi-1.2 gene). However, plants from the 'Guardião' rootstock tomato (carriers of the Mi-1.2 gene) (Guardião rootstock) were found with the root system showing severe typical symptoms, of root-knot nematodes, in a protected crop in municipality by Frederico Westphalen, rio Grande do Sul, state. Severely infected roots were taken to the laboratory and females were extracted and used for biochemical characterization of α-esterase and perineal pattern. A complementary study was carried out in order to confirming of resistance breakdown through a pathogenicity test, by measuring the nematode population density. The species of the population collected from Guardião rootstock root system was identified as *Meloidogyne javanica* (Est J3, J2), and this was the first report of a virulent population of this nematode in Brazil. The pathogenicity test confirmed the breakdown of resistance of the *Mi-1.2*gene by the virulent population of *M. javanica*. In addition, it was possible to prove that there was no influence of the population density of the pathogen on the breakdown of resistance. In general, it is extremely important to

monitor and characterize virulent populations in tomato production areas in order to plan the management of the disease properly.

Keywords: *Solanum* spp., Resistance, Virulence, Root-knot nematodes.

4.1 INTRODUÇÃO

Na cultura do tomateiro, os problemas causados pelos nematoides do gênero *Meloidogyne* podem ser controlados através da resistência genética, que pode ser definida como a capacidade de genes em restringir ou impedir a multiplicação de nematoides, em uma determinada espécie hospedeira (TRUDGILL, 1986). A resistência aos nematoides-das-galhas no tomateiro é conferida por um único gene dominante *Mi*, localizado no cromossomo 6, oriundo da espécie de tomateiro selvagem *Solanum peruvianum* L. (SMITH, 1944). O gene *Mi*-1.2 confere resistência a 13 espécies do gênero *Meloidogyne* (*M. arenaria, M. ethiopica, M. exigua*, *M. hispanica*, *M. incognita*, *M. inornata*, *M. izalcoensis M. javanica*, *M. konaensis, M. luci*, *M. morocciensis*, *M. paranaensis* and *M. petuniae*), mas não a *M. hapla* e *M. enterolobii* (GABRIEL et al., 2020). Até o momento, esse gene tem sido a única fonte de resistência aos NGs, em todas as cultivares de tomateiros disponíveis no mercado, e pode ser considerado um gene de resistência muito estável em termos de durabilidade (WILLIAMSON, 1998).

Embora o gene *Mi*-1.2 tenha ao longo dos anos conferido resistência ao nematoide das galhas, essa resistência pode ser perdida devido à temperatura do solo acima de 28ºC, e pela ocorrência de populações virulentas capazes de suprimir a ação do gene (CORTADA et al., 2011; DEVRAN e SOGUT 2010; TZORTZAKAKIS et al., 2014). Além disso, a resistência pode estar influenciada pela dosagem do gene, em que genótipos com dois alelos dominantes (homozigoto – *Mi*-1.2/*Mi*-1.2) apresentam mais resistência quando comparados a genótipos com um só alelo (heterozigoto – *Mi*-1.2/*mi*-1.2) (JACQUET et al., 2005; MALEITA et al., 2011; IBERKLEID et al., 2014).

A virulência é definida como a capacidade do nematoide de se reproduzir em uma planta hospedeira que possui um ou mais genes de resistência. Populações virulentas podem ocorrer naturalmente, sem exposição prévia a uma cultivar resistente (OMAT et al., 2001; IBERKLEID, 2014) ou podem ser selecionadas após exposição repetida da população ao gene de resistência no campo (KARAJEH et al., 2005; VERDEJO - LUCAS et al., 2009; DEVRAN e SOGUT, 2010; TZORTZAKAKIS et al.,

2014) ou até mesmo por seleção induzida em laboratório (WILLIAMSON, 1998).

Estudos realizados por Pinheiro et al. (2014) relatam a predominância das espécies *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 (50%), *M. incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949 (28,5%), *M. ethiopica* Whitehead, 1968 (14,2%), *M. enterolobii* Yang e Einseback, 1983 (7,14%) e *M. morocciensis* Rammah e Hirschmann, 1990 (3,57%) em áreas de produção de tomate no Brasil, sendo *M. javanica* e *M. incognita*, as mais comumente encontradas.

Embora a ocorrência de populações de *Meloidogyne* spp. virulentas, capazes de se reproduzir em plantas portadoras do gene *Mi*-1.2, tenha sido relatada em vários países da Europa (CASTAGNONE-SERENO et al., 1994; ORNAT et al., 2001; ROBERTSON et al., 2006; BLEVE-ZACHEO et al., 2007; DEVRAN e SOGUT, 2010; TZORTZAKAKIS et al., 2014) e, recentemente, em relação à espécie *M. incognita* no Brasil (SILVA et al., 2019), não há relatos sobre populações de *M. javanica* virulentas no Brasil.

Considerando que o uso de variedades resistentes tem sido a estratégia mais econômica e sustentável para controlar os NGs na produção de tomate (DEVRAN e SOGUT, 2010), é de fundamental importância o monitoramento de populações virulentas em áreas de cultivo para auxiliar nas práticas de manejo a serem adotadas bem como para atencipar potenciais ações de melhoramento genético visando identificar fontes de resistência. O objetivo deste estudo foi identificar as espécies de *Meloidogyne* spp., em lavouras de tomate no noroeste do Rio Grande do Sul, comprovar a suplantação da resistência ao gene *Mi*-1.2 em casa de vegetação e estudar a reprodução de diferentes densidades de inóculo de *Meloidogyne* sp. virulento, em tomateiro resistente.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Cinco amostras de tomateiro, com sintomas de infecção por *Meloidogyne* foram coletadas em lavouras convencionais e em cultivo protegido na região Noroeste do Rio Grande do Sul, pertencentes aos municípios de Frederico Westphalen, Rodeio Bonito e Palmeira das Missões.

Tabela 1 - Amostras, origem geográfica no Rio Grande do Sul e plantas hospedeiras.

Amostra	Origem geográfica	Coordenadas	Hospedeiro, resistência (R) /suscetibilidade (S)
1	Frederico Westphalen	27º 21' 32" S/53º 23' 38" O	*Solanum lycopersicum/* 'Guardião' (R)
2	Rodeio Bonito	27º 28' 15" S/53º 10' 08" O	*S. lycopersicum/* Santa Cruz 'Kada*'* (S)
3	Palmeira das Missões	27º 53' 56" S/53º 18' 50" O	*S. lycopersicum*/ 'Santa Clara*'* (S)
4	Frederico Westphalen	27º 21' 32" S/53º 23' 38" O	*S. lycopersicum/* 'Santa Clara I5300' (S)
5	Rodeio Bonito	27º 28'15" S/53º 10' 08" O	*S. lycopersicum* Santa Cruz 'Kada*'* (S)

4.2.1 Obtenção das populações de *Melodogyne* spp

Para a realização das coletas foi adotado o caminhamento em zigue-zague, onde foram realizadas coletas de solo e raiz de tomateiro. Dez subamostras foram retiradas no perfil de 0-20 cm de profundidade, próximo da planta, em seguida foram homogeneizadas para a retirada do volume de um quilograma de solo mais raízes e armazenadas em sacos plásticos e transportadas ao Laboratório de Fitopatologia da UFSM (Universidade de Santa Maria).

Para avaliação da densidade populacional dos nematoides presentes no solo, uma fração de 200 cm^3 foi processada seguindo processamento por peneiramento e flutuação em centrífuga, em solução de sacarose (JENKINS, 1964).

As raízes das amostras foram separadas, lavadas e pesadas. Em seguida, 10g de raiz foram utilizadas para a extração dos nematoides conforme metodologia de Hussey e Barker (1973), mediante trituração de raízes em liquidificador, com uma solução de 0,5% de hipoclorito de sódio (NaOCl). A quantificação dos J2 no solo e ovos +J2 nas raizes foi realizada em lâminas de Peters, ao microscópio óptico, através da média de três contagens.

A outra parte da raiz foi utilizada para inoculação em planta de tomateiro cv. 'Santa Clara' e esta foi mantida em casa de vegetação, durante 60 dias para posterior identificação das espécies do nematoide-das-galhas. Após esse período, fêmeas foram extraídas e caracterizadas bioquimicamente pela técnica de eletroforese, utilizando-se a enzima α-esterase e morfologicamente, através da configuração da região perineal.

4.2.2 Caracterização bioquímica

A caracterização bioquímica foi realizada no laboratório de Microbiologia do

Solo da UFSM e no Laboratório de Nematologia da EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia. Para isso, vinte fêmeas adultas e com aspecto branco leitoso foram retiradas das raízes de tomateiro de cada amostra, com o auxílio de um estilete de ponta fina, sob microscópio estereoscópico. Cada fêmea retirada foi depositada individualmente em um tubo capilar mantido em gelo, com 10-15µL de solução tampão de extração para a enzima esterase (Est) (CARNEIRO e ALMEIDA, 2001).

Após a coleta das fêmeas, foi realizada a preparação de um gel de poliacrilamida a 7% (11 x 18 cm, 1 mm de espessura), sendo as mesmas maceradas individualmente e a respectiva suspensão, adsorvida em papel filtro qualitativo (Whatman 3mm).

Cada pedaço de papel adsorvido com a respectiva amostra foi colocado separadamente no gel, e em três deles, foi depositada uma gota de azul de bromofenol (0,01%). Utilizou-se como padrão, o extrato proteíco de uma população pura de *M. javanica*, o qual foi depositado em três cavidades do mesmo gel, para garantir a comparação dos fenótipos encontrados (CARNEIRO e ALMEIDA, 2001).

Feita a aplicação das amostras, o gel foi colocado em uma cuba contendo tampão e esta foi ligada a uma fonte de 80 volts, mantida em geladeira tipo balcão entre 5 e 8°C, sendo a corrida eletroforética efetuada no sistema horizontal, através da metodologia descrita por Carneiro e Almeida (2001).

Ao final da corrida, o gel foi submetido à revelação da enzima esterase, utilizando-se uma solução de 50 mL de tampão fosfato (50 mg de Fast Blue RR Salt e 1,5 mL de α naftilacetato 1%). A seguir, os géis foram levados à incubação, onde permaneceram em estufa a 37°C por aproximadamente 15–20 minutos., até que as bandas esterásticas (escuras) aparecessem em fundo claro. Em seguida, os géis foram transferidos para uma solução fixativa contendo 10% de ácido acético e 40% de solução de álcool metílico, por 30 min. Os perfis isoenzimático foram comparados e confirmados com os descritos na literatura (CARNEIRO et al., 2016).

4.2.3 Caracterização morfológica

Para a identificação das espécies de *Meloidogyne* encontrada no porta-enxerto (Guardião), portador do gene *Mi*-1.2, vinte fêmeas foram caracterizadas pela configuração da região perineal. Os cortes perineais foram efetuados de 20 fêmeas adultas lavadas e limpas em ácido lático 45% e montadas em lâminas com glicerina,

para posterior observação microscópica e, consequente confirmação da espécie (HARTMANN e SASSER, 1985). As características observadas foram comparadas com as características das espécies já descritas na literatura (EISENBACK e TRIANTAPHYLLOU, 1991).

4.2.4 Confirmação da virulência da espécie de *Meloidogyne* encontrada no porta-enxerto Guardião

Para confirmar a virulência da população encontrada no porta-enxerto portador do gene *Mi*-1.2 (Guardião) foram realizados dois ensaios em casa de vegetação com temperatura média de 25 ºC. No primeiro ensaio, foi realizado um teste de patogenicidade e no segundo ensaio foi testada a influência da densidade populacional do inóculo de *M. javanica* na multiplicação em porta-enxerto portador do gene *Mi*-1.2. No primeiro ensaio (teste de patogenicidade) utilizou-se como padrão resistente o porta-enxerto ‘Muralha’ (*Mi*-1.2/*Mi*-1.2) e como padrão suscetível a cultivar ‘Santa Clara’ (*mi*-1.2 /*mi*-1.2). Duas semanas após o transplante, os tomateiros foram inoculados com suspensão de 5.000 ovos + J2/planta. No segundo ensaio (densidade populacional) foram utilizadas as concentrações: 0, 250, 2.000, 5.000, 7.000, e 10.000 ovos + juvenis de segundo estágio (J2) por planta do híbrido ‘Guardião’, duas semanas após o transplante. Os ensaios foram instalados em um delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições. As mudas de tomateiro foram transplantadas quando apresentaram três folhas expandidas, em recipientes plásticos, com capacidade de 2 kg preenchidos com substrato mais solo, na proporção de 2:1, anteriormente esterilizados, em autoclave.

Após 65 dias, as raízes foram lavadas e avaliadas quanto a massa fresca. Posteriormente, foram processadas segundo metodologia de Hussey e Barker (1973), obtendo-se suspensão aquosa para contagem dos ovos e juvenis, determinando-se o número de ovos por grama de raiz, índice de galhas e massa de ovos por sistema radicular, conforme Taylor e Sasser (1978) e fator de reprodução (FR = população final/população inicial) em cada unidade experimental, conforme Oostenbrink (1966).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade com intuito de verificar as pressuposições. A normalidade foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste

de Scott-Knott a 5% de probabilidade. A análise estatística foi realizada no software Sisvar (FERREIRA, 2011).

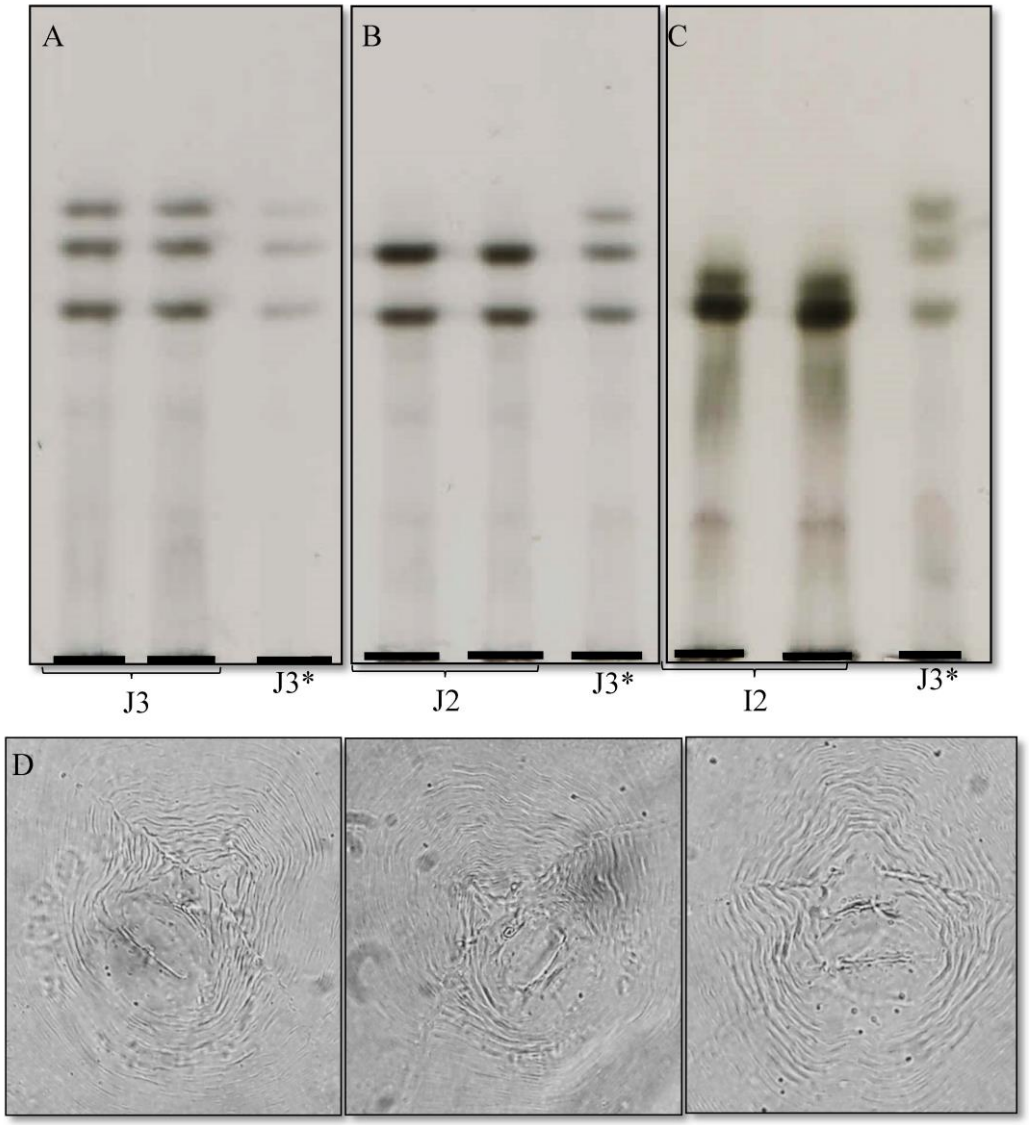
4.3 RESULTADOS

4.3.1 Análise bioquímica: Esterase (EST)

Na caracterização isoenzimática, as populações de *Meloidogyne* spp., apresentaram três fenótipos de esterase (Figura 1). Para *M. javanica* virulenta foram observados dois fenótipos da enzima esterase (EST), EST J3 (Rm: 1.00; 1.20 e 1.40) e EST J2 (Rm: 1.00 e 1.20), nas amostras 1 e EST J3 (Rm: 1.00; 1.20 e 1.40) na amostra 2. Para *M. incognita* observou-se somente um fenótipo, EST I2 (Rm 1,0 e 1,06), nas amostras 3, 4 e 5.

A configuração perineal da população identificada como *M. javanica* EST J3 e *M. javanica* EST J2 virulenta (Figura 1D) apresentou arco dorsal alto, arredondado, e presença de duas incisuras cortando lateralmente as estrias, de modo que estas se interrompem ao se expandirem do setor dorsal para o ventral, características típicas da descrição da espécie *M. javanica***.**

Figura 1 – **(A-B)** Fenótipos de esterase (EST) de *Meloidogyne javanica* (EST J3 e J2) e (**C)** de *Meloidogyne incognita* (EST I2). (**D)** Padrões perineais da espécie *Meloidogyne javanica* encontradas em porta-enxerto 'Guardião' de tomateiro no Rio Grande do Sul. J3*: fenótipo de *M. javanica* utilizado como padrão de comparação. Fonte: Márcia Gabriel.



4.3.2 **Determinação do nível populacional em solo e raiz provenientes das amostras de campo.**

Os maiores níveis populacionais de nematoides foram observados na amostra 1 e 2, sendo a amostra proveniente do porta-enxerto 'Guardião' (portador de gene *Mi*-1.2) com maior reprodução que as demais suscetíveis (Tabela 2).

Tabela 2 - Números médios de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* encontrados em solo e raiz, provenientes de áreas de produção de tomate (*Solanum lycopersicum*) na região noroeste do RS.

Amostra	Espécie/ EST*.	Hospedeiro /cultivar	Nº/N/ g / raiz	Nº/ J2 solo/200 cm^3
1	*M. javanica* /J3 e J2	*S. lycopersicum* / 'Guardião'	15686	1875
2	*M. javanica* J3	*S. lycopersicum*/ Santa Cruz 'Kada'	8452	823
3	*M. incognita* / I2	*S. lycopersicum/ '*Santa Clara*'*	6540	372
4	*M. incognita* / I2	*S. lycopersicum/ '*Santa Clara *I5300'*	3859	548
5	*M. incognita* / I2	*S. lycopersicum/* 'Santa Cruz Kada'	2345	426

* EST: esterase; Nº/N/g/raiz = Número de ovos + J2s por grama de raiz; Nº/J2/solo/200cm^3 = Número de juvenis de segundo estádio (J2s) em 200 cm^3 de solo.

4.3.3 **Teste de patogenicidade**

No teste de patogenicidade, o número de nematoide por grama de raiz e FR foi maior na cultivar 'Santa Clara', no entanto, o porta-enxerto 'Muralha' homozigoto para o gene *Mi*-1.2, também permitiu a reprodução da população de *M. javanica,* detectada no porta-enxerto 'Guardião' (Tabela 3).

Tabela 3 - Massa fresca de raiz (MFR), número de nematoides por grama de raiz (Nº N/R), índice de galhas (IG) índice de massa de ovos (IMO) fator de reprodução (FR) do porta-enxerto Muralha (padrão resistente) e cultivar Santa Clara (padrão suscetível) inoculadas com *Meloidogyne javanica.*

Cultivar/alelos	**MFR**	**Nº N/R**	**IG**	**IMO**	**FR**
Muralha (*Mi*-1.2/*Mi*-1.2)	29,80 b	28.861 b	5	5	171,79 b
Santa Clara (*mi*-1.2/*mi*-1.2)	38,28 a	57.561 a	5	5	436,57 a
Coeficiente de Variação (%)	7,80	24,33			21,84

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. (P = 0,05). IG = Índice de Galhas (0-5): 0 = sem galhas, 1 = 1-2, 2 = 3-10, 3 = 11-30, 4 = 31-100, 5 => 100 galhas por sistema radicular) atribuídos a Taylor e Sasser (1978).

4.3.4 **Densidade populacional**

Os resultados demostraram que a população de *M. javanica* se reproduziu em todas as densidades populacionais testadas e induziu galhas radiculares com profusão

em raízes de plantas resistente de tomateiro porta-enxerto ‘Guardião’ homozigoto para o gene *Mi*-1.2, confirmando os resultados observados a campo (Tabela 4).

O aumento gradativo do inóculo inicial (PI) do nematoide resultou em aumentos significativos no número de ovos e J2 por grama de raiz (NNGR), até a população de 7.000 ovos de inóculo; a partir desse valor (10.000) houve redução significativa no NNGR. Enquanto que o fator de reprodução (FR) do nematoide foi significativamente reduzido à medida que o inóculo inicial aumentou, mantendo-se significativamente igual para os inóculos de 2.000, 5000 e 7.000 (Tabela 4). Já o inóculo de 10.000 foi excessivo pois reduziu significativamente o NNGR e o FR. Já o índice de galhas foi o máximo (5) para todos os inóculos não refletindo a real população (NNGR).

Tabela 4 - Número de nematoide por grama de raízes (NNGR), índice de galhas (IG) e fator de reprodução (FR) de uma população virulenta de *Meloidogyne javanica* virulento, em raízes do tomateiro híbrido ‘Guardião’ submetidas a diferentes concentrações de inóculo (PI), 65 dias após inoculação.

População inicial (PI)	*Meloidogyne javanica*			
	Massa fresca da raiz	Número de nematoide por grama de raiz (NNGR)	Índice de galhas	Fator de reprodução
0	21,73 a	-	-	-
250	14,04 b	2.233 d	5	121,50 a
2000	14,80 b	11.760 c	5	73,78 b
5000	15,20 b	26.474 b	5	78,67 b
7000	15,62 b	41.770 a	5	79,43 b
10.000	16,43 b	17.678 c	5	28,71 c
CV.	11,73	20,22		18,41

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.2 DISCUSSÃO

Através da análise bioquímica foi possível confirmar a presença de populações de *M. javanica* e *M. incognita* infectando tomateiros no Rio Grande do Sul. Essas duas espécies são comumente encontradas em áreas de cultivo de tomate no Brasil (PINHEIRO et al., 2014). Em nosso trabalho, dois perfis de esterase (Est J3 e Est J2) foram encontrados ocorrendo em uma única população de *M. javanica* caracterizada

como virulenta ao gene *Mi*-1.2. A presença de polimorfismos do perfil enzimático é reportada para essa espécie, assim como também para *M. incognita* (SANTOS et al., 2012). De acordo com Carneiro et al., (1996) o fenótipo EST J3 é o perfil mais frequentemente observado no sul do Brasil na cultura do tomateiro, enquanto que o fenótipo EST J2 é uma variante do EST J3.

Ofenótipo EST J2 tem sido relatado no Brasil em diferentes culturas como tomateiro, arroz, cana de açúcar, milho, amora, mandioca, pimenta, fumo (CARNEIRO et al., 1996; CARNEIRO et al., 1998), soja (CASTRO et al., 2003), banana (COFCEWICZ et al., 2004), quiabo (OLIVEIRA et al., 2007b), figueira (GOMES et al., 2009), videira (SOMAVILLA, 2011) e batata (LIMA-MEDINA, 2013), sendo essas três últimas de ocorrência no Rio Grande Sul. No entanto, este é o primeiro registro da ocorrência de ambos perfis (EST J3 e EST J2), em plantas de tomateiro portadora do gene *Mi*-1.2 no Brasil. De acordo com a literatura, populações que apresentaram a supressão de uma das bandas em relação ao perfil EST J3, ou seja, populações J2 de *M. javanica,* apresentaram uma certa diversidade fenotípica e genética (COFCEWICZ et al., 2004).

Embora a população estudada tenha apresentado dois fenótipos EST J3 e J2 misturados em fêmeas individualizadas na identificação bioquímica, não foi possível identificar diferenças na configuração da região perineal das fêmeas, confirmando o estudo de Carneiro et al., (1998) que ao comparar seis populações de *M. javanica* com perfis EST J3 e J2, também não encontrou diferenças nesse caractere morfológico.

A elevada população de *M. javanica* encontrada no presente estudo no porta-enxerto ‘Guardião’ (portador do gene *Mi*-1.2), pode ser explicada pela suplantação da resistência conferida por esse gene, sendo este o primeiro registro formal desa suplantação da resistência em tomateiro por *M. javanica* no Brasil. A ocorrência de populações virulentas capazes de se reproduzir em plantas portadoras do gene *Mi*-1.2 tem sido relatadas em vários países da Europa na região Mediterrânea, sendo em sua maioria por *M. javanica* e *M. incognita* (CASTAGNONE-SERENO et al., 1994; ORNAT et al., 2001; ROBERTSON et al., 2006; BLEVE-ZACHEO et al., 2007; DEVRAN e SOGUT, 2010; TZORTZAKAKIS et al., 2014).

De acordo com os nossos resultados, a suplantação do gene *Mi-1.2* não apresentou relação com a densidade populacional inicial. Segundo Singh et al. (1974), a resistência aos nematoides-das-galhas depende da variedade da planta e das espécies

envolvidas. Todavia, as maiores densidades iniciais do nematoide (exceto 10.000) apresentaram aumento no número de nematoides por grama de raiz (NNGR) e redução na taxa de reprodução (FR), corroborando com estudos anteriores (CHAREGANI et al., 2012; KAMRAN et al., 2013). Os valores entre 2.000 e 7000 mostraram as melhores densidades de inóculo em relação aos FRs, não sendo evidenciadas diferenças estatísticas. Já quanto ao NNGR e FR, a população inicial de 10.000 nematoides foi excessiva e possivelmente, isso ocorreu devido a uma competição por alimento que diminuiu a população dos nematoides (SEINHORST, 1970).

A inativação da resistência do gene *Mi*-1.2 em cultivares e porta-enxertos de tomateiro pode estar relacionada a diversos fatores entre eles, a variabilidade intraespecífica da população local desse nematoide (CASTAGNONE-SERENO 2002, 2006), alta temperatura do solo (>28 ºC) (ARAUJO et al., 1982; VERDEJO-LUCAS et al., 2013) ou pressão de seleção através do uso de variedades resistentes continuada, que podem ter selecionado uma população capaz de quebrar essa resistência (XU et al., 2001). Embora Ornat et al. (2001) e Iberkleid (2014) tenham relatado populações de *Meloidogyne* sp., naturalmente virulentas ao gene *Mi-1.2*, outros trabalhos demostram que essas populações possuem também habilidade de ‘quebrar’ a resistência conferida pelo gene *Mi*-1.2 após exposição repetida a plantas resistentes (KARAJEH et al., 2005; VERDEJO-LUCAS et al., 2009; DEVRAN e SOGUT, 2010; TZORTZAKAKIS et al., 2014). Essa parece ser a hipótese mais plausível a ser atribuída à população relatada neste trabalho, uma vez que houve exposição repetida da cultivar ‘Guardião’ portador do gene *Mi*-1.2 a *M. javanica* durante um período de três anos (monocultura) o que correspondeu a seis ciclos reprodutivos do nematoide.

A capacidade do nematoide se reproduzir em plantas portadoras do gene *Mi*-1.2 pode ser desenvolvida gradualmente ou rapidamente (WILLIAMSON, 1998). Eddaoudi et al. (1997) obtiveram várias populações de *M. javanica* naturalmente selecionadas em campos previamente cultivados com cultivares resistentes de tomateiro por pelo menos um ano. Na região central da Flórida uma população virulenta de *M. incognita* se desenvolveu após cinco ciclos reprodutivos do tomateiro resistente cv. Sanibel (NOLING, 2000). Em laboratório, experimentos de seleção artificial demonstraram que a mudança de avirulência para virulência pode ocorrer de maneira progressiva em 5 a 10 gerações de repetidas inoculações de *M. incognita* em um tomateiro resistente contendo

o gene *Mi*-1.2 (JARQUIN-BARBERENA et al., 1991; CASTAGNONE-SERENO et al, 1994).

De acordo com Castagnone-Sereno (2006), embora a maior parte das espécies de *Meloidogyne* apresente reprodução partenogenética mitótica obrigatória, inclusive *M. javanica*, as mesmas apresentam alta capacidade de adaptação às restrições ambientais, por exemplo, sua capacidade de suplantar os genes de resistência. A adaptação de populações virulentas do nematoide das galhas ao gene *Mi*-1.2 pode estar relacionada a uma perda de genes do nematoide. A análise comparativa de duas populações de nematoides-das-galhas virulentas ao gene *Mi*-1.2 e outras duas populações avirulentas, quase isogênicas, permitiu identificar 33 genes que mostraram diminuições no número de cópias nas populações virulentas em comparação com as avirulentas (Castagnone-Sereno et al., 2019). Semblat et al. (2001) em uma análise comparativa de linhagens isogênicas de *M. incognita*, selecionadas por sua avirulência ou virulência ao gene *Mi-1.2* por 25 gerações, permitiu a identificação de um gene (*map*-1) presente nas linhas avirulentas e ausentes nas correspondentes linhas virulentas. Posteriormente, Castagnone-Sereno et al. (2009), ao utilizarem duas populações de *M. incognita* avirulentas ao gene *Mi*-1.2 de diferentes regiões (Rússia e México), as submeteu à pressão de seleção, tornando-as virulentas após 40 gerações, essas populações apresentaram perda das formas mais curtas do gene *map*-1 (*map*-1.2 e *map*-1.3). Segundo esses autores o fato de que a mesma deleção foi observada em duas linhas de nematoides, independentes da origem geográfica e submetidas à mesma pressão de seleção, sugere que a perda de genes após a etapa de seleção não é um evento aleatório, mas o resultado de um mecanismo adaptativo que ajuda o nematoide a se desenvolver em plantas resistentes.

Em conclusão, esse foi o primeiro relato de população virulenta de *M. javanica* no Brasil e a comprovação da sua virulência. Dessa maneira, torna-se imprescindível a busca por novas fontes de resistência a populações de *Meloidogyne* spp. que infectam a cultura do tomateiro, como também adotar práticas de manejo como rotação com culturas não hospedeiras, evitando possível seleção de populações virulentas e aumento da longevidade do gene *Mi*-1.2.

4.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, M. T., BASSETT, M. J., AUGUSTINE, J. J., DICKSON, D. W. Effect of Diurnal Changes in Soil Temperatures on Resistance to *Metoidogyne incognita* in Tomato. **Journal of nematology**, v. 14, n. 3, p. 414, 1982.

BLEVE-ZACHEO, T.; MELILLO, M. T.; CASTAGNONE-SERENO, P. The contribution of biotechnology to root-knot nematode control in tomato plants. **Pest Technology**, v. 1, p. 1-16, 2007.

CARNEIRO, R. M. D. G.; MONTEIRO, J. M. S.; SILVA, U. C.; GOMES, G. Gênero *Meloidogyne*: diagnose através de eletroforese de isoenzimas e marcadores SCAR. In: OLIVEIRA, C M. G, SANTOS, M. A, CASTRO L. H. S (Ed). **Diagnose de Fitonematoides**. 1st Edition. Campinas–SP: Millennium, p. 47- 70, 2016.

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.; CASTAGNONE-SERENO, P.; DICKSON, D. W. Variability among four populations of *Meloidogyne javanica* from Brazil. **Fundamental and applied Nematology,** v. 4, n. 21, p. 319-326, 1998.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, A. R. A.; CARNEIRO, R. G. Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. **Fundamental and applied Nematology,** v. 19, n. 6, p. 555-560, 1996.

CASTAGNONE-SERENO, P. et al. Gene copy number variations as signatures of adaptive evolution in the parthenogenetic plant‐parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Molecular Ecology**, v. 28, n. 10, p. 2559-2572, 2019.

CASTAGNONE-SERENO, P.; SEMBLAT, J. P.; CASTAGNONE, C. Modular architecture and evolution of the map-1 gene family in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 282, n. 5, p. 547, 2009.

CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. **Heredity,** v. 96, n. 4, p. 282-289, 2006.

CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic variability in parthenogenetic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., and their ability to overcome plant resistance genes. **Nematology,** v. 4, n. 5, p. 605-608, 2002.

CASTAGNONE-SERENO, P.; BONGIOVANNI, M.; DALMASSO, A. Reproduction of virulent isolates of *Meloidogyne incognita* on susceptible and *Mi*- resistant tomato. **Journal of Nematology,** v. 26, p. 324–328, 1994.

CASTRO, J. M. C.; LIMA, R.; 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.

CHAREGANI, H.; MAJZOOB, S.; HAMZEHZARGHANI, H.; KAREGAR-BIDE, A. Effect of various initial population densities of two species of *Meloidogyne* on growth of tomato and cucumber in greenhouse. **Nematologia Mediterranea**, v. 40, p. 129-134, 2012.

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

CORTADA, L.; SAKAI, H.; VERDEJO-LUCAS, S.; MIZUKUBO, T. *Meloidogyne* virulence locus molecular marker for characterization of selected *Mi*-virulent populations of *Meloidogyne* spp. is correlated with several genera of betaproteobacteria. **Phytopathology**, v. 101, n. 4, p. 410-415, 2011.

DEVRAN, Z.; SÖĞÜT, M. A. Occurrence of virulent root-knot nematode populations on tomatoes bearing the *Mi* gene in protected vegetable-growing areas of Turkey. **Phytoparasitica,** v. 38, n. 3, p. 245-251, 2010.

EDDAOUDI, M.; AMMATI, M.; RAMMAH, A. Identification of the resistance breaking populations of *Meloidogyne* on tomatoes in Morocco and their effect on new sources of resistance. **Fundamental and Applied Nematology,** v. 20, n. 3, p. 285-290. 1997.

EISENBACK, J. D.; TRIANTAPHYLLOU, H. H. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. **Manual of agricultural nematology,** v. *1*, p.191-274, 1991.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e **Agrotecnologia,** v. 35, p.1039-1042, 2011.

GABRIEL, M. et al. Reaction of a heterozygous tomato hybrid bearing the *Mi*-1.2 gene to 15 *Meloidogyne* species. **Plant Pathology,** v. 69, n. 5, p. 944-952, 2020.

GOMES, C. B. et al. Monitoramento do nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em figueira (*Ficus carica* L.) no Rio Grande do Sul Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento,** p. 86, 2009.

HARTMANN, K. M.; SASSER, J. N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal patterns morfphology. In: BARKER, K. R.; CC. CARTER; SASSER, J.N. (Ed). **An advanced treatise on *Meloidogyne***, v. 2. Methodology. North Carolina State University Graphics, Raleigh, p. 69-77, 1985.

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

IBERKLEID I. et al. Responses of tomato genotypes to avirulent and *Mi*-virulent *Meloidogyne javanica* isolates occurring in Israel. **Phytopathology**, v. 104, p. 484–496,

2014.

JACQUET, M. et al. Variation in resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato genotypes bearing the *Mi* gene. **Plant Pathology,** v. 55, n. 2, p. 93-99, 2005.

JARQUIN-BARBERENA, H.; DALMASSO, A.; DE GUIRAN, G.; CARDIN, M. C. Acquired virulence in the plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. I, Biological analysis of the phenomenon. **Revue de nematologie,** v. *14*, n. 2, p. 299-303, 1991.

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

KAMRAN, M. et al. The influence of *Meloidogyne incognita* density on susceptible tomato. **Pakistan Journal of Zoology,** v. 45, n. 3, 2013.

KARAJEH, M.; ABU-GHARBIEH, W.; MASOUD, S. Virulence of root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., on tomato bearing the *Mi* gene for resistance. **Phytopathologia Mediterranea,** v. 44, p. 24-28, 2005.

LIMA-MEDINA, I. **Levantamento e caracterização do nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) e das lesões (*Pratylenchus* spp.) em batata no sul do Brasil, e estudo da patogenicidade em** *Solanum* **spp**. 2013, 120 p. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, 2013.

MALEITA, C. M. et al. Effect of the *Mi* gene on reproduction of *Meloidogyne hispanica* on tomato genotypes. **Nematology,** v. 13, p. 939–94, 2011.

NOLING, J. W. Effects of continuous culture of a resistant tomato cultivar on *Meloidogyne incognita* soil population density and pathogenicity. **Journal of Nematology,** v. 32, p. 452, 2000.

OLIVEIRA, R. D. L. et al. Nematofauna associada à cultura do quiabo na região leste de Minas Gerais. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 88-93, 2007b.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mededelingen Landbouw,** Suriname, v. 66, n. 4, p.1-46, 1966.

ORNAT, C.; VERDEJO-LUCAS, S.; SORRIBAS, F. J. A population of *Meloidogyne javanica* in Spain virulent to the *Mi* resistance gene in tomato. **Plant Disease**, v. 85, p. 271-276, 2001.

PINHEIRO, J. B. et al. Identificação de espécies de *Meloidogyne* em tomateiro no Brasil. **Embrapa Hortaliças-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento,** (INFOTECA-E), 2014.

ROBERTSON, L. et al. Characterization of *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* and *M. hapla* populations from Spain and Uruguay parasitizing pepper (*Capsicum annuum* L.).

Crop Prot, v. 25, p. 440- 445, 2006.

SANTOS, M. F. A. et al. Biometrical, biological, biochemical and molecular characteristics of *Meloidogyne incognita* isolates and related species. **European Journal of Plant Pathology,** v. 134, n. 4, p. 671-684, 2012.

SEMBLAT, J. P. et al. Molecular cloning of a cDNA encoding an amphid-secreted putative avirulence protein from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Molecular Plant-Microbe Interactions,** v. 14, n. 1, p. 72-79, 2001.

SEINHORST, J. W. Dynamics of populations of plant parasitic nematodes. **Annual review of Phytopathology,** v. *8*, n. 1, p. 131-156, 1970.

SILVA, R. V. D. et al. Supplanting resistance of the Mi gene by root-knot nematode in industrial tomato in the Cerrado in Goiás State of Brazil. **Ciência Rural,** v. 49, n. 9, 2019.

SINGH, B.; CHOUDHURY, B. Screening tomato cultivars for resistance to *Meloidogyne* species. **PANS Pest Articles & News Summaries,** v. 20, n. 3, p. 319-322, 1974.

SMITH, P. G. Embryo culture of a tomato species hybrid. **Proceedings of American Society Horticultural Sciences**, v. 44, p. 413–16, 1944.

SOMAVILLA, L. **Levantamento, caracterização do nematoide das galhas em videira nos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina e estudo da resistência de porta-enxertos a** *Meloidogyne* **spp.** 2011, 81 p. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, 2011.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J. N. **Biology, identification and control of root-knotnematodes.** Raleigh: NCSU Graphics, 1978, 111 p.

TRUDGILL, D. L. Yield losses caused by potato cyst nematodes: a review of the current position in Britain and future prospect for improvements. **Annals of Applied Biology, v.** 108, n.1, p. 89-98, 1986.

TZORTZAKAKIS, E. A. et al. Occurrence of a new resistant breaking pathotype of *Meloidogyne incognita* on tomato in Greece. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 121, n. 4, p. 184-186, 2014.

VERDEJO-LUCAS, S.; BLANCO, M.; CORTADA, L.; SORRIBAS, F. J. Resistance of tomato rootstocks to *Meloidogyne arenaria* and *Meloidogyne javanica* under intermittent elevated soil temperatures above 28 C. **Crop Protection,** v. 46, p. 57-62, 2013.

VERDEJO-LUCAS, S.; CORTADA, L.; SORRIBAS, F. J.; ORNAT, C. Selection of virulent populations of *Meloidogyne javanica* by repeated cultivation of *Mi* resistance gene tomato rootstocks under field conditions. **Plant Pathology,** v. 58, n. 5, p. 990-998,

2009.

XU, J.; NARABU, T.; MIZUKUBO, T.; HIBI, T. A molecular marker correlated with selected virulence against the tomato resistance gene *Mi* in *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. **Phytopathology,** v. 91, p. 377–382, 2001.

WILLIAMSON, V. M. Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. **Annual review of phytopathology,** v. 36, n. 1, p. 277-293, 1998.

5 CAPITULO III: IMPACTO DA DOSAGEM ALÉLICA DO GENE *Mi*-1.2 NOS NÍVEIS DE RESISTÊNCIA DE PORTA-ENXERTOS DE TOMATEIRO A DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Meloidogyne* spp. E HISTOPATOLOGIA COMPARADA EM ACESSOS RESISTENTE E SUSCETÍVEIS À INFECÇÃO DE POPULAÇÕES DE *Meloidogyne javanica* AVIRULENTA E VIRULENTA.

Resumo: O gene *Mi-1.2* confere resistência aos nematoides-das-galhas (NGs) e está presente em diversas cultivares comerciais de tomateiro. A eficiência e durabilidade deste gene, porém, depende do manejo adequado em campo, temperatura, presença de populações virulentas de nematoides e da dosagem do efeito do gene na planta. Para melhor entendimento da influência do estado alélico (homozigoto e heterozigoto no *locus Mi*) na expressão da resistência de tomateiros, em relação a *Meloidogyne* spp. e populações *Mi*-1.2-virulentas, este trabalho teve como objetivo avaliar a reprodução de populações avirulentas e virulentas em porta-enxertos heterozigotos (*Mi*-1.2/*mi*-1.2) e homozigotos (*Mi*-1.2/*Mi*-1.2, *mi*-1.2/*mi*-1.2). Visou também determinar o mecanismo de resistência, através de métodos histopatológicos, em porta-enxerto homozigoto resistente a populações virulenta e avirulenta de *M. javanica*. Os resultados mostraram que a dosagem de alelos do gene *Mi*-1.2 está associada à redução do fator de reprodução (FR), apenas em populações avirulentas de *Melodogyne* spp. A variabilidade observada nos valores do FR das populações avirulentas de *M. javanica, M. incognita* e *M. arenaria* foram detectadas dentro das condições alélicas *Mi*-1.2, indicando um efeito de dosagem do gene, bem como uma influência do fundo genético da planta, assim como diferentes agressividades das populações do patógeno. Para esclarecer os mecanismos de resistência (populações avirulentas) e suscetibilidade (populações virulentas), o porta-enxerto 'Guardião' (*Mi*-1.2/*Mi*-1.2), altamente resistente foi escolhido para a caracterização histopatológica da interação planta-nematoide e comparado com a cultivar altamente suscetível ('Santa Clara'- *mi*-1.2/*mi*-1.2). Os juvenis do segundo estádio (J2s) virulentos de *M. javanica* penetraram, sofreram três ecdises e completaram o ciclo se desenvolvendo em adultos férteis, igualmente nos dois genótipos (suscetível e resistente). Na população avirulenta de *M. javanica*, poucos J2s conseguiram penetrar no genótipo resistente e foi visualizada morte celular no local da infecção do nematoide, reação de hipersensibilidade (RH), principalmente no início (até 7 dias após a inoculação, DAI) no córtex e no cilindro central da planta resistente. Esse mecanismo de resistência se caracterizou como uma resistência próxima à imunidade. No controle suscetível, foi possível visualizar sítios de alimentação bem desenvolvidos dos 2 aos 30 DAI. As fêmeas atingiram a maturidade aos 34 DAI. Os resultados sugeriram que a reação de resistência do genótipo homozigoto 'Guardião' está relacionada a respostas precoce de defesa, que impediam totalmente a reprodução do nematoide. Esses resultados são importantes em termos de estratégias de manejo, devido à durabilidade da resistência conferida pelo gene *Mi*-1.2 presente em homozigose nas cultivares Guardião e Muralha, que impedem a reprodução e consequente, a formação de populações virulentas do patógeno, ao contrário de outras combinações alélicas (*Mi*-1.2/*mi*-1.2 e *mi*-1.2/*mi*-1.2), que permitiram uma certa reprodução dos nematoides.

Palavras chaves: *Solanum lycopersicum* L., *S. peruvianum*, hipersensíbilidade; Efeito de dosagem e Virulência.

IMPACT OF THE ALLELIC DOSAGE OF THE GENE Mi-1.2 ON THE RESISTANCE LEVELS OF TOMATO ROOTSTOCKS TO DIFFERENT POPULATIONS OF *Meloidogyne* spp. AND HISTOPATHOLOGY COMPARAtive OF RESISTANT AND NON-RESISTANT ACCESSES TO POPULATIONS INFECTION OF *Meloidogyne javanica* AVIRULENTA AND VIRULENTA.

Abstract: The *Mi´1.2* gene confers resistance to root-knot nematodes (RKN) and is present in several commercial tomato cultivars. The efficiency and durability of this gene, however, depend on proper management in the field: temperature, presence of virulent nematode populations and the dosage of the gene's effect on the plant. For a better understanding of the influence of allelic state (homozygous and heterozygous at the locus *Mi*) on the tomato resistance expression, in relation to *Mi-1.2* virulent and avirulent *Meloidogyne* spp. populations, this study aimed to evaluate the reproduction of avirulent and virulent rootstock populations that were heterozygous (*Mi*-1.2/*mi*-1.2) and homozygous ((*Mi*-1.2/*Mi*-1.2, *mi*-1.2/*mi*-1.2).It also aimed to determine the resistance mechanism toward virulent and avirulent populations of *M. javanica* through histopathological methods in a homozygous rootstock. The results showed that the dosage of *Mi-1.2* alleles is associated with the reduction of the reproduction factor (RF) only in avirulent populations of *Melodogyne* spp. The variability observed in the RF values of the avirulent populations of *M. javanica*, *M. incognita* and *M. arenaria* was detected within the *Mi*-1.2 allelic conditions, indicating a gene dosing effect, as well as an influence of the plant's genetic background and differences in aggressiveness of the pathogen populations. To clarify the mechanisms of resistance (avirulent populations) and susceptibility (virulent populations), the highly resistant 'Guardião' rootstock (*Mi*-1.2/*Mi*-1.2), was chosen for the histopathological characterization of the plant-nematode interaction and compared to the highly susceptible cultivar (‘Santa Clara’ *mi*-1.2/*mi*-1.2). Second-stage juveniles (J2s) of the *M. javanica* virulent population penetrated, suffered three molts and completed the cycle, developing equally in both genotypes (susceptible and resistant) in fertile adults. For the avirulent population of *M. javanica*, few J2s managed to penetrate the resistant genotype, and cell death was seen at the site of the hypersensitivity reaction (RH) nematode infection, mainly at the beginning (up to 7 days after inoculation, DAI) in the cortex and in the central cylinder of the resistant plant. This resistance mechanism is characterized as resistance close to immunity. In the susceptible control, it was possible to visualize well-developed feeding sites from 2 to 30 DAI. The females reached maturity at 34 DAI. The results suggested that the resistance reaction of the homozygous genotype ‘Guardião’ is related to early defense responses, which completely prevented the nematode from reproducing. These results are important in terms of management strategies, due to the durability of resistance conferred by the *Mi-1.2* gene, present in homozygosity in the ‘Guardião’ and ‘Muralha’ cultivars, which totally prevent reproduction and, consequently, the formation of virulent populations of the pathogen, unlike other alleles combinations (*Mi*-1.2/*mi*-1.2 and *mi*-1.2 /*mi*-1.2), which allowed a certain level of reproduction by the nematodes.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L., *S. peruvianum*, Hypersensitivity, Dosage effect and Virulence.

5.1 INTRODUÇÃO

Os nematoides-das-galhas (NGs), do gênero *Meloidogyne*, são reconhecidos como um dos principais problemas da cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), devido aos danos que causam e sua ampla disseminação em diversos países. No Brasil, as espécies de *M. javanica* e *M. incognita* são as predominantes nessa hortaliça (PINHEIRO et al., 2014). Os NGs induzem a modificação de células da raiz para sua alimentação e reprodução. Essa modificação celular tem como sintoma visível as galhas nas raízes da planta, impedindo a absorção de água e nutrientes do solo, provocando deficiência mineral e perda de produtividade (VALE et al., 2013). Os danos causados por esses nematoides têm sido uma das principais preocupações dos produtores de tomate, pois esses patógenos causam danos diretos e indiretos, deixando as plantas predispostas ao ataque de outros patógenos.

Na cultura do tomateiro, os problemas causados pelas espécies do gênero *Meloidogyne* podem ser controlados através do uso de genes de resistência. A resistência aos nematoides-das-galhas é conferida por um único gene dominante *Mi-1.2*, localizado no cromossomo 6, que foi oriundo de espécie de tomateiros selvagem *Solanum peruvianum* L. (SMITH, 1944). Esse gene confere resistência contra populações de 13 espécies de NG ocorrentes no Brasil: *M. javanica, M. incognita, M. arenaria, M. morocciensis, M. ethiopica, M. inornata, M. luci, M. konaensis, M. paranaensis, M. izalcoensis, M. hispanica, M. petuniae* e *M. exigua*, (GABRIEL et al., 2020). Até o momento, esse gene tem sido a única fonte de resistência nas cultivares de tomateiro disponíveis no mercado, e pode ser considerado como um gene de resistência extremamente durável (WILLIAMSON, 1998).

De acordo com Iberkleid et al. (2014) mesmo que o gene *Mi-1.2* consiga bloquear o desenvolvimento do nematoide no estágio inicial da penetração, esse não confere uma resposta do tipo imunidade. Essa resistência pode não se manifestar em temperaturas contínuas acima de 32ºC, ou, como já relatado na literatura, quando desafiada por populações virulentas capazes de suprimir a ação deste gene (CASTAGNONE-SERENO et al., 1993, 1994; ROBERTS, 1995; ORNAT et al., 2001; DEVRAN e SÖĞÜT, 2010). Além disso, a dosagem alélica do gene *Mi-1.2* também pode ser capaz de afetar a expressão da resistência (JACQUET et al., 2005; MALEITA et al., 2011, IBERKLEID et al., 2014).

A reprodução de populações virulentas de *Meloidogyne* spp. em genótipos resistentes (contendo o ~~ao~~ gene *Mi*-1.2) tem sido relatada em áreas de cultivo de tomateiro em vários países, levando a uma limitação dessa estratégia de controle. Essas populações podem ser naturalmente virulentas, ou seja, sem exposição prévia a uma cultivar resistente (ORNAT et al., 2001), ou por seleção induzida (WILLIAMSON, 1998), ou seja, após exposições repetidas de cultivares resistentes (DEVRAN e SOGUT 2010; TZORTZAKAKIS et al., 2014).

Estudos sobre o papel da condição alélica do gene *Mi-1.2* na resposta das plantas aos nematoides-das-galhas apresentam resultados conflitantes. Tzortzakakis et al., (1998) observaram uma maior reprodução de isolados de *M. javanica* avirulentos em genótipos de tomateiro heterozigotos (*Mi*-1.2/*mi*-1.2), do que em relação aos homozigotos (*Mi*-1.2/*Mi*-1.2), sem diferença na taxa de reprodução de isolados virulentos nos respectivos genótipos. Por sua vez, Jacquet et al. (2005) ao testarem a possível influência do estado alélico homozigoto versus heterozigótico do locus *Mi-1.2* em populações avirulentas e virulentas de *M. incognita*, verificaram que a reprodução dos nematoides foi semelhante ou, com maior frequência, significativamente maior nos genótipos heterozigotos (*Mi*-1.2/*mi*-1.2) de tomateiro do que nos homozigotos (*Mi*-1.2/*Mi*-1.2), sugerindo um possível efeito da dosagem do gene *Mi-1.2*. Da mesma forma, Maleita et al. (2011) demonstraram que um número crescente de alelos do gene *Mi-1.2* está associado a uma diminuição no fator de reprodução de *M. hispanica* em tomateiro. Em outro estudo, Iberkleid et al. (2014), verificaram que populações avirulentas de *M. javanica* não conseguiram se reproduzir em genótipos homozigotos (*Mi*-1.2/*mi*-1.2), sendo observada reprodução apenas nos genótipos heterozigotos (*Mi*-1.2/*mi*-1.2),

No entanto, identificar os eventos gerais associados ao parasitismo bem sucedido das plantas pelos nematoides-das-galhas ou a defesa bem sucedida pelo hospedeiro resistente, são pré-requisitos para compreender a biologia da interação planta-nematoide. Além disso, o conhecimento do efeito da dosagem alélica do gene *Mi-1.2* nos materiais comercializados sobre populações virulentas e avirulentas, podem gerar novas ideias de estratégias para o controle desse patógeno nas plantas cultivadas.

Os mecanismos de resistência de plantas aos fitonematoides podem ser pré e pós-penetração (HUANG, 1985; TRUDGILL, 1991). Os mecanismos de pré-penetração ocorrem antes que o nematoide penetre a raiz da planta. Nesse mecanismo, a produção

de substâncias químicas presentes nos exsudatos radiculares interfere na atração do nematoide (HUANG, 1985). Enquanto nos mecanismos de pós-penetração ocorre após a penetração dos J2s com ativação de processos fisiológicos, moleculares e genéticos na planta hospedeira, impedindo ou atrasando o desenvolvimento do nematoide, inibindo a formação de sítios de alimentação e/ou limitando a reprodução das fêmeas (HUANG, 1985; TRUDGILL,1991).

Nos últimos anos, têm sido observados diversos mecanismos de resistência em plantas parasitadas por nematoides-das-galhas, entre eles, a reação de hipersensibilidade que se deve ao acúmulo de compostos fenólicos, formação de fitoalexinas e a atividade das enzimas fenilalanina amônia liase (PAL), b-glucanase, peroxidase e polifenoloxidase, dentre outras (FRAGOSO et al., 2007; LOPES et al., 2020; MATTOS et al., 2019). Como no caso das plantas de tomateiros portadoras do gene *Mi*-1.2, onde o principal mecanismo de resistência persiste nos primeiros dias após a infecção pelo nematoide, desencadeando a reação de hipersensibilidade (RH), ocorre morte celular próximo ao local de alimentação do nematoide (DROPKIN, 1969; SCHAFF et al., 2007). Essa reação funciona como uma barreira bioquímica que bloqueia o desenvolvimento dos juvenis de segundo estádio (J2s).

Considerando as questões acima abordadas, o objetivo desse trabalho foi avaliar as respostas de diferentes porta-enxertos que diferem em suas características alélica a diferentes populações de *Meloidogyne* spp. avirulentas e virulenta; também analisar as alterações histopalógicas associadas à infecção por populações *Mi*-1.2 avirulentas e *Mi*-1.2 virulenta de *M. javanica* em porta-enxertos de tomateiro resistente e suscetível, a fim de conhecer os mecanismos que atuam para controlar a infecção na planta.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Populações de *Meloidogyne* spp., utilizadas no presente estudo

Foram utilizadas no estudo sete populações de três espécies de *Meloidogyne* uma virulenta (*M. javanica*e seis avirulentas (*M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria*) ao gene *Mi*-1.2. Todas foram previamente identificadas pela caracterização enzimática (Tabela 1), de acordo com a metodologia descrita por CARNEIRO e ALMEIDA (2001). Dessas populações seis são provenientes de áreas de produção de tomate da região

noroeste do estado do Rio Grande do Sul e uma do Distrito Federal, Brasil.

Tabela 1 - Origem e perfil enzimático das populações de *Meloidogyne* spp. obtidas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) em regiões produtoras do tomate no Rio Grande do Sul e em Brasília-DF.

Código	Espécie	Origem geográfica	Coordenadas	Hospedeiro /cultivar	Perfil enzimático (Esterase)
MJFW	*M. javanica* v*	Frederico Westphalen	27º 21' 32" S/53º 23' 38" O	*S. lycopersicum* / 'Guardião'	J3 e J2
MJRB	*M. javanica a**	Rodeio Bonito	27º 28' 15" S/53º 10' 08" O	*S. lycopersicum*/ Santa Cruz 'Kada'	J3
MJDF	*M. javanica a*	Brasília (Embrapa Hortaliças)	15º 55' 58.19" S/48º 8' 40.69" O	*S. lycopersicum*/ 'Santa Clara'	J3
MIPM	*M. incognita a**	Palmeira das Missões	27º 53' 56" S/53º 18' 50" O	*S. lycopersicum/'*Santa Clara*'*	I2
MIFW	*M. incognita a*	Frederico Westphalen	27º 21' 32" S/53º 23' 38" O	*S. lycopersicum/ '*Santa Clara *I5300'*	I2
MIRB	*M. incognita a*	Rodeio Bonito	27º 28' 15" S/53º 10' 08" O	*S. lycopersicum* 'Santa Cruz Kada'	I2
MAFW	*M. arenaria a**	Frederico Westphalen	27º 21' 32" S/53º 23' 38" O	*S. lycopersicum*/ 'Santa Clara'	A2

M.javanica v = *Meloidogyne javanica* virulenta; *M. javanica* a = *Meloidogyne javanica* avirulenta; *M. incognia* a = *Meloidogye incognita* avirulenta e *M. arenaria* a = *Meloidogyne arenaria* avirulenta.

5.2.2 Material vegetal utilizado e condições de crescimento

Sete porta-enxertos de tomateiro (*S. lycopersicum*) portadores do gene *Mi*-1.2 foram usados no estudo. Todas as sementes foram germinadas em bandejas com substrato esterilizado, aos 14 dias após a germinação, foram transplantadas para o recipiente definitivo, em vasos plásticos de 3 litros contendo solo e substrato (2:1), previamente autoclavados.

Antes da inoculação, todos os porta-enxertos de tomateiro foram estudados quanto às suas características alélicas, em relação ao gene *Mi-1.2* por métodos baseados na reação em cadeia de polimerase (PCR). Os híbridos resistentes utilizados foram BSPE 0041', 'Guardião', 'Muralha', 'Defensor', 'DR 6632 TX', 'TD1' e 'AF 26296' e mais o tomateiro suscetível 'Santa Clara'. Para confirmar a presença / ausência do gene *Mi*-1.2 foram utilizadas como padrões as cultivares: 'Viradooro' - homozigota resistente, cultivar 'BRS Zamir' - homozigota suscetível e cultivar 'BRS Nagai' - heterozigota resistente.

Para a purificação dos ácidos nucléicos de acordo com a metodologia CTAB 2X modificada por Boiteux et al. (1999), foram utilizadas folhas apicais jovens de diferentes cultivares. O *Pellet* de DNA foi lavado cuidadosamente com álcool a 70%. Os tubos da microcentrífuga foram aquecidos a temperatura de 37 °C por 20 minutos e ressuspensos em 100 µL de tampão Tris – EDTA + RNAse.

As amostras purificadas foram agitadas em vórtice e armazenadas a -20 °C. As amplificações de PCR foram realizados com um par de iniciadores 'Mi23F' (5'-TGG-AAA-AAT-GTT-GAA-TTT-CTT-TTG-3') e 'Mi23R' (5'-GCA-TAC-TAT-ATG-GCT-TGT-TTA-CCC-3'), que é considerado o marcador molecular co-dominante mais confiável para a detecção de alelos contrastantes no gene / locus *Mi*-1.2 (SEAH et al., 2007; BHAVANA et al., 2019). As reações de PCR consistiram de 1,25 µL de tampão *Taq* DNA polimerase 10X (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3 e KCl 500 mM), 1,25 µL de dNTPs (2,5 mM, Invitrogen) 0,5 µL de cada primer, 0,75 µL de $MgCl_2$ (50 mM), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U / µL, Invitrogen), 0,5 µL de água Milli-Q (Millipore, Billerica, MA) e 3 µL de suspensão de DNA (ajustado para 20 ng / µL) com um volume final de 12,5 µL. As amplificações foram realizadas com os seguintes parâmetros: passo inicial de desnaturação a 94 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos - desnaturação a 94

°C por 30 segundos; recozimento a 57 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto - e uma etapa final de extensão de 72 °C por 10 minutos. Azul de bromofenol (4 µL) foi adicionado a cada amostra e aplicado ao gel de agarose a 1,5%, já suplementado com brometo de etídio. Os fragmentos de DNA amplificado foram separados por eletroforese em tampão TBE (Tris-Borato 45 mM e EDTA 1 mM) a 120V por um período de aproximadamente 3 horas. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, usando o 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen) para análise do perfil de amplificações.

5.2.3 Preparo do inóculo e teste de agressividade e virulência de populações de *Meloidogyne* spp. em porta-enxertos de tomateiro

As populações foram multiplicadas em raízes de tomateiro cv. 'Santa Clara' e mantidas em casa de vegetação em temperatura variando de 23ºC a 28ºC. A suspensão de ovos de cada população de *Meloidogyne* spp. foi obtida conforme a metodologia de HUSSEY e BARKER (1973), mediante a trituração das raízes em liquidificador com hipoclorito de sódio a 0,5%, durante aproximadamente 30 segundos. As raízes trituradas foram passadas por um conjunto de três peneiras de 20, 100 e 500 Mech, permitindo a coleta da suspensão de ovos + J2s na peneira 500.

Cada plântula foi inoculada com 5.000 ovos + J2 aplicados em quatro orifícios equidistantes, ao redor das plantas. Esta, foi efetuada uma semana após o transplante dos porta-enxertos estudados. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições para cada genótipo testado. Plantas de tomateiro cv. 'Santa Clara' foram inoculadas com o mesmo nível de inóculo para averiguação de sua viabilidade.

Decorridos 90 dias da inoculação, as raízes de cada planta foram separadas da parte aérea, lavadas em água corrente e avaliadas: a massa fresca da raiz (MFRs), o índice de galhas (IG), índice de massa de ovos (IMO) e fator de reprodução (FR). As MFRs foram obtidas através da pesagem do sistema radicular em balança de precisão. Para quantificação do índice de galhas (IG) e índice de massa de ovos (IMG) foram contadas individualmente e avaliadas conforme a escala de 0 a 5, sendo 0 = 0 galhas; 1 = 1- 2; 2 = 3-10; 3 = 11-30; 4 = 31-100 e 5 = > 100 (TAYLOR e SASSER, 1978).

Para a determinação do número total de ovos/planta/repetição, os nematoides foram extraidos como descrito por Hussey e Barker (1973) com NaOCl a 1%, usando trituração em liquidificador, como no item anterior. O fator de reprodução (FR) de cada

planta foi obtido pelo número total de ovos/planta ou população final (PF) pelo número de ovos inoculados ou população inicial (PI = 5.000). Inicialmente, foi verificado se os dados apresentavam distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados que não atenderam os pressupostos de normalidade foram transformados em log (x+1) antes da análise da variância. A comparação das médias entre os tratamentos foi feita pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o *software* SISVAR (FERREIRA, 2011).

A reação de suscetibilidade e/ou resistência dos porta-enxertos de tomateiro foram realizadas com base nos valores de FR, utilizando a proposta de OOSTENBRINK (1966), sendo consideradas plantas com FR<1, altamente resistente (AR). Para valores de FR>1, foram consideradas as reações: R = resistente e S = suscetível e AS = altamente suscetível, segundo os conceitos de HUSSEY e JANSSEN (2002), que consideram resistentes plantas com redução de FR acima de 90%, em relação à testemunha altamente suscetível. Foram usadas também as análises estatísticas. Os tomateiros cv. 'Santa Clara' (altamente suscetível) e 'Guardião' (altamente resistente) foram utilizados para analisar respostas histopatológicas.

5.2.4 Estudos histopatológicos das interações compatíveis e incompatíveis entre tomateiros resistente e suscetível e populações de *M. javanica* *Mi*-1.2 avirulenta e *Mi*-1.2virulenta

Para estudar o desenvolvimento da população virulenta e avirulenta de *M. javanica* em tomateiro suscetível ('Santa Clara') e resistente ('Guardião', *Mi*-1.2/*Mi*-1.2),), as plantas foram cultivadas em vasos contendo areia esterilizada e fertilizadas semanalmente conduzidas em casa de vegetação com temperatura varaiando de 24ºC a 28ºC. Decorridos 15 dias após a emergência, as plântulas foram inoculadas com cada população do nematoide-das-galhas separadamente. Para isso 10.000 juvenis de segundo estádio (J2s) foram colocados em quatro orifícios feitos próximos ao colo das plantas. Posteriormente, essas plantas foram mantidas em casa de vegetação.

Plantas de cada porta-enxerto resistente e suscetível (três repetições) foram cuidadosamente removidas dos vasos 2 dias após a inoculação (DAI) e aos 4, 6, 9, 11, 13, 16, 21, 19, 27 e 34 DAI e suas raízes foram lavadas com água da torneira. As raízes de cada planta resistente e suscetível foram coradas com fucsina ácida, conforme descrito por BYRD et al. (1983), para observar a penetração e localização dos J2s que

penetraram em toda a raiz e, finalmente, o desenvolvimento subsequente do nematoide nas raízes. Analisaram-se, aproximadamente, 60 pontas de raiz por ponto, nos diferentes tempos por tratamento.

Posteriormente, os segmentos radiculares corados foram cortados sob um microscópio-estereomicroscópio e as partes que apresentavam infecção por nematoides foram montadas em lâminas para observação sob microscópio óptico e fotografadas (AxioPhot; Zeiss). Três outros sistemas radiculares de cada genótipo foram utilizados para produzir seções.

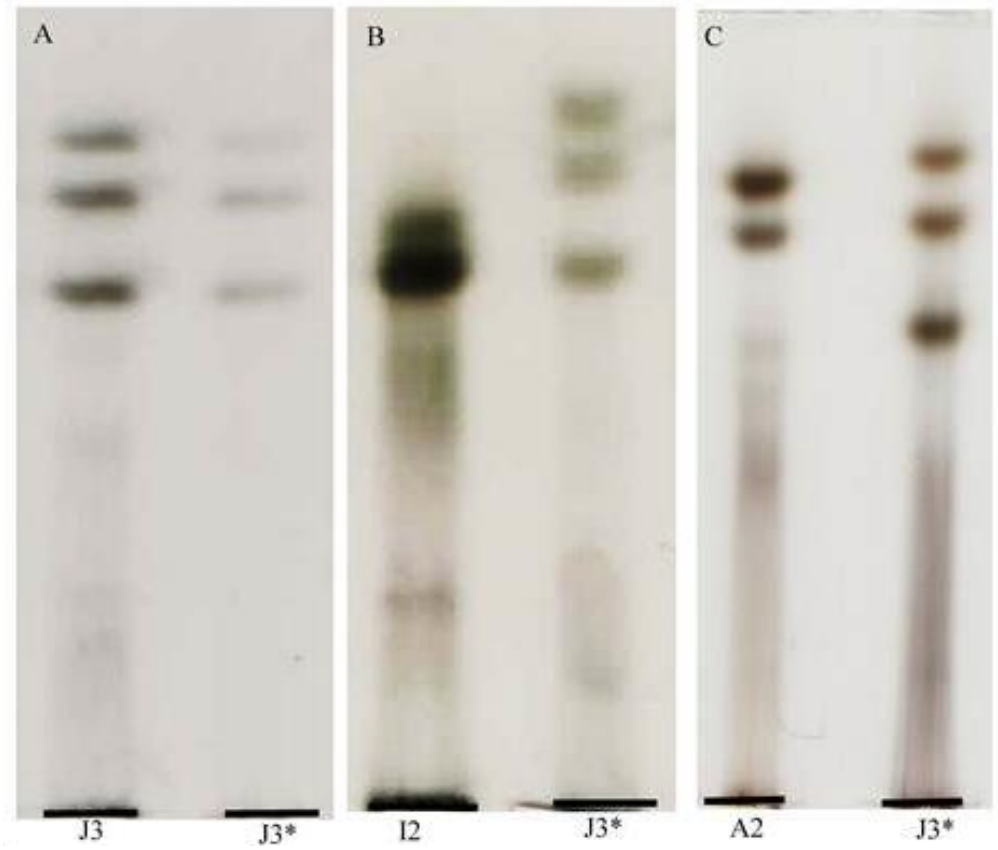
Os fragmentos de raiz (não coradas) mostrando galhas ou engrossamentos ou sem sintomas, foram cortados sob um estereomicroscópio e em seguida, fixados e embebidos em resina epóxi Technovit 7100 (Kulzer Friedrichsdorf), como descrito por PEGARD et al. (2005), e de acordo com as recomendações do fabricante. Secções radiculares não coradas foram montadas em lâminas de vidro e a fluorescência foi observada após excitação por ultravioleta (UV). As mesmas seções foram subsequentemente coradas (1 min a 60 °C) com 0,5% de azul de toluidina em 0,1 M de tampão fosfato de sódio, pH 5,5, e observadas usando um microscópio óptico. Mais de 5.000 seções de cada tratamento foram visualizadas e documentadas.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Caracterização de espécies de *Meloidogyne*

Todas as populações de *Meloidogyne* spp. do estudo foram identificadas e confirmadas bioquimicamente pelo perfil da enzima esterase (Est) (Figura. 1, Tabela 1). As espécies apresentaram fenótipos típicos de Est: *M. javanica* (Est J3, Rm:1.00, 1.20, 1.40; Est J2 RM: 1.00, 1.20), *M. incognita* (Est I2, Rm:1.00, 1.06), *M. arenaria* (Est A2, Rm:1.20, 1.30).

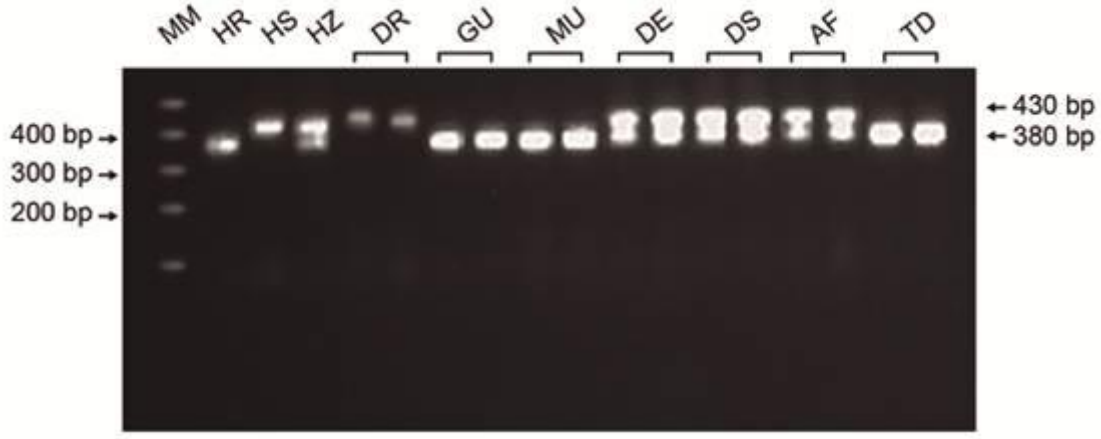
Figura 1 - (**A**) *Meloidogyne javanica* EST J3; (**B**) *Meloidogyne incognita* EST. I2. (**C**) *Meloidogyne arenaria* EST. A2. Fenótipo de *M. javanica* é utilizado como padrão em todos os géis. Fonte: Márcia Gabriel.



5.3.2 Detecção dos alelos do gene *locus Mi-1.2*

Os ensaios de PCR realizados com o par de iniciadores Mi23F/Mi23R confirmaram que as cultivares padrões Viradooro, BRS Zamir e BRS Nagai utilizadas como controles foram homozigoto resistente (banda de 380 pb), homozigoto suscetível (banda de 430 pb) e heterozigoto resistente (bandas de 380 e 430 pb), respectivamente (Figura 2). Os porta-enxertos Guardião, Muralha e TD1 foram identificados como homozigoto resistentes (*Mi*-1.2/*Mi*-1.2), apresentando uma banda de 380 pb, e os porta-enxertos Defensor, BSPE 0041 e AF 26296 foram identificados como heterozigotos resistentes (*Mi*-1.2/*mi*-1.2), apresentando duas bandas de 380 e 430 pb, já o porta-enxerto DR 6632 TX foi identificado como homozigoto suscetível (*mi*-1.2/*mi*-1.2), apresentando uma banda de 430 pb (Figura 2), igual a um dos padrões 'BRS Zamir'.

Figura 2 – Amplificações da PCR obtidos com o par de iniciadores ‘Mi23F’ e ‘Mi23R’, empregando como modelo o DNA total extraído de três amostras controle e de 'hibridos portadores do gene *Mi*-1.2. MM = marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen); **HR** = amostra de controle resistente homozigota = cultivar ‘Viradoro’ (banda com 380 pb); **HS =**= amostra de controle suscetível homozigota = cultivar ‘BRS Zamir’ (somente a banda com 430 pb); **HZ** = amostra de controle heterozigota, resistente = cultivar ‘BRS Nagai’ (com ambas as bandas de 380 e 430 pb); **DR**: DR 6632TX, hibrido (uma banda – 430 pb - indicando que esse porta-enxerto é homozigoto suscetível (*mi*-1.2/*mi*-1.2), **GU:** Guardião, **MU**: Muralha e **TD**: TD1 (com uma banda – 380 pb – indicando que esses porta-enxertos são homozigotos resistentes (*Mi*-1.2/*Mi*-1.2) e os híbridos **DE**: Defensor, **BS**: BSPE 0041 e **AF**: 26296 (duas bandas – 380 pb e 430 pb – indicando que esses porta-enxertos são heterozigotos (*Mi*-1.2/*mi*-1.2).



5.3.3 Agressividade e virulência de populações de *Meloidogyne* spp. em porta-enxertos de tomateiro

Os resultados de reação dos diferentes porta-enxertos de tomateiro às populações de *Meloidogyne* spp., estão apresentados nas tabelas 2 e 3. As reações de resistência e/ou suscetibilidade foram classificadas com base no fator de reprodução (FR). A cultivar ‘Santa Clara’ (controle suscetível) apresentou-se como altamente suscetível para todas as populações, apresentando médias referentes ao FR entre 33,58 e 424,19, dependendo da agressividade e/ou virulênciada população do nematoide em questão, como é o caso da população do DF (MJDF), nitidamente a menos agressiva que as demais (Tabela 2). Todos os porta-enxertos de tomateiro resistentes testados foram suscetíveis à população virulenta de *M. javanica* (MJFW) de Frederico Westphalen (Tabela 2). O porta-enxerto DR 6632TX (*mi*-1.2/*mi*-1.2) mostrou-se suscetível às

populações testadas, variando os FRs de acordo com a agressividade das populações analisadas, entretanto, os FRs foram muito inferiores aos da testemunha absoluta (Tabela 2). Os dois híbridos homozigotos no *locus Mi*-1.2 (Guardião e Muralha) foram classificados como altamente resistente as populações *M. javanica* MJRB e MJDF, *M. incognita* MIPM, MIFW, MIRB e *M. arenaria* MAFW. Já o porta enxerto TD1 (*Mi*-1.2/*Mi*-1.2) foi resistente as populações MJRB, MJDF, MIPM, MIFW, MIRB e MAFW estudadas e altamente resistente a *M. arenaria* (Tabela 2).

Os porta-enxertos heterozigotos (*Mi*-1.2/*mi*-1.2) Defensor e AF 26296 (Mimi) foram resistentes a todas as populações de *Meloidogyne* spp., exceto a *M. javanica* MJRB (Tabela 2). Já o porta-enxerto BSPE 0041, também heterozigoto (*Mi*-1.2/*mi*-1.2) foi resistente a todas as populações avirulentas de *Meloidogyne* da Tabela 2.

Os resultados indicaram que tanto a condição alélica do gene *Mi-1.2* (P<0,0001) quanto a população do nematoide (P<0,0001) influenciaram significativamente na resistência, havendo também interação significativa entre esses dois fatores (P< 0,0001).

A população MJFW de *M. javanica* se reproduziu em todos os porta-enxertos resistentes (heterozigotos ou homozigotos para o gene *Mi*-1.2) (Tabela 2), diferindo significativamente das demais populações de *Meloidogyne* testadas. O número de nematoide por grama de raiz variou de 6051,99 a 9853,80 e o fator de reprodução de 106,93 a 183,46 (Tabela 2), indicando que a reprodução do nematoide virulento não foi afetada pela condição alélica.

Embora, o fundo genético dos porta-enxertos homozigotos e heterozigotos não tenha efeito na reprodução da população 1 de *M. javanica* (MJ FW), foi observada uma influência significativa do fundo genético quando esses foram infectados por nematoides avirulentos (*M. javanica* RB, DF, *M. incognita* PM, FW e RB e *M. arenaria MA*FW).

Ao analisar o fator de reprodução dos nematoides, observou-se que nas populações avirulentas os FRs foram maiores no tomateiro suscetível (Santa Clara) do que nos materiais portadores do gene *Mi*-1.2 (Tabela 2), enquanto que na população virulenta (MJ p1) os FRs observados no tomateiro suscetível foram estatisticamente iguais aos observados nos porta-enxertos resistentes (Muralha, TD1, BSPE 0041 e AF 26296).

Nas populações avirulentas os menores números de nematoides por grama de

raiz foram observadas nos porta-enxertos ‘Guardião e Muralha’ (Tabela 2), ambos homozigotos para o gene *Mi*-1.2, demonstrando um maior nível de resistência e, portanto, maior capacidade para redução da densidade do nematoide das galhas e provavelmente, mais eficiente quando utilizados em condições de campo.

Todos os porta-enxertos estudados apresentaram altos IGs e IMOs para população 1 de *M. javanica* virulenta (Tabela 3). Embora a população virulenta não tenha apresentado diferença no índice de galhas em relação a cultivar suscetível ‘Santa Clara’, observou-se que os porta-enxertos portadores do gene *Mi*-1.2 apresentaram galhas de menor tamanho em relação a cultivar suscetível (Figura 3). Nas populações avirulentas, os IGs e IMOs variaram de 0,0 a 5,0 nos porta-enxertos homozigotos (‘Guardião’ e ‘Muralha’) e heterozigotos (DR 6632TX), respectivamente, correspondendo com os resultados observados nas variáveis NNGR e FR (Tabela 2). Resultados inconsistentes foram observados entre IGs e FR nos porta-enxertos TD1, Defensor, BSPE e AF 26296 para populações MJ p2 e MJ p3, apresentando IGs = 0 e FR entre 1,58 e 22,71. O porta-enxerto Muralha para as populações MJ p3 e MA p1 apresentou massas de ovos, porém essas não continham ovos como observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Reação de sete porta-enxertos de *Solanum lycopersicum* com diferentes dosagens alélicas do gene dominante *Mi*-1.2 a saber: DR 6632 TX homozigoto suscetível (*mi*-1.2/*mi*-1.2), Guardião homozigoto resistente (*Mi*-1.2/*Mi*-1.2), Muralha homizigoto resistente (*Mi*-1.2/*Mi*-1.2), TD1 homozigoto resistente (*Mi*-1.2/*Mi*-1.2), Defensor heterozigoto resistente (*Mi*-1.2/*mi*-1.2), BSPE 0041 homizigoto resistente (*Mi*-1.2/*mi*-1.2), AF 26296 homozigoto resistente (*Mi*-1.2/*mi*-1.2) e cultivar 'Santa Clara' homozigota suscetível (*mi*-1.2/*mi*-1.2) para três populações de *M. javanica*, três de populações de *M. incognita* e uma população de *M. arenaria*.

Porta-enxerto e cultivar	MJ p1	MJ p2	MJ p3	MI p1	MI p2	MI p3	MA p1
	Número de nematoide por grama de raiz						
DR6632TX	9891,73 bA	4701,15 aB	987,83bD	5661,15 bB	3602,21bB	2157,87 bC	4415,00 bB
Santa Clara	9609,52 bE	5679,31 aF	2097,04 aG	17259,17 aD	39226,11 aB	49490,14 aA	24395,09 aC
Guardião	9632,69 bA	9,88 dB	9,91 dB	33,88 dB	0,00 eB	0.00 eB	0.00 dB
Muralha	12261,80 aA	30,61 dB	0,00 dB	36,46 dB	0.00 eB	0.00 eB	10,79 dB
TD1	6051,99 cA	350,11 cC	223,00 cC	1453,22 cB	4359,75 bA	1607,87 bB	163,16 cC
Defensor	10074,11 bA	3287,39 bB	416,13 cC	686,93 cC	692,72 dC	626,46 cC	582,10 cC
BSPE0041	12053,28 aA	518,01 cB	206,12 cB	807,80 cB	431,41 dB	360.94 dB	297,56 cB
AF26296	9853,80 bA	923,58 cC	300,04 cB	1100,72 cC	1753,24 cC	1522,42 bC	273,57 cC
CV				21,64			

	FR	Re	FR	Re	FR	Re	FR	Re	FR	Re	FR	Re	FR	Re
DR6632TX-	173,60 aA	AS	72,60 bB	S	25,20 aC	S	35,59 aC	S	25,73bC	S	14,42 bD	S	30,23 aC	S
Santa Clara	172,41 aD	AS	123,46 aE	AS	33,58 aF	AS	163,35 aD	AS	360,91 aB	AS	424,19 aA	AS	217,36 aC	AS
Guardião	115,13 bA	AS	0,10 cB	AR	0,10 cB	AR	0,13 dB	AR	0,00 dB	AR	0,00 eB	AR	0,00 bB	AR
Muralha	183,46 aA	AS	0,25 cB	AR	0,00 cB	AR	0,14 dB	AR	0,00 dB	AR	0,00 eB	AR	0,00 bB	AR
TD1	154,10 aA	AS	6,92 dB	R	3,66 bC	R	2,34 cC	R	6,01 cB	R	3,84 dC	R	0,79 cC	AR
Defensor	106,93 bA	AS	22,71 cB	S	3,45 bC	R	3,24 cC	R	2,91 cC	R	2,89 dC	R	3,66 cC	R
BSPE 0041	176,43 aA	AS	6,51 dB	R	1,58 bC	R	2,45 cC	R	1,84 dC	R	1,77 dC	R	1,68 cC	R
AF 26296	164,03 aA	AS	14,97 cB	S	3,50 bC	R	3,27 cC	R	8,25 cB	R	6,26 cC	R	1,48 cC	R
CV							16,64							

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. MJ p1= *M. javanica* população 1, MJ p2= *M. javanica* população 2 e MJ p3= *M. javanica* população 3; MI p1= *M. incognita* população 1, MI p2= *M. incognita* população 2, MI p3= *M. incognita*

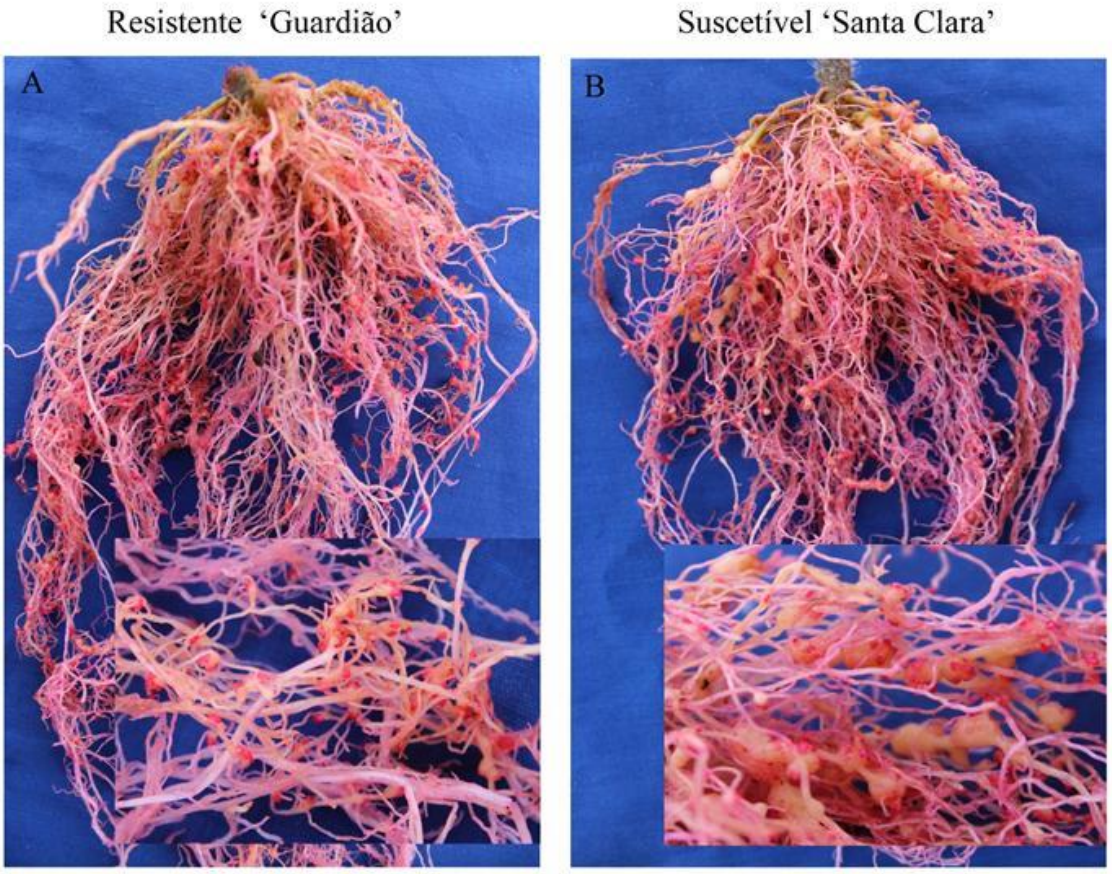
população 3 e MA p1= *Meloidogyne arenaria*; AR= Altamente resistente; R= resistente e S= Suscetível; AS= altamente suscetível.

Tabela 3 - Índice de galhas e massa de ovos de sete porta-enxertos de *Solanum lycopersicum* com diferentes dosagens alélicas do gene dominante *Mi*-1.2 a saber: DR 6632 TX homozigoto suscetível (*mi*-1.2/*mi*-1.2), Guardião homozigoto resistente (*Mi*-1.2/*Mi*-1.2), Muralha homizigoto resistente (*Mi*-1.2/*Mi*-1.2), TD1 homozigoto resistente (*Mi*-1.2/*Mi*-1.2), Defensor heterozigoto resistente (*Mi*-1.2/*mi*-1.2), BSPE 0041 homizigoto resistente (*Mi*-1.2/*mi*-1.2), AF 26296 homozigoto resistente (*Mi*-1.2/*mi*-1.2) e cultivar 'Santa Clara' homozigota suscetível (*mi*-1.2/*mi*-1.2) para três populações de *M. javanica*, três de populações de *M. incognita* e uma população de *M. arenaria*.

Porta-enxerto e cultivar	MJ p1	MJ p2	MJ p3	MI p1	MI p2	MI p3	MA p1
	Índice de galhas						
DR6632TX	5	4	4	4	5	5	5
Santa Clara	5	5	5	5	5	5	5
Guardião	5	0	0	0	0	0	0
Muralha	5	0	0	0	0	0	0
TD1	5	0	0	3	2	3	2
Defensor	5	0	0	2	0	2	3
BSPE 0041	5	0	0	2	0	3	2
AF 26296	5	0	0	4	2	3	2
	Índice de massa de ovos						
DR6632TX	5	5	3	5	5	5	5
Santa Clara	5	5	5	5	5	5	5
Guardião	5	1	1	1	0	0	0
Muralha	5	1	1	1	0	0	1
TD1	5	3	2	3	3	2	2
Defensor	5	4	2	3	2	3	2
BSPE 0041	5	2	2	3	2	2	2
AF 26296	5	2	2	3	3	3	3

MJ p1= *M. javanica* população 1, MJ p2= *M. javanica* população 2 e MJ p3= *M. javanica* população 3*;* MI p1= *M. incognita* população 1, MI p2= *M. incognita* população 2, MI p3= *M. incognita* população 3; MA= *Meloidogyne arenaria*; (mi.mi)= homozigoto suscetível, (Mi.Mi)= homozigoto resitente, (Mi.mi)= heterozigoto resistente Índices: Calculados de acordo com a metodologia proposta por Taylor e Sasser (1978)

Figura 3 - **A**: Sistema radicular de planta do porta-enxerto de tomateiro ‘Guardião’ resistente (portador do gene *Mi*-1.2) apresentando galhas pequenas; **B**: Sistema radicular de planta de tomateiro suscetível cv. ‘Santa Clara’ com galhas grandes inoculadas com *M. javanica* virulento aos 34 DAI. Fonte: Márcia Gabriel.



5.3.4 Análise histopatológica

Através de observações das raízes de tomateiro coradas com fucsina ácida e das secções de radicelas coradas com azul de toluidina, visualizadas sob microscópio em luz (LM) e Ultra Violeta (UV), foi possível acompanhar a duração, em dias, do ciclo de vida de *M. javanica* virulento e avirulento na planta altamente suscetível ‘Santa Clara’ e no porta-enxerto altamente resistente ‘Guardião, bem como observar as modificações celulares de ambos os materiais estudados durante o desenvolvimento do nematoide.

5.3.4.1 *Meloidogyne javanica* ***avirulento***

Analisando-se as raízes da cultivar altamente suscetível ‘Santa Clara’ coradas com fucsina ácida, observou-se dos 2 e 7 dias de inoculação (DAI) grande penetração (96 indivíduos) de juvenis de segundo estagio (J2s) na região do córtex da raiz e alguns já alimentando na região do cilindro central (**Figura 4A – B e Tabela 4**). As observações microscópicas das secções de radicelas coradas com azul de toluidina, aos 4 DAI, demonstraram o inicio da formação das células gigantes (**Figura 4C**) e aos 11 DAI a presença de células gigantes formadas ao lado de juvenis de terceiro estádio (J3) (**Figura 4D**). Nessa fase já pode ser observado o alargamento da raiz (**Figura 4E**).

Aos 11 DAI, juvenis de quarto estádio ao lado de células gigantes já formadas, com espessamento das paredes, podem ser observados na região dos vasos condutores (**Figura 4F**). Aos 24 DAI pode-se observar a presença de fêmeas jovens (**Figura 4G**) e aos 34 DAI fêmea adulta ao lado de células gigantes com vários núcleos e paredes bem espessa no cilindro central (**Figura 4H**). Observou-se também a ovoposição de fêmeas adultas (**Figura 4I**), completando assim, o ciclo de vida no tomateiro altamente suscetível.

Já as raízes do porta-enxerto altamente resistente ‘Guardião’, coradas com fuccina ácida, mostraram que poucos (cinco) juvenis de *M. javanica* avirulentos foram capazes de penetrar nas raízes do porta-enxerto resistente ‘Guardião’, aos 4 e 7 DAI (**Figura 5A e Tabela 4**). Dentre os poucos J2s que penetraram nas raízes, a maioria permaneceu no córtex da planta e morreu nesse local, sem a formação de células gigantes, e consequente desenvolvimento do nematoide.

Por meio de secções visualizadas à luz ultravioleta (UV), obtidas aos 7 DAI, foi possível observar reação de hipersensibilidade (HR) na região do córtex (**Figura 5B**). Poucos J2s penetraram na região do cilindro central e alguns HRs foram observados nessa região (**Figura 5C**). Essas secções, quando coradas com azul de toluidina, apresentaram uma coloração escura nos mesmos locais (**Figura 5D**), características de morte celular.

Do 4 ao 16 DAI, foi observada a penetração intensa de J2s do *M. javanica* avirulento (Tabela 4) nas raízes da cv. Santa Clara, utilizada como padrão de suscetibilidade, com a maior taxa de penetração aos 7 DAI (Tabela 4). Somente nas raízes da cv. Santa Clara foram observadas as fases de desenvolvimento e reprodução do

nematoide, sendo que, todas as fases de desenvolvimento foram observadas aos 24 e 34 DAI (Tabela 4).

Figura 4 - Interação de compatibilidade observada na planta suscetível. Raízes da cv. Santa Clara (controle) infectadas com *Meloidogyne javanica* avirulento. **A**, **B**, **E**, **G** e **I** = observações em microscopia de campo claro (LM) de fragmentos de raiz corados com fucsina ácida. Secções **C**, **D**, **F** e **H** = Raízes coradas com azul de toluidina. **A =** J2s no córtex e cilindro central, e **B** = J2s alimentado no cilindro central. **C** = secções mostrando inicio da formação das células gigantes; **D** = juvenil de terceiro estádio (J3) ao lado de células gigantes; **E** = juvenil de terceiro estádio (J3) no cilindro central e alargamento da raiz; **F** = células gigantes em formação ao lado ao lado de J4; **G** = Fêmeas jovem; **H** = Fêmea adulta e células gigantes com vários núcleo e parede espessa e **I** = Massa de ovos. **DAI** = dias após a inoculação, **N** = nematoide, **GC** = célula gigante, **IGC**= Célula gigante inicial **EG** = massa de ovo, **YF** = Fêmeas jovem CC= cilindro central.

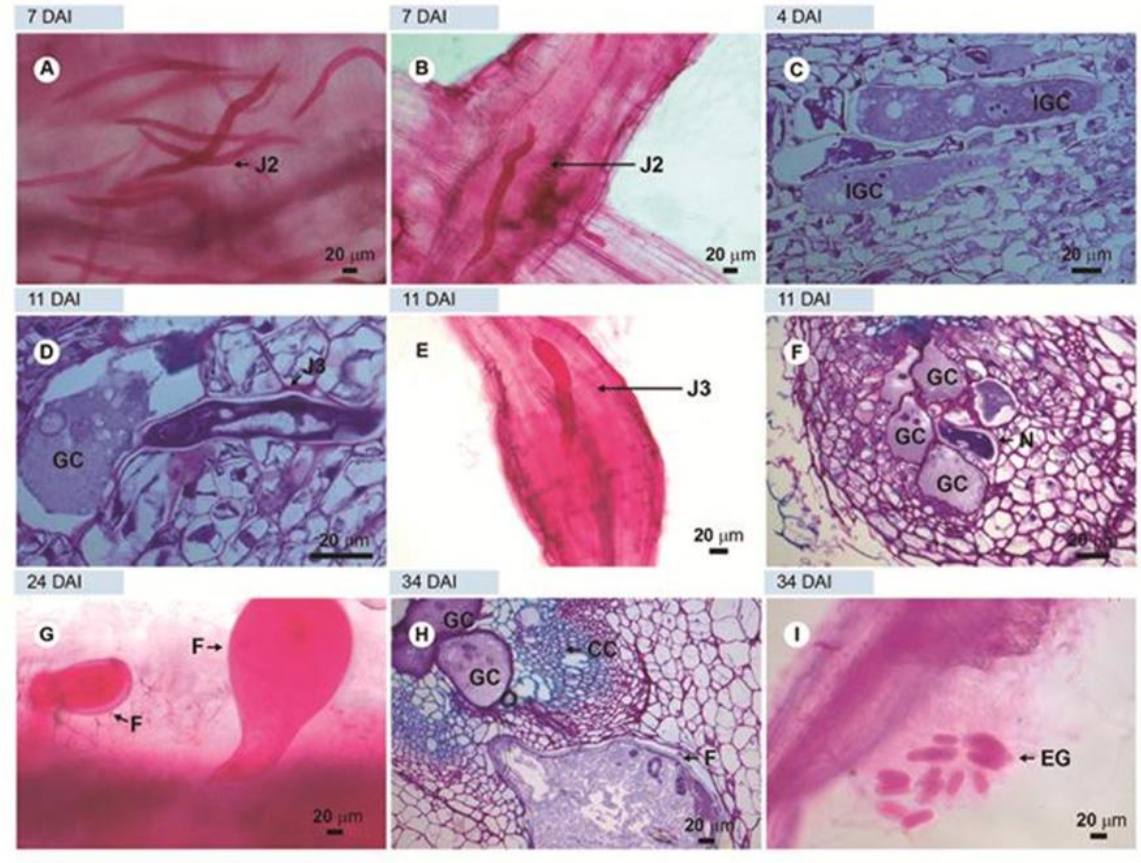


Figura 5 - Interação incompatível observada na planta resistente. Raízes do hibrido 'Guardião' infectadas com *Meloidogyne javanica* avirulento. **A** = observações em microscopia de campo claro de fragmento de raiz corado com fucsina ácida. Seções **B** e **C** = secções não coradas visualizadas ao UV; **D** = seção corada com azul de toluidina, mostrando morte celular (CD). **A** = juvenil de segundo estádio (J2) dentro da raiz aos 7DAI; **B** e **C** =reação de hipersensibilidade (HR). **DAI =** dias após inoculação, **HR** = reação de hipersensibilidade, **CD=**morte celular.

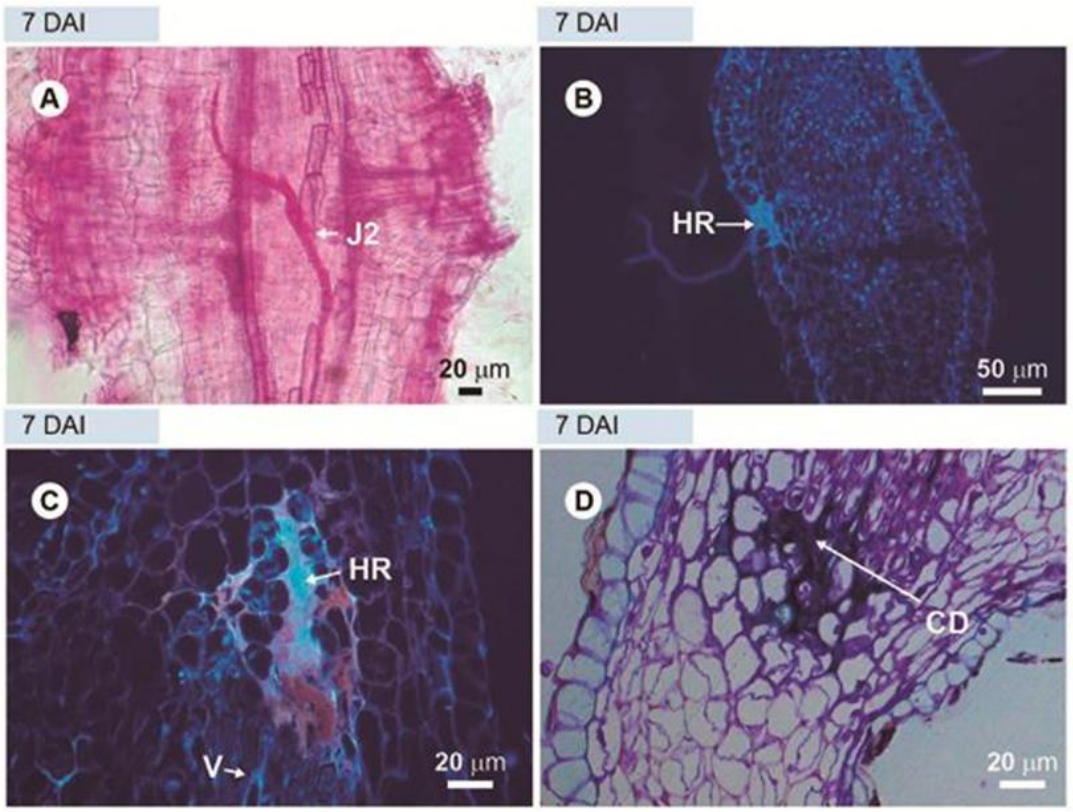


Tabela 4 - Avaliação da penetração e desenvolvimento de *Meloidogyne javanica* avirulento, em raízes de tomateiro na cultivar Santa Clara e do Porta-enxerto Guardião inoculadas com 10.000 J2s.

Estádio	Cultivar/ Porta-enxerto	Número de indivíduos /sistema radicular								
		Dias Após Inoculação								
		4º DAI	7º DAI	9° DAI	11° DAI	13° DAI	16º DAI	24º DAI	34º DAI	**Total**
J2	Guardião	2	3	0	0	0	0	0	0	**5**
	S. Clara	96	259	274	123	55	31	1	1	**840**
J3	Guardião	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**
	S. Clara	0	0	0	229	192	56	50	16	**543**
J4	Guardião	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**
	S. Clara	0	0	0	6	154	383	147	156	**846**
Fêmeas s/ massa de ovos	Guardião	0	0	0	0	0	0	3	0	**3**
	S. Clara	0	0	0	0	0	0	498	445	**943**
Fêmeas	Guardião	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**

ovopositando	S. Clara	0	0	0	0	0	0	0	63	**63**
Macho	Guardião	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**
	S. Clara	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**

J2= juvenil de segundo estádio; J3= juvenil de terceiro estádio; J4= juvenil de quarto estádio.

5.3.4.2 *Meloidogyne javanica* ***virulento***

Os exames das seções da raiz cv. ‘Santa Clara’ suscetível coradas com fucsina ácida e dos cortes corados com azul de toluidina mostraram que os J2s de *M. javanica* virulentos foram capazes de penetrar nas raízes, migrar e se desenvolver normalmente, apresentando grande penetração (374) de J2s na raiz a partir do 4 DAI (**Figura 6A e Tabela 5**).

As observações histológicas revelaram inúmeros locais de alimentação, com formação de células gigantes na região do cilindro central aos 7 DAI (**Figura 6B**). A partir dos 9 DAI foi possível observar a presença de J3 (**Figura 6C**) e aos 13 DAI a presença de J4, ambos na região do cilindro central (**Figura 6D**). Ainda, aos 13 DAI, foi observado grande número de conjuntos de células gigantes no cilindro central (**Figura 6E**), mostrando intenso parasitismo dessa população virulenta. Aos 21 DAI nas raízes coradas com fucsina ácida, observaram-se fêmeas jovens se alimentando na região do cilindro central (**Figura 6F**), como também a presença de machos (**Figura 6H**) e os cortes corados com azul de toluidina demonstrou células gigantes bem formadas na região do cilindro central (**Figura 6G**). Aos 27 DAI observaram-se fêmeas adultas em ovoposição (**Figura 6I**), completando assim, seu ciclo de vida no tomateiro suscetível.

No porta-enxerto ‘Guardião’, portador do gene *Mi*-1.2, as raízes coradas com fucsina ácida mostraram que em torno de 253 J2s penetraram pela região apical das raízes e às vezes, pela zona de elongação do híbrido resistente aos 4 DAI (**Figura 7A**). Já as observações microscópicas das secções de radicelas coradas com azul de toluidina, aos 7 DAI, demonstraram a formação das primeiras células gigantes iniciais (**Figura 7B**). A partir 9 DAI foi possível visualizar a presença de grande número de J3/J4 do nematoide no cilindro central da raiz (**Figura 7C**). Por meio de secções visualizadas à luz UV, obtidas aos 11 DAI, muitos dos J3/J4 já tinham estabelecidos sítios de alimentação, com células gigantes bem formadas no cilindro central da raiz com ausência de HR (**Figura 7D**). Pela observação de secções coradas com azul de

toluidina, aos 13 DAI, as células gigantes já apresentaram paredes engrossadas (**Figura 7E**). Da mesma forma, que na cultivar suscetível no porta-enxerto resistente nas raízes coradas com fucsina ácida aos 21 DAI, observaram-se fêmeas jovens se alimentando na região do cilindro central **(Figura 7F).** Nesse o porta-enxerto, as secções das raízes aos 27 DAI (**Figura 7G**), revelaram a presença de ovos em massa gelatinosa. Ainda, aos 27 DAI, foram observados machos se libertando da cutícula do J4 (**Figura 7H**) e aos 34 DAI observaram-se machos em diferentes regiões da raiz; córtex, cilindro central (**Figura 7I**).

Durante todo o período de avaliação, 2 a 34 DAI houve penetração de *M. javanica* virulento, comprovada pela presença de J2s, sendo que a maior penetração ocorreu aos 7 DAI, tanto na cv. Santa Clara (padrão suscetível), quanto nas raízes do porta-enxerto Guardião (padrão resistente), com valores de 540 e 444 indivíduos, respectivamente, (Tabela 5). Aos 11 DAI (Tabela 5), foram observados no sistema radicular todos os estádios (J2-J4) de desenvolvimento de *Meloidogyne javanica* virulento, com números mais expressivos da fase J4 a partir dos 13 DAI.

Meloidogyne javanica virulento completou o ciclo biológico nos tomateiros estudados aos 27 DAI, quando foi observada a presença de fêmeas com ovos (Tabela 5). Aos 34 DAI houve um aumento no número de J2s (provenientes dos ovos da primeira geração), nas duas cultivares estudadas, além de um aumento no número (64 indivíduos) de machos nas raízes do porta-enxerto ‘Guardião’ (Tabela 5).

Figura 6 - Interação de compatibilidade. Raízes da cv. ‘Santa Clara’ suscetível, infectadas com *Meloidogyne javanica* virulento. **A**, **C**, **D**, **F**, **H** e **I** = observações em microscopia de campo claro de fragmentos de raiz corados com fucsina ácida. Secções **B**, **E** e **G** = coradas com azul de toluidina. **A** = Juvenis do segundo estádio (J2s) já dentro das raízes aos 4 DAI; **B** = formação de célula gigante iniciais no cilindro central; **C** = juvenil de terceiro estádio (J3); **D** =juvenil de quarto estádio (J4) no cilindro central. **E** = grande número de células gigantes no cilindro central; **F** = fêmea jovem se alimentando no cilindro central em raiz bem engrossada; **G** = células gigantes bem formadas; **H** = presença de machos em grande número e **I** = fêmeas adultas em ovoposição. **DAI** = dias após a inoculação; **GC** = células gigantes; **M** = macho; **F** = Fêmea. **CC** = cilindro central.

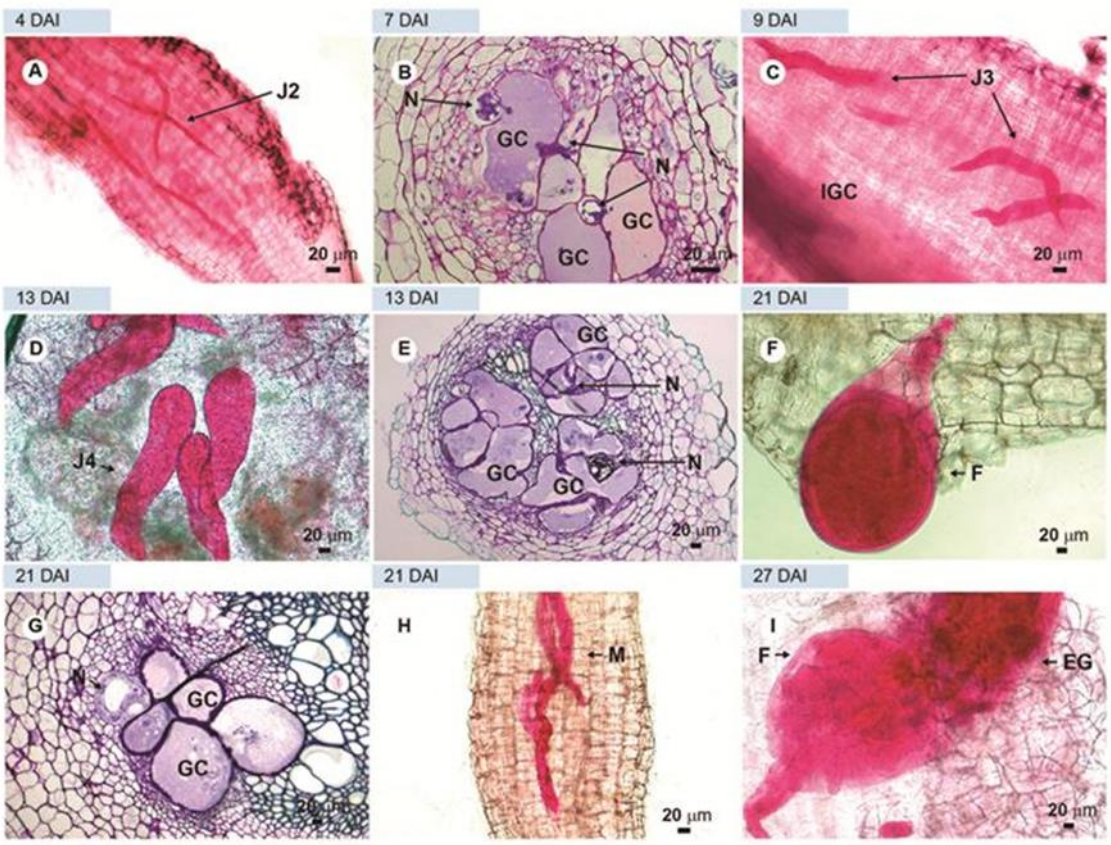


Figura 7 - Interação de compatibilidade. Raízes do porta-enxerto ‘Guardião’ infectadas com *Meloidogyne javanica* virulento. **A**, **C**, **F**, **G**, **H** e **I** = Observações por microscopia de campo claro de um fragmento de raiz corado com fucsina ácida. Seções **B** e **E** coradas com azul de toluidina. **D** = secções não coradas visualizadas ao UV; **A** = juvenil de segundo estádio (J2) penetrando pela região apical da raiz; **B** = célula gigante em formação; **C** = presença de J3/J4 no cilindro central; **D** = sitio de alimentação bem formada sem a presença de HR; **E** = células gigantes com parede espessa; **F** = fêmea alimentando no cilindro central; **G** = massa de ovos; **H** = macho se libertando da cutícula do J4 e **I** = presença de grande número de macho em diferentes regiões da raiz: córtex, cilindro central. GC = Celula gigante; NG = nematoide-das-galhas; M = macho; EG = Massa de ovos.

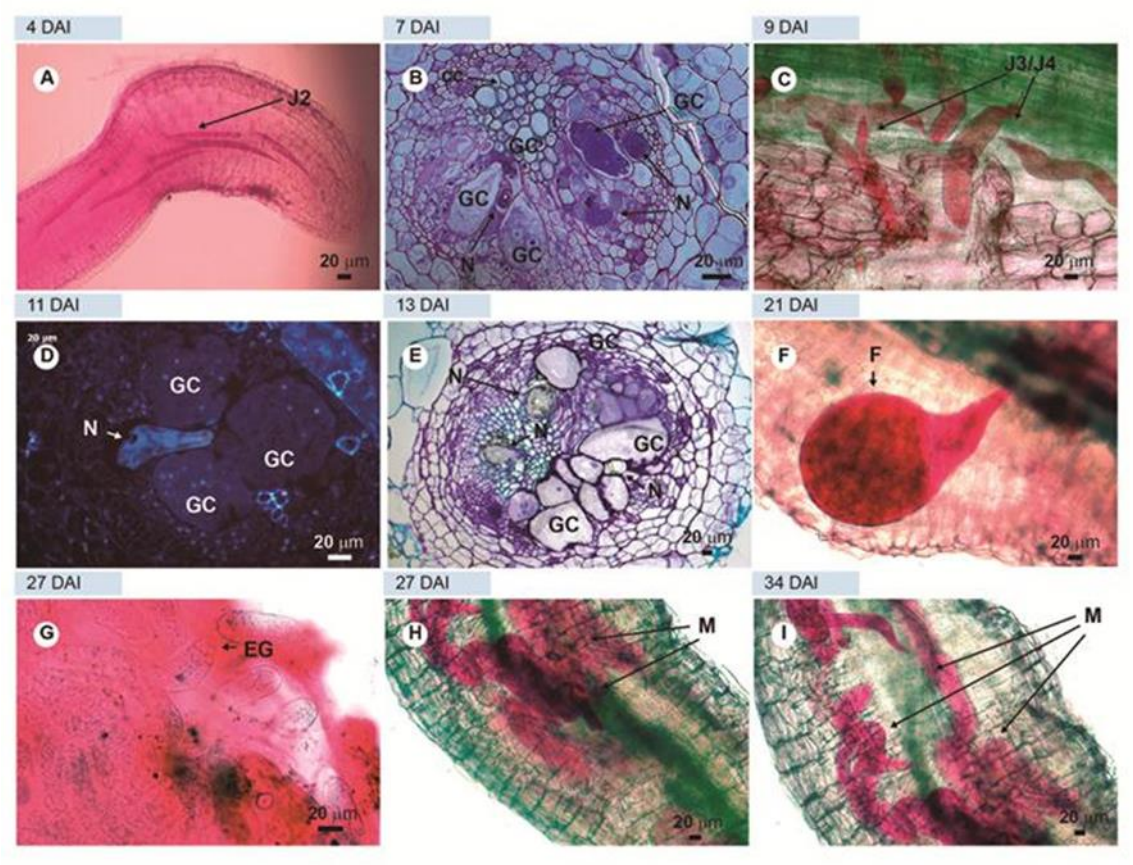


Tabela 5 - Avaliação da penetração e desenvolvimento de *M. javanica* virulento em raízes de tomateiro na cultivar “Santa Clara” e do Porta-enxerto “Guardião” inoculadas com 1000 J2s.

Estádio	Cultivar/ Porta-enxerto	Número de indivíduos /sistema radicular										
		Dias Após Inoculação										
		2° DAI	4º DAI	7º DAI	9° DAI	11° DAI	13° DAI	16º DAI	21º DAI	27º DAI	34º DAI	**Total**
J2	Guardião	2	253	444	322	134	65	21	1	3	10	**1255**
	S. Clara	4	374	540	424	236	110	6	3	8	34	**1739**
J3	Guardião	0	0	0	8	410	379	258	116	21	10	**1202**

	S. Clara	0	0	0	4	463	417	335	149	26	21	**1415**
J4	Guardião	0	0	0	0	4	199	389	187	116	14	**909**
	S. Clara	0	0	0	0	2	230	434	286	52	10	**1014**
Fêmeas s/ massa de ovos	Guardião	0	0	0	0	0	2	205	317	428	116	**1068**
	S. Clara	0	0	0	0	0	0	305	382	365	56	**1108**
Fêmeas ovopositando	Guardião	0	0	0	0	0	0	0	0	481	576	**1057**
	S. Clara	0	0	0	0	0	0	0	0	608	830	**1438**
Macho	Guardião	0	0	0	0	0	0	0	0	9	64	**73**
	S. Clara	0	0	0	0	0	0	0	9	14	8	**31**

J2= juvenil de segundo estádio; J3= juvenil de terceiro; J4= juvenil de e quarto estádio.

5.4 DISCUSSÃO

A detecção do gene *Mi-1.2* em porta-enxertos e/ou cultivares de tomateiro resistentes com marcador molecular é importante, pois permite identificar se há resistência ou não nas cultivares comercializadas com baixa frequência de falsos positivos. Neste estudo, sete porta-enxertos de tomateiro foram rastreados quanto à presença do gene *Mi-1.2* usando o marcador *Mi*23. Esse marcador molecular foi o mais confiável para alelos contrastantes no gene/locus *Mi*-1.2 (Bhavana et al., 2019). Os resultados apontaram que todos os porta-enxertos de tomateiro classificados como altamente resistente e resistente a *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* carregavam o gene de resistência *Mi-1.2*, tanto no estado homozigoto (*Mi*-1.2/*Mi*-1.2 e *mi*-1.2/*mi*-1.2) quanto heterozigoto (*Mi*-1.2/*mi*-1.2).

Embora o porta-enxerto DR 6632TX, no qual o gene *Mi-1.2* e alelo recessivo (*mi*-1.2/*mi*-1.2) tenha sido classificado como alelo suscetível, apresentou valores menores em relação a cultivar testemunha altamente suscetível (Santa Clara) para quase todas as populações. Esse resultado indica que o gene *Mi-1.2* não é o único gene que determina a redução da reprodução dos nematoides-das-galhas. Santos et al. (2020) também observaram que genótipos que não possuíam o gene de resistência *Mi*-1.2 tiveram valores baixos de reprodução e se classificaram como resistentes a *M. ethiopica* e *M. luci*.

De maneira geral, os demais porta-enxertos que apresentaram o gene *Mi-1.2* tanto em homozigose quanto em heterozigose foram altamente resistentes ou resistentes para todas as espécies e populações avirulentas, porém, foi possível observar

variabilidade entre os porta-enxertos e espécies testadas. Os porta-enxertos ‘Guardião’ e ‘Muralha’, ambos homozigotos com dois alelos dominantes (*Mi*-1.2/*Mi*-1.2) foram os que apresentaram melhor resultados no controle das espécies avirulentas testadas. Iberkleid et al. (2014), confirmaram esses resultados mostrando que os genótipos homozigotos foram os mais resistentes. Por outro lado, o porta-enxerto TD1 apesar de ser homozigoto com dois alelos dominantes comportou-se como os demais porta-enxertos heterozigotos. Diferença na reação de resistência dentro da mesma condição alélica para o gene *Mi*-1.2, também foram observadas por Maleita et al. (2011), ao testar 25 acessos de tomateiro portador do gene *Mi*-1.2 no controle de *M. hispanica* e por Santos et al. (2020) ao avaliarem 27 genótipos de tomateiro quanto à resistência a *M. luci* e *M. ethiopica*. Segundo esses autores, essa discrepância pode ser devida ao fundo genético da planta, que não foi até o momento completamente elucidado.

A variação observada entre as populações e espécies virulentas pode ser explicada pela variabilidade inter e intraespecífica existente no gênero *Meloidogyne* (ROBERTS e THOMASON 1996; ORNAT et al., 2001; RANDIG et al., 2002, CASTAGNONE-SERENO 2002).

A menor reprodução da população virulenta de *M. javanica* na cv. suscetível Santa Clara, embora não significativa em relação às obtidas nos porta-enxertos resistentes, corroboram com as observações realizadas por Castagnone-Sereno et al. (1994) e Tzortzakakis et al. (1998). Em que observaram menor reprodução da população virulenta quando inoculada em cv. suscetível. Segundo Castagnone-Sereno et al. (2007) e Djian-Caporalino et al. (2011), essa redução na reprodução de nematoides virulentos em plantas suscetíveis indica que um custo de condicionamento (custo adaptativo) está associado com a virulência desnecessária do nematoide.

Estudos tem mostrado que custos adaptativos da virulência, que penalizam a agressividade dos patógenos virulentos em plantas suscetíveis, têm sido frequentemente observados em bactérias, fungos e vírus (CRUZ et al., 2000; PARLEVLIET 2002; DESBIEZ et al., 2003; AYME et al., 2007; JANZAC et al., 2009).

A virulência reflete a capacidade dos nematoides de se reproduzirem em hospedeiros resistentes (HUSSEY e JANSSEN, 2002). Portanto, neste estudo a alta reprodução observada na população MJFW confirma a sua virulência, tanto em genótipos heterozigotos quanto homozigotos para o gene *Mi*-1.2, o que indica que a virulência não é afetada pela condição alélica. Estes resultados corroboraram com os

observados por Jacquet et al. (2005) e Iberkleid et al. (2014), ambos observaram que a população de *M. javanica* virulenta teve alta reprodução, tanto em tomateiro heterozigoto como em homozigoto.

Todavia, conforme verificado neste trabalho, os porta-enxertos de tomateiro portadores do gene *Mi-1.2* parasitados por *M. javanica* virulento apresentaram galhas de menor tamanho quando comparadas com plantas sem a presença do gene. A presença de galhas maiores na planta suscetível pode estar relacionada ao maior número de fêmeas encontradas no sistema radicular. Segundo Ndeve et al., (2018), os genes de resistência relativos aos nematoides-das-galhas suprimem o desenvolvimento e a reprodução dos mesmos nos sistemas radiculares e, na maioria dos casos, também limitam o desenvolvimento de galhas, e que a correlação positiva entre número de galhas e fator de reprodução do nematoide nesses genótipos, indica que ambas as respostas provavelmente estão sob controle do mesmo determinante de resistência. No entanto, a reprodução e o número de galhas apresentada pela população de *M. javanica* avirulenta neste estudo pode indicar que essas variáveis estão em parte sob controle de fatores genéticos independentes. Respostas semelhantes foram observadas em genes de resistência aos nematoides-das-galhas presente no feijão-caupi (NDEVE et al., 2018) e em feijão-de-lima (ROBERTS et al., 2008).

Outro exemplo disso, em nosso trabalho foi a presença de massa de ovos (matriz gelatinosa) em raízes do porta-enxerto ‘Muralha’ infectadas com as populações MJDFe MAFW (Tabela 4). Mesmo a reprodução sendo nula FR=0 para essas populações nesse genótipo, alguns J2s conseguiram penetrar e se desenvolver em fêmeas imaturas, porém essas não conseguiram se reproduzir com sucesso. Isso pode ter ocorrido devido a uma incompleta formação dos ovários das fêmeas, em que as glândulas retais produziram a glicoproteína que envolve os ovos (matriz gelatinosa), mas os ovários não conseguiram produzir ovos.

Considerando a existência de populações avirulentas e virulentas e a variabilidade existente nas relações patógeno–hospedeiro, para completar esse estudo, decidiu-se comparar a capacidade parasitária de *M. javanica* virulento e avirulento através de análise histopatológica, em porta-enxertos resistente homozigoto ao gene *Mi*-1.2 e suscetível (sem o gene *Mi-1.2*).

Estudos anteriores do gene de resistência *Mi-1.2* indicaram que as respostas de defesa mediadas por *Mi*-1.2 aos nematoides-das-galhas estão associadas à indução da

HR (reação de hipersensibilidade), o que impede a formação de células gigantes, através do bloqueio do ciclo de vida do parasita (BHATTARAI et al., 2008). Nossos resultados mostraram que na interação entre o porta-enxerto 'Guardião' (homozigoto Mi/Mi) e a população avirulenta, dois diferentes mecanismos podem estar envolvidos na expressão da resistência ao gene *Mi-1.2*. O primeiro ocorreu como resposta de defesa à pré-infecção, ou seja, ocorreu antes dos nematoides penetrarem na epiderme da raiz e possivelmente está associado a barreiras físicas ou bioquímicas que impedem os J2s de penetrar nas raízes (99% de redução na penetração de J2s em comparação com plantas suscetíveis). Outro mecanismo ocorreu como resposta de defesa à pós-infecção, uma defesa inicial (2-7 DAI), logo após a penetração dos J2s, sendo observada morte celular (ML) e reação de hipersensibilidade (observada em UV) na região córtex da raiz e no cilindro central, como já foi observado em outros genótipos de tomateiro resistentes ao NGs (DROPKIN 1969; REGAIEG e HORRIGUE-RAOUANI, 2012). Esse mecanismo é muito frequente e apareceu em várias espécies de plantas em relação a outros NG, incluindo algodão (LOPES et al., 2020 e MOTA et al. 2012), café (LIMA et al. 2015), pimenta (PEGARD et al. 2005).

Apesar de não termos realizados análise histopatológica em plantas heterozigotas ao *Mi*-1.2, os valores de FR obtido no teste de agressividade sugerem que alguns J2s conseguiram penetrar e se desenvolver em fêmeas férteis, como observado por IBERKLEID et al. (2014).

A resistência a populações avirulentas de *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* detectada no híbrido Guardião, no teste em casa de vegetação foi comprovada através de observações histopatológicas. A reprodução nas raízes foi muito baixa e correspondeu à classificação de quase imunidade dos dois híbridos 'Guardião' e 'Muralha', ambos homozigotos no loco *Mi-1.2*, em comparação com a testemunha suscetível 'Santa Clara' (*mi*-1.2/*mi*-1.2). Da mesma forma, as observações histopatológicas na população virulenta estão de acordo com o teste de infecção *in vivo*. A mesma foi capaz de estabelecer locais de alimentação e manter células gigantes saudáveis, contendo vários núcleos e paredes espessadas em raízes resistentes semelhantes às observadas na cultivar suscetível ('Santa Clara'). Essas mesmas observações foram realizadas por Regaieg e Horrigue-Raouani (2012), estudando o mecanismo de resistência de híbridos de tomateiro resistentes e suscetíveis a *M. incognita* virulenta. A interação compatível entre *M. javanica* virulento e planta

portadora do gene *Mi-1.2*, também foi relatada por Iberkleid et al. (2014) quando estudaram a resistência de híbridos de tomateiro a uma população virulenta de *M. javanica.* Esses autores observaram no hibrido resistente, que os J2s conseguiram penetrar nas raízes e desenvolver células gigantes que suportaram o desenvolvimento e reprodução do nematoide.

Embora os resultados deste estudo tenham sido confirmados com outros trabalhos da literatura, em que plantas portadoras de um só alelo *Mi-1.2* dominante tenham menor efeito no controle do NG, em relação às plantas com dois alelos, é importante notar que nossos resultados indicaram variação na capacidade dos isolados avirulentos de se reproduzirem em porta-enxertos de tomateiro portadores do gene *Mi-1.2*, mostrando que algumas linhas homozigotas permitem a reprodução dos nematoides comportando-se igual as linhas heterozigotas, como já foi observado por Maleita et al., 2011. Devido a isso mais estudos sobre o fundo genético dessas fontes de resistência devem ser realizados.

O uso restrito tanto de genótipos homozigotos quanto heterozigotos a longo prazo, pode levar ao surgimento de populações virulentas. Mas sem dúvida, cultivares que apresentam FRs<1.0 vão levar muito mais tempo para se tornarem suscetíveis, devido à pressão de seleção, o mesmo aconteceu com plantas de pimentão contendo dois genes de resistência (DJIAN-CAPORALINO et al., 2014). Outro fator são os genes de virulência dos nematoides, que até hoje são pouco conhecidos (EL-SAPPAH et al., 2919). Dessa forma, é aconselhável usar a resistência genética como mais uma técnica de manejo. Outras hortaliças com genes de resistência tais como o pimentão, cenoura, entre outras, poderiam ser usadas em sistemas de rotação com o tomateiro (DJIAN-CAPORALINO et al., 2014) e outras práticas de manejo também, tais como solarização, matéria orgânica, alqueive úmido, controle biológico, entre outras.

Neste estudo, foi possível através de observações histopatológica, juntamente com resultados de reprodução esclarecer que o gene *Mi*-1.2 na linhagem homozigota dominante (*Mi*-1.2/*Mi*-1.2) presente nos híbridos ‘Guardião’ e ‘Muralha’ é uma fonte extremamente eficiente de resistência, porque impede na maioria das vezes a formação de galhas e fêmeas férteis, comprometendo a reprodução de *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* avirulentas. Entretanto, os resultados desse estudo mostraram que a população de *M. javanica* virulenta representa uma ameaça à maioria dos porta-enxertos de tomateiro comercializados, portadores do gene *Mi*-1.2. Reforça-se que a população

utilizada representa uma pequena amostra das populações virulentas existentes. De toda forma, o gene de resistência *Mi-1.2* deve ser utilizado em um contexto de manejo integrado, combinado a outras estratégias de controle já mencionadas acima, com o intuito de preservar a sua durabilidade.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

AYME, V. et al. Molecular dissection of the potato virus y VPg virulence factor reveals complex adaptations to the pvr2 resistance allelic series in pepper. **Journal of General Virology,** v. 88, p. 1594-1601, 2007.

BHAVANA, P. et al. Identification of resistance in tomato against root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and comparison of molecular markers for *Mi* gene. **Australasian Plant Pathology**, v. 48, p. 93–100, 2019.

BHATTARAI, K. K. et al. Tomato susceptibility to root-knot nematodes require an intact jasmonic acid signaling pathway. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, p. 1205-1214, 2008.

BYRD, D. W., JR.; KIRKPATRICK, T.; BARKER, K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of nematology, v.**15, n1, p. 142, 1983.

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

CARNEIRO, R. M. D. G. et al. Gênero *Meloidogyne*: diagnose através de eletroforese de isoenzimas e marcadores SCAR. In: OLIVEIRA, C M. G, SANTOS, M. A, CASTRO L. H. S. (Ed). **Diagnose de Fitonematoides**. 1st Edition. Campinas–SP: Millennium, p. 47-70, 2016.

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.

CASTAGNONE-SERENO, P.; BONGIOVANNI, M.; WAJNBERG, E. Selection and parasite evolution: a reproductive fitness cost associated with virulence in the parthenogenetic nematode *Meloidogyne incognita*. **Evolutionary Ecology**, v. 21, n. 2, p. 259-270, 2007.

CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes? **Euphytica**, v.124, p. 193–199, 2002.

CASTAGNONE-SERENO, P.; BONGIOVANNI, M.; DALMASSO, A. Stable virulence

against the tomato resistance *Mi* gene in the parthenogenetic root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Phytopathology**, v. 83, n. 8, p. 803-812, 1993.

CASTAGNONE-SERENO, P.; BONGIOVANNI, M.; DALMASSO, A. Reproduction of virulent isolates of *Meloidogyne incognita* on susceptible and *Mi*-resistant tomato. **Journal of Nematology,** v. 26, p. 324-328, 1994.

CRUZ, C. M. V. et al. Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 13500–13505, 2000.

DESBIEZ, C. et al. Increase in Zucchini yellow mosaic virus symptom severity in tolerant zucchini cultivars is related to a point mutation in P3 protein and is associated with a loss of relative fitness on susceptible plants. **Phytopathology**, v. 93, p.1478-1484, 2003.

DEVRAN, Z.; SÖĞÜT, M. A. Occurrence of virulent root-knot nematode populations on tomatoes bearing the *Mi* gene in protected vegetable-growing areas of Turkey. **Phytoparasitica**, v. 38, n. 3, p. 245-251, 2010.

DJIAN-CAPORALINO, C. et al. Pyramiding, alternating or mixing: comparative performances of deployment strategies of nematode resistance genes to promote plant resistance efficiency and durability. **BMC plant biology**, v.14, p. 53, 2014.

DJIAN-CAPORALINO, C. et al. The reproductive potential of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* is affected by selection for virulence against major resistance genes from tomato and pepper. **European Journal of Plant Pathology,** v.131, n.3, p. 431, 2011.

DROPKIN, V. H. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 59, n. 11, p. 1632-1637, 1969.

EL-SAPPAH, A. H. et al. Tomato natural resistance genes in controlling the root-knot nematode. Genes, v. 10, p. 925, 2019.

FRAGOSO, R. D. R. et al. **Interação molecular planta-nematoide.** Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, (Documentos/Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111, 2007, 198 p.

GABRIEL, M. et al. Reaction of a heterozygous tomato hybrid bearing the *Mi*-1.2 gene to 15 *Meloidogyne* species. **Plant Pathology**. V.69, n.5, p.944-952, 2020.

HUANG, C. S. Formation, anatomy and physiology of giant cells induced by root-knot nematodes. In: SASSER J. N; CARTER C. C. (Ed.) **An Advanced Treatise on *Meloidogyne*,** Vol. I Biology and Control. North Caroline State University. Raleigh, North Caroline, p. 155-164, 1985.

HUSSEY R. S.; JANSSEN G. J. W. Root-knot nematode: *Meloidogyne* species. In: STARR J. L, COOK R, BRIDGE J. (Ed). **Plant Resistance to Parasitic Nematodes.** Wallingford, UK: CAB International, p. 43-70, 2002,

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

IBERKLEID, I. et al. Responses of tomato genotypes to avirulent and *Mi*-virulent *Meloidogyne javanica* isolates occurring in Israel. **Phytopathology**, v. 104, n. 5, p. 484-496, 2014.

JACQUET, M. et al. Variation in resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato genotypes bearing the *Mi* gene. **Plant Pathology**, v. 54, p. 93-99, 2005.

JANZAC, B.; FABRE, F.; PALLOIX, A.; MOURY, B. Constraints on evolution of virus avirulence factors predict the durability of corresponding plant resistances. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 599–610, 2009.

LIMA E. A. et al. The multi-resistant reaction of drought-tolerant *coffee Conilon* clone 14 to *Meloidogyne* spp. and late hypersensitive-like response in *Coffea canephora*. **Phytopathology**, v. 105, p. 805-814, 2015.

LOPES, C. M. L. et al. Marker-assisted selection in *Gossypium* spp. for *Meloidogyne incognita* resistance and histopathological characterization of a near immune line. **Euphytica**, v. 216, n. 2, p. 1-15, 2020.

MALEITA, C. M. et al. Effect of the *Mi* gene on reproduction of *Meloidogyne hispanica* on tomato genotypes. **Nematology**, v. 13, p. 939-94, 2011.

MATTOS, V. S. et al. Oryza glumaepatula, a New Source of Resistance to Meloidogyne graminicola and Histological Characterization of Its Defense **Mechanisms. Phytopathology,** v. 109, n. 11, p. 1941-1948, 2019.

MOTA, F. C. et al. New sources of resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in wild cotton accessions and histological characterization of the defense mechanisms. **Plant Pathology**, v. 62, p. 1173-1183, 2012.

NDEVE, A. D. et al. Broad-based root-knot nematode resistance identified in cowpea gene-pool two. **Journal of Nematology**, v. 50, n. 4, p. 545, 2018.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mededelingen Landbouw, Suriname**, v. 66, n 4, p.1-46, 1966.

ORNAT, C.; VERDEJO-LUCAS, S.; SORRIBAS, F. J. A population of *Meloidogyne javanica* in Spain virulent to the resistance gene *Mi* in tomato. **Plant Disease**, v. 85, p. 271-276, 2001.

PINHEIRO, J. B. et al. Identificação de espécies de *Meloidogyne* em tomateiro no Brasil. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento nº 102.** Brasília, DF, Brazil: Embrapa Hortaliças, 2014.

PARLEVLIET, J. E. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. **Euphytica**, v. 124, p. 147-156, 2002.

PEGARD, A. et al. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. **Phytopathology**, v. 95, p. 158-165, 2005.

RANDIG, O.; BONGIOVANNI, M.; CARNEIRO, R.M.D.G.; CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. **Genome,** v. 45, p. 862-870, 2002.

REGAIEG, H.; HORRIGUE-RAOUANI, N. Histological response of resistant tomato cultivars to infection of virulent Tunisian root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) populations. **Archives of phytopathology and plant protection**, v. 45, n. 17, p. 2036-2045, 2012.

ROBERTS, P. A.; MATTHEWS, W. C.; EHLERS, J. D.; HELMS, D. Genetic determinants of differential resistance to root-knot nematode reproduction and galling in lima bean. **Crop Science**, v. 48, p. 553-61, 2008.

ROBERTS, P. A.; THOMASON, I. J. Variability in reproduction of isolates of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* on resistant tomato genotypes. **Plant Disease**, v. 70, p. 547-541, 1996.

ROBERTS, P. A. Conceptual and practical aspects of variability in *Meloidogyne* related to host plant resistance. **Annual Review of Phytopathology,** v. 33, p. 199-221, 1995.

SANTOS, D.; DA SILVA, P. M.; ABRANTES, I.; MALEITA, C. Tomato *Mi*-1.2 gene confers resistance to *Meloidogyne luci* and *M. ethiopica*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 156, n. 2, p. 571-580, 2020.

SCHAFF, J. E. et al. Comprehensive transcriptome profiling in tomato reveals a role for glycosyltransferase in Mi-mediated nematode resistance. **Plant physiology**, v. 144, n. 2, p. 1079-1092, 2007.

SEAH, S, et al. Evaluation of a codominant SCAR marker for detection of the *Mi*-1 locus for resistance to root-knot nematode in tomato germplasm. **Tomato Genetics Cooperative Report**, v. 57, p. 37-40, 2007.

SMITH P. G. Embryo culture of a tomato species hybrid. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science v.** 44, p. 413–6, 1944.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes**. Raleigh: NCSU Graphics. 1978, 111p.

TRUDGILL, D. L. Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. **Annual Review of Phytopathology** v. 29, p. 167-192, 1991.

TZORTZAKAKIS, E. A. et al. Occurrence of a new resistant breaking pathotype of *Meloidogyne incognita* on tomato in Greece. **Journal of Plant Diseases and Protection,** v. 121 n. 4, p. 184-186, 2014.

TZORTZAKAKIS, E. A.; TRUDGILL, D. L.; PHILLIPS, M. S. Evidence for a dosage effect of the *Mi* gene on partially virulent isolates of *Meloidogyne javanica*. **Journal of nematology**. V. 30, p. 76-80, 1998.

VALE, F. X. R.; LOPES, C. A.; ALVARENGA, M. A. R. Doenças fúngicas, bacterianas e causadas por nematoides. In: ALVARENGA, M. A. R. (Ed.). **Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia.** Lavras: UFLA, 2013. 445 p.

WILLIAMSON, V. M. Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. **Annual review of phytopathology,** v. 36, n. 1, p. 277-293, 1998.

6 CAPITULO IV: EFEITO DO GENE *Mi*-9 NA REPRODUÇÃO DE POPULAÇÕES *Mi*-1.2 VIRULENTA E AVIRULENTAS DE *Meloidogyne* spp.

Resumo: A resistência aos nematoides-das-galhas (NGs) em tomateiros mediada pelo gene *Mi*-1.2 tem sido estudada nos últimos anos. Recentemente, um homólogo desse gene, (denominado como *Mi*-9) foi caracterizado clonado em um acesso *Solanum arcanum*, tendo como principal característica a expressão estável é estável em altas temperaturas (>28ºC) contra populações de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. No presente trabalho, testamos a capacidade de resistência deste gene *Mi*-9 a *Meloidogyne enterolobii*, população *Mi*-1.2 virulenta de *M. javanica* e populações avirulentas de *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* (todas avirulentas) em temperatura de 25-28 ºC. O acesso LA 2157 (portador do gene *Mi*-9) e a cultivar suscetível 'Santa Clara' foram empregados nesses bioensaios. A reação de resistência e/ou suscetibilidade do gene foi avaliada com base no fator de reprodução (FR). Os resultados indicaram resistência do acesso LA 2157 contra todas as populações avirulentas de *M. javanica, M. incognita* e *M. arenaria.* No entanto, respostas de suscetibilidade (com redução populacional) foram observadas com as populações de *M. enterolobii* e *Mi*-1.2 virulenta de *M. javanica*, indicando que a expressão fenotípica da resistência mediada pelo gene *Mi*-9 não difere inteiramente do gene *Mi*-1.2 em temperaturas de 25-28ºC. A capacidade de *M. enterolobii* e *M. javanica* virulenta ao gene *Mi*-1.2 contendo esse gene em superar a resistência do gene *Mi*-9 limitam o uso de futuras cultivares contendo esse gene em áreas de produção de tomate infestadas com esses nematoides. A busca contínua por novas fontes de resistência é indispensável, uma vez que plantas com resistência a *M. enterolobii* e a populações *Mi*-1.2 virulentas ainda não foram encontradas.

Palavras chave: *Solanum arcanum*, resistência e nematoide-das-galhas, *Meloidogyne enterolobii.*

EFFECT OF THE *Mi*-9 GENE ON THE REPRODUCTION OF VIRULENT AND AVIRULENT *Mi*-1.2 POPULATIONS OF *Meloidogyne* spp.

Abstract: Resistance to root-knot nematodes (RKN) in tomato plants mediated by the *Mi*-1.2 gene has been studied for the past few years. Recently, a homologue of this gene, (named as *Mi*-9) was characterized cloned in a *Solanum arcanum* accession, having as main characteristic the stable expression at high temperatures (>28ºC) against *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* populations.In the present work, we tested the resistance capacity of this *Mi*-9 gene to *Meloidogyne enterolobii*, a virulent *Mi*-1.2 population of *M. javanica* and avirulent populations of *M. javanica*, *M. incognita* and *M. arenaria* (all avirulent) at a temperature of 25-28 ºC. A LA 2157 accession (carrier of the *Mi*-9 gene) and a susceptible cultivar Santa Clara were employed in their own bioassays. The resistance and / or susceptibility reaction of the gene was evaluated based on the reproduction factor (RF). The results indicated resistance of access LA 2157 against all avirulent populations of *M. javanica*, *M. incognita* and *M. arenaria*. However, susceptibility responses (with population reduction) were observed with *M. enterolobii* and *M. javanica* virulent *Mi*-1.2 populations, indicating that the phenotypic expression of resistance mediated by the *Mi*-9 gene does not differ entirely from the *Mi*-1.2 at temperatures of 25-28ºC. The capacity of *M. enterolobii* and *M. javanica* virulent

to the *Mi*-1.2 gene containing this gene to overcome the resistance of the *Mi*-9 gene limits the use of future cultivars containing this gene in tomato production areas infested with these nematodes. The continuous search for new sources of resistance is essential, since plants with resistance to *M. enterolobii* and virulent *Mi*-1.2 populations have not yet been found.

Keywords: *Solanum arcanum*, Resistance, Root-knot nematode, *Meloidogyne enterolobii.*

6.1 INTRODUÇÃO

A resistência dos tomateiros aos nematoides-das-galhas foi observada pela primeira vez na espécie selvagem *Lycopersicon peruvianum* L. por Bailey (1941) e essa característica foi introduzida em *Solanum lycopersicum* (espécie domesticada) por Smith (1944). Essa resistência foi inicialmente identificada contra populações da espécie *Meloidogyne incognita* e posteriormente identificada como sendo codificada por um único gene dominante (atualmente denominado como *Mi*-1.2) localizado no cromossomo 6 (HO et al., 1992). Estudos posteriores confirmam esse resultado e relatam a eficiência deste gene a outras espécies de *Meloidogyne* (SILVA et al., 2008; MALEITA et al., 2011; GABRIEL et al., 2020; SANTOS et al., 2020).

Além disso, o gene *Mi*-1.2 que confere resistência a certos biótipos de pulgões da batata (*Macrosiphum euphorbiae*) e de moscas-branca (*Bemisia tabaci*) (ROSSI et al., 1998; VOS et al., 1998; KALOSHIAN et al., 1995; NOMBELA et al., 2003). Cultivares de tomateiro portando o gene *Mi*-1.2, apesar de não apresentarem imunidade ao nematoide das galhas, provaram ser altamente eficazes no controle deste patógeno e mesmo em solos altamente infestados, podendo ser cultivadas sem redução significativa da produtividade (RICH e OLSON, 1999; SORRIBAS et al., 2005). Por essa razão, esse fator tem sido amplamente utilizado no desenvolvimento de cultivares de tomateiro (WILLIAMSON, 1998). A resistência mediada pelo gene *Mi*-1.2 aos nematoides-das-galhas (NGs) em raízes de tomateiro se manifesta pela reação de hipersensibilidade (HR) caracterizada por morte celular próxima ao sítio de alimentação do juvenil de segundo estágio (J2). Essa reação impede a alimentação do nematoide e consequentemente evita a formação das células gigantes (DROPKIN, 1969). O gene *Mi*-1.2 está localizado no braço curto do cromossomo 6 do tomateiro onde estão em ligação outros genes de interesse, tais como os genes *Cf*-2 e *Cf*-5 que agregam resistência a

algumas raças do fungo *Cladosporium fulvum*, *Ol*-4/*Ol*-6 que controlam *Oidium neolycopersici* e o gene *Am* que controla o vírus do mosaico da alfafa (DIXON et al., 1996, 1998; SEIFI et al., 2011; PARRELLA et al., 2004).

No entanto, a resistência conferida por esse gene apresenta algumas desvantagens, como termo-instabilidade, isto é, perda de efetividade em temperaturas constantes acima de 28 °C (AMMATI et al., 1986 Além disso, o gene *Mi*-1.2 não é efetivo contra populações das espécies *M. enterolobii* e *M. hapla* (WILLIAMSON 1998; MALEITA et al. 2011; CASTAGNONE-SERENO, 2012) e contra populações virulentas de *Meloidogyne* spp. (CASTAGNONE-SERENO et al. 1993, 1994; ROBERTS 1995; SILVA et al., 2019). Além disso, fatores de resistência ao tomato yellow leaf curl virus (*Ty*-1/ Ty-3) e *Ralstonia solanacearum* (*Bw*-5) também foram mapeados próximos a região do gene *Mi*-1.2, mas em repulsão em relação a cópia ativa do gene *Mi*-1.2 (VERLAAN et al., 2013; THOQUET et al., 1996).

Recentemente, um novo gene de resistência denominado de *Mi*-9 foi clonado e caracterizado no acesso da espécie silvestre *Solanum arcanum* LA2157. Esse gene está localizado no braço curto do cromossomo 6 do tomateiro, em uma posição física semelhante ao gene *Mi*-1.2. Estudos anteriores mostram o aspecto diferencial do Mi-9 é o fato desse gene apresentar maior estabilidade térmica que o gene *Mi*-1.2 (AMMATI et al., 1986); AMMIRAJU et al., 2003; VEREMIS et al., 2000). No entanto, ainda pouco se conhece sobre a resposta de acessos contendo o gene *Mi*-9 contra uma ampla gama de espécies de Meloidogyne. Neste contexto, com a intenção de melhor caracterizar a ação deste gene Mi-9 na resistência aos nematoides das galhas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a reação do acesso *S. arcanum* LA 2157 (portador esse gene) contra o parasitismo de populações de *M. enterolobii*, *M. javanica* (populações avirulenta virulenta ao gene *Mi*-1.2), *M. incognita* e *M. arenaria* em condições de casa-de-vegetação.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Material vegetal

Os genótipos utilizados neste estudo foram *S. arcanum* acesso LA 2157 (possuindo o gene *Mi*-9) e a cv. suscetível ‘*S. lycopersicum* ‘Santa Clara’ que foi incluída, para efeito de comparação, como padrão de suscetibilidade.

6.2.2 Populações de nematoides

Foram utilizadas cinco populações de *Meloidogyne* spp., sendo duas populações da espécie *M. javanica* (uma virulenta e outra avirulenta em relação ao gene *Mi*-1.2); populações de *M. incognita* e *M. arenaria* (avirulentas ao gene *Mi*-1.2) e uma população da espécie *M. enterolobii*.Todas as populações foram coletadas em áreas produtoras de tomate com excessão a população de *M. enterolobii* que foi de goiabeira, sendo previamente identificadas pelos fenótipos das esterases (EST), de acordo com a metodologia de Carneiro e Almeida (2001) e testadas quanto a agressividade e ou virulência ao gene *Mi*-1.2 no capítulo anterior (Tabela 1).

6.2.3 Preparo do inóculo

As populações foram multiplicadas e mantidas em plantas de tomateiro cv. ‘Santa Clara’ em casa de vegetação com temperatura controlada (25-28 °C), com posterior extração de ovos para inóculo seguindo protocolo descrito por HUSSEY e BARKER (1973), mediante a trituração das raízes em liquidificador, em baixa velocidade com hipoclorito de sódio a 0,5%, durante aproximadamente 30 segundos.

Tabela 1 - Código, espécie, origem geográfica, hospedeira, perfil enzimático e reação em relação ao gene *Mi*-1.2 das populações de *Meloidogyne* spp.

Espécie	Origem geográfica	Coordenadas	Hospedeiro /Cultivar	Perfil de Esterase	Reação ao gene *Mi*-1.2
M. javanica	Frederico Westphalen	27º21'32" S 53º 23'38" O	*S. lycopersicum* / "Guardião"	J3 e J2	virulento
M. javanica	Brasília (Embrapa Hortaliça)	15º 55' 58.19" S 48º 8'40.69" O	*S. lycopersicum*/ "Santa Clara"	J3	avirulento
M. enterolobii	Brasília (CENARGEN)	15º 43'52.56" S 47º54'10.58" O	*Psidium guajava* L. Paluma	En2	virulento
M. incognita	Rodeio Bonito	27º 28'15" S 53º 10' 08" O	*S. lycopersicum* Santa Cruz "Kada"	I2	avirulento
M. arenaria	Frederico Westphalen	27º21'32" S 53º 23'38" O	*S. lycopersicum*/ "Santa Clara"	A2	avirulento

6.2.4 Preparo do material vegetal e inoculação

As sementes do acesso *S. arcanum* LA 2157 foram cedidas pela Embrapa Hortaliças e da cv. Santa Clara adquiridas em lojas de produtos agrícolas. As sementes foram germinadas em bandejas com substrato esterilizado e aos 12 dias após a germinação foram transplantadas para vasos de 3L contendo solo e substrato (2:1), previamente autoclavados. Uma semana após o transplante, as plântulas foram inoculadas com 5000 ovos + J2 das populações de nematoides, aplicados em quatro orifícios realizados próximos ao colo das plantas.

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado, em arranjo simples, com oito repetições e uma planta por parcela. Após 90 dias da inoculação, as plantas foram avaliadas segundo os índices de galha e massa de ovos, conforme escala proposta por Taylor e Sasser (1978). Índice 0 = 0 galhas e massa de ovos, índice 1= 1 a 2 galhas e massas de ovos; índice 2 = 3 a 10; índice 3 = 11 a 30; índice 4 = 31 a 100 e índice 5 maior que 100. O fator de reprodução (FR) foi determinado dividindo a população final do nematoide pela população inicial (OOSTENBRINK, 1966).

As raízes foram separadas de suas partes aéreas, lavadas e pesadas. Em seguida, foram coradas com Floxina B e quantificados os índices de galhas e massas de ovos. A suspensão de ovos e eventuais J2s de cada população de *Meloidogyne* spp. foi obtida conforme a metodologia de Hussey e Barker (1973), em liquidificador com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% por 30 segundos. A concentração da suspensão de ovos e eventuais J2s obtida de cada planta foi determinada pela média da contagem de três alíquotas de 1 ml, em lâmina de Peters. Foram calculados a população final para cada sistema radicular e o fator de reprodução. Inicialmente, foi verificado se os dados apresentavam distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados que não atenderam os pressupostos de normalidade, foram transformados segundo $\sqrt{(x+0,5)}$ antes da análise da variância. A comparação das médias entre os tratamentos foi feita pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa SISVAR (FERREIRA 2011). As plantas foram classificadas de acordo com a proposta de Hussey e Janssen (2002), sendo consideradas plantas resistentes (R) aquelas que presentaram

redução do FR acima de 90 % em relação à testemunha e as que apresentaram redução abaixo de 90 % como Suscetível (S).

6.3 RESULTADOS

Plantas de *S. arcanum* acesso LA 2157 descrito anteriormente como resistente a nematoides-das-galhas em alta temperatura (>28ºC) (AMMATI et al., 1986), foram testadas quanto à resistência a duas populações da espécie *M. javanica* (uma virulenta e outra avirulenta em relação ao gene *Mi*-1.2); populações de *M. incognita* e *M. arenaria* (avirulentas ao gene *Mi*-1.2) e uma população da espécie *M. enterolobii*. Por ser uma medida mais precisa, usou-se o fator de reprodução (FR) dos nematoides, como critério para medir a resistência ou suscetibilidade do gene *Mi*-9. Todas as populações de *Meloidogyne* spp. testadas mostraram-se capazes de se reproduzir no acesso LA 2157 de *S. arcanum* portador do gene *Mi*-9 havendo, todavia, diferenças entre as populações em todas as variáveis analisadas (Tabela 2). Por sua vez, a cultivar Santa Clara, usada como controle neste estudo mostrou ser suscetível a todas as populações de *Meloidogyne* spp. testadas. Os valores de FR variaram de 192,21 a 472,88, sendo a espécie *M. arenaria* (FR:472,88) a mais agressiva, seguida por *M. enterolobii* (FR: 459,71), *M. incognita* (FR:459,71) e *M. javanica Mi*-1.2 virulento (FR: 410,96), embora não haja diferença estatística (Tabela 2).

Com base nos critérios de suscetibilidade e resistência utilizados por Hussey e Janssen (2002) classificou-se o acesso *S. arcanum* LA 2157 como resistente (R) a *M. javanica Mi*-1.2 avirulento (FR: 6,18), *M. incognita* (FR: 4,92) e *M. arenaria* (FR: 2,51) e altamente suscetível (AS) a *M. javanica Mi*-1.2 virulento (FR: 230,14) e a *M. enterolobii* (FR: 54,52).

O índice de galhas (IG) variou de 0 a 1 e massa de ovos (IMO) de 2 a 3 nas plantas resistentes, enquanto nas plantas altamente suscetíveis e suscetíveis nas duas variáveis os índices foram 5 (Tabela 2). Esses índices medem de forma restrita a população real dos nematoides quantificada mais precisamente pelos fatores de reprodução.

Os valores baixos de IG e IMO (0 a 2 galhas e 2 a 3 massa de ovos) observados no sistema radicular de *S. arcanum* LA 2157 inoculadas com *Mi*-1.2 avirulentas de *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria*, comparadas com as raízes inoculadas com *Mi*-1.2 virulento de *M. javanica* e *M. enterolobii* (Tabela 2), confirmaram que a resistência

mediada pelo gene *Mi*-9 é menos efetiva sobre essas duas populações.

Quanto ao desenvolvimento dos sistemas radiculares (massa fresca das raízes - MFR) pode-se observar que as raízes da cv. ‘Santa Clara’ (Tabela 2) apresentaram um maior desenvolvimento, consequentemente maior peso em relação ao sistema radicular de *S. arcanum* acesso ‘LA 2157’. Nesse acesso os maiores valores de MFR foram observados nas raízes inoculadas com a população *Mi*-1.2 virulenta de *M. javanica* e não diferiu apenas das raízes inoculadas com a população *M. enterolobii*.

Tabela 2 - Valores médios da massa fresca de raiz, índice de galhas (IG), índice de massa de ovos (IMO), número de ovos por grama de raiz, fator de reprodução (FR) e reação do acesso LA 2157 de *Solanum arcanum* (portador do gene *Mi*-9) e da cultivar suscetível *S. lycopersicum* 'Santa Clara' a duas populações de *Meloidogyne javanica* (uma virulenta e outra avirulenta ao gene *Mi*-1.2) e populações de *M. incognita*, *M. arenaria* (ambas avirulentas ao gene *Mi*-1.2) e *M. enterolobii* (virulenta ao gene *Mi*-1.2).

Espécies de *Meloidogyne*	Cultivar suscetível (*Solanum lycopersicum*, 'Santa Clara')						Cultivar resistente (*Solanum arcanum* acesso LA 2157)					
	Massa fresca de raiz	IG	IMO	N° de ovos /g/raiz	FR	Reação	Massa fresca de raiz	IG	IMO	N° de ovos /g/raiz	FR	Reação
M. enterolobii (v)	99,88bc	5	5	23743,38 a	459,71a	AS	37,36 ab	5	5	7607,36 b	54,82 b	S
M. javanica (v)	93,31bc	5	5	21589,66ab	405,21a	AS	45,64 a	5	5	27571,06 a	230,14 a	AS
M. javanica (a)	84,06c	5	5	11628,13b	192,21 b	AS	26,92 b	0	2	1207,44 c	6,18 c	R
M. incognita (a)	143,65a	5	5	15462,78ab	410,96a	AS	11,35 c	1	3	2473,52 c	4,92 c	R
M. arenaria (a)	112,38ab	5	5	20955,31ab	472,88a	AS	23,78 b	0	3	574,54 c	2,51 c	R
Cv.	9,23			21,67	20,56		15,31			27,91	17,87	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. (v) população virulenta ao gene *Mi*-1.2; (a) população avirulenta ao gene *Mi*-1.2; Cv. = Coeficiente de Variação; S = suscetível; R = resistente; AS = altamente suscetível

6.4 DISCUSSÃO

A estabilidade da resistência aos nematoides-das-galhas sob estresse térmico (>28ºC) tem sido atribuída como uma das principais vantagens do gene *Mi*-9 presente em *S. arcanum* tendo, portanto, um potencial interesse para áreas tropicais e subtropicais onde os nematoides são uma ameaça importante à produtividade do tomateiro (AMMATI et al, 1986). No entanto, no presente estudo, não foi explorada a termoestablilidade e sim a capacidade desse gene em reduzir a capacidade de reprodução das principais espécies de *Meloidogyne*, incluindo uma população virulenta de *M. javanica* e a espécie virulenta *M. enterolobii*. A resistência do gene *Mi*-9 presente no acesso LA 2157 foi observada nitidamente nas populações *Mi*-1.2 avirulentas de *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* em temperatura de 25-28ºC de acordo com dados observados em outros estudos (VEREMIS et al., 1999; VEREMIS e ROBERTS, 2000; AMMIRAJU et al. 2003). No entanto, o gene *Mi*-9 não conferiu resistência total (acima de 90 %) a *M. enterolobii* bem como para a população *Mi*-1.2 virulenta de *M. javanica*. Embora tenha sido classificado como suscetível, o acesso *S. arcanum* LA 2157 proporcionou uma redução de 88% da população de *M. enterolobii*, o que é interessante, considerando a alta virulência desse patógeno a diferentes genes de resistência (CASTAGNONE-SERENO, 2012). O presente estudo é a primeiro relato da resposta de *S. arcanum* LA 2157 em relação a *M. enterolobii*. Desta forma, estudos adicionais deverão ser realizados no sentido de corroborar ou não a esses resultados.

Este é o primeiro estudo envolvendo a capacidade de reprodução de *M. enterolobii* em materiais vegetais portadores do gene *Mi*-9. O efeito negativo de outros genes sobre a reprodução de *M. enterolobii* foi previamente observado em tomateiros portadores do gene *Mi*-1.2 (KIEWNICK et al. 2009; WESTERICH et al., 2011; ROSA et al., 2014; GABRIEL et al., 2020). Essa espécie de nematoide foi capaz de superar a resistência medida pelo gene *N* presente em porta-enxertos de pimenta que confere resistência a *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica* (BRITO et al., 2007; KIEWNICK et al. 2009; PINHEIRO et al., 2015). O estudo realizado por VEREMIS et al., (1999) demostrou que o *Mi*-9 também não tem efeito contra populações de *M. hapla*. Esse similar padrão de não efetividade desses dois genes (*Mi*-1.2 e *Mi*-9) tanto para a espécie de *M. enterolobii* quanto *M. hapla* provavelmente se deve ao fato destes nematoides

serem geneticamente muito diferente de outras espécies tropicais (TIGANO et al., 2010) para as quais ambos os genes se mostras efetivos. Um estudo adicional da amplitude da eficiência do gene *Mi*-9 pode confirmar essa hipótese.

Populações de nematoide-das-galhas (virulentas) capazes de suplantar a resistência do gene *Mi*-1.2 em cultivares de tomateiro foram relatadas em diferentes regiões do mundo (ROBERTS e THOMASON 1989; ORNAT et al. 2001; DEVRAN e SOGUT 2010; TZORTZAKAKIS et al., 2014; SILVA et al., 2019). Nosso estudo indicou que populações de *M. javanica* virulentas ao gene *M*i-1.2 também foram virulentas ao gene termoestável *Mi*-9. Esses resultados corroboram aqueles os obtidos em bioensaios usando o acesso LA2157 contra populações de *M. incognita* virulentas ao gene Mi-1.2 (VEREMIS e ROBERTS, 2000).

As populações de *M. enterolobii* e de *M. javanica Mi*-1.2 virulenta ao gene *Mi*-1.2 usadas neste estudo foram virulentas também a *S. arcanum* acesso LA 2157 portador do gene *Mi*-9. No entanto, a população de *M. javanica* virulenta produziu um numero maior de ovos por grama de raiz e apresentou maior FR, ou seja, foi mais agressiva quando comparada a *M. enterolobii.* Possivelmente a agressividade se deve a aptidão virulenta (evolução adaptativa) já adquirida contra o gene *Mi*-1.2 e que se manteve em relação ao gene *Mi*-9. Considerando a aptidão como sendo a capacidade de um organismo sobreviver e se reproduzir, ou seja, transmitir os seus genes para a próxima geração (HOLLIDAY, 2001).

Conforme verificado neste estudo, o sistema radicular de *S. arcanum* LA 2157 inoculado com as populações avirulentas de *M. javanica* e *M. arenaria* não apresentou sintomas de galhas. Este resultado também foi observado em plantas portadoras do gene *Mi*-1.2 quando inoculadas com essas populações (ver no capítulo anterior). Desta forma, podemos concluir que *S. arcanum* acesso LA 2157 é resistente a populações de *M. javanica* avirulentas ao gene *Mi*-1.2 como também para *M. incognita* e *M. arenaria* (ambas populações avirulentas em relação ao gene *Mi*-1.2). No entanto, é acesso foi considerado suscetível a *M. enterolobii* e à população de *M. javanica* virulenta ao *Mi*-1.2. Essas observações fornecem evidências de que o gene *Mi*-9 apresenta (em temperatura de 25ºC) expressão fenotípica muito similar a aquela do gene *Mi*-1.2 (capitulo anterior). Esses resultados mostram que o gene *Mi*-9 tem o mesmo efeito da expressão que *Mi*-1.2 em termos de especificidade ao nematoide-das-galhas e a sua única diferença no efeito fenotípico é a resistência estável a altas temperaturas

AMMATI et al., (1986) que não foi um tema explorado no presente estudo.

Essa similaridade na expressão fenotípica desses dois genes foi anteriormente verifica por Ammati et al., (1986). Jablonska et al., (2007) utilizando a tecnologia de silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) para silenciar homólogos do *Mi*-1.2 em *S. arcanum* LA 2157, demonstraram que o *Mi*-9 é um homólogo do gene *Mi*-1.2.

Por mais de 60 anos, o gene *Mi-1.2* tem sido usado efetivamente em acessos de tomate para reduzir os danos causados por várias espécies de *Meloidogyne* spp. No entanto, os resultados do nosso estudo indicam que *M. enterolobii* e populações de *M. javanica* virulentas ao *Mi*-1.2 e outras espécies presentes em áreas de cultivo de tomate permanecerão causando danos mesmo em planta portadoras do gene *Mi*-9. A capacidade dessas populações em superar a resistência conferida pelo gene *Mi*-9, torna indispensável à busca contínua de novas fontes de resistência às populações de *Meloidogyne* que infectam o tomateiro. Por outro lado, os resultados confirmam relatados na literatura que a resistência estável ao calor presente em *S. arcanum* acesso LA 2157 apresenta um uso potencial em cultivares de tomateiro para áreas subtropicais visando controlar populações avirulentas ao *Mi*-1.2.

6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMMATI, M.; THOMASON, I. J.; MCKINNEY, H. E. Retention of resistance to *Meliodogyne* incognita in *Lycopersicon* genotypes at high soil temperature. **Journal of Nematology,** v. 18, n. 4 p. 491–495, 1986.

AMMIRAJU, J. S. S. et al. The heat-stable, root-knot nematode-resistance gene *Mi*-9 from *Lycopersicon peruvianum* is localized on the short arm of chromosome 6. **Theoretical and Applied Genetics,** v. 106, p. 478–484, 2003.

BAILEY, D. M. The seedling test method for root-knot-nematode resistance. In **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**. v. 38, p. 573-575, 1941.

BRITO, J. A. et al. Effects of the *Mi*-1, *N* and Tabasco genes on infection and reproduction of *Meloidogyne mayaguensis* on tomato and pepper genotypes. **Journal of Nematology,** v. 39: p. 327–332. 2007.

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, p. 35–44. 2001.

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

CASTAGNONE-SERENO, P.; BONGIOVANNI, M.; DALMASSO, A. Reproduction of virulent isolates of *Meloidogyne incognita* on susceptible and *Mi*-resistant tomato. **Journal of Nematology**, v. 26, p. 324–328, 1994.

CASTAGNONE-SERENO, P.; BONGIOVANNI, M.; DALMASSO, A. Stable virulence against the tomato resistance *Mi* gene in the parthenogenetic root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Phytopathology,** v. 83, p. 803–805, 1993.

DEVRAN, Z, SOGUT, M. A. Occurrence of virulent root-knot nematode populations on tomatoes bearing the *Mi* gene in protected vegetable-growing areas of Turkey. **Phytoparasitica**, v. 38, p. 245–251, 2010.

DIXON, M. S. et al. The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. **Cell**, v. 84, p. 451–459, 1996.

DIXON, M. S. et al. The tomato Cf-5 disease resistance gene and six homologs show pronounced allelic variation in leucine-rich repeat copy number. **The Plant Cell**, v. 105, p. 1915-1925, 1998.

DROPKIN, V. H. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: Reversal by temperature. **Phytopathology**, v. 59, p. 1632-1637, 1969.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e **Agrotecnologia,** v. 35, p.1039-1042, 2011.

GABRIEL, M. et al. Reaction of a heterozygous tomato hybrid bearing the *Mi*-1.2 gene to 15 *Meloidogyne* species. **Plant Pathology**, v. 69, n. 5, p. 944-952, 2020.

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

HO, J. Y. et al. The root-knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato: construction of a molecular linkage map and identification of dominant cDNA markers in resistant genotypes. **The Plant Journal,** v. 2 n. 6, p. 971-982, 1992.

HOLLIDAY, P. A dictionary of plant pathology, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge Hurlbert SH (1984) Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. **Ecological monographs**, v. 54, p. 187-211, 2001.

HUSSEY, R. S.; JANSSEN, G. J. W. Root-knot nematode: *Meloidogyne* species. In: STARR, J. L; COOK, R.; BRIDGE, J, (Ed). **Plant Resistance to Parasitic Nematodes**. Wallingford, UK: CAB International, p. 43–70, 2002.

JABLONSKA, B. et al. The *Mi*-9 gene from *Solanum arcanum* conferring heat-stable

resistance to root-knot nematodes is a homolog of *Mi*-1. **Plant Physiology**, v. 143, n. 2, p. 1044-1054, 2007.

KALOSHIAN, I.; LANGE, W. H.; WILLIAMSON, V. M. An aphid-resistance locus is tightly linked to the nematode-resistance gene, *Mi*, in tomato. Proceedings of the **National Academy of Sciences**, v. 92, n. 2, p. 622-625, 1995.

KIEWNICK, S.; DESSIMOZ, M.; FRANCK, L. Effects of the *Mi*-1 and the N root-knot nematode-resistance gene on infection and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and pepper cultivars. **Journal of nematology**, v. 41, n. 2, p. 134, 2009.

MALEITA, C. M. et al. Effect of the *Mi* gene on reproduction of *Meloidogyne hispanica* on tomato genotypes. **Nematology**, v. 13, p. 939–949, 2011.

NOMBELA, G.; WILLIAMSON, V. M.; MUÑIZ, M. The root-knot nematode resistance gene *Mi*-1.2 of tomato is responsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.16, n. 7, p. 645-649, 2003.

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

ORNAT, C.; VERDEJO-LUCAS, S.; SORRIBAS, F. J. A population of *Meloidogyne javanica* in Spain virulent to the *Mi* resistance gene in tomato. **Plant Disease**, v. 85, p. 271- 276, 2001.

PARRELLA, G. et al. The Am gene controlling resistance to Alfalfa mosaic virus in tomato is located in the cluster of dominant resistance genes on chromosome 6. **Phytopathology**, v. 94, p. 345-350, 2004.

PINHEIRO, J. B. et al. First report of *Meloidogyne enterolobii* in *Capsicum* rootstocks carrying the *Me1* and *Me3*/*Me7* genes in central Brazil. **Nematropica,** v. 45, p. 184–188, 2015.

RICH, J. R.; OLSONS, M. Utility of *Mi* gene resistance in tomato to manage *Meloidogyne javanica*in North Florida. **Journal of Nematology**, v. 31, n.4, p. 715, 1999.

ROBERTS, P. A. Conceptual and practical aspects of variability in *Meloidogyne* related to host plant resistance. **Annual Review of Phytopathology,** v. 33, p. 199-221, 1995.

ROBERTS, P. A.; THOMASON, I. J. A review of variability in four *Meloidogyne* spp. measured by reproduction on several hosts including *Lycopersicon.* **Agricultural Zoology Reviews**, v. 3, p. 225-252, 1989.

ROSSI, M. et al. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n.17, p. 9750-9754, 1998.

ROSA, J. M. O.; WESTERICH, J. N.; WILCKEN, S. R. S. Reaction of tomato

genotypes and hybrids to *Meloidogyne enterolobii*. **Ciência Rural**, v. 44, n.7, p. 1166-1171, 2014.

SANTOS, D.; DA SILVA, P. M.; ABRANTES, I.; MALEITA, C. Tomato Mi-1.2 genes confers resistance to *Meloidogyne luci* and *M. ethiopica.* European Journal of Plant Pathology. **European Journal of Plant Pathology,** v. 156, n. 2, p. 571-580, 2020.

SEIFI, A. et al. Linked, if not the same, *Mi*-1 homologues confer resistance to tomato powdery mildew and root-knot nematodes. **Molecular Plant-Microbe Interactions,** v. 24, p. 441-450, 2011.

SILVA, R. V. D. et al. Supplanting resistance of the *Mi* gene by root-knot nematode in industrial tomato in the Cerrado in Goiás State of Brazil. **Ciência Rural**, v. 49, n. 9, 2019.

SILVA, R. V.; OLIVIERA, R. D. L.; FERREIRA, O. S.; CASTRO, D. B, Efeito do gene Mi na reprodução de populações de *Meloidogyne exigua* em tomateiro. **Nematologia Brasileira,** v. 32, p. 150-153, 2008.

SMITH, P.G. Embryo culture of a tomato species hybrid. **Proceedings of American Society Horticultural Sciences**, v. 44, p. 413–416, 1944.

SORRIBAS, F. J. et al. Effectiveness and profitability of the *Mi*-resistant tomatoes to control root-knot nematodes. **European Journal of Plant Pathology**, v. 111,p. 29-38, 2005.

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

TIGANO, M. et al. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* and development of a SCAR marker for this guava-damaging species. **Plant Pathology,** v. 59, p. 1054-1061, 2010.

THOQUET, P. et al. Polygenic resistance of tomato plants to bacterial wilt in the French West Indies. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 9, p. 837-842, 1996.

TZORTZAKAKIS, E. A. et al. Occurrence of a new resistant breaking pathotype of *Meloidogyne incognita* on tomato in Greece. **Journal of Plant Diseases and Protection,** v. 121, p. 184–186, 2014.

VEREMIS, J. C.; ROBERTS, P. A. Diversity of heat-stable genotype specific resistance of *Meloidogyne* in Maranon races of *Lycopersicon peruvianum* complex. **Euphytica**, v. 111, p. 9-16, 2000.

VEREMIS, J. C.; VAN HEUSDEN, A. W.; ROBERTS, P. A. Mapping a novel heat-stable resistance to *Meloidogyne* in *Lycopersicon peruvianum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. *98*, n. 2, p. 274-280, 1999.

VERLAAN, M. G. et al. The Tomato yellow leaf curl virus resistance genes Ty-1 and Ty-3 are allelic and code for DFDGD-Class RNA-dependent RNA polymerases. **PLoS Genet**, v. 9, n. 3, p. e1003399, 2013.

VOS, P. et al. The tomato Mi-1gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. **Nature biotechnology**, v. 16, p. 1365-1369, 1998.

WESTERICH, J. N.; ROSA, J. M. O.; WILCKEN, S. R. S. Estudo comparativo da biologia de *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*) e *Meloidogyne javanica* em tomateiros com gene *Mi*. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 35-41, 2011.

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

7 DISCUSSÃO GERAL

Por ser uma hortaliça de intenso cultivo, tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é afetado por inúmeros patógenos, entre eles os nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.), que estão amplamente distribuídos no Brasil e no mundo. Sua ampla gama de hospedeiros e ampla distribuição, o torna um dos gêneros mais prejudiciais dentre os nematoides parasitas de plantas (MOENS et al., 2009).

Sabe-se que o gene *Mi-1.2* introgredido do tomateiro *S. peruvianum* no tomateiro *S. lycopersicum* é atualmente a principal fonte de resistência aos nematoides-das-galhas, especialmente a *M. javanica, M. incognita* e *M. arenaria*, e tem sido a única fonte de resistência empregada em todas as cultivares comerciais de tomateiro há mais de 60 anos.

No **capitulo I**, o espectro de ação do gene *Mi*-1.2 foi avaliado contra as 15 principais espécies de *Meloidogyne* detectadas no Brasil, se mostrando eficiente contra: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria M. ethiopica*, *M. hispanica*, *M. luci*, *M. morocciensis*, *M. inornata*, *M. konaensis*, *M. paranaensis*, *M. izalcoensis* e *M. petuniae*. Esse trabalho também confirmou que esse gene não é efetivo contra as espécies *M. enterolobii* e *M. hapla* (GABRIEL et al., 2020). A indução de severos sintomas no híbrido de tomateiro portador do gene/*locus Mi*-1.2 pelas populações de *M. enterolobii* e *M. hapla* no híbrido de tomateiro portador do gene/*locus Mi*-1.2 está de acordo com relatos anteriores no Brasil e em outros países (BRITO et al., 2007; ELLING, 2013). Os ensaios de PCR com os iniciadores Mi23F/Mi23R mostraram que o marcador molecular codominante foi confiável para a detecção dos alelos contrastantes do gene/*locus Mi*-1.2 (BHAVANA et al., 2019), sendo uma ferramenta muito importante do melhoramento genético do tomateiro.

Embora altamente eficiente na maioria dos casos, o uso intensivo do gene *Mi*-1.2, juntamente com a alta variabilidade patogênica dos nematoides-das-galhas, têm despertado preocupação em relação a durabilidade dessa resistência devido ao potencial surgimento de populações de nematoides virulentas, capazes de se reproduzir em plantas portadoras desse gene. De fato, populações de *Meloidogyne* virulentas ao gene *Mi*-1.2 já foram relatadas em áreas de cultivo de tomateiro, em diferentes regiões do mundo (KALOSHIAN et al., 1996; EDDAOUDI et al., 1997; ORNAT et al., 2001) e no Brasil (SILVA et al., 2019).

O capítulo II representa o primeiro relato formal da ocorrência de uma população de *M. javanica* virulenta ao gene *Mi*-1.2 no Brasil, em Frederico Westphalen (RS), em áreas de produção intensiva de tomate, com alta densidade populacional detectada no porta-enxerto resistente 'Guardião'. Nesse trabalho, dois perfis de esterase (EST J3 e EST J2) foram encontrados ocorrendo em fêmeas individuais obtidas da mesma população virulenta de *M. javanica*. A presença de polimorfismos do perfil enzimático já foi previamente reportada para essa espécie (CARNEIRO et al., 1996), assim como também para *M. incognita* (SANTOS et al., 2012). De acordo com Carneiro et al. (1996), o fenótipo EST J3 é o perfil mais frequentemente observado no sul do Brasil na cultura do tomateiro, enquanto que o fenótipo EST J2 é uma variante e é de mais rara ocorrência. A inativação da resistência do gene *Mi*-1.2 em cultivares e porta-enxertos de tomateiro resistentes pode estar relacionada a diversos fatores, entre eles, a variabilidade intraespecífica da população local desse nematoide (CASTAGNONE-SERENO 2002, 2006), alta temperatura do solo (>28 ºC) (ARAUJO et al., 1982; VERDEJO-LUCAS et al., 2013) ou pressão de seleção, através do uso de variedades resistentes, que podem ter selecionado uma população capaz de superar que essa resistência (XU et al., 2001), que é a hipótese mais provável para a população de *M. javanica* proveniente Frederico Westphalen (RS).

Além disso, pouco se sabe sobre a presença e a dosagem do gene *Mi*-1.2, em híbridos de *Solanum lycopersicum* e *S. peruvianum* presentes em porta-enxertos de tomateiros utilizados no Brasil. Isso tem influenciado a eficiência no controle de *Meloidogyne* spp. e provavelmente o aparecimento de populações virulentas.

No capítulo III verificou-se que porta-enxertos homozigotos dominantes (*Mi*-1.2/ *Mi*-1.2), de maneira geral, apresentaram maiores níveis de resistência aos nematoides-das-galhas quando comparados aos porta-enxertos heterozigotos (*Mi*-1.2/*mi*-1.2), embora um sido observado que um dos porta-enxertos homozigotos apresentou comportamento semelhante aos heterozigotos. Essa variação pode estar relacionada a diferenças no fundo (*background*) genético do material vegetal avaliado. Outros autores observaram esse efeito da dosagem do gene *Mi-1.2* em relação a *Meloidogyne* spp. (IBERKLEID, et al, 2014, JACQUET et al., 2005) e a outras espécies do nematoide-das-galhas, *M. hispanica* (MALEITA et al., 2011), e *M. luci* e *M. ethiopica* (SANTOS et al., 2020) e obtiveram resultados semelhantes aos observados neste capítulo.

Ainda no **capítulo III**, foram conduzidos visando elucidar os mecanismos associados com interações planta-nematoide contrastantes (compatível vs. incompatível). Foram usadas, neste estudo, populações de *M. javanica* avirulenta e virulenta ao gene *Mi*-1.2 em bioensaios de inoculação do porta-enxerto híbrido resistente 'Guardião' da cultivar suscetível 'Santa Clara'. Em relação à população avirulenta, o gene *Mi* 1.2 impediu a penetração, induziu morte celular e reação de hipersensibilidade (HR), logo no início da interação no porta-enxerto resistente. Já a população virulenta comportou-se de forma semelhante tanto no porta-enxerto quanto na cultivar suscetível, não sendo percebido nenhum efeito 'residual' do gene *Mi*-1.2. Estudos anteriores de mecanismos de resistência corroboraram com as nossas observações e indicaram que as respostas de defesa mediadas por *Mi*-1.2 aos nematoides-das-galhas estão associadas à indução da HR, o que impede a formação de células gigantes, através do bloqueio do ciclo de vida do parasita (BHATTARAI et al., 2008).

O gene *Mi*-9 (proveniente da espécie silvestre *S. arcanum*) é homólogo do gene *Mi*-1.2, mas se diferencia deste por apresentar estabilidade de expressão em altas temperaturas (> 28ºC). O gene *Mi*-9 e vem sendo avaliado no controle de *Meloidogyne* spp. **No capítulo IV**, fenotiparam-se plantas de *S. arcanum* foram desafiadas por duas populações da espécie *M. javanica* (uma virulenta e outra avirulenta em relação ao gene *Mi*-1.2); populações de *M. incognita* e *M. arenaria* (avirulentas ao gene *Mi*-1.2) e uma população da espécie *M. enterolobii*. Foi detectada resistência contra todas as populações de *Meloidogyne* spp. avirulentos, como previamente demonstrado em outros ensaios (VEREMIS et al., 1999; VEREMIS e ROBERTS, 2000; AMMIRAJU et al., 2003). No entanto, o gene *Mi*-9 não conferiu resistência total (acima de 90 %) a *M. enterolobii* e a população de *M. javanica* virulenta ao gene *Mi*-1.2. *Mi*-1.2 virulenta de *M. javanica*. Embora tenha sido classificado como suscetível, *S. arcanum* LA 2157 proporcionou uma redução de 88% na população de *M. enterolobii,* quando comparada com a testemunha, o que é interessante, considerando a alta virulência desse patógeno a diferentes genes de resistência (CASTAGNONE-SERENO, 2012). Como *S. arcanum* LA 2157 não tinha sido anteriormente testado em relação a *M. enterolobii,* estudos futuros deverão ser conduzidos no sentido de corroborar esses resultados.

As informações geradas no presente trabalho de pesquisa têm caráter inédito e servem de base para futuros estudos demostram que os programas de melhoramento

genético do tomateiro devem seguir em busca contínua por novas fontes de resistência é indispensável, uma vez que plantas com resistência a *M. enterolobii* e a populações virulentas ao gene *Mi*-1.2 ainda não foram encontradas. Além disso, fornecem subsídios para o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção de espécies de *Meloidogyne*.

8 CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ O gene/*locus Mi*-1.2 conferiu resistência a treze (13) espécies de *Meloidogyne* encontradas no Brasil: *M. incognita, M. javanica, M. arenaria, M. ethiopica, M. hispanica* e *M. luci, M. exigua, M. inornata, M. izalcoensis, M. konaensis, M. morocciensis, M. paranaensis* e *M. petuniae,* mostrando ter um amplo espectro de ação.

- ✓ O presente trabalho representa a mais ampla análise do espectro de ação do gene Mi-1.2 em relação a diversidade de espécies de Meloidogyne disponível na literatura.

- ✓ O gene *Mi*-1.2 não conferiu resistência a *M. hapla* e *M. enterolobii,* e essa última foi altamente virulenta ao tomateiro resistente heterozigoto 'Debora-Plus' (*Mi*-1.2/ *mi*-1.2).

- ✓ A caracterização de uma população virulenta de *M. javanica* virulenta ao gene *Mi*-1.2 (detectada pela primeira vez no Sul do Brasil) foi confirmada pela α-esterase e pela superação da resistência do gene *Mi*-1.2, nos porta-enxertos 'Muralha' e 'Guardião' (ambos portadores do gene *Mi*-1.2 em homozigose), em ensaio em casa de vegetação.

- ✓ Os ensaios de PCR com os iniciadores Mi23F/Mi23R comprovou que o marcador molecular codominante foi confiável para a detecção dos alelos contrastantes no gene/*locus Mi*-1.2, em sete porta-enxertos híbridos e uma cultivar resistente. Uma perfeita associação foi observada entre os padrões de amplicons e a resposta dos acessos as diferentes populações de *Meloidogyne*.

- ✓ Populações avirulentas de *M. javanica* não foram capazes de se desenvolver e completar o ciclo de vida em plantas resistentes do híbrido 'Guardião'.

- ✓ Os porta-enxertos homozigotos dominantes (*Mi*-1.2/ *Mi*-1.2), de maneira geral, apresentaram maior resistência aos nematoides-das-galhas quando comparados aos porta-enxertos heterozigotos (*Mi*-1.2 /*mi*-1.2), embora um dos porta-enxertos homozigotos tenha apresentado comportamento semelhante aos heterozigotos.

Essa variação pode estar relacionada ao fundo genético do material vegetal avaliado.

- ✓ Houve influência da dosagem alélica (homozigoto vs. heterozigoto) do gene *Mi*-1.2, em sete porta-enxertos de tomateiro frequentemente plantados no Brasil, apenas para as populações avirulentas de *Meloidogyne* spp.

- ✓ Análises histopatológicas dos mecanismos de resistência da população de *M. javanica* avirulenta indicaram que as respostas de defesa mediadas pelo gene *Mi*-1.2 aos nematoides-das-galhas estão associadas a um mecanismo pré-infectivo, que bloqueia a penetração dos J2s bem como a um mecanismo pós-infectivo que causou morte celular e indução da reação de hipersensibilidade (HR), o que impediu a formação de células gigantes, através do bloqueio do ciclo de vida do parasita.

- ✓ Populações virulentas de *M. javanica* não apresentaram alteração em seu ciclo de vida e na patogenicidade quando comparadas plantas resistentes e suscetíveis.

- ✓ O gene *Mi*-9 (termo estável) comportou-se de maneira semelhante ao gene *Mi*-1.2, apresentando o mesmo espectro de resistência em relação às principais espécies de nematoide-das-galhas, mas conferiu um certo controle a *M. enterolobii*, que precisa ainda ser confirmado.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABDELMAGEED, A. H.; GRUDA, N.; GEYER, B. Effects of temperature and grafting on the growth and development of tomato plants under controlled conditions. **Rural Poverty Reduction through Research for Development and Transformation,** p. 5-7, 2004.

ABDUL-BAKI, A.; HROON, S. A.; CHITWOOD, D. J. Temperature e ects on resistance to *Meloidogyne* spp. in excised tomato roots. **HortScience,** v. 31, p. 147–149, 1996.

ABREU, C. L. M. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicum esculentum*) com óleos essenciais. 2006. 71f. **Tese de Doutorado em Agronomia/Horticultura**) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

ALVARENGA, M. A. R. Origem botânica e descrição da planta. In: ALVARENGA, M. A. R. (Ed) Tomate: **Produção de tomate em campo, casa de vegetação e hidroponia**. Lavras: Editora UFLA, p, 455, 2013.

ALVARENGA, M. A. R. **Tomate produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia.** 1 ed. Lavras MG: Editora Perffil, 2004, 400 p.

BAKKER, E.G.; TOOMAJIAN, C.; KREITMAN, M.; BERGELSON, J. A genome-wide survey of R gene polymorphisms in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 18, p. 1803–1818, 2006.

BLACK, L. L. et al. Grafting tomatoes for production in the hot-wet season. **Asian Vegetable Research e Development Center. AVRDC Publication,** v. 3, p. 551. 2003.

BLANCA, J. et al. Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. **BMC Genomics,** v.16, n1, p1, 2015.

BLOK, V. C.; POWERS, T. O. Biochemical and molecular identification. ***Root-knot nematodes,* p.** 98-118, 2009.

BLOK, V. C.; PHILLIPS, M. S.; MCNICOL, J. W.; FARGETTE, M. Genetic variation in tropical *Meloidogyne* spp. as shown by RAPDs. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 20, p. 127-133, 1997.

BRASIL, **Hortifruti. Anuário 2018-2019.** n, 185, 50 p, 2019. Disponível em:https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/completo/anuario-2018-2019.

BROWN, C. R.; MOJTAHEDI, H.; SANTO G. S.; WILLAMSON, V. M. Effect of the *Mi* gene in tomato on reproductive factors of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. hapla*. **Journal of Nematology,** v. 29, p. 416-9, 1997.

CAP, G. B.; ROBERTS, P.; THOMASON, I. J. Inheritance of heat-stable resistance to

Meloidogyne incognita in *Lycopersicon peruvianum* and its relationship to the *Mi* gene. **Theoretical and Applied Genetics,** v. 85, p. 777–783, 1993.

CAPLAN, J. L. et al. Induced ER chaperones regulate a receptor-like kinase to mediate antiviral innate immune response in plants. **Cell host & microbe,** v.6, n.5, p. 457–469. 2009.

VILLIAN, L.; SALGADO, S, M. L. TTINH, P. Q. Nematode parasites of coffee and cocoa. In. SIKORA, R. A.; COYNE, D.; HALLAMANN, J.; TIMPER, P. (Ed) Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CABI, Boston, p, 505-536, 2018.

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

CENIS, J. L. Identification of four major *Meloidogyne* spp. by Random Amplified Polymorphic DNA (TAPD-PCR). **Phytopathology,** v. 83, p. 76-78, 1993.

CHISHOLM, S. T.; COAKER, G.; DAY, B.; STASKAWICZ, B. J. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 803–814. 2006.

DIAS, G. B.; RANGEL, T. B. A. Indução de resistência em plantas: O papel do oxido nítrico. **Revista Capixaba de Ciência e Tecnologia**, Vitória, n. 3, p.1-8. 2007.

CUARTERO, J.; M. C. BOLARIN, M. J.; ASINS, MORENO, V. Increasing salt tolerance in the tomato. **Journal of experimental botany,** v. 57, p. 1045–1058, 2006.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, p. 826–833, 2001.

DE LEY, P., BLAXTER, M. L. Systematic position and phylogeny. In: LEE, D. L**.** (ed), **The Biology of Nematodes**. London: Taylor and Francis, p 1–30. 2002.

DUVAUX, L. et al. Dynamics of copy number variation in host races of the pea aphid. **Molecular biology and evolution,** v. 32, p. 63-80, 2015.

DOGANLAR, S.; FRARY, A.; TANKSLEY, S. D. Production of interspecific F-1 hybrids, BC1, BC2 and BC3 populations between *Lycopersicon esculentum* and two accessions of *Lycopersicon peruvianum* carrying new root-knot nematode resistance genes. **Euphytica**, v. 95, p. 203–207, 1997.

ESTAN, M. T. et al. Grafting raises the salt tolerance of tomato through limiting the transport of sodium and chloride to the shoot**. Journal of experimental botany,** v, 56, p. 703–712. 2005.

ESBENSHADE, P. R.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida). **Journal of Nematology**, v. 17, p. 6-20, 1985.

FAOSTAT. Food and Agricultural Organization in the United Nations. Data base Results. 2016. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_country. Acesso em maio de 2019.

FERREIRA, S. M. R.; FREITAS, R. J. S.; LAZZARI, E. N. Padrão de identidade e qualidade do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) de mesa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p.329-335, 2004.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3ª edição. Embrapa. Brasília-DF, 1998.

FERRAZ, L. C. C. B. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In: SILVA, J. F. V. (Org.). Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja. Londrina: EMBRAPA Soja; **Sociedade Brasileira de Nematologia**, p. 15-38. 2001.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematoides. In: AMORIM, L.; KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia:** Princípios e conceitos. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 168-199, 2011.

FERNANDEZ-GARCIA, N.; MARTINEZ, V.; CERDA, A.; CARVAJAL, M. Water and nutrient uptake of grafted tomato plants grown under saline conditions. **Journal of Plant Physiology,** v. 159, p. 899–905, 2002.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura:** agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Nº 635, 2000.

FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Ann Ver Phytopathol**, Palo Alto, v. 9, p. 275-296. 1971.

FOURIE, H.; ZIJLSTRA, C.; MCDONALD, H. Identification of root–knot nematode species occurring in South Africa using the SCAR–PCR technique. **Nematology,** v. 3, p. 675-680, 2001.

FREITAS, L. G.; LIMA, R. D.; FERRAZ, S. *Meloidogyne* spp., o nematoide das galhas. In: FREITAS, L. G.; LIMA, R. D.; FERRAZ, S. **Introdução à Nematologia**. 5 ed. Viçosa: UFV, p. 37-45, 2009.

GIEBEL, J. Mechanism of resistance to plant nematodes. **Annual Review Phytopathology,** v.20, p.257-279, 1982.

GOMES, A. C. M. M.; MATTOS, J. K.; CIROTO, P. A. S.; CARNEIRO, R. M. D. G. Resistance of Pfaffia glomerata accessions to Meloidogyne incognita. Nematologia Brasileira, v. 30, n. 2, p. 189-194, 2006.

GOTO, R. et al. Metodologia de enxertia. In: Goto, R. et al., (Ed) **Enxertia em hortaliças**. Sao Paulo: Editora UNESP, p. 85, 2003.

GUIMARÃES, L. M. P. et al. Parasitismo de *Meloidogyne mayaguensis* em diferentes espécies botânicas. **Nematologia Brasileira**, v.27, p.139-145, 2003.

HALLMAN, J.; MERESSA, B. H. "Nematode parasites of vegetables" in Plant Parasitic Nematodes. In: SIKORA, R. A.; COYNE, D.; HALLMAN, J.; TIMPER, P. (Ed), **Subtropical and Tropical Agriculture**. (Wallingford: CABI International), p. 346–410, 2018.

HEATH, M. C. Hypersensitive response-related death. In Programmed cell death in higher plants, Springer, Dordrecht, p. 77-90, 2000.

HUANG, X.; MCGIFFEN, M.; KALOSHIAN, I. Reproduction of *Mi*-virulent *Meloidogyne incognita* isolates on *Lycopersicon* spp. **Journal of nematology,** v. 36, n.1), p. 69, 2004.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia E Estatística. Sistema de recuperação Automática – SIDRA. Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em https://sidra.ibge.gov.br. Acessado20 de maio de 2019.

IOANNOU, N. Integrating soil solarization with grafting on resistant rootstocks for management of soil-borne pathogens of eggplant. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology,** v. 76, n. 4, p. 396-401, 2001.

JONES, J. T. et al. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology,** v. 14, p. 946–961, 2013.

KARSSEN, G.; MOENS, M. Root-knot nematodes. In: PERRY, R. N.; MOENS, M (Ed.). **Plant nematology.** Wallingford, UK: CAB International, p.59-90. 2006.

KOBORI, R. F.; SANTOS, H. S. Problemas relacionados ao uso de porta-enxertos na enxertia. In: GOTO, R.; SANTOS, H. S.; CAÑIZARES, K. A. L **(Ed)**. **Enxertia em hortaliças,** São Paulo, ed. UNESP, p.33-39, 2003.

KOUTSOVOULOS, G. D. et al. Population genomics supports clonal reproduction and multiple gains and losses of parasitic abilities in the most devastating nematode plant pest. **Evolutionary Applications**, v. 12, p. 1–15, 2019.

LEONARDI, C.; F. GIUFFRIDA. Variation of plant growth and macronutrient uptake in grafted tomatoes and eggplants on three different rootstocks. **European Journal of Horticultural Science**, v. 71, p. 97 -101, 2006.

LOUWS, F.J.; RIVARD, C.L.; KUBOTA, C. Grafting fruiting vegetables to manage soilborne pathogens, foliar pathogens, arthropods and weeds. **Scientia Horticulturae.** v. 127, p. 127-146, 2010.

MAC KEY, J. Genetic interaction and breeding strategies in relation to fungal cereal diseases. In: SIDDIQUI, K.A., FARUQUI, A.M. **New genetical approaches to crop improvement**. Karachi, p.503-525, 1986.

MANSO, E. C.; TENENTE, R. V. Extração e identificação de fitonematoides. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 2, p. 265-285, 1994.

MARÍN R. J. **Portagrano. Vademecum de variedades hortícolas**. El Ejido, Almería, Spain: Escobar Impresores, 2005.

MENG, Q. P.; LONG, H.; XU, J. H. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria.* **Acta Phytopathologica, Sinica**, v. 34, p. 204–10, 2004.

MELLO, S da C. Exigências climáticas e ecofisiologia. In: NICK, C.; SILVA, D. J. H da.; BORÉM, A. (Ed). **Tomate do plantio a colheita**. Viçosa (MG): Ed. UFV, p, 237, 2018.

MELO, P.C.T. de. **Desenvolvimento tecnológico para o cultivo do tomateiro de mesa em condições agroecológicas tropicais e subtropicais**. Livre docência. Universidade de São Paulo. Piracicaba, p 193, 2017.

MIGUEL A, Grafting as a non-chemical alternative to methyl bromide for tomato in Spain. In: BACHELOR T, BOLIVAR J. (Ed). **Proceedings of the International Conference on Alternatives to Methyl Bromide: 'The Remaining Challenges'**, Sevilla, Spain, p. 283–4, 2002.

MINNING, T. A.; WEATHERLY, D. B.; FLIBOTTE, S.; TARLETON, R. L. Widespread, focal copy number variations (CNV) and whole chromosome aneuploidies in Trypanosoma cruzi strains revealed by array comparative genomic hybridization. **BMC Genomics**, v. 12, p. 139. 2011.

MOENS, M.; PERRY, R.; STARR, J. *Meloidogyne* species- a diversegroup of novel and important plant parasites. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Ed). **Root-knot nematodes**, 1. Wallingford, UK, p, 483, 2009.

MORETTI, A.; BONGIOVANNI, M.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARANTA, C. Introgression of resistance against *Mi*-1-virulent *Meloidogyne* spp. from *Lycopersicon peruvianum* into *L. esculentum*. **Report of the Tomato Genetics Cooperative**, v. 52, p. 21–23, 2002.

MOURA, R. M.; RÉGIS, E. M. O. Reação de cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em relação ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* (Nematoda: Heteroderidae). **Nematologia Brasileira,** v. 11, p. 215-25, 1987.

NAIKA, S.; JEUDE, J.V.L.; GOFFAU, M.H.; DAM, B V. **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização.** Wageningen: Fundação Agromisa e CTA, (Agrodok 17), 2006, 104p.

NICK, C.; SILVA, D. J. H DA. A cultura. In: NICK, C.; SILVA, D. J. H DA.; BORÉM, A. (Ed.). **Tomate do plantio a colheita**. Viçosa (MG): Ed. UFV, p, 237, 2018.

OKORLEY, B. A.; AGYEMAN, C.; AMISSAH, N.; NYAKU, S. T. Screening Selected Solanum Plants as Potential Rootstocks for the Management of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne incognita*). **International journal of agronomy,** 2018.

OLIVEIRA, D. C. Enxertia de plantas de pimentão em *Capsicum* spp. no manejo de Nematoides-das-galhas. 2007a, 134 f. **Tese de Doutorado** - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2007a.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE; J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**. 4 ed. São Paulo: Ceres, v.1, cap.35, p. 593-637, 2011.

PAULSON, R. E.; WEBSTER, J. M. Ultrastructure of the hypersensitive reaction in roots of tomato, *Lycopersicon esculentum* L., to infection by the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Physiol. **Physiological Plant Pathology,** v. 2, p. 227-234, 1972.

PERALTA, I.E.; SPOONER, D.M.; KNAPP, S. taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. Lycopersicoides, sect. Juglandifolia, sect. Lycopersicon; Solanaceae). United States: **American Society of Plant Taxonomists**, v. 84, 2008.

PINHEIRO, J. B. **Nematoides em Hortaliças.** Embrapa Hortaliças – Livro Técnico, Brasília- DF, 2017, 194 p.

PERALTA I. E.; KNAPP S. K.; SPOONER D. M. New species of wild tomatoes (*Solanum section Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. **Systematic Botany,** v. 30, n.2, p. 424-434, 2005.

RANDIG, O.; CARNEIRO, R. M. D. G.; CASTAGNONE-SERENO, P. Identificação das principais espécies de *Meloidogyne* parasitas do cafeeiro no Brasil com marcadores SCAR-CAFÉ em Multiplex-PCR, **Nematologia Brasileira,** v. 28, p. 1-10, 2004.

ROSA, J. M. O.; WESTERICH, J. N.; WILCKEN, S. R. S. Nematoides-das-Galhas em Áreas de Cultivo de Olerícolas no estado de São Paulo. **Nematologia Brasileira**, v. 37, p.15-19, 2013.

RIVERO, R. M., RUIZ, J. M.; ROMERO, L. Role of grafting in horticultural plants under stress conditions. **Journal of food agriculture and environment,** v. 1, p. 70– 74, 2003.

RIVARD, C. L.; O'CONNELL, S.; PEET, M. M.; LOUWS, F. J. Grafting tomato with interspecific rootstock to manage disease caused by *Sclerotium rolfsii* and southern root-knot nematode. **Plant Disease**, v. 94, p.1015-1021, 2010.

ROBERTS, P. A. Concepts and consequences of resistance. In: STARR, J.L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (Eds.). **Plant Resistance to Parasitic Nematodes.** CAB International. p. 23-41, 2002.

ROBERTS, P. A. Current status of the availability, development, and use of host plant resistance to nematodes. **Journal of Nematology**, v. 24, n. 2, p. 213, 1992.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Eds.) **Bioinformatics methods and protocols**: methods in molecular biology. Totowa: Humana Press, 2000. p.365-386.

RUIZ, J. M.; BELAKBIR, A.; ROMERO, L. Foliar level of phosphorus and its bioindicators in Cucumis melo grafted plants. A possible effect of rootstocks. **Journal of Plant Physiology,** v. 149, p. 400–404, 1996.

RUIZ, J. M.; ROMERO, L. Nitrogen efficiency and metabolism in grafted melon plants. **Scientia Horticulturae,** v**.** 81, p. 113–123, 1999.

SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. B. **Tomate para processamento industrial.** Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças, p.8-11, 2000.

SEMBLAT, J.P.; WAJNBERG, E.; DALMASSO, A.; ABAD P.; CASTAGNONE-SERENO, P. High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis. **Molecular Ecology**, v. 7, p.119-125, 1998.

SPRING, KEVIN J.; PHAM, STEPHANIE; ZUFALL, REBECCA A. Chromosome copy number variation and control in the ciliate Chilodonella uncinata. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56413, 2013.

TAYLOR, D.T.; SASSER, J. N. Biologia, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raiz (*Meloidogyne* species). **North Carolina State University and USAID**, 1983, 111p.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada.** 2.Ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000, 473 p.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Funep, 1993.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola.** Jaboticabal: Fcav, 1989, 82 p,

VERDEJO-LUCAS, S.; TALAVERA, M.; ANDRÉS, M. F. Virulence response to the *Mi.* 1 gene of *Meloidogyne* populations from tomato in greenhouses. **Crop Protection**, v. 39, p. 97-105, 2012.

VEREMIS J. C, ROBERTS P. A. Relationships between *Meloidogyne incognita* resistance genes in *Lycopersicon peruvianum* differentiated by heat sensitivity and nematode virulence. **Theoretical and Applied Genetics,** v. 93, p. 950- 959, 1996a.

VEREMIS, J. C, ROBERTS, P. A. Differentiation of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria* novel resistance phenotypes in *Lycopersicon peruvianum* and derived bridge-

lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, p. 960-967, 1996b.

VEREMIS, J. C.; ROBERTS, P. A. Relationship between *Meloidogyne incognita* resistance gene in *Lycopersicon peruvianum* di erentiated by heat sensitivity and nematode virulence. **Theoretical and Applied Genetics,** v. 93, p. 950–959, 1996c.

WEBBER, H. J.; ORTON, W. A. Some diseases of cowpea. II. A cowpea resistant to root knot nematode (Heterodera radicola). **USDA bureau of plant industry Bulletin no**, v. 17, 1902.

WESTERICH, J. N. et al. Alterações anatômicas induzidas por Meloidogyne enterolobii (= M. mayaguensis) e Meloidogyne javanica em tomateiros resistentes a meloidoginose. Summa Phytopathologica, v. 38, n. 3, p. 192-197, 2012.

WILLIAMSON, V. M. et al. The nematode resistance gene, *Mi*. In: DE WIT, P. J. G., BISSELING, T.; STIEKEMA, W. J. (Ed.) **Biology of Plant Microbe Interactions.** International Society for Molecular Plant Microbe Interactions: St. Paul, MN, USA, v. 2, p. 88–92, 2000.

WILLIAMSON, V. M.; HUSSEY, R. S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1735-1745, 1996.

WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research,** V. 18, p. 6531-6535, 1990.

WPTC. Word producion estimate of tomatões for processing. 2019. Disponivel em: http://www.solanaspa.it/images/PDFWPTC_Word_production_estimate_as_of_20_maio_2019.pdf. Acesso em: 20 maio. 2019.

YAGHOOBI, J.; YATES, J. L.; WILLIAMSON, V. M. Fine mapping of the nematode resistance gene *Mi*-3 in *Solanum peruvianum* and construction of an *S. lycopersicum* DNA contig spanning the locus. **Molecular Genetics and Genomics,** v. 274, p. 60–69, 2005.

YETISIR, H.; SARI, N. Effect of different rootstock on plant growth, yield and quality of watermelon. **Australian journal of experimental agriculture,** v. 43, p. 1269– 1274, 2003.

ZIJLSTRA, C.; DONKERS-VENNE, D. T. H. M.; FARGETTE, M. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified regions (SCAR) based PCR assays. **Nematology**, v. 2, p. 847-853, 2000a.

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