



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MOLECULAR DE
ACESSOS DE BANANEIRA A *RADOPHOLUS SIMILIS* E
MELOIDOGYNE INCOGNITA.**

JANSEN RODRIGO PEREIRA SANTOS

Brasília - DF

2011

JANSEN RODRIGO PEREIRA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MOLECULAR DE ACESSOS DE
BANANEIRA A *RADOPHOLUS SIMILIS* E *MELOIDOGYNE INCOGNITA*.**

Tese apresentada à Universidade de
Brasília como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Fitopatologia pelo Programa de Pós
Graduação em Fitopatologia

Orientador

Prof. Juvenil Enrique Cares, PhD.

Co-orientador

Dr. Fábio Gelape Faleiro

BRASÍLIA

DISTRITO FEDERAL - BRASIL

2011

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do **Professor Juvenil Enrique Cares**, com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ, Universidade Católica de Brasília, Embrapa-Cerrados e Embrapa-Mandioca e Fruticultura.

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MOLECULAR DE ACESSOS DE
BANANEIRA A *RADOPHOLUS SIMILIS* E *MELOIDOGYNE INCOGNITA*.**

JANSEN RODRIGO PEREIRA SANTOS

TESE APROVADA em 05/04/2011 por:

Dra. Patrícia Messenberg Guimarães
Examinador Externo

Dra. Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro
Examinador Externo

Prof. Leonardo Silva Boiteux
Examinador

Prof. Cleber Furlanetto
Examinador

Prof. Juvenil Enrique Cares
Orientador (Presidente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2011

A minha esposa e amiga, Marcella, pelo incentivo e apoio. A Daniella, minha filha que tanto amo. Ao meu pai e familiares que me educaram e me transmitiram os seus melhores valores.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por toda força que dele obtive para seguir em frente neste caminho.

À minha amada esposa Marcella Alves Teixeira, a qual sempre esteve ao meu lado incentivando e me confortando nos momentos difíceis. Agradeço por me proporcionar bons momentos em minha vida e ser meu exemplo e inspiração para seguir em frente.

Ao meu pai, José Célio dos Santos, pelo incentivo e exemplo de profissionalismo e simplicidade.

A todos os meus familiares que sempre me apoiaram.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Juvenil Enrique Cares, pela tranquilidade, orientação, apoio, amizade e ensinamentos.

Aos Dr. Fábio Gelape Faleiro e Robert N. G. Miller, pela orientação, incentivo e confiança.

Ao Dr. Dílson da Cunha Costa por ter cooperado com o projeto, compartilhado sua experiência e por toda ajuda prestada.

A Sebastião de Oliveira Silva, Edson Perito Amorim e Frederico H. S. Costa, pela ajuda e cooperação no projeto.

Aos professores e funcionários da UnB, pela amizade e colaboração.

Aos professores Cláudio, Dianese, Adalberto Café, Marisa Ferreira, Cleber e Leonardo Boiteux por todos os ensinamentos pelos conselhos prestados.

Ao amigo Ribamar pela amizade e torcida durante o curso.

Aos meus colegas de curso de pós-graduação Ednalva, Cecília e Jessica pelo carinho, ajuda e momentos de descontração.

Aos funcionários e colegas da Embrapa Cerrados, em especial a Gracielle e João Batista, que me ajudaram na execução deste trabalho.

A Cristiane, Marco, Flávia e Flavio pela ajuda e momentos de descontração.

Aos colegas e funcionários da Universidade Católica de Brasília, por toda ajuda prestada.

À Universidade de Brasília e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade de realização do curso.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CPAC) e a Universidade Católica de Brasília (UCB), pela disponibilização de infra-estrutura no desenvolvimento científico de parte deste trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPMPF) pelo fornecimento de material vegetal.

Ào Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao CNPq e à FAP/DF por financiarem o presente projeto de pesquisa.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMO GERAL	iv
GENERAL ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	xii
OBJETIVO GERAL	xv
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	xv
LITERATURA CITADA	xvi
CAPÍTULO 1: RESISTÊNCIA A NEMATOIDES EM <i>MUSA</i> SPP	1
1. A IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO CULTIVO DE BANANA.....	2
2. CLASSIFICAÇÃO, ORIGEM E EVOLUÇÃO DAS CULTIVARES.....	2
3. ASPECTOS FITOSSANITÁRIOS DA BANANEIRA.....	4
4. TAXONOMIA, MORFOLOGIA E BIOLOGIA DE <i>RADOPHOLUS</i>	7
5. TAXONOMIA, MORFOLOGIA E BIOLOGIA DE <i>MELOIDOGYNE</i> <i>INCOGNITA</i>	9
6. TAXONOMIA, MORFOLOGIA E BIOLOGIA DE <i>PRATYLENCHUS</i> <i>BRACHYURUS</i>	10
7. MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE NEMATOIDES ENDOPARASITAS.....	11
8. VARIABILIDADE GENÉTICA DE NEMATOIDES.....	12
9. PRÁTICAS DE CONTROLE DE NEMATOIDES EM BANANEIRAS.....	13
10. MELHORAMENTO GENÉTICO DA BANANEIRA.....	18
11. VARIABILIDADE GENÉTICA DA BANANEIRA E USO DE MARCADORES MOLECULARES DE DNA.....	21
12. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.....	23
13. GENÔMICA DE <i>MUSA</i>	25
14. RESPOSTAS DE RESISTÊNCIA DE BANANEIRAS A NEMATOIDES.....	28
15. LITERATURA CITADA.....	30
CAPÍTULO 2: COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE MULTIPLICAÇÃO <i>IN</i> <i>VITRO</i> DE <i>RADOPHOLUS SIMILIS</i> E <i>PRATYLENCHUS BRACHYURUS</i> EM CILINDROS DE CENOURA.....	55
RESUMO	56
ABSTRACT	57
1. INTRODUÇÃO.....	58
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1. Método sem ágar-água.....	60
2.2. Método com ágar-água.....	63
3. RESULTADOS.....	66
4. DISCUSSÃO.....	70
5. CONCLUSÕES.....	72
6. LITERATURA CITADA.....	73
CAPÍTULO 3: REAÇÃO DE ACESSOS DE BANANEIRA A TRÊS POPULAÇÕES	

DE <i>RADOPHOLUS SIMILIS</i>	76
RESUMO.....	77
ABSTRACT.....	78
1. INTRODUÇÃO.....	79
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	80
3. RESULTADOS.....	82
4. DISCUSSÃO.....	89
5. CONCLUSÕES.....	93
6. LITERATURA CITADA.....	94
CAPÍTULO 4: RESISTÊNCIA HORIZONTAL E VERTICAL, AGRESSIVIDADE E VIRULÊNCIA NO PATOSSISTEMA <i>MUSA SPP.</i> VS. <i>RADOPHOLUS SIMILIS</i>.....	99
RESUMO.....	100
ABSTRACT.....	101
1. INTRODUÇÃO.....	102
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	103
2.1. Material genético.....	103
2.2. Inoculação e avaliação.....	104
2.3. Análise.....	105
3. RESULTADOS.....	106
4. DISCUSSÃO.....	110
5. CONCLUSÕES.....	113
6. LITERATURA CITADA.....	114
CAPÍTULO 5: IDENTIFICAÇÃO DE ACESSOS DE <i>MUSA SPP.</i> COM TOLERÂNCIA A <i>RADOPHOLUS SIMILIS</i> E A <i>MELOIDOGYNE INCOGNITA</i>.....	118
RESUMO.....	119
ABSTRACT.....	120
1. INTRODUÇÃO.....	121
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	122
2.1. Material vegetal.....	123
2.2. Obtenção e multiplicação de <i>Radopholus similis</i>	124
2.3. Obtenção e multiplicação de <i>Meloidogyne incognita</i>	124
2.4. Preparo do inóculo e inoculação.....	125
2.5. Delineamento experimental.....	125
2.6. Avaliação e análise estatística.....	126
3. RESULTADOS.....	127
3.1. Reação dos acessos de bananeira a <i>Radopholus similis</i>	127
3.2. Reação dos acessos de bananeira a <i>Meloidogyne incognita</i>	132
4. DISCUSSÃO.....	136
4.1. Reação dos acessos de bananeira a <i>Radopholus similis</i>	138
4.2. Reação dos acessos de bananeira a <i>Meloidogyne incognita</i>	140
5. CONCLUSÕES.....	141
6. LITERATURA CITADA.....	142
CAPÍTULO 6: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE BANANEIRA CONTRASTANTES PARA A	

RESISTÊNCIA A NEMATOIDES, COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES.....	147
RESUMO.....	148
ABSTRACT.....	150
1. INTRODUÇÃO.....	152
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	153
2.1. Material genético.....	153
2.2. Extração do DNA.....	155
2.3. Obtenção dos marcadores RAPD e Microssatélites.....	155
2.4. Análises estatísticas.....	156
3. RESULTADOS.....	157
4. DISCUSSÃO.....	171
5. CONCLUSÕES.....	174
6. LITERATURA CITADA.....	176
CAPÍTULO 7: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES ANÁLOGOS DE RESISTÊNCIA EM ACESSOS DE <i>MUSA</i> RESISTENTE E SUSCETÍVEL A <i>RADOPHOLUS SIMILIS</i>.....	181
RESUMO.....	182
ABSTRACT.....	183
1. INTRODUÇÃO.....	184
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	188
2.1. Material vegetal e bioensaio.....	188
2.2. Multiplicação e inoculação de nematoides.....	189
2.3. Protocolos de extração do RNA total.....	190
2.4. Tratamento do RNA com DNase.....	191
2.5. Síntese de cDNA.....	192
2.6. Síntese dos <i>primers</i> específicos de RGAs e reação de PCR.....	192
3. RESULTADOS.....	195
3.1. Bioensaio para confirmação da infecção de nematoides nas raízes.....	195
3.2. Avaliação dos protocolos de extração de RNA.....	196
3.3. Padronização da concentração dos cDNAs usando genes constitutivos.....	198
3.4. Análise de expressão de RGAs em acessos de <i>Musa acuminata</i> resistentes e suscetíveis ao nematoide <i>Radopholus similis</i>	199
4. DISCUSSÃO.....	200
5. CONCLUSÕES.....	205
6. LITERATURA CITADA.....	206

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 1: RESISTÊNCIA A NEMATOIDES EM <i>MUSA</i> SPP.	
Tabela 1. Ranking dos países com maior produção de banana em 2008.....	2
CAPÍTULO 2: COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>RADOPHOLUS SIMILIS</i> E <i>PRATYLENCHUS BRACHYURUS</i> EM CILINDROS DE CENOURA.	
Tabela 1. Número de nematoides resultantes de dois métodos de multiplicação <i>in vitro</i> para três tempos de avaliação, com população inicial de 25 fêmeas de <i>Radopholus similis</i> e de <i>Pratylenchus brachyurus</i>	67
Tabela 2. Número médio e aumento populacional de nematoides extraídos de cilindros de cenoura multiplicados <i>in vitro</i> por dois diferentes métodos, 20, 30 e 60 dias após a inoculação com 25 fêmeas de <i>Radopholus similis</i> e de <i>Pratylenchus brachyurus</i>	68
CAPÍTULO 3: REAÇÃO DE ACESSOS DE BANANEIRA A TRÊS POPULAÇÕES DE <i>RADOPHOLUS SIMILIS</i>.	
Tabela 1. Lista de acessos de <i>Musa</i> spp. utilizados para avaliar a reação a <i>Radopholus similis</i>	81
Tabela 2. Análise de variância de seis variáveis relacionadas à resistência de oito acessos de bananeira a três populações de <i>Radopholus similis</i>	83
Tabela 3. Reação de oito acessos de bananeira a três populações de <i>Radopholus similis</i>	85
Tabela 4. Reação de acessos de bananeira a três populações de <i>Radopholus similis</i> baseada na percentagem de redução do fator de reprodução.....	86
Tabela 5. Efeito de três populações de <i>Radopholus similis</i> sobre oito acessos de bananeira.....	87
Tabela 6. Médias do número de nematoides presentes na raiz de oito acessos de bananeira inoculados com três populações de <i>Radopholus similis</i>	89
CAPÍTULO 4: RESISTÊNCIA HORIZONTAL E VERTICAL, AGRESSIVIDADE E VIRULÊNCIA NO PATOSSISTEMA <i>MUSA</i> SPP. VS. <i>RADOPHOLUS SIMILIS</i>.	
Tabela 1. Análise de variância de um modelo de dialelo parcial envolvendo um grupo de hospedeiros e outro de isolados do patógeno, segundo Melo e Santos (1999), considerando o modelo fixo.....	106
Tabela 2. Análise dialélica e média geral do fator de reprodução dos nematoides avaliadas em 8 acessos de bananeiras inoculados com 3 diferentes populações de <i>Radopholus similis</i>	107
Tabela 3. Estimativas do Efeito da Capacidade Geral de Resistência Horizontal (ECGRH) e Resistência Horizontal Relativa (RHR) de 8 acessos de bananeiras inoculadas com 3 populações <i>Radopholus similis</i>	108
Tabela 4. Estimativas do Efeito da Capacidade Geral de Agressividade (ECGA) e Agressividade Relativa (AR) de 3 isolados de <i>Radopholus similis</i> inoculados em 8 acessos de bananeira.....	108
CAPÍTULO 5: IDENTIFICAÇÃO DE ACESSOS DE <i>MUSA</i> SPP. COM TOLERÂNCIA A <i>RADOPHOLUS SIMILIS</i> E A <i>MELOIDOGYNE INCOGNITA</i>.	
Tabela 1. Lista de 14 acessos de bananeiras utilizados para avaliar a tolerância a <i>Meloidogyne incognita</i> e a <i>Radopholus similis</i> , em Brasília-DF, 2007.....	123
Tabela 2. Taxa de multiplicação de <i>Radopholus similis</i> em 11 acessos de bananeira após 13	

meses da inoculação e mantidas em condições de campo por nove meses.....	128
Tabela 3. Comparação entre características de desenvolvimento de plantas inoculadas e não-inoculadas com <i>Radopholus similis</i> , 13 meses após a inoculação e mantidas por nove meses em condições de campo.....	130
Tabela 4. Reação de 11 acessos de bananeira a <i>Radopholus similis</i> baseada na taxa de multiplicação do nematoide e vigor das plantas em condições de campo.....	131
Tabela 5. Taxa de multiplicação de <i>Meloidogyne incognita</i> em 14 acessos de bananeira após 13 meses da inoculação e mantidos por nove meses em condições de campo.....	133
Tabela 6. Comparação entre características de desenvolvimento de plantas inoculadas e não-inoculadas com <i>M.incognita</i> , mantidas por nove meses em condições de campo.....	135
Tabela 7. Reação de 11 acessos de bananeira a <i>M. incognita</i> baseada na taxa de multiplicação do nematoide e vigor das plantas em condições de campo.....	136
CAPÍTULO 6: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE BANANEIRA CONTRASTANTES PARA A RESISTÊNCIA A NEMATOIDES, COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES.	
Tabela 1. Acessos de bananeira analisados e fenotipados quanto a resistência ou suscetibilidade a <i>Radopholus similis</i> (Rs), <i>Meloidogyne incognita</i> (Mi), <i>M. javanica</i> (Mj) e <i>M. arenaria</i> (Ma) com base no fator de reprodução.....	154
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados para obtenção dos marcadores RAPD e respectivos número de bandas polimórficas e monomórficas.....	160
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados para obtenção dos marcadores SSR e respectivos número de bandas polimórficas.....	161
Tabela 4. Matriz de dissimilaridade entre 11 acessos de bananeira, calculada com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li (1979), utilizando-se 195 marcadores RAPD.....	163
Tabela 5. Matriz de distâncias entre 11 acessos de bananeira, calculadas com base na coincidência alélica, utilizando-se 59 alelos de marcadores microssatélites.....	164
Tabela 6. Número de marcadores moleculares RAPD promissores para o mapeamento genético entre os cruzamentos de acessos suscetíveis e resistentes de bananeiras aos nematoides <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M arenaria</i> e <i>Radopholus similis</i>	165
Tabela 7. Número de marcadores moleculares SSR promissores para o mapeamento genético entre os cruzamentos de acessos suscetíveis e resistentes de bananeiras aos nematoides <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M arenaria</i> e <i>Radopholus similis</i>	166
CAPÍTULO 7: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES ANÁLOGOS DE RESISTÊNCIA EM ACESSOS DE MUSA RESISTENTE E SUSCETÍVEL A RADOPHOLUS SIMILIS.	
Tabela 1. Lista de <i>primers</i> específicos usados para análise de expressão de RGAs em <i>Musa</i> por RT-PCR.....	194
Tabela 2. Número médio de nematoides encontrados em 20 gramas de raiz de bananeiras ao longo do tempo de interação.....	196
Tabela 3. Avaliação do rendimento e qualidade do RNA total obtido de folhas e raízes de bananeira usando diferentes protocolos de extração.....	197

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 1: RESISTÊNCIA A NEMATOIDES EM <i>MUSA</i> SPP.	
Figura 1. Evolução das cultivares de bananas comestíveis.....	4
CAPÍTULO 2: COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>RADOPHOLUS SIMILIS</i> E <i>PRATYLENCHUS BRACHYURUS</i> EM CILINDROS DE CENOURA.	
Figura 1. Material necessário para a preparação de frascos para inoculação de nematoides.....	60
Figura 2. Preparação dos frascos para multiplicação de nematoides <i>in vitro</i> de acordo com a metodologia sem ágar-água.....	61
Figura 3. Axenização dos nematoides de acordo com a metodologia sem ágar-água.....	62
Figura 4. Preparo dos frascos para multiplicação <i>in vitro</i> de nematoides, de acordo com o método com ágar-água.....	64
Figura 5. Axenização dos nematoides de acordo com a metodologia com ágar-água.....	65
Figura 6. Aparência dos cilindros de cenoura após 60 dias de avaliação para os dois métodos de multiplicação de <i>Radopholus similis</i>	69
CAPÍTULO 4: RESISTÊNCIA HORIZONTAL E VERTICAL, AGRESSIVIDADE E VIRULÊNCIA NO PATOSSISTEMA <i>MUSA</i> SPP. VS. <i>RADOPHOLUS SIMILIS</i>.	
Figura 1. Estimativas da Capacidade Específica de Interação (CEI) de 8 acessos de <i>Musa</i> spp. inoculadas com 3 populações de <i>Radopholus similis</i>	109
Figura 2. Estimativas da Capacidade Específica de Interação (CEI) de 3 populações de <i>Radopholus similis</i> inoculados em 8 acessos de <i>Musa</i> spp.....	110
CAPÍTULO 5: IDENTIFICAÇÃO DE ACESSOS DE <i>MUSA</i> SPP. COM TOLERÂNCIA A <i>RADOPHOLUS SIMILIS</i> E A <i>MELOIDOGYNE INCOGNITA</i>.	
Figura 1. Disposição em campo das plantas inoculadas e não inoculadas com nematoides.....	126
CAPÍTULO 6: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE BANANEIRA CONTRASTANTES PARA A RESISTÊNCIA A NEMATOIDES, COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES.	
Figura 1. Produtos de amplificação do DNA de 11 acessos de bananeira gerados utilizando-se os primers OPE09 para RAPD e MaOCENF/MaOCEN1R para microssatélites.....	158
Figura 2. Correlação de Pearson e dispersão gráfica das distâncias genéticas entre pares de acessos de bananeira calculadas com base em marcadores microssatélites e RAPD.....	167
Figura 3. Análise de agrupamento de 11 acessos de bananeira, com base na matriz de distâncias genéticas calculadas a partir de marcadores RAPD e microssatélites.....	169
Figura 4. Dispersão gráfica e análise de agrupamento de 11 acessos de bananeira com base em distâncias genéticas calculadas a partir de marcadores RAPD e microssatélites.....	170
CAPÍTULO 7: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES ANÁLOGOS DE RESISTÊNCIA EM ACESSOS DE <i>MUSA</i> RESISTENTE E SUSCETÍVEL A <i>RADOPHOLUS SIMILIS</i>.	
Figura 1. RNA do acesso Grande Naine no tempo 7, não tratado e tratado com DNase, revelado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.....	198
Figura 2. Análise da expressão de doze genes análogos de resistência por RT-PCR, ao longo da cinética da interação de <i>Radopholus similis</i> e plantas resistentes e suscetíveis de <i>Musa</i>	200

RESUMO GERAL

SANTOS, Jansen Rodrigo Pereira. **Caracterização genética e molecular de acessos de bananeira a *Radopholus similis* e *Meloidogyne incognita***. 2011. 244p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A cultura da bananeira tem grande importância econômica e social em todo o mundo. O Brasil é o quarto produtor mundial de banana, sendo esta cultivada de Norte a Sul do País e, praticamente toda produção é comercializada no mercado interno. Problemas fitossanitários de variadas etiologias reduzem a vida útil dos plantios e levam a perdas na produção e na qualidade dos frutos. Dentre os fitonematoides, *Radopholus similis*, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Rotylenchulus reniformis* e *Pratylenchus coffeae* são considerados os de maior importância para a bananicultura. O parasitismo dos nematoides além de levar a perdas diretas, pode acarretar perdas indiretas, como gastos com fertilizantes, outros insumos e mão de obra para evitar maiores perdas de produção. Também o uso de nematicidas pode acarretar em risco de intoxicação durante a aplicação e de contaminação do meio ambiente.

Tendo em vista que o princípio da resistência de plantas a doenças constitui uma das medidas de controle mais compatíveis com a sustentabilidade agrícola, estabelecemos como objetivo deste projeto buscar uma forma de viabilizar o controle de nematoides por meio de resistência e tolerância varietal na cultura da banana, estudando a variabilidade do patógeno e do hospedeiro, além de iniciar o estudo da interação nematoide vs. *Musa* utilizando técnicas moleculares.

O uso de métodos de multiplicação em massa de fitonematoides *in vitro* em condições axênicas permite intensificar os estudos de taxonomia, biologia, epidemiologia e controle desses patógenos. Portanto, devido a necessidade de multiplicação massal de *R. similis* para a produção de inóculo com a finalidade de atender aos experimentos, tentou-se otimizar o método de multiplicação do inóculo para o nematoide, já que há variação da eficiência entre diferentes métodos de multiplicação. Foram avaliadas duas metodologias de multiplicação *in vitro* para *R. similis* e *Pratylenchus brachyurus* em três períodos de avaliação (20, 40 e 60 dias). Ambas as metodologias utilizam cilindros de cenoura em frascos com tampas, sendo que em uma delas foi adicionado meio agar-água no interior dos frascos. O método com agar-água mostrou-se mais efetivo que o método sem agar-água, para ambas as espécies, com um aumento populacional em torno de 280 vezes para

R. similis e 226 vezes para *P. brachyurus*, enquanto o outro método aumentou 5 e 2 vezes, respectivamente, após 60 dias.

O grau de resistência de oito acessos de bananeiras a diferentes populações de *R. similis* foi verificado e a diferença de agressividade entre as populações do nematoide também foram avaliadas. Plantas dos acessos 4249-05, 4279-06, Yangambi Km5, 0323-03, 0337-02, 1304-06, Borneo e Grande Naine foram inoculadas com 400 nematoides por planta e mantidas em casa de vegetação por 60 dias. Cada acesso foi inoculado com três populações de *R. similis* provenientes de Pernambuco, Distrito Federal e Santa Catarina, separadamente, com 5 repetições. Os acessos 4249-05, Yangambi Km5, 0323-03 e 4279-06 apresentaram níveis diferentes de resistência ao nematoide cavernícola com base na porcentagem de redução do fator de reprodução. A população de PE foi considerada a mais agressiva em relação às demais, enquanto que a do DF foi mais agressiva que a de SC.

Foi avaliada também a reação de clones diploides e triploides de bananeira em relação aos nematoides *R. similis* (nematoide cavernícola) e *M. incognita* (nematoide das galhas), em condições de campo com base nas taxas de multiplicação de cada nematoide e no desenvolvimento das plantas. As plantas foram previamente inoculadas com 200 juvenis, machos e fêmeas de *R. similis*, ou 2500 ovos e juvenis de *M. incognita* em vasos distintos. Os acessos foram avaliados após 13 meses da inoculação, em condições de campo. Os acessos 1304-04, 4223-06, 1318-01, 1319-01, Tjau Lagada e N118 se mostraram tolerantes ao nematoide cavernícola e os acessos N118, Pipit e Birmanie tolerantes ao nematoide das galhas, sendo que estes acessos permitiram a multiplicação do nematoide e não tiveram o desenvolvimento afetado.

Para o entendimento de componentes da resistência horizontal-vertical e da agressividade-virulência do patossistema *Musa* spp. vs. *R. similis*, foram utilizadas as populações de Santa Catarina (SC), Distrito Federal (DF) e Pernambuco (PE) do nematoide, além dos acessos 4249-05, Yangambi Km5, 0323-03, 4279-06, Grande Naine, 0337-02, Borneo e 1310-06. De cada população de *R. similis* foram inoculados 400 nematoides por planta em casa de vegetação. Os nematoides foram extraídos das raízes e do solo 60 dias após a inoculação. O fator de reprodução (FR) para cada acesso em relação a cada população de nematoide foi determinado. Na análise dos dados utilizou-se o modelo IV de Griffing (1956), no esquema de dialelo parcial, com quatro repetições. Os acessos com maior resistência horizontal foram 4249-05 e Yangambi Km5 e a população mais agressiva do patógeno foi a de Pernambuco.

Marcadores moleculares SSR e RAPD foram utilizados para a análise molecular de 11 acessos de *Musa* contrastantes para os fenótipos de resistência aos nematoides *R.similis*, *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, visando identificar *primers* e selecionar marcadores moleculares promissores para futuros trabalhos de mapeamento genético da resistência, além de estudar a diversidade genética dos acessos. Os acessos Birmanie, Pisang Nangka, Borneo, Grande Naine, Yangambi Km5, 1304-06, 4279-06, 4223-06, 8694-15, 1304-04 e 4249-05 foram selecionados conforme a percentagem de redução do fator de reprodução de cada espécie de nematoide de acordo com Santos (2007) e Teixeira (2007). O DNA genômico dos onze acessos foi extraído, sendo utilizados 13 *primers* RAPD e 14 pares de *primers* microssatélites. Um total de 195 marcadores RAPD e 59 alelos microssatélites foram gerados. Do total de marcadores, 183 RAPD e 56 SSR foram polimórficos e, 44 e 17, respectivamente, mostraram-se promissores para trabalhos futuros de mapeamento genético para resistência a *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *R. similis*. Entre todos os *primers* utilizados, 92 % para RAPD e 78 % para SSR geraram ao menos uma banda ou alelo promissor para estudos de mapeamento genético. Os *primers* decâmeros para RAPD OPE-09, OPG-12 e OPG-05 e, os pares de *primers* SSR AGMI25/AGMI26 e AGMI101/AGMI102 apresentaram o maior número de alelos promissores e se destacaram para futuros trabalhos de mapeamento genético. As distâncias genéticas entre os diferentes acessos baseadas nos marcadores RAPD variaram de 0,29 a 0,62 e, com base nos microssatélites variaram de 0,33 a 0,78. Os acessos Pisang Nangka e Grande Naine apresentaram a menor distância genética com base nos marcadores RAPD e os acessos Yangambi Km5 e 4223-06 com base nos marcadores SSR. Os acessos contrastantes para a resistência, 4279-06 e Borneo apresentaram, respectivamente distância genética de 0,48 e 0,60 e um total de 37 marcadores RAPD e 10 alelos SSR polimórficos e promissores para o mapeamento genético. Para os acessos contrastantes 4279-06 e 1304-04, as distâncias genéticas foram, respectivamente, de 0,47 e 0,46 e o total de bandas polimórficas promissoras para o mapeamento foi de 36 e 9 para os marcadores RAPD e microssatélites,

Para analisar a expressão de genes análogos de resistência (RGAs) em acessos resistente (Yangambi Km5) e suscetível (Grande Naine) ao nematoide *R. similis*, na presença e ausência do patógeno em momentos diferentes após a inoculação, um bioensaio foi realizado com duração de 7 dias em casa de vegetação. As raízes foram coletadas em quatro períodos distintos, 0, 3, 5 e 7 dias após inoculação. Doze pares de *primers* desenhados a partir de sequências de RGAs da família NBS-LRR (sítio de ligação a

nucleotídeos e região de repetição rica em leucina) foram utilizados para a análise de expressão diferencial via RT-PCR a partir do RNA extraído das raízes. Seis protocolos de extração de RNA foram testados. O protocolo do Concert™ Plant RNA Reagent foi selecionado, pois possibilitou a extração de RNA em quantidade e qualidade ideais. Os genes RGC5 e RGA14 não foram expressos em nenhum dos dois acessos. Os genes RGA10, Franc_MbPKW_RGA08L, Franc_MbPKW_RGA08O, se revelaram como constitutivos e expressos em todos os tempos para ambos os acessos. Outros genes que apresentaram uma expressão basal foram os RGA37, RGA41, RGC3 e RGC1, sendo que o primeiro foi expresso de forma constitutiva apenas para Yangambi Km5, os dois seguintes apenas para Grande Naine, e o últimos para ambos os acessos. O gene Franc_MbPKW_RGA08E teve um aumento na concentração a partir do tempo 3 para o acesso resistente, sendo que para a planta suscetível este gene só foi começar a ser expresso no tempo 7. O gene RGC2 foi expresso apenas no acesso resistente no tempo 5. O gene Franc_MbPKW_RGA08K foi expresso tardiamente em Grande Naine e para Yangambi Km5 foi constitutivo, mas deixou de ser expresso a partir do período de tempo 3.

Palavras-chave: *Musa*, Multiplicação *in vitro*, *Pratylenchus brachyurus*, *Radopholus similis*, *Medoidogyne*, resistência, tolerância, diversidade genética, marcadores moleculares, RGAs.

Orientador - Juvenil Enrique Cares - UnB; Co-orientador - Fábio Gelape Faleiro – Embrapa Cerrados.

GENERAL ABSTRACT

SANTOS, Jansen Rodrigo Pereira. **Genetic and molecular characterization of banana accessions to *Radopholus similis* and *Meloidogyne incognita***. 2011. 244p. Thesis (Doctorate in Plant Pathology) – Universidade de Brasilia, Brasilia, DF. Brazil.

Banana plantations have great economic and social importance worldwide. Brazil is the fourth largest producer of bananas, which is planted from North to South, and almost total fruit produced is sold domestically. Phytosanitary problems of varied etiologies reduce crop life span and lead to yield losses and poor fruit quality. Among the plant-parasitic nematodes, *Radopholus similis*, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Pratylenchus coffeae* and *Rotylenchulus reniformis* are considered the most important for banana production. Parasitism by nematodes also lead to direct and indirect losses, such as spending on fertilizers, and other inputs and labors to mitigate crop losses. Furthermore, the use of nematicides can carry risks of intoxication during application, and environmental contamination.

Considering that the principle of plant resistance to diseases is one of the most consistent strategy with sustainable farming, the goal for this project is to achieve control of nematodes in banana through varietal resistance or tolerance. For that, we analyzed the variability of the pathogen and host, and studied the interaction *Musa* vs. nematode at molecular level.

The use of mass multiplication methods of plant-parasitic nematodes in vitro allows to intensify studies on taxonomy, biology, epidemiology and control of these pathogens. Due to the need of mass production of nematodes for supplying inoculum for the experiments in this project, we optimized the method of multiplication of *R. similis*, since the efficiency of the methods of multiplication varies widely. Therefore, two methods for in vitro multiplication of *R. similis* and *Pratylenchus brachyurus* were evaluated in three time periods (20, 40 and 60 days). Both methods used carrot cylinders in closed lid jars. In one of them, water-agar was added covering the bottom of the jars, whilst in the second method no water-agar was added. For both species the method with water-agar proved to be more the most efficient, with a population increase of 280 times for *R. similis* and 226 times for *P. brachyurus*, whilst by the other method, the nematode populations increased 5 and 2 times, respectively, after 60 days.

The degree of resistance of eight accessions of banana to three different populations of *R.similis* has been verified, and the difference in aggressiveness between populations of the nematode has also been evaluated. Plants of accessions 4249-05, 4279-06, Yangambi Km5, 0323-03, 0337-02, 1304-06, Borneo and Grande Naine were inoculated with 400 nematodes per plant and maintained under greenhouse for 60 days. Each access was inoculated with three populations of *R.similis* from Pernambuco (PE), Federal District (DF) and Santa Catarina (SC), separately, with five replicates. Accessions 4249-05, Yangambi Km5, 0323-03 and 4279-06 expressed different levels of resistance to the burrowing nematode. The population from PE was considered the most aggressive. The population from DF was more aggressive whe compared to the one from SC.

The reaction of clones of diploid and triploid bananas was evaluated to the burrowing nematode (*R. similis*), and to the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*), under field conditions, based on the multiplication rates of each nematode and plant development. Plants were inoculated with 200 juveniles, males and females of *R.similis*, or 2500 eggs and juveniles of *M. incognita* in pots, separately. The accessions were evaluated 13 months after inoculation under field conditions. Accessions 1304-04,4223-06, 1318-01, 1319-01, Tjau Lagada and N118 reacted as tolerant to the burrowing nematode, while N118, Birmanie, Pipit as tolerant to the root-knot nematode.

To understand the components of horizontal-vertical resistance and of virulence-aggressiveness in the pathosystem *Musa* spp. vs. *R. similis* were used, three populations of *R. similis*, from Santa Catarina (SC), Federal Distrito (DF), Pernambuco (PE), and eight accessions of banana (4249-05, Yangambi KM5, 0323-03, 4279-06, Grande Naine, 0337-02, Borneo, and 1310-06). Each accession was inoculated with 400 nematodes per plant under greenhouse. The nematodes were extracted from roots and soil 60 days after inoculation. The reproduction factor (RF) for each accession and each nematode population was determined. The model IV of Griffing (1956) was adopted for analyzing the data, in partial diallel scheme with four replications. The accessions with higher horizontal resistance were 4249-05 and Yangambi Km5, and PE was the most aggressive population of the pathogen. Evidence of vertical and horizontal resistance were observed.

RAPD and SSR markers were used for molecular characterization of 11 genotypes of *Musa* with contrasting phenotypes of resistance to the nematodes *R. similis*, *M. incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*, aiming to select primers and molecular markers for future work on genetic mapping of the resistance. In addition the genetic diversity of the banana genotypes was studied. These accessions were selected from a working

collection of 26 accessions of banana, based on the evaluation of the reproduction factor for each nematode species. Genomic DNA was extracted from the selected accessions, and used 13 RAPD primers and 14 pairs of microsatellite primers for obtaining molecular markers. A total of 195 RAPD markers and 59 microsatellite alleles were generated. Of the total markers, 183 RAPD and 56 SSR were polymorphic, and 44 and 17, respectively, have shown to be promising for future studies of genetic mapping for resistance to *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* and *R. similis*. Among all primers used, 92% RAPD, and 78% SSR primers generated at least one band or allele promising for genetic mapping. Decamer primers for RAPD, OPE-09, OPG-12 and OPG-05 and the pairs of SSR primers AGMI25/AGMI26 and AGMI101/AGMI102 showed the highest number of alleles promising for future works of genetic mapping. The genetic distances between the different accessions based on RAPD markers ranged from 0.29 to 0.62 and, based on microsatellites ranged from 0.33 to 0.78. Accessions Grande Naine and Pisang Nangka showed the smallest genetic distance based on RAPD markers, and accessions Yangambi Km5 and 4223-06 the smallest distance based on SSR markers. For the contrasting accessions for resistance, Borneo and 4279-06 the genetic distances were respectively 0.48 and 0.60 and, with a total of 37 RAPD and 10 SSR polymorphic alleles promising for genetic mapping. For the contrasting accessions 4279-06 and 1304-04, genetic distances were, respectively, 0.47 and 0.46, and the total number of polymorphic bands promising for genetic mapping was 36 and 9 for the RAPD and microsatellites.

To analyze the expression of RGAs in banana accessions, resistant (Yangambi Km5) and susceptible (Grande Naine) to the nematode *R. similis* in the presence and absence of the pathogen, were used at different time periods after inoculation. A bioassay was conducted for 7 days in a greenhouse. Roots were collected in four distinct periods, 0, 3, 5 and 7 days after inoculation. Twelve pairs of primers designed from sequences of RGAs from the NBS-LRR family were used for analysis of differential expression by RT-PCR from RNA extracted from roots. Six RNA extraction protocols were tested. The protocol Concert™ Plant RNA Reagent was selected since it allowed the extraction of RNA in ideal quantity and quality. The genes RGC5 and RGA14 were not expressed in any of the two accessions. The genes RGA10, Franc_MbPKW_RGA08L, Franc_MbPKW_RGA08O, were revealed as constitutive and expressed in all times for both accessions. Other genes that showed a basal expression were RGA37, RGA41, RGC3 and RGC1. The first one was expressed constitutively only in Yangambi Km5, the next two only in Grande Naine, and the last one was expressed in both accessions. The gene

Franc_MbPKW_RGA08E had an increased concentration starting from time 3 in the resistant accession, while in the susceptible one, this gene was only beginning to be expressed at time 7. The gene RGC2 was expressed only in the resistant accession, beginning at time 5. The gene Franc_MbPKW_RGA08K was expressed late in Grande Naine, and it proved to be constitutive in Yangambi Km5, but it stopped to be expressed at time 3.

Keywords: *Musa*, In vitro multiplication, *Pratylenchus brachyurus*, *Radopholus similis*, *Medoidogyne*, resistance, tolerance, genetic diversity, molecular markers, RGAs.

Guidance Committee: Juvenil Enrique Cares - UnB (Advisor), Fábio Gelape Faleiro – Embrapa Cerrados (Co-advisor).

INTRODUÇÃO GERAL

A bananeira, *Musa* spp., é uma das frutas mais consumidas no mundo, sendo cultivada na maioria dos países tropicais. Seu produto está incorporado à alimentação da população brasileira com 99% da produção destinada ao mercado interno. No Brasil, a cultura ocupa o segundo lugar em área plantada e produção de frutíferas, sendo superada apenas pela laranja. O Brasil apresenta uma produção de 6,9 milhões de toneladas de banana, em uma área de 479 mil hectares (IBGE, 2009).

Dentre os patógenos que atacam a cultura da banana, os nematoides se destacam pela sua ampla disseminação em todo o mundo. As perdas causadas são altas, com valores estimados de 20% (Sasser e Freckman, 1987), chegando a 100%, quando não há controle efetivo (Silva *et al.*, 2001). Os nematoides atacam o sistema radicular e o rizoma, afetando, dessa forma, o crescimento e produção da planta, influenciando negativamente a sustentação da planta e a absorção de nutrientes (Speijer e De Waele, 1997).

A bananeira é uma ótima hospedeira de vários nematoides importantes, sendo que *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949, *Helicotylenchus multicinctus* (Cobb, 1893) Golden, 1956; *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann, 1898) Filipjev e Schuurmans Stekhoven, 1941, *Meloidogyne* spp. e *Rotylenchulus reniformis* Linford e Oliveira, 1940, são os principais. Segundo Zem e Lordello (1983), os nematoides cavernícola e espiralado (*H. multicinctus*) são considerados fatores limitantes à produção de banana em várias partes do mundo, apresentando oneroso e difícil controle.

Radopholus similis apresenta uma ampla distribuição pelo mundo e é capaz de causar extensas necroses de raízes, razão pela qual é denominado “nematóide cavernícola”. O parasitismo por esse nematóide pode ocasionar atraso na emissão do pendão floral, formação de cachos de menor peso e menor rendimento por área (Zem *et al.*, 1982; Jaehn, 1993).

O nematóide de galhas radiculares do gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1887, está mundialmente distribuído infectando muitas culturas economicamente importantes. As espécies mais encontradas associadas a bananeiras são *M. incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949, *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949 e *M. hapla* Chitwood, 1949 (Stoffelen *et al.*, 2000). De acordo com Cofcewicz *et al.* (2001) as espécies de *Meloidogyne* que ocorrem com mais frequência nos estados brasileiros onde se cultivam banana são *M. incognita* e *M. javanica*.

No Brasil, *P. coffeae* é a espécie mais importante e mais comumente encontrada na cultura da banana, sendo que *Pratylenchus brachyurus* tem sido relatado parasitando raízes de bananeiras em vários estados brasileiros, Cavalcante e colaboradores (2002) relataram *P. brachyurus* no estado do Acre e Souza *et al.* (1999) em alguns municípios dos estados de Minas Gerais, Ceará e Pernambuco.

Várias medidas de controle podem ser aplicadas para reduzir populações de fitonematoides na bananicultura, sendo que o método mais empregado é o químico. No entanto, este apresenta alto custo e uma série de desvantagens com relação à contaminação do meio ambiente.

Um método eficiente, de baixo custo e grande potencial para o produtor de banana é a resistência genética a nematoides, que tem sido estudada por diferentes pesquisadores (Moens *et al.*, 2001; Vilas Boas *et al.*, 2002; Cofcewicz *et al.*, 2004a,b; Gaidashova *et al.*, 2008; Quénéhervé *et al.*, 2009; Dizon *et al.*, 2010).

Apesar de encontrarmos alguns relatos de fontes de resistência em *Musa* a nematoides, poucos são os relatos de tolerância, principalmente em condições de campo (Viaene *et al.*, 2003; Janarthani *et al.*, 2005; Hartman *et al.*, 2010). A busca da resistência genética depende da variabilidade genética da planta hospedeira e da variabilidade existente nas populações dos nematoides. Diferenças quanto à virulência e agressividade em populações de *R. similis* tem sugerido a existência de diferentes biótipos. Há relatos de variantes populacionais de nematoides em banana (Riggs, 1991; Pinochet, 1979; Koshy e Jasy, 1991; Elbadri, 2000; Costa, 2004), sendo que uma população pode se reproduzir de maneira diferenciada em várias plantas da mesma espécie e, diferentes populações podem mostrar diferentes níveis de virulência e agressividade em diferentes hospedeiras ou em uma mesma hospedeira.

Espécies de *Meloidogyne*, por exemplo, são conhecidas pela sua alta variabilidade genética, sendo que algumas espécies são altamente polífagas, com mais de 300 espécies de hospedeiras (Trudgill e Blok, 2001) enquanto outras têm uma gama de hospedeiras restrita.

A variabilidade genética do germoplasma de *Musa* tem sido amplamente estudada. Alguns autores têm utilizado técnicas que possibilitam detectar melhor o polimorfismo do DNA, gerando grande número de marcadores moleculares para análises genéticas (Howell *et al.*, 1994; Kaemmer *et al.*, 1992; Fauré *et al.*, 1994; Pillay *et al.*, 2000; Creste *et al.*, 2003).

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram sofisticados mecanismos de

defesa contra patógenos. Os mecanismos das interações entre planta e patógenos já são conhecidos, porém pouco se sabe sobre essas interações a nível molecular (Cordeiro e Sá, 1999).

Os genes de resistência identificados até o momento pertencem a cinco famílias e estão relacionados a estresses bióticos em plantas (Martin *et al.*, 2003). Esses genes geralmente codificam para a produção de aminoácidos ou proteínas com motivos bem conservados, fatores que podem se tornar uma importante ferramenta para a biotecnologia, auxiliando em estudos de doenças em diferentes plantas, porém provocadas pelo mesmo patógeno.

As famílias de genes de resistência identificadas em *Musa* são pertencentes às classes do sítio de ligação a nucleotídeos e região de repetição rica em leucina (NBS-LRR), *Receptor Like Protein* (RLP), *Receptor like kinase* (RLK), (Serina/Treonina quinase) e *Coiled coil* (CC ancorado à membrana) (Miller *et al.*, 2008).

A maior e mais importante classe de genes de resistência (genes R) é a que apresenta sítio de ligação a nucleotídeos e região de repetição rica em leucina (NBS-LRR) (Rommens e Kishmore, 2000). A maioria dos genes clonados até hoje ligados à resistência estão incluídos nessa família. Acredita-se que o domínio NBS esteja atuando na transdução de sinais (Ellis e Jones, 1998) e, o LRR no reconhecimento do patógeno por meio da interação do produto do gene Avr com o produto do gene R (Fluhr, 2001).

A existência de similaridades estruturais entre os genes de resistências possibilitou a identificação de análogos aos genes de resistência em diversas espécies vegetais (Malvas, 2003). Os análogos de genes de resistência (RGAs) são sequências similares a sequências de genes de resistência, mas que ainda não possuem sua funcionalidade confirmada.

Usando amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) com *primers* degenerados para detecção de motivos conservados de NBS e LRR, dentre outros, além de domínios conhecidos de genes de resistência, um grande número de genes análogos de resistência (RGA) foram isolados em bananeiras (Pei *et al.*, 2007; Azhar e Heslop-Harrison, 2008; Miller *et al.*, 2008; Peraza-Echeverria *et al.*, 2009).

Até o momento poucos trabalhos verificaram a expressão de genes análogos de resistência a doenças em *Musa*, sendo que nenhum deles envolveram RGAs que estavam relacionados à resistência a nematoides (Peraza-Echeverria *et al.*, 2008; Baurens *et al.*, 2010).

OBJETIVO GERAL

Tendo em vista que o princípio da resistência de plantas a doenças constitui uma das medidas de controle mais compatíveis com a sustentabilidade agrícola, estabelecemos como objetivo deste trabalho identificar possíveis fontes de resistência ou tolerância, estudar a variabilidade de acessos de *Musa* e populações de nematoides, além de iniciar o estudo da interação nematoide vs. *Musa* em nível genético e molecular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são: comparar duas técnicas usadas para a multiplicação em massa de *R. similis* e *P. brachyurus*; avaliar a reação de acessos de bananeiras a diferentes populações de *R. similis*, bem como detectar diferenças de agressividade entre populações do nematoide; identificar acessos de bananeiras tolerantes a *R. similis* e a *M. incognita* em condições de campo utilizando como critérios de seleção o vigor das plantas e na taxa de multiplicação dos nematoides; iniciar estudos sobre componentes da resistência horizontal/vertical e da agressividade/virulência no patossistema *Musa* spp. vs. *R. similis*; utilizar o sistema de marcadores moleculares SSR e RAPD, para realizar a caracterização molecular de 11 acessos de *Musa* contrastantes para fenótipos de resistência aos nematoides *R. similis*, *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, visando a identificar marcadores promissores para futuros trabalhos de mapeamento genético da resistência, além de estudar a diversidade genética dos acessos; analisar a expressão de RGAs em acessos de *Musa acuminata* resistentes e suscetíveis ao nematoide *R. similis* na presença e ausência do patógeno durante a cinética da interação nematoide-planta.

LITERATURA CITADA

- AZHAR, M. e HESLOP-HARRISON, J.S. Genomes, diversity and resistance gene analogues in *Musa* species. *Cytogenetic Genome Resistance* 121: 59-66. 2008.
- BAURENS, F.C.; BOCS, S.; ROUARD, M.; MATSUMOTO, T.; MILLER, R.; RODIER-
OUD, M.; MBEGUIE-A-MBEGUIE, D. e YAHIAOUI, N. Mechanisms of haplotype
divergence at the RGA08 nucleotide-binding leucine-rich repeat gene locus in wild banana
(*Musa balbisiana*). *MC Plant Biology* 10: 149. 2010.
- CAVALCANTE M.J.B.; SHARMA, R.D; VALENTIM, J.F. e GONDIM, T.M.S.
Nematoides associados ao amendoim forrageiro e a bananeira no estado do Acre.
Fitopatologia Brasileira 27: 107. 2002.
- COFCEWICZ, E.T.; CARNEIRO, R.M.D.G.; CASTAGNOCE SERENO, P e
QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotype and genetic diversity of root-knot nematodes
parasitizing *Musa* in Brazil. *Nematology* 6: 85-95. 2004a.
- COFCEWICZ, E.T.; CARNEIRO, R.M.D.G; CORDEIRO, C.M.T.; QUÉNÉHERVÉ, P. e
FARIA, J.L.C. Reação de cultivares de bananeira a diferentes espécies de nematoides das
galhas. *Nematologia Brasileira* 28: 11-22. 2004b.
- COFCEWICZ, E.T.; CARNEIRO, R.M.D.G.; QUÉNÉHERVÉ, P.; AUGUSTIN, E. e
FARIA, J.L.C. Ocorrência de *Meloidogyne* spp. em áreas produtoras de banana no Brasil.
In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 23., 2001. Anais... Piracicaba:
FAEF. p. 112. 2001.
- CORDEIRO, M.C.R e SÁ, M.F.G. Biotecnologia e resistência a patógenos. *Biotecnologia
Ciência e Desenvolvimento* 10: 34-39.1999.
- COSTA, D. da C. Variabilidade patogênica e genética de *Radopholus similis* em bananeira
no Brasil. 2004. Tese (Doutorado). Universidade de Brasília, Brasília. 2004.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; SILVA, S.O. e FIGUEIRA, A. Genetic
characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers.
Euphytica 132:259-268. 2003.

DIZON, T.O.; PINILI, M.R.; CRUZ JR, F.S; DAMASCO, O.P.; VAN DEN BERGH, I.; DE WAELE, D. Response of Philippine banana (*Musa* spp.) cultivars to *Radopholus similis* (Thorne) and *Meloidogyne incognita* Chitwood under greenhouse conditions. Philippine Journal of Crop Science 35:36-51. 2010.

ELBADRI, G. A. Diversity of *Radopholus similis* (Cobb, 1893) (Nematoda: Tylenchida). 146 p. Thesis. Faculty of Sciences, University of Gent. 2000.

ELLIS, J. e JONES, D. Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogen resistance in plants. Current Opinion in Plant Biology 1:288–293. 1998.

FAURÉ, S.; NOYER, J.L.; CARREEL, F.; HORRY, J. P.; BAKRY, F. e LANAUD, C. Maternal inheritance of chloroplast genome and paternal inheritance of mitochondrial genome in banana (*Musa acuminata*). Curr. Genet. 25:265-269. 1994.

FLUHR R. Sentinels of disease. Plant resistance genes. Plant Physiol. 127: 1367–1374. 2001.

GAIDASHOVA, S.V.; UWIMPUHWE, B.; KARAMURA, E.B. Identification of banana varieties with resistance to nematodes in Rwanda. Afr. Crop Sci. J. 16: 27-33. 2008.

HARTMAN, J.B.; VUYLSTEKE, D.; SPEIJER, P.R.; SSANGO, F.; COYNE, D.L. e DE WAELE, D. Measurement of the field response of *Musa* genotypes to *Radopholus similis* and *Helicotylenchus multincinctus* and the implications for nematode resistance breeding. Euphytica 172:139-148. 2010.

HOWELL, E.C.; NEWBURY, H.J.; SWENNEN, R.L.; WITHERS, L.A. e FORD-LLOYD, B.V. The use of RAPD for identifying and classifying *Musa* germplasm. Genome 37: 328-332. 1994.

IBGE. Produção Agrícola Municipal. Rio de Janeiro. Disponível: site. IBGE. <http://www.ibge.gov.br>. Consultado em Janeiro de 2011. 2009.

JAEHN, A. Controle de *Radopholus similis* em bananeira cv. Nanicão através de nematicidas. In: Encontro de bananicultores de Registro, 3Q, Registro. Palestras, 21 p. 1993. (mimeografado).

JANARTHANI, D.; SOORIANATHASUNDARAM, K.; POOMIMA, K. e KUMAR, N. Screening of certain banana accessions against *Radopholus similis* under field conditions. *Nematol. Medit.* 33:139-143. 2005.

KAEMMER, D.; AFZA, R.; WEISING, K.; KAHL, G.; FRANTISEK, J. e NOVAK, F.J. Oligonucleotide and amplification fingerprinting of wild species and cultivars of banana (*Musa* spp.). *Biotechnology Techniques* 10: 1030 – 1035. 1992.

KOSHY, P.K. e JASY, T. Host preference of the burrowing nematode *Radopholus similis* populations from India. *Indian Journal of Nematology* 21:39-51. 1991.

MALVAS, C.C. Clonagem e caracterização genética de locos homólogos a genes de resistência em *Brassica oleracea* L. e *Zea mays* L. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 79p. 2003.

MARTIN, G.B.; BOGDANOVE, A.J. e SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review Plant Biology* 54: 23-61. 2003

MELO, L.C. e SANTOS, J.B. Identification of resistant genotypes considering polygenic systems in host-pathogen interaction. *Genetic and Molecular Biology* 22: 601-608. 1999.

MILLER, R.N.G.; BERTIOLI, D.J.; BAURENS, F.C.; SANTOS, C.M.R.; ALVES, P.C.; MARTINS, N.F.; TOGAWA, R.C.; SOUZA JÚNIOR, M.T; PAPPAS JÚNIOR, G.J. Analysis of non-TIR NBS-LRR resistance gene analogs in *Musa acuminata* Colla: Isolation, RFLP marker development, and physical mapping. *BMC Plant Biology* 8:1-15. 2008.

MOENS, T.A.S.; ARAYA, M. e DE WAELE, D. Correlations between nematode numbers and damage to banana (*Musa* AAA) roots under commercial conditions. *Nematropica* 31:55–65. 2001.

PEI, X.; LI, S.; JIANG, Y.; ZHANG, Y.; WANG, Z. e JIA, S. Isolation, characterization and phylogenetic analysis of the resistance gene analogues (RGAs) in banana (*Musa* spp.). *Plant Science* 172:1166-1174. 2007.

PERAZA-ECHEVERRIA, S.; DALE, J.L.; HARDING, R.M. e COLLET, C. Molecular cloning and in silico analysis of potencial *Fusarium* resistance genes in banana. Mol. Breeding 23:423-443. 2009.

PERAZA-ECHEVERRIA S.; DALE J.L.; HARDING R.M.; SMITH M.K.; COLLET, C. Characterization of disease resistance gene candidates of the nucleotide binding site (NBS) type from banana and correlation of a transcriptional polymorphism with resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cabense* race 4. Mol. Breeding 22(4): 565-579. 2008.

PILLAY, M.; NWAKANMA, D. C. e TEKNOUANO, A. Identification of RAPD markers linked to A and B genome sequences in *Musa* L. Genome 43:763 – 767. 2000.

PINOCHET, J. Comparison of four isolates of *Radopholus similis* from Central America on Vallery banana. Nematropica 9: 40-43. 1979.

QUÉNÉHERVÉ, P.; VALETTE, C.; TOPART, P.; TEZENAS DU MONTCEL, H. e SALMON, F. Nematode resistance in bananas: screening results on some wild and cultivated accessions of *Musa* spp. Euphytica 165: 123-136. 2009.

RIGGS, R.D. Resistance: breaking races of plant parasitic nematodes. In: NICKLE, W.R. (Ed.). Manual of Agricultural Nematology. New York: Basel and Hong Kong. Marcel Dekker. p. 827-851. 1991.

ROMMENS, C.M. e KISHMORE, G.M. Exploiting the full potential of disease-resistance genes for agricultural use. Current Opinion in Biotechnology 11:120-125. 2000.

SASSER, J.N. e FRECKMAN, D.W. A world perspective on nematology, the role of society. In: VEECH, J. A. e DICKSON, D. W. Vistas on Nematology. p. 7-14. 1987.

SILVA, S.O.; SOUZA JUNIOR, M.T.; ALVES, E.J.; SILVEIRA, J.R.S. e LIMA, M. Banana breeding program at Embrapa. Crop Breeding and Applied Biotechnology1:399-436. 2001.

SOUZA, J.T.; MAXIMINIANO, C. e CAMPOS, V.P. Nematoides associados a plantas frutíferas em alguns estados brasileiros. Ciência e Agrotecnologia 23:353-357. 1999.

SPEIJER, P.R. e DE WAELE, D. Screening of *Musa* germplasm for resistance and tolerance to nematodes. INIBAP Technical Guidelines, No 1, pp. 47. 1997.

STOFFELEN, R.; VERLINDEN, R.; XUYEN, N. T.; SWENNEN, R. e DE WAELE, D. Host plant response of *Eumusa* and *Australimusa* bananas (*Musa* spp.) to migratory endoparasitic and root-knot nematodes. *Nematology* 2: 907 – 916. 2000.

TRUDGILL, D.L. e BLOK, V.C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review Phytopathology*. 39: 53–77. 2001.

VIAENE, N.; DURAN, L.F.; RIVERA, J.M.; DUEÑAS, J; ROWE, P. e DE WAELE, D. Responses of banana and plantain cultivars, lines and hybrids to the burrowing nematode *Radopholus similis*. *Nematology* 5:85–98. 2003.

VILAS BOAS, L.C.; TENENTE, R.C.V.; GONZAGA, V.; SILVA NETO, S.P.; ROCHA, H.S. Reação de clones de bananeira (*Musa* spp.) ao nematoide *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949, Raça 2. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 24: 690 – 693. 2002.

ZEM, A.C. e LORDELLO, L.G.E. Estudos sobre hospedeiros de *Radopholus similis* e *Helicotylenchus multincinctus*. *Sociedade Brasileira de Nematologia* 7: 175-188. 1983.

ZEM, A.C.; RODRIGUES, J.A.S. e LORDELLO, L.G.E. Efeitos de nematicidas nas populações de nematoides e produção da bananeira “Nanicão”. *Sociedade Brasileira de Nematologia* 6: 57-70. 1982.

CAPÍTULO 1

RESISTÊNCIA A NEMATOIDES EM *MUSA SPP.*

1. A IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO CULTIVO DE BANANA

A produção de banana é concentrada em países tropicais, onde existem condições adequadas para o desenvolvimento da planta. Em 2008, os países que mais produziram bananas foram a Índia, China, Filipinas, Brasil, Equador, Indonésia, República Unida da Tanzânia, México, Costa Rica e Colômbia (FAO, 2008) (Tabela 1).

Tabela 1. Ranking dos países com maior produção de banana em 2008 (FAO, 2008).

Posição	País	Produção (Toneladas)
1	Índia	26217000
2	Filipinas	8687624
3	China	8042702
4	Brasil	6998150
5	Equador	6701146
6	Indonésia	5741352
7	Tanzânia	3500000
8	México	2159280
9	Costa Rica	2127000
10	Colômbia	1987603

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de bananas (FAO, 2008), tendo produzido aproximadamente 6,7 milhões de toneladas em uma área colhida de 479 mil hectares no ano de 2009, sendo superada apenas pela laranja (IBGE, 2009). O que correspondeu a um volume de negócios superior a R\$ 3 bilhões. Os principais estados produtores em 2009 foram São Paulo, Bahia, Santa Catarina, Minas Gerais e Pará. Estes cinco estados somaram 59% da produção nacional (IBGE, 2009).

No Brasil o consumo per capita de frutas, de 31 kg/ano, equivale ao triplo do consumo per capita do europeu e do norte-americano (9 e 10 kg/ano, respectivamente) (FAO, 2007). O mercado interno consome 99% da produção de banana, sendo que cada região tem preferência por um determinado grupo de variedades.

2. CLASSIFICAÇÃO, ORIGEM E EVOLUÇÃO DAS CULTIVARES

Amplamente distribuída por todo o globo, a banana tem como origem o sudeste Asiático, mais especificamente na Índia e Polinésia (Simmonds, 1962), sendo a Malásia e a

Indonésia considerados os centros da diversidade (Daniells *et al.*, 2001). Nesta região, alguns diplóides, possivelmente híbridos, adquiriram a capacidade de produzir mais polpa e se tornaram progressivamente sem semente. A intervenção humana teve um papel fundamental na geração de bananas comestíveis, sendo que as bananeiras sem sementes só poderiam ter chegado a outras partes do mundo através do transplante de mudas pelo homem. Dessa forma, a história das variedades de banana está intimamente ligada à das populações humanas (De Langhe, 1996).

As bananeiras são plantas pertencentes ao gênero *Musa* L., família *Musaceae* L., sendo esta uma das seis famílias da ordem Zingiberales Grisebach. A família *Musaceae* é dividida em dois gêneros: *Musa* e *Ensete* Horaninow. O Gênero *Musa* é dividido em quatro seções (Cheesman, 1947): *Callimusa*, *Australimusa*, *Eumusa* e *Rhodochlamys*. Teoricamente, todas as bananeiras cultivadas são originárias das espécies pertencentes à seção *Eumusa*, que possui cerca de 11 espécies. Entretanto, a maioria das cultivares é resultante de duas espécies, *Musa acuminata* Colla (genoma A) e *Musa balbisiana* Colla (genoma B) (Inibap, 2004).

As bananeiras são monocotiledôneas tropicais cujas espécies de importância econômica, *M. acuminata* e *M. balbisiana* apresentam número básico de cromossomos igual a 11.

As primeiras bananas cultivadas foram diplóides: a maioria das bananeiras produtoras de frutos comestíveis originou-se a partir da hibridação intra e interespecífica das espécies selvagens, *M. acuminata* (genoma A) e *M. balbisiana* (genoma B) (Simmonds e Shepherd, 1955). Formas triplóides passaram a ocorrer como resultado de hibridações entre diplóides parcialmente estéreis com formas macho-férteis e, por serem mais produtivos, mais vigorosos e produzirem frutos maiores, foram selecionados em preferência aos diplóides, substituindo-os em muitos locais (Sharrock, 1998). Naturalmente, nos locais onde ocorreram encontros entre as duas espécies, surgiram os triplóides AAB e ABB (Inibap, 2004). Grande parte das cultivares é triplóide, sendo que diplóides e tetraplóides ocorrem com menor frequência. Os tetraplóides podem se originar também a partir de hibridação natural, porém eles são mais raros que os triplóides. No entanto, alguns tetraplóides foram produzidos por programas de melhoramento, como os híbridos FHIA (Fundação Hondurenha de Investigação Agrícola) (Inibap, 2004). O intercruzamento de espécies e subespécies levou ao aparecimento de esterilidade, uma característica selecionada pelo homem juntamente com partenocarpia e propagação vegetativa (Simmonds, 1995). No entanto, os diplóides são indispensáveis ao

melhoramento genético, pois são fontes potenciais de genes de resistência a fatores bióticos e abióticos adversos (Silva *et al.*, 1999) (Figura 1).

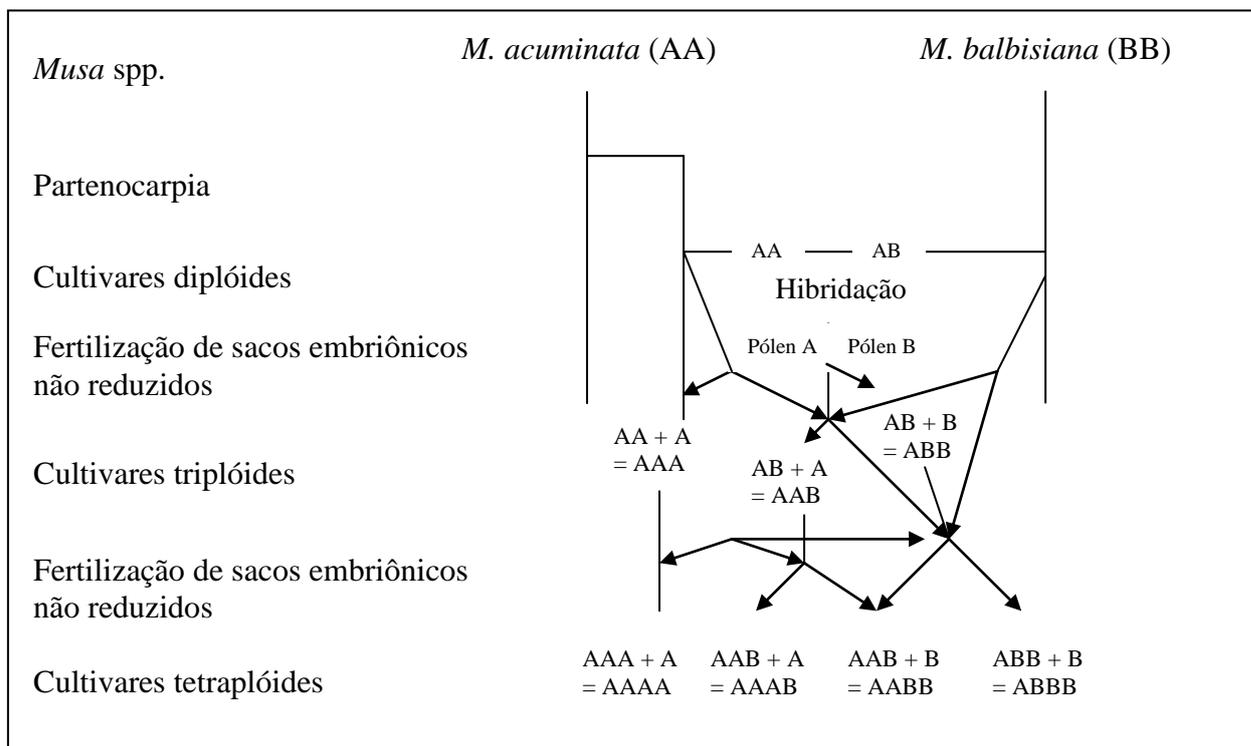


Figura 1. Evolução das cultivares de banana comestíveis (Simmonds e Shepherd, 1955).

3. ASPECTOS FITOSSANITÁRIOS DA BANANEIRA

A bananicultura brasileira, salvo algumas áreas de produção, caracteriza-se pelo baixo nível técnico dos cultivos. Isto conduz ao fato de que, em geral, bananais mal cuidados são comumente afetados, com grande intensidade, por problemas fitossanitários, dentre os quais se destacam as doenças bióticas. Estas, por sua vez, contribuem decisivamente para a baixa produtividade e qualidade dos frutos que são produzidos em nosso país (Cordeiro, 1997).

As doenças causadas por fungos são as mais comuns. Ocorrem aproximadamente 50 patógenos fúngicos em bananeiras, porém os mais importantes são os fungos causadores da Sigatoka-negra, Sigatoka-amarela e Mal do Panamá (Jones, 2000).

A Sigatoka-negra é causada pelo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (fase perfeita)/*Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton (fase imperfeita). A primeira observação da doença foi em 1963, em Fiji (Rhodes, 1964); sendo constatada no Brasil apenas em 1998, no Estado do Amazonas. Seu desenvolvimento e disseminação são fortemente influenciados por fatores ambientais, como umidade, temperatura e vento

(Cordeiro, 2006). Esta é na atualidade, a mais grave doença da bananeira, implicando em aumento significativo de perdas, que podem chegar a 100% onde o controle não é realizado. Onde essa doença é introduzida, a sigatoka-amarela perde sua importância, podendo desaparecer em cerca de três anos. Ataca severamente as variedades tradicionais de banana, incluindo as do tipo Prata e Cavendish (Cordeiro, 2006).

A Sigatoka-amarela, também conhecida por cercosporiose da bananeira ou mal de Sigatoka, tem por agente causal o fungo *Mycosphaerella musicola*, Leach (forma perfeita)/ *Pseudocercospora musae* (Zimm) Deighton (forma imperfeita) (Cordeiro, 1997; 2006; Ploetz e Pegg, 2000). A doença foi observada pela primeira vez na Ilha de Java, em 1902, tendo sua primeira ocorrência de importância na Ilha de Fiji, em 1913. No Brasil, seu primeiro relato foi em 1944, no Amazonas (Kimati e Galli, 1980), local com chuvas frequentes e temperaturas acima de 25°C. Em condições ideais, os prejuízos causados pelo patógeno podem chegar a 100%, uma vez que os frutos produzidos sem nenhum controle da doença não apresentam valor comercial. Ocorre morte precoce das folhas e enfraquecimento da planta, com diminuição do número de pencas por cacho, redução do tamanho e maturação precoce dos frutos e perfilhamento lento (Cordeiro, 2006).

Conhecida por mal-do-Panamá ou murcha-de-fusário, a doença causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Sn e Hansen é disseminada principalmente por contato dos sistemas radiculares de plantas saudáveis com esporos liberados no solo junto a plantas doentes e, em muitas áreas, o uso de material de plantio contaminado. O fungo também é disseminado por água, pelo homem, animais e equipamentos agrícolas contaminados (Cordeiro, 2006). O fungo sobrevive no solo por longos períodos na ausência do hospedeiro, fato que provavelmente se deve à formação de estruturas de resistência (clamidósporos) (Cordeiro e Matos, 2000). Em variedades altamente suscetíveis, como a banana ‘Maçã’, provoca perdas de 100% na produção. Já nas variedades tipo ‘Prata’, que apresentam um grau de suscetibilidade bem menor do que a ‘Maçã’, a doença causa em torno de 20% de perdas (Cordeiro, 2006).

Doenças de etiologia bacteriana também têm provocado sérias perdas na cultura da banana. No Brasil, a presença do moko ou murcha bacteriana é conhecida desde 1976 (Tokeshi e Duarte, 1976) e, atualmente se encontra em todos os Estados da região Norte, com exceção do Acre. Em Sergipe e Alagoas vem sendo mantida sob controle mediante erradicação dos focos que têm surgido periodicamente. A doença é causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi *et al.*, 1995 raça 2. A disseminação é feita por material propagativo contaminado, pelo uso de ferramentas contaminadas,

ocorrendo também transmissão de raiz para raiz ou do solo para a raiz. Insetos como abelhas (*Trigona* spp.), vespas (*Polybia* spp.) e mosca-das-frutas (*Drosophyla* sp.), visitantes de inflorescência, são outros veículos de disseminação.

Outra doença bacteriana de menor expressão é a podridão mole, causada por *Pectobacterium carotovorum* (Jones, 1901) Waldee, 1945 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Bergey *et al.* 1923). As plantas afetadas por essa doença entram em colapso devido à murcha seguida de podridão causada pela bactéria (Cordeiro, 2006).

A bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* (Dagnachew e Bradbury) Dye, 1978 agente causal da murcha bacteriana da banana, que teve seu primeiro relato na Etiópia, ataca o sistema vascular das bananeiras causando murcha e morte. Diversos campos foram completamente destruídos, causando elevadas perdas econômicas na África. Estudos indicam que a doença se espalha rapidamente no campo e afeta todas as variedades de banana (Mwebaze *et al.*, 2006). Esta bactéria ainda não foi relatada no Brasil, portanto medidas devem ser tomadas na tentativa de evitar a introdução da bactéria no país.

A cultura é afetada pelos vírus: *Banana streak virus* (BSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Banana bunchy top virus* (BBTV). O primeiro é transmitido por cochonilha e mudas infectadas, enquanto a transmissão do segundo é realizada por afídeos. O CMV está presente nas principais áreas produtoras de banana, inclusive no Brasil, podendo provocar perdas elevadas em plantios novos, especialmente quando eles são estabelecidos em áreas com elevada incidência de trapoeraba (*Commelina diffusa*) e alta população de pulgões (Ploetz *et al.*, 2003; Cordeiro, 2006).

A bananeira é hospedeira de várias espécies importantes de nematoides. Os nematoides constituem o maior problema na produção de banana no Caribe e o segundo maior na África e América Latina, sendo superado apenas pela Sigatoka negra (Persley e De Langhe, 1987; Pinochet, 1992; Fogain e Gowen, 1997).

As espécies de nematoides mais importantes são aquelas envolvidas na destruição das raízes primárias, danificando o sistema de fixação e resultando em tombamento das plantas (Gowen e Quénéhervé, 1990). Os mais citados são: o nematoide cavernícola (*Radopholus similis* Cobb, (1983) Thorne), o nematoide espiralado, *H. multicinctus*, o nematoide de lesões (*Pratylenchus coffeae* (Zimmermann, 1898) Filipjev e Schuurmans Stekhoven, 1941; o nematoide de galha (*Meloidogyne* spp.) e o nematoide reniforme (*Rotylenchulus reniformis* Linford e Oliveira, 1940). Até o momento, várias outras

espécies de 43 gêneros já foram encontradas associadas à cultura (Gowen e Quénéhervé, 1990).

Segundo Zem e Lordello (1983), os nematoides cavernícola e espiralado são considerados fatores limitantes à produção de banana em várias partes do mundo, apresentando oneroso e difícil controle. *Radopholus similis* se destaca quanto aos danos causados e pela sua ampla distribuição nas principais regiões produtoras de banana do mundo (Vilardebo, 1981; Tarté e Pinochet, 1981; Zem, 1982).

Quando há pouco inóculo, a presença do nematoide só é observada a longo prazo, quando as plantas apresentam redução na longevidade, queda no vigor, diminuição da produção com menor massa nos cachos. Com altas infestações, as plantas não se desenvolvem, as folhas ficam pequenas, o cacho não atinge a massa ideal, o sistema radicular apresenta-se pobre em raízes e as mesmas são curtas permitindo o tombamento da planta ocasionado por ventos fortes ou pela massa do cacho.

4. TAXONOMIA, MORFOLOGIA E BIOLOGIA DE *RADOPHOLUS SIMILIS*

O gênero *Radopholus* Thorne, 1949 pertence ao filo *Nematoda* Potts, 1932, à classe *Chromadorea* Inglis, 1983, à subclasse *Chromadoria* Pearce, 1942, à ordem *Rhabditida* Chitwood, 1933 à subordem *Tylenchina* (Thorne, 1949) Chitwood, 1950, à infraordem *Tylenchomorpha* De Ley e Blaxter, 2002, à superfamília *Tylenchoidea* Örley, 1880, à família *Pratylenchidae* Thorne, 1949, e à subfamília *Pratylenchinae* Thorne, 1949.

Etimologicamente, o nome genérico *Radopholus* surgiu do prefixo latino *radix* = raiz e do sufixo grego *philéin* = gostar. Este gênero foi criado para abrigar nematoides com aparência de *Pratylenchus*, Filipjev, 1934, mas com dois ovários (Sher, 1968). O fato das 23 espécies válidas de *Radopholus* terem sido encontradas na Oceania e em parte da Ásia, indica que o gênero teve sua origem na Australásia (Siddiqi, 2001). O nematoide *R. similis* foi detectado pela primeira vez nas ilhas Fiji em raízes de bananeiras. Segundo Cares e Andrade (2006) a rápida disseminação desse nematoide ao redor do mundo se deve ao trânsito de hospedeiras contaminadas. O nematoide se encontra na América Central, Norte e Sul, Ilhas do Pacífico e Caribe, Europa, Ásia, África e Austrália (Araya, 1995a). De todos os países produtores de banana, apenas Israel, as Ilhas Canárias, Chipre, China e Creta não documentaram sua presença (Gowen, 1977; Tarté, 1980; Román, 1986; Gowen e Quénéhervé, 1990; Araya, 1995a).

A ampla disseminação do patógeno se deve à troca da variedade ‘Gros Michel’ (suscetível ao mal do Panamá) por clones Cavendish (resistentes ao mal do Panamá, mas suscetíveis ao nematoide), no período de 1958 a 1970 (Blacke, 1972; López, 1976; Tarté *et al.*, 1981).

Radopholus similis apresenta uma longa lista de plantas hospedeiras entre espécies de interesse agrícola e ornamental, porém o maior impacto de seu parasitismo ocorre em bananeiras e citros (Cares e Andrade, 2006), sendo a espécie mais importante para a cultura da banana no mundo. No Brasil, em 1959 esse nematoide foi identificado pela primeira vez em mudas oriundas do litoral de São Paulo (Carvalho, 1959). Mais de 50 anos após esse relato, esse parasita ainda continua sendo disseminado para outras regiões produtoras de banana brasileiras.

É um nematoide endoparasita migratório, ou seja, penetra as raízes da hospedeira e migra pelos tecidos radiculares a nível de parênquima cortical, podendo chegar até o rizoma. O ato de migrar internamente nas raízes ocasiona a desintegração dos tecidos, formando cavidades. Assim se originou o nome comum do nematoide (nematoide cavernícola). Os tecidos necrosados, inicialmente de coloração parda, após a colonização de fungos, tornam-se enegrecidos e podem coalescer originando extensas necroses. Essa destruição do sistema radicular favorece o tombamento das plantas por ventos fortes ou pelo peso do cacho. Sintomas moderados, como prolongamento do ciclo vegetativo e redução do peso dos cachos podem ocorrer em plantas suscetíveis (Gowen e Quénehervé, 1990). Com a evolução desse processo, o parasita pode voltar ao solo à procura de novas raízes ou permanecer em pedaços de rizoma no campo. Sem alimento, ele pode sobreviver pouco menos do que seis meses com reservas de seu próprio organismo (Rossi, 2006).

Como *R. similis* é essencialmente um endoparasita, pode completar seu ciclo de vida no interior das raízes e qualquer fator que influencie o tamanho da população está diretamente relacionado a alterações na fisiologia da hospedeira (Gowen, 1979).

Em condições favoráveis, o nematoide pode produzir novas gerações em cerca de três semanas (Loos, 1962). Em temperaturas de 24 ° C, o ciclo biológico se completa em 21 dias, podendo haver variação de 20 a 25 dias (Sarah *et al.*, 1996) em decorrência de fatores ligados à planta hospedeira ou ao ambiente. A reprodução ocorre por anfigimixia (Van Weerdt, 1960; Rivas e Román, 1985) ou partenogênese (Brooks e Perry, 1962; Huettel e Dickson, 1981). A temperatura ótima de reprodução ocorre aos 30°C, sendo que abaixo de 16 °C e acima de 33 °C não é observada reprodução ou esta é reduzida (Fallas e Sarah, 1995; Sarah *et al.*, 1996; Elbadri, 2000). As fêmeas fazem a postura de quatro a

cinco ovos por dia num período de duas semanas. A eclosão de juvenis ocorre depois de cinco a sete dias em cultura de tecidos, e de sete a oito dias em raízes de bananeira (Costa, 2004).

Além das altas infestações de *R. similis* resultarem em baixa produção, frutos de pequeno peso e tombamento de plantas (Murray, 1980; Gowen, 1990), as lesões ocasionadas pelo nematoide nas raízes, também servem de porta de entrada para fungos patogênicos (Stover, 1966), os quais provavelmente aceleram a destruição dos tecidos. A destruição de raízes e rizomas por *R. similis* reduz a absorção de água e nutrientes minerais, enfraquecendo o sistema radicular e aumentando a suscetibilidade da planta ao tombamento, especialmente de plantas que estão produzindo frutos (Pinochet e Ventura, 1977; Gowen, 1979). Como consequência do parasitismo, há redução da produção, pouca resposta à fertilização, proliferação de plantas filhas raquíticas e maior suscetibilidade da planta a outros patógenos de solo e a estresses abióticos (Araya *et al.*, 1995).

Perdas mundiais atribuídas à ação *R. similis* foram estimadas em 19,7% da produção mundial de banana (Sasser e Freckman, 1987). Perdas drásticas devido à presença de *R. similis* foram relatadas por Rajendran *et al.* (1979) na Índia. Na Colômbia (Gómez, 1980), foram relatadas perdas de 30 a 60%; no México (Román, 1986; Gomes, 1996), de até 68% e no Brasil, de 80 a 100% na cultivar Nanicão (AAA) (Zem e Alves, 1981). Em alguns estudos são relatadas perdas de 12,5 ton/ha/ano (O'Bannon, 1977; MacGowan, 1977) a 18 ton/ha/ano (Román, 1986).

5. TAXONOMIA, MORFOLOGIA E BIOLOGIA DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA*

O nematoide de galhas radiculares do gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1887 pertence à família Meloidogynidae Skarbilovich, 1959 é um nematoide que esta mundialmente distribuído infectando muitas culturas economicamente importantes. As espécies mais encontradas associadas com banananeiras são *M. incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949, *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949, e *M. hapla* Chitwood, 1949 (Stoffelen *et al.*, 2000).

No Brasil as espécies de *Meloidogyne* que ocorrem com mais frequência em lugares onde se cultivam banana são *M. incognita* e *M. javanica* (Cofcewicz *et al.* (2001).

No ciclo de vida do nematoide a fase infectante corresponde ao juvenil de segundo estágio. O juvenil de *Meloidogyne* penetra nas proximidades da ponta da raiz, migrando intercelularmente pelo córtex até a ponta da raiz (Wyss *et al.*, 1992), em seguida volta a migrar até a zona de alongação da raiz então, estabelece um sítio de alimentação no parênquima vascular. O sítio de alimentação é constituído de células nutritoras hipertrofiadas, denominadas células gigantes multinucleadas que conectam-se às células vizinhas e delas recebem os solutos e fotoassimilados produzidos pela planta (Huang, 1969). Paralelo ao processo de hipertrofia celular, o nematoide induz a hiperplasia de células parenquimáticas do córtex e do cilindro vascular, levando ao desenvolvimento das galhas radiculares (Christie, 1936).

Feito isso, o juvenil torna-se sedentário, passando por três ecdises até atingir a fase adulta. Os ovos que a fêmea lança para o exterior da raiz permanecem unidos por meio de uma matriz gelatinosa secretada pela própria fêmea durante a oviposição.

Os danos causados pelos nematoides das galhas nos cultivos de banana são diretamente proporcionais ao aumento das populações (Cordeiro, 1999).

As plantas parasitadas apresentam redução do crescimento e atraso no florescimento. As margens das folhas se tornam ressecadas e fendilhadas e, os cachos produzidos são pequenos, com frutos subdesenvolvidos (Patel *et al.*, 1996).

O nematoide tem uma ampla gama de hospedeiras, especialmente em plantas dicotiledôneas, que estão normalmente presentes na maioria dos solos onde a banana é cultivada.

6. TAXONOMIA, MORFOLOGIA E BIOLOGIA DE *PRATYLENCHUS BRACHYURUS*

As espécies de *Pratylenchus* Filipjev, 1936 são comumente conhecidas como os nematoides das lesões radiculares devido aos sintomas na forma de lesões necróticas que causam nas raízes de seus hospedeiros (Godfrey, 1929; Tihohod, 1993). Esses nematoides são endoparasitas migradores de corpo fusiforme, cujo comprimento dos indivíduos adultos varia de 0,3 a 0,9 mm (Loof, 1991)

Os nematoides desse gênero ocupam o segundo lugar em importância econômica, sendo superados apenas pelas espécies do gênero *Meloidogyne* (Sasser e Freckman, 1987).

Algumas espécies de *Pratylenchus* têm ampla distribuição geográfica, tanto em países de clima tropical como temperados (Luc, 1987) e causam necroses em órgãos

subterrâneos em um grande número de culturas, tais como: soja, cana-de-açúcar, citros, café, milho, algodão, batata, banana e diversas ornamentais (Tenente *et al.*, 2002).

Apesar da espécie *P. coffeae* ser a mais importante e mais comumente encontrada na cultura da banana, no Brasil é comum encontrar a espécie *Pratylenchus brachyurus* parasitando raízes de bananeiras. Cavalcante e colaboradores (2002) relataram a espécie *P. brachyurus* parasitando bananeira no estado do Acre. Esta espécie também foi encontrada associada a bananeiras em alguns municípios dos estados de Minas Gerais, Ceará e Pernambuco (Souza *et al.*, 1999).

7. MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE NEMATOIDES ENDOPARASITAS

Técnicas de multiplicação em massa de nematoides têm sido aplicadas a nematoides endoparasitas, como *Radopholus similis* e espécies de *Pratylenchus* com propósito experimental, para produção de inóculos, estudos biológicos e de diversidade, para manutenção de coleções e estudos de mecanismos de reprodução (Boisseau e Sarah, 2008).

Culturas monoxênicas de nematoides em plântulas, raízes excisadas ou calos vegetais, são métodos tradicionais de multiplicação e manutenção de fitonematoides em condições estéreis (Castro e Ferraz, 1989), mas a técnica mais utilizada até o momento por diversos autores com resultados satisfatórios é a multiplicação de nematoides e discos de cenoura (Fallas e Sarah, 1994; De Waele e Elsen, 2001; Costa, 2004; Van den Bergh, 2005; Gonzaga, 2006; Boisseau e Sarah, 2008). A técnica de multiplicação de nematoides axenicamente em discos de cenoura foi primeiramente descrita por O'Bannon e Taylor em 1968 e, a partir daí, essa técnica vem sendo utilizada e modificada na tentativa de melhorar a sua eficiência. Moody *et al.*, (1973) foram os primeiros a modificar a está técnica, aumentando a quantidade de discos de cenoura em frascos de vidros com ausência de água, e também obtiveram bons resultados. Mas de acordo com este autor a não adições de um meio de cultura, para manutenção da umidade no ambiente de multiplicação, reduz a longevidade dos discos de cenoura, o que pode influenciar na multiplicação dos nematoides.

Gonzaga *et al.*, 2006 introduziram modificações nessa técnica e também alcançaram sucesso na multiplicação de *Pratylenchus* spp. *in vitro*. Em vez de discos de cenoura, foram utilizados cilindros de cenoura individuais de, aproximadamente, 30 mm de

comprimento por 15 mm de diâmetro, retirados da porção central das raízes, sem adição de qualquer meio, e melhoraram o processo de axenização.

Costa, (2004) utilizando um método semelhante, desenvolvido por Marc Boisseau, conforme Villain (2000), com o uso de cilindros de cenoura e meio ágar-água teve bons resultados na multiplicação de *Radopholus similis*.

No entanto, a busca pela otimização e aumento de eficiência para multiplicação em massa de nematoides *in vitro*, ainda tem ocorrido.

8. VARIABILIDADE GENÉTICA DE NEMATOIDES

Em cada ecossistema a diversidade dos fatores bióticos e abióticos condiciona a evolução das populações de nematoides. Intensos cultivos agrícolas e o uso de novas cultivares resistentes contribuem para a pressão de seleção e aceleram o fenômeno da evolução das populações de nematoides (Costa, 2004).

Depois dos relatos de diversidade biológica dos nematoides (Ritzema Bos, 1888), outras informações se acumularam principalmente em relação aos nematoides sedentários dos gêneros *Heterodera*, *Globodera* e *Meloidogyne* (Sturhan, 1971; Dropkin, 1988) e mais tarde a outras espécies, por exemplo, *Ditylenchus dipsaci* (Janssen, 1994). A variabilidade na virulência e capacidade de reprodução de fitonematoides em diferentes hospedeiros é bem documentada (Hartman e Sasser, 1985; Riggs, 1991; Griffin, 1993).

A diversidade biológica entre populações de nematoides têm sido demonstrada por estudos morfológicos, citogenéticos, gama de hospedeiras, reprodução e potencial de danos (Fogain e Gowen, 1995; Elbadri, 2000).

Triantaphyllou (1987) sugeriu que o termo “biótipo” fosse utilizado para caracterizar nematoides em função de suas capacidades parasíticas. Já o termo “raça” é utilizado para populações que diferenciam nas características morfológica, ecológicas, fisiológicas e principalmente na sua gama de hospedeiras (Sturhan, 1971).

Diferenças quanto à virulência e capacidade de reprodução de *R. similis* tem sugerido a existência de diferentes biótipos na espécie. Diversos relatos de diferenciação entre diferentes populações quanto à capacidade reprodutiva e agressividade têm ocorrido (Riggs, 1991; Pinochet, 1979; Koshy e Jasy, 1991; Elbadri, 2000; Costa, 2004), sendo que uma população pode se reproduzir de maneira diferenciada em várias plantas da mesma espécie e, diferentes populações podem mostrar diferentes níveis de virulência e danos a diferentes hospedeiras ou a uma mesma hospedeira.

Espécies de *Meloidogyne*, por exemplo, são conhecidas pela sua alta variabilidade genética, sendo que algumas espécies são altamente polífagas, com mais de 300 espécies de hospedeiros (Trudgill e Blok, 2001) enquanto outras têm uma gama de hospedeiras restrita.

A resistência de plantas é atualmente o método de controle mais eficiente e ambientalmente seguro contra nematoides, entretanto, o conhecimento da variabilidade genética dos nematoides fitoparasitas é essencial para os programas de melhoramento se tornarem mais efetivos (Hahn *et al.*, 1994).

9. PRÁTICAS DE CONTROLE DE NEMATOIDES EM BANANEIRAS

Um dos métodos mais eficiente e utilizado de controle disponível, são os nematicidas, mas estes apresentam alto custo e são muito tóxicos. Além disso, podem contribuir para alterações na comunidade microbiana do solo, do pH do solo, contaminação do ambiente, incluindo lençóis freáticos (Peoples *et al.*, 1980; Zaki *et al.*, 1982; Wixted *et al.*, 1987; Davies *et al.*, 1991; Araya, 1995b; Daneel *et al.*, 1998).

Geralmente, uma única medida de controle não é suficiente para controlar os nematoides. Sugere-se então, a integração de diferentes métodos de controle para que o produtor possa chegar a um manejo sustentável dos nematoides em sua plantação (Robinson *et al.*, 1998). Apesar da recomendação de diversas medidas de controle, o manejo integrado geralmente é executado apenas por produtores mais tecnificados. A maioria dos pequenos produtores não utiliza esse tipo de manejo, tanto pela falta de informações básicas sobre como aplicar a tecnologia, quanto pela falta de recursos financeiros para utilizá-las (Fogain, 2001).

Visando um manejo integrado de nematoides adequado, deve-se reduzir o inóculo no solo ou no material de propagação antes do plantio, ou promover o desenvolvimento saudável e vigoroso da raiz (Robinson *et al.*, 1998). Ao buscar reduzir o inóculo no solo antes do plantio, o uso de solo virgem se torna o cenário ideal para o plantio. Caso o solo já esteja infestado, técnicas como o pousio, a rotação de culturas e a remoção de restos culturais auxiliam na tentativa de retirar possíveis fontes de alimento dos nematoides.

Existem relatos de sobrevivência de *R. similis* em tecido do rizoma por períodos superiores a seis meses (Stanton, 1994). Alguns estudos mostram que solos infestados submetidos a pousio por 06 a 12 meses, mantidos livres de hospedeiras, apresentaram redução considerável de populações de *R. similis* (Fogain *et al.*, 1998). Na África do Sul,

pousio de 10 meses não evitou reinfecção de plantas, apesar de não se detectar o nematoide em amostras de solo (Keetch *et al.*, 1975). Resultados semelhantes foram obtidos no Panamá, onde um período de 18 meses de pousio não erradicou *R. similis* (Salas *et al.*, 1976). É certo que hospedeiras alternativas devem ser evitadas por no mínimo um ano. Apesar de levar apenas à redução do inóculo, um decréscimo no nível de infestação proporciona a redução do número de aplicações de nematicidas e recuperação mais lenta da população do nematoide (Sarah, 1983).

A longevidade de *P. brachyurus*, em solos de pousio, pode chegar até a 21 meses em determinadas situações (Tihohod, 1993).

O material propagativo é uma das mais importantes fontes de disseminação de nematoides. Rizomas limpos e desinfestados são recomendados para garantir que os nematoides não sejam introduzidos no campo. Em plantações comerciais, os rizomas podem ser submetidos ao escalpamento e mergulhados em uma mistura nematicida antes do plantio. Outros métodos como tratamento com água quente para desinfecção do material propagativo não são comumente adotados pelos produtores. Em plantações de pequena escala, os produtores simplesmente limpam o material e nenhum outro tratamento é feito antes do plantio (Fogain, 2001).

Material de plantio proveniente de cultura de tecidos é totalmente livre de nematoides. Quando plantas provenientes de cultura de tecido são usadas após o pousio, populações muito pequenas de *R. similis* são recuperadas dois anos após o plantio. Isso se deve ao fato de que quando a população inicial é muito pequena, leva mais tempo para aumentar sua população até ultrapassar o nível de dano econômico (Fogain, 2001). No entanto, é essencial que este material seja plantado em solo livre do patógeno. Em solo já infestado, o uso de mudas oriundas de cultura de tecidos deve ser evitado, por que as plantas, apesar de vigorosas, não têm reservas para superar danos radiculares severos logo após o plantio. Neste caso, torna-se mais conveniente utilizar rizomas escalpelados, inspecionando o tecido do rizoma em busca de lesões que indiquem a presença do nematoide. É um método fácil e de baixo custo, apesar de que rizomas aparentemente limpos não são uma garantia de que não estejam infectados (Fogain, 2001; Robinson *et al.*, 1998).

O tratamento por solarização se mostra mais eficaz se feito juntamente com o escalpamento. Mbwana e Seshu-Reddy (1995) submeteram rizomas de bananeiras a tratamento com solarização e observaram a presença de *Pratylenchus goodeyi* Sher e Allen, 1953 após 650 dias de crescimento. Em plantas que foram apenas submetidas à

escalpeamento, haviam 5.027 *P. goodeyi* por 100 g de raízes, enquanto que em plantas que não foram submetidas ao escalpeamento haviam 29.767 *P. goodeyi* / 100 g de raiz. Quando estes rizomas foram também submetidos à solarização, a contagem foi de apenas 542 *P. goodeyi* / 100 g de raízes. Isso indica o efeito benéfico do uso integrado dos dois tratamentos. O tratamento do material propagativo com água quente também pode eliminar os nematoides sem prejudicar o rizoma. Essa prática, associada ao uso de fertilizantes aumenta significativamente a produção (Mbwana e Seshu-Reddy, 1995).

Segundo Musabyimana e Saxena (1999), o uso de torta de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) a 100 g por rizoma no plantio, a 4 e a 8 meses após o plantio, reduziu a incidência de *P. goodeyi* Sher e Allen, 1953 e *M. javanica* em níveis similares aos encontrados quando se aplica Furadan.

Um solo bem preparado promove o desenvolvimento de raízes em maior número e tamanho, quando comparado a solos compactados. Segundo Quénéhervé (1988), solos com altos níveis de matéria orgânica apresentam menor população de *R. similis*, enquanto o contrário ocorre com *H. multicinctus*. O uso de esterco ajuda a reduzir o nível populacional de nematoides fitoparasitas a longo prazo, mas grandes quantidades são necessárias para que haja a expressão de propriedades nematicidas. Como efeito secundário, observa-se o aumento do vigor da raiz. A alta quantidade de nitrogênio presente em esterco, principalmente de aves, parece inibir os nematoides e estimular a microbiota, a qual reduz, indiretamente, a densidade populacional de nematoides (Quénéhervé, 1988).

Segundo Daneel *et al.* (1998), o uso de cobertura morta (“mulching”) pode auxiliar as plantas a se tornarem mais fortes e saudáveis, se tornando mais tolerantes a nematoides e outros fatores de estresse. Também pode auxiliar a reconstrução de um ambiente natural para a planta, reduzindo significativamente o número de nematoides. O uso de cobertura aumenta a matéria orgânica do solo, bem como melhora sua estrutura e a infiltração de água, reduzindo as flutuações de temperatura, o crescimento de plantas daninhas, a erosão do solo pelo vento e pela água, a compactação do solo e a perda de água por evaporação; além de promover um crescimento vigoroso das raízes.

A adição de matéria orgânica ao solo pode reduzir a doença causada por *Meloidogyne* de duas formas: diretamente, alterando as propriedades do solo e indiretamente, melhorando o desenvolvimento da planta, alterando a fisiologia da raiz, aumentando a população de microorganismos antagonistas e induzindo resistência à doença (Van Loon *et al.*, 1998).

Em plantações comerciais, nematicidas são utilizados sistematicamente em plantios antigos. Em locais de plantio recente, as populações de nematoides são monitoradas mensalmente e as aplicações de nematicidas são efetuadas somente quando as populações de *R. similis* são maiores que 7000 indivíduos /100g de raiz (Fogain *et al.*, 1996). No entanto, segundo Davide (1985), populações de 1000; 2000 e 3000 nematoides por planta reduziram o peso dos frutos em 14,3%; 40,3%; 60%, respectivamente.

Vários princípios nematicidas estão disponíveis (aldicarb, fosthiazate, terbufós, carbofuran, fenamifos, ethoprophos) (Fogain *et al.*, 1996), sendo que existem relatos de incremento na produção variando de 5 a 263%, quando houve aplicação de nematicidas para controle de diversas espécies de nematoides em *Musa* AAA em diferentes países (Araya, 1995a). No entanto, não existe um nematicida ideal que deveria exercer um efeito sistêmico, ser absorvido pela folhagem e transportado pelo floema até o sistema radicular em concentrações suficientes que ocasionassem a eliminação dos nematoides ao redor das raízes do cultivo, protegendo a planta por um longo período, sendo os nematoides controlados em todos os seus estados morfológicos (Johnson, 1985; Johnson e Feldmesser, 1987). A atividade dos nematicidas disponíveis é grandemente afetada pelas condições físico-químicas do solo, condições climáticas e outros pesticidas (Schmitt e Nelson, 1987), com um efeito residual geralmente curto, inferior a 90 dias em condições tropicais (Araya, 1995b).

Na década de 1980, produtores e pesquisadores perceberam que houve uma redução na eficácia de fenamifos (Sarah, 1989), quando este era o único produto aplicado por certo período de tempo. Estudos mostraram o surgimento de microrganismos especializados capazes de realizar rápida degradação deste princípio ativo em solos tratados por longos períodos por este composto (Anderson, 1988). O mesmo fenômeno também foi observado com carbofuran em outras culturas (Felsot *et al.*, 1982; Harris *et al.*, 1984; Read, 1987). A ocorrência de degradação biológica de nematicidas também foi observada por Stirling *et al.* (1992) e Davis *et al.* (1993). Isso mostra a importância da rotação de produtos químicos em produções de grande escala de banana (Anderson, 1988; Sarah, 1989).

Atualmente, a tendência global na produção agrícola é a manutenção ou melhoria dos rendimentos com uso mais eficiente dos recursos e conservação do meio ambiente (Araya *et al.*, 1995). Como a maioria dos produtores não aplica as estratégias de manejo integrado e, considerando o alto custo do controle de nematoides a partir do uso de produtos químicos, a resistência da planta hospedeira certamente trará grande benefício a

partir de um pequeno investimento. Desde 1989, mais de 200 acessos de diferentes grupos genômicos tem sido estudados pelo CRBP (Centre de Recherches Régionales sur Bananiers et Plantains) em busca de fontes de resistência e baixa suscetibilidade a *R. similis*. Os resultados indicaram que todas as plantas pertencentes ao grupo Cavendish são suscetíveis aos nematoides (Fogain 1998b). ‘Yangambi Km5’, clones do subgrupo Ibota, um clone do subgrupo Pisang Jarí Buaya e um clone diplóide, Kunnan (*Musa* AB) (Costa, 2004) comportaram-se como resistentes a *R. similis*. ‘Selangor’, ‘Calcutta 4’ e a maioria das cultivares de *Musa balbisiana* são significativamente menos suscetíveis que as do subgrupo Cavendish.

No caso da resistência a *Meloidogyne*, nenhuma fonte de resistência foi encontrada em 26 acessos de banana do Vietnã, oriundos do genoma AA, AAA, AAB, ABB e AB, além de alguns acessos selvagens (Van den Bergh *et al.*, 2002a). No entanto já existem relatos de resistência a *Meloidogyne* em genótipos de banana. Em trabalho realizado por Costa *et al.* (1998) todas as cultivares avaliadas se comportaram como moderadamente resistentes, se diferenciando da cultivar Nanicão. Em outro trabalho realizado por Teixeira (2007), os clones 5854-03, Birmanie, 4279-06, Pisang Nangka e Jaran se comportaram como resistentes a *M. incognita*. Neste mesmo trabalho os acessos 4279-06 e Birmanie foram considerados resistentes a *M. arenaria* e Pisang Nangka e Jaran, resistentes a *M. incognita* e *M. javanica*.

Em trabalho realizado por Quénéhervé e colaboradores (2009) dos seis híbridos avaliados para a resistência a *P. coffeae*, todos os seis reduziram a taxa de infecção de 75% (FB921) para 96% (FB920) em relação a ‘Gran Enano’.

Apesar de encontrarmos alguns relatos de fontes de resistência em *Musa* a nematoides, poucos são os relatos de tolerância, principalmente em condições de campo. Viaene *et al.* (2003) avaliando 28 genótipos de *Musa* quanto à resistência e tolerância a *R. similis*, identificaram uma fonte de tolerância, o genótipo FHIA-03. Hartman *et al.* (2010) ao avaliar parâmetros de crescimento e dano em 24 genótipos de bananeira em condições de campo quanto a reação a *R. similis* e *H. multicinctus* verificaram que “Bobby Tannap” e “TMP x 6930-1” são relativamente tolerantes a *R. similis*, já que estes acessos apesar de apresentarem danos relativamente altos não tiveram grandes perdas de produtividade. Alguns tetraploides (*Musa* AAAA) apresentaram alguma tolerância no campo (Gowen, 1976, 1993). Sob condições de campo, os diploides “Vennettu Kunnan” e “Then Kunnan”, e o triploide “Karpooravelli” foram classificados como tolerantes (Janarthani *et al.*, 2005).

Em relação a fontes de tolerância às espécies de *Pratylenchus* e *Meloidogyne*, os relatos ainda são menos comuns. Pinochet *et al.* (1998) relataram o híbrido FHIA-01 com tolerante a *P. goodeyi*.

Recentemente, alguns trabalhos foram realizados na tentativa de padronizar e criar formas mais efetivas de avaliação de bananeiras em condições de campo (Speijer e De Waele, 1997; Moens *et al.*, 2001; Gaidashova *et al.*, 2008; Hartman *et al.*, 2010), tendo verificado que a densidade populacional de nematoides, os danos nas raízes e produção são bons indicadores de tolerância a nematoides. No entanto, devido aos custos e consumo de tempo elevado, os testes em vasos são preferidos em detrimento dos experimentos de campo, tanto para avaliar resistência quanto tolerância (Stanton, 1999).

10. MELHORAMENTO GENÉTICO DA BANANEIRA

A resistência genética obtida pelo melhoramento é uma forma eficiente, barata e ecologicamente correta de controle de nematoides. Os altos custos das aplicações de nematicidas e as conseqüências negativas que resultam do acúmulo de resíduos no ambiente somada aos perigos de manter culturas importantes como a banana em uma base genética reduzida, são razões suficientes para encorajar a busca por fontes de resistência e ações de melhoramento genético (Gowen, 1979).

Embora exista um grande número de cultivares, a baixa produtividade dos clones, bem como a falta de resistência a fatores bióticos e abióticos adversos constituem os maiores entraves da bananicultura no país (Silva *et al.*, 1999). Sabe-se que em todo o mundo a cultura da banana tem enfrentado uma série de problemas relacionados a patógenos e pragas, para os quais, na ausência de variedades resistentes, o uso de pesticidas é a única forma de controle (Frison *et al.*, 1997).

Em se tratando do controle de nematoides, a busca de resistência genética é talvez o tema de pesquisa mais complexo. A complexidade genética da banana constitui provavelmente o maior obstáculo para a produção de cultivares resistentes (Stover e Buddenhagen, 1986; Pinochet, 1988).

Avanços obtidos no melhoramento genético têm demonstrado o potencial da hibridação no desenvolvimento de novas cultivares (Ortiz *et al.*, 1998). Assim, híbridos tetraplóides promissores têm sido obtidos a partir do cruzamento de um genitor diplóide cultivado, melhorado ou selvagem, portador da característica de interesse, com uma cultivar triplóide estabelecida (Crouch *et al.*, 1999). Entretanto, no melhoramento genético,

os ganhos genéticos obtidos envolvendo manipulações poliplóides são altamente dependentes da utilização adequada dos recursos genéticos disponíveis (Ortiz *et al.*, 1998).

O melhoramento da bananeira foi iniciado em 1922 no Colégio Imperial de Agricultura Tropical, em Trinidad (Rowe, 1985; Dantas *et al.*, 1997), motivado pelo mal-do-Panamá (Shepherd, 1992). Após breve tentativa de melhorar as bananeiras nos anos 30, a United Fruit Company começou um programa de melhoramento genético da bananeira em Honduras, em 1959. Em 1984, esse programa foi doado à Fundação Hondurenha de Investigação Agrícola (FHIA). A partir de 1976 teve início uma série de coletas de germoplasma de banana em países asiáticos, com o objetivo de estabelecer um sistema de hibridação para o melhoramento da cultura. Em 1982, na Embrapa Mandioca e Fruticultura – CNPMF foi iniciado um programa de melhoramento genético da bananeira, tendo como objetivo a obtenção de variedades resistentes a pragas e doenças (Dantas *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 1998).

O pré-requisito básico dos programas de pesquisa objetivando produzir novas cultivares tem sido a formação, caracterização e avaliação de amplas coleções de germoplasma.

A principal coleção de germoplasma de banana (Banco Ativo de Germoplasma – BAG) no Brasil está instalada na Embrapa - CNPMF, tendo sido enriquecida e ampliada mediante coletas em âmbito nacional e internacional. Esse BAG inclui espécies e subespécies silvestres, variedades, cultivares e híbridos que são mantidos sob condições de campo.

Na bananeira, a variabilidade genética de interesse se encontra entre as diversas formas selvagens da espécie *M. acuminata* e nas cultivares do grupo AA (Shepherd *et al.*, 1986). O objetivo do melhoramento do germoplasma AA é concentrar, em um mesmo genótipo, o maior número de características desejáveis, tais como partenocarpia, bom número de pencas, dedos compridos, cachos bem formados, resistência a pragas e patógenos, incluindo nematoides, para posteriormente tentar transferi-las aos tetraplóides (Dantas *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 1998).

Viaene *et al.* (1998), avaliando genótipos do programa de melhoramento da FHIA, identificaram cinco genótipos resistentes (SH-3142, SH-3362, SH-3723, SH-3624 e FHIA-18) e outros cinco parcialmente resistentes (SH-3437, SH-3648, FHIA-01, FHIA-01, FHIA-23) a *R. similis*. Em 1997, Fogain e Gowen, avaliando os danos radiculares em *Musa* confirmaram estudos anteriores (Fallas e Marbán-Mendoza, 1994) que mostravam resistência da cultivar Yangambi (AAA). (Wehunt *et al.*, 1978). Wehunt *et al.*, (1978)

avaliaram 64 diplóides experimentais e, de todos estes clones, os diplóides de ‘Pisang Jari Buaya’ (AA) mostraram-se os mais promissores para programas de inserção de resistência a *R. similis*. Um clone diplóide de Kunnan (AB) também se mostrou resistente ao nematoide (Collingborne e Gowen, 1997).

Diversos trabalhos (Davide e Marasigan, 1992; Patel *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 1997, 1998; Pinochet *et al.*, 1998; Van Den Bergh *et al.*, 2000, 2002a, 2002b; Stoffelen *et al.*, 2000; Almeida e Santos, 2002; Vilas Boas *et al.*, 2002; Cofcewicz *et al.*, 2004a,b; Guedira *et al.*, 2004; Moens *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2005) vêm sendo desenvolvidos visando a avaliação da resistência de genótipos de bananeira a *Meloidogyne* spp.

A ausência de sementes em plantios comerciais é uma consequência da inexistência de pólen viável ou, talvez, de polinizadores naturais eficientes. As cultivares que se apresentam sem sementes quando polinizadas, ou que as produzem em quantidades pequenas, podem ser tanto diplóides quanto triplóides. Sem dúvida, a ausência total de sementes está relacionada à intensa seleção humana contra a presença de sementes, e o estado triplóide por si só, provavelmente, não seja a causa principal da esterilidade feminina em bananeiras cultivadas (Shepherd *et al.*, 1986).

Uma vez estabelecida a fonte de resistência, o próximo passo é a incorporação de genes para a resistência em cultivares comerciais triplóides, e é um outro obstáculo (Pinochet, 1988). Efetua-se o melhoramento pela produção de gerações sucessivas de híbridos diplóides e pela seleção contínua dos melhores genótipos resultantes de todos os cruzamentos colocados em campo. São realizados cruzamentos, envolvendo espécies selvagens, cultivares e híbridos, visando a obtenção de parentais masculinos melhorados, os quais são utilizados no melhoramento de triplóides ou tetraplóides. Na prática, é importante que se disponha de acessos diplóides básicos com boa capacidade de combinação (Dantas *et al.*, 1997).

A fertilização de sacos embrionários com número cromossômico maternal duplicado pode conduzir a sementes viáveis, mas não a plantas úteis. A fertilização de sacos não reduzidos diplóides ou triplóides favorece a obtenção de resultados desejáveis em programas de hibridação, visando a novos genótipos triplóides ou tetraplóides, seja diretamente ou por cruzamentos secundários posteriores (Dantas *et al.*, 1997). Segundo estes autores, podem ser consideradas as quatro classes de hibridação a seguir: 1. Os triplóides resultantes de cruzamento de diplóides com diplóides, com a recombinação originária apenas do parental diplóide masculino. Foi dessa maneira que as cultivares triplóides supostamente evoluíram, sendo esta a principal opção para a produção artificial

de novas cultivares triplóides; 2. Os tetraplóides resultantes de cruzamentos de triplóides com diplóides, com a recombinação originária apenas do parental diplóide masculino. É importante ressaltar que o pólen contribui com apenas um quarto do novo genótipo, em cada fertilização deste tipo. Portanto, é basicamente um processo de implantação de características adicionais, sem provocar maiores alterações fenotípicas. Assim, o híbrido tetraplóide apresenta as características do parental feminino triplóide, inclusive aquelas relacionadas ao sabor do fruto; 3. Os tetraplóides resultantes de cruzamentos entre tetraplóides, com segregação nos dois parentais; 4. Os triplóides resultantes de cruzamentos entre tetraplóides e diplóides, também com segregação nos dois parentais. Utilizando-se o pólen A de diplóides é freqüentemente possível obter bons rendimentos de sementes e, conseqüentemente, híbridos secundários triplóides.

Os resultados de um programa de melhoramento, independentemente dos seus objetivos (produção de triplóides ou tetraplóides), dependem basicamente da qualidade dos parentais diplóides utilizados na geração dos híbridos desejáveis, por seu papel fundamental na incorporação de características de valor agrônômico. Na prática, o germoplasma diplóide básico consiste de formas selvagens e cultivares férteis do grupo AA, abrangendo uma variabilidade útil muito grande, suficiente para satisfazer todos os objetivos atuais do melhoramento (Dantas *et al.*, 1997).

11. A VARIABILIDADE GENÉTICA DA BANANEIRA E USO DE MARCADORES MOLECULARES DE DNA

A variabilidade genética do germoplasma de *Musa* tem sido amplamente estudada. Inicialmente, a avaliação se baseava basicamente em descritores morfotaxonômicos, sendo que recentemente foram definidos 119 descritores como norma de descrição do germoplasma de *Musa* (Ipgri, 1999). Limitações para essa forma de avaliação são os fatores ambientais que influenciam as características vegetativas utilizadas nesses casos. Além disso, existem características de *Musa* que se expressam apenas na fase adulta. Dessa forma, os descritores morfotaxonômicos podem não refletir a real diversidade existente (Lima *et al.*, 2002).

No entanto, existem marcadores bioquímicos utilizados para identificação e classificação do germoplasma de *Musa*. Seu uso está até o momento limitado à identificação de clones e estimativa da variabilidade genética pelo grau de polimorfismo obtido (Gawel e Jarret, 1991; Carvalho, 1998).

Outros autores têm utilizado técnicas que possibilitam detectar melhor o polimorfismo do DNA, gerando grande número de marcadores moleculares para análises genéticas (Jeffreys *et al.*, 1985; Gawel e Jarret, 1991; Gawel *et al.*, 1992; Howell *et al.*, 1994; Kaemmer *et al.*, 1992; Fauré *et al.*, 1994; Pillay *et al.*, 2000; Creste *et al.*, 2003).

A técnica de RAPD vem sendo utilizada para caracterização de germoplasma. Por exemplo, Bhat e Jarret (1995), conseguiram diferenciar clones que se mostravam idênticos sob o ponto de vista morfológico. RAPD e SSR foi uma das técnicas utilizadas por Jesus *et al.* (2006) para diferenciação molecular de cultivares de banana. Gomes *et al.* (2005) utilizaram marcadores RAPD para correlacionar a diversidade existente em genótipos de bananeira e a resistência ao estresse salino. Dessa forma, observa-se a viabilidade em correlacionar a resposta de genótipos a condições de estresse com a caracterização molecular realizada por meio da técnica de RAPD e SSR. Santos e Colaboradores (2010) encontraram uma alta variabilidade entre 26 acessos de bananeira, por meio marcadores RAPD.

Os marcadores moleculares, além de serem utilizados para os estudos de diversidade, podem ser utilizados para outras finalidades com a obtenção de mapas genéticos (Carrel, 1999; Lagoda, 1999) e identificação de marcadores úteis na seleção indireta de características de interesse (Milach, 1998).

A obtenção de populações segregantes pode ser utilizada para a validação de marcadores moleculares, RAPD ou SSR, ao correlacionar os marcadores encontrados em parentais resistentes com esta população. Diferentes populações segregantes de bananeira já existem (ou estão em andamento) com diferentes níveis de acessibilidade. Entretanto poucas populações segregantes estão disponíveis para estudar a resistência a nematoides. Um população segregante foi obtida para estudar a resistência a *R. similis*, a partir do cruzamento dos híbridos diploides TMB2 x 6142-1 e TMB2 x 8075-7 (Dochez *et al.*, 2009). Há um grande interesse por parte do CIRAD (Station of Neufchâteau in Guadeloupe) à obtenção de populações segregantes resultantes de *M.acuminata pahang* (AA) x Pisang Jari Buaya (AA) e *M.acuminata pahang* (AA) x Yangambi Km5 (AA) (INIBAP, 2002). Atualmente, no Brasil, a Embrapa Mandioca e Fruticultura têm tentado obter um população segregante resultante do cruzamento de parentais resistentes e suscetíveis a *R. similis* e espécies de *Meloidogyne* (Edson P. Amorin, informação Pessoal).

12. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

As plantas desenvolveram sofisticados mecanismos de defesa contra patógenos. Os mecanismos das interações entre planta-patógenos já são conhecidos, porém pouco se sabe sobre estas interações em nível molecular (Cordeiro e Sá, 1999).

A resistência genética da planta está associada à reação de incompatibilidade entre a planta e o patógeno. Porém, um problema comumente encontrado diz respeito ao fato dos patógenos de plantas poderem evoluir para quebrar a resistência total ou para erodir a resistência parcial. A evolução das populações de patógenos depende de mutações, recombinações, alterações nas frequências alélicas, do fluxo gênico e da pressão de seleção exercida pelo hospedeiro (Carlier, 2003).

A resistência raça-específica ou vertical é baseado na hipótese gene-a-gene. A hipótese define que a planta possui um gene de resistência (R gene) e o patógeno possui um gene de avirulência (Avr gene). Quando os dois, planta e patógeno, entram em contato, acontece um reconhecimento do produto do R gene pelo produto do gene Avr. Nesse caso, o R gene funciona como um receptor que é induzido ao receber um sinal externo (o patógeno tentando atacar a planta), liberando uma cascata de sinais que são transduzidos para que se obtenha uma resposta de defesa (Flor, 1971).

Essa resposta pode ser local, havendo uma reação de hipersensibilidade (HR) no qual ocorre a morte programada de células no local da infecção. Nesta interação, o patógeno, ao penetrar o tecido da planta, dispara as respostas de defesa do hospedeiro, que, ativadas rápida e intensamente, impedem a multiplicação do patógeno evitando assim a doença (Vantini *et al.*, 2008). Um evento no início desta reação de hipersensibilidade é a geração de superóxido (O_2^-) e acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em uma explosão oxidativa produzindo *Reactive Oxygen Intermediates* (ROIs), isto é, espécies ativas de oxigênio (Fang, 1997), que juntamente com a produção de óxido nítrico (NO), desempenham um papel chave na ativação dos mecanismos de resistência a doenças em animais e plantas (Delledonne *et al.*, 2001). A ativação da explosão oxidativa na HR vegetal é parte de um sistema altamente amplificado e integrado de sinalização que envolve também o ácido salicílico (AS) e descargas de Ca^{2+} citosólico para desencadear mecanismos de defesa (Lamb e Dixon, 1997). Ocorre também no processo a produção de fenóis, espessamento da parede celular da planta, acúmulo de fitohormônios, etileno e ácido jasmônico (JA), formação de fitoalexinas e indução de expressão de proteínas relacionadas à defesa que limitam a colonização de tecidos vegetais e impedem a

manifestação da doença (Hammond-Kosak e Jones, 2003).

Esses eventos podem posteriormente desencadear uma resposta generalizada com longa duração, prolongando-a de forma sistêmica e atuando mesmo longe do local da infecção (SAR - Resistência Sistêmica Adquirida).

Já a resistência raça-não-específica ou horizontal, é controlada por vários genes. Por ter vários genes envolvidos na produção de respostas de defesa, pode-se dizer que a resistência raça-não-específica é poligênica ou multigênica, sendo possível que ela seja mais durável pela menor probabilidade do patógeno quebrar a resistência (Nelson, 1971). Assim, esse mecanismo de resistência é considerado de fundamental importância para o melhorista.

A desvantagem desse tipo de resistência está associada à dificuldade em se transferi-la de um genótipo para outro, pois a probabilidade de transferência de todos os alelos desejáveis a partir de um genótipo resistente para um suscetível é baixa, quando um grande número de alelos está envolvido. Atualmente tem-se utilizado a seleção por meio de marcadores moleculares, visando a identificação de genes de resistência, portanto sendo mais fácil (Gonçalves-Vidigal e Poletine, 1999).

A resistência de não hospedeiro é provavelmente, a resistência mais comum e durável de todas as citadas anteriormente. Isso decorre do fato de alguns patógenos possuírem afinidades por determinadas plantas em detrimento de outras. Em comparação com a raça-específica, o entendimento da resistência não hospedeiro é menos completo. Este tipo de resistência é conhecida por ser dependente de múltiplos componentes celulares que compreendem além de outros fatores, pré-barreiras (síntese de peptídios, proteínas e metabólitos secundários, que restringem a infecção por patógenos induzindo mecanismos de defesa) (Heath, 2000).

Certo número de moléculas de sinalização, como etileno, ácido salicílico, ácido jasmônico, induzidos por proteínas quinases, estão também ligadas a resistência de não hospedeira. R-genes são também conhecidos por estar envolvidos neste tipo de resistência à doença (Kang *et al.*, 2003).

Os genes de resistência identificados até o momento são de cinco famílias de genes de resistência a estresses bióticos em plantas (Martin *et al.*, 2003). Estes genes geralmente possuem como produto aminoácidos ou estruturas protéicas com motivos bem conservados, fatores que podem se tornar uma importante ferramenta para a biotecnologia auxiliando em estudos de doenças em diferentes plantas, porém provocadas pelo mesmo patógeno.

As famílias de genes de resistência identificados em *Musa* são pertencentes às classes (NBS-LRR), (RLP), (RLK), (Ser/Thr quinase) e (CC ancorado à membrana) (Miller *et al.*, 2008). Sendo que a família NBS-LRR: sítio de ligação a nucleotídeo (NBS) e domínios ricos em repetições de leucina (LRR) é a maior e mais importante família de R genes, pois todos os integrantes dessa família estão relacionados de alguma forma à resistência. A maioria dos genes clonados até hoje ligados à resistência estão incluídos nessa família, pois grande parte desses genes codificam proteínas NBS-LRR. A explicação se dá pelo fato de se acreditar que o domínio NBS seja importante na ligação de ATP e GTP e esteja atuando na transdução de sinais (Ellis e Jones, 1998; Van der Biezen e Jones 1998) e o LRR no reconhecimento do patógeno por meio da interação do produto do gene Avr com o produto do R gene. Então dessa forma, os dois agindo juntos, como um complexo bem coordenado traz grande eficácia na defesa das plantas contra as doenças mais importantes. Muitos estudos têm sido elaborados em torno desta família de proteínas, pois a sua única função conhecida está relacionada à resistência (Dangl e Jones, 2001; Meyers *et al.* 2005).

Foram identificados até hoje cerca de 150 genes da família NBS-LRR em *Arabidopsis thaliana* e mais de 400 em *Oryza sativa* (Meyers *et al.*, 2003). O domínio NBS compreende dois tipos de subclasses, conhecidos como TIR (Toll interleucine receptor) NBS ou Não-TIR NBS, baseados em aminoácidos localizados no N-terminal que mostram homologia com domínios de sinalização intracelular de drosófila (Toll) e uma interleucina (IL) basal de mamíferos (Parker *et al.*, 1997). O receptor Toll controla a resposta imune a bactérias gram-positivas e fungos através da ativação de uma via de sinalização. O grupo TIR está presente em dicotiledôneas, enquanto o grupo não-TIR ocorre tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas. O NBS também pode estar ligado a um CC (cauda espiralada) no N-terminal ou então pode estar ligado a um motivo TIR no N-terminal e um NLS e WRKY no C-terminal.

O domínio LRR pode estar envolvido predominantemente na regulação de interações intermoleculares.

13. GENOMICA DE MUSA

Os avanços obtidos na área da biologia molecular, com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante na década de 70, abriram novas possibilidades na área de biotecnologia. Esses avanços possibilitaram o desenvolvimento de bibliotecas de BAC

para ambos os genomas A e B de banana (Emediato, 2009).

Os estudos de genômica em *Musa* têm conseguido diversos avanços através das pesquisas em citogenética molecular, identificação de marcadores moleculares, construção de mapas físico e genético, elucidação sobre os genes e sua expressão, bancos de dados de ESTs, análise de BACs e RGAs (Emediato, 2009).

Em *Musa*, uma série de estudos tem relatado a expressão gênica durante a interação patógeno-hospedeiro (por exemplo, van den Berg *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2004). A análise de bibliotecas de cDNA através do sequenciamento dos ESTs correspondentes (expressed sequence tags), que são porções que representam parte das regiões transcritas do genoma em determinadas condições é uma ferramenta utilizada para identificar os genes que estão sendo expressos em determinado organismo ou sob determinada condição fisiológica. Esse método permite a identificação de genes de interesse (como genes envolvidos na resistência no caso de interação planta-patógeno).

Atualmente, 23.060 BAC ends de *M. acuminata* 'DH Pahang' estão em processo de sequenciamento. Esse sequenciamento completo do genoma da banana representará um enorme recurso para o estudo do genoma de *Musa*.

Miller *et al.* (2008) tem utilizado sequências ortólogas conservadas (COS), identificadas por meio de *primers* degenerados, para a identificação de genes envolvidos na resistência à estresses bióticos. Este trabalho representa a primeira análise em grande escala de diversidade de RGAs em *M. acuminata* Calcutta 4 e oferece uma estratégia para o desenho de *primers* para RGAs/NBS-LRR.

Vários genes de resistência a nematoides (Nem-R) têm sido isolados de plantas, todos conferindo resistência contra nematoides endoparasitas sedentários. O primeiro gene de resistência a nematoide clonado foi o *Hs1^{pro-1}* da beterraba, o qual confere resistência ao nematoide do cisto da beterraba (*Heterodera schachtii*) (Cai *et al.*, 1997, Thureau *et al.*, 2003). A proteína codificada não tem similaridade com genes de plantas conhecidos. Entretanto, outro Nem-R genes clonado definitivamente se assemelhava a R-genes de plantas já conhecidos. Quatro desses genes, *Mi-1*, *Hero A*, *Gpa2* and *Gro1-4*, todos clonados de tomate ou batata, encontram-se dentro da classe de R-genes NBS-LRR. Os genes de tomate *Mi-1* e *Hero A* conferem resistência contra varias espécies de nematoides das galhas e contra alguns patótipos do nematoide de cisto da batata, respectivamente (Vos *et al.*, 1998; Ernst *et al.*, 2002). Por outro lado, os genes *Gpa2* e *Gro1-4* conferem resistência limitada a patótipos de *Globodera pallida* (Stone) e *Globodera rostochiensis* em batata.

Nem-R genes também incluem membros das classes de R-gens que codificam proteínas com domínios LRR extracelular. Em soja, análises genéticas determinaram que dois locus, *Rhg1* e *Rhg4*, condicionavam resistência a *Heterodera glycines* (Meksem *et al.*, 2001). Os genes candidatos de *Rhg1* e *Rhg4* foram clonados e ambos codificam proteínas com LRRs extracelulares, um domínio transmembrana e um domínio citosólico ser/thr kinase, estruturalmente semelhantes ao gene *Xa21* de arroz (Hauge *et al.*, 2001).

Numerosos RGAs pertencentes à família NBS-LRR foram recentemente caracterizados em diversas cultivares dos genomas A e B de *Musa* (Azhar e Heslop-Harrison, 2008). Pei *et al.* (2007), também ampliou esta busca na família non-TIR NBS em espécies selvagens de *Musa*, utilizando *primers* previamente publicados. Miller *et al.* (2008) utilizaram sequências conservadas, identificadas por *primers* degenerados, como marcadores para a identificação de genes envolvidos na resistência a estresses bióticos.

Em relação à expressão de genes de resistência em espécies de bananeiras cinco genes candidatos de resistência (RGCs) foram avaliados por RT-PCR em folhas e raízes de plantas de bananeira resistentes e suscetíveis a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* raça 4. Desses cinco RGCs, a expressão do gene RGC2 foi associada apenas às plantas resistentes (Peraza-Echeverria *et al.*, 2008). Mais seis pares de *primers* específicos foram analisados por qPCR e foram expressos em *Musa*. Todos os genes testados foram encontrados sendo expressos em diferentes tecidos de *M. balbisiana*, indicando que vários membros de um mesmo cluster de genes de resistência (RGA08) são expressos e são potencialmente funcionais (Baurens *et al.*, 2010).

Após a obtenção das sequências completas e confirmação da função, genes candidatos poderão ser utilizados para o melhoramento de *Musa*, seja com o desenvolvimento de marcadores moleculares para seleção assistida, ou para a transformação genética de cultivares suscetíveis. Alguns trabalhos que envolvem a transformação genética de espécies de *Musa* já foram realizados. Pei *et al.* (2005) transformaram plantas de banana para expressarem o produto do gene humano da Lisozima para obter resistência ao mal do Panamá e verificaram que 24 de 51 plantas transgênicas em vaso se mantiveram saudáveis, enquanto plantas não transformadas desenvolveram sintomas. Vishnevetsky *et al.* (2011) obtiveram plantas de 'Grande Naine' tolerantes a *Mycosphaerella fijiensis* e a *Botrytis cinerea* ao transformá-las para expressarem endoquitinase (ThEn-42) de *Trichoderma harzianum* junto com o gene da estilbeno sintase de uva (StSy). Em relação a planta de *Musa* transgênica para o controle de nematoides, plantas transformadas para expressar a proteína cistatina de arroz tiveram níveis de

resistência a *R. similis* em torno de 70% em relação as plantas controle (Atkinson *et al.*, 2004).

14. RESPOSTAS DE RESISTÊNCIA DE BANANEIRAS A NEMATOIDES

A resistência de plantas a nematoides fitoparasitas envolvem barreiras físicas e químicas, que estão constitutivamente presentes ou são induzidos pela infecção (Giebel, 1982).

Após a penetração, os nematoides podem ser afetados por compostos tóxicos já presentes nos tecidos das plantas (resistência bioquímica pré-formada). Correlação positiva entre teores de compostos fenólicos e a resistência a nematoides são relatadas (Huang, 1985; Trudgill, 1991; Appel, 1993).

Além dos fenóis, várias classes de compostos com propriedades nematicidas vêm sendo divulgadas, por exemplo, ácidos graxos, terpenóides, alcaloides, isoflavanóides (Chitwood, 1993; Baldrige *et al.*, 1998). As plantas sintetizam uma grande variedade de compostos pré-infeccionais e pós-infeccionais que agem contra os nematoides (Giebel, 1974; Mace e Howell, 1974; Luis, 1998). Poucas cultivares de banana têm sido investigadas quanto às reações bioquímicas das plantas a nematoides e, na maioria dos estudos envolvem testes não específicos para fenóis.

Em relação a mecanismos de resistência em banana contra *R. similis*, um grande número de células contendo compostos fenólicos foram encontradas em raízes de ‘Yangambi Km5’ e ‘Gros Michel’, mas não em cultivares suscetíveis (Mateille, 1994; Fogain e Gowen, 1996; Valette *et al.*, 1997). Um grande número de células com paredes lignificadas foram observadas na cultivar resistente Pisang Jari Buaya (Fogain e Gowen, 1996) e em Yangambi Km5 a resistência à penetração do cilindro vascular foi atribuída à extensiva presença de suberina na parede da endoderme (Valette *et al.*, 1997; 1998). Um grupo de fitoalexinas, incluindo as fenilfenalenonas foram identificadas em *M. acuminata* em resposta à infecção por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e *Mycosphaerella fijiensis* e ao nematoide *R. similis*. Cultivares resistentes de banana produzem a mesma família de compostos em grande quantidade (Luis, 1998; Binks *et al.*, 1997). Plantas de banana produzem outros compostos fenólicos em sementes e frutos tais como, taninos e 3,4 flavana-diol (Ali e Bhutani, 1993). Collingborne e colaboradores (2000) detectaram altos níveis de taninos e 3,4 flavana-diol na cultivar de bananeira Kunan, resistente a *R. similis*, antes e depois da infecção. Estudos preliminares sugerem que taninos também são

produzidos em raízes de bananeiras no campo e, podem em alta concentração, atuar na defesa da planta a nematoides (Kashaija, 1996).

Testes histoquímicos mostraram que compostos fenólicos pré-existent em raízes de bananeiras não constituem em reações de defesa constitutiva a *R. similis*, uma vez que plantas suscetíveis têm maior concentração do que plantas resistente, mas após a infecção há um maior acúmulo em plantas resistentes (Costa, 2004). Os testes histoquímicos realizados por este autor, também evidenciaram que taninos pré-existent aumentam em resposta à infecção, que células lignificadas e suberizadas constituem em resposta de defesa e, que a quantidade de ácido gálico conferiu maior resistência a plantas resistentes.

Wuyts e colaboradores (2007) também observaram que plantas resistentes apresentavam constitutivamente altos níveis de lignificação na parede do cilindro vascular e ácido ferúlico e seus ésteres no córtex e, que a lignificação também foi induzida no cilindro vascular. Compostos como a dopamina, catecolamina, e antocianidina foram encontrados em altas concentrações em raízes de plantas resistentes.

A resposta de resistência às espécies de *Pratylenchus* geralmente são similares, já que estes nematoides possuem a mesma forma de parasitismo de *R. similis*. O acúmulo de fenóis tem ocorrido em algumas espécies de plantas resistentes a *Pratylenchus* (Acedo e Rohde, 1971; Pi e Rohde, 1967).

No caso das espécies de *Meloidogyne* a resposta de resistência do hospedeiro, geralmente previne a formação do sítio de alimentação, ou pode causar a degeneração do sítio de alimentação em algum momento do início do seu desenvolvimento (Cook, 1991).

Respostas de reação de hipersensibilidade (HR), também são induzidas em plantas resistentes a nematoides, assim como a outros patógenos (Keen, 1990).

15. LITERATURA CITADA

- ACEDO, J.R. e ROHDE, R.A. Histochemical root pathology of *Brassica oleracea capitata* L. infected by *Pratylenchus penetrans* (Cobb) Filipjev e Schuurmans Stekhoven (Nematoda: Tylenchidae). *Journal of Nematology* 3: 62-68. 1971.
- ALI, M. e BHUTANI, K.K. Flavan-3,4-diols from *Musa sapientum* seeds. *Pharmazie* 48: 455-456. 1993.
- ALMEIDA, A. e SANTOS, N. Resistance and host-response of selected plants to *Meloidogyne megadora*. *Journal of Nematology* 34: 140 – 142. 2002.
- ANDERSON, J.P. Accelerated microbial degradation of nematicides and other plant protection chemicals. *Nematropica* 19:1. 1988.
- APPEL, H.M. Phenolics in ecological interactions: The importance of oxidation. *Journal Chemical Ecology* 17: 123-124. 1993.
- ARAYA, M. Efecto depresivo de ataques de *Radopholus similis* en banano (*Musa AAA*). *Corbana* 20: 3-6. 1995a.
- ARAYA, M. Reflexiones sobre el uso de nematicidas en banano (*Musa AAA*). *Corbana* 20: 67-73. 1995b.
- ARAYA, M; CENTENO, M. e CARILLO, W. Densidades poblacionales y frecuencia de los nematodos parasitos del banano (*Musa AAA*) em nueve cantones de Costa Rica. *Corbana* 20: 6-11. 1995.
- ATKINSON, H.J; GRIMWOOD, S., JOHNSTON, K e GREEN, J. Prototype demonstration of transgenic resistance to the nematode *Radopholus similis* conferred on banana by a cystatin. *Transgenic Research* 13: 135-142. 2004.
- AZHAR, M. e HESLOP-HARRISON, J.S. Genomes, diversity and resistance gene analogues in *Musa* species. *Cytogenetic Genome Resistance* 121: 59-66. 2008.
- BALDRIDGE, G.D; O'NEILL, N.R. e SAMAC, D.A. Alfafa (*Medicago sativa* L.) resistance to the root-lesion nematode *Pratylenchus penetrans*: defense-response gene

mRNA and isoflavonoid phytoalexin levels in roots. *Plant Molecular Biology* 38: 999-1010. 1998.

BAURENS, F.C.; BOCS, S.; ROUARD, M.; MATSUMOTO, T.; MILLER, R.; RODIER-GOUD, M.; MBEGUIE-A-MBEGUIE, D. e YAHIAOUI, N. Mechanisms of haplotype divergence at the RGA08 nucleotide-binding leucine-rich repeat gene locus in wild banana (*Musa balbisiana*). *BMC Plant Biology*. 10: 149. 2010.

BHAT, K. V. e JARRET, R.L. Random amplified polymorphic DNA and genetic diversity in Indian *Musa* germplasm. *Genetic Resources and Crops Evolution* 42: 328-332. 1995.

BINKS, R.H.; GREENHAN, J.R.; LUIS, J.G.e GOWEN, S.R. A phytoalexin from roots of *Musa acuminata* var. *Pisang sipulu*. *Phytochemistry* 45: 47-49. 1997.

BLACKKE, C.D. Nematode diseases of banana plantations. In: WEBSTER, J. M. *Economic Nematology*, London, Academic Press, p. 245-267. 1972.

BOISSEAU, M. e SARAH, J.L. *In vitro* rearing of Pratylenchidae nematodes on carrot discs. *Fruits* 63: 307-310. 2008.

BROOKS, T.L. e PERRY, V.G. Apparent parthenogenetic reproduction of the burrowing nematode *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. *Soil Crop Science of the Society of Florida* 22: 160-162. 1962.

CAI, D.; KLEINE, M.; KIFLE, S.; HARLOFF, H.-J.; SANDAL, N.N.; MARKER, K.A.; KLEIN-LANKHORST, R.M.; SALENTIJN, E.M.J; LANGE, W.; STIEKEMA, W.J.; WYSS, U.; GRUNDLER, F.M.W. e JUNG, C. positional cloning of gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* 275: 832-834. 1997.

CARREL, F. Genome mapping and genetic analysis of the black leaf streak resistance in bananas. *Infomusa* 8: 20-22. 1999.

CARES, J.E. e ANDRADE, E.P. Taxonomia do gênero *Radopholus*. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 14: 113 – 149. 2006.

CARLIER, J.; HAYDEN, H.; RIVAS, G.; ZAPATER, M.F.; ABADIE, C. e AITKEN, E. Genetic differentiation in *Mycosphaerella* leaf pathogens. In: WORKSHOP ON MYCOSPHAERELLA LEAF SPOT DISEASE HELD IN SAN JOSE, 2002, Costa Rica.

Mycosphaerella leaf spot disease of bananas: present status and outlook. Montpellier: INIBAP, p. 123-29. 2003.

CARVALHO, J.C. O nematoide cavernícola e seu aparecimento em São Paulo. O Biológico 25: 195 – 198. 1959.

CARVALHO, R.I.N. Variabilidade em plantas jovens de aceroleira propagadas por semente. Agropecuária Catarinense 11: 16 – 18. 1998.

CASTRO, M.E.A. e FERRAZ, S. Multiplicação ‘in vitro’ de *Pratylenchus brachyurus*, *P. zae*, *Radopholus similis* e *Tylenchorhynchus* sp. em discos de cenoura. Nematologia Brasileira 13: 31-38. 1989.

CAVALCANTE M.J.B.; SHARMA, R.D; VALENTIM, J.F. e GONDIM, T.M.S. Nematoides associados ao amendoim forrageiro e a bananeira no estado do Acre. Fitopatologia Brasileira 27: 107. 2002.

CHEESMAN E. E. Classification of the bananas. II. The genus *Musa* L. *Kew Bulletin* 2: 106-117. 1947.

CHITWOOD, D.J. Naturally occurring nematicides. ACS Symp. Ser. 524: 300-315. 1993.

CHRISTIE, J. The development of root knot nematode galls. *Phytopathology* 26: 1-22. 1936.

COFCEWICZ, E.T.; CARNEIRO, R.M.D.G.; CASTAGNOCE SERENO, P e QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotype and genetic diversity of root-knot nematodes parasitizing *Musa* in Brazil. *Nematology* 6: 85-95. 2004a.

COFCEWICZ, E.T.; CARNEIRO, R.M.D.G; CORDEIRO, C.M.T.; QUÉNÉHERVÉ, P. e FARIA, J.L.C. Reação de cultivares de bananeira a diferentes espécies de nematoides das galhas. *Nematologia Brasileira* 28: 11-22. 2004b.

COFCEWICZ, E.T.; CARNEIRO, R.M.D.G.; QUÉNÉHERVÉ, P.; AUGUSTIN, E. e FARIA, J.L.C. Ocorrência de *Meloidogyne* spp. em áreas produtoras de banana no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 23., 2001. Anais... Piracicaba: FAEF. p. 112. 2001.

COLLINGBORNE, F.M.B. e GOWEN, S.R. Screening of banana cultivars for resistance to *Radopholus similis* and *Pratylenchus coffeae*. INTERNATIONAL NETWORK FOR IMPROVEMENT IN BANANAS AND PLANTAINS. Montpellier: InfoMusa 6: 3. 1997.

COLLINGBORNE, F.M.B.; GOWEN, S.R. e MUELLER-HARVEY, I. Investigations into the biochemical basis for nematode resistance in roots of three *Musa* cultivars in response to *Radopholus similis* infection. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 5297-5301. 2000.

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

CORDEIRO, M.C.R e SÁ, M.F.G. Biotecnologia e resistência a patógenos. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento 10: 34-39.1999.

CORDEIRO, Z.J.M. Doenças da bananeira. In ZAMBOLIN, L. e MONTEIRO, A.J.A. (Eds.) 3º ENCONTRO DE FITOPATOLOGIA. UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. p. 145. 1999.

CORDEIRO, Z.J.M. Sistema de produção de banana para o Estado do Pará. <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaPara/doencas.htm>. Consultado em Outubro de 2006.

CORDEIRO, Z.J.M. Doenças. In: ALVES, E.J. (Ed.). A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. Brasília: Embrapa, cap. 13, p. 353-398. 1997.

CORDEIRO, Z.J.M. e MATOS, A.P. Doenças. In: CORDEIRO, Z.J.M. (Ed.) Banana produção: aspectos técnicos. Embrapa, Brasília. p. 106. 2000.

COSTA, D. da C. Variabilidade patogênica e genética de *Radopholus similis* em bananeira no Brasil. Tese (Doutorado). Universidade de Brasília, Brasília. 2004.

COSTA, D. da C.; SILVA, S. de O. e ALVES, F.R. Reação de genótipos de bananeira (*Musa* sp.) a *Radopholus similis* e *Meloidogyne incognita*. Nematologia Brasileira 22: 49 – 56. 1998.

COSTA, D. da C.; SILVA, S. de O.; ALVES, F.R. e SANTOS, A. do C. Avaliação de danos e perdas à bananeira cv. Nanica causadas por *Meloidogyne incognita* na região de Petrolina – PE. Nematologia Brasileira 21: 21. 1997.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; SILVA, S.O. e FIGUEIRA, A. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. Euphytica 132:259-268. 2003.

CROUCH J.H.; CROUCH, H.K.; TENKOUANO, A. e ORTIZ, R. VNTR-based diversity analysis of 2x and 4x full-sib *Musa* hybrids. Electronic Journal of Biotechnology 2: 99-108. 1999.

DANEEL, M.; DE JAGER, K. e DE BEER, Z. IPM for nematodes on bananas in South Africa. 1998. In: FRISON, E.A.; GOLD, C.S.; KARAMURA, E.B. e SIKORA, R.A. (Eds). Mobilizing IPM for sustainable banana production in Africa. Inibap. 1998.

DANIELLS, J.; JENNY, C.; KARAMURA, D. e TOMEKPE, K. Diversity in the genus *Musa*. Musalogue: a catalogue of *Musa* germplasm. International Improvement of Banana and Plantain. 2001.

DANGL, J.L. e JONES, J.D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature 411(6839):826-833. 2001.

DANTAS, J.L.L.; SHEPHERD, K.; SILVA, S. O. e SOARES-FILHO, W.S. Classificação botânica, origem, evolução e distribuição geográfica. In: ALVES, E.J. (Ed.). A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. Brasília: Embrapa, cap. 1, p. 27-34. 1997.

DAVIDE, R.G. Studies on the population dynamics of nematodes in relation to yield loss of banana and evaluation of banana varieties for nematode resistance. Research Bulletin (Filipinas) 40: 1-26. 1985.

DAVIDE, R.G. e MARASIGAN, L.Q. Yield loss assessment and evaluations of resistance of banana cultivars to the nematodes *Radopholus similis* and *Meloidogyne incognita*. In: DAVIDE, R.G. Studies on nematodes affecting bananas in the Philippines. Los Baños, Laguna: Philippine Agriculture and Resources Research Foundation 14 – 37: 79 - 93. 1992.

- DAVIES, K.G.; DE LEIJ, F.A.A.M. e KERRY, B.R. Microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes in tropical agriculture. TPM Special Review. Tropical Pest Management 37(4): 303-320. 1991.
- DAVIS, R.F.; JOHNSON, A.W. e WAUCHOPE, R.D. Accelerated degradation of fenamiphos and its metabolites in soil previously treated with fenamiphos. Journal of Nematology 25(4): 679-685. 1993.
- DELLEDONNE, M.; ZEIER, J.; MAROCCO, A. e LAMB, C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98: 13454-13459. 2001
- DE LANGHE, E. Banana and plantain: The earliest Fruit crops? In: Inibap annual report 1995. Inibap: Montpellier. p. 6-8. 1996.
- DE WAELE, D. e ELSEN, A. Recent developments in *Musa* nematology research: Establishment of aseptic culture systems of *Radopholus similis* for *in vitro* host-pathogen studies. Advancing banana and plantain ReD in Asia and the Pacific 10: 24-27. 2001.
- DROPKIN, V. The concept of race in phytonematology. Annual reviews of phytopathology 26: 145-161. 1988.
- ELBADRI, G. A. Diversity of *Radopholus similis* (Cobb, 1893) (Nematoda: Tylenchida). 146 p. Thesis. Faculty of Sciences, University of Gent, Belgium. 2000.
- ELLIS, J. e JONES, D. Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogen resistance in plants. Current Opinion in Plant Biology 1: 288-293. 1998.
- EMEDIATO, F.L. Caracterização de genes análogos de resistência (RGAs) em cultivares de *Musa acuminata* contrastantes em resistência à estresses bióticos. Dissertação de Mestrado. Universidade Católica de Brasília. 95p. 2009.
- ERNST, K.; KUMAR, A.; KRISELEIT, D.; KLOOS, D.U. e PHILLIPS, M.S. The broad-spectrum potato cyst nematode resistance gene (Hero) from tomato is the only member of a large gene family of NBS-LRR genes with an unusual amino acid repeat in the LRR region. The Plant Journal 31: 127-136. 2002.

FALLAS, G. e MARBÁN-MENDOZA, N. Respuesta de tres cultivares y un híbrido de *Musa* a *Radopholus similis* en Costa Rica. *Nematropica* 24: 161-164. 1994.

FALLAS, G.A. e SARAH, J.L. Effect of temperatures of seven *Radopholus similis* isolates from different banana producing zones of the world. *Fundamental and Applied Nematology* 18: 445-449. 1995.

FALLAS, G.A. e SARAH, J.L. Effect of storage temperature on the *in vitro* reproduction of *Radopholus similis*. *Nematropica* 24: 175-177. 1994.

FANG, F.C. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *The Journal of Clinical Investigation* 99: 2818-2825. 1997.

FAO. Agricultural Data – FAOSTAT, 2007. Visualizado em Dezembro de 2006. Online. Disponível na Internet. <http://www.fao.org>.

FAO. Agricultural Data – FAOSTAT, 2008. Visualizado em Dezembro de 2006. Online. Disponível na Internet. <http://www.fao.org>

FAURÉ, S.; NOYER, J.L.; CARREEL, F.; HORRY, J. P.; BAKRY, F. e LANAUD, C. Maternal inheritance of chloroplast genome and paternal inheritance of mitochondrial genome in banana (*Musa acuminata*). *Curr. Genet.* 25: 265-269. 1994.

FELSOT, A.; WILSON, J.G.; KUHLMAN, D.E. e STEFFEY, K.E. Rapid dissipation of carbofuran as a limiting factor in corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) control in fields with histories of continuous carbofuran use. *Journal of Economic Entomology* 75: 1098-1103. 1982.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9: 75-296. 1971.

FOGAIN, R. Nematodes and weevil of bananas and plantains in Cameroon: occurrence, importance and host susceptibility. *International Journal of Pest Management*.47:201-205. 2001.

FOGAIN, R.; ACHARD, R.; KWA, M.; FERRIER, P. e SARAH, J.L. Lutte contre les nematodes des bananiers: evaluation de quelques nématicides. *Fruits* 51: 151-161. 1996.

- FOGAIN, R. e GOWEN, S.R. Damage to roots of *Musa* cultivars by *Radopholus similis* with and without protection of nematicides. *Nematropica* 27: 27-32. 1997.
- FOGAIN, R. e GOWEN, S.R. Pathogenicity on maize and banana among isolates of *Radopholus similis* from four producing countries of Africa and Asia. *Fruits* 50: 5-9. 1995.
- FOGAIN, R. e GOWEN, S.R. Investigations on possible mechanisms of resistance to nematodes in *Musa*. *Euphytica* 92: 375-381. 1996.
- FOGAIN, R.; FOURÉ, E. e ABADIE, C. Root disease complex of bananas and plantains in Cameroon. *Proceedings of the International Seminar on Plantain Production*. p. 168 – 176. 1998.
- FRISON, E.A.; ORJEDA, G. e SHARROCK, S.L (Eds). *Promusa: a global programme for Musa improvement*. Montpellier: Inibap. 64 p. 1997.
- GAIDASHOVA, S.V.; UWIMPUHWE, B. e KARAMURA, E.B. Identification of banana varieties with resistance to nematodes in Rwanda. *Afr. Crop Sci. J.* 16: 27-33. 2008.
- GAWEL, N. e JARRET, R. L. Cytoplasm diversity in bananas and plantains. *Euphytica* 52: 19 -23. 1991.
- GAWEL, N.J.; JARRET, R.L. e WHITTEMORE, A.P. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) - based phylogenetic analysis of *Musa*. *Theoretical and Applied Genetics* 84: 286-290. 1992.
- GIEBEL, J. Biochemical mechanisms of plant resistance to nematodes: a review. *Journal of Nematology*. 6: 175-184. 1974.
- GIEBEL, J. Mechanisms of resistance to plant nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 20: 275 – 279. 1982.
- GOMES, J.T. Dispersion and level of root infestation by the ‘burrowing nematode *Radopholus similis* Cobb’ in some banana plantations of El Oro province, Ecuador. In: XII Acobat Meeting. 1996. Abstract. Santo Domingo: Junta Agroempresarial Dominicana. p. 88. 1996.

GOMES, E.W.F.; WILLADINO, L.; MARTINS, L.S.S.; SILVA, S. De O. e CÂMARA, T.R. Variabilidade genética de genótipos de bananeira (*Musa* spp.) submetidos ao estresse salino. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 9: 171 – 177. 2005.

GÓMEZ, T.J. Determinación de la infestación de fitonematodos em plantaciones bananeras de Urabá. Colômbia. *Fitopatologia Colombiana* 9: 1932. 1980.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C. e POLETINE, J.P. Resistência às doenças. In: DESTRO, D (Ed.). *Melhoramento Genético de Plantas*, p.820. 1999.

GONZAGA, V. Caracterização morfológica, morfométrica e multiplicação in vitro das seis espécies mais comuns de *Pratylenchus* Filipjev, 1936 que ocorrem no Brasil. Tese (Doutorado). UNESP, Jaboticabal, SP. 2006.

GOWEN, S.R. Yield losses caused by nematodes to different banana varieties and some management techniques appropriate for farmers in Africa. In: *Biological and integrated control of highland banana and plantain pests and diseases. Proceedings of a Research Coordination Meeting*. GOLD, C.S. e GEMMIL, B. (Eds.), pp. 199 – 208. Cotonou, Benin. 1993.

GOWEN, S.R. Some considerations of problems associated with the nematode pests of bananas. *Nematropica* 9: 79-91. 1979.

GOWEN, S. R. Los nematodos y su control. In: UPEB: *Seminário sobre identificación de las prioridades en la investigación del banano y plátano en Panamá*. Upeb, p. 50-56. 1977.

GOWEN, S.R. Varietal responses and prospect for breeding nematode resistant banana varieties. *Nematropica* 6:45–49. 1976.

GOWEN, S.R. *Bananas and plantains*. Chapman and Hall, Londres. p. 434-467. 1990.

GOWEN, S.P. e QUÉNÉHERVÉ, P. Nematode parasites of bananas and abaca. In: LUC, M.; SIKORA, R.A. e BRIDGE, J. (Eds). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. C.A.B. International. Wallingford, U. K. p. 431 – 460. 1990.

GRIFFIN, G.D. Comparative response of alfafa to *Pratylenchus penetrans* populations. *Journal of Nematology* 25: 461-465. 1993.

GUEDIRA, A.; RAMMAH, A.; TRIQUI, Z.; CHLYAH, H.; CLYAH, B. e HAICOUR, R. Évaluation de la résistance à deux nematodes: *Radopholus similis* et *Meloidogyne* spp. Chez quatre genotypes de bananiers au Maroc. CR Biologies 327: 745-751. 2004.

HAHN, M.L.; BURROWS, P.R.; GNANAPRAGASAM, N.C.; BRIDGE, J.; VINES, N.J. e WRIGHT, D.J. Molecular diversity amongst *Radopholus similis* populations from Sri Lanka detected by RAPD analysis. Fundamental and Applied Nematology 17: 275-281. 1994.

HAMMOND-KOSACK, K.E. e JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48: 575-607. 2003.

HARRIS, C.R.; CHAPMAN, R.A.; HARRIS, C. e TU, C.M. Biodegradation of pesticides in soil: rapid induction of carbamate degrading factors after carbofuran treatment. Journal of Environmental Science Health B19: 1-11. 1984.

HARTMAN, J.B.; VUYLSTEKE, D.; SPEIJER, P.R.; SSANGO, F.; COYNE, D.L. e DE WAELE, D. Measurement of the field response of *Musa* genotypes to *Radopholus similis* and *Helicotylenchus multincinctus* and the implications for nematode resistance breeding. Euphytica 172: 139-148. 2010.

HARTMAN, K.M. e SASSER, J.N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal patterns morphology. In: BARKER, K.R.; CARTER, C.C. e SASSER, J.N. (Eds.). An advanced treatise on *Meloidogyne*: Raleigh, NCSU e USAID Coop. p. 69 – 77. 1985.

HAUGE, B.M.; WANG, M.L.; PARSONS, J.D. e PARNELL, L.D. Nucleic acid molecules and other molecules associated with soybean cyst nematode resistance. WO 01/51627 PCT/US01/00552 Patent # 20030005491. 2001.

HEATH, M.C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. Current Opinion Plant Biology. 3:315-319. 2000.

HOWELL, E.C.; NEWBURY, H.J.; SWENNEN, R.L.; WITHERS, L.A. e FORD-LLOYD, B.V. The use of RAPD for identifying and classifying *Musa* germplasm genome 37: 328-332. 1994.

HUANG, C.S. e MAGGENTI, A.R. Mitotic aberrations and nuclear changes of developing giant cells in *Vicia faba* caused by root knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Phytopathology* 59: 447-455.1969.

HUANG, J. S. Mechanisms of resistance to root-knot nematodes. In: SASSER, J.N.; CARTER, C.C. (Eds.). An advanced treatise on *Meloidogyne*. Vol I – Biology and Control. Raleigh North Carolina State University Press, USA. p.165-174. 1985.

HUETTEL, R.N. e DICKSON, D.W. Karyology and oogenesis of *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. *Journal of Nematology* 13: 16 -19. 1981.

IBGE. Produção Agrícola Municipal. Rio de Janeiro. Disponível: site. IBGE. <http://www.ibge.gov.br>. Consultado em Janeiro de 2011. 2009.

INIBAP. International network for the improvement of banana and plantain. Banana diversity. October, 2004.

INIBAP. The Global Musa Genomics Consortium. A strategy for the Global Musa Genomics Consortium. Report of a meeting held in Arlington, USA, 17-20 July 2001. The International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France. 2002.

IPGRI. (Online). Descriptors for banana (*Musa* spp.). Homepage: http://bananas.bioversityinternational.org/files/files/pdf/publications/descriptors_en.pdf. 1999.

JANARTHANI, D.; SOORIANATHASUNDARAM, K.; POOMIMA, K. e KUMAR, N. Screening of certain banana accessions against *Radopholus similis* under field conditions. *Nematologia Mediterranea* 33: 139-143. 2005.

JANSSEN, G.J.W. The relevance of races in *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) Filipjev, the stem nematode. *Fundamental and Applied Nematology*.17: 469-473. 1994.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V. e THEIN, S.L. Hipervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73. 1985.

- JESUS, O.N.; CÂMARA, T.R.; FERREIRA, C.F.; SILVA, S.O.; PESTANA, K.N. e SOARES, T.L. Diferenciação molecular de cultivares elites de bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41: 1739-1748. 2006.
- JOHNSON, A. W. The role of nematicides in nematode management. In: SASSER, J. N. e CARTER, C. C. (Eds.). *An advanced treatise on Meloidogyne*. Vol I – Biology and Control. Raleigh North Carolina State University Press, USA. p. 249-267. 1985.
- JOHNSON, A.W. e FELDMESSER, J. Nematicides – a historical review. In: VEECH, J. A. e DICKSON, D. W. (Eds.). *Vistas on Nematology*. p. 448 – 454. Society of Nematologists, Inc, USA. 1987.
- JONES, D.R. *Diseases of banana, abaca and enset*. CABI Publishing. Wallingford, Oxon, UK. 544p. 2000.
- KAEMMER, D.; AFZA, R.; WEISING, K.; KAHL, G.; FRANTISEK, J. e NOVAK, F.J. Oligonucleotide and amplification fingerprinting of wild species and cultivars of banana (*Musa* spp.). *Biotechnology Techniques* 10: 1030 – 1035. 1992.
- KANG, L.; LI, J.; ZHAO, T.; XIAO, F.; TANG, X.; THILMONY, R.; HE, S. e ZHOU, J. Interplay of the *Arabidopsis* nonhost resistance gene NHO₁ with bacterial virulence. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 100: 3519-3524. 2003.
- KASHAIJA, I.N. Factors influencing nematode population densities and root damage on banana cultivars in Uganda. PhD Thesis, University of Reading. 242p. 1996.
- KEEN, N.T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Genetics*.24: 447-463. 1990.
- KEETCH, D.P.; REYNOLDS, R.E. e MITCHELL, J.A. The survival and vertical distribution of the burrowing eelworm in Natal banana soils. *The Citrus and Sub-tropical Fruit Journal* 493: 15 -17. 1975.
- KIMATI, H. e GALLI, F. Doenças da bananeira *Musa* spp. In: GALLI, F. *Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2. p. 87-101. 1980.

- KOSHY, P.K. e JASY, T. Host preference of the burrowing nematode *Radopholus similis* populations from India. *Indian Journal of Nematology* 21: 9-51. 1991.
- LAGODA, P. Mapping and genomics. The study of the Musaceae: mapping and genomics. *Infomusa* 8: 6-8. 1999.
- LAMB, C. e DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251-275. 1997.
- LIM, K.J.; TAN, S.H.; OTHMAN, Y.R. SUHAMI, N.; RAHA, A.R.; GURMIT, S.; HO, Y.W. Microarray analysis of gene expression using plants infected with *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. In: 1st International Congress on Musa. Harnessing Research to Improve Livelihoods. p. 31. 2004.
- LIMA, M. L.A.; GARCIA, A.A. F.; OLIVEIRA, M.K.M.; MATSUOKA, S.; ARIZONO, H.; SOUZA-JUNIOR, C. L. e SOUZA, A.P. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum* spp.). *Theoretical and Applied Genetics* 104: 30 – 38. 2002.
- LOOF, P.A.A. The family Pratylenchidae Thorne, 1949. In: NICKLE, W.R. (Ed). *Manual of agricultural nematology*. New York, NY, USA, Marcel Dekker, p. 363-421. 1991.
- LOOS, C.A. Studies on the life-history and habits of the burrowing nematode *Radopholus similis* the cause of black-head disease of banana. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 29: 3-52. 1962.
- LÓPEZ, R.J.A. Los nematodos parásitos del cultivo del banano, su ecología y control. *Augura* 2: 4-16. 1976.
- LUC, M. A reappraisal of Tylenchina (Nemata). 7. The family Pratylenchidae Thorne, 1949. *Revue de Nématologie* 10: 203-218. 1987.
- LUIS, J.G. Phenylphenalenone-type phytoalexins and phytoanticipins from susceptible and resistant cultivars of *Musa* species: its potential for engineering resistance to fungi and nematodes into banana. *Acta Hort. (ISHS)*. 490:425-432. 1998.
- MACE, M.E. e HOWELL, C.R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in roots of cotton seedlings. *Canadian Journal of Botany* 52: 2423-2426. 1974.

MACGOWAN, J.B. The burrowing nematode *Radopholus similis* (Cobb 1893) Thorne 1949. Fia. Dept. of Agric. e Consumer Service Division of Plant Industry Nematology circular n° 27. 2p. 1977.

MATEILLE, T. Comparative host tissue reactions of *Musa acuminata* (AAA group) cvs Poyo and Gros Michel roots to three banana-parasitic nematodes. *Annals of Applied Biology* 124: 65-73.1994.

MARTIN, G.B.; BOGDANOVA, A.J. e SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology* 54: 23-61. 2003.

MBWANA, A.S.S. e SESHU-REDDY, K.V. Solarisation equipment for treatment of banana planting material against endoparasitic phytonematodes. *Nematologia Mediterranea* 23: 195 -197. 1995.

MEKSEM, K.; PANTAZOPOULOS, P.; NJIT, V.N.; HYTEN, L.D.; RAO-ARELLI, A.P. e LIGHTFOOT, D.A. 'Forrest' resistance to the soybean cyst nematode is bigenic: saturation mapping of the Rhg1 and Rhg4 loci. *Theoretical Applied Genetics* 103: 710-717. 2001.

MEYERS, B.C.; KAUSHIK, S. e NANDETY R.S. Evolving disease resistance genes. *Current Opinion Plant Biology* 8: 129-134. 2005.

MEYERS, B.C.; KOZIK, A.; GRIEGO, A.; KUANG, H. e MICHELOMORE, R.W. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 15: 809–834. 2003.

MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA. Aplicações no melhoramento de plantas. Ed.Sandra Cristina Kothe Milach. Porto Alegre, 141p. 1998.

MILLER, R.N.G.; BERTIOLI, D.J.; BAURENS, F.C.; SANTOS, C.M.R.; ALVES, P.C.; MARTINS, N.F.; TOGAWA, R.C.; SOUZA JÚNIOR, M.T. e PAPPAS JÚNIOR, G.J. Analysis of non-TIR NBS-LRR resistance gene analogs in *Musa acuminata* Colla: Isolation, RFLP marker development, and physical mapping. *BMC Plant Biololgy* 8:1-15. 2008.

- MOENS, T.; ARAYA, M.; SWEENEN, R. e DE WAELE, D. Screening of *Musa* cultivar for resistance to *Helicotylenchus multicinctus*, *Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus coffeae* and *Radopholus similis*. *Australasian Plant Pathology* 34: 299-309. 2005.
- MOENS, T.A.S.; ARAYA, M. e DE WAELE, D. Correlations between nematode numbers and damage to banana (*Musa* AAA) roots under commercial conditions, *Nematropica* 31: 5-65. 2001.
- MOODY, E.H.; LOWNSBERY, B.F. e AHMED, J.M. Culture of Root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* on carrot disks. *Journal of Nematology* 5:225-226. 1973.
- MWEBAZE, J.M.; TUSIME, G.; TUSHEMEREIRWE, W.K. e KUBIRIBA, J. The survival of *Xantohomonas campestris* pv. *musacearum* in soil and plant debris. *African Crop Science Journal* 14:121-127. 2006.
- MURRAY, D.S. Uso de nematicidas en escala comercial en plantaciones bananeras del Atlantico. *Asbana* 4: 8 -9. 1980.
- MUSABYIMANA, T. e SAXENA, R.C. Potencial of neem (*Azadirachta indica*) seed derivatives for the management of parasitic nematodes and the banana weevil complex. *Proceedings of Conference on Bananas and Food Security held at Douala, Cameroon*. 1999.
- NELSON, R.R. Horizontal resistance in plants: concepts, aplicaciones. In: GALVES, I.E. (Ed.) *Proceedings of the Seminar on Horizontal Resistance to the Disease of Rice*. Cali: CIAT, p. 1-20. 1971.
- O'BANNON, J.H. Worldwide dissemination of *Radopholus similis* and its importance in crop production. *Journal of Nematology* 9: 16 -25. 1977.
- O'BANNON, J.H. e TAYLOR, A.L. Migratory endoparasitic nematodes reared on carrot disks. *Phytopathology* 58:385. 1968.
- ORTIZ, R.; MADSEN, S. e VUYLSTEKE, D. Classification of African plantain landraces and banana cultivars using a phenotypic distance index of quantitative descriptors. *Theo. Appl. Genet.* 96: 904-911. 1998.

- PARKER, J.E.; HOLUB, E.B.; FROST, L.N.; FALK, A.; GUNN, N.D. e DANIELS, M.J. Characterization of eds1, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. *The Plant Cell* 8: 2033–2046. 1996.
- PATEL, B.A.; VYAS, R.V.; PATEL, D.J. e PATEL, R.S. Susceptibility of banana cultivars to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Infomusa* 5: 26-27. 1996.
- PEI, X.; LI, S.; JIANG, Y.; ZHANG, Y.; WANG, Z. e JIA, S. Isolation, characterization and phylogenetic analysis of the resistance gene analogues (RGAs) in banana (*Musa* spp.). *Plant Science* 172:1166-1174. 2007.
- PEI, X.; CHEN, S.; WEN, R.; YE, S.; HUANG, J.; ZHANG, Y.; WANG, B.; WANG, Z. e JIA, S. Creation of transgenic bananas expressing human lysozyme gene for Panama wilt resistance. *Journal of Integrative Plant Biology (Formerly Acta Botanica Sinica)* 47: 971-977. 2005.
- PEOPLES, S.A.; MADDY, K.T.; COSICK, W.; JACKSON, T.; COOPER, C. e FREDERICKSON, A.S. A study of samples of well water collected from selected areas in California to determine the presence of DBCP and certain other pesticide residues. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 24: 611-618.1980.
- PERAZA-ECHEVERRIA S.; DALE J.L.; HARDING R.M.; SMITH M.K.; COLLET, C. Characterization of disease resistance gene candidates of the nucleotide binding site (NBS) type from banana and correlation of a transcriptional polymorphism with resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 4. *Mol. Breeding*, 22(4): 565-579. 2008.
- PERSLEY, G. e DE LANGHE, E.A. Banana and plantain breeding strategies. *ACIAR Proceedings N° 21*. Canberra, Australia. 1987.
- PI, C.L. e ROI-IDE, R.A. Phenolic compounds and host reaction in tomato to injury caused by root-knot and lesion nematodes. *Phytopathology* 57 : 344. 1967.
- PILLAY, M.; NWAKANMA, D.C. e TEKNOUANO, A. Identification of RAPD markers linked to A and B genome sequences in *Musa* L. *Genome* 43: 763 – 767. 2000.

- PINOCHET, J. Breeding banana for resistance against lesion forming nematodes. In: GOMMERS, F.J. e MAAS, P.W.T. (Eds.), *Nematodes from molecule to ecosystem*. Dundee, European Society of Nematologists, p. 157-169. 1992.
- PINOCHET, J. Comments on the difficulty in breeding bananas and plantains for resistance to nematodes. *Revue de Nématologie* 11: 3-5. 1988.
- PINOCHET, J. Comparison of four isolates of *Radopholus similis* from Central America on Vallery banana. *Nematropica* 9: 40-43. 1979.
- PINOCHET, J; CAMPRUBI, A; CALVET, C; FERNANDEZ, C. e KABANA, R.R. Inducing tolerance to the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* by early mycorrhizal inoculation of micropropagated Myrobalan 29 C plum rootstock. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 123: 342-347. 1998.
- PINOCHET, J. e VENTURA, O. Plant parasitic nematodes associated with bananas in Belize. *Trop. Agric.* 54: 349 -352. 1977.
- PINTO, A.C.B.V.; BORZUK, V.; SOUSA, A.I.M; TENENTE, R.C.V.; NETO, S.P.S. e CARRIJO, O. A reação de clones de bananeira a *Meloidogyne incognita*. XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, SÃO PAULO. 2005.
- PLOETZ, R.C. e PEGG, K.G. *Fusarium* wilt. In: JONES D R. (Ed.) *Diseases of banana, abaca and enset*. CABI Publishing: Wallingford, UK. p.143-159. 2000.
- PLOETZ, R.C.; THOMAS, J.E. e SLABAUGH, W.R. Diseases of banana and plantain. In: PLOETZ R.C. (Ed.) *Diseases of tropical fruit crops*. (CABI Publishing: Wallingford, UK). p.73-134. 2003.
- QUÉNEHERVÉ, P. Populations of nematodes in soils under banana cv. Poyo in the Ivory Coast. 2. Influence of soil texture, pH and organic matter on nematode populations. *Revue de Nématologie* 11: 245-251. 1988.
- QUÉNEHERVÉ, P.; VALETTE, C.; TOPART, P.; TEZENAS DU MONTCEL, H. e SALMON, F. Nematode resistance in bananas: screening results on some wild and cultivated accessions of *Musa* spp. *Euphytica* 165: 123-136. 2009.

RAJENDRAN, G.; NAGANATHANM, T.G. e SIVAGAMI, V. Studies on banana nematodes. *Indian Journal of Nematology* 9: 54. 1979.

READ, D.C. Greatly accelerated microbial degradation of aldicarb in retreated field soil, in flooded soil and in water. *Journal of Economic Entomology* 80: 15163. 1987.

RHODES, P.H. A new banana disease in Fiji. *Commonw. Phytopathology News* 10: 38 – 41. 1964.

RIGGS, R.D. Resistance: breaking races of plant parasitic nematodes. In: NICKLE, W.R. (Ed.). *Manual of Agricultural Nematology*. New York: Basel and Hong Kong. Marcel Dekker. p. 827-851. 1991.

RITZEMA BOS, J. L'anguillule de la tige (*Tylenchus devastatrix* Kühn) et les maladies des plantes dues à ce nématode. *Arch. Mus. Teyler*. 2:161-348.1888.

RIVAS, X. e ROMAN, J. Investigations on the host range of a population of *Radopholus similis* from Puerto Rico. *Nematropica* 15: 165-170. 1985.

ROBINSON, J.C.; DANEEL, M. e SCHOEMAN, P.S. Cultural practices in relation to integrated pest management in bananas. 1998. In: *Mobilizing IPM for sustainable banana production in Africa*. Inibap. 1998.

ROMÁN, J. Plant-parasitic nematodes of bananas, citrus, coffee, grapes and tobacco. Union Carbide Agricultural Products Company. 17p. 1986.

ROSSI, C.E. Nematoides da bananeira. In: www.biologico.sp.gov.br_ Consultado em Outubro de 2006.

ROWE, P. Fitomejoramiento de bananas y plátanos. Unión de Paises Exportadores de Banano (Upeb), Panamá, 19 p. 1985.

SALAS, A.; OYUELA, R. e STOVER, R.H. Effect of fallow on the burrowing nematode (*Radopholus similis*) of bananas. *Plant Disease Reporter* 60: 863-866. 1976.

SANTOS, J.R.P; TEIXEIRA, M.A.; CARES, J.E.; FALEIRO, F.G. e COSTA, D.C. Contrastant banana accessions for resistance to the burrowing nematode, based on molecular markers RAPD. *Euphytica*172: 13-20. 2010.

SARAH, J.L. Utilisation des nématicides endothérapeutiques pour la lutte contre *Pratylenchus brachyurus* em culture d'ananas. IV. Effets secondaires d'applications foliaires sur le développement des plants après le traitement d'induction florale et sur la maturation des fruits. *Fruits* 38: 523-540. 1983.

SARAH, J.L. Banana nematodes and their control in África. *Nematropica* 19: 199-216. 1989.

SARAH, J L.; PINOCHET, J. e STANTON, J. The burrowing nematode of bananas, *Radopholus similis* Cobb, 1913. *Musa* Pest Fact Sheet N. 1. Inibap, Montpellier, France. 1996.

SASSER, J.N. e FRECKMAN, D.W. A world perspective on nematology, the role of society. In: VEECH, J.A. e DICKSON, D.W. *Vistas on Nematology*. p. 7-14. 1987.

SCHMITT, D.P. e NELSON, L.A. Interaction of nematocides with other pesticides. In: VEECH, J.A. e DICKSON, D.W. (Eds.). *Vistas on Nematology*. Society of Nematologists, Inc, USA. p. 455-460. 1987.

SHARROCK, S. Collecting the *Musa* gene pool in Papua New Guinea. In: GUARINO, L.; RAO, V.R. e REID, R. (Eds.). *Colletcing plant genetic diversity*. Wallingford: C.A.B International, cap. 33, p. 647-658. 1998.

SHEPHERD, K. History and methods of banana breeding. In: *Report of the First External Program and Management Review of the International Network for the Improvement of Banana and Plantain*, Washington, Cgiar Secretariat, The World Bank, p. 108-110. 1992.

SHEPHERD, K.; DANTAS, J L.L. e ALVES, E.J. Melhoramento genético da bananeira. *Informe Agropecuário* 12: 11-19. 1986.

SHER, S.A. Revision of genus *Radopholus* Thorne, 1949 (Nematoda -Tylenchoidea). *Proceedings of the Helminthological society of Washington* 35:219-37. 1968.

SIDDIQI, M.R. *Tylenchida: Parasites of plants and insects*. 2^a ed. CABI Publishing. 864 p. 2001.

SIMMONDS, N.W. *The Evolution of the bananas*. Longman, London. 1962.

SILVA, S.O.; ALVES, E.J.; LIMA, M.B. e SILVEIRA, J.R.S. Melhoramento genético da bananeira. In: BRUCKNER, C.H. (Ed.). Melhoramento de espécies frutíferas. Viçosa: UFV, cap. 1. 1999.

SILVA, S.O.; MATOS, A.P. e ALVES, E.J. Melhoramento genético da bananeira. Pesquisa Agropecuária Brasileira 34: 693-703. 1998.

SILVA, S.O.; SHEPHERD, K.; DANTAS, J.L.L.; ALVES, E.J.; BORGES, A.L.; FANCELLI, M.; OLIVEIRA, S.L. de e ALMEIDA, M. de A. Avanços do programa de pesquisa em *Musa* no CNPMF, Embrapa, Brasil. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF, 37p. (Embrapa-CNPMF. Documentos, 65). 1996.

SILVA, S.O.; SHEPHERD, K.; DANTAS, J.L.L.; SOUZA, A.S. e CARNEIRO, M.S. Germoplasma. In: ALVES, E.J. (Ed.). A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. Brasília: Embrapa, cap. 4, p. 61-84. 1997.

SIMMONDS, N.W. Bananas. In: SMARTT, J. e SIMMONDS, N.W. (Eds.) Evolution of crop plants. Essex: Longman. p. 370-375. 1995.

SIMMONDS, N.W. e SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. J. Linn. Soc. Bot. 55: 302-312. 1955.

SOUZA, J.T.; MAXIMINIANO, C. e CAMPOS, V.P. Nematoides associados a plantas frutíferas em alguns estados brasileiros. Ciência e Agrotecnologia 23: 353-357. 1999.

SPEIJER, P.R. e DE WAELE, D. Screening of *Musa* germplasm for resistance and tolerance to nematodes. INIBAP Technical Guidelines, N^o 1, 47p. 1997.

STANTON, J.M. Assessment of resistance and tolerance of in vitro-propagated banana plants to burrowing nematode, *Radopholus similis*. Aust. J. Exp. Agric. 39: 891-895. 1999.

STANTON J.M. Status of nematode and weevil borer problems affecting banana in Australia. In: Banana nematodes and weevil borers in Asia and the Pacific. In: VALMAYOR, R.V.; DAVIDE, R.G.; STANTON, J.M.; TREVERROW N.L. e ROA, V.N. (Eds). Inibap/ASPNET, Los Baños, Philippines. p. 48-56. 1994.

STIRLING, A.M.; STIRING, G.R. e MACRAE, E.C. Microbial degradation of fenamiphos after repeated application to a tomato-growing soil. *Nematologica* 38: 245-254. 1992.

STOFFELEN, R.; VERLINDEN, R.; XUYEN, N.T.; SWENNEN, R. e DE WAELE, D. Host plant response of *Eumusa* and *Australimusa* bananas (*Musa* spp.) to migratory endoparasitic and root-knot nematodes. *Nematology* 2: 907 – 916. 2000.

STOVER, R.H. Fungi associated with nematode and non-nematode lesions on banana roots. *Canadian Journal of Botany* 44: 1703-1710. 1966.

STOVER, R.H. e BUDDENHAGEN, I.W. Banana breeding: polyploidy, disease resistance and productivity. *Fruits* 41: 175-191. 1986.

STURHAN, D. Biological races. In: ZUCKERMAN, B.M.; MAI, W.F. e RHODE, R.A. (Eds.). *Plant Parasitic nematodes*. New York: Academic Press. p.51-71. 1971.

TARTÉ, R. La importancia del conocimiento de la biología y comportamiento de los nematodos parásitos del banano em el desarrollo de métodos eficientes de control. *Augura* 6: 13-21. 1980.

TARTÉ, R. e PINOCHET, J. Problemas nematológicos del banano: contribuciones recientes a su conocimiento y combate. *Unión Países Exportadores Banano (UPEB)*, Panamá, 32 p. 1981.

TARTÉ, R.; PINOCHET, J.; GABRIELLI, C. e VENTURA, O. Differences in population increase, host preferences and frequency of morphological variants among isolates of the banana race of *Radopholus similis*. *Nematropica* 11: 43 -52. 1981.

TENENTE, R.C.V.; GONZAGA, V.; MELO, L.A.M.P. e TENENTE, M.S.M. Bibliografia brasileira de nematoides. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 386 p. (Documentos, 76). 2002.

TEIXEIRA, M.A. Resistência de genótipos de bananeira a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* e variabilidade genética com base em marcadores moleculares RAPD. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, DF – Brasil. 2007.

TIHOHOD, D. *Nematologia agrícola aplicada*. Jaboticabal: FUNEP. 372 p. 1993.

TOKESHI, H. e DUARTE, M.L.R. Moko da bananeira no Território Federal do Amapá. *Summa Phytopathologica* 2: 224 – 229. 1976.

THURAU, T.; KIFLE, S.; JUNG, C. e CAI, D. The promoter of the nematode resistance gene HS1^{pro1} activates a nematode-responsive and feeding site-specific gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 52: 643-660. 2003.

TRIANANTAPHYLLOU, A.C. Genetics of nematode parasitism of plants. In: VEECH, J.A.; DICKSON, D.W. (Eds.). *Vistas on Nematology*. Hyattsville: Society of Nematologists. p. 354-363. 1987.

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

TRUDGILL, D.L. e BLOK, V.C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 39: 53–77. 2001.

VALETTE, C.; BAUJARD, P.; NICOLE, M.; SARAH, J.L. e MOUNPORT, D. Ultrastructural observations on the cuticle of *Radopholus similis* (Nematoda: Pratylenchidae). *Fundamental and Applied Nematology* 20: 481-485. 1997.

VALETTE, C.; MOUNPORT, D.; NICOLE, M.; SARAH, J.L. e BAUJARD, P. Scanning electron microscope study of two African populations of *Radopholus similis* (Nematoda: Pratylenchidae) and proposal of *R. citrophilus* as a junior synonym of *R. similis*. *Fundamental and Applied Nematolog.* 21: 139-146. 1998.

VAN WEERDT, L.G. Studies on the biology of *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949. In: II. Embriology and post-embryonic development. *Nematologica* 5: 43-51. 1960.

VAN DEN BERGH, I. Culturing and mass propagation of *Radopholus similis* and *Pratylenchus* spp. on carrot discs under in vitro conditions. International Network for the Improvement of Banana and Plantain-Asia Pacific c/o IRRI, GS Khush Hall, Los Baños, Laguna 4031 (Philippines). 2005.

VAN DEN BERGH, I.; DE WAELE, D.; NHI, H.H.; NGUYET, D.T.M.; TUYET, N.T. e THANH, D.T. Screening of Vietnamese *Musa* germplasm for resistance and tolerance to root-knot and root-lesion nematodes in the greenhouse. *Infomusa* 9: 8 – 10. 2000.

VAN DEN BERGH, I.; NGUYET, D.T.M.; TUYET, N.T.; NHI, H.H. e DE WAELE, D. Screening of Vietnamese *Musa* germplasm for resistance to root knot and root lesion nematodes in the greenhouse. *Australasian Plant Pathology* 31: 363 –371. 2002a.

VAN DEN BERGH, I.; NGUYET, D.T.M.; TUYET, N.; NHI, H.H. e DE WAELE, D. Responses of Vietnamese *Musa* genotypes to *Meloidogyne* spp. under field conditions. *Nematology* 4: 917 – 923. 2002b.

VAN DEN BERG, N.; BIRCH, P.; VILJOEN, A.; WINGFIELD, M.J.; VISSER, M. e BERGER, D.K. Suppression subtraction hybridization used to identify genes associated with resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* in Cavendish bananas, 3rd international symposium on Molecular and Cellular Biology of bananas. Leuven Belgium. p. 22. 2002.

VAN DER BIEZEN, E.A. e JONES, J.D.G. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences* 12: 454–456. 1998.

VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M. e PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36: 453 – 483. 1998.

VANTINI, J.; FERRO, M.; FERRO, J. e OLIVEIRA, J.C. Expressão gênica diferencial da β -1,3-Glucanase (PR-2) nas interações compatível e incompatível entre *Xanthomonas axonopodis* e *Citrus sinensis*. *Científica* 36: 139-147. 2008.

VIAENE, N.; DURAN, L.F.; RIVERA, J.M.; DUEÑAS, J.; ROWE, P. e DE WAELE, D. Responses of banana and plantain cultivars, lines and hybrids to the burrowing nematode *Radopholus similis*. *Nematology* 5: 85–98. 2003.

VIAENE, N.; DUEÑAS, J. e DE WAELE, D. Screening for resistance and tolerance to *Radopholus similis* and *Pratylenchus coffeae* in banana and plantain (abstract). *Nematologica* 44: 599. 1998.

VILAS BOAS, L.C.; TENENTE, R.C.V.; GONZAGA, V.; SILVA NETO, S.P. e ROCHA, H. S. Reação de clones de bananeira (*Musa* spp.) ao nematoide *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949, raça 2. Revista Brasileira de Fruticultura. 24: 690 – 693. 2002.

VILARDEBO, A. Applications des resultats de recherches de lutte contre la nematose du bananier a *Radopholus similis* Cobb dans l'ouest africain. Nematropica 11: 193-207. 1981.

VISHNEVETSKY, J.; WHITE, T.L.; PALMATEER, A.J.; FLAISHMAN, M.; COHEN, Y.; ELAD, Y.; VELCHEVA, M.; HANANIA, U.; SAHAR, N.; DGANI, O. e PERL, A. Improved tolerance toward fungal diseases in transgenic Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv. Grand Nain. Transgenic Res. 20: 61-72. 2011.

VOS, P.; SIMONS, G.; JESSE, T.; WIJBRANDI, J.; HEINEN, L.; HOGERS, R.; FRIJTERS, A.; GROENENDIJK, J.; LIHARSKA, T.; HONTELEZ, J. e ZABEAI, M. The tomato Mi-1 gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. Nature Biotechnology 16: 1315-1336. 1998.

WEHUNT, E.; HUTCHINSON, D. e EDWARDS, D.I. Reaction of banana cultivars to the burrowing nematode (*R. similis*). Journal of Nematology 10: 368-370. 1978.

WIXTED, D.J.; LORIA, R. e KOTCON, J.P. Efficacy of ethoprop on potato and the potential for groundwater contamination. Journal of Nematology 19: 563-564. 1987.

WUYTS, N.; LOGNAY, G.; VERSCHEURE, M.; MARLIER, M.; DE WAELE, D. e SWENNEN, R. Potential physical and chemical barriers to infection by the burrowing nematode *Radopholus similis* in roots of susceptible and resistant banana (*Musa* spp.). Plant Pathology 56: 878–890. 2007.

WYSS, U. e GRUNDLER, F.M.V. Feeding behavior of sedentary plant parasitic nematodes. European Journal of Plant Pathology 98: 165 – 173. 1992.

VILLAIN, L. Caractérisation et bioécologie du complexe parasitaire du genre *Pratylenchus* (Nemata : Pratylenchidae) présent sur caféiers (*Coffea* spp.) au Guatemala. Montpellier: CIRAD (Thèse de doctorat: Biologie et agronomie). 312p. 2000.

ZAKI, M.H.; MORAN, D. e HARRIS, D. Pesticides in groundwater: the aldicarb story in Suffolk county. N. Y. American Journal of Public Health 72: 1391-1395. 1982.

ZEM, A.C. Problemas nematológicos em bananeiras (*Musa* spp.) no Brasil (contribuição ao seu conhecimento e controle). Tese de Doutorado. USP –ESALQ, Piracicaba, SP. 40p. 1982.

ZEM, A.C. e ALVES, E.J. Observações sobre perdas provocadas por nematoides em bananeira (*Musa acuminata*) cultivar Nanicão. Bahia, Cruz das Almas, Brasil, EMBRAPA/CNPMPF, Boletim de pesquisa Nº 6. 10 p. 1981.

ZEM, A.C. e LORDELLO, L.G.E. Estudos sobre hospedeiros de *Radopholus similis* e *Helicotylenchus multicinctus*. Sociedade Brasileira de Nematologia 7: 175-188. 1983.

CAPÍTULO 2

**COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE MULTIPLICAÇÃO IN
VITRO DE *RADOPHOLUS SIMILIS* E *PRATYLENCHUS*
BRACHYURUS EM CILINDROS DE CENOURA.**

COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *RADOPHOLUS SIMILIS* E *PRATYLENCHUS BRACHYURUS* EM CILINDROS DE CENOURA.

RESUMO

O uso de métodos de multiplicação em massa de nematoides *in vitro* em condições axênicas permite intensificar os estudos em relação à taxonomia, biologia, epidemiologia e controle desses patógenos. Portanto, o presente trabalho visou avaliar duas metodologias de multiplicação *in vitro* para as duas espécies de nematoides fitoparasitas, *Radopholus similis* e *Pratylenchus brachyurus*, em três períodos de avaliação (20, 40 e 60 dias). Ambas as metodologias utilizam cilindros de cenoura em frascos com tampas, sendo que em uma foi adicionado meio agar-água no interior dos frascos e a outra não. O método sem agar-água teve a axenização dos nematoides apenas com uma solução de ampicilina 1,0% enquanto o outro método com solução de cloreto de mercúrio 0,01% e sulfato de estreptomicina 0,02%. O método com agar-água mostrou-se mais efetivo que o método sem agar-água para ambas as espécies de nematoides, com um aumento populacional de aproximadamente 280 vezes para *R. similis* e 226 vezes para *P. brachyurus*, enquanto o outro método foi de 5 vezes maior para *R. similis* e 2 vezes para *P. brachyurus* após 60 dias. A maior quantidade de nematoides ocorreu aos 60 dias após a inoculação dos nematoides. Portanto a multiplicação de *P. brachyurus* e *R. similis* em cilindros de cenoura em frascos com agar-água é uma técnica de fácil execução, de baixo custo e adequada para a produção massiva desses nematoides.

Palavra-chave: Multiplicação *in vitro*, *Pratylenchus brachyurus*, *Radopholus similis*.

COMPARISON OF TWO METHODS FOR IN VITRO MULTIPLICATION OF *RADOPHOLUS SIMILIS* AND *PRATYLENCHUS BRACHYURUS* IN CARROT CYLINDERS.

ABSTRACT

The use of in vitro mass multiplication of nematodes under axenic conditions allows the intensification of studies on taxonomy, biology, epidemiology and control of these pathogens. Therefore, two methods were evaluated for in vitro multiplication of two species of plant-parasitic nematodes, *Radopholus similis* and *Pratylenchus brachyurus* in three time periods (20, 40 and 60 days). Both techniques used carrot cylinders in jars with lids, with or without the addition of water-agar in the bottom of the bottles. In the method with no addition of water-agar the nematodes were axenized only with a 1% solution of ampicillin whilst in the other procedure the axenization was carried out with a solution of mercuric chloride (0.01%), and streptomycin sulfate 0.02%. The method with water-agar was the most effective for both species of nematodes, with a population increase of about 280 times for *R. similis* and 226 times for *P. brachyurus*. Whithout water-agar the population was just 5 times higher for *R. similis* and 2 times for *P. brachyurus* after 60 days. Overall, the largest amount of nematodes occurred at 60 days after inoculation. So the multiplication of *P. brachyurus* and *R. similis* in carrot cylinders in glass jars with water-agar is an easy and low cost technique suitable for mass production of these nematodes.

Keywords: Multiplication in vitro, *Pratylenchus brachyurus*, *Radopholus similis*

1. INTRODUÇÃO

Os nematoides *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949, e *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev e Schuurmans Stekhoven, 1941, são endoparasitas migratórios que se desenvolvem em tecidos de raízes funcionais. Ambas as espécies são consideradas importantes no contexto mundial. *Pratylenchus brachyurus*, conhecido como o nematoide das lesões radiculares, pertence ao grupo considerado o segundo em importância econômica para a agricultura, sendo superado apenas pelas espécies do gênero *Meloidogyne* (Sasser e Freckman, 1987, Tihohod, 1993). Já o nematoide *Radopholus similis* é considerado o mais importante para a cultura da banana (Luc e Vilardebo, 1961; Fallas e Marbán-Mendoza, 1994).

A multiplicação em massa de ambas as espécies *in vitro* em condições axênicas permite intensificar os estudos voltados à taxonomia, biologia, epidemiologia e controle desses nematoides.

Em se tratando do processo de multiplicação *in vitro*, a axenização dos nematoides constitui uma etapa fundamental no estabelecimento de uma cultura monoxênica, com o intuito de evitar a contaminação com microrganismos. Hastings e Bosher (1938) realizaram os primeiros estudos para axenização e manutenção de uma espécie de *Pratylenchus* em plântulas de aveia *in vitro*. Entretanto, foi Krusberg (1961) quem iniciou os estudos visando ao estabelecimento de culturas axênicas de nematoides em calo de alfafa mantido em meio de cultura.

Outra técnica importante para a multiplicação de nematoides axenicamente ocorre em discos de cenoura, publicada por O'Bannon e Taylor (1968). Esses pesquisadores foram os pioneiros na utilização desse recurso e, a partir daí, essa técnica vem sendo utilizada para multiplicação *in vitro* de *Radopholus similis* e de diferentes espécies de *Pratylenchus* (Castro e Ferraz, 1989b, Verdejo-Lucas e Pinochet, 1992; Fallas e Sarah, 1994, Stoffelen *et al.*, 1999; Di Vito *et al.*, 2002; Costa, 2004; Gonzaga, 2006; Boisseau e Sarah, 2008, Santos, 2007). A técnica foi aprimorada por Moody *et al.* (1973), permitindo o prolongamento do período de manutenção da cultura e aumento da taxa de multiplicação.

Gonzaga (2006) obteve sucesso na multiplicação de *Pratylenchus* ssp. *in vitro* ao introduzir modificações na técnica de Moody, como a melhoria do processo de axenização e troca de discos de cenoura por cilindros individuais de, aproximadamente, 30 mm de comprimento por 15mm de diâmetro, retirados da porção central das raízes, sem adição de qualquer meio.

A partir da técnica desenvolvida por Marc Boisseau, citada por Villain (2000), Costa (2004) fez pequenas modificações, usando cilindros de cenoura de 20 mm de comprimento por 15 mm de diâmetro, qual foi utilizada com sucesso na multiplicação de *R. similis*.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi comparar duas técnicas de multiplicação *in vitro* quanto à eficácia na multiplicação de *R. similis* e *P. brachyurus*, com a finalidade de atender a demanda de inóculo para a realização dos experimentos aqui apresentados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em condições de câmara de crescimento no Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Brasília, no período de 28 de agosto de 2009 a 27 de outubro de 2009. A população de *P. brachyurus* utilizada no experimento foi extraída de raízes de soja provenientes do estado de Tocantins, Brasil e a população de *R. similis* é originária de Pernambuco, proveniente de bananeiras da cultivar Pacovan mantida em plantas da cultivar Grande Naine.

Para o preparo de nematoides para multiplicação pelos dois métodos, cenouras frescas cultivadas pelo sistema orgânico de produção foram lavadas e imersas em uma solução de 2% de hipoclorito de sódio por 15 minutos. As ferramentas necessárias foram mantidas em condições assépticas em uma câmara de fluxo laminar (Figura 1).



Figura 1. Material necessário para a preparação de frascos para inoculação de nematoides. **A)** Da esquerda para a direita, espátula com ponta curva, faca, perfurador, pinça, êmbolo; **B)** Da esquerda para a direita, Flambador, frasco com álcool e o material descrito em “A” para serem flambados, béquer com álcool 92,8% para mergulhar os cilindros de cenoura para serem flambados e uma tábua de corte abaixo.

2.1. Método sem ágar-água

Os cilindros de cenoura foram preparados pela técnica de Moody *et al.* (1973), com modificações, conforme descrito por Gonzaga *et al.* (2006).

Em uma câmara de fluxo laminar, pedaços de cenoura de 30 mm de comprimento foram cortadas com uma lâmina de metal previamente flambada. Depois de cortar os cilindros, eles foram imersos em álcool etílico (92,8%), flambadas e, com auxílio de um perfurador cilíndrico de metal, retirou-se o cilindro central de cada pedaço de cenoura, de 30 mm de comprimento por 15 mm de diâmetro, descartando-se a camada externa ao perfurador (Figura 2 A-E). Individualmente, esse cilindro de cenoura foi colocado em posição vertical, em frasco de 100 ml com tampa previamente autoclavado (Figura 2F).

Todos os materiais utilizados para corte ou perfuração das cenouras foram flambados a cada nova utilização. Os frascos com os cilindros de cenoura foram mantidos em repouso por cinco dias, e, na ausência de qualquer sinal de contaminação nos cilindros de cenoura, os nematoides axenizados foram inoculados.

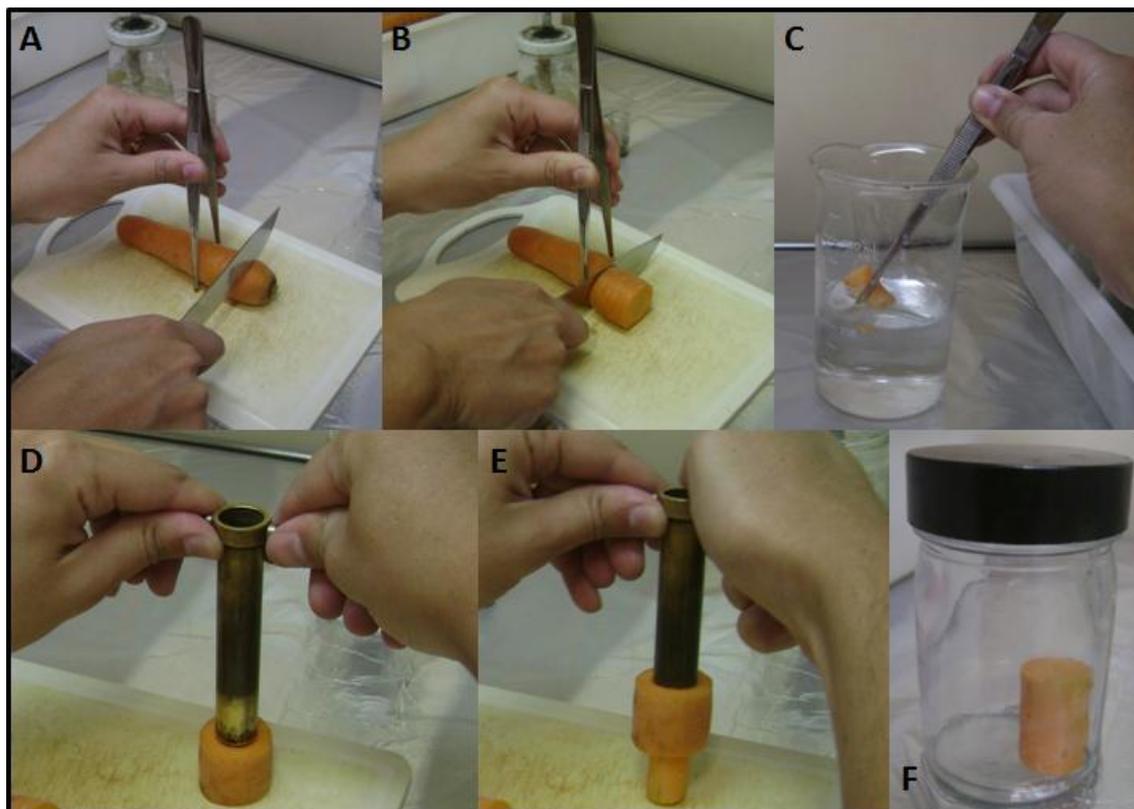


Figura 2. Preparação dos frascos para multiplicação de nematoides *in vitro* de acordo com a metodologia sem ágar-água. **A e B)** Corte dos cilindros de cenoura de 30 mm; **C)** Esterilização e flambagem dos cilindros de cenoura. **D e E)** Retirada do cilindro central do pedaço de cenoura; **F)** Frasco com o cilindro de cenoura pronto para inoculação.

Os nematoides *P. brachyurus* e *R. similis* foram extraídos de suas respectivas hospedeiras de acordo com Coolen e D’Herde (1972). Vinte e cinco fêmeas de cada espécie foram selecionadas e colocadas em microtubos estéreis de 1,5 ml, do tipo eppendorf, contendo 600 µl de água destilada estéril. A seguir os nematoides foram axenizados pela técnica de Mountain (1955), com modificações. Após 10 minutos de repouso em água destilada estéril removeu-se o excesso de água e acrescentou-se uma solução de ampicilina a 0,1%. Decorridos mais 10 minutos de repouso, removeu-se novamente o excesso de solução e acrescentou-se 200 µl de água destilada esterilizada. Após 5 minutos, o excesso de líquido foi removido, sendo novamente adicionados 200 µl da solução do antibiótico. Os nematoides foram mantidos por mais 10 minutos nessa solução de antibiótico, sendo então inoculados com uma micropipeta em condições assépticas, na região superior dos cilindros de cenoura previamente posicionados em frascos de vidro autoclavados na posição vertical (Figura 3). Os frascos contendo os

cilindros de cenoura inoculados e lacrados com tampa e fita plástica adesiva ficaram em repouso por 30 minutos em câmara de fluxo laminar até serem transferidas para uma câmara de crescimento do tipo BOD regulada a 28 °C no escuro.

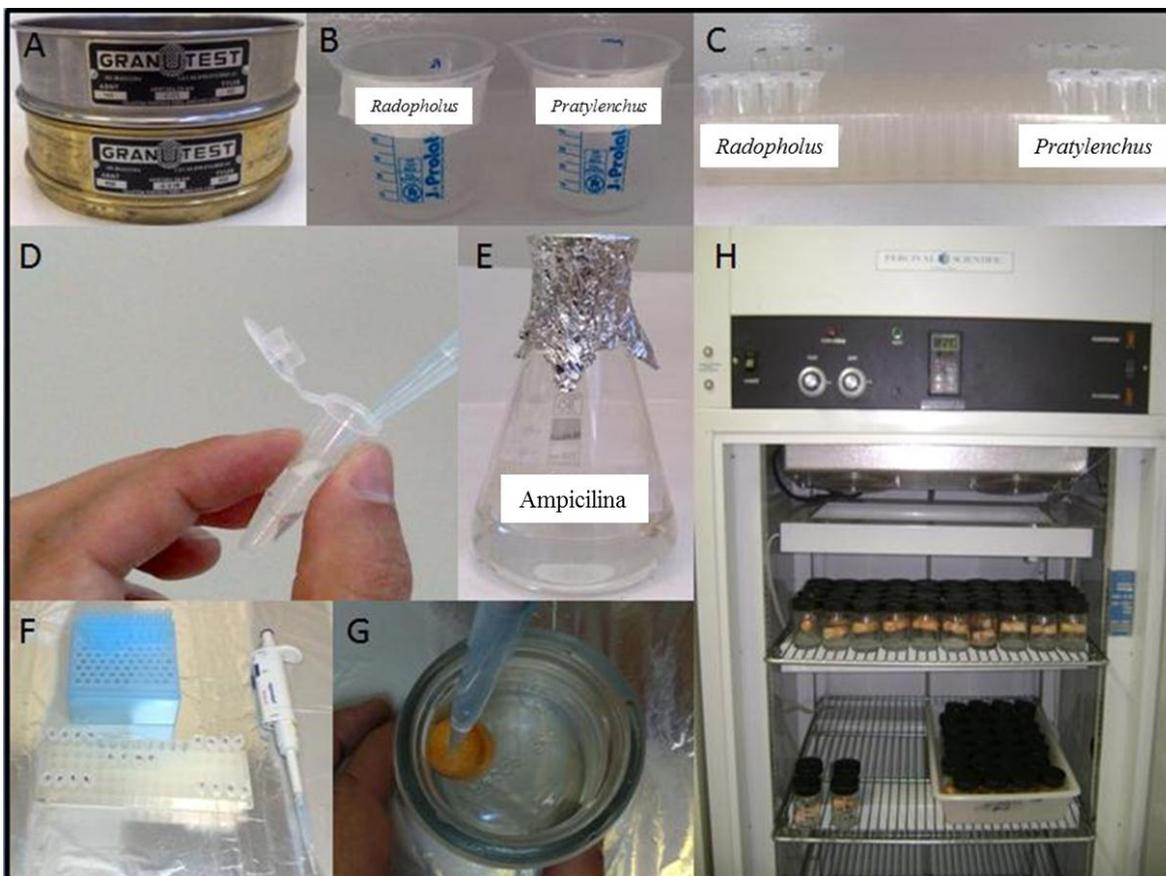


Figura 3. Axenização dos nematoides de acordo com a metodologia sem ágar-água. **A)** Peneiras de 140 e 400 mesh utilizadas na extração dos nematoides de raízes; **B)** Suspensão de *Radopholus similis* e *Pratylenchus brachyurus*; **C)** Microtubos com 25 fêmeas adultas de cada espécie de nematoide em 600 μ L de água destilada estéril; **D)** Retirada do excesso de água para adição de antibiótico; **E)** Solução de ampicilina 0,1 %; **F)** Microtubos com nematoides após todas as fases da axenização prontos para inoculação; **G)** Inoculação dos nematoides sobre o cilindro de cenoura; **H)** Frascos armazenados em câmara de crescimento tipo BOD a 28 °C.

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições para cada período de avaliação. O experimento foi avaliado aos 20, 40 e 60 dias após inoculação.

Em cada avaliação os nematoides foram extraídos dos tecidos dos cilindros de cenoura de acordo com Coolen e D'Herde (1972). As paredes dos frascos também foram lavadas com água estéril e os nematoides foram coletados em peneira de 400 mesh.

As concentrações de nematoides nas suspensões obtidas incluindo ovos, foram estimadas pela contagem de alíquotas de 2 ml por 3 vezes em microscópio estereoscópico com auxílio de uma placa de contagem. Os dados relativos ao número total de nematoides foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade, utilizando o software SISVAR (Ferreira, 2008).

Este método sofreu pequenas modificações, sendo que aqui adotamos a utilização de microtubos do tipo eppendorf para a axenização dos nematoides ao invés de frascos de vidro do tipo BPI. Usamos frascos de 100 ml com tampas e não frascos de 180 ml tampados apenas com papel alumínio. Para ambas espécies de nematoides, os cilindros de cenoura foram inoculados com 25 fêmeas, e, a temperatura na câmara de crescimento calibrada para 28 °C.

2.2. Método com ágar-água

O método em questão foi desenvolvido por Marc Boisseau, conforme citado por Villain (2000), e que foi posteriormente adaptado e usado por Costa (2004).

As cenouras foram borrifadas com álcool comercial e flambadas em câmara de fluxo laminar, sendo cortadas em cilindros de 2 cm de comprimento. Com auxílio de um perfurador metálico inserido no centro de cada pedaço de cenoura foi removido um cilindro de 20 mm de comprimento e 15 mm de diâmetro, sendo descartada a camada externa. Frascos de vidro com tampas com capacidade de 100 ml foram preenchidos com aproximadamente 10 ml de meio ágar-água a 1% e autoclavados. Quando o meio já estava solidificado, os cilindros centrais das cenouras foram equilibrados transversalmente no meio dos frascos e deixados em repouso por aproximadamente 5 dias para a triagem de frascos sem contaminação (Figura 4).

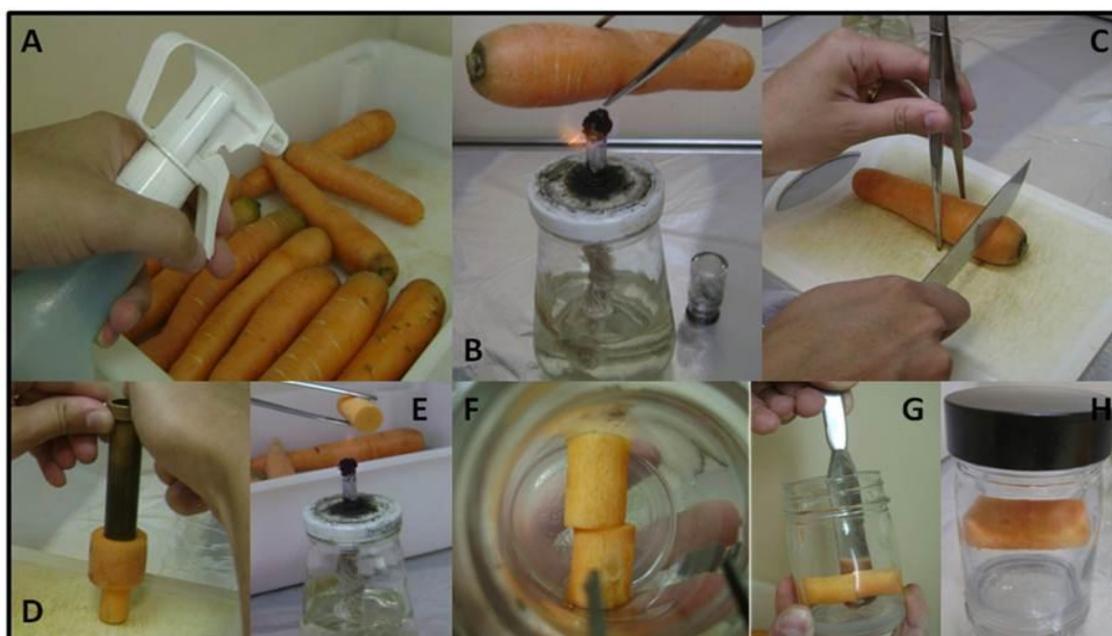


Figura 4. Preparo dos frascos para multiplicação *in vitro* de nematoides, de acordo com o método com ágar-água. **A)** Borrifação de álcool sobre as cenouras; **B)** flambagem da cenoura; **C e D)** Corte e perfuração dos cilindros centrais de cenoura; **E)** Esterilização do cilindro central do pedaço de cenoura; **F e G)** Encaixe dos cilindros de cenoura no interior do frasco; **H)** Frasco equilibrando cilindros de cenoura.

Os nematoides foram extraídos das respectivas hospedeiras conforme descrito por Coolen e D'Herde (1972), então 25 fêmeas foram colocados em microtubos estéreis de 1,5 ml do tipo eppendorf com 1000 μ l de água destilada estéril. Na sequência os microtubos foram submetidos à centrifugação em microcentrífuga a 3000 rpm por seis minutos e o sobrenadante posteriormente descartado. Aos tubos com os nematoides foi adicionado 1 μ L de uma solução de cloreto de mercúrio a 0,01% e novamente foram submetidos à centrifugação a 3000 rpm por seis minutos, novamente descartando-se o sobrenadante. Foi adicionado, então, 1 μ L de uma solução de sulfato de estreptomicina 0,02% e realizada outra centrifugação a 3000 rpm por seis minutos, seguida de novo descarte de sobrenadante.

Após axenização, a suspensão concentrada de nematoides foi coletada com uma micropipeta e transferida para a superfície dos cilindros de cenoura em condições assépticas (Figura 5), sendo os frascos vedados com plástico adesivo. Os frascos foram mantidos em uma câmara de crescimento tipo BOD a 28 °C com ausência de fotoperíodo.

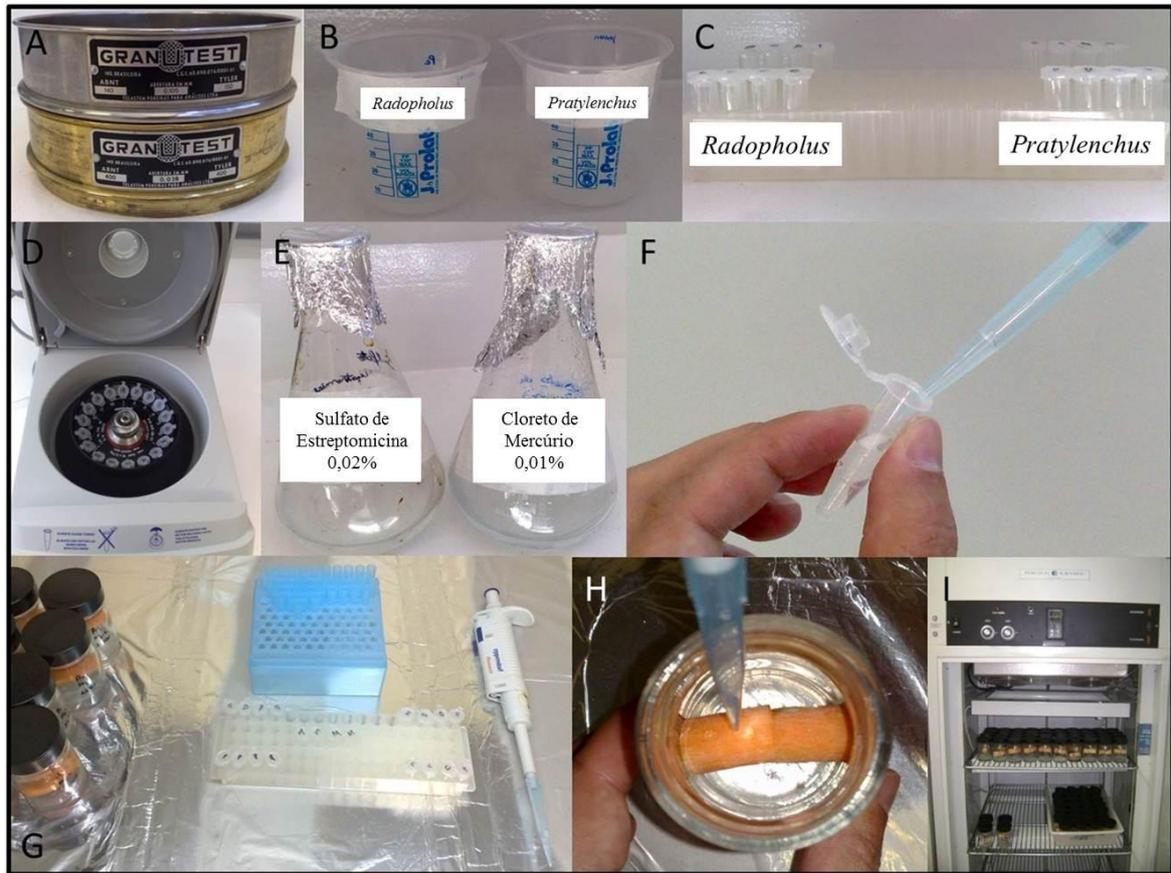


Figura 5. Axenização dos nematoides de acordo com a metodologia com ágar-água. **A)** Peneiras de 140 e 400 mesh utilizadas na extração dos nematoides de raízes; **B)** Suspensão de *Radopholus similis* e *Pratylenchus brachyurus*; **C)** Microtubos com 25 fêmeas adultas de cada espécie do nematoide em 600 μ L de água destilada estéril; **D)** Centrifugação dos microtubos a 3000 rpm por 6 min; **E)** Solução de sulfato de estreptomicina 0,02 % e cloreto de mercúrio 0,01 %; **F)** Retirada do excesso de água para adição de antibiótico ou cloreto de mercúrio; **G)** Frascos com nematoides após todas as fases da axenização prontos para inoculação; **H)** Inoculação dos nematoides sobre o cilindro de cenoura; **I)** Frascos armazenados em câmara de crescimento tipo BOD a 28 °C.

Assim como descrito na seção anterior, o experimento teve um delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições para cada período de avaliação. O experimento foi avaliado aos 20, 40 e 60 dias após inoculação.

Em cada época de avaliação os nematoides foram extraídos dos tecidos dos cilindros de cenoura de acordo com Coolen e D’Herde (1972) e as paredes dos frascos também foram lavadas com água estéril e os nematoides foram coletados em peneira de 400 mesh.

As concentrações de nematoides nas suspensões obtidas, incluindo os ovos, foram estimadas, pela contagem de alíquotas de 2 ml por 3 vezes em microscópio estereoscópio com auxílio de uma placa de contagem. Os dados relativos ao número total de nematoides foram submetidos à análise de variância e, as médias comparadas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade, utilizando o software SISVAR (Ferreira, 2008).

3. RESULTADOS

Após o preparo dos frascos e decorridos os cinco dias em repouso, antes de serem utilizados, para ambas as metodologias houve contaminação na proporção aproximada de 20% para a metodologia sem ágar-água e de 5% para aquela com ágar-água.

Não houve diferença estatística significativa entre as duas espécies de nematoides quanto aos métodos de multiplicação. No entanto, houve diferença significativa entre os métodos para ambas as espécies de nematoides e para as épocas de avaliação, sendo que ocorreu interação significativa entre os métodos e as épocas de avaliação.

As médias do número de nematoides para o método com ágar-água foram significativamente maiores do que aquelas geradas pelo outro método em todas as épocas de avaliação. Vinte dias após a inoculação pelo método que utiliza ágar-água, foram contados em média 353 nematoides enquanto que o método sem ágar-água apresentava média de 38 nematoides, e, após os 40 dias da inoculação a contagem média de nematoides foi de 486 e 102 nematoides, respectivamente. A maior diferença foi visualizada após os 60 dias onde o método com ágar-água teve em média 6333 nematoides, enquanto o método sem ágar-água tinha apenas 83 nematoides em média. Na avaliação de 60 dias as médias foram estatisticamente superiores às demais épocas de avaliação para o método com ágar-água. Em relação ao método sem ágar-água, não foram observadas diferenças estatísticas entre os diferentes tempos de observação e a contagem numérica de nematoides aumentou da primeira avaliação aos 20 dias, para a segunda, após 40 dias. Na avaliação de 60 dias houve uma redução no número de nematoides em relação às avaliações prévias (Tabela 1).

Tabela 1. Número de nematoides resultantes de dois métodos de multiplicação *in vitro* para três tempos de avaliação, com população inicial de 25 fêmeas de *Radopholus similis* e de *Pratylenchus brachyurus*.

Número médio de nematoides ¹				
Metodologia	(Dias após a inoculação)			Média geral
	20	40	60	
Com ágar-água	353,75 bA ²	486,50 bA	6333,00 bB	2391,12 B
Sem ágar-água	37,62 aA	102,62 aAB	83,87 aAB	74,70 A

¹ Média resultante de 4 repetições. Os números na tabela são originais; para a análise os números foram convertidos para $\text{Log}_{10}(x)$.

² Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, ou letras minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Tanto as populações de *R. similis* quanto as de *P. brachyurus* se multiplicaram por ambos os métodos *in vitro*, sendo que o método com ágar-água foi mais efetivo com um aumento de aproximadamente 280 vezes para *R. similis* e 226 vezes para *P. brachyurus*, enquanto que pelo método sem ágar-água o aumento foi de 5 vezes para *R. similis* e 2 vezes para *P. brachyurus*, 60 dias após a inoculação, quando as populações das duas espécies chegou ao ápice (Tabela 2).

Tabela 2. Número médio e aumento populacional de nematoides extraídos de cilindros de cenoura multiplicados *in vitro* por dois diferentes métodos, 20, 30 e 60 dias após a inoculação com 25 fêmeas de *Radopholus similis* e de *Pratylenchus brachyurus*.

Nematoides								
Metodologia	<i>Radopholus similis</i>				<i>Pratylenchus brachyurus</i>			
	20	40	60	Média	20	40	60	Média
Com ágar-água	559.5 b ¹ (22.38 x) ²	503.2 b (20.18 x)	7010.0 a (280.4 x)	2.691.0 A	148.0 b (5.92 x)	469.7 b (18.79 x)	5656.2 a (226.25 x)	2.091.3 A
Sem ágar-água	20.0 b (0.8 x)	25.7 b (1.03 x)	108.5 a (4.34 x)	51.4 B	55.2 b (2.21 x)	179.5 a (7.18 x)	49.2 b (1.97 x)	94.6 B

¹ Dados originais são média de 4 repetições. Para análise estatística os dados foram convertidos em Log₁₀ (x). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, ou letras minúsculas na linha, não diferiram pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

² Valores entre parênteses representam o aumento do número de nematoides ao longo dos períodos de avaliação.

Na avaliação de 60 dias após a inoculação, o estado de conservação dos cilindros de cenoura dos frascos restantes ainda era bom e não havia sinal de decomposição ou contaminação com microrganismos oportunistas (Figura 6). Dos 16 frascos avaliados aos 60 dias, em apenas um frasco da metodologia com ágar-água houve o crescimento de um fungo não identificado.

Para as duas espécies de nematoides, apenas nos frascos montados segundo a metodologia com ágar-água foi possível visualizar, com auxílio de microscópio estereoscópio, a presença de nematoides em pequenas gotas de água formadas nas paredes dos frascos (Figura 6).

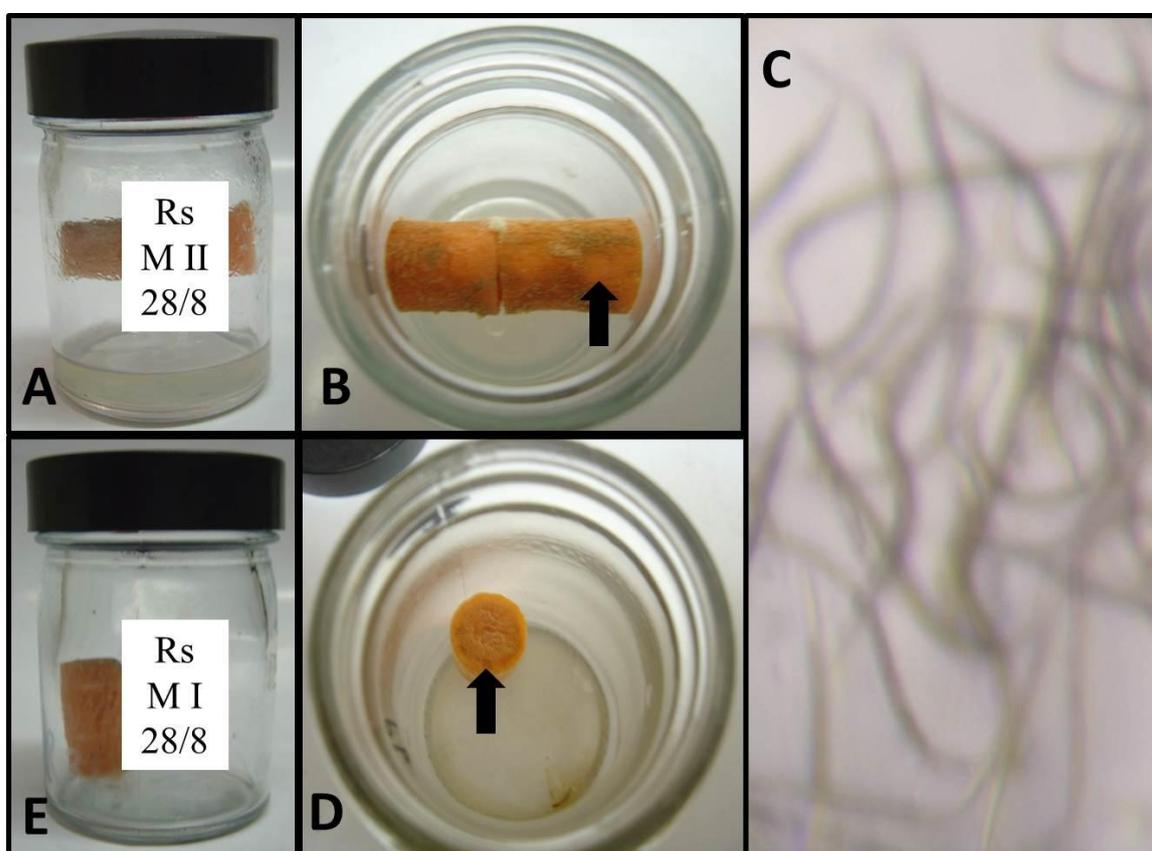


Figura 6. Aparência dos cilindros de cenoura após 60 dias de avaliação para os dois métodos de multiplicação de *Radopholus similis*. **A)** Frasco com cenoura em bom estado de conservação e alta umidade nas paredes segundo metodologia com ágar-água; **B)** Seta indicando sinal onde os nematoides foram inoculados; **C)** Visualização de nematoides nas gotas presentes na parede do frasco com auxílio de um microscópio estereoscópio com aumento de 50x (metodologia com ágar-água); **D)** Seta indicando sinal onde os nematoides foram inoculados os nematoides pela metodologia sem ágar-água; **E)** Frasco com cilindro de cenoura em bom estado de conservação pela metodologia sem ágar-água.

4. DISCUSSÃO

O menor percentual de contaminação pela metodologia com ágar-água, provavelmente está relacionado ao fato de que os cilindros de cenoura não ficaram em contato com a umidade acumulada no fundo do frasco, a qual propicia um ambiente para a proliferação de microrganismos indesejáveis. Portanto, esta inovação nessa técnica melhorou as condições do ambiente controlado em relação às técnicas adotadas por O'Bannon e Taylor (1968), Castro e Ferraz (1989a e b), Fallas e Sarah (1994), Castillo *et al.* (1995) e Boisseau e Sarah (2008), pois em todas estas o material vegetal fica em contato com o meio agar-água podendo aumentar o grau de contaminação. Apesar de que a metodologia da outra técnica não usar o meio agar-água, o cilindro fica em contato com o acúmulo de umidade no fundo do frasco.

A utilização de cenouras frescas provenientes de cultivo orgânico também contribuiu para a redução da contaminação dos frascos. Na multiplicação *in vitro* de nematoides, o rendimento na preparação dos frascos com cenouras de plantio convencional foi visivelmente inferior em comparação com o uso de cenouras de cultivo orgânico (Dilson C. Costa, comunicação pessoal). Gonzaga (2006) ao contrário do que foi feito neste ensaio, não utilizou cenouras orgânicas, mas conseguiu resultados satisfatórios.

É importante lembrar que uma boa axenização dos nematoides também irá influenciar na manutenção da integridade dos cilindros de cenoura, evitando que ocorram contaminações posteriores à inoculação dos nematoides e, portanto prolongando o tempo de multiplicação dos nematoides e conservação da cultura. Vários autores observaram que axenização com compostos mercuriais, separadamente ou em combinações com antibióticos, para diferentes espécies de nematoides são bastante efetivos para a multiplicação de diferentes espécies de nematoides (Moutain e Patrick, 1959; O'Bannon e Taylor, 1968; Chitambar e Raski, 1985; Castro e Ferraz, 1989b; Costa, 2004; Gonzaga, 2006; Boisseau e Sarah, 2008).

Acreditamos que a metodologia com ágar-água mostrou-se mais efetiva para a multiplicação das populações de *R. similis* e *P. brachyurus* do que a metodologia sem ágar-água, pois a umidade no interior dos frascos no primeiro método foi aparentemente mais elevada. Castro e Ferraz (1989b) avaliando dois métodos para a multiplicação *in vitro* de *P. brachyurus*, *P. zaeae*, *R. similis* e *Tylenchorhynchus* sp. em discos de cenoura observaram que a manutenção de discos de cenoura em placas de Petri com meio agar-água proporcionou melhores condições de umidade e aeração para a multiplicação dos

nematoides do que a manutenção dos discos em frasco de vidro sem agar-água. No entanto, Moody *et al* (1973) demonstraram que maiores quantidades de cenoura seriam suficientes para manter a umidade necessária de modo a dispensar o uso de meio agar-água. Provavelmente o tamanho do frasco também influencie na manutenção da umidade no interior do frasco.

As maiores médias do número final de nematoides, tanto para *R. similis* quanto para *P. brachyurus*, ocorreram aos 60 dias na metodologia com ágar-água. Castro e Ferraz (1989b) obtiveram as maiores populações de nematoides 60 dias após a inoculação. Gonzaga (2006), a partir dos 60 dias após a inoculação dos cilindros de cenoura, observou manchas necróticas escurecidas no topo dos cilindros, indicando o estabelecimento do nematoide.

Alguns autores relataram que em torno de 40 e 45 dias após a inoculação, um grande número de nematoides já pode ser extraído dos frascos contendo os discos de cenoura (Moody *et al.*, 1973; Fallas e Sarah, 1994; Boisseau e Sarah, 2008). Portanto a avaliação até 60 dias adotados neste trabalho é bem representativa para a comparação dos métodos em questão. No entanto, o estado de conservação dos cilindros de cenoura aos 60 dias ainda era bom e a multiplicação dos nematoides ainda poderia avançar por um período de tempo mais prolongado. Fallas e Sarah (1994) conseguiram manter a multiplicação em discos de cenoura por até 75 dias à temperatura de 27 °C, podendo avançar para 135 dias quando mantidos em temperaturas de 15 °C. Gonzaga (2006) também conseguiu obter altas populações de espécies de *Pratylenchus* aos 120 dias após a inoculação, assim como Castillo *et al.* (1995) obtiveram altas populações de *P. thornei* após 100 dias da inoculação.

Sobre o tempo necessário para a obtenção de altas populações de nematoides, é importante deixar claro que existem diferenças entre as diversas populações e espécies, devido a diferença de agressividade de cada população ou espécie. Costa (2004) trabalhando com 12 populações diferentes de *R. similis*, verificou que as populações mais agressivas se reproduziam mais rapidamente que populações menos agressivas. Em um experimento, ao avaliar a dinâmica de três populações de *R. similis* (originárias de Cuba, Costa Rica e Brasil), este autor verificou que a população cubana, por exemplo, atingia o ápice da capacidade reprodutiva aos 60 dias, enquanto a brasileira aos 90 dias e a costa riquenha aos 120 dias. Como no presente trabalho utilizamos uma das populações brasileiras de *R. similis* mais agressivas avaliadas por Costa (2004), obtivemos resultados satisfatórios aos 60 dias de multiplicação. Os melhores resultados obtidos por Gonzaga (2006) em seus experimentos em comparação aos aqui apresentados, também podem ter

ocorrido por estar trabalhando com populações de *Pratylenchus* mais agressivas que a utilizada neste ensaio.

A multiplicação de *P. brachyurus* e *R. similis* em cilindros de cenoura é uma técnica de fácil execução, de baixo custo e adequada à produção massiva desses nematoides, tanto para a produção de inóculo, manutenção de populações diversas para estudos morfológicos e moleculares e, outras finalidades. E, portanto a metodologia com ágar-água mostrou-se mais adequada à multiplicação desses nematoides, uma vez que propiciou maiores quantidades de nematoides aos 60 dias e por apresentar menores taxas de contaminação do que a metodologia sem ágar-água.

5. CONCLUSÕES

Ambos os métodos possibilitam a multiplicação de *Radopholus similis* e *Pratylenchus brachyurus*. No entanto, o método de multiplicação com ágar-água foi mais efetivo, por resultar em maiores populações de nematoides após 60 dias e, por apresentar menores níveis de contaminação. O período mínimo de 60 dias deve ser adotado em situações onde a população inicial é de 25 fêmeas por frasco.

6. LITERATURA CITADA

BOISSEAU, M. e SARAH, J.L. *In vitro* rearing of Pratylenchidae nematodes on carrot discs. *Fruits* 63:307-310. 2008.

CASTILLO, P.; TRAPERO-CASAS, J.L.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. Effect of time, temperature, and inoculum density on reproduction of *Pratylenchus thornei* in carrot disk cultures. *Journal of Nematology* 27(1):120-124. 1995.

CASTRO, M.E.A. e FERRAZ, S. Avaliação de cinco métodos de axenização para *Pratylenchus brachyurus*, *P. zaeae*, *Radopholus similis* e *Tylenchorhynchus* sp. *Nematologia Brasileira* 13:21-30. 1989a.

CASTRO, M.E.A. e FERRAZ, S. Multiplicação 'in vitro' de *Pratylenchus brachyurus*, *P. zaeae*, *Radopholus similis* e *Tylenchorhynchus* sp. em discos de cenoura. *Nematologia Brasileira* 13: 31-38. 1989b.

CHITAMBAR, J.J. e RASKI, D.J. Life history of *Pratylenchus vulnus* on carrot disks. *Journal of Nematology* 17:235-236. 1985.

COOLEN, W.A. e D'HERDE, C.J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent: Nematology and Entomology Research Station, 77p. 1972.

COSTA, D.C. Variabilidade patogênica e genética de *Radopholus similis* em bananeira no Brasil. Tese (Doutorado), Universidade de Brasília, Brasília. 2004.

DI VITO, M.; CATALANO, F. e ZACCHEO, G. Reproduction of six populations of *Pratylenchus* spp. from the Mediterranean region on selected plant species. *Nematologia Mediterranea* 30:103-105. 2002.

FALLAS, G. e MARBAN-MENDOZA, N. Respuesta de tres cultivares y un híbrido de *Musa* a *Radopholus similis* en Costa Rica. *Nematropica* 24:161-164. 1994.

FALLAS, G.A. e SARAH, J.L. Efecto de La temperatura de almacenamiento sobre la reproducción *in vitro* de *Radopholus similis*. *Nematropica* 24:175-177. 1994.

- FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. Revista Symposium (Lavras) 6:36-41. 2008.
- GONZAGA, V. Caracterização morfológica, morfométrica e multiplicação *in vitro* das seis espécies mais comuns de *Pratylenchus* Filipjev, 1936 que ocorrem no Brasil. Tese (Doutorado). UNESP, Jaboticabal, SP. 2006.
- HASTINGS, R.J. e BOSHER, J.E. A study of the pathogenicity of the meadow nematode and associated fungus *Cylindrocarpon radicumicola*. Canadian Journal of Research 16:225-229. 1938.
- KRUSBERG, L.R. Studies on the culturing and biochemistry of *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzemabosi* on alfafa tissues. Nematologica 6:181-200. 1961.
- LUC, M. e VILARDEBO, A. Les nematodes associé aux bananiers cultivés dans l'Quest African. I – Espèces parasites, dommages causes. Fruits 16:205-279. 1961.
- MOODY, E.H.; LOWNSBERY, B.F. e AHMED, J.M. Culture of Root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* on carrot disks. Journal of Nematology 5:225-226. 1973.
- MOUNTAIN, W.B. A method of culturing plant parasitic nematodes under sterile conditions. Proceeding of the Helminthological Society of Washington 22:49-52. 1955.
- O'BANNON, J.H. e TAYLOR, A.L. Migratory endoparasitic nematodes reared on carrot disks. Phytopathology 58:385. 1968.
- SANTOS, J.R.P. Caracterização de genótipos de Musa com base na reação a *Radopholus similis* e de genótipos contrastantes para resistência com base em marcadores moleculares RAPD. Dissertação (Mestrado), Universidade de Brasília, Brasília. 2007.
- SASSER, J.N. e FRECKMAN, D.W. A world perspective on nematology, the role of society. In: Veech JA, Dickson DW (eds). Vistas on Nematology. Hyattsville: Society of Nematologists, p. 7-14. 1987.
- STOFFELEN, R.; JIMENEZ, M.I.; DIERCKXSENS, C.; TAM, V.T.T.; SWENNEN, R. e DE WAELE, D. Effect of time and inoculum density on the reproductive fitness of *Pratylenchus coffeae* and *Radopholus similis* populations on carrot disks. Nematology 1:243-250. 1999.

TIHOHOD, D. Nematologia agrícola aplicada. Jacoticabal: FUNEP. 372 p. 1993.

VERDEJO-LUCAS, S. e PINOCHET, J. Population densities of five migratory endoparasitic nematodes in carrot disk cultures. *Journal of Nematology* 24:96-98. 1992.

VILLAIN, L. Caractérisation et bioécologie du complexe parasitaire du genre *Pratylenchus* (Nemata : Pratylenchidae) présent sur caféiers (*Coffea* spp.) au Guatemala. Montpellier: CIRAD (Thèse de doctorat: Biologie et agronomie). 312p. 2000.

CAPÍTULO 3

**REAÇÃO DE ACESSOS DE BANANEIRA A TRÊS POPULAÇÕES DE
RADOPHOLUS SIMILIS.**

REAÇÃO DE ACESSOS DE BANANEIRA A TRÊS POPULAÇÕES DE *RADOPHOLUS SIMILIS*.

RESUMO

O nematoide cavernícola, *Radophulus similis*, está entre os mais danosos e amplamente distribuídos em cultivos de bananeira, podendo causar grandes perdas na cultura. Diante da dificuldade de controle do nematoide cavernícola o uso de plantas resistentes é uma das opções mais promissoras a seu controle e, portanto a descoberta de novas fontes de resistência será de grande utilidade aos programas de melhoramento genético da banana para resistência ao nematoide. O objetivo deste estudo foi avaliar a reação de oito acessos de bananeiras a diferentes populações de *R. similis*, bem como a agressividade das populações avaliadas. Os acessos de *Musa acuminata* 4249-05, 4279-06, Yangambi Km5, 0323-03, 0337-02, 1304-06, Borneo e Grande Naine foram obtidos no banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, onde as mudas foram produzidas por micropropagação. Esses acessos foram inoculados com uma suspensão de 400 nematoides por planta e mantidas em casa de vegetação por um período de 60 dias. Cada acesso foi inoculado com três populações de *R. similis* provenientes de Pernambuco, Distrito Federal e Santa Catarina, separadamente, com cinco repetições. Variáveis como o número de nematoides por grama de raiz, número de nematoides por sistema radicular, número de nematoides no solo e número total de nematoides, fator de reprodução e percentagem do fator de reprodução foram avaliadas. Os acessos 4249-05, Yangambi Km5, 0323-03 e 4279-06 expressaram níveis diferentes de resistência ao nematoide cavernícola, podendo ser consideradas para futuros trabalhos de melhoramento genético visando resistência ao nematoide. A população de PE foi considerada mais agressiva em relação à do DF e, esta por sua vez mais agressiva que a de SC. Dependendo da agressividade da população do nematoide sobre cada um dos acessos, estes expressaram diferentes reações ao nematoide. Assim, os acessos que apresentaram algum grau de resistência poderão ter os danos amenizados quando parasitados por populações menos agressivas de *R. similis*.

Palavras-chave: Resistência; nematoide cavernícola; agressividade.

HOST REACTION OF BANANA ACCESSIONS TO THREE POPULATIONS OF *RADOPHOLUS SIMILIS*.

ABSTRACT

The burrowing nematode, *Radopholus similis*, is among the most damaging and widely distributed pathogens of bananas, and can lead to major losses in this crop. Due the difficulty of control of the burrowing nematode, the use of resistant plants is one of the most promising approaches. The discovery of sources of resistance will be useful for breeding programs of bananas for resistance to nematodes. Therefore, the aim of this study was to access the degree of resistance of eight accessions of banana to different populations of *R. similis*, and to verify differences in aggressiveness between populations of the nematode. Genotypes 4249-05, 4279-06, Yangambi Km5, 0323-03, 0337-02, 1304-06, Borneo and Grande Naine were obtained from the active germplasm bank of Embrapa Cassava and Fruits, where the seedlings were produced by micropropagation. These accessions were inoculated with a suspension of 400 nematodes per plant and maintained in a greenhouse for a period of 60 days. Each access was inoculated with three populations of *R. similis* from Pernambuco (PE), Federal District (DF) and Santa Catarina (SC), separately, with five replicates. Variables such as number of nematodes per gram of root, number of nematodes per root system, number of nematodes in soil and total number of nematodes, the reproduction factor and percentage reduction of the reproduction factor were evaluated. Accessions 4249-05, Yangambi Km5, 0323-03 and 4279-06 expressed different levels of resistance, which may be considered for future plant breeding for resistance to the nematode. The population of PE was considered more aggressive compared to the one of DF, and this in turn more aggressive than that one from SC. According to the aggressiveness of the nematode population to each accession, produced different reactions to the nematode. Thus, the ones that showed some degree of resistance will potentially mitigate the damage when infested by less aggressive populations of *R. similis*.

Keywords: Resistance; burrowing nematode; aggressiveness.

1. INTRODUÇÃO

A banana é a fruta tropical mais popular e amplamente consumida no mundo e, em muitos países, é o principal alimento e fonte de renda familiar. Entretanto os campos de produção de bananas são afetados por um complexo de pragas e doenças, sendo que várias espécies de nematoides infestam raízes de bananeiras com diversas consequências, restringindo a produção (Mendoza *et al.*, 2008).

O nematoide endoparasita migratório *Radopholus similis* (Cobb 1893) Thorne 1949 está entre os nematoides mais danosos e amplamente disseminados em plantações de banana no mundo, causando perdas severas e, sendo, portanto considerado o nematoide mais importante para a cultura (Gowen *et al.*, 2005). A infestação por nematoides resulta em danos nas raízes, reduzindo a absorção de água e nutrientes podendo em alguns casos afetar o crescimento, reduzir a produtividade e levar a queda das plantas (Speijer e De Waele, 1997).

O manejo deste nematoide em sistemas de produção de larga escala é feito principalmente, pela aplicação repetida de nematicidas (Gowen e Quénéhervé, 1990). Entretanto o uso destes compostos resulta em desvantagens para o meio ambiente e para a saúde dos aplicadores. Mais recentemente, o controle de nematoides em plantios de banana tem incluído novas práticas como o uso de plantas micropropagadas e a rotação de cultura (Quénéhervé, 2008). O melhoramento de bananeiras para a resistência a nematoides é uma opção apropriada para o manejo sustentável de nematoides, embora existam poucos relatos de resistência em bananeiras a nematoides.

Em bananas e plátanos, poucos têm sido os avanços no melhoramento para a resistência a nematoides devido à complexidade genética do gênero *Musa* (Haegeman *et al.*, 2010) e à alta variabilidade entre populações de *R. similis* (Costa *et al.*, 2008). Entretanto diferentes cultivares e híbridos têm sido testados para a resistência a nematoides.

Algumas fontes de resistência têm sido relatadas em alguns genótipos, como Pisang Jari Buaya (Pinochet e Rowe, 1978), Yangambi Km5 (Fogain e Gowen, 1997; Costa, 2004; Quénéhervé *et al.*, 2009a), Kunnan (Collingborne e Gowen, 1997). Além desses, outros acessos promissores têm sido identificados com algum grau de resistência (Moens *et al.*, 2005; Quénéhervé *et al.*, 2009b; Dochez *et al.*, 2009).

As reações dos acessos de bananeira também dependem da agressividade da população do nematoide, a qual está ligada à capacidade reprodutiva e à virulência do

patógeno. As populações mais agressivas de nematoides se reproduzem rapidamente, causando danos severos nas raízes. Existem diversos relatos de que há uma correlação direta entre a quantidade de nematoides presentes nas raízes e danos (Fallas *et al*, 1995; Marín *et al.*, 1999; Moens *et al.*, 2001; Moens, 2004; Costa, 2004), conseqüentemente a quantidade de nematoides nas raízes pode ser utilizada para determinar a diferença de agressividade entre populações de *R. similis*.

Portanto, os objetivos deste estudo foram avaliar a reação de acessos de bananeiras a diferentes populações de *R. similis*, bem como detectar diferenças de agressividade entre populações do nematoide.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os acessos (Tabela 1) foram obtidos a partir do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, onde mudas foram produzidas por micropropagação e aclimatadas por três semanas em câmara de crescimento (27-28 °C) com 12 horas de fotoperíodo. As plântulas foram transplantadas para vasos de 1,5 L, contendo mistura autoclavada de latossolo vermelho e areia, na proporção de 3:1. A acidez do solo foi corrigida com calcário com PRNT de 95% e solo adubado com NPK 4:14:8 atendendo a necessidade do nutriente mais limitante de acordo com a recomendação de adubação para a cultura (Borges, 2004). Após o transplante, as mudas foram mantidas em casa de vegetação, situada na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília pelo período de 15 dias. Os acessos avaliados anteriormente por Santos (2007) foram agora reavaliados com outras duas populações do nematoide provenientes do Distrito Federal e de Santa Catarina, além na população de Pernambuco da primeira avaliação. A população do nematoide proveniente do estado de Pernambuco foi coletada originalmente em Petrolina em plantas de bananeira cultivar Pacovan (AAB). A população proveniente de Santa Catarina foi coletada em Luís Alves em plantas de bananeira pertencentes ao grupo Cavendish e a população do Distrito Federal foi coletada no Núcleo Rural Rajadinha em plantas de *Musa coccínea* Andrews e de espécies de *Heliconia* L.

Tabela 1. Lista de acessos de *Musa* spp. utilizados para avaliar a reação a *Radopholus similis*.

Número	Acessos	Reação a <i>R. similis</i> (Santos, 2007)
1	Borneo	Altamente suscetível
2	Grande Naine	Suscetível
3	1304-06	Suscetível
4	4279-06	Resistente
5	0323-03	Resistente
6	0337-02	Resistente
7	Yangambi Km5	Parcialmente Resistente
8	4249-05	Altamente resistente

Todas as populações vinham sendo mantidas em plantas de bananeira cv. Grande Naine e posteriormente os nematoides foram multiplicados em cultura de tecido de cilindros de cenoura (*Daucus carota* L.), conforme metodologia mencionada (método com ágar-água) no segundo capítulo desta tese.

Decorrido o período de aclimação das mudas microporpagadas, estas foram inoculadas com o nematoide *R. similis*. Os nematoides foram extraídos dos cilindros de cenoura combinando a trituração, peneiramento e centrifugação. Os nematoides foram recuperados em peneiras de 400 mesh e por lavagem com água destilada esterilizada da parede interna dos frascos contendo os cilindros de cenoura com nematoides. O inóculo recolhido em béqueres foi calibrado para 400 nematoides/ml, sendo que apenas os nematoides ativos foram contados para inoculação. Dois orifícios opostos foram abertos ao redor das mudas expondo as raízes onde a suspensão de nematoides (1 ml) foi depositada sobre as raízes. As plantas permaneceram por 60 dias em casa de vegetação, no período de 18 de setembro de 2009 a 18 de novembro de 2009, sendo que as plantas foram distribuídas sobre bancadas na casa de vegetação de maneira inteiramente ao acaso, com cinco repetições para cada acesso.

Após 60 dias, os nematoides foram extraídos das raízes e do solo das bananeiras pelos métodos modificados de Coolen e D'Herde (1972) e de Jenkins (1964), respectivamente, para avaliação dos níveis populacionais de *R. similis*. Tanto a extração de nematoides do solo como da raiz foram realizadas por amostragem e, para esse fim, 100 cc

de solo e 10g de raiz foram utilizados. Após a extração os nematoides de cada amostra foram contados sob microscópio estereoscópico, sendo os mesmos contados em três alíquotas de 2 ml, compondo uma média cujos resultados foram extrapolados para o total de solo e para o total de raiz. Todas as plantas tiveram suas raízes lavadas e pesadas anteriormente ao processo de extração. Raízes que pesaram menos de 10 g foram utilizadas por completo na extração.

A reação das mudas de bananeira a *R. similis* foi avaliada conforme o fator de reprodução, estimado para cada repetição ($FR = \text{população final} / \text{população inicial}$), sendo que a população final corresponde ao total de nematoides recuperados do solo e das raízes. A avaliação da reação dos acessos de bananeiras ao nematoide seguiu a escala de percentagem de redução do fator de reprodução (FR) (Sasser *et al.*, 1987). A cultivar que apresentou o mais alto fator de reprodução do nematoide foi considerada como padrão de suscetibilidade (Moura e Régis, 1987). Os acessos Grande Naine e Yangambi Km5 foram incluídos como padrão de suscetibilidade e de resistência ao nematoide cavernícola, respectivamente.

Variáveis como o número de nematoides por grama de raiz, número de nematoides por sistema radicular, número de nematoides no solo e número total de nematoides foram também avaliadas.

Para efeito da análise estatística os dados originais foram transformados em $\log(x)$. Para avaliar a resistência dos acessos as médias das variáveis foram calculadas e comparadas pelo teste de Tukey 1 %, após análise de variância, utilizando o software SISVAR (Ferreira, 2008).

3. RESULTADOS

A análise de variância mostrou que houve diferença estatística entre pelo menos dois dos acessos para todas as variáveis analisadas ao nível de significância de 1% de probabilidade. Entre as populações de nematoide só não houve diferença estatística significativa para a variável peso de raiz, sendo que as outras variáveis testadas diferiram estatisticamente a 1 % de probabilidade. Houve apenas diferença estatística significativa para a interação entres os diferentes acessos e populações do nematoide para a variável número de nematoides na raiz (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância de seis variáveis relacionadas à resistência de oito acessos de bananeira a três populações de *Radopholus similis*.

FV	GL	QM				
		Nematoides na raiz	Nema/g raiz	Nematoides no solo	Total nematoides	FR
Acessos	7	5,523**	2,004**	5,606**	1,822**	0,571**
Populações	2	21,566**	11,350**	6,850**	20,141**	5,540**
A-1 X P-1	14	1,225**	0,247 ^{NS}	1,029 ^{NS}	0,866 ^{NS}	0,121 ^{NS}
P-1 X A-1	14	1,225**	0,247 ^{NS}	1,029 ^{NS}	0,866 ^{NS}	0,121 ^{NS}
Resíduo	58	0,379	0,187	0,595	0,487	0,076
CV(%)		23,38	32,02	98,33	24,85	48,00
Média Geral		2488,35	66,93	87,56	2575,32	7,02

QM: Quadrado médio; **Quadrado médio estatisticamente significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey; ^{NS} Quadrado médio estatisticamente não significativo; FV: Fonte de variação; GL: Grau de Liberdade; FR: Fator de reprodução; CV: Coeficiente de variação.

Os menores números de nematoides encontradas na raiz (Tabela 3) foram observados nos acessos 4249-05 e Yangambi Km5 (328,17 e 562,69 nematoides, respectivamente). Esse mesmo comportamento foi observado para o número de nematoides por grama de raiz, para o total de nematoides encontrados em cada acesso e para o fator de reprodução. Já as maiores quantidades de nematoides encontradas em raízes foram observadas nos acessos 1304-06, Borneo e Grande Naine (5729,6; 3431,23 e 3023,53, respectivamente). Neste caso apenas o fator de reprodução teve o mesmo comportamento. O número de nematoides por grama de raiz (Tabela 3) variou de 20,19 (Yangambi Km5) a 129,6 (Grande Naine). As menores médias foram observadas nos acessos 4249-05 e Yangambi Km5. Os acessos Grande Naine, 0337-02 e 1304-06 tiveram as maiores médias. O número total de nematoides (Tabela 3) nos acessos variou de 490,35 (4249-05) a 7729,6 (1304-06).

Em relação à quantidade de nematoides presentes no solo (Tabela 3) as menores médias foram encontradas nos acessos 1304-06, Grande Naine, seguidas por Borneo, sendo que nenhum nematoide foi encontrado no solo em 1304-06 e Grande Naine e, apenas 10,89 dos nematoides foram encontrados associados ao acesso Borneo. Já as maiores quantidades de nematoides encontradas no solo estavam presentes nos acessos Yangambi Km5, 0337-02, 4249-05 e 4279-06.

O fator de reprodução (Tabela 3) variou de 1,22 (4249-05) a 14,32 (1304-06), sendo que as menores médias foram encontradas nos acessos 4249-05 e Yangambi Km5 e, as maiores nos acessos 1304-06 e Borneo.

Tabela 3. Reação de oito acessos de bananeira a três populações de *Radopholus similis*.

Acessos	Nematoides na raiz¹		Nematoides /grama de raiz¹		Nematoides no Solo¹		Total nematoides¹		FR¹	
1304-06	5729,60	c	105,44	c	0,00	a	7729,60	c	14,32	c
Borneo	3431,23	c	71,62	bc	10,89	ab	3437,42	bc	13,29	c
0337-02	2880,00	bc	104,27	c	168,18	c	3048,19	abc	7,62	bc
G. Naine	3023,53	c	129,60	c	0,00	a	3023,53	abc	7,55	bc
4279-06	2294,56	bc	37,99	bc	116,25	bc	2410,81	abc	6,02	abc
0323-03	1657,00	bc	39,28	bc	30,93	ab	1687,93	abc	4,21	ab
Yangambi Km5	562,69	b	20,19	a	212,06	c	774,75	ab	1,93	a
4249-05	328,17	a	27,07	b	162,18	bc	490,35	a	1,22	a

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna são iguais estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,01$).

Com base na porcentagem de redução do FR (Tabela 4), dos oito acessos avaliados, dois foram classificados como altamente resistentes, dois como suscetíveis, dois como baixa resistência e dois parcialmente resistentes. Assim como o acesso Borneo, o diplóide 1304-06 reagiu como altamente suscetível. Os acessos 0337-02 e Grande Naine foram classificados com suscetíveis, 4279-06 e 0323-03 como de baixa resistência. Apenas Yangambi Km5 e 4249-05 foram considerados parcialmente resistentes.

Tabela 4. Reação de acessos de bananeira a três populações de *Radopholus similis* baseada na porcentagem de redução do fator de reprodução.

Acessos	FR¹	RFR²	Reação³
1304-06	14,32c	0	AS
Borneo	13,29bc	7	AS
0337-02	7,62bc	47	S
G. Naine	7,55abc	47	S
4279-06	6,02ab	58	BR
0323-03	4,21ab	71	BR
Yangambi Km5	1,93 ^a	87	PR
4249-05	1,22 ^a	91	PR

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna são iguais estatisticamente pelo teste de Tukey (P≤0,01). FR (Fator de reprodução) = População final /População inicial.

²Redução do fator de reprodução (RFR) = (100 – (FR x 100/14,32)); onde: FR = fator de reprodução no tratamento. ³Comportamento dos acessos de bananeira: PR =Parcialmente Resistente (76,0 - 95,0); BR = Baixa Resistência (51,0 – 75,0); S = Suscetível (26,0 – 50,0); e AS = Altamente suscetível (0 – 25,0) (Sasser *et al.*, 1987).

A população de *R. similis* de Pernambuco (PE) foi a população que teve as maiores médias nas variáveis nematoides na raiz, nematoides por grama de raiz, total de nematoides e fator de reprodução. Já a população de Santa Catarina (SC) foi a que teve as menores médias para todas as variáveis. A população do Distrito Federal (DF) teve médias intermediárias para as variáveis nematoides na raiz, nematoides por grama de raiz, total de nematoides e fator de reprodução (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito de três populações de *Radopholus similis* sobre oito acessos de bananeira.

População (origem)	Peso da raiz¹	Nematoides raiz¹	Nematoides/ grama de raiz¹	Nematoides no solo¹	Total nematoides¹	FR¹
PE	37,99 a	6118,45 c	151,75 c	171,49 b	6289,94 c	15,7 c
DF	27,71 a	1025,98 b	38,38 b	74,11 b	1098,33 b	4,50 b
SC	26,16 a	320,61 a	10,66 a	17,08 a	337,70 a	0,84 a

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna são iguais estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,01$).

A quantidade média de nematoides presentes nas raízes de cada acesso não se repete quando analisada separadamente para cada população de nematoide. Enquanto que na média geral 1304-06, Borneo e Grande Naine tiveram as maiores quantidades de nematoides na raiz (5729,60, 3431,23 e 3023,53, respectivamente), mas quando desafiados com a população de Pernambuco, o acesso com maior número de nematoides na raiz foi o 1304-06, seguido por Borneo e 0337-02. Para os acessos desafiados pela população do Distrito Federal, Grande Naine foi a que teve maior quantidade de nematoide na raiz, seguida por 1304-06, 0337-02 e Borneo, mas quando os acessos foram submetidos à população de Santa Catarina foram Borneo, Grande Naine, 0323-03 e 1304-06 os que apresentaram maiores quantidades de nematoides.

Os acessos que apresentaram as menores quantidades de nematoides na raiz foram 4249-05, Yangambi Km5 e 0323-03 para a população de Pernambuco, Yangambi Km5, 0323-03, 4249-05 e 4279-06 para a do Distrito Federal e, Yangambi Km5, 4249-05 e 4279-06 para a de Santa Catarina.

A população do Distrito Federal teve menor quantidade de nematoide na raiz para o acesso Yangambi Km5 (9,06 nematoides), seguido pelos acessos 0323-03, 4249-05 e 4279-06 (275,35, 359,76 e 450,19, respectivamente). Os acessos restantes tiveram as maiores quantidades de nematoide na raiz. Os acessos Yangambi Km5, 4249-05 e 4279-06 (0, 29,53, 45,45, respectivamente) tiveram as menores quantidades de nematoide na raiz para a população de Santa Catarina e a maior quantidade para o acesso Borneo (1229,38). Já para a população de Pernambuco, a menor quantidade de nematoide na raiz foi observada no acesso 4249-05 (595,21) e a maior para 1304-06 (15478,62) (Tabela 6.).

Os acessos 1304-06, 0337-02 e 4249-05 tiveram a menor quantidade de nematoide na raiz para a população de Santa Catarina (308,93; 135,10 e 29,53, respectivamente) e a maior para a de Pernambuco (15478,62; 7470,56 e 595,21, respectivamente). No caso de 0323-03 e Yangambi Km5 as médias de nematoides na raiz foram maiores para a população de Pernambuco (4289,91 e 1679,02, respectivamente). Para o acesso 4279-06 a população de Santa Catarina teve a menor quantidade e diferiu das outras populações de nematoide. Borneo teve a menor quantidade para a população do Distrito Federal e a maior para a de Pernambuco. Para o acesso Grande Naine houve diferença estatística entre a população de SC em relação às demais (Tabela 6).

Tabela 6. Médias do número de nematoides presentes na raiz de oito acessos de bananeira inoculados com três populações de *Radopholus similis*.

Acessos	Populações		
	DF ¹	SC ¹	PE ¹
1304-06	1401,25 bcAB	308,93 cdA	15478,62 bB
Borneo	1008,23 bcA	1229,38 dAB	8056,08 abB
G. Naine	3669,68 bcB	410,76 cdA	4990,16 abB
0337-02	1034,34 bcAB	135,10 bcA	7470,56 abB
4279-06	450,19 bAB	45,45 abA	6388,03 abB
0323-03	275,35 bA	405,74 cdA	4289,91 abB
Yangambi Km5	9,06 aA	0,00 aA	1679,02 abB
4249-05	359,76 bAB	29,53 abA	595,21 aB

¹Médias seguidas pela mesma letra (minúscula) na coluna são iguais estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,01$). Médias seguidas pela mesma letra (maiúscula) na linha são iguais estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,01$).

4. DISCUSSÃO

Os acessos 1304-06 e Borneo tiveram os maiores valores do fator de reprodução (FR), caracterizando-as como plantas altamente suscetíveis a *R. similis*. Estes dois acessos apresentaram um maior número total de nematoides, com a maior parte dos nematoides presentes no interior das raízes e menos nematoides no solo, mostrando que esses acessos são excelentes hospedeiras ao nematoide. Apesar desses acessos não terem apresentado maiores quantidades de nematoides por grama de raiz, grande quantidade de nematoide foi encontrada por grama de raiz, o que também os qualifica como bons hospedeiros às três populações do nematoide. Em trabalho realizado por Costa *et al.*, (1998), o acesso 1304-06 teve reação de suscetibilidade com fator reprodução de 28,54, superior ao encontrado neste trabalho (14,32). O mesmo acesso quando testado por Santos (2007) teve um fator de reprodução (11,00) um pouco mais próximo do encontrado neste trabalho.

De acordo com Wehunt *et al.* (1978) a espécie silvestre Borneo (*Musa acuminata* subsp. *microcarpa* Simmonds) se comportou como uma boa hospedeira ao nematoide cavernícola, assim como no presente estudo. Santos (2007) avaliando ‘Borneo’ obteve

resultado semelhante, já que o acesso foi considerado altamente suscetível com um fator de reprodução de 21,31. Nesse trabalho o autor utilizou a população de Pernambuco, uma das utilizadas no presente ensaio, considerada de alta agressividade. Quénehervé *et al.*, (2009a) avaliando 55 acessos de bananeira a *R. similis* verificaram que ‘Borneo’ favoreceu o maior fator de reprodução. Segundo Teixeira (2007), Borneo comportou-se como altamente resistente a *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, suscetível a *M. incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949 e, moderadamente resistente a *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949.

A alta suscetibilidade demonstrada pelo acesso 1304-06 pode ter ocorrido pelo fato dele ser resultante do cruzamento de Malaccensis-FHIA com Madang (*Musa acuminata* subsp. *banksii* (F.Muell) Simmonds). *Musa acuminata* subsp. *banksii* foi classificada anteriormente por Wehunt *et al.*, (1978) como suscetível, o que não qualifica esse acesso como promissor para obtenção de plantas resistentes a *R. similis*.

Gowen (1976) verificou que o acesso M48 não era um bom hospedeiro de *R. similis* nem a *Helicotylenchus multicinctus* (Cobb, 1893) Golden, 1956. Então, possivelmente o genótipo M48 tenha transferido genes de resistência ao híbrido 4249-05, o qual foi considerado parcialmente resistente no presente trabalho.

Os acessos M48 e M53 são híbridos oriundos da Jamaica, os quais estão sendo utilizados como fonte de resistência a diversos patógenos (Silva *et al.*, 1998). Os acessos 4249-05 e 4279-06 têm estes híbridos como parentais e podem ter herdado algum gene que lhes confere algum grau de resistência. O híbrido 4249-05 (M53 x M48) apresentou a menor quantidade total de nematoide no solo e na raiz e foi caracterizado como parcialmente resistente. Além disso, este híbrido obteve a maior redução do fator de reprodução em relação a 1304-06. O híbrido 4279-06, considerado de baixa resistência, além de ter o acesso M53 como parental feminino, tem como ancestral paterno o genótipo Calcutta, também considerado resistente ao nematoide em outros estudos (Carlier *et al.*, 2003; Santos, 2007). Santos (2007) avaliando 26 genótipos de bananeira a uma população agressiva de *R. similis* obteve resultados semelhantes para os acessos 4249-05 e 4279-06 onde estes foram classificados como altamente resistente e resistente, respectivamente. No entanto, no presente trabalho, os acessos 4249-05 e 4279-06 apresentaram maiores quantidades de nematoides no solo e na raiz, maior quantidade de nematoides por grama de raiz e um fator de reprodução maior. Tais diferenças podem ter ocorrido devido à diferença na quantidade de inóculo inicial, uma vez que neste trabalho usamos 400 nematoides por planta enquanto Santos (2007) inoculou apenas 100 nematoides por planta. Outro fator

importante que pode ter contribuído para essas respostas diferentes deve-se ao fato de que as médias apresentadas neste trabalho são resultantes de três diferentes populações do patógeno.

Teixeira (2007) avaliando a resistência de bananeiras a três espécies de *Meloidogyne* verificou que o acesso 4279-06 se comportou como resistente a *M. incognita*, *M. arenaria* e moderadamente resistente a *M. javanica*. Portanto, esses acessos podem ser considerados promissores para o melhoramento de bananeiras resistentes a nematoides.

Os acessos 0323-03 e 0337-02 têm como parental feminino o genótipo Calcutta, mas, no entanto no presente estudo apenas o primeiro acesso mostrou algum grau de resistência, sendo considerado de baixa resistência. Santos (2007) classificou ambos os acessos como resistentes, apesar de usar apenas uma população de nematoide e inóculo inicial menor.

Os acessos Yangambi Km5 e Grande Naine que foram classificados como parcialmente resistente e suscetível, respectivamente, confirmaram seu comportamento padrão conforme relatado por diversos autores (Fogain e Gowen, 1998; Costa, 2004; Santos, 2007; Quénehervé *et al*, 2009a).

Embora o conjunto de acessos avaliado tenha expressado padrões de reação compatíveis com o nível de resistência ou susceptibilidade ao nematoide inerente a cada acesso, verificamos que o comportamento de cada acesso pode variar de acordo com a população de nematoide com qual tenham sido avaliados. Assim, a resposta do hospedeiro depende também do nível de agressividade de cada população do patógeno. Costa (2004) avaliando 12 populações diferentes de *R. similis* observou diferenças marcantes na capacidade reprodutiva e agressividade entre as populações sobre as cultivares Grande Naine, Pisang Jari Buaya e Yangambi Km 5. Foi observado também que populações mais agressivas causaram maiores danos sobre a cultivar Yangambi Km 5 e que poucos danos foram causados por populações menos agressivas nesta mesma cultivar. Estes resultados confirmam que a mesma cultivar pode não ser resistente a algumas populações, mas pode reduzir a reprodução de outras populações. É o caso do acesso Yangambi Km 5 que no presente estudo, teve menores densidades de nematoides nas raízes para a população de Santa Catarina, seguida pela população do Distrito Federal em relação à população de Pernambuco, considerada a de maior capacidade reprodutiva. Os acessos 4249-05, 4279-06, 0337-02, 1304-06 também hospedaram menores quantidades de nematoides na raiz para a população de Santa Catarina e, maiores para a de Pernambuco. Já Borneo e 0323-03

tiveram as menores quantidades de nematoides quando inoculados com a população do Distrito Federal.

Além de confirmar que os acessos de bananeira avaliados apresentaram diferentes reações ao parasitismo de *R. similis*, verificamos que existe diferença na capacidade reprodutiva entre as três populações do nematoide avaliadas, em que a população de Pernambuco teve a maior taxa de multiplicação, a de Santa Catarina a menor e a do Distrito Federal intermediária. Costa (2004) já havia demonstrado que a população de Pernambuco se colocou entre as mais agressivas e com maiores taxas de multiplicação, do universo de 12 populações brasileiras e do exterior avaliadas, sendo que esta população teve um dos maiores fatores de reprodução e causou a maior porcentagem de áreas lesionadas em raízes de bananeiras, além de apresentar uma das maiores porcentagens de raízes mortas. É importante ressaltar que, apesar de ter sido, por algumas vezes, multiplicada em discos de cenoura no decorrer de sete anos, a população proveniente de Pernambuco conservou a característica de ter uma alta capacidade reprodutiva e consequentemente alta agressividade, mostrando estabilidade no padrão de agressividade ao longo do tempo.

Costa (2004) avaliando outra população de Santa Catarina, também proveniente de Luís Alves, observou que a população do nematoide era menos agressiva, causando menos danos aos rizomas, apesar das altas taxas de multiplicação.

Um dos fatores que influenciam as perdas no campo é a capacidade reprodutiva das populações de *R. similis*. A capacidade reprodutiva tem sido estudada por diversos autores que têm encontrado uma variabilidade muito alta entre as populações do nematoide, seja a nível global ou regional (Tarté *et al.*, 1981; Pinochet, 1979; Fallas e Sarah, 1995; Stoffelen *et al.*, 1999; Costa, 2004). Diferenças entre populações de *R. similis* foram também confirmadas por estudos moleculares (Fallas *et al.*, 1996, Elbadri *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2008).

Diferenças na capacidade reprodutiva (Agressividade) entre populações de diferentes países podem estar relacionadas com a distribuição de *Musa* spp. pelo mundo (Marín *et al.*, 1998). Os efeitos climáticos, as condições do solo e o manejo do cultivo, também podem ter influenciado no desenvolvimento ou evolução de uma população com características próprias (Moens, 2004).

Portanto, a diferença de agressividade encontrada entre as três populações utilizados no presente estudo era esperada e esta de acordo com resultados obtidos por outros Costa (2004).

Cada uma das populações (PE, SC e DF) podem ter sido introduzidas de diferentes origens e em diferentes momentos e podem se encontrar em diferentes estágios evolutivos. As populações de *R. similis* podem ter se adaptado às condições de origem e ao serem utilizadas como inóculo em condições diferentes podem ter sua capacidade reprodutiva afetada. Como as condições climáticas do estado de Santa Catarina são diferentes daquelas do Distrito Federal, local onde foi realizado o experimento, com temperaturas anuais mais amenas, por exemplo, podem ter afetado o desenvolvimento do nematoide e por isso esta se mostrou menos agressiva do que as outras duas. Já no caso da população do DF, a qual tinha as mesmas condições climáticas, é proveniente de cultivos de *Musa coccinea* e *Heliconia* spp. e portanto estavam adaptadas e estas hospedeiras e também podem ter tido o seu desenvolvimento afetado. A população de Pernambuco pode não ter sido afetada uma vez que se adaptou melhor as condições do experimento.

5. CONCLUSÕES

Os acessos 4249-05, Yangambi Km 5, 0323-03 e 4279-06 expressaram certo grau de resistência a *R. similis*, podendo ser consideradas para programas de melhoramento futuros visando o controle do nematoide. Existe um gradiente de agressividade entre as população de *R. similis* avaliadas, em que a de Pernambuco é mais agressiva em relação à população do Distrito Federal e, esta por sua vez é mais agressiva que a de Santa Catarina. Dependendo do nível de agressividade do nematoide interagindo com cada um dos acessos, esses podem expressar reações diferenciadas às várias populações do patógeno. Assim, acessos com algum grau de resistência podem reagir com menos danos quando parasitadas por populações menos agressivas de *R. similis*, sendo fundamental a realização de ensaios prévios no sentido de se avaliar a agressividade de isolados antes de avaliar a reação de acessos de interesse.

6. LITERATURA CITADA

- BORGES, A.L. Recomendação de adubação para a bananeira. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. (Embrapa CNPMF, Comunicado Técnico, 106). 4 p. 2004.
- CARLIER, J.; DE WAELE, D. e ESCALANT, J.V. Global evaluation of *Musa* germplasm for resistance to *Fusarium* wilt, *Mycosphaerella* leaf spot diseases and nematodes. Performance evaluation (A. Vézina e C. Picq, eds). Inibap Technical Guidelines 7. p. 22. 2003.
- COLLINGBORNE, F. M. B. e GOWEN, S. R. Screening of banana cultivars for resistance to *Radopholus similis* and *Pratylenchus coffeae*. INTERNATIONAL NETWORK FOR IMPROVEMENT IN BANANAS AND PLANTAINS. Montpellier: InfoMusa 6: 3. 1997.
- COOLEN, W. A. e D'HERDE, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent State Agriculture Research Centre. Belgium: Merelbeke. 77p. 1972.
- COSTA, D. da C. Variabilidade patogênica e genética de *Radopholus similis* em bananeira no Brasil. 2004. Tese (Doutorado). Universidade de Brasília, Brasília. 2004.
- COSTA, D. da C.; FALEIRO, F.G.; CARES, J.E. e GOMES, A.C. Pathogenicity and genetic variability of *Radopholus similis* populations in bananas (*Musa acuminata* AAA and AA) based on RAPD analysis. Nematologia Brasileira 32: 303-308. 2008.
- COSTA, D. da C.; SILVA, S. de O. e ALVES, F. R. Reação de genótipos de bananeira (*Musa* sp.) a *Radopholus similis* e *Meloidogyne incognita*. Nematologia Brasileira 22: 49 – 56. 1998.
- DOCHEZ, C.; TENKOUANO, A.; ORTIZ, R.; WHYTE, J. e DE WAELE, D. Host plant resistance to *Radopholus similis* in a diploid banana hybrid population. Nematology 11, 329–335. 2009.
- ELBADRI, G.A.A.; DE LEY, P.; WAEYENBERGE, L.; VIERSTRAETE, A.; MOENS, M. e VANFLETEREN, J. Intraspecific variation in *Radopholus similis* isolates assessed with restriction fragment length polymorphism and DNA sequencing of the internal

transcribed spacer region of the ribosomal RNA cistron. *International Journal for Parasitology* 32: 199–205. 2002.

FALLAS, G. A. e SARAH, J. L. Effect of temperatures of seven *Radopholus similis* isolates from different banana producing zones of the world. *Fundamental and Applied Nematology* 18: 445-449. 1995.

FALLAS, G.A.; SARAH, J.L. e FARGETTE, M. Reproductive fitness and pathogenicity of eight *Radopholus similis* isolates on banana plants (*Musa* AAA cv. Poyo). *Nematropica* 32:135-141. 1995.

FALLAS, G.A.; HAHN, M.L.; FARGETTE, M.; BURROWS, P.R.e SARAH. J.L. Molecular and biochemical diversity among isolates of *Radopholus similis* from different areas of the world. *Journal of Nematology* 28: 422-430. 1996.

FOGAIN, R. e GOWEN, S. R. Damage to roots of *Musa* cultivars by *Radopholus similis* with and without protection of nematicides. *Nematropica* 27: 27-32. 1997.

FOGAIN, R. e GOWEN, S.R. “Yangambi Km5” (*Musa* AAA, Ibiota subgroup): a possible source of resistance to *R. similis* and *Pratylenchus goodeyi*. *Fundamental and Applied Nematology* 21:75-80. 1998.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium (Lavras)* 6:36-41. 2008.

GOWEN, S. R. Varietal responses and prospects for breeding nematode resistant banana varieties. *Nematropica* 6: 45. 1976.

GOWEN, S. P. e QUÉNÉHERVÉ, P. Nematode parasites of bananas and abaca. p. 431 – 460. In: LUC, M.; SIKORA, R. A. e BRIDGE, J. (eds). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. C.A.B. International. Wallingford, U. K. 1990.

GOWEN, S.; QUÉNÉHERVÉ, P. e FOGAIN, R. Nematode parasites of banana, plantains and abaca. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Eds.). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. CAB International, Wallingford, UK. pp. 611-644. 2005.

HAEGEMAN, A.; ELSEN, A.; DE WAELE, D. e GHEYSEN, G. Emerging molecular knowledge on *Radopholus similis*, an important nematode pest of banana. *Molecular Plant Pathology*. 11:315-323. 2010.

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

MARÍN, D.H.; BARKER, K.R.; SUTTON, T.B. e OPPERMAN, C.H. Dissemination of bananas in Latin America and the Caribbean and its relation to the occurrence of *Radopholus similis*. *Plant Disease* 82: 964-974. 1998.

MARÍN, D.H.; BARKER, K.R.; KAPLAN, D.T.; SUTTON, T.B. e OPPERMAN, C.H. Aggressiveness and damage potential of Central American and Caribbean populations of *Radopholus* spp. in banana. *Journal of Nematology* 31: 377-385. 1999.

MENDOZA, A.R.; KIEWNICK, S. e SIKORA, R.A. In vitro activity of *Bacillus firmus* against the burrowing nematode *Radopholus similis*, the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*. *Biocontrol Science and Technology* 1: 377–389. 2008.

MOENS, T.A.S.; ARAYA, M. e DE WAELE, D. Correlations between nematode numbers and damage to banana (*Musa AAA*) roots under commercial conditions. *Nematropica* 31: 55–65. 2001.

MOENS, T.A.S. Variability in reproductive fitness and pathogenicity of *Radopholus similis* in *Musa*: Effect of biotic and abiotic factors. PhD Thesis. Katholieke Universiteit Leuven. 215 p. 2004.

MOENS, T.; ARAYA, M.; SWENNEN, R. e DE WAELE, D. Screening of *Musa* cultivars for resistance to *Helicotylenchus multicinctus*, *Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus coffeae* and *Radopholus similis*. *Australasian Plant Pathology* 34, 299–309. 2005.

MOURA, R.M. e REGIS, E.M.O. Reações de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em relação ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* (Nematoda: Heteroderidae). *Nematologia Brasileira* 11: 215 – 255. 1987.

PINOCHET, J. Comparison of four isolates of *Radopholus similis* from Central America Valley banana. *Nematropica* 9: 40-43. 1979.

PINOCHET, J. e ROWE, P.R. Reaction of two banana cultivars to three different nematodes. *Plant Disease Reporter* 62: 727 – 729. 1978.

QUÉNÉHERVÉ, P. Integrated management of banana nematodes. In: Ciancio A, Mukerji KG (eds) *Integrated management of fruit crops nematodes*. Springer, The Netherlands, pp 1–54. 2008.

QUÉNÉHERVÉ, P.; VALETTE, C.; TOPART, P.; TEZENAS DU MONTCEL, H. e SALMON, F. Nematode resistance in bananas: screening results on some wild and cultivated accessions of *Musa* spp. *Euphytica* 165: 123-136. 2009a. DOI 10.1007/s10681-008-97773-7

QUÉNÉHERVÉ, P.; SALMON, F.; TOPART, P. e HORRY, J.P. Nematode resistance in bananas: screening results on some new *Mycosphaerella* resistant banana hybrids. *Euphytica* 165:137-143. 2009b. DOI 10.1007qs10681-008-9774-6

SANTOS, J.R.P. Caracterização de genótipos de *Musa* com base na reação a *Radopholus similis* e de genótipos contrastantes para a resistência com base em marcadores moleculares RAPD. 72p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília. 2007.

SASSER, J. N.; HARTMAN, K.; CARTER, C. E. Summary of preliminary crop germplasm evaluation for resistance to root-knot nematodes. Raleigh: NC State Univ., 88p. 1987.

SILVA, S. O.; MATOS, A. P. e ALVES, E. J. Melhoramento genético da bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34: 693-703. 1998.

SPEIJER P.R. e DE WAELE D. Screening of *Musa* germplasm for resistance and tolerance to nematodes, INIBAP Technical Guidelines 1. Montpellier: INIBAP, 1997.

STOFFELEN, R.; JIMNEZ, M.L.; DIERCKXSENS, C.; TAM, V.T.T.; SWENNEM, R. e DE WAELE, D. Effect of time and inoculum on the reproductive fitness of *Pratylenus coffeae* and *Radopholus similis* populations on carrot disc. *Nematology* 1:243-250. 1999.

TARTÉ, R.; PINOCHET, J.; GABRIELLI, C. e VENTURA, O. Differences in population increase, host preferences and frequency of morphological variants among isolates of the banana race of *Radopholus similis*. *Nematropica* 11: 43 -52. 1981.

TEIXEIRA, M.A. Resistência de genótipos de bananeira a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* e variabilidade genética com base em marcadores moleculares RAPD. 68p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília. 2007.

WEHUNT, E.; HUTCHINSON, D. e EDWARDS, D. I. Reaction of banana cultivars to the burrowing nematode (*R. similis*). *Journal of Nematology* 10: 368-370. 1978.

CAPÍTULO 4

**RESISTÊNCIA HORIZONTAL E VERTICAL, AGRESSIVIDADE E
VIRULÊNCIA NO PATOSSISTEMA *MUSA* SPP. VS. *RADOPHOLUS*
SIMILIS.**

RESISTÊNCIA HORIZONTAL E VERTICAL, AGRESSIVIDADE E VIRULÊNCIA NO PATOSSISTEMA *MUSA* SPP. VS. *RADOPHOLUS SIMILIS*.

RESUMO

O conhecimento de componentes da resistência horizontal-vertical e da agressividade-virulência é fundamental para o entendimento da genética da resistência. O objetivo desse trabalho foi estudar os componentes do patossistema *Musa* spp. vs. *R. similis*, utilizando três populações de *R. similis*, Santa Catarina (SC), Distrito Federal (DF) e Pernambuco (PE) e oito acessos de bananeira (4249-05, Yangambi Km5, 0323-03, 4279-06, Grande Naine, 0337-02, Borneo e 1310-06), provenientes do banco de germoplasma de banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura. O inóculo de cada população do nematoide foi calibrado para 400 nematoides/ml e foi introduzido em dois orifícios opostos abertos ao redor das mudas de bananeiras. As plantas permaneceram por 60 dias em casa de vegetação. Os nematoides foram extraídos das raízes e do solo e então contados. O fator de reprodução (FR) para cada acesso e cada população de nematoide foi determinado. Na análise dos dados utilizou-se o modelo IV de Griffing (1956), no esquema de dialelo parcial, com quatro repetições. Os acessos com maiores níveis de resistência horizontal foram 4249-05 e Yangambi Km5 e a população mais agressiva do patógeno foi a de PE. Índícios de resistência vertical e horizontal foram observados.

Palavras-chave: *Radopholus similis*, bananeira, interação patógeno hospedeiro.

HORIZONTAL AND VERTICAL RESISTANCE, AGGRESSIVENESS AND VIRULENCE IN THE PATHOSYSTEM *MUSA* SPP. VS. *RADOPHOLUS SIMILIS*.

ABSTRACT

The assessment of the components of the horizontal-vertical resistance, and aggressiveness-virulence is crucial for understanding the genetics of resistance. The objective of this work was to study the components of the pathosystem *Musa* spp. vs. *Radopholus similis*, using three populations of *R. similis* [Santa Catarina (SC), Distrito Federal (DF) and Pernambuco (PE)] and eight accessions of banana (4249-05, Yangambi KM5, 0323-03, 4279-06, Grande Naine, 0337-02, Borneo, and 1304-06) from the banana germplasm bank of Embrapa Mandioca e Fruticultura. Inoculum of each of the nematode populations was calibrated to 400 nematodes / ml and was introduced into two opposite holes around the banana plantlet. The plants were maintained for 60 days in the greenhouse conditions. The nematodes were extracted from roots and soil, then counted. The reproduction factor (RF) for each accession and nematode population was determined. For data analysis the model IV of Griffing (1956) was used, in partial diallel scheme with four replications. The accessions with higher levels of horizontal resistance were Yangambi Km5 and 4249-05, and the most aggressive population of the pathogen was from Pernambuco. Evidences of vertical and horizontal resistances were observed.

Keywords: *Radopholus similis*, banana, host pathogen interaction

1. INTRODUÇÃO

A banana é a fruta tropical mais popular e amplamente consumida no mundo. Em vários países, é o principal alimento e fonte de renda familiar. Em qualquer lugar onde as bananeiras se desenvolvem, a produção é afetada por um complexo de pragas e doenças. Apesar de várias espécies de nematoides infectarem raízes de bananeiras com diversas consequências, o endoparasita migratório *Radopholus similis* (Cobb 1893) Thorne 1949 é considerado o mais importante (Gowen *et al.*, 2005).

No Brasil a banana está presente em 90 % dos domicílios, estando disponível em todos os meses do ano, cabendo-lhe o papel fundamental no âmbito socioeconômico, como importante fonte de alimento e pela fixação de mão de obra rural (Costa, 2004).

A destruição de raízes e rizomas por *R. similis* reduz a absorção de água e nutrientes minerais, enfraquece o sistema de sustentação aumentando a suscetibilidade da planta ao tombamento, especialmente de plantas que estão em fase de produção (Pinochet e Ventura, 1977; Gowen, 1979). Como consequência do parasitismo, há redução da produção, pouca resposta à fertilização, proliferação de plantas filhas raquíticas e maior suscetibilidade da planta a outros patógenos de solo e a estresses abióticos (Araya *et al.*, 1995). As perdas causadas pelo nematoide são altas, com valores estimados de 20 % na produção (Wehunt e Edwards, 1968; Badra e Caveness, 1983), chegando a 100%, quando não efetuado o controle apropriado (Costa, 2004).

As possibilidades de controle eficiente do patógeno envolvem métodos integrados com especial ênfase à resistência, por ser um método barato, eficiente e acessível aos produtores. Progressos no melhoramento de bananeiras para resistência têm sido modestos, em comparação com os alcançados em muitas culturas. Entre as principais razões para este fato, está o desconhecimento dos mecanismos de resistência e da interação planta-patógeno para a implementação do controle genético. O entendimento de como os alelos de resistência do hospedeiro interagem-se com os alelos de (a)virulência do patógeno é fundamentalmente importante para a definição de estratégias de melhoramento visando a resistência (Van der Plank, 1968).

A busca da resistência depende da variabilidade genética da planta hospedeira e da variabilidade existente entre as populações dos nematoides.

A base genética da resistência a *R. similis* em bananeira ainda não foi estabelecida, apesar da existência de estudos que demonstram que essa característica é controlada por um ou poucos genes (Pinochet *et al.*, 1998). Moens *et al.* (2002) avaliando a progênie

resultante do cruzamento de Pisang Berlin e Calcutta 4 observaram indícios de segregação em relação à resistência a *R. similis*. Dochez *et al.*, (2009) avaliando a progênie dos híbridos diploides TMB2 x 6142-1 e TMB2 x 8075-7, verificaram que a resistência era controlada por dois genes dominantes, A e B, ambos com efeitos aditivos e interativos, por meio do qual o recessivo bb suprime o dominante A.

A interação *R. similis* x *Musa* spp., apesar de sua grande importância, foi pouco estudada até o momento. Diferenças genéticas entre populações de *R. similis* e de acessos de *Musa* têm sido detectadas por sistemas de marcadores de DNA e por avaliações fenotípicas (patogenicidade e resistência) (Costa *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2010). Os resultados evidenciam que a bananeira pode apresentar diferentes genes de resistência ao nematoide *R. similis*. Em decorrência de poucos estudos, o mecanismo de controle dessa resistência ainda não é bem conhecido. As hipóteses de controle genético são do monogênico (gene-a-gene ou resistência vertical) e poligênico, controlado por efeitos aditivos ou resistência horizontal (Van der Plank, 1968; Robinson, 1979), ou mesmo controle genético combinando os dois tipos de resistência (Parlevliet e Zadoks, 1977; Nelson, 1978; Parlevliet, 1993) necessitam ser avaliadas.

Melo e Santos (1999) testaram uma metodologia capaz de fornecer, de maneira simplificada, informações sobre a resistência horizontal e vertical do hospedeiro, bem como da virulência e agressividade do patógeno. Nesta metodologia proposta, utiliza-se uma versão modificada do modelo IV de Griffing (1956), no esquema de dialelo parcial descrito por Geraldi e Miranda Filho (1988).

Neste trabalho, objetivou-se iniciar os estudos sobre componentes da resistência horizontal/vertical e da agressividade/virilência no patossistema *Musa* spp. vs. *R. similis*, utilizando-se a metodologia descrita por Melo e Santos (1999).

2. MATERIAL E MÉTODOS

1.1. Material genético

Foram utilizadas oito acessos de *Musa* spp. provenientes do banco ativo de germoplasma de banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura: 1- 4249-05 (híbrido-AA), 2- Yangambi Km5 (cultivar-AAA), 3- 0323-03 (híbrido-AA), 4- 4279-06 (híbrido-AA), 5- Grande Naine (cultivar-AAA), 6- 0337-02 (híbrido-AA), 7- Borneo (diploide simples-AA) e 8- 1304-06 (híbrido-AA). Os materiais 4249-05 e 4279-06 são acessos considerados

resistentes que apresentam como parentais dois genótipos híbridos provenientes da Jamaica que têm sido utilizados como fontes de resistência a vários patógenos (Silva *et al.*, 1998). O acesso 4279-06 tem como ancestral o genótipo Calcutta o qual é considerado fonte de resistência a *R. similis* por alguns autores (Costa *et al.*, 1998; Carlier *et al.*, 2003; Santos, 2007). Os acessos 0323-03 e 0337-02 também têm Calcutta como um dos seus pais. O acesso Yangambi Km5 foi identificado como fonte de resistência a *R. similis* (Costa, 2004; Santos, 2007; Quénéhervé *et al.*, 2009) e tem sido utilizado como padrão de resistência. Os acessos Borneo e Grande Naine são considerados bons hospedeiros e são utilizados como padrão de suscetibilidade (Wehunt *et al.*, 1978, Santos, 2007; Quénéhervé *et al.*, 2009).

Para desafiar os oito acessos de bananeira, foram utilizadas duas populações de *R. similis* coletadas em diferentes estados brasileiros e uma coletada no Distrito Federal: 1- Santa Catarina, 2- Distrito Federal e 3- Pernambuco. A população de Pernambuco foi coletada em bananeiras cultivar Pacovan em Petrolina e era a única que já havia sido testada quanto à agressividade por Costa (2004). Por ser uma população agressiva, foi utilizada como padrão. A população do Distrito Federal foi coletada em raízes de helicônia em plantio comercial e população de Santa Catarina foi coletada em Luís Alves em plantas de bananeira pertencentes ao grupo Cavendish. As populações de nematoides vinham sendo mantidas em plantas de bananeira cv. Grande Naine em casas de vegetação e multiplicadas *in vitro* em cilindros de cenoura como descrito por Santos (2007).

1.2. Inoculação e avaliação

Decorrido o período de 15 dias de aclimação, as mudas foram inoculadas com o nematoide *R. similis*. Os nematoides foram extraídos dos cilindros de cenoura combinando a trituração, peneiramento e centrifugação. Parte dos nematoides foram recuperados da parede interna dos frascos, com a utilização de água e peneira de 400 mesh e, foram adicionados à suspensão depositada em béqueres. O inóculo recolhido dos béqueres foi calibrado para 400 nematoides/ml, sendo que apenas os nematoides ativos foram contados para inoculação. Dois orifícios opostos foram abertos ao redor das mudas expondo as raízes e a suspensão de nematoides (1 ml) depositada sobre as raízes. As plantas permaneceram por 60 dias em casa de vegetação, no período de 18 de setembro de 2009 a 18 de novembro de 2009, sendo que as plantas foram distribuídas sobre bancadas na casa de vegetação de maneira inteiramente ao acaso, com cinco repetições para cada acesso.

Após 60 dias, os nematoides foram extraídos das raízes e do solo das bananeiras pelos métodos modificados de Coolen e D'Herde (1972) e de Jenkins (1964), respectivamente, avaliação dos níveis populacionais de *R. similis*. Tanto a extração de nematoides do solo como da raiz foram realizadas por amostragem e, para esse fim, 100 cc de solo e 10g de raiz foram utilizados. Após a extração, os nematoides de cada amostra foram contados sob microscópio estereoscópico, sendo os mesmos contados em três alíquotas de 2 ml, compondo uma média cujos resultados foram extrapolados para o total de solo e para o total de raiz. Todas as plantas tiveram suas raízes lavadas e pesadas anteriormente ao processo de extração. Raízes que pesaram menos de 10 g foram utilizadas por completo na extração.

A variável fator de reprodução dos nematoides foi avaliada e utilizada para a análise.

1.3. Análise

Foi avaliado o fator de multiplicação em cada combinação patógeno – hospedeiro, utilizando-se quatro repetições de 11 plantas. Na análise dos dados utilizou-se uma versão modificada (Melo e Santos, 1999) do modelo IV de Griffing (1956), no esquema de dialelo parcial descrito por Geraldi e Miranda Filho (1988). O modelo matemático utilizado para analisar a interação patógeno – hospedeiro pela análise em dialelo parcial foi o seguinte:

$$Y_{ij} = \mu + r_i + a_j + s_{ij} \quad \text{onde:}$$

Y_{ij} = Fator de reprodução do nematoide representado pelo i-ésimo hospedeiro quando inoculado com o j-ésimo isolado do patógeno;

μ = média Geral do FR;

r_i = efeito da resistência horizontal do i-ésimo hospedeiro;

a_j = efeito da agressividade da j-ésimo isolado do patógeno;

s_{ij} = efeito da interação entre o i-ésimo hospedeiro e o j-ésimo isolado do patógeno, relacionado aos efeitos da resistência vertical do i-ésimo hospedeiro e da virulência do i-ésimo isolado do patógeno.

Na versão original, o dialelo parcial foi proposto para acessar a capacidade de combinação de genitores distribuídos em dois grupos, sendo as inferências feitas para cada grupo. Na versão modificada utilizada no presente estudo, um grupo é formado pelos

hospedeiros e o outro pelos diferentes isolados do patógeno e o objetivo é avaliar com base na capacidade geral e específica de combinação a interação patógeno – hospedeiro.

Foram realizadas análises de variância e cálculos da capacidade geral e específica de combinação com o auxílio do Programa Genes (Cruz, 2006). A Tabela 1 mostra o esquema da análise de variância do dialelo parcial envolvendo um grupo de hospedeiros e outro de isolados (raças fisiológicas) do patógeno, segundo Melo e Santos (1999), considerando o modelo fixo.

Tabela 1. Análise de variância de um modelo de dialelo parcial envolvendo um grupo de hospedeiros e outro de isolados do patógeno, segundo Melo e Santos (1999), considerando o modelo fixo.

FV	GL	QM	F
Tratamentos	$pq - 1$		
CGRH (resistência horizontal)	$p - 1$	QM1	QM1/QMR
CGA (agressividade)	$q - 1$	QM2	QM2/QMR
CEI (interação resistência horizontal vs. agressividade)	$(p - 1)(q - 1)$	QM3	QM3/QMR
Resíduo	m	QMR	

p =Número de hospedeiros

q =Número de isolados (raças fisiológicas) do patógeno

m =GL do resíduo = $q(r-1)(p-1)$, sendo r o número de repetições

2. RESULTADOS

O fator de reprodução variou de 1,22 (4249-05) a 14,32 (1304-06), sendo que as menores médias foram encontradas nos acessos 4249-05 e Yangambi Km5 e, as maiores nos acessos 1304-06 e Borneo, conforme os dados apresentados no capítulo 3 dessa tese.

A população de *R. similis* de Pernambuco (PE) foi a população que teve o maior fator de reprodução, sendo seguida pela população do Distrito Federal (DF) e por último a população de Santa Catarina (SC), conforme capítulo 3.

Análises dialélicas (Tabela 2) mostraram efeitos significativos da Capacidade Geral de Resistência Horizontal (CGRH) e da Capacidade Geral de Agressividade (CGA), indicando a variabilidade para a resistência horizontal no hospedeiro e para a agressividade no patógeno.

A Capacidade Específica de Interação (CEI) foi significativa ($p < 0,01$), indicando a existência pronunciada da interação das populações do nematoide e os acessos do hospedeiro, podendo caracterizar a existência de resistência vertical. No entanto, como observado na tabela 2, também há indícios de resistência horizontal.

Tabela 2. Análise dialélica e média geral do fator de reprodução dos nematoides avaliadas em oito acessos de bananeiras inoculados com três diferentes populações de *Radopholus similis*.

	FV	GL	QM	F	Prob.
Tratamentos		23	361,976	361,976	0,0
CGRH (resistência horizontal)		7	276,945	276,945	0,0
CGA (agressividade)		2	1924,219	1924,219	0,0
CEI (interação)		14	181,313	181,313	0,0
Resíduo		72	1		
Média geral 7,02					

Os acessos com maiores níveis de resistência horizontal foram a 1 (4249-05), 2 (Yangambi Km5), 3 (0323-03) e 4 (4279-06). Já os acessos com menores níveis de resistência horizontal foram 8 (1304-06), 7 (Borneo) 6 (0337-02) e 5 (Grande Naine) (Tabela 3).

Tabela 3. Estimativas do Efeito da Capacidade Geral de Resistência Horizontal (ECGRH) e Resistência Horizontal Relativa (RHR) de oito acessos de bananeiras inoculadas com três populações *Radopholus similis*.

Acessos	ECGRH ¹	RHR (%) ²
1- 4249-05	-5,8	100
2- Yangambi Km5	-5,086	94,54
3- 0323-03	-2,806	77,14
4- 4279-06	-1	63,35
5- G. Naine	0,533	51,65
6- 0337-02	0,596	51,17
7- Borneo	6,26	7,93
8- 1304-06	7,3	0

¹ O sinal de negativo (-) indica que o acesso teve um efeito negativo sobre o FR.

² Os valores de RHR foram obtidos por interpolação, com base na proximidade numérica, sendo que -5,8 está para 100% e 7,3 está para 0%.

A população mais agressiva foi a 3 (Pernambuco) e as menos agressivas a 1 (Santa Catarina) e 2 (Distrito Federal) (Tabela 4).

Tabela 4. Estimativas do Efeito da Capacidade Geral de Agressividade (ECGA) e Agressividade Relativa (AR) de três isolados de *Radopholus similis* inoculados em oito acessos de bananeira.

Isolados	ECGA ¹	AR (%) ²
3. Pernambuco (PE)	8,700	100
2. Distrito Federal (DF)	-2,519	75,39
1. Santa Catarina (SC)	-6,181	0

¹ O sinal de negativo (-) indica que o Isolado teve um efeito negativo sobre o FR.

² Os valores de AR foram obtidos por interpolação, com base na proximidade numérica, sendo que -6,181 está para 100% e 8,7 está para 0%.

Os valores da CEI (Capacidade específica de interação) em cada combinação patógeno – hospedeiro (Figura 1 e 2) fornecem informações sobre a resistência vertical do hospedeiro bem como da virulência do patógeno (Melo e Santos, 1999). A significância da CEI indica que a resistência horizontal do hospedeiro (CGRH) e a agressividade do isolado

(CGA) não são suficientes para explicar a variação no fator de reprodução do nematoide. Os diferentes acessos de bananeira comportam-se diferenciadamente quando inoculadas com os diferentes isolados de *R. similis* e vice-versa. Assim, os valores da CEI são bons indicadores do comportamento específico de cada combinação patógeno-hospedeiro, de modo que o comportamento específico de cada hospedeiro ou de cada população do nematoide pode ser estudado em detalhe.

A Figura 1 evidencia os valores da CEI entre os oito acessos de bananeira e as três populações de *R. similis*. Quando um hospedeiro resistente apresenta pequena variação entre os valores da CEI, podemos dizer que, para este hospedeiro, a resistência horizontal é mais importante que a resistência vertical. Dessa forma podemos comparar o comportamento de cada hospedeiro analisando as variações nos valores da CEI. No presente estudo, pode-se observar menores variações na CEI dos acessos 5 (Grande Naine), 2 (Yangambi Km5) e 1 (4249-05) em relação ao restante dos acessos, podendo dizer que a resistência horizontal tem maior efeito na resistência de Grande Naine, Yangambi Km5 e 4249-05 que na resistência do restante. O acesso 3 (0323-03) teve a maior variação do CEI e portanto este acesso têm maior efeito da resistência vertical.

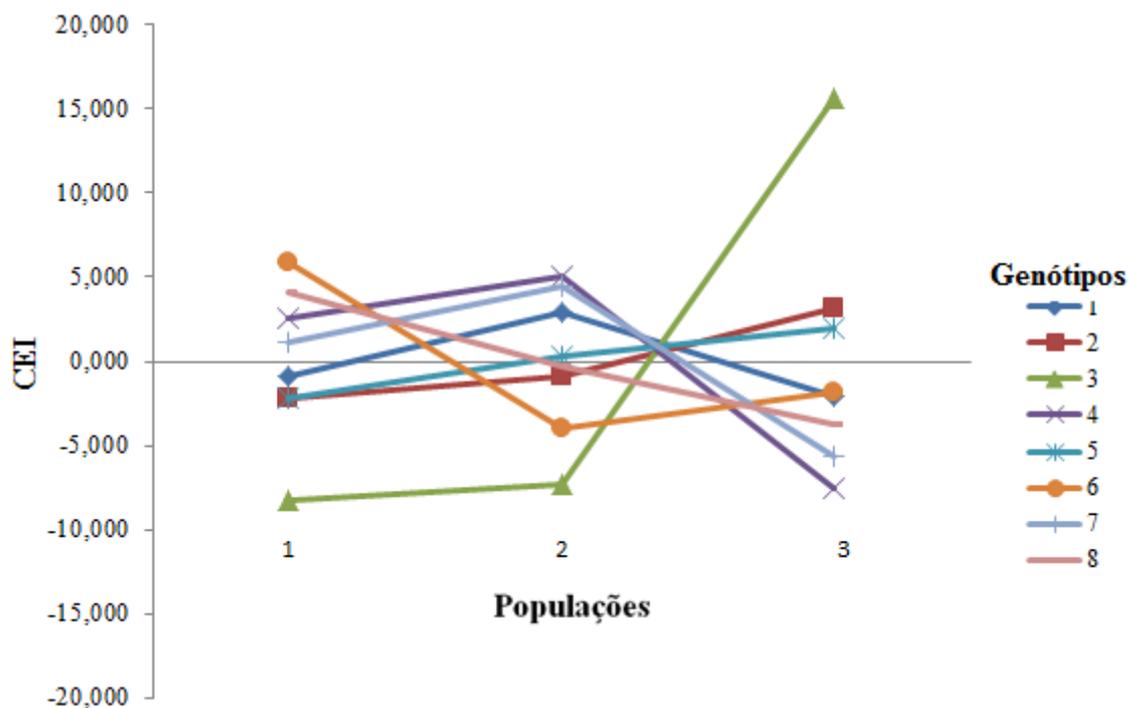


Figura 1. Estimativas da Capacidade Específica de Interação (CEI) de oito acessos de *Musa* spp. (1 - 4249-05, 2 – Yangambi Km5, 3 – 0323-03, 4 – 4279-06, 5 – Grande Naine, 6 – 0337-02, 7 – Borneo e 8 – 1304-06) inoculadas com três populações de *Radopholus similis* (1- SC, 2 - DF, 3 - PE).

A Figura 2 evidencia as variações da CEI de cada população em relação aos oito acessos de bananeira. Pode-se observar que a população do nematoide 3 (Pernambuco) apresentou a maior variação nos valores de CEI, indicando assim, maiores variações no comportamento desse isolado frente os acessos de bananeira quando comparado aos demais isolados. Podemos dizer também que a população de 3 (Pernambuco) apresenta o maior efeito interativo com o acesso 3 (0323-03), o qual é um dos acessos resistentes ao nematoide. O maior valor de CEI da população de Pernambuco com o acesso 0323-03, indica que esta população é a mais agressiva para este acesso.

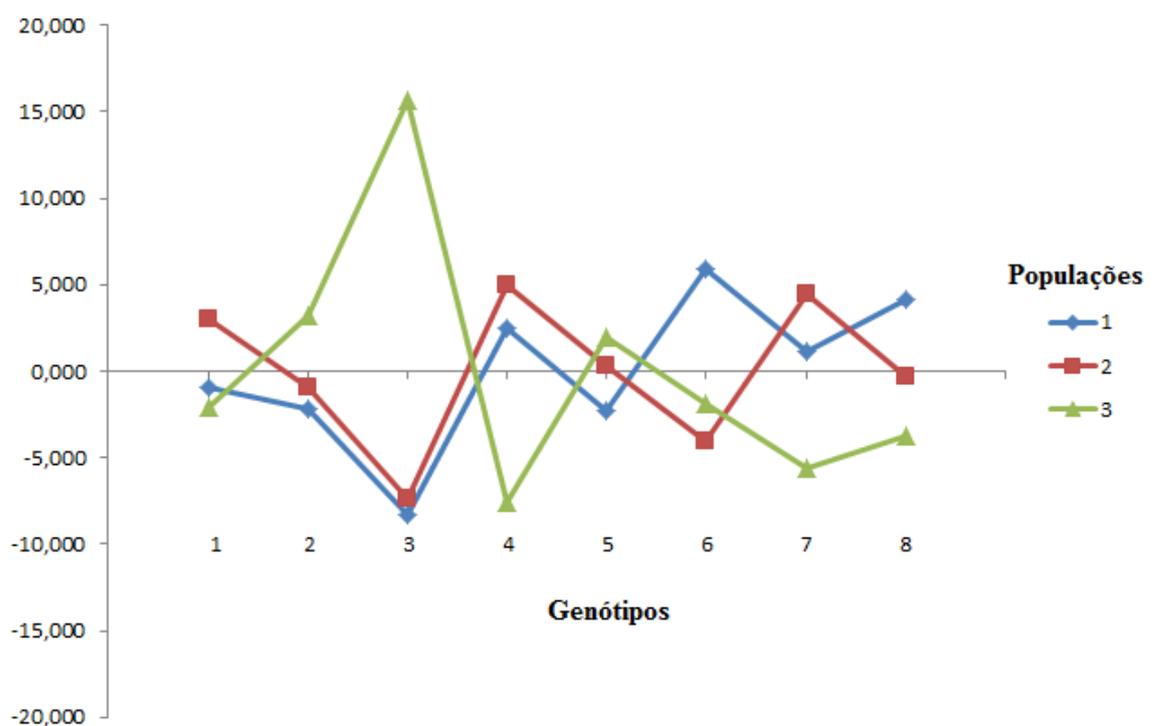


Figura 2. Estimativas da Capacidade Específica de Interação (CEI) de três populações de *Radopholus similis* 1- SC, 2 - DF, 3 - PE) inoculados em oito acessos de *Musa* spp. (1 - 4249-05, 2 – Yangambi Km5, 3 – 0323-03, 4 – 4279-06, 5 – Grande Naine, 6 – 0337-02, 7 – Borneo e 8 – 1304-06).

3. DISCUSSÃO

A análise comprovou a existência de variabilidade em relação à resistência de bananeiras ao nematoide cavernícola e à agressividade das diferentes populações do nematoide. Diferentes níveis de resistência de bananeiras a *R. similis* e de agressividade do nematoide têm sido observados (Fallas *et al.*, 1995; Elbadri, 2000; Costa, 2004). Em

alguns casos acessos considerados resistentes, quando reavaliados com outras populações do nematoide comportaram-se como suscetíveis e vice-versa. A cultivar Pisang Jari Buaya considerada resistente a *R. similis* em Honduras por Pinochet e Rowe (1978), quando avaliada por Costa (2004) comportou-se como suscetível. Essa diversidade genética têm sido comprovada a nível de DNA, tanto por parte do hospedeiro como por parte do nematoide (Hahn *et al.*, 1994; Fallas *et al.*, 1996; Elbadri *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2010).

De acordo com a capacidade específica de interação, há um indicativo de resistência do tipo população-específica, qualitativa ou oligogênica sendo controlada por um ou poucos genes, em pelo menos uma das interações estudadas. Pinochet *et al.* (1998) avaliando a base genética da resistência a *R. similis* em bananeira sugeriu que a resistência é controlada por um ou poucos genes. Recentemente, Dochez *et al.* (2009) avaliando a progênie dos híbridos diploides TMB2 x 6142-1 e TMB2 x 8075-7, verificaram que a resistência era controlada por dois genes dominantes, ambos com efeitos aditivos e interativos, por meio do qual o recessivo *bb* suprime o dominante *A*. No entanto, a resistência do tipo horizontal também pode ocorrer, sendo que no presente estudo há indícios de resistência horizontal.

Van der Plank (1968) estudou 12 cultivares de cevada inoculadas com três raças de *Helminthosporium gramineum*, em três experimentos. As cultivares foram avaliadas por meio da área da folha lesionada. Na análise de variância, a interação entre raças e cultivares altamente significativa indicou que a reação de cada cultivar era específica a uma raça particular. Da mesma forma, a interação no presente experimento, pode ser indicativa de resistência vertical. Em outro exemplo, Van der Plank (1968) referiu-se a avaliação de três cultivares de batata sem alelos de resistência verticais e inoculadas com quatro raças de *Phytophthora infestans*, avaliando-se a taxa de crescimento do micélio no tubérculo. O autor observou que houve diferença no nível de resistência das cultivares e de agressividade das raças. Entretanto, a ausência de interação mostrou que as cultivares reagiram de maneira semelhante a todas as raças, isto é, elas diferiram em relação à resistência horizontal, mas não em relação à resistência vertical.

Geralmente os dois tipos de resistência ocorrem juntos. Por exemplo, tal fato foi constatado por Parlevliet (1981) na avaliação da percentagem de área da folha de arroz infectada por *Xanthomonas oryzae*.

Os acessos 4249-05, Yangambi Km5, 0323-03 e 4279-06 que apresentaram os maiores níveis de resistência horizontal, já haviam sido relatados por Santos (2007) como

resistentes ao nematoide cavernícola. Os acessos que aqui apresentaram os menores níveis de resistência horizontal, com exceção do acesso 0337-02 o qual foi considerado resistente, foram classificados pelo mesmo autor como suscetíveis ao nematoide. Este fato pode ser um indicativo de que a resistência observada pode ser do tipo horizontal. O acesso 4249-05 pode ter apresentado um maior efeito da resistência horizontal devido à presença de dois acessos (M48 e M53) em seu background genético que estão sendo utilizados como fonte de resistência a outros patógenos na Jamaica (Silva *et al.*, 1998). Gowen (1976) verificou que o acesso M48 não era um bom hospedeiro de *R. similis* nem de *H. multicinctus* e, portanto pode ter transferido genes de resistência para o acesso 4249-05. O acesso 4279-06, o qual tem em seu background do acesso M53, possivelmente tenha herdado genes de resistência deste.

Os acessos 0323-03 e 0337-02 têm como parental feminino o acesso Calcutta, no qual possui certo grau de resistência a *R. similis* de acordo com Quénéhervé *et al.*, (2009). Apesar de 0337-02 não apresentar um grau de resistência horizontal elevado, este mostrou indício de resistência vertical, tendo uma maior interação com a população de Santa Catarina.

A população mais agressiva do nematoide, a de Pernambuco, foi igualmente caracterizada por Costa (2004) como uma população agressiva. No presente estudo, esta população mostrou uma alta taxa de multiplicação nas cultivares Grande Naine e Pisang Jari Buaya, com taxa mediana na cultivar Yangambi Km5. Costa (2004) avaliou outra população proveniente de Santa Catarina e verificou que esta não era muito agressiva, pois apresentou taxas de multiplicação mediana e não causavam muitos danos às raízes. Apesar de não ser a mesma população testada no presente trabalho, os resultados dos dois trabalhos demonstram que ambas populações provenientes do Estado de Santa Catarina não estão entre as mais agressivas.

Populações do nematoide de regiões produtoras de banana ao redor do mundo, analisadas com base em marcadores moleculares, mostraram diferenciação clara em nível de DNA (Fallas *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 2008). No trabalho realizado por Costa *et al.* (2008) as populações provenientes de Pernambuco e Santa Catarina apresentaram uma relevante distância genética, baseado no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li, calculado com base em marcadores RAPD.

As menores variações na capacidade específica de interação dos acessos Yangambi Km5 e Grande Naine, cultivares triploides (AAA) selvagens, em relação aos híbridos produzidos via cruzamentos controlados, pode ser uma indicação de que a resistência

horizontal tem maior efeito na resistência do germoplasma nativo do que na resistência de híbridos artificiais. Este maior efeito da resistência horizontal nos materiais silvestres já foi discutido por Tokeshi (2006). Segundo este autor, é nos centros de origem das plantas que estão concentrados os mais altos níveis de resistência horizontal a doenças. De acordo com Van der Plank (1963), a resistência horizontal é durável e confere resistência a todas as raças do patógeno, independente da carga genética do mesmo.

O presente estudo representa uma contribuição inicial aos estudos sobre a interação *Musa* spp. vs. *R. similis* utilizando a metodologia de análise dialélica. Novos estudos, envolvendo maior número de populações de cultura pura do nematoide e de acessos da bananeira deverão ser conduzidos para melhor entendimento da interação patógeno – hospedeiro e da genética da resistência, o que irá subsidiar os estudos de identificação de possíveis raças fisiológicas do patógeno.

4. CONCLUSÕES

O efeito significativo da resistência horizontal e da agressividade evidenciaram diferenças entre os materiais genéticos de bananeiras e também entre populações do nematoide. Os acessos com maiores níveis de resistência horizontal foram 4249-05, Yangambi Km5, 0323-03 e 4279-06, enquanto que os acessos com menores níveis de resistência horizontal foram 1304-06, Borneo, 0337-02 e Grande Naine. A população mais agressiva do nematoide foi a de Pernambuco e as menos agressivas a de Santa Catarina (SC) e a do Distrito Federal. A significância da Capacidade Específica de Interação indicou a existência de interação entre acessos de bananeira e populações do nematoide, sendo um indício da existência de resistência vertical ou população-específica.

5. LITERATURA CITADA

- ARAYA, M. Efecto depresivo de ataques de *Radopholus similis* en banano (*Musa* AAA). Corbana 20: 3-6. 1995.
- BADRA, T. e CAVENESS, F.E. Effects of dosage sequence on the efficacy of nonfumigant nematicides, plantain yields, and nematode seasonal fluctuations as influenced by rainfall. *Journal of Nematology* 15: 496-502. 1983.
- CARLIER, J. e DE WAELE, D. e ESCALANT, J.V. Global evaluation of *Musa* germplasm for resistance to *Fusarium* wilt, *Mycosphaerella* leaf spot diseases and nematodes. Performance evaluation (A. Vézina e C. Picq, eds). Inibap Technical Guidelines 7. p. 22. 2003.
- COOLEN, W. A. e D'HERDE, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. State Agriculture Research Center, Ghent. 77 p. 1972.
- COSTA, D. da C.; FALEIRO, F.G.; CARES, J.E. e GOMES, A.C. Pathogenicity and genetic variability of *Radopholus similis* populations in bananas (*Musa acuminata* AAA and AA) based on RAPD analysis. *Nematologia Brasileira* 32: 303-308. 2008.
- COSTA, D. da C. Variabilidade patogênica e genética de *Radopholus similis* em bananeira no Brasil. 2004. Tese (Doutorado). Universidade de Brasília, Brasília. 2004
- COSTA, D. da C.; SILVA, S. de O. e ALVES, F.R. Reação de genótipos de bananeira (*Musa* sp.) a *Radopholus similis* e *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Brasileira* 22: 49-56. 1998.
- CRUZ, C. D. Programa Genes: Estatística experimental e matrizes. Viçosa (MG). 285p. 2006.
- DOCHEZ, C.; TENKOUANO, A.; ORTIZ, R.; WHYTE, J. e DE WAELE, D. Host plant resistance to *Radopholus similis* in a diploid banana hybrid population. *Nematology* 11: 329-335. 2009.
- ELBADRI, G.A.A.; DE LEY, P.; WAEYENBERGE, L.; VIERSTRAETE, A.; MOENS, M. e VANFLETEREN, J. Intraspecific variation in *Radopholus similis* isolates assessed

with restriction fragment length polymorphism and DNA sequencing of the internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA cistron. *International Journal for Parasitology* 32: 199–205. 2002.

ELBADRI, G.A. Diversity of *Radopholus similis* (Cobb, 1893) (Nematoda: Tylenchida). 146 p. Thesis. Faculty of Sciences, University of Gent. 2000.

FALLAS, G.A.; SARAH, J.L.; FARGETTE, M. Reproductive fitness and pathogenicity of eight *Radopholus similis* isolates on banana plants (*Musa* AAA cv. Poyo). *Nematropica* 32:135-141. 1995.

FALLAS, G.A.; HAHN, M.L.; FARGETTE, M.; BURROWS, P.R. e SARAH, J.L. Molecular and biochemical diversity among isolates of *Radopholus similis* from different areas of the world. *Journal of Nematology* 28: 422-430. 1996.

GERALDI, I.O. e MIRANDA-FILHO, J.B. Adapted models for the analysis of combining ability of varieties in partial diallel crosses. *Revista Brasileira de Genética* 11: 431-440. 1988.

GRIFFING, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Australian Journal of Biological Sciences* 9: 463-493. 1956.

GOWEN, S.R. Varietal responses and prospects for breeding nematode resistant banana varieties. *Nematropica* 6: 45. 1976.

GOWEN, S.R. Some considerations of problems associated with the nematode pests of bananas. *Nematropica* 9: 79-91. 1979.

GOWEN, S.; QUÉNÉHERVÉ, P. e FOGAIN, R. Nematode parasites of banana, plantains and abaca. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Eds.). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. CAB International, Wallingford, UK. pp. 611-644. 2005.

HAHN, M.L.; BURROWS, P.R.; GNANAPRAGASAM, N.C.; BRIDGE, J.; VINES, N.J.; WRIGHT, D.J. Molecular diversity amongst *Radopholus similis* populations from Sri Lanka detected by RAPD analysis. *Fundamental and Applied Nematology* 17: 275-281. 1994.

- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 48:692. 1964.
- MELO, L.C. e SANTOS, J.B. Identification of resistant genotypes considering polygenic systems in host-pathogen interaction. *Genetic and Molecular Biology* 22: 601-608. 1999
- MOENS, T.; SANDOVAL, J.A.; ESCALANT, J.C. e DE WAELE, D. Evaluation of the progeny 'Pisang Berlin' and *M. acuminata* spp. *burmannicoides* 'Calcutta 4' for evidence of segregations with respect to resistance to black leaf streak disease and nematodes. *Infomusa* 11:20-22. 2002.
- NELSON, R.R. Genetics of horizontal resistance to plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* 16: 359-378. 1978.
- PARLEVLIET, J.E. What is durable resistance, a general outline. In Jacobs, T.H. and Parlevliet, J.E (eds.) *Durability of Disease Resistance*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. p. 23-29. 1993.
- PARLEVLIET, J.E. Disease resistance in plants and its consequences for plant breeding. In FREY, J.K. *Plant Breeding II*. The Iowa State University Press. pp.309-364. 1981.
- PARLEVLIET, J.E. e ZADOKS, J.C. The integrated concept of disease resistance, a new view including horizontal and vertical resistance in plants. *Euphytica* 26: 5-21. 1977.
- PINOCHET, J. e ROWE, P.R. Reaction of two banana cultivars to three different nematodes. *Plant Disease Reporter* 62: 727 – 729. 1978.
- PINOCHET, J. e VENTURA, O. Plant parasitic nematodes associated with bananas in Belize. *Trop. Agric.* 54: 349 -352. 1977.
- PINOCHET, J; CAMPRUBI, A; CALVET, C; FERNANDEZ, C e KABANA, R. R. Inducing tolerance to the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* by early mycorrhizal inoculation of micropropagated Myrobalan 29 C plum rootstock. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 123: 342-347. 1998.

QUÉNÉHERVÉ, P.; VALETTE, C.; TOPART, P.; TEZENAS DU MONTCEL, H. e SALMON, F. Nematode resistance in bananas: screening results on some wild and cultivated accessions of *Musa* spp. *Euphytica*.165:123-136. 2009.

ROBINSON, R.A. Permanent and impermanent resistance to crop parasites, a re-examination of the pathosystem concept with special reference to rice blast. *Pflanzenzuchtg* 83: 1-39. 1979.

SANTOS, J.R.P; TEIXEIRA, M.A.; CARES, J.E.; FALEIRO, F.G. e COSTA, D.C. Contrastant banana accessions for resistance to the burrowing nematode, based on molecular markers RAPD. *Euphytica* 172:13-20. 2010.

SANTOS, J.R.P. Caracterização de genótipos de *Musa* com base na reação a *Radopholus similis* e de genótipos contrastantes para a resistência com base em marcadores moleculares RAPD. 72p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília. 2007.

SILVA, S.O.; MATOS, A.P.; ALVES, E.J. Melhoramento genético da bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34: 693-703. 1998.

TOKESHI, H. Importância dos centros de origem das plantas e sua resistência a pragas e doenças. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS (COBRADAN), 3., 2006, Belém, PA. Palestras...Belém: Embrapa Amazônia Oriental, p. 69-81. 2006.

VAN DER PLANK, J.E. *Plant diseases. Epidemics and Control*. New York: Academic Press, 134 p. 1963.

VAN DER PLANK, J.E. *Disease Resistance in Plants*. New York, Academic Press. 349p. 1968.

WEHUNT, E.J. e EDWARDS, D. I. *Radopholus similis* and other nematode species on banana. In : SMART, JR., G.C. e PERRY, V. G. (Eds). *Tropical nematology*. Gainesville, Univ. Florida Press : 1-19. 1968.

WEHUNT, E.; HUTCHINSON, D. e EDWARDS, D. I. Reaction of banana cultivars to the burrowing nematode (*R. similis*). *Journal of Nematology* 10: 368-370. 1978.

CAPÍTULO 5

**IDENTIFICAÇÃO DE ACESSOS DE *MUSA* SPP. COM
TOLERÂNCIA A *RADOPHOLUS SIMILIS* E A *MELOIDOGYNE
INCOGNITA*.**

IDENTIFICAÇÃO DE ACESSOS DE *MUSA* SPP. COM TOLERÂNCIA A *RADOPHOLUS SIMILIS* E A *MELOIDOGYNE INCOGNITA*.

RESUMO

Os danos causados por fitonematoides estão entre os principais entraves ao cultivo da banana, causando perdas que podem exceder 50% em condições favoráveis. O uso de cultivares tolerantes a nematoides é uma estratégia que viabiliza a sustentabilidade da produção de banana em áreas infestadas com nematoides. O objetivo deste trabalho foi avaliar a reação de clones diploides e triploides de bananeira em relação a *Radopholus similis* (nematóide cavernícola) e *Meloidogyne incognita* (nematóide das galhas). A avaliação foi conduzida em condições de campo e foi baseada nas taxas de multiplicação de cada nematóide e no desenvolvimento das plantas. Plantas individuais, provenientes de multiplicação *in vitro*, foram previamente inoculadas com uma suspensão de 200 juvenis, machos e fêmeas de *R. similis*, ou uma de 2500 ovos e juvenis de *M. incognita* em vasos distintos. Após um período de 4 meses as mudas foram transplantadas para microparcela em campo aberto em delineamento inteiramente casualizado. Os acessos foram avaliados após 13 meses da inoculação e 9 meses em condições de campo. O número de nematóide no solo e na raiz foi utilizado para calcular o fator de reprodução ($FR = \text{população final} / \text{população inicial}$). As variáveis indicadoras de desenvolvimento como peso de raiz, altura do pseudocaule, diâmetro do pseudocaule e número de perfilhos foram utilizados para comparação entre plantas inoculadas e não inoculadas, com intuito de avaliar os danos causados na presença do nematóide. Notas foram atribuídas aos acessos com base na multiplicação do nematóide e no desenvolvimento das plantas para classificar a reação dos acessos aos nematoides. Os acessos 1304-04, 4223-06, 1318-01, 1319-01, Tjau Lagada e N118 mostraram-se tolerantes ao nematóide cavernícola e os acessos N118, Pipit e Birmanie tolerantes ao nematóide das galhas.

Palavras-chave: banana, tolerância, nematóide cavernícola, nematóide das galhas.

IDENTIFICATION OF ACCESSIONS OF *MUSA* SPP. TOLERANT TO *RADOPHOLUS SIMILIS* AND *MELOIDOGYNE INCOGNITA*.

ABSTRACT

Damage caused by nematodes are among the main constraints for cultivation of bananas, causing yield losses that may exceed 50% under favorable conditions. The use of tolerant cultivars to nematodes is a strategy that enables the sustainability of banana production in areas infested with nematodes. The objective of this study was to evaluate the reaction of diploid and triploid banana clones, to the nematode *Radopholus similis* (burrowing nematode) and *Meloidogyne incognita* (root-knot nematode). Evaluation was carried out under field conditions and it was based on the multiplication rates of each nematode, and plant development. In vitro plants were inoculated with a suspension of 200 juveniles, males and females of *R. similis*, or of 2500 eggs and juveniles of *M. incognita* (in separate pots) under greenhouse. Equal number of plants were maintained without inoculation. After a period of four months the plants were transplanted into microplots in an open field in a completely randomized design. The plants were evaluated 13 months after inoculation under field conditions. The number of nematodes in soil and in the roots was used to calculate the reproduction factor ($RF = \text{final population} / \text{initial population}$) of nematodes. Variables indicative of development such as, root weight, plant height, diameter of pseudstem, and number of suckers were used for comparisons between inoculated and uninoculated plants, aiming to assess the damage caused in the presence of these nematodes. Scores were assigned to plants according to the multiplication of the nematodes and plant development, in order to classify the reaction of the accessions to the nematodes. Accessions 1304-04, 4223-06, 1318-01, 1319-01, Tjau Lagada and N118 were tolerant to the burrowing nematode, and N118, Birmanie, and Pipit tolerant to the root-not nematode.

Keywords: banana, tolerance, burrowing nematode, root-not nematode.

1. INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* spp.) é uma das frutas cultivadas mais importantes no mundo. No Brasil, a produção foi estimada em aproximadamente 6,7 milhões de toneladas em uma área colhida de 479 mil hectares (IBGE, 2009). Os nematoides fitoparasitas estão entre os principais entraves no cultivo da banana no mundo, causando perdas de produção em média de 20% (Sasser e Franckman, 1987) e podem exceder a 50% em algumas condições favoráveis (Sarah, 1989; Speijer *et al.*, 1994; Fogain e Gowen 1995; Davide, 1996; Speijer e Fogain, 1999). A infecção por nematoides causa danos nas raízes, reduzindo a absorção de água e nutrientes, sendo que em infecções severas podem reduzir a produção e causar tombamento (Speijer e De Waele, 1997).

No Brasil, diferentes espécies de nematoides atacam e causam danos às bananeiras (Ferraz, 1995). Entretanto, apenas *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949, *Helicotylenchus multicinctus* (Cobb, 1893) Golden, 1956; *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann, 1898) Filipjev e Schuurmas Stekhoven, 1941 e *Meloidogyne* spp. são tidos como de maior importância (Bridge *et al.*, 1997; Collingborne e Gowen, 1997; Costa *et al.*, 1998).

Radopholus similis é o nematoide mais danoso à cultura da banana e se encontra amplamente disseminado pelas regiões produtoras de banana (Stover e Simmonds, 1987). Este nematoide é um endoparasita migratório que penetra nas raízes e completa seu ciclo no interior das raízes. Ele destrói as raízes ao se alimentar do citoplasma de células do parênquima cortical (Blake, 1961). Com o desenvolvimento do nematoide e a sua constante migração e alimentação, túneis são formados na região cortical da raiz. Neste estágio lesões marrom avermelhadas podem ser observadas ao longo do córtex (Stover, 1972). Além da podridão das raízes, outros sintomas secundários podem ser observados como murcha, amarelecimento de folhas, desfolhação prematura, redução do tamanho e número de folhas, redução do crescimento e desenvolvimento das plantas (Dizon *et al.*, 2010).

Meloidogyne spp. atacam quase todas culturas economicamente importantes. Entre as espécies encontradas em diferentes regiões produtoras de banana, *M. incognita* e *M. javanica* são as de ocorrência mais ampla (Gowen e Quénéhervé, 1990). Estes também são endoparasitas, mas sedentários. Uma vez dentro das raízes, eles induzem a produção de células gigantes multinucleadas e a multiplicação de células do córtex, resultando na formação de galhas. Os primeiros sintomas da infecção pelo nematoide são a presença de

galhas nas raízes primárias, seguidas por galhas nas raízes secundárias e terciárias, resultando em sintomas sistêmicos como amarelecimento das folhas, redução de área foliar e do crescimento da planta com reflexo na produtividade, com perdas chegando a 57% (Guzmán-Piedrahita e Castaño-Zapata, 2002).

Em plantios comerciais, os nematoides fitoparasitas geralmente são controlados com o uso da rotação de cultura e aplicação de nematicidas (Gowen *et al.*, 2005). Como no Brasil, nem sempre os produtores possuem terra o suficiente para a rotação de cultura, já que grande parte da produção vem de pequenas propriedades e, o controle químico nem sempre é praticado, pois os nematicidas têm alto custo e podem trazer problemas à saúde dos aplicadores e ao ambiente, novos métodos de controle têm sido desenvolvidos (Speijer e De Waele, 1997; Elsen *et al.*, 2004).

A identificação e o uso de fontes de resistência ou tolerância a nematoides são considerados altamente apropriados para a redução de problemas nematológicos nos cultivos de banana. O desenvolvimento de cultivares resistentes contra nematoides é um dos critérios chave nos programas de melhoramento (Hartman *et al.*, 2010). Diante disso, existe uma grande necessidade de se obter variedades geneticamente melhoradas para a resistência ou tolerância a nematoides, garantindo uma produção sustentável e ambientalmente segura.

Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos visando identificar fontes de resistência ou tolerância a *Meloidogyne* e *Radopholus* em genótipos de bananeiras, sendo que poucos desses trabalhos foram realizados em condições de campo (Costa *et al.*, 1997; 1998; Moens *et al.*, 2001; Vilas Boas *et al.*, 2002, Guedira *et al.*, 2004; Cofcewicz *et al.*, 2004a,b; Janarthani *et al.*, 2005; Santos, 2007; Teixeira, 2007, Gaidashova *et al.*, 2008; Quénéhervé *et al.*, 2009; Dizon *et al.*, 2010).

O presente estudo tem como objetivo identificar acessos de bananeira tolerantes a *Radopholus similis* e *Meloidogyne incognita* em condições de campo, utilizando como critérios de seleção o vigor das plantas e a taxa de multiplicação dos nematoides.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Estação Experimental do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sendo avaliado no período de outubro de 2006 a julho de 2007, com duração em campo de nove meses. A inoculação com os nematoides

foi realizada em mudas cultivadas em vasos em casa de vegetação, onde permaneceram quatro meses até serem transferidos para o campo.

2.1. Material vegetal

Os acessos (Tabela 1) foram obtidos no banco de germoplasma da Embrapa – Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, BA. As mudas foram produzidas por micropropagação e aclimatadas por três semanas em câmara de crescimento (27-28 °C) com 12 horas de fotoperíodo. As plântulas foram transplantadas para vasos de 1,5 l, contendo mistura autoclavada de latossolo vermelho e areia, na proporção de 3:1. Após o transplante, as mudas foram mantidas em casa de vegetação pelo período de 30 dias. Depois de 15 dias do transplante foi realizada uma adubação de cobertura com 8,3g de NPK (4:14:8) por vaso.

Todos os acessos foram avaliados para o nematoide *M. incognita* e *R. similis*, com exceção dos acessos Pipit, Pisang Nangka e Birmanie que não foram avaliados para o nematoide cavernícola.

Tabela 1. Lista de 14 acessos de bananeiras utilizados para avaliar a tolerância a *Meloidogyne incognita* e *Radopholus similis*, em Brasília-DF, 2007.

Número	Acessos	Grupo Genômico
1	1304-04	AA (Híbrido)
2	1304-06	AA (Híbrido)
3	1318-01	AA (Híbrido)
4	1319-01	AA (Híbrido)
5	4223-06	AA (Híbrido)
6	8694-15	AA (Híbrido)
7	Borneo	AA (Diploide Simples)
8	Grande Naine	AAA (Cultivar)
9	N118	AA (Diploide Simples)
10	Pipit	AA (Cultivar)
11	Pisang Nangka	AA (Diploide Simples)
12	Tjau Lagada	AA (Cultivar)
13	Vitória	AAAB (Cultivar)
14	Birmanie	AA (Diploide Simples)

2.2. Obtenção e multiplicação de *Radopholus similis*.

A população de *R. similis* usada na avaliação foi coletada em Pernambuco, em bananeiras da cultivar Pacovan e foi mantida em plantas da cultivar Grande Naine. Esta população foi escolhida por ter se mostrado agressiva de acordo com Costa (2004).

Os nematoides foram extraídos de tecidos de raízes que foram previamente fragmentadas (aproximadamente 2 cm) e em seguida trituradas em liquidificador em velocidade máxima, por 15 segundos. A suspensão foi passada em peneiras de 140 e 400 mesh. A suspensão recuperada na peneira de 400 mesh foi transferida para Funil de Baermann modificado, onde foi mantida por aproximadamente 24 horas com aeração produzida com o auxílio de uma bomba de aquário. Os espécimes obtidos pelo funil de Baermann foram então coletados em peneira de 400 mesh. Os nematoides extraídos das raízes do acesso Grande Naine foram então multiplicados em cultura de tecidos de cilindros de cenoura (*Daucus carota* L.) com a metodologia de ágar-água, conforme descrito no segundo capítulo desta tese.

2.3. Obtenção e multiplicação de *Meloidogyne incognita*.

A população de *M. incognita* utilizada foi obtida por Costa (2004) e mantida em plantas de tomateiro da cultivar “Santa Cruz – Kada”. Essa população pertence a uma coleção de trabalho na Estação Experimental do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Visando certificar a pureza do inóculo, a população foi mantida em mudas de tomateiro por 45 dias, para a obtenção de fêmeas em estágio de desenvolvimento ideal para a identificação de espécies de acordo com as configurações perineais (Hartman e Sasser, 1985). Além da identificação por cortes perineais, foi feita a identificação pela técnica de eletroforese de proteínas (Carneiro e Almeida, 2001), adaptada a partir da metodologia de Esbenshade e Triantaphyllou (1990).

Devido à longa permanência em tomateiro, a população de *M. incognita* foi posteriormente transferida para mudas de bananeira “Grande Naine” onde permaneceu durante 90 dias, para assegurar a manutenção da patogenicidade deste isolado à bananeira e, para a produção de inóculo a ser usado na realização do experimento.

2.4. Preparo do inóculo e inoculação.

Decorrido o período de aclimação, mudas de cada clone foram inoculadas com ambos nematoides, individualmente. A extração dos *R. similis* dos cilindros de cenoura combinou as metodologias de peneiramento e funil de Baermann modificado. A parede interna dos frascos contendo os discos de cenoura com nematoides foi lavada com água esterilizada e a suspensão resultante da lavagem foi passada em peneiras de 140 e 400 mesh. A suspensão recolhida da última peneira foi mantida em béqueres que, a seguir, foram vedados com telas de nylon e papel absorvente, sob oxigenação por 24 horas. O inóculo recolhido dos béqueres foi calibrado para 200 nematoides/ml.

Já em relação *M. incognita*, os juvenis e ovos foram extraídos das raízes pela metodologia de Hussey e Barker (1973), modificada por Bonetti e Ferraz (1981). As raízes foram picadas em pedaços de aproximadamente 2 cm de comprimento e trituradas em liquidificador por 15 segundos em velocidade máxima. Para que os ovos fossem liberados da massa de ovos, foi adicionada uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % nas raízes, até cobri-las. A suspensão resultante foi recolhida e passada em peneira de 140 mesh, e os ovos recolhidos em peneiras de 500 mesh, lavando o excesso de hipoclorito de sódio sob água de torneira. Como a suspensão obtida se apresentou muito suja, foi ainda submetida a um processo de clarificação, utilizando a metodologia de Coolen e D'Herde (1972) modificada. Após a extração os nematoides e ovos foram contados e calibrados para 2500 ovos e juvenis de segundo estágio por ml.

A inoculação de ambos nematoides foi feita em plantas separadas, em que dois orifícios opostos foram abertos na superfície do solo, ao redor das mudas expondo as raízes, onde a suspensão de nematoides (1 ml) foi depositada sobre as raízes. As plantas permaneceram por 120 dias em casa de vegetação e posteriormente foram transplantadas para microparcels de manilhas de concreto com 40 cm de abertura em condições de campo.

2.5. Delineamento experimental.

O experimento foi implantado no campo em microparcels, numa distribuição inteiramente casualizada (Figura 1).



Figura 1. Disposição em campo das plantas inoculadas e não inoculadas com nematoides.

Os acessos inoculados com *R. similis*: 1304-04, 1319-01, Borneo, Pipit e Pisang Nangka tiveram três repetições para cada um dos dois tratamentos, plantas não inoculadas e inoculadas. Os acessos 1304-06, 1318-01, 8694-15, Grande Naine, N118 e Tjau Lagada tiveram quatro repetições para cada tratamento, enquanto que ‘4223-06’ e ‘Vitória’ tiveram cinco repetições.

Para as plantas não inoculadas e as inoculadas com *M. incognita*, os acessos Pisang Nangka e Birmanie tiveram três repetições para os tratamentos, 1304-04, 1304-06, Borneo N118, Tjau Lagada tiveram quatro repetições e 1318-01, 1319-01, 4223-06, 8694-15, Grande Naine, Pipit e Vitória tiveram cinco repetições.

2.6. Avaliação e análise estatística.

Após nove meses, os nematoides foram extraídos das raízes e do solo das bananeiras, sendo submetidos à contagem. Os níveis populacionais dos nematoides nas raízes e no solo foram avaliados após a extração pelos métodos modificados de Coolen e D’Herde (1972) e de Jenkins (1964), respectivamente.

A tolerância baseada no vigor das plantas foi avaliada através da comparação de médias resultantes de cada um dos tratamentos, inoculado e testemunha, em relação à

altura do pseudocaule, diâmetro do pseudocaule, peso fresco de raiz e número de perfilhos, por planta.

O Fator de Reprodução (FR = população final/ população inicial) das espécies de nematoides foi estimado para cada repetição, sendo que a população final corresponde ao total de nematoides encontrados no solo e na raiz (Seinhorst, 1967). Variáveis como o número de nematoides por grama de raiz, número de nematoides por sistema radicular, número de nematoides no solo e número total de nematoides foram também avaliadas.

Para realizar as análises de variância, os dados originais foram transformados em $\log(x + 1)$.

Para avaliar a tolerância, as médias das variáveis de desenvolvimento da planta foram calculadas e comparadas entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As variáveis de multiplicação dos nematoides em cada acesso foram avaliadas pelo agrupamento das médias pelo teste de Scott-Knott a 1 % de probabilidade.

Ambos os testes foram realizados com o auxílio do Programa Genes: Genética quantitativa e estatística experimental, versão 2006.4.1 (Cruz, 2006).

3. RESULTADOS

3.1. Reação dos acessos de bananeira a *Radopholus similis*.

Os acessos Borneo, N118 e Tjau Lagada foram os que apresentaram as menores taxas de multiplicação de *R. similis* (Tabela 2). Esses acessos também tiveram baixo número de nematoides por grama de raiz e baixo número de nematoides no solo e na raiz. O acesso N118 se destacou dos demais acessos de bananeira por apresentar a menor quantidade de nematoide para todas as variáveis de multiplicação do nematoide (Tabela 2).

Os acessos que tiveram as maiores taxas de multiplicação de *R. similis* foram: 1304-04, 4223-06, 1318-01, Vitória e 1319-01. Para as outras variáveis de multiplicação de *R. similis*, esses acessos apresentaram os maiores números de nematoides. Os acessos 1304-04 e 1319-01, apesar de terem uma quantidade de nematoide elevada no sistema, tiveram uma baixa quantidade de nematoide por grama de raiz e de nematoides em todo o sistema radicular. Os acessos Grande Naine e 1304-06 são exemplos do efeito contrário do que ocorreu a 1304-04 e 1319-01, pois neste caso os acessos apresentaram um número relativamente alto de nematoide presentes na raiz e baixas quantidades de nematoides no solo indicando que estes acessos são boas hospedeiras do nematoide (Tabela 2).

Tabela 2. Taxa de multiplicação de *Radopholus similis* em 11 acessos de bananeira após 13 meses da inoculação e mantidas em condições de campo por nove meses.

Acessos	Nematoides/g de raiz ¹		Nematoides no solo ¹		Nematoides na Raiz ¹		Nematoides Total ¹		FR ¹	
1304-04	29	b	194527	a	9095	b	203622	a	1018	a
4223-06	132	a	133455	a	42380	a	175835	a	879	a
1318-01	87	a	130690	a	34584	a	165274	a	826	a
Vitória	98	a	112092	a	25705	a	137797	a	689	a
1319-01	27	b	112155	a	8551	b	120706	a	604	a
Grande .Naine	127	a	45993	b	32177	a	78170	b	391	b
8694-15	27	b	55711	b	6682	b	62393	b	312	b
1304-06	69	a	49428	b	4025	c	53453	b	267	b
Tjau Lagada	47	b	11980	c	5338	c	17317	c	87	c
N118	14	c	14745	c	441	d	15186	c	76	c
Borneo	34	b	12441	c	1402	d	13843	c	69	c
CV%	8,18		3,15		6,13		2,92		5,57	
Fcal	23,3**		25,43**		18,36**		28,03**		28,24**	

¹ Os dados são médias de quatro repetições. Para análise, os dados originais foram transformados em $\log(x + 1)$ e médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 1% (**). (Fcal.) valor de F calculado na análise estatística; (CV%) coeficiente de variação; (FR) fator de reprodução.

Os acessos 1318-01, 1319-01, N118 e Tjau Lagada quando inoculados com *R. similis* não diferiram das plantas não inoculadas, o que pode ser um indicativo de algum nível de tolerância para estes acessos. Os acessos 1304-04 e 4223-06 apesar de haver uma diferença estatística significativa para as características diâmetro do pseudocaule e altura de planta para o acesso 1304-04 e, de número de perfilhos para 4223-06, as plantas inoculadas tiveram médias maiores que as plantas não inoculadas o que também pode ser um indicativo de tolerância (Tabela 3).

Já os acessos 1304-06, 8694-15, Borneo, Grande Naine e Vitória tiveram diferença estatística significativa em pelo menos uma das características de desenvolvimento avaliadas, com maiores médias para as plantas não inoculadas e, portanto estes acessos foram afetados negativamente pela ação do nematoide. Os acessos Borneo e 1304-06 se destacaram em relação a estes acessos, pois das quatro características avaliadas, três delas tiveram diferença significativa negativa em relação às plantas não inoculadas. O acesso Vitória teve duas características afetadas, altura da planta e número de perfilhos. Grande Naine e 8694-15 tiveram apenas uma das características avaliadas afetada (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação entre características de desenvolvimento de plantas inoculadas e não-inoculadas com *Radopholus similis*, 13 meses após a inoculação e mantidas por nove meses em condições de campo.

Acessos	Repetições	Peso da raiz ¹		Diâmetro do pseudocaule ¹		Altura da planta ¹		Número de Perfilhos									
		Testemunha	Inoculado	Testemunha	Inoculado	Testemunha	Inoculado	Testemunha	Inoculado								
1304-04	3	318,12	a	303,55	a	5,60	b	7,95	a	76,50	b	101,50	a	2,00	a	2,00	a
1304-06	4	547,67	a	121,99	b	7,67	a	3,67	b	105,50	a	58,82	a	2,25	a	1,00	b
1318-01	4	310,72	a	329,59	a	7,30	a	7,40	a	85,00	a	87,00	a	1,20	a	1,33	a
1319-01	3	540,62	a	315,35	a	5,36	a	8,35	a	75,00	a	100,00	a	2,40	a	3,50	a
4223-06	5	280,73	a	265,61	a	6,34	a	7,30	a	80,00	a	96,00	a	1,20	b	2,00	a
8694-15	4	642,27	a	198,60	b	5,70	a	5,27	a	60,00	a	53,00	a	2,20	a	2,00	a
Borneo	3	338,10	a	40,34	b	7,63	a	2,80	b	97,66	a	29,50	b	1,75	a	1,50	a
Grande Naine	4	321,05	a	188,29	a	5,67	a	6,27	a	47,00	a	48,00	a	2,80	a	1,66	b
N118	4	116,85	a	38,87	a	3,15	a	2,05	a	31,75	a	26,32	a	1,80	a	2,66	a
Tjau lagada	4	138,08	a	89,16	a	3,70	a	5,37	a	52,75	a	65,00	a	2,50	a	2,00	a
Vitória	5	352,53	a	168,52	a	9,56	a	6,68	a	101,90	a	71,20	b	2,60	a	1,60	b

¹ Os dados são médias do número de repetições de cada acesso. Para análise os dados originais foram transformados em $\log(x + 1)$ e médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tomando como base as variáveis de multiplicação do nematoide, número de nematoides na raiz e fator de reprodução e, todas as variáveis de desenvolvimento das plantas, os acessos 1304-04, 4223-06, 1318-01, 1319-01, Tjau Lagada e N118 foram considerados tolerantes. O acesso Borneo foi o único considerado intolerante a *R. similis* (Tabela 4).

Tabela 4. Reação de 11 acessos de bananeira a *Radopholus similis* baseada na taxa de multiplicação do nematoide e vigor das plantas em condições de campo.

Acessos	<i>Radopholus similis</i>						Reação
	NR	FR	PR	DP	AP	NP	
1304-04	+++ ¹	+++	-	+	+	-	Tolerante
4223-06	++++	+++	-	-	-	+	Tolerante
1318-01	++++	+++	-	-	-	-	Tolerante
Vitória	++++	+++	-	-	++	++	Suscetível
1319-01	+++	+++	-	-	-	-	Tolerante
Grande Naine	++++	++	-	-	-	++	Suscetível
8694-15	+++	++	++	-	-	-	Suscetível
1304-06	++	++	++	++	-	++	Suscetível
Tjau Lagada	++	+	-	-	-	-	Tolerante
N118	+	+	-	-	-	-	Tolerante
Borneo	+	+	++	++	++	-	Intolerante

NR: nematoides na raiz, FR: fator de reprodução do nematoide; PR: peso da raiz; DP: diâmetro do pseudocaule; AP: altura da planta; NP: número de perfilhos. ¹ Para NR: “+” = baixa quantidade de nematoide; “++” e “+++” = média quantidade; “++++” = alta quantidade. Para FR: “+” = baixo fator de reprodução; “++” = médio; “+++” = alto. Para PR, DP, AP e NP: “-” = não significativo; “+” = significativo com médias menores para plantas não inoculadas; “++” significativamente com médias menores para plantas inoculadas.

3.2. Reação dos acessos de bananeira a *Meloidogyne incognita*.

Não houve diferença estatística significativa entre os acessos quanto às variáveis fator de reprodução, nematoides totais e nematoides no solo. No entanto, os valores relacionados à multiplicação do nematoide foram altos. Os acessos 1304-06, 1304-04, Borneo, N118 e Pipit tiveram menores quantidades de nematoides presentes na raiz em relação aos demais acessos. Os acessos que tiveram menores médias de nematoides por grama de raiz foram 1304-06, 1304-04, Borneo, Vitória, N118, Grande Naine, 8694-15 e Pipit (Tabela 5).

Tabela 5. Taxa de multiplicação de *Meloidogyne incognita* em 14 acessos de bananeira após 13 meses da inoculação e mantidos por nove meses em condições de campo.

Acessos	Nematoides/g de raiz ¹		Nematoides no solo ¹		Nematoides na Raiz ¹		Nematoides Total ¹		FR ¹	
Tjau Lagada	402	a	1624832	a	36928	a	1661759	a	665	a
Pisang Nangka	558	a	765292	a	36988	a	802280	a	321	a
1318-01	270	a	547580	a	67552	a	615131	a	246	a
Birmanie	313	a	476894	a	87032	a	563926	a	226	a
4223-06	440	a	381704	a	101224	a	482927	a	193	a
Pipit	114	b	430901	a	6626	b	437527	a	175	a
8694-15	152	b	360027	a	36531	a	396557	a	159	a
Grande Naine	199	b	358142	a	25859	a	384001	a	154	a
N118	74	b	325155	a	6469	b	331624	a	133	a
1319-01	457	a	266721	a	34413	a	301134	a	120	a
Vitória	220	b	217712	a	53125	a	270838	a	108	a
Borneo	56	b	238447	a	2292	b	240738	a	96	a
1304-04	122	b	220540	a	11760	b	232300	a	93	a
1304-06	402	b	114040	a	19190	b	133230	a	53	a
CV%	13,77		8,11		11,13		7,88		20,12	
Fcal	3,84**		2,34**		5,37**		2,41**		2,43**	

¹ Os dados são médias de quatro repetições. Para análise os dados originais foram transformados em $\log(x + 1)$ e médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 1% (**). (Fcal.) valor de F calculado na análise estatística; (CV%) coeficiente de variação; (FR) fator de reprodução.

As médias das variáveis de desenvolvimento das plantas inoculadas e não inoculadas dos acessos Birmanie, Pipit e Pisang Nangka não diferiram estatisticamente indicando com isso, que esses acessos não foram afetados pelo parasitismo do nematoide nas condições ambientais do experimento. Os demais acessos tiveram pelo menos uma das médias significativamente diferentes entre as plantas inoculadas e não inoculadas, com médias menores para as plantas inoculadas com *M. incognita* e com isso, indicando que podem ter sido afetadas pelo nematoide das galhas. O acesso 1304-06 teve as quatro variáveis (peso de raiz, diâmetro do caule, altura de planta e número de perfilhos) afetadas negativamente pelo nematoide, enquanto que os acessos 1304-04, 1319-01 e Borneo tiveram todas as variáveis afetadas negativamente pelo nematoide, exceto o número de perfilhos (Tabela 6).

Tabela 6. Comparação entre características de desenvolvimento de plantas inoculadas e não-inoculadas com *Meloidogyne incognita*, mantidas por nove meses em condições de campo.

Acessos	Repetições	Peso da raiz		Diâmetro do pseudocaule		Altura da planta		Nº de perfilhos	
		Testemunha	Inoculado	Testemunha	Inoculado	Testemunha	Inoculado	Testemunha	Inoculado
1304-04	4	292,19 a	96,24 b	6,47 a	3,02 b	82,37 a	49,25 b	2,00 a	1,50 a
1304-06	4	547,67 a	29,70 b	7,67 a	2,30 b	105,50 a	35,37 b	2,25 a	1,40 b
1318-01	5	452,34 a	414,60 a	7,68 a	4,46 b	89,00 a	50,00 b	1,20 a	1,60 a
1319-01	5	387,61 a	101,40 b	4,60 a	2,30 b	66,40 a	39,40 b	2,40 a	1,80 a
4223-06	5	280,73 a	221,33 a	6,34 a	4,24 b	80,00 a	58,70 a	1,20 a	1,40 a
8694-15	5	580,50 a	301,81 b	5,42 a	4,02 a	57,60 a	47,90 a	2,20 a	1,00 b
Birmanie	3	377,50 a	244,24 a	4,63 a	2,80 a	66,33 a	37,25 a	2,33 a	2,50 a
Borneo	4	320,52 a	38,50 b	7,37 a	1,50 b	93,25 a	26,37 b	1,75 a	1,00 a
Grande Naine	5	285,94 a	137,35 a	5,18 a	4,24 a	45,40 a	34,20 b	2,80 a	1,40 b
N118	4	81,15 a	79,25 a	2,15 a	1,97 a	22,75 a	21,25 a	1,80 a	2,25 a
Pipit	5	89,74 a	60,75 a	3,20 a	2,32 a	26,70 a	20,10 a	2,20 a	1,80 a
Pisang Nangka	3	194,81 a	55,48 b	5,70 a	2,33 a	59,25 a	22,66 a	1,00 a	1,00 a
Tjau Lagada	4	138,08 a	96,53 a	3,70 a	4,07 a	52,75 a	59,37 a	2,50 a	1,40 b
Vitória	5	352,53 a	335,16 a	9,56 a	7,8 a	101,9 a	76,7 a	2,60 a	1,60 b

¹ Os dados são médias do número de repetições de cada acesso. Para análise os dados originais foram transformados em $\log(x + 1)$ e médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Os acessos N118, Pipit e Birmanie foram considerados tolerantes com base nas variáveis de multiplicação do nematoide, número de nematoides na raiz e fator de reprodução e, todas as variáveis de desenvolvimento das plantas. As demais plantas foram consideradas suscetíveis (Tabela 7).

Tabela 7. Reação de 11 acessos de bananeira a *M. incognita* baseada na taxa de multiplicação do nematoide e vigor das plantas em condições de campo.

Acessos	<i>Meloidogyne incognita</i>						Reação
	NR	FR	PR	DP	AP	NP	
1304-04	+ ¹	++	++	++	++	-	Suscetível
4223-06	++	++	-	++	-	-	Suscetível
1318-01	++	++	-	++	++	-	Suscetível
Vitória	+	++	-	-	-	++	Suscetível
1319-01	++	++	++	++	++	-	Suscetível
Grande Naine	+	++	-	-	++	++	Suscetível
8694-15	+	++	++	-	-	++	Suscetível
1304-06	+	++	++	++	++	++	Suscetível
Tjau Lagada	++	++	-	-	-	++	Suscetível
N118	+	++	-	-	-	-	Tolerante
Borneo	+	++	++	++	++	-	Suscetível
Pipit	+	++	-	-	-	-	Tolerante
Birmanie	++	++	-	-	-	-	Tolerante
Pisang Nangka	++	++	++	-	-	-	Suscetível

NR: nematoides na raiz, FR: fator de reprodução do nematoide; PR: peso da raiz; DP: diâmetro do pseudocaule; AP: altura da planta; NP: número de perfilhos. ¹ Para NR: “+” = baixa quantidade de nematoide; “++” = alta quantidade. Para FR: “++” alto. Para PR, DP, AP e NP: “-” = não significativo; “++” significativo com médias menores para plantas inoculadas.

4. DISCUSSÃO

Resistência pode ser considerada como a habilidade da planta suprimir o desenvolvimento de pragas ou patógenos, enquanto que tolerância é a habilidade da planta

ter um bom desenvolvimento apesar de infectada pelo patógeno (Bos e Parlevliet, 1995). A avaliação ou interpretação dos dados obtidos durante uma seleção de plantas tolerantes ou resistentes a nematoides deve ser baseada na combinação de dados de reprodução do nematoide (número de nematoide na raiz) e os dados de resposta da planta (porcentagem de raízes mortas, índices de necrose radicular e eventualmente, produtividade). As combinações desses dados indicarão se o acesso é resistente ou suscetível, tolerante ou intolerante) (Speijer e De Waele, 1997). Na presente avaliação, os acessos que não expressaram efeito no desenvolvimento apesar do alto fator de reprodução, foram considerados tolerantes e não resistentes. Nenhum acesso avaliado neste trabalho foi classificado como resistente, pois nenhum deles suprimiu as populações dos nematoides, tanto no solo quanto na raiz, e ao mesmo tempo não tiveram o desenvolvimento afetado. Pelo contrário, plantas que tiveram valores altos do fator de reprodução do nematoide e tiveram o seu desenvolvimento negativamente afetado foram consideradas suscetíveis e, plantas que tiveram baixa população de nematoide e tiveram seu desenvolvimento afetado foram considerados intolerantes.

Apesar de não termos avaliado neste estudo, nenhum dos dados de resposta sugeridos por Speijer e De Waele (1997), alguns autores verificaram que há uma correlação positiva entre os parâmetros de altura de plantas, diâmetro do pseudocaule, peso de raiz, peso dos perfilhos e peso da parte aérea, com necrose na raiz e ou morte de raiz (Vilas Boas *et al.*, 2002; Guedira *et al.*, 2004; Dizon *et al.*, 2010). Marin *et al.* (2000) durante o desenvolvimento e avaliação de um método padrão para seleção de bananeiras resistentes a *R. similis*, verificaram que havia uma alta correlação entre a população final do nematoide e necroses nas raízes. No entanto, os autores sugerem, que ambas as variáveis sejam determinadas, pois nem sempre a alta população se encontra necessariamente relacionada a danos severos. Por outro lado, Hartman *et al.* (2010) ao avaliar a resposta de genótipos de *Musa* a *R. similis* e *H. multicinctus*, observaram que a porcentagem de necrose nas raízes estava relacionada com a redução da produtividade para ambas plantas inoculadas e não inoculadas, sugerindo que outros fatores podem estar contribuindo para as necroses nas raízes e na redução da produtividade.

Alterações no vigor das plantas como, por exemplo, redução do tamanho e número de folhas podem ser considerada como sintomas ocasionados por nematoides (Orton Williams e Siddiqi, 1973). Portanto, a perda de vigor pode indicar a ocorrência de danos em mudas de bananeiras, demonstrando que os dados aqui apresentados são relevantes para estudar o comportamento de diferentes acessos a nematoides em condições de campo.

4.1. Reação dos acessos de bananeira a *Radopholus similis*.

Os acessos que tiveram as menores taxas de multiplicação de *R. similis* (N118 e Tjau Lagada) foram considerados tolerantes ao nematoide, pois apesar de apresentarem taxas mais baixas de que os demais acessos o fator de reprodução também é considerado alto já que foi bem superior a 1. Valores superiores a 1 para o fator de reprodução caracterizam as plantas com suscetíveis, mas nesse caso as plantas não foram consideradas suscetíveis pois não tiveram seu desenvolvimento afetado pelo nematoide. Vilas Boas *et al.* (2002) avaliando a reação de clones de bananeira ao nematoide *M. incognita* caracterizou os clones como suscetíveis quando estes apresentavam FR acima de 1 e altamente suscetível acima de 2. Costa (2004) ao avaliar a reação de acessos de bananeira ao nematoide *R. similis* classificou o acesso N118 como parcialmente resistente em condições de casa de vegetação. Este acesso e o Tjau Lagada foram classificados, também como parcialmente resistentes em casa de vegetação (Santos, 2007). Portanto, as informações são coerentes com o presente resultado, demonstrando que ambos os acessos anteriormente classificados como parcialmente resistentes, quando cultivados por períodos de tempo mais longos, interagindo com o nematoide em condições de campo se comportaram como tolerantes ao nematoide.

Outro acesso que apresentou um fator de reprodução baixo foi Borneo, No entanto, neste caso esse acesso foi considerado intolerante, pois teve o seu desenvolvimento afetado. Segundo Roberts, (2002) plantas intolerantes podem sofrer injúrias e se desenvolverem menos ou até mesmo morrer quando infectadas. As plantas inoculadas com o nematoide cavernícola tiveram uma redução no peso da raiz, no diâmetro do pseudocaule e na altura das plantas em relação às plantas não inoculadas. O acesso Borneo foi o único com baixas populações de nematoide, associadas a baixos valores para as variáveis de desenvolvimento das plantas avaliadas. Santos (2007) ao avaliar este acesso em condições de casa de vegetação verificou elevada suscetibilidade. Outros autores também haviam obtido o mesmo resultado em condições semelhantes (Wehunt *et al.*, 1978; Quénéhervé, 2009a e 2009b). Portanto, o acesso Borneo quando avaliado em condições de casa de vegetação se comporta como suscetível, apresentando altas taxas de multiplicação de *R. similis*. No entanto, quando levado a campo e cultivado por períodos mais longos de tempo, as taxas se reduzem em relação aos demais acessos. Provavelmente em condição de campo a população tenha aumentado em determinado momento e afetado o desenvolvimento da planta, como foi observado neste experimento. A falta de raízes com

tecidos vivos para alimentar o nematoide pode ter contribuído para a diminuição do número final de nematoides.

Os acessos 1304-04, 4223-06, 1318-01, Vitória e 1319-01 se destacaram por apresentarem os maiores fatores de reprodução do nematoide cavernícola e foram considerados tolerantes, com exceção de Vitória o qual foi classificado como suscetível ao ser o único destes acessos que teve as variáveis de vigor de planta afetadas negativamente. A altura das plantas e o número de perfilhos foram menores do que nas plantas não inoculadas para este acesso que apresentou elevada população do nematoide no solo e na raiz. O acesso Vitória foi classificado anteriormente como parcialmente resistente a *R. similis* em condições de casa de vegetação (Santos, 2007).

Os acessos tolerantes 1304-04 e 4223-06 quando inoculados com *R. similis* tiveram maiores médias no diâmetro e altura do pseudocaule, no caso do acesso 1304-04 e, do número de perfilhos, no caso de 4223-06. Este fato pode ser visto como um indicativo de tolerância onde estes acessos possuem um efeito compensatório ao se desenvolver mais para compensar os danos ocasionados pela elevada população do nematoide. Fatos como este já foram observados. Plantas tolerantes com baixa taxa de mortalidade radicular, as quais sob alta pressão do nematoide compensaram as perdas de raízes com o lançamento de novas raízes (Hartman *et al.*, 2010). Se analisarmos, os dois acessos mantiveram em média a mesma proporção de raízes que as plantas não inoculadas mesmo sob alta população de nematoides presente nas raízes. Portanto, de alguma maneira as plantas mantiveram um bom desenvolvimento quando comparadas às testemunhas.

Os acessos 1304-04 e 1319-01, ao longo do período de avaliação, se tornaram hospedeiras menos receptivas de *R. similis*, pois a maior parte dos nematoides foram encontrados no solo e não no interior das raízes. O contrário ocorreu quando estes acessos foram avaliados em condições de casa de vegetação, onde foi observada uma população relativamente maior no interior de suas raízes (Costa *et al.*, 1998; Santos, 2007). O acesso 1304-04 havia sido considerado como suscetível e de baixa resistência, enquanto 1319-01 com resistência intermediária e parcialmente resistente por Costa *et al.* (1998) e Santos (2007), respectivamente. Diferenças entre os dados de campo e de casa de vegetação podem indicar que acessos considerados suscetíveis em avaliação de curto prazo em casa de vegetação, ao longo do tempo em condição de campo podem se expressar como tolerantes, quando por algum motivo os nematoides migram do interior da raiz para o solo. No entanto, uma análise como esta deve ser feita com cuidado, pois pode ter ocorrido que os nematoides encontrados no solo tenham migrado de raízes mortas, e as raízes das quais

os nematoides foram extraídos já podiam ser raízes novas. Para tirar qualquer dúvida neste sentido, novos experimentos em campo devem ser realizados, onde avaliações da quantidade de nematoide sejam realizadas ao longo do tempo.

Diferentemente dos acessos 1304-04 e 1319-01, os acessos Grande Naine e 1304-06 mantiveram o mesmo comportamento em casa de vegetação quando levadas ao campo e foram classificadas como suscetíveis. Neste caso, as plantas mantiveram a maior parte dos nematoides no interior das raízes em qualquer situação, sendo ela em campo ou casa de vegetação. Os acessos em questão, anteriormente, já foram classificados como suscetíveis ao nematoide cavernícola (Costa *et al.*, 1998; Santos, 2007). O acesso 8694-15, também considerado suscetível, já havia sido avaliado em casa de vegetação e havia se comportado de maneira semelhante ao que ocorreu no presente ensaio, em que altas populações foram encontradas no interior das raízes e no solo (Santos, 2007).

4.2. Reação dos acessos de bananeiras a *Meloidogyne incognita*.

Em relação a esse nematoide, apenas três dos acessos avaliados foram considerados tolerantes, pois apesar das altas taxas de multiplicação do nematoide e alta quantidade de nematoides presentes no interior das raízes, N118, Pipit e Birmanie não tiveram o vigor afetado ao serem parasitadas com o nematoide das galhas. Os acessos que aqui foram considerados tolerantes, anteriormente, haviam sido avaliados em casa de vegetação e se comportaram como moderadamente resistente (N118), pouco resistente (Pipit) e resistente (Birmanie) a *M. incognita* (Teixeira, 2007). Esta mesma autora também testou o comportamento desses acessos em relação à resistência a *M. javanica* e *M. arenaria*, sendo que, N118 se comportou como moderadamente resistente a ambas espécies, Pipit como resistente a *M. javanica* e moderadamente resistente *M. arenaria* e, Birmanie como moderadamente resistente a *M. javanica* e resistente a *M. arenaria*. Portanto, estes três acessos ao serem avaliados em campo tiveram comportamento semelhante àquele em casa de vegetação e, mostraram que além de hospedarem menores populações de *M. incognita* em curto intervalo de tempo, podem suportar maiores populações em campo sem aparentemente sofrerem prejuízos ao seu desenvolvimento. Os acessos 4223-06, 1318-01, Grande Naine, Tjau Lagada e Pisang Nangka não haviam sido avaliados em casa de vegetação. Os demais acessos se comportaram como suscetíveis ou de pouca resistência a *M. incognita* (Teixeira, 2007). Os acessos 1304-04, 4223-06, 1318-01, Vitória, 1319-01, Grande Naine, 8694-15, 1304-06, Tjau Lagada, Borneo e Pisang Nangka tiveram o vigor

afetado e foram considerados suscetíveis. Em sua maioria mantiveram comportamento semelhante tanto em casa de vegetação quanto a campo.

Os acessos que em casa de vegetação exibiram algum grau de resistência (4223-06, 1318-01, Grande Naine, Tjau Lagada e Pisang Nangka) não foram capazes de manter as populações em baixos níveis e, portanto foram negativamente afetadas pelo nematoide *M. incognita*.

O acesso N118 manteve o comportamento de tolerância em condições de campo a ambas espécies de nematoides (*R. similis* e *M. incognita*) avaliadas e, se destacou como potencial fonte de tolerância de amplo espectro e de interesse para a utilização em futuros trabalhos de melhoramento genético.

Apesar dos acessos não terem sido avaliados em fase de produção, os resultados aqui apresentados e respaldados por trabalhos anteriores em casa de vegetação indicam a existência de tolerância entre os acessos avaliados quanto ao parasitismo de *M. incognita* e *R. similis*. No entanto, novos estudos deverão ser realizados por períodos mais longos, avaliando fatores de desenvolvimento da planta, danos radiculares e queda de produtividade.

5. CONCLUSÕES

As variáveis analisadas relacionadas às taxas de multiplicação dos nematoides e ao vigor das plantas são indicativos de tolerância em condições de campo. Com base em parâmetros nesses critérios de avaliação, os acessos 1304-04, 4223-06, 1318-01, 1319-01, Tjau Lagada e N118 foram considerados tolerantes a *R. similis* e, os acessos N118, Pipit e Birmanie foram considerados tolerantes a *M. incognita*. O acesso N118 se destacou por se comportar como tolerante a ambos nematoides, mostrando-se como um germoplasma com potencial de ser utilizado em futuros trabalhos de melhoramento genético de bananeiras.

6. LITERATURA CITADA

- BLAKE, C.D. Root rot of bananas caused by *Radopholus similis* (Cobb) and its control in New South Wales. *Nematologica* 6: 295-310. 1961.
- BONETTI, J. I. S. e FERAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 6: 553. 1981.
- BOS, L. e PARLEVLIET, J.E. Concepts and terminology on plant/pest relationships: toward consensus in plant pathology and crop protection. *Annual Review Phytopathology* 33: 69–102. 1995.
- BRIDGE, J.; FOGAIN, R. e SPEIJER, P. The root lesion nematodes of banana, *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann, 1898) Filij. e Schu., 1941 and *Pratylenchus goodeyi* Sher e Allen, 1953. Montpellier, France: INIBAP, 4p. (INIBAP Musa Pest Fact Sheet, 2). 1997.
- CARNEIRO, R.M.D.G e ALMEIDA, M.R.A. Electrophoretic technique used in the study of root-knot nematode enzymes for species identification. *Nematologia Brasileira* 25: 35–44. 2001.
- COFCEWICZ, E.T.; CARNEIRO, R.M.D.G.; CASTAGNOCE SERENO, P e QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotype and genetic diversity of root-knot nematodes parasitizing Musa in Brazil. *Nematology* 6: 85-95. 2004a.
- COFCEWICZ, E.T.; CARNEIRO, R.M.D.G.; CORDEIRO, C.M.T.; QUÉNÉHERVÉ, P. e FARIA, J. L.C. Reação de cultivares de bananeira a diferentes espécies de nematoides das galhas. *Nematologia Brasileira* 28: 11–22. 2004b.
- COLLINGBORNE, F.M.B. e GOWEN, S.R. Screening of banana cultivars for resistance to *Radopholus similis* and *Pratylenchus coffeae*. INTERNATIONAL NETWORK FOR IMPROVEMENT IN BANANAS AND PLANTAINS. Montpellier: InfoMusa 6: 3. 1997.
- COOLEN, W.A. e D'HERDE, C.J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent State Agriculture Research Centre. Belgium: Merelbeke. 77p. 1972.

COSTA, D. da C. Variabilidade patogênica e genética de *Radopholus similis* em bananeira no Brasil. 2004. Tese (Doutorado). Universidade de Brasília, Brasília. 2004.

COSTA, D. da C.; SILVA, S. de O. e ALVES, F.R. Reação de genótipos de bananeira (*Musa* sp.) a *Radopholus similis* e *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Brasileira* 22: 49-56. 1998.

COSTA, D. da C.; SILVA, de O.; ALVES, F.R. e SANTOS, A. do C. Avaliação de danos e perdas à bananeira cv. Nanica causadas por *Meloidogyne incognita* na região de Petrolina – PE. *Nematologia Brasileira* 21: 21. 1997.

CRUZ, C.D. Programa Genes: Estatística experimental e matrizes. Viçosa (MG). 285p. 2006.

DAVIDE, R.G. Overview of nematodes as a limiting factor in *Musa* production. In: FRISON, E.A.; HARRY, J.-P. e DE WAELE, D. (eds.). *New frontiers in resistance breeding for nematode, Fusarium, and Sigatoka*. Proceedings of a workshop Kuala Lumpur, Malaysia 2–5 October, 1995. INIBAP, Montpellier, France pp 27–31. 1996.

DIZON, T.O.; PINILI, M.R.; CRUZ J.R., F.S; DAMASCO, O.P.; VAN DEN BERGH, I. e DE WAELE, D. Response of Philippine banana (*Musa* spp.) cultivars to *Radopholus similis* (Thorne) and *Meloidogyne incognita* Chitwood under greenhouse conditions. *Philippine Journal of Crop Science* 35: 36-51. 2010.

ELSEN, A.; GOOSSENS, B.; BELPAIRE, B.; NEYENS, A.; SPEIJER, P. e DE WAELE, D. Recolonisation by nematodes of hot water treated cooking banana planting material in Uganda. *Nematology* 6: 215–221. 2004.

ESBENSHADE, P.R. e TRIANTAPHYLLOU, A.C. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 22: 10–15. 1990.

FERRAZ, L.C.B. *Radopholus similis* em banana no Brasil: considerações gerais sobre o problema com ênfase aos danos causados à cultura. In: Congresso Internacional de *Nematologia Tropical* 27: 176-185. 1995.

FOGAIN, R. e GOWEN, S.R. Pathogenicity on maize and banana among isolates of *Radopholus similis* from four producing countries of Africa and Asia. *Fruits* 50: 5-9. 1995.

GAIDASHOVA, S.V.; UWIMPUHWE, B. e KARAMURA, E.B. Identification of banana varieties with resistance to nematodes in Rwanda. *African Crop Science Journal* 16:27-33. 2008.

GOWEN, S.; QUÉNÉHERVÉ, P. e FOGAIN, R. Nematode parasites of banana, plantains and abaca. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (eds.). *Plant parasitic nematodes in*

subtropical and tropical agriculture. CAB International, Wallingford, UK. pp. 611-644. 2005.

GOWEN, S. R. & QUÉNÉHÉRVÉ, P. Nematode parasites of bananas and abaca.

Pp. 431 – 460. In: LUC, M.; SIKORA, R. A. & BRIDGE, J. (eds). Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. C.A.B. International. Wallingford, U. K. 1990.

GUEDIRA, A.; RAMMAH, A.; TRIQUI, Z.; CHLYAH, H.; CLYAH, B. e HAICOUR, R. Évaluation de la résistance à deux nematodes: *Radopholus similis* et *Meloidogyne* spp. Chez quatre génotypes de bananiers au Maroc. C.R Biologies 327: 745-751. 2004.

GUZMÁN-PIEDRAHITA, O.A. e CASTAÑO-ZAPATA, J. Identification of plant parasitic nematodes of plantain ‘Dominico hartón’ (*Musa* AAB Simmonds), ‘Africa’, ‘FHIA-20’ and ‘FHIA-21’ in Colombia. Infomusa 11: 33–36. 2002.

HARTMAN, K.M. e SASSER, J.N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: BARKER, K.R.; CARTER, C.C. e SASSER, J.N. (eds.). An advanced treatise on *Meloidogyne*: Raleigh, NCSU e USAID Coop. pp. 69 – 77. 1985.

HARTMAN, J.B.; VUYLSTEKE, D.; SPEIJER, P.R.; SSANGO, F.; COYNE, D.L. e DE WAELE, D. Measurement of the field response of *Musa* genotypes to *Radopholus similis* and *Helicotylenchus multincinctus* and the implications for nematode resistance breeding. Euphytica 172: 139-148. 2010.

HUSSEY, R.S. e BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. Including a new technique. Plant Disease Report 57: 1025–1028. 1973.

IBGE. Produção Agrícola Municipal. Rio de Janeiro. Disponível: site. IBGE. <http://www.ibge.gov.br> . Consultado em Janeiro de 2011. 2009.

JANARTHANI, D.; SOORIANATHASUNDARAM, K.; POOMIMA, K. e KUMAR, N. Screening of certain banana accessions against *Radopholus similis* under field conditions. Nematol. Medit. 33: 139-143. 2005.

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

MARIN, D.H.; BARKER, K.R.; KAPLAN, D.T.; SUTTON, T.B. e OPPERMAN, C.H. Development and evaluations of a standart method for screening for resistance to *Radopholus similis* in bananas. Plant Disease 84: 689-693. 2000.

MOENS, T.A.S.; ARAYA, M. e DE WAELE, D. Correlations between nematode numbers and damage to banana (*Musa* AAA) roots under commercial conditions. Nematopica 31: 55–65. 2001.

ORTON WILLIAMS, K.J. e SIDDIQI, M.R. *Radopholus similis*. CIH description of plant parasitic nematodes Set 2, No. 27. St. Albans, UK: Commonwealth Institute of Helminthology. 1973.

QUÉNÉHERVÉ, P.; VALETTE, C.; TOPART, P.; TEZENAS DU MONTCEL, H. e SALMON, F. Nematode resistance in bananas: screening results on some wild and cultivated accessions of *Musa* spp. *Euphytica* 165: 123-136. 2009.

ROBERTS, P.A. Concepts and consequences of resistance. In: STARR, J.L.; COOK, R. e BRIDGE, J. (eds.). *Plant resistance to parasitic nematodes*. CABI Publishing, Wallingford. pp. 23-43. 2002.

SANTOS, J.R.P. Caracterização de genótipos de *Musa* com base na reação a *Radopholus similis* e de genótipos contrastantes para a resistência com base em marcadores moleculares RAPD. 72p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília. 2007.

SARAH, J. L. Banana nematodes and their control in Africa. *Nematropica* 19: 199-216. 1989.

SASSER, J. N. e FRECKMAN, D. W. A world perspective on nematology, the role of society. In: VEECH, J. A. e DICKSON, D. W. *Vistas on Nematology*. pp. 7-14. 1987.

SEINHORST, J.W. The relationships between population increase and population density in plant parasitic nematodes. II. Sedentary nematodes. *Nematologica* 13: 157-171. 1967.

SPEIJER, P.R.; GOLD, C.S.; KASHAJA, I.N. e KARAMURA, E.B. Assessment of nematode damage in East African highland banana systems. In: VALMAYOR, R.V.; DAVIDE, R.G.; STANTON, J.M.; TREVERROW, N.L. e ROA, V.N. (eds.). *Banana nematodes and weevil borers in Asia and the Pacific*. Proceedings of the workshop Serdang, Selangor, Malaysia 18–22 April, 1994. INIBAP/ASPNET, Los Banos, Philippines, pp. 191–203. 1994.

SPEIJER, P.R. e DE WAELE, D. Screening of *Musa* germplasm for resistance and tolerance to nematodes. INIBAP Technical Guidelines I. INIBAP, Montpellier, France. pp. 43. 1997.

SPEIJER, P.R. e FOGAIN, R. *Musa* and *Ensete* nematode pest status in Africa. In: KARAMURA, E.B. e GOLD, C.S. (eds.). *Banana IPM*. Proceedings of the workshop, Nelspruit, South Africa, 23–26 November, 1998. INIBAP, Montpellier, France pp 99–118. 1999.

STOVER, R.H. e SIMMONDS, N.W. *Bananas*. 3.ed. New York: Longman Scientific e Technical, 468p. 1987.

STOVER, R.H. *Banana plantation and abaca disease*. Commonwealth Mycological Institute London, 316 p. 1972.

TEIXEIRA, M.A. Resistência de genótipos de bananeira a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* e variabilidade genética com base em marcadores moleculares RAPD. 68p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília. 2007.

VILAS BOAS, L. C.; TENENTE, R. C. V.; GONZAGA, V.; SILVA NETO, S. P. e ROCHA, H. S. Reação de clones de bananeira (*Musa* spp.) ao nematoide *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949, Raça 2. Revista Brasileira de Fruticultura 24: 690 – 693. 2002.

WEHUNT, E.; HUTCHINSON, D. e EDWARDS, D. I. Reaction of banana cultivars to the burrowing nematode (*R. similis*). Journal of Nematology 10: 368-370. 1978.

CAPÍTULO 6

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E VARIABILIDADE
GENÉTICA DE ACESSOS DE BANANEIRA CONTRASTANTES
PARA RESISTÊNCIA A NEMATOIDES, COM BASE EM
MARCADORES MOLECULARES.**

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE BANANEIRA CONTRASTANTES PARA RESISTÊNCIA A NEMATOIDES, COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES.

RESUMO

Metodologias para detecção e análise de variabilidade genética em nível molecular oferecem importantes informações para caracterização e uso de recursos genéticos. Neste trabalho, objetivou-se utilizar marcadores moleculares SSR e RAPD, para realizar a caracterização molecular de 11 acessos de *Musa* contrastantes para os fenótipos de resistência aos nematoides *Radopholus similis*, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, visando a identificar *primers* e marcadores moleculares promissores para futuros trabalhos de mapeamento genético da resistência, além de estudar a diversidade genética dos acessos. A coleção de acessos foi selecionada com base na avaliação do fator de reprodução de cada espécie de nematoide. O DNA genômico dos onze acessos foi extraído, sendo utilizados 13 *primers* RAPD e 14 pares de *primers* microssatélites para a obtenção de marcadores moleculares. Os marcadores obtidos foram convertidos em matrizes numéricas, a partir das quais foram calculadas as distâncias genéticas entre os acessos e realizadas análises de agrupamento e de dispersão gráfica. Um total de 195 marcadores RAPD e 59 alelos microssatélites foram gerados. Do total de marcadores RAPD e SSR, 183 e 56 foram polimórficos e 44 e 17 se mostraram promissores para trabalhos futuros de mapeamento genético para a resistência a *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *R. similis*. Entre todos *primers* utilizados, 92 % para RAPD e 78 % para SSR geraram ao menos uma banda ou alelo promissor para o mapeamento genético. Os *primers* decâmeros OPE-09, OPG-12 e OPG-05 e os pares de *primers* SSR AGMI25/AGMI26 e AGMI101/AGMI102 apresentaram o maior número de alelos promissores e se destacaram para futuros trabalhos de mapeamento genético. As distâncias genéticas entre os diferentes acessos baseadas nos marcadores RAPD variaram de 0,29 a 0,62 e com base nos microssatélites variaram de 0,33 a 0,78. Os acessos Pisang Nangka e Grande Naine apresentaram a menor distância genética com base nos marcadores RAPD e, os acessos Yangambi Km5 e 4223-06 com base nos marcadores SSR. Os acessos contrastantes para a resistência (4279-06) e susceptibilidade (Borneo), apresentaram uma distância genética de 0,48 e 0,60 e um total de 37 marcadores RAPD e 10 alelos SSR polimórficos e úteis para o mapeamento genético. Para os acessos contrastantes 4279-06 e 1304-04, as distâncias

genéticas foram de 0,47 e 0,46 e o total de fragmentos de DNA polimórficas úteis para o mapeamento foi de 36 e 9 para os marcadores RAPD e microssatélites, respectivamente. Ambos marcadores RAPD e microssatélites mostraram variabilidade genética entre os acessos de bananeira contrastantes para resistência à nematoides, abrindo boa perspectiva para futuros trabalhos de mapeamento genético.

Palavras-chave: Banana, diversidade genética, marcador molecular, nematoides.

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND GENETIC VARIABILITY OF BANANA ACCESSIONS CONTRASTING FOR RESISTANCE TO NEMATODES BASED ON MOLECULAR MARKER.

ABSTRACT

Methodologies for detection and analysis of genetic variability at the molecular level offer important information for characterization and use of genetic resources. This work aimed to use SSR and RAPD molecular markers to perform molecular characterization of 11 genotypes of *Musa* with contrasting phenotypes for resistance to the nematodes *Radopholus similis*, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*, to identify primers and molecular markers promising for future work on genetic mapping, and to study the genetic diversity of the genotypes. These accessions were selected from a working collection of 26 banana genotypes of the banana bank of germplasm of Embrapa Mandioca e Fruticultura, based on the evaluation of the reproduction factor of each species of nematode. Genomic DNA was extracted from 11 accessions, and used 13 RAPD primers and 14 pairs of microsatellite primers for obtaining molecular markers. These markers were analyzed separately, converting them into a numeric matrix, from which it was calculated the genetic distances between accessions to perform cluster analysis and graphical dispersion. A total of 195 RAPD markers and 59 microsatellite alleles were generated. From all primers tested, 183 RAPD and 56 SSR markers, were polymorphic, and 44 and 17, respectively proved to be promising for future studies of genetic mapping for resistance to *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* and *R. similis*. Among all the primers used, 92% for RAPD, and 78% for SSR generated at least one band or allele promising for gene mapping. Decamer primers OPE-09, OPG-12 and OPG-05, and the pairs of primers for SSR, AGMI25/AGMI26 and AGMI101/AGMI102 showed the highest number of alleles, therefore, promising for future work of genetic mapping. The genetic distances between the different accessions based on RAPD markers ranged from 0.29 to 0.62, and based on microsatellites ranged from 0.33 to 0.78. Accessions Grande Naine and Pisang Nangka showed the smallest genetic distance based on RAPD markers, and accessions Yangambi Km5 and 4223-06 based on SSR markers. The contrasting accessions for resistance (4279-06) and susceptibility (Borneo) showed a genetic distance of 0.48 and 0.60 and a total of 37 RAPD e 10 SSR alleles polymorphic and useful for genetic mapping. For the contrasting accessions 4279-06 and 1304-04, genetic distances

were 0.47 (RAPD) and 0.46 (SSR), and the total polymorphic bands useful for mapping was 36 and 9, respectively. Both RAPD and microsatellites showed genetic variability among accessions of banana contrasting for resistance to nematodes, opening new windows for future work on genetic mapping.

Keywords: banana, genetic diversity, molecular marker, nematodes.

1. INTRODUÇÃO

A banana (*Musa ssp.*) é a base alimentar de milhões de pessoas nas regiões tropicais (Onguso *et al.*, 2004), sendo cultivada em mais de 100 países, com produção anual superior a 64 milhões de toneladas (Gomes *et al.*, 2005).

O interesse pelo melhoramento genético de banana começou a partir de 1922, sendo que, em 1976, iniciaram-se estudos sobre a variabilidade de recursos genéticos visando estabelecer um sistema de hibridação para melhoramento da cultura (Dantas *et al.*, 1997). Vários métodos têm sido empregados para investigar a variabilidade genética presente no germoplasma de *Musa*. Os descritores morfotaxonômicos foram os primeiros a serem desenvolvidos e aperfeiçoados para as bananeiras e 119 descritores foram definidos como norma de descrição do germoplasma de *Musa* (Ipgri, 1999).

Muitas características vegetativas são influenciadas por fatores ambientais, apresentam variação contínua e alto grau de plasticidade, podendo muitas vezes não refletir a real diversidade existente (Lima *et al.*, 2002). Ademais, em *Musa*, alguns caracteres são expressos somente na fase adulta, podendo ser avaliados somente após longo tempo de plantio no campo (Pillay *et al.*, 2000). Marcadores bioquímicos (isoenzimas) foram testados para identificação e classificação de germoplasma de *Musa*, entretanto o baixo grau de polimorfismo obtido, limitou sua utilização na identificação de clones e na estimativa da diversidade genética (Gawel e Jarret, 1991; Carvalho, 1998).

O advento de técnicas possibilitando detectar polimorfismos diretamente do DNA tem gerado um grande número de marcadores moleculares para análises genéticas e “fingerprinting” de acessos (Jeffreys *et al.*, 1985). Marcadores moleculares foram empregados na caracterização e na avaliação da variabilidade genética em *Musa*, incluindo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Gawel *et al.*, 1992; Fauré *et al.*, 1994), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Kaemmer *et al.*, 1992; Howell *et al.*, 1994; Bhat e Jarret, 1995; Pillay *et al.*, 2000); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Loh *et al.*, 2000) e microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*) (Lagoda *et al.*, 1998; Crouch *et al.*, 1998; Kaemmer *et al.*, 1997; Grapin *et al.*, 1998).

A caracterização molecular da diversidade genética pode fornecer dados úteis para os programas de melhoramento, possibilitando o cruzamento de materiais divergentes com finalidade de recombinações gênicas mais favoráveis (Teixeira, 2007). Os marcadores moleculares, além de serem utilizados para os estudos de diversidade, podem ser utilizados para outras finalidades com a obtenção de mapas genéticos (Carrel, 1999; Lagoda, 1999) e

identificação de marcadores úteis na seleção indireta de características de interesse (Milach, 1998).

Neste trabalho, objetivou-se utilizar o sistema de marcadores moleculares SSR e RAPD, para realizar a caracterização molecular de 11 acessos de *Musa* contrastantes para os fenótipos de resistência aos nematoides *R. similis*, *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, visando a identificar marcadores moleculares promissores para futuros trabalhos de mapeamento genético da resistência, além de estudar a diversidade genética dos acessos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Genético

Após a avaliação prévia do fator de reprodução de 26 acessos de bananeira realizada em casa de vegetação por Santos (2007) e Teixeira (2007), foram selecionados 11 acessos contrastantes em relação à suscetibilidade e resistência aos nematoides *R. similis*, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (Tabela 1). Os acessos 4279-06, Yangambi Km5, Brimanie, Pisang Nangka 4249-05 e 4223-06 baseado no fator de reprodução, mostraram-se resistentes a pelo menos uma das espécies estudadas. Os acessos Borneo, 1304-04, 1304-06, Grande Naine e 8694-15 foram considerados suscetíveis a pelo menos uma das espécies de nematoide estudadas.

Tabela 1. Acessos de bananeira analisados e fenotipados quanto a resistência ou suscetibilidade a *Radopholus similis*, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* em casa de vegetação.

Número	Acessos	<i>R. similis</i>		<i>M. incognita</i>		<i>M. javanica</i>		<i>M. arenaria</i>	
		FR ¹	Reação ²	FR	Reação	FR	Reação	FR	Reação
1	4279-06 AA(H)	0,41	R	0,67	R	2,26	MR	0,95	R
2	Yangambi Km5 AAA(C)	1,06	R	5,09	MR	1,61	R	*	*
3	Birmanie AA(DS)	2,4	MR	0,69	R	4,9	MR	0,82	R
4	Pisang Nangka AA (DS)	1,81	MR	0,56	R	1,05	R	3,17	MR
5	4249-05 AA(H)	0,01	AR	*	*	*	*	*	*
6	4223-06 AA(H)	1,49	MR	1,36	MR	1,7	R	2,62	MR
7	Borneo AA(DS)	21,31	AS	14,04	S	45,03	AS	4,56	MR
8	1304-04 AA(H)	6,11	PR	21,96	AS	15,81	PR	24,24	AS
9	1304-06 AA(H)	11	S	11,99	S	10,09	MR	4,3	MR
10	G. Naine AAA(C)	11,3	S	4,22	MR	8,06	MR	5,91	PR
11	8694-15 AA(H)	7,59	PR	10,34	PR	28,36	S	17,87	S

¹Fator de reprodução. ² AR: altamente resistente; R: resistente; MR: moderadamente resistente; PR: pouca resistência; S: suscetível; AS: altamente suscetível.

2.2. Extração do DNA

Folhas de cada acesso de *Musa* foram coletadas e o DNA genômico extraído utilizando o método do CTAB (Doyle e Doyle, 1990) com algumas modificações (Faleiro *et al.*, 2003). Após a extração, a concentração do DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm e 280 nm (Sambrook *et al.*, 1989). Fragmentos de DNA genômico total, separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, foram usados como indicadores da integridade e da pureza do DNA extraído. Após a quantificação, as amostras de DNA de boa qualidade foram diluídas para a concentração de 10 ng/ μ L.

2.3. Obtenção dos marcadores RAPD e Microssatélites

As reações de amplificação para RAPD foram feitas em um volume total de 13 μ L, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 100 μ M de cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 μ M de um “primer” (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA, uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 30 ng de DNA.

As amplificações foram efetuadas em termociclador programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte sequência: 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 35 °C e 90 segundos a 72 °C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72 °C e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C.

No caso dos microssatélites, as reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 μ L, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2,4 mM, 150 μ M de cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 3 pM de cada um dos dois “primers” (F e R), uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 30 ng de DNA. As amplificações foram efetuadas em termociclador, de acordo com o seguinte programa: 4 minutos a 94 °C + 10 ciclos (30 segundos a 94 °C + 60 segundos a 60 °C –1 °C a cada ciclo + 90 segundos a 72 °C) + 30 ciclos (30 segundos a 94 °C + 60 segundos a 48 °C + 90 segundos a 72 °C) + 6 minutos a 72°C. Após amplificação a temperatura das amostras foi reduzida a 4°C. Foram testados um total de 13 *primers* (Tabela 2) pertencentes aos kits OPE, OPF, OPG e OPH (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) para a obtenção dos marcadores RAPD e 14 pares de *primers* (Tabela 3) para os microssatélites,

sendo 8 da série AGMI (Lagoda *et al.*, 1998), 3 da série Ma (Crouch *et al.*, 1998) e 3 da série MaOCEN (Creste *et al.*, 2006).

Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 µl de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%), glicerol (60%) e água (39,75%). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,2 e 3%, corado com brometo de etídio (0,2 ug/ml), para separação dos fragmentos RAPD e microssatélites, respectivamente. O gel foi submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM) e a separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 100 volts. Ao término da corrida os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

2.4. Análises estatísticas

Os marcadores RAPD e SSR gerados foram analisados, convertendo-os em matrizes numéricas codificadas, a partir das quais foram calculadas as distâncias genéticas entre os materiais genéticos e realizadas as análises de agrupamento. A codificação dos marcadores RAPD, como são dominantes, foi 1 para presença e 0 para ausência do marcador. No caso dos marcadores SSR, como são co-dominantes, a codificação foi realizada para cada loco, identificando os alelos presentes. Tal codificação é composta por dois números representando os alelos, sendo que dois números iguais, significa que o loco está em homozigose (duas cópias do mesmo alelo) e dois números diferentes que o loco está em heterozigose (dois alelos diferentes). As distâncias genéticas (DG) calculadas a partir dos marcadores RAPD foram baseadas no complemento do coeficiente de similaridade de NEI e LI (1979), utilizando-se o Programa Genes (Cruz, 2006), conforme a fórmula descrita abaixo:

$DG_{ij} = 1 - [2a/(2a + b + c)]$ sendo:

DG_{ij} = Distância genética entre as variedades i e j ;

a = número de encontros (1 1); b = número de encontros (1 0) e c = número de encontros (0 1) entre as variedades i e j .

As distâncias genéticas obtidas a partir dos marcadores microssatélites foram calculadas com auxílio do Programa Genes (Cruz, 2006), baseando-se na seguinte fórmula:

$DG_{ij} = 1 - (NLC/NTL)$ sendo:

DG_{ij} = Distância genética entre as variedades i e j ;

NLC = Número de Locos Coincidentes;

NTL = Número Total de locos.

O NLC é o somatório das coincidências alélicas de cada loco analisado, sendo que cada coincidência pode assumir o valor 1 (dois alelos coincidentes); 0,5 (um alelo coincidente) e 0 (nenhum alelo coincidente) para encontros (0 1) e (1 0).

As matrizes de distâncias genéticas obtidas com base em cada tipo de marcador molecular foram utilizadas para realizar as análises de agrupamento dos acessos. Foi realizada a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS (SAS Institute, 1989) e Statistica (Statsoft Inc., 1999). Para a formação de grupos via dendrograma foi utilizado como critério de agrupamento o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

Para comparar os resultados obtidos com base em cada tipo de marcador molecular, foram calculados coeficientes de correlação de Pearson entre as distâncias genéticas.

3. RESULTADOS

Os 13 *primers* RAPD e os 14 pares de *primers* SSR geraram um total de 195 marcadores RAPD e 59 alelos microssatélites, perfazendo uma média de 15 e 4 marcadores por primer ou pares de *primers*, respectivamente. A Figura 1 mostra os produtos de amplificação do DNA genômico dos 11 acessos de *Musa* spp. gerados pelas técnicas RAPD e microssatélite utilizadas neste trabalho.

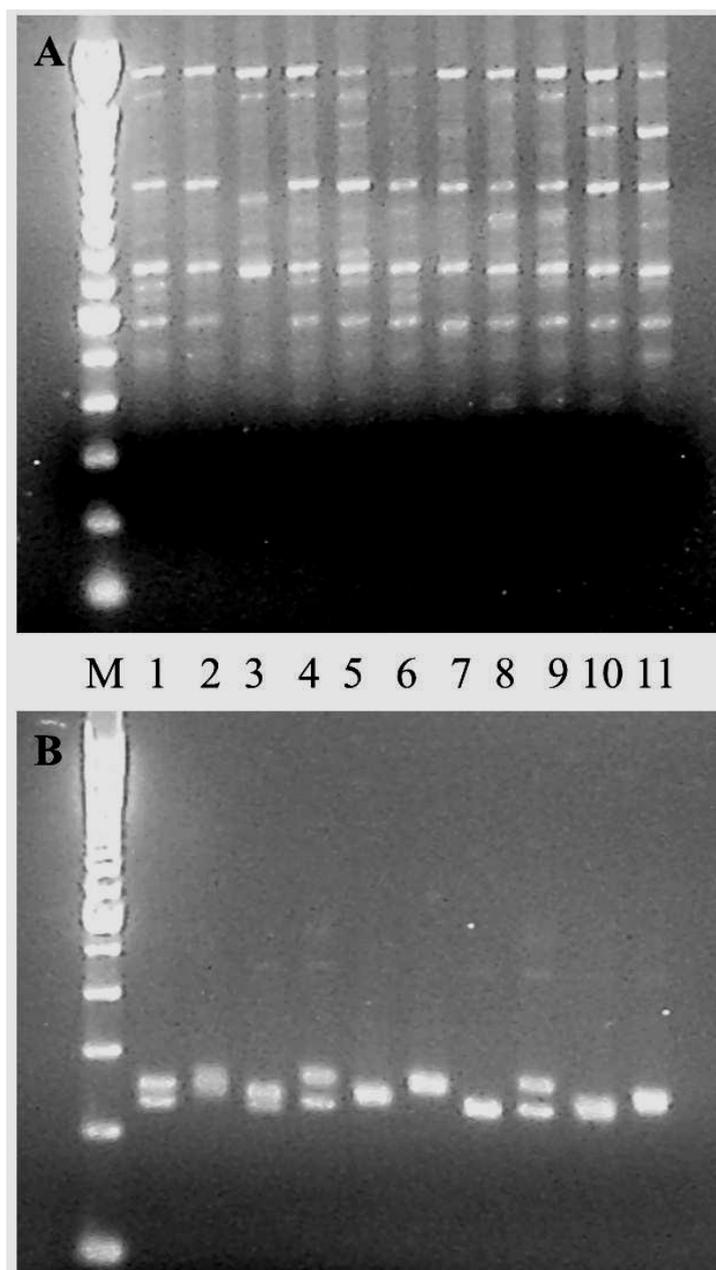


Figura 1. Produtos de amplificação do DNA de 11 acessos de bananeira gerados utilizando-se os *primers* OPE09 para RAPD (A) e MaOCENF/MaOCEN1R para microssatélites (B).

Dentre os *primers* RAPD utilizados, apenas um (OPG-17) não gerou bandas presentes nos acessos resistentes e ausentes em todos os suscetíveis e entre os pares de *primers* microssatélite apenas três não geraram alelos promissores (AGMI187 e AGMI188, AGMI99 e AGMI100, e Ma3 e Ma103). Portanto, 92 % dos *primers* RAPD e 78 % dos *primers* SSR geraram ao menos um fragmento de DNA ou alelo promissor para o mapeamento genético. Os *primers* RAPD OPE-09, OPG-12 e OPG-05 foram os que apresentaram um maior número de bandas promissoras (8, 7 e 6, respectivamente) e os

pares de *primers* microssatélites AGMI25/AGMI26 e AGMI101/AGMI102 apresentaram o maior número de alelos promissores (3). Estes *primers* se destacaram entre os outros de suas categorias para futuros trabalhos de mapeamento genético (Tabela 2 e 3).

Dos 195 marcadores RAPD, 12 foram monomórficos, 183 foram polimórficos e 44 se mostraram promissoras para trabalhos futuros de mapeamento genético para a resistência a *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *R. similis* (Tabela 2).

Tabela 2. *Primers* utilizados para obtenção dos marcadores RAPD e respectivos número de bandas polimórficos e monomórficos.

<i>Primer</i>	Sequência 5' --> 3'	Nº de fragmentos de DNA	Nº de fragmentos de DNA	Nº de fragmentos de DNA
		polimórficos	monomórficos	promissores
OPE-02	GGTGCGGGAA	18	0	2
OPE-09	CTTCACCCGA	17	1	8
OPE-11	GAGTCTCAGG	13	3	2
OPE-16	GGTGACTGTG	13	0	1
OPF-08	GGGATATCGG	11	0	2
OPG-05	CTGAGACGGA	19	0	6
OPG-08	TCACGTCCAC	9	3	1
OPG-09	CTGACGTCAC	19	0	4
OPG-11	TGCCCGTCGT	16	0	3
OPG-12	CAGCTCACGA	16	1	7
OPG-17	ACGACCGACA	7	3	0
OPH-12	ACGCGCATGT	13	0	3
OPH-17	CACTCTCCTC	12	1	5
Total		183	12	44

Dos 59 alelos microssatélites, 3 foram monomórficos e 56 foram polimórficos. Dos alelos polimórficos, 17 se mostraram promissores para trabalhos de mapeamento genético da resistência aos nematoides aqui estudados (Tabela 3).

Tabela 3. *Primers* utilizados para obtenção dos marcadores SSR e respectivos número de bandas polimórficas.

Primer	Sequência 5' --> 3'	Nº de alelos polimórficos	Nº de alelos monomórficos	Nº de alelos promissores
AGMI103	ACAGAATCGCTAACCCCTAATCCTCA	1	1	1
AGMI104	CCCTTTGCGTGCCCTAA			
AGMI187	GCAACTTTGGCAGCATTTT	3	0	0
AGMI188	TGATGGACTCATGTGTACCTACTAT			
AGMI25	TTAAAGGTGGGTTAGCATTAGG	6	0	3
AGMI26	TTTGATGTCCACAATGGTGTTC			
AGMI101	TGCAGTTGACAAACCCACACA	6	0	3
AGMI102	TTGGGAAGGAAAATAAGAAGATAGA			
AGMI105	TCCAACCCCTGCAACCACT	5	0	1
AGMI108	ATGACCTGTGGAACATCCTTT			
AGMI125	TCCCATAAGTGTAATCCCTCAGTT	4	0	1
AGMI126	CTCCATCCCCCAAGTCATAAAG			
AGMI99	ATTTCTTTCTTTTCATACCTTTA	0	2	0
AGMI100	TAATGAGACGCTATGGAGCAC			
AGMI127	AAGTTAGGRCAAGATAGTGGGATT	4	0	1
AGMI128	CTTTTGCACCAGTTGTTAGG			
Ma1	GAGCCCATTAAGCTGAACA	3	0	1
Ma24	CCGACAGTCAACATACAATACA			
Ma1	TGAATCCCAAGTTTGGTCAAG	5	0	1
Ma27	CAAAACACTGTCCCCATCTC			
Ma3	TCGCTCTCTTTAGCTCTG	3	0	0
Ma103	TGTTGGAGGATCTGAGATTG			
MaOCENF	TCTCAGGAAGGGCAACAATC	5	0	2
MaOCEN1R	GGACCAAAGGGAAAGAAACC			
MaOCEN3F	GGAGGAAATGGAGGTCAACA	6	0	2
MaOCEN3R	TTCGGGATAGGAGGAGGAG			
MaOCEN10R	GGAAGAAAGAAGTGGAGAATGAA	5	0	1
MaOCEN10F	TGAAATGGATAAGGCAGAAGAA			
Total		56	3	17

As distâncias genéticas entre os diferentes acessos baseadas nos marcadores RAPD variaram de 0,29 a 0,62, enquanto as baseadas nos marcadores microssatélites variaram de 0,33 a 0,78. Os acessos Pisang Nangka e Grande Naine apresentaram a menor distância

genética e os acessos Birmanie e Grande Naine apresentaram a maior pela técnica de RAPD. Já para a técnica de microssatélite a menor distância genética foi entre Yangambi Km5 e 4223-06, ambas resistentes a *M. javanica*, e as com maior distância foram Birmanie e 1304-06, onde a primeira foi considerada resistente a *M. incognita* e *M. javanica* e a segunda suscetível a *M. incognita* e *R. similis* (Tabela 4 e 5).

Observou-se que, para os acessos em estudo, apesar da técnica RAPD ter gerado um maior número de bandas polimórficas, a técnica de microssatélites teve maior capacidade de diferenciação dos acessos de bananeira. Houve uma correlação positiva de 0,37 entre as distâncias calculadas com base em RAPD e SSR, sendo altamente significativa pelo teste t ($P < 0,01$) (Figura 2).

Considerando os acessos mais contrastantes para a resistência aos nematoides aqueles que são resistentes e suscetíveis ao maior número de espécies de nematoides, 4279-06 teria o maior contraste com os acessos Borneo e 1304-04. Os acessos contrastantes para a resistência (4279-06 e Borneo) apresentaram uma distância genética de 0,48 e 0,60 e um total de 37 e 10 bandas polimórficas e úteis para o mapeamento para as técnicas de RAPD e SSR, respectivamente (Tabela 4 e 6). E para os acessos contrastantes (4279-06 e 1304-04) as distâncias genéticas foram de 0,47 e 0,46 e o total de bandas polimórficas úteis para o mapeamento foi de 36 e 9 para cada uma das técnicas, respectivamente (Tabela 5 e 7).

Tabela 4. Matriz de dissimilaridade entre 11 acessos de bananeira, calculada com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li (1979), utilizando-se 195 marcadores RAPD.

Acessos	Birmanie	Pisang Nangka	Borneo	Grande Naine	Yangambi Km5	1304-06	4279-06	4223-06	8694-15	1304-04	4249-05
Birmanie	0,000										
Pisang Nangka	0,517	0,000									
Borneo	0,519	0,387	0,000								
Grande Naine	0,620	0,293	0,343	0,000							
Yangambi Km5	0,488	0,417	0,396	0,333	0,000						
1304-06	0,531	0,455	0,343	0,355	0,466	0,000					
4279-06	0,470	0,464	0,485	0,485	0,496	0,425	0,000				
4223-06	0,581	0,492	0,479	0,333	0,492	0,437	0,470	0,000			
8694-15	0,571	0,414	0,435	0,381	0,444	0,376	0,512	0,407	0,000		
1304-04	0,565	0,523	0,528	0,463	0,500	0,410	0,469	0,383	0,421	0,000	
4249-05	0,485	0,548	0,564	0,500	0,469	0,500	0,514	0,475	0,492	0,442	0,000

Tabela 5. Matriz de distâncias entre 11 acessos de bananeira, calculadas com base na coincidência alélica, utilizando-se 59 alelos de marcadores microssatélites.

Acessos	Birmanie	Pisang Nangka	Borneo	Grande Naine	Yangambi Km5	1304-06	4279-06	4223-06	8694-15	1304-04	4249-05
Birmanie	0,000										
Pisang Nangka	0,464	0,000									
Borneo	0,571	0,571	0,000								
Grande Naine	0,500	0,429	0,643	0,000							
Yangambi Km5	0,643	0,393	0,607	0,429	0,000						
1304-06	0,786	0,607	0,750	0,393	0,536	0,000					
4279-06	0,714	0,536	0,607	0,429	0,536	0,536	0,000				
4223-06	0,708	0,542	0,750	0,458	0,333	0,333	0,542	0,000			
8694-15	0,607	0,536	0,464	0,500	0,536	0,464	0,536	0,458	0,000		
1304-04	0,643	0,464	0,643	0,464	0,429	0,357	0,464	0,417	0,500	0,000	
4249-05	0,708	0,583	0,750	0,458	0,583	0,500	0,583	0,545	0,542	0,625	0,000

Tabela 6. Número de marcadores moleculares RAPD promissores para o mapeamento genético entre os cruzamentos de acessos suscetíveis e resistentes de bananeiras aos nematoides *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *Radopholus similis*.

Acessos	Borneo	1304-04	1304-06	G. Naine	8694-15	4279-06	Yangambi Km5	Birmanie	Pisang	4249-05	4223-06
Borneo						37 ¹	31	27	23	39	36
1304-04						36	26	33	22	38	25
1304-06						36	29	27	33	41	35
G. Naine						28	30	28	33	29	23
8694-15						32	30	30	28	35	22
4279-06	27 ²	30	26	32	33						
Yangambi Km5	24	22	39	34	29						
Birmanie	40	42	41	37	34						
Pisang	30	22	37	35	27						
4249-05	23	22	21	17	23						
4223-06	21	18	24	23	26						

¹ Valores acima da diagonal mostra o número de marcadores presentes em acessos resistentes e ausente em acessos suscetíveis. ² Valores abaixo da diagonal mostram os número de marcadores presentes em acessos suscetíveis e ausentes nos resistentes.

Tabela 7. Número de marcadores moleculares SSR promissores para o mapeamento genético entre os cruzamentos de acessos suscetíveis e resistentes de bananeiras aos nematoides *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *Radopholus similis*.

Acessos	Borneo	1304-04	1304-06	G. Naine	8694-15	4279-06	Yangambi Km5	Birmanie	Pisang	4249-05	4223-06
Borneo						10 ¹	11	10	13	13	14
1304-04						8	10	11	10	12	7
1304-06						9	7	14	11	9	7
G. Naine						9	9	9	9	10	10
8694-15						10	9	10	11	10	7
4279-06	11 ²	8	9	8	10						
Yangambi Km5	15	7	9	10	9						
Birmanie	10	12	15	12	11						
Pisang	10	10	9	9	10						
4249-05	13	11	8	7	9						
4223-06	13	18	5	6	9						

¹ Valores acima da diagonal mostra o número de marcadores presentes em acessos resistentes e ausente em acessos suscetíveis. ² Valores abaixo da diagonal mostram os número de marcadores presentes em acessos suscetíveis e ausentes nos resistentes.

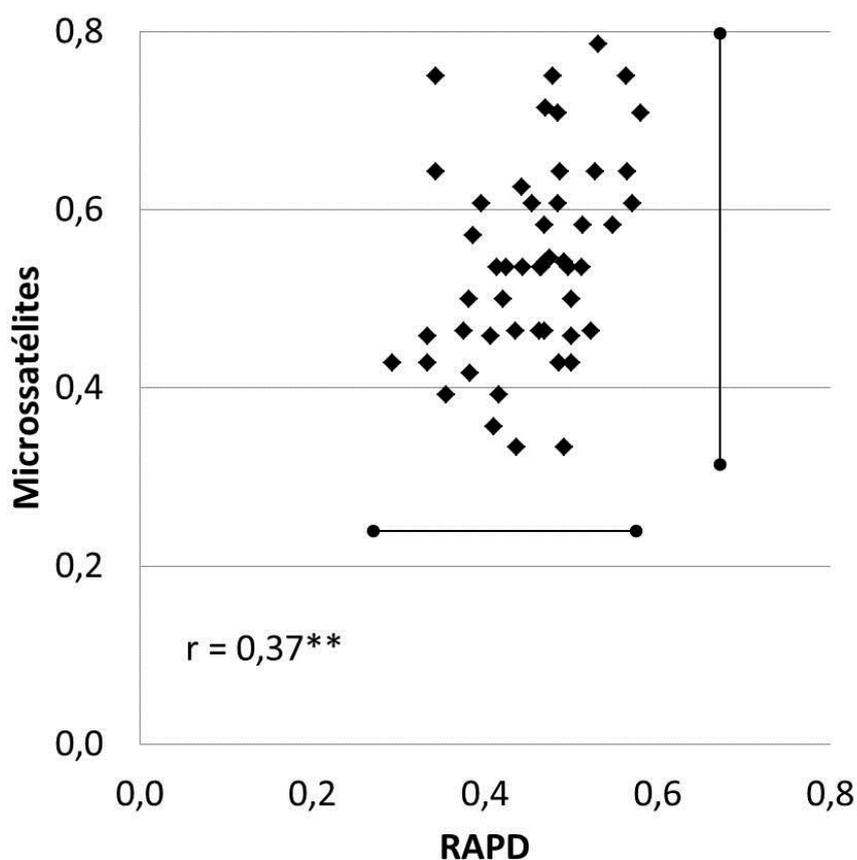


Figura 2. Correlação de Pearson e dispersão gráfica das distâncias genéticas entre pares de acessos de bananeira calculadas com base em marcadores microssatélites e RAPD.

A análise de agrupamento realizada com base nas distâncias genéticas geradas por RAPD permitiu dividir os acessos analisados em pelo menos 5 grupos de similaridade genética a uma distância genética relativa de 0,45 (Figura 3A). Enquanto isso, a análise de agrupamento realizada com base nas distâncias genética geradas pelos marcadores SSR permitiu dividir os 11 acessos nos mesmos 4 grupos de similaridade genética, mas agora a uma distância genética relativa de 0,55 (Figura 3B). As distâncias entre os acessos e a distribuição dos mesmos também podem ser observadas nos gráficos de dispersão (Figura 4).

Apesar das diferenças entre os grupos formados por ambos os métodos, algumas coincidências ocorreram. Os acessos Birmanie e 4249-05 mantiveram-se isolados entre si por ambas técnicas utilizadas. Pisang Nangka, Grande Naine, Yangambi Km 5 e 1304-06 agruparam-se em grupos semelhantes por ambas as técnicas. 8694-15 e Borneo, os quais faziam parte deste último grupo pela técnica de RAPD formaram um grupo separado pela

técnica de SSR, mas ainda assim ficaram próximos do grupo formado por Pisang Nangka, Grande Naine, Yangambi Km 5 e 1304-06. Algo semelhante ocorreu com 4223-06 e 1304-04 que apesar de estarem próximos pela técnica de RAPD e ficarem em um grupo separado, passaram a pertencer o grupo de Pisang Nangka, Grande Naine, Yangambi Km 5 e 1304-06 pela técnica de microssatélite. O acesso 4279-06 apesar de ter ficado isolado pela técnica de RAPD agrupou-se ao último grupo descrito, pela técnica de SSR e ainda manteve certa proximidade com o acesso 1304-04.

Os acessos 1304-04 e 1304-06 apesar de não fazerem parte do mesmo grupo pela técnica de RAPD, como ocorreu para o SSR, mantiveram-se a uma distância relativamente próxima (Figura 3 e 4).

Os acessos Pisang Nangka, Grande Naine e Yangambi Km5 além pertencerem ao mesmo grupo, estes tiveram a distância genética bastante próxima entre eles para ambas às técnicas utilizadas.

Apesar da grande variação entre as distâncias genéticas, em ambas as técnicas, houve uma tendência de agrupamento entre os híbridos diploides (AA) avaliados. As duas cultivares triploides (AAA) Grande Naine e Yangambi Km5 também ficaram bem próximas entre si para ambas às técnicas. Já a proximidade genética entre os diploides simples (AA) Birmanie e Borneo foram distantes tanto para SSR quanto RAPD (Figura 3).

Apesar da análise de dispersão não ter separado os acessos resistentes dos suscetíveis, alguns acessos resistentes ficaram mais próximos e isolados dos acessos restantes. De acordo com o gráfico de dispersão (Figura 4 A) os acessos Birmanie, 4279-06, 4249-5 e Yangambi Km5 ficaram próximos entre si e mais isolados dos outros pela técnica de RAPD, sendo que Pisang Nangka e Yangambi km5 ficaram dentro do mesmo grupo. De acordo com a figura 4B, os acessos resistentes 4249-05, Yangambi Km5 e 4223-06 ficaram próximos entre si pela técnica de microssatélite e Pisang Nangka, Yangambi km5, 4223-06 e 4279-06 pertenceram ao mesmo grupo.

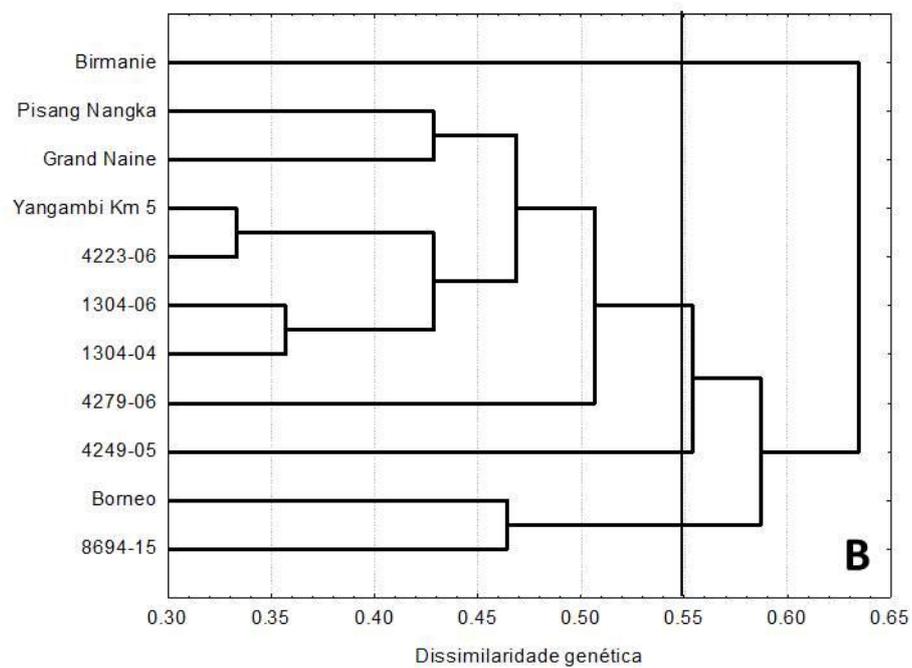
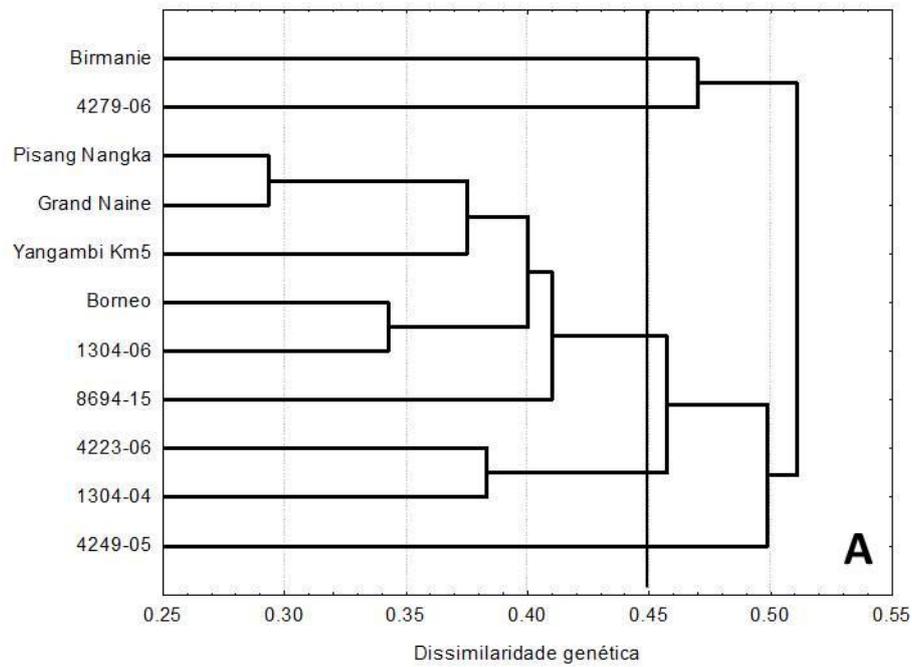


Figura 3. Análise de agrupamento de 11 acessos de bananeira, com base na matriz de distâncias genéticas calculadas a partir de marcadores RAPD (A) e microssatélites (B). O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

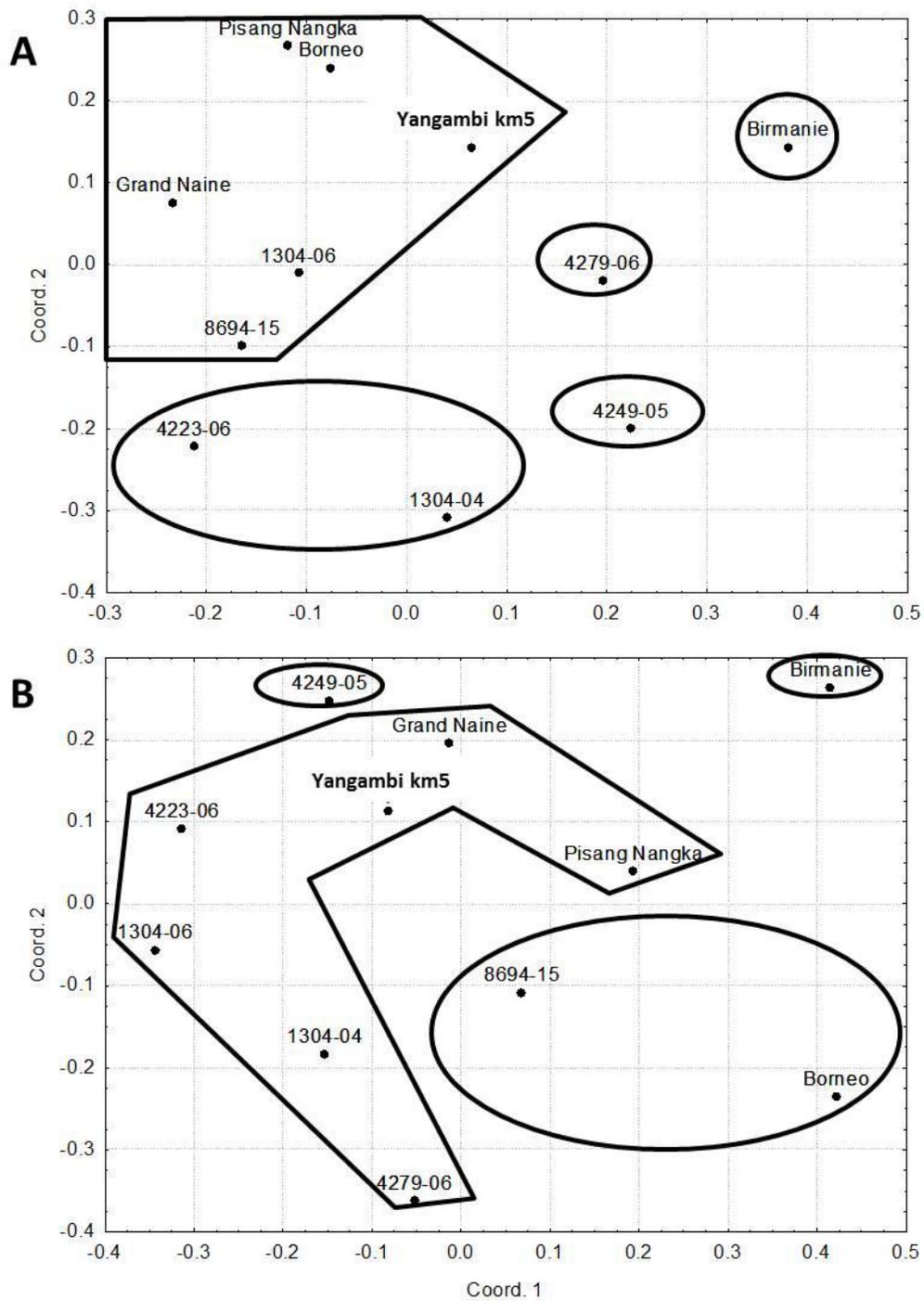


Figura 4. Dispersão gráfica e análise de agrupamento de 11 acessos de bananeira com base em distâncias genéticas calculadas a partir de marcadores RAPD (A) e microssatélites (B). O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

4. DISCUSSÃO

Ambas as técnicas utilizadas, RAPD e microssatélites, permitiram a obtenção de grande número de marcadores polimórficos, dos quais 44 marcadores RAPD e 17 marcadores SSR mostraram-se promissores para trabalhos de mapeamento genético da resistência aos nematoides *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *R. similis*; ou seja, são presentes em pelo menos um acesso resistente e ausentes em todos os suscetíveis.

Dentre os *primers* utilizados, os iniciadores RAPD (OPE-09, OPG-12 e OPG-05) e microssatélites (AGMI25/AGMI26 e AGMI101/AGMI102) foram os que apresentaram um maior número de alelos promissores e se destacaram para futura utilização em trabalhos de mapeamento genético. Santos *et al.*, (2010) utilizou os mesmos *primers* RAPD (OPE-09, OPG-12 e OPG-05) e verificou que estes geraram 12, 14 e 15 marcas polimórficas e 4, 2 e 3 bandas promissoras para mapeamento genético.

A alta média de marcadores por *primer* RAPD e a baixa percentagem de marcadores monomórficos detectada em ambas as técnicas, evidenciam a alta variabilidade genética dos acessos analisados. Santos *et al.*, (2010) utilizando marcadores RAPD em acessos contrastantes a resistência a *R. similis* obteve resultados semelhantes. O alto grau de polimorfismo detectado com marcadores RAPD, com média de 14 loci polimórficos por *primer*, está de acordo com os observados por Gomes *et al.*, (2005) e Jesus *et al.*, (2006). Nas análises com microssatélites, também ficou evidente um alto grau de polimorfismo apesar da quantidade de loci por *primer* terem sido menores do que o encontrado pelo RAPD. Do total de 59 alelos obtidos no presente trabalho pelos 14 *primers* SSR, 56 alelos foram polimórficos e uma média de 4 alelos por loco foi encontrado. Os dados obtidos por estes *primers* foram bem próximos aos obtidos por Souza (2002), no qual ao testar 11 pares de *primers* microssatélites em 35 genótipos de bananeira, obteve 67 alelos polimórficos, com uma média de 6,1 alelos por loco. Faleiro *et al.*, (2004a) avaliando a variabilidade de cacauzeiros, em condições semelhantes ao presente trabalho, obteve uma média de 4 alelos por locus também. Outros autores obtiveram médias maiores de locos por *primer*, utilizando microssatélites, do que as aqui encontradas. Médias em torno de 7,5 alelos por *primer* foram encontradas por Faleiro *et al.*, (2004b); Amorim *et al.*, (2008 e 2009), sendo que os últimos trabalhos foram com genótipos de bananeira. De acordo com Faleiro *et al.*, (2004b) a média de alelos por locus de microssatélites poderia ser maior se géis de alta resolução fosse utilizado para a eletroforese. No entanto, a menor média de marcadores por *primer* é compensada pelo alto conteúdo de informação genética por loco, uma vez que os

marcadores microssatélites, ao contrário de RAPD, são codominantes, multialélicos, abundantes e distribuídos por todo o genoma e reprodutíveis (Russel *et al.*, 1997; Grapin *et al.*, 1998).

Os acessos que apresentaram menor e maior distância genética em uma das técnicas não coincidiram na outra, havendo certa divergência que já era esperada por não haver uma correlação alta entre as distâncias calculadas por cada uma das técnicas. Apesar da correlação baixa entre as distâncias calculadas por RAPD e SSR, a correlação foi positiva e significativa e, portanto os dados são similares e podem ser utilizados de forma complementar. Jesus *et al.* (2006), ao não conseguir produzir bandas específicas para a caracterização dos genótipos Preciosa, Garantida e FHIA-02 com base em marcadores microssatélites pode complementar a caracterização dessas cultivares com as informações geradas pelos *primers* RAPD. Faleiro *et al.* (2004), estudando a variabilidade em acessos de cacau com base em marcadores moleculares, obtiveram uma correlação entre as distâncias genéticas calculadas por RAPD e microssatélites de 0,27, mas apesar de ser baixa os grupos formados com base nestas distâncias genéticas foram similares. Em outra ocasião Faleiro *et al.*, (2001) usando maior número de loci para a caracterização da diversidade genética em *Theobroma cacao* obtiveram uma correlação da distância genética mais alta entre as duas técnicas e a análise de agrupamento entre RAPD e microssatélites foram idênticas.

Vários trabalhos têm sido realizados para comparar as informações geradas entre diferentes marcadores moleculares e a correlação linear entre as distâncias genéticas é um dos critérios comparativos mais utilizados (Arnau *et al.*, 2001; Briard *et al.*, 2001; Grzebelus *et al.*, 2001). Diversos fatores podem afetar esta correlação entre as distâncias genéticas calculadas por diferentes marcadores moleculares, sendo o número e a reprodutibilidade das marcas moleculares analisadas de grande importância. O número de marcas moleculares necessário para a diferenciação de materiais genéticos depende do número e da similaridade genética dos materiais, sendo que quanto maior o número e a similaridade dos materiais, maior será o número de marcas moleculares necessárias para a diferenciação dos mesmos (Faleiro *et al.*, 2001). O isolamento de Birmanie e 4249-05 entre si e o agrupamento em comum de Pisang Nangka, Grande Naine, Yangambi Km5 e 1304-06 em ambas as técnicas utilizadas comprova certa similaridade entre as duas análises. Alguns acessos apesar de não pertencerem aos mesmos grupos entre ambas as técnicas mantiveram-se próximos destes grupos. Os acessos 8694-15 e 1304-06, 4223-06 e 1304-

04, e o 4279-06 se enquadram na situação descrita anteriormente e também demonstram alguma similaridade entre as técnicas de RAPD e microssatélites.

Apesar de 1304-04 e 1304-06 se manterem a uma distância relativamente próxima pela técnica de RAPD, o posicionamento destes dois acessos dentro de um mesmo grupo pela técnica de SSR é mais correto, já que estes dois acessos possuem os mesmos ancestrais materno e paterno em comum (Malaccencis-FHIA X Madang, respectivamente). Teixeira (2007) ao caracterizar a variabilidade de 23 acessos de *Musa* utilizando a técnica de RAPD, também não conseguiu agrupar estes dois acessos. Portanto a técnica de SSR se mostrou mais adequada neste caso.

Os acessos Pisang Nangka (AA) e Grande Naine (AAA), apesar de não pertencerem ao mesmo grupo genômico e não serem resistentes a nematoides apresentaram a menor distância genética pela técnica de RAPD. O mesmo aconteceu com os acessos Yangambi Km 5 (AAA) e 4223-06 (AA) os quais tiveram a menor distância genética pela técnica de SSR e não pertencem ao mesmo grupo genômico. No entanto estes dois acessos têm a resistência a *M. javanica* em comum. Souza (2002) estudando a variabilidade genética em acessos diploides de *Musa acuminata* e cultivares triploides de bananeira revelada por marcadores microssatélites, verificou que algumas cultivares triploides exibiram altas similaridades com acessos diploides, sendo que essa observação é valiosa para o melhoramento, pois permite que estes acessos possam ser utilizados para obtenção de tetraploides. Segundo Jenny *et al.*, (1999) várias semelhanças morfológicas e moleculares existem entre clones diploides e triploides. Entre essas semelhanças moleculares podem estar a característica de resistência a patógenos, como pode ter ocorrido entre Yangambi Km5 e 4223-06 quanto a resistência a *M. javanica*. Apesar destes resultados, alguns autores tiveram sucesso na separação de genótipos de bananeira de acordo com origem e a constituição genômica por ambas as técnicas (Bhat *et al.*, 1995; Howell *et al.*, 1994; Souza 2002; Jesus *et al.*, 2006). Jesus *et al.*, (2006) apesar de detectar uma superioridade da técnica SSR sobre o RAPD em identificar genótipos de bananeira, verificou que quando se trata em separar cultivares de mesma origem em subgrupos diferentes a técnica de RAPD leva vantagem por proporcionar uma alta cobertura do genoma e conseguir identificar diferenças mínimas entre os acessos.

Os acessos Pisang Nangka, Grande Naine e Yangambi Km5 mantiveram a distância genética próxima em ambas às técnicas e mais uma vez isso mostra que apesar de Pisang Nangka não ser triploide ele tem uma boa similaridade entre os triploides Grande Naine e Yangambi Km5, os quais se mantiveram próximos entre si.

A alta distância genética entre Birmanie e Borneo, visível nas duas técnicas, pode ocorrer, pois estes dois acessos pertencem a subespécies diferentes de *Musa acuminata* (*M. acuminata* ssp. *burmannica* e *M. acuminata* ssp. *microcarpa*, respectivamente). Outra diferença entre estes dois acessos ocorre em relação a resistência a nematoides, pois Birmanie têm um fenótipo resistente a *M. incognita* e *M. arenaria* e Borneo têm fenótipo suscetível a *M. javanica*, *M. incognita* e *R. similis*.

Como esperado, pelo gráfico de dispersão, os acessos resistentes mantiveram uma distância genética relativamente próxima entre si, apesar de não ficarem dentro de um mesmo grupo. Santos (2007) ao caracterizar 7 acessos contrastantes de bananeira conseguiu agrupar 3 acessos resistentes dentre 4 e agrupou os outros suscetíveis. Os acessos 4279-06 e 4249-05 também foram utilizados por este autor e mesmo sendo caracterizados como resistentes a *R. similis* e terem o híbrido parental M53 em comum não se agruparam e mantiveram uma distância genética alta. Estes acessos, também utilizados no presente trabalho, mantiveram-se isolados um do outro por ambas as técnicas aqui utilizadas.

Os híbridos testados mantiveram, em geral, uma distância genética próxima entre si para as duas técnicas utilizadas, com exceção de 4279-06 que pela técnica de RAPD ficou um pouco mais isolado. É possível que esta proximidade esteja relacionada ao fato de que todos são provenientes do programa de melhoramento da Embrapa Mandioca e Fruticultura e que três deles têm como ancestral o acesso M53 (4249-05, 4279-06 e 4223-06), dois tem Calcutta (4279-06 e 8694-15) e dois os mesmos parentais Malaccensis-FHIA x Madang (1304-06 e 1304-04). Amorim et. al. (2008) ao avaliar a variabilidade genética estimada entre diploides de bananeira também provenientes do mesmo programa de melhoramento verificou que existia uma elevada similaridade a esses diploides melhorados e de acordo com este autor este fato pode estar associado com o pequeno número de genitores envolvidos na obtenção desses acessos. Teixeira (2007) também verificou que havia certo agrupamento dos diploides, provenientes do programa de melhoramento da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em relação às cultivares avaliadas por ela.

5. CONCLUSÕES

Ambos marcadores RAPD e microssatélites mostraram variabilidade genética entre os acessos de bananeira estudados. Os marcadores microssatélites, devido ao maior

conteúdo de informação genética por loco, tiveram maior capacidade de diferenciação dos acessos.

A análise de forma complementar entre as duas técnicas utilizadas garante uma maior quantidade de informações pertinentes ao melhoramento genético.

Pela análise de dispersão apenas foi possível agrupar os híbridos melhorados da Embrapa Mandioca Fruticultura, sendo que não houve um padrão de agrupamento por grupo genômico e fenótipo de resistência.

Com base na variabilidade genética verificada entre os acessos contrastantes para resistência a nematoides, abre-se uma boa perspectiva para futuros trabalhos de mapeamento genético.

6. LITERATURA CITADA

- AMORIM, E.P.; LESSA, L.S.; SILVA LEDO, C.A.S; AMORIM, V.B.O.; REIS, R.V.; SANTOS-SEREJO, J.A. e SILVA, S.O. Caracterização agronômica e molecular de genótipos diploides melhorados de bananeira. *Revista Brasileira de Fruticultura* 31:154-161. 2009.
- AMORIM, E.P., REIS, R.V.; SANTOS-SEREJO, J.A.; AMORIM, V.B.O. e SILVA, S.O. Variabilidade genética estimada entre diploides de banana por meio de marcadores microsatélites. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43:1045-1052. 2008.
- ARNAU, G.; LALLEMAND, J. e BOURGOIN, M. Are AFLP markers the best alternative for cultivar identification? *Acta Horticulturae* 546: 301-306. 2001.
- BHAT, K.V. e JARRET, R.L. Random amplified polymorphic DNA and genetic diversity in Indian *Musa* germplasm. *Genetic Resources and Crops Evolution* 42: 328-332. 1995.
- BHAT, K.V.; JARRET, R.L. e RANA, R.S. DNA profiling of banana and plantain cultivars using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Electrophoresis* 16:1736-1745. 1995.
- BRIARD M., LE CLERCK, V.; MAUSSET, A.E. e VERET, A.A comparative study on the use of ISSR, microsatellites and RAPD markers for varietal identifications of carrot genotypes. *Acta Horticulturae* 546: 377-385. 2001.
- CARREL, F. Genome mapping and genetic analysis of the black leaf streak resistance in bananas. *Infomusa* 8:20-22. 1999.
- CARVALHO, R. I. N. Variabilidade em plantas jovens de aceroleira propagadas por semente. *Agropecuária Catarinense* 11: 16 -18. 1998.
- CRESTE, S.; BENATTI, T.R.; ORSI, M.R.; RISTERUCCI, A.M. e FIGUEIRA, A. Isolation and characterization of microsatellite loci from a commercial cultivar of *Musa acuminata*. *Molecular Ecology Notes* 6:303-306. 2006.

CROUCH, H.K.; CROUCH, J.H.; JARRET, R.L.; CREGAN, P.B. e ORTIZ, R. Segregation of microsatellite loci from haploid and diploid gametes in *Musa*. *Crop Science* 38: 211-217. 1998.

CRUZ, C.D. Programa Genes: Estatística experimental e matrizes. Viçosa (MG). 285p. 2006.

DANTAS, J.L.L.; SHEPHERD, K.; SILVA, S.O. e SOARES-FILHO, W.S. Classificação botânica, origem, evolução e distribuição geográfica. In: ALVES, E. . (ed.). A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. Brasília: Embrapa, cap. 1, p. 27-34. 1997.

DOYLE, J.J. e DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15 . 1990.

FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; PIRES, J.L.; BAHIA, R.C.S.; SANTOS, R.C.; GOMES, L.M.C.; ARAÚJO, I.S.; FALEIRO, A.S.G.; GRAMACHO, K.P.; MELO, G.R.P.; MONTEIRO, W.R. e VALLE, R.R. Caracterização de variedades clonais de *Theobroma cacao* L. com base em marcadores RAPD, AFLP e microssatélites. *Agrotropica* 13:79-86. 2001.

FALEIRO, A.S.G.; FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; MELO, G.R.P.; MONTEIRO, W.R.; YAMADA, M.M.; BAHIA, R.C.S. e CORRÊA, R.X. Variability in cacao selected by producers for resistance to witches broom based on microsatellite markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 4:290-297. 2004a.

FALEIRO, F.G.; PIRES, J.L.; MONTEIRO, W.R.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; PIEDRA, A.G.; MOURA, A.D.; ARÉVALO-GARDINI, E.; MARQUES, J.R.B.; GRAMACHO, K.P.; FALEIRO, A.S.G. e SANTOS, M.C.M. Variability in cacao accessions from the Brazilian, Ecuadorian, and Peruvian Amazons based on molecular markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 4:227-233. 2004b.

FALEIRO, F.G.; FALEIRO, A.S.G.; CORDEIRO, M.C.R. e KARIA, C.T. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. (Comunicado Técnico No.92) 6p.

- FAURÉ, S.; NOYER, J.L.; CARREEL, F.; HORRY, J.P.; BAKRY, F. e LANAUD, C. Maternal inheritance of chloroplast genome and paternal inheritance of mitochondrial genome in banana (*Musa acuminata*). *Curr Genet* 25:265-269. 1994.
- GAWEL, N. e JARRET, R. L. Cytoplasm diversity in bananas and plantains. *Euphytica* 52: 19 -23. 1991.
- GAWEL, N. J.; JARRET, R. L. e WHITTEMORE, A. P. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) - based phylogenetic analysis of *Musa*. *Theoretical and Applied Genetics* 84: 286-290. 1992.
- GOMES, E.W.F.; WILLADINO, L.; MARTINS, L.S.S.; SILVA, S. De O. e CÂMARA, T.R. Variabilidade genética de genótipos de bananeira (*Musa* spp.) submetidos ao estresse salino. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 9: 171 – 177. 2005.
- GRAPIN, A.; NOYER, J.L.; CARREED, F.; DAMBLER, D.; BAURENS, F.C.; LANAUD, C. e LAGODA, P.J.L. Diploid *Musa acuminata* genetic diversity assayed with sequence tagged microsatellite sites. *Electrophoresis* 19: 1374-1380. 1998.
- GRZEBELUS, D.; BARANSKI, R.; MICHALIK, B. e SIMON, P.W. 2001. Comparison of RAPD and AFLP techniques used for the evolution of genetic diversity of carrot breeding materials. *Acta Horticulturae*. 546: 413-416. 2001.
- HOWELL, E.C.; NEWBURY, H.J.; SWENNEN, R.L.; WITHERS, L.A. e FORD-LLOYD, B.V. The use of RAPD for identifying and classifying *Musa* germplasm genome 37: 328-332. 1994
- IPGRI. 1999. [Online]. Descriptors for banana (*Musa* spp.). Homepage: http://bananas.bioversityinternational.org/files/files/pdf/publications/descriptors_en.pdf.
- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V. e THEIN, S.L. Hipervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73. 1985.
- JENNY, C.F.; CARREEL, F.; TOMEKPE, K.; PERRIER, X.; DUBOIS, C.; HORRY, J.P.; MONTCEL, H.T. Les bananiers. In: HAMON, P.; SEGUIN, M.; PERRIER, X.; GLAZMAN, J.C. (Eds.). *Diversité génétique des plantes tropicales*. Montpellier: Cirad, p.113-139. 1999.

- JESUS, O.N. de; CÂMARA, T.R.; FERREIRA, C.F.; SILVA, S. de O.; PESTANA, K.N. e SOARES, T.L. Diferenciação molecular de cultivares elites de bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41: 739-1748. 2006.
- KAEMMER, D.; FISCHER, D.; JARRET, R.L.; BAURENS, F.C.; GRAPIN, A.; DAMBIER, D.; NOYER, J.L.; LANAUD, C.; KAHL, G. e LAGODA, P.J.L. Molecular breeding in genus *Musa*: a strong case for STMS marker technology. *Euphytica* 96: 49-63. 1997.
- KAEMMER, D.; AFZA, R.; WEISING, K.; KAHL, G.; FRANTISEK, J. e NOVAK, F.J. Oligonucleotide and amplification fingerprinting of wild species and cultivars of banana (*Musa* spp.). *Biotechnology Techniques* 10: 1030 – 1035. 1992.
- LAGODA, P. Mapping and genomics. *The study of the Musaceae: mapping and genomics. Infomusa* 8:6-8. 1999.
- LAGODA, P.J.L.; DAMBIER, D.; GRAPIN, A.; BAURENS, F.C.; LANAUD, C. e NOYER, J. L.. Nonradioactive sequence tagged microsatellite site analyses: a method transferable to the tropics. *Electrophoresis* 19: 152-157. 1998.
- LIMA, M.L.A.; GARCIA, A.A.F.; OLIVEIRA, M.K.M.; MATSUOKA, S.; ARIZONO, H.; SOUZA-JUNIOR, C.L. e SOUZA, A.P. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum* spp.). *Theoretical and Applied Genetics* 104: 30- 38. 2002.
- LOH, J.P.; KIEW, R.; SET, O.; GAN, L.H. e GAN, Y.Y. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting of 16 Banana cultivars (*Musa* spp.). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17: 360-366. 2000.
- MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA. Aplicações no melhoramento de plantas. Ed.Sandra Cristina Kothe Milach. Porto Alegre. 141p. 1998.
- NEI, M.e LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science*, 76: 5269 – 5273. 1979.

- ONGUSO, J.M., KAHANGI, E.M.; NDIRITU, D.W. e MIZUTANI, F. Genetic characterization of cultivated bananas and plantains in Kenya by RAPD markers. *Sci Hortic.* 99: 9-20. 2004.
- PILLAY, M.; NWAKANMA, D. C. e TEKNOUANO, A. Identification of RAPD markers linked to A and B genome sequences in *Musa L.* *Genome* 43: 763 -767. 2000.
- RUSSELL, R.J.; FULLER, J.D.; MACAULAY, M.; HATS, B.G.; JAHOOOR, A.; POWELL, W. e WAUGH, R. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor Appl Genet.* 95:714-722. 1999.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. e MANIATS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 653 p. 1989.
- SANTOS, J.R.P. Caracterização de genótipos de *Musa* com base na reação a *Radopholus similis* e de genótipos contrastantes para a resistência com base em marcadores moleculares RAPD. 72p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília. 2007.
- SANTOS, J.R.P; TEIXEIRA, M.A.; CARES, J.E.; FALEIRO, F.G.; COSTA, D.C. Contrastant banana accessions for resistance to the burrowing nematode, based on molecular markers RAPD. *Euphytica* 172:13-20. 2010.
- SAS INSTITUTE INC. *SAS/STAT user's guide.* Version 6, 4 ed. SAS Institute, North Caroline, Cary. 1989.
- SOUZA, S.A.C.D; Avaliação da variabilidade genética em *Musa* spp. utilizando marcadores microssatélites. Tese (Doutorado). ESALQ, Piracicaba- Brasil. 2002.
- STATSOFT INC. *Statistica for Windows [Computer program manual]* Tulsa, OK. StatSoft Inc. 2300 East 14th Street, Tulsa. 1999
- TEIXEIRA, M.A. Resistência de genótipos de bananeira a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* e variabilidade genética com base em marcadores moleculares RAPD. 68p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília. 2007.

CAPÍTULO 7

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES ANÁLOGOS DE
RESISTÊNCIA EM ACESSOS DE *MUSA* RESISTENTE E
SUSCETÍVEL A *RADOPHOLUS SIMILIS*.**

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES ANÁLOGOS DE RESISTÊNCIA EM ACESSOS DE *MUSA* RESISTENTE E SUSCETÍVEL A *RADOPHOLUS SIMILIS*.

RESUMO

A bananeira (*Musa spp*) é cultivada por todo o país, sendo fundamental para a complementação da dieta alimentar das populações de baixa renda. O Brasil é o quarto maior produtor mundial de bananas. Onde quer que seja o cultivo da banana tem sua produção afetada por um complexo de doenças e pragas. Apesar de várias espécies de nematoides infectarem as raízes de bananeiras com consequências adversas, o endoparasita migratório *Radopholus similis* é considerado o mais importante para a cultura. Portanto, o estudo dos mecanismos de resistência a este nematoide é de extrema importância para o melhoramento de banana. O presente estudo tem como objetivo analisar a expressão de RGAs em acessos resistente (Yangambi Km5) e suscetível (Grande Naine) ao nematoide *Radopholus similis* na presença e ausência do patógeno em momentos diferentes após a inoculação. Um bioensaio foi realizado com duração de 7 dias em casa de vegetação. As mudas foram distribuídas inteiramente ao acaso com 3 repetições por planta sobre bancada, para a subsequente inoculação dos nematoides. As raízes foram coletadas em quatro tempos distintos, 0, 3, 5 e 7 dias após inoculação. Doze pares de *primers* desenhados a partir de sequências de RGAs da família NBS-LRR foram utilizados para a análise de expressão diferencial via RT-PCR a partir do RNA extraído das raízes. Seis protocolos de extração de RNA foram testados. O protocolo do Reagente Concert foi selecionado, pois possibilitou a extração de RNA de raiz em quantidade e qualidade ideais. Os genes RGC5 e RGA14 não foram expressos para nenhum dos dois acessos. Os genes RGA10, Franc_MbPKW_RGA08L, Franc_MbPKW_RGA08O se revelaram como constitutivos e expressos em todos os tempos para ambos os acessos. Outros genes que apresentaram uma expressão basal foram os RGA37, RGA41, RGC3 e RGC1, sendo que o primeiro foi expresso de forma constitutiva apenas para Yangambi Km5 e os ultimo para da mesma forma para ambos os acessos e os outros dois apenas para Grande Naine. O gene Franc_MbPKW_RGA08E teve um aumento na expressão a partir do período de tempo 3 para o acesso resistente, sendo que para a planta suscetível este gene só foi começar a ser expresso no tempo 7. O gene RGC2 foi expresso apenas no acesso resistente no tempo 5. O gene Franc_MbPKW_RGA08K foi expresso tardiamente em Grande Naine e para Yangambi Km5 foi constitutivo, mas deixou de ser expresso a partir do tempo 3.

Palavras-chave: Banana, nematoide cavernícola, NBS-LRR, genes de resistência

**ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF ANALOGOUS GENES OF RESISTANCE
IN ACCESSIONS OF *MUSA* RESISTANT AND SUSCEPTIBLE TO
RADOPHOLUS SIMILIS.**

ABSTRACT

Banana (*Musa* spp.) is cultivated throughout the country and it is essential to complement the diet of low-income populations. Brazil is the fourth largest producer of bananas. Wherever banana is planted, production is affected by a complex of diseases and pests. Although several species of nematodes infect the roots of banana with adverse consequences, the migratory endoparasite *Radopholus similis* is considered the most important to the culture. Therefore, the study of mechanisms of resistance to this nematode is of utmost importance for breeding of bananas. This study aims to analyze the expression of RGAs in resistant accessions (Yangambi Km5) and susceptible (Grande Naine) to *Radopholus similis* in the presence and absence of the pathogen at different times after inoculation. A bioassay was conducted with duration of 7 days in greenhouse. Plants were randomly assigned to three replicates per accession on a workbench, with subsequent inoculation of nematodes. Equal number of plants was maintained without inoculation. Roots were collected at four different time 0, 3, 5 and 7 days after inoculation. Twelve pairs of primers designed from RGAs sequences of NBS-LRR family were used for analysis of differential expression by RT-PCR using RNA extracted from roots. Six RNA extraction protocols were tested. The protocol Concert™ Plant RNA Reagent was selected since it allowed the extraction of RNA in ideal quantity and quality. The sequences RGC5 and RGA14 were not expressed in any of the two accessions, RGA10, Franc_MbPKW_RGA08L, Franc_MbPKW_RGA08O, were revealed as constitutive and expressed in all times for both accessions. Other sequences that showed a basal expression were RGA37, RGA41, RGC3 and RGC1. The first one was expressed constitutively only in Yangambi Km5, the next two only in Grande Naine, and the last one was expressed in both accessions. The gene Franc_MbPKW_RGA08E had an increased expression starting from time 3 in the resistant accession, while in the susceptible one, this gene only started to be expressed at time 7. The gene RGC2 was expressed only in the resistant accession, beginning at time 5. The gene Franc_MbPKW_RGA08K was expressed late in Grande Naine, and it proved to be constitutive expression in Yangambi Km5, but it stopped to be expressed at time 3.

Keywords: Banana, burrowing nematode, NBS-LRR, genes for resistance.

1. INTRODUÇÃO

A bananeira (*Musa spp*) é cultivada por todo o país, sendo fundamental para a complementação da dieta alimentar das populações de baixa renda. O Brasil é o quarto maior produtor mundial de bananas (FAO, 2008), tendo produzido aproximadamente 6,9 milhões de toneladas em uma área colhida de 479 mil hectares no ano de 2009 (IBGE, 2009). Onde quer que seja o cultivo da banana tem sua produção afetada por um complexo de doenças e pragas. Apesar de várias espécies de nematoides infectarem as raízes de bananeiras com consequências adversas, o endoparasita migratório *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949 é considerado o mais importante para a cultura (Gowen *et al.*, 2005).

Além das altas infestações de *R. similis* resultarem em baixa produção, redução no peso de frutos e tombamento de plantas, as lesões ocasionadas pelos nematoides nas raízes podem facilitar a entrada de fungos fitopatogênicos (Stover, 1966), que aceleram a destruição dos tecidos. Como consequência da destruição das raízes as plantas diminuem a absorção de água e nutrientes minerais e enfraquecem a ancoragem das plantas, podendo levar ao tombamento da planta, especialmente em plantas que estão com frutos (Pinochet e Ventura, 1977; Gowen, 1979). Como resultado do parasitismo do nematoide, no qual é um endoparasita migratório, há uma redução da produção, pouca resposta a fertilização, proliferação de plantas filhas raquíticas e maior suscetibilidade da planta a outros patógenos de solo e a estresses abióticos (Araya *et al.*, 1995).

Perdas atribuídas ao nematoide cavernícola podem variar de 20 a 100%, dependendo de condições favoráveis. No Brasil perdas de até 68% foram relatadas, sendo que na cultivar Nanicão (AAA) variaram de 80 a 100% (Zem e Alves, 1981).

O controle de *R. similis* em plantios comerciais de banana é amplamente dependente dos nematicidas (Gowen *et al.*, 2005; Moens *et al.*, 2004), enquanto que pequenos produtores usam métodos culturais (Speijer *et al.*, 1999). O manejo de nematoides requer o desenvolvimento de alternativas que reduzem o uso de pesticida e sejam ambientalmente seguras. O desenvolvimento de variedades de plantas com resistência durável a nematoides é muito importante para o controle de *R. similis*.

Embora algumas fontes de resistência a *R. similis* já terem sido relatadas por alguns autores (Pinochet e Rowe, 1978; Sarah *et al.*, 1992; Fogain e Gowen, 1997; Collingborne e Gowen, 1997; Wehunt *et al.*, 1978; Fallas e Marbán-Mendonza, 1994; Elsen *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 1998; Santos 2007, Quénéhervé *et al.*, 2009; Dizon *et al.*, 2010) nos últimos

anos, em comparação com outras culturas como soja e café, o melhoramento genético de *Musa* spp. a nematoides ainda é limitado.

Cultivares têm evoluído a partir de diploides, triplóides e tetraploides selvagens de espécies de *M. acuminata* (Genoma A) e *M. balbisiana* (Genoma B). As espécies selvagens são geralmente seminíferas, enquanto a maioria das cultivares comerciais plantadas atualmente são triplóides estéreis, com frutos que se desenvolvem por partenocarpia. Como a cultura evoluiu principalmente através de reprodução assexuada e possui uma variação genética limitada sem resistência a pragas e doenças, deve-se concentrar na busca de genes de importância em cultivares selvagens como fontes de resistência, para que posteriormente sejam transferidos para as cultivares comerciais triplóides e tetraploides (Silva *et al.*, 2001). O melhoramento convencional de diploides e triplóides de bananeira é, de qualquer modo, impedido devido ao baixo número ou à completa ausência de sementes, causada pela perda de viabilidade do pólen, ou ineficiência na polinização por insetos (Silva *et al.*, 2002). Além destes entraves, o melhoramento clássico para resistência demanda períodos longos para a finalização do processo, sendo que na maioria das vezes estas fontes de resistência podem ser perdidas rapidamente ou então alguns genes de resistência podem estar ligados a características agronomicas indesejáveis. Com isso a aplicação da engenharia genética e molecular pode encurtar consideravelmente o ciclo de desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças, com a aplicação de marcadores moleculares para seleção assistida (Gao *et al.*, 2010) ou transferência de genes de resistência através da transformação genética (Proite, 2007).

Os genótipos resistentes podem prevenir o ingresso do patógeno por meio a um simples mecanismo de defesa gene-a-gene. A hipótese gene-a-gene define que a planta possui um gene de resistência (gene R) e o patógeno possui um gene de avirulência (gene Avr). Quando os dois, planta e patógeno entram em contato, acontece o reconhecimento do produto do gene R pelo produto do gene Avr. Nesse caso, o gene R funciona como um receptor que é induzido ao receber um sinal externo (tentativa do patógeno em atacar a planta), liberando uma cascata de sinais que são transduzidos para que se obtenha uma resposta de defesa (Flor, 1972). No entanto, com os avanços da genética molecular, cada vez mais temos evidências de que na realidade este sistema de reconhecimento planta/patógeno seja mais complexo e outras proteínas podem estar envolvidas neste processo. A hipótese “guarda” é uma tentativa de explicar uma forma de reconhecimento indireto, onde as proteínas R estariam guardando, como um sensor, impactos sobre outras proteínas para uma resposta (Jones e Takemoto, 2004). Os elementos desse mecanismo

incluem uma proteína endógena da planta hospedeira, denominada de “guarda”, que interage ou é modificada pelo efector produzido pelo patógeno (Avr). Essa interação é percebida quimicamente pela proteína de resistência R, nesse caso chamada de proteína guarda, a qual ativa a resistência do hospedeiro (Dangl e McDowell, 2006). Está hipótese, foi apresentada para explicar porque a proteína quinase *Pto* requer a proteína NBS-LRR *Prf* para ativar a defesa após o reconhecimento da *AvrPto* (Van de Biezen e Jones, 1998). A evidência para a hipótese guarda foi observada com uma proteína R de *Arabidopsis* chamada *RIN4*. As evidências mostram que *RIN4* é guardada por duas proteínas de resistência *RPM1* e *RPS2*. *RPM1* está envolvida no desencadeamento da resposta de hipersensibilidade, em resposta à presença dos genes *AvrRpm1* e *AvrB* de bactérias, enquanto as respostas *RPS2* são desencadeadas pelo gene *AvrRpt2* da bactéria. *AvrRPM1* e *AvrB* levam a fosforilação de *RIN4* que ativa a via de sinalização *RPM1*. Curiosamente, tanto *RPS2* e *RIN4* guardam *RPM1*, que é alterada na presença de proteínas de avirulência bacteriana *AvrRpt2* e *AvrRpm1*. Modificações na *RIN4* são percebidas e as defesas da planta são acionadas (Mackey *et al.*, 2002; Quirino e Bent, 2003).

Até hoje, cinco classes de R genes foram identificadas em plantas, baseadas em domínios proteicos conservados (Martin *et al.*, 2003). A maior e mais importante classe de R genes é a de sítio de ligação a nucleotídeos e região de repetição rica em leucina (NBS-LRR) (Rommens e Kishmore, 2000). A maioria dos genes clonados até hoje ligados a resistência estão incluídos nessa família. Acredita-se que o domínio NBS esteja atuando na transdução de sinais (Ellis e Jones, 1998), e o LRR no reconhecimento do patógeno por meio da interação do produto do gene Avr com o produto do gene R (Fluhr, 2001). A maior parte dos estudos têm sido elaborados em torno desta família de proteínas, pois esta família tem apenas a resistência a estresse biótico como função conhecida em plantas (Meyers *et al.*, 2005). Duas subfamílias ocorrem dentro desta família baseadas no motivo N-terminal. A TIR (Toll interleucine receptor) NBS exibe aminoácidos localizados no N-terminal que mostram homologia com domínios de sinalização intracelular de *Drosophila* (Toll) e uma interleucina (IL) basal de mamíferos (Parker *et al.*, 1997). A Não - TIR NBS pode conter um domínio N-terminal *coiled-coil* (CC), um subconjunto que codifica para uma sequência *Leucine zipper* (LZ). O grupo TIR está presente em dicotiledôneas, enquanto o grupo Não - TIR ocorre tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas (Meyers *et al.*, 1999).

As outras classes de genes R em plantas incluem proteínas com LRR extracelular ancorado à membrana, LRR extracelular com domínio transmembrana ligado a uma ser/thr

kinase no citoplasma, ser/thr kinase citoplasmática e *coiled coil* ancorado à membrana (Meyers *et al.*, 1999).

A existência de similaridades estruturais entre os genes de resistências possibilitou a identificação de análogos aos genes de resistência (RGAs) em diversas espécies vegetais (Malvas, 2003). Os RGAs são sequências similares a sequências de genes de resistência, mas que ainda não possuem sua funcionalidade confirmada.

Usando amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) com *primers* degenerados para a detecção de motivos conservados de NBS e LRR, dentre outros, domínios conhecidos de genes de resistência e um grande número de genes análogos de resistência (RGA) foram isolados em soja (Graham *et al.*, 2000), batata (Leister *et al.*, 1996), alface (Shen *et al.*, 1998), arroz e cevada (Leister *et al.*, 1998) trigo (Seah *et al.*, 2000), girassol (Ayele-Gedil *et al.*, 2001) feijão (López *et al.*, 2003), morango (Martínez-Zamora *et al.*, 2004), maçã (Calenge *et al.*, 2005), cana-de-açúcar (Rossi *et al.*, 2003) e até *Musa* (Pei *et al.*, 2007; Azhar e Heslop-Harrison, 2008; Miller *et al.*, 2008; Peraza-Echeverria *et al.*, 2009).

Vários genes de resistência a nematoides (Nem-R) têm sido isolados de plantas, todos conferindo resistência contra nematoides endoparasitas sedentários. O primeiro gene de resistência a nematoide clonado foi o *HsI^{pro-1}* da beterraba, o qual confere resistência contra ao nematoide de cisto da beterraba (*Heterodera schachtii* Schmidt, 1871) (Cai *et al.*, 1997, Thureau *et al.*, 2003). A proteína codificada não tem similaridade com genes de plantas conhecidos. Entretanto, outro gene Nem-R clonado se assemelhava a genes-R de plantas conhecidos. Quatro desses genes, *Mi-1*, *Hero A*, *Gpa2* and *Gro1-4*, todos clonados de tomate ou batata, encontram-se dentro da classe de R-genes NBS-LRR. Os genes de tomate *Mi-1* e *Hero A* conferem resistência contra várias espécies de nematoides das galhas e contra alguns patótipos do nematoide de cisto da batata, respectivamente (Vos *et al.*, 1998; Ernst *et al.*, 2002). Por outro lado, os genes *Gpa2* e *Gro1-4* conferem resistência limitada em batata a patótipos de *Globodera rostochiensis* e *G. pallida*, respectivamente.

Nem-R genes também incluem membros das classes de R-genes que codificam proteínas com domínios LRR extracelular. Em soja, análises genéticas determinaram que dois locos, *Rhg1* e *Rhg4*, condicionavam resistência a *Heterodera glycines* tipo 0 (Meksem *et al.*, 2001). Os genes candidatos de *Rhg1* e *Rhg4* foram clonados e ambos codificam proteínas com LRRs extracelulares, um domínio transmembrana e um domínio citosólico ser/thr kinase, estruturalmente semelhantes ao gene *Xa21* de arroz (Hauge *et al.*, 2001).

Numerosos RGAs pertencentes à família NBS-LRR foram recentemente caracterizados das mais diversas cultivares dos genomas A e B de *Musa* (Azhar e Heslop-Harrison, 2008). Pei *et al.* (2007), também ampliaram esta busca na família não-TIR NBS em espécies selvagens de *Musa*, utilizando *primers* previamente publicados. Miller *et al.*, (2008) utilizaram sequências conservadas, identificadas por *primers* degenerados, como marcadores para a identificação de genes envolvidos na resistência à estresses bióticos. Os *primers* degenerados foram desenhados tomando como base motivos conservados descobertos nos domínios NBS e LRR em R-genes e homólogos de espécies de planta monocotiledônea, os quais foram utilizados para a caracterização de RGAs NBS-LRR em *Musa acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4. Numerosos loci específicos de resistência foram identificados em 88 clones BAC.

Em relação à expressão de genes de resistência em espécies de bananeiras, cinco genes candidatos de resistência (RGC1, RGC2, RGC3, RGC4 e RGC5) foram avaliados por RT-PCR em folhas e raízes de plantas de bananeira resistentes e suscetíveis a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* raça 4. Desses cinco RGCs, a expressão do RGC2 foi associada apenas às plantas resistentes (Peraza-Echeverria *et al.*, 2008). Mais seis pares de *primers* específicos foram analisados por qPCR e foram expressos em *Musa*. Todos os genes testados foram encontrados sendo expressos em diferentes tecidos de *M. balbisiana*, indicando que vários membros de um mesmo agrupamento (*Cluster*) de genes de resistência podem ser expressos e são potencialmente funcionais (Baurens *et al.*, 2010).

Como até o momento poucos trabalhos verificaram a expressão de genes análogos de resistência a doenças em *Musa*, entre elas as causadas por nematoides, este trabalho tem por objetivo analisar a expressão de RGAs em acessos de *M. acuminata* resistentes e suscetíveis ao nematoide *R. similis* na presença e ausência do patógeno em momentos diferentes após a inoculação, durante a cinética da interação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e bioensaio

O bioensaio foi realizado na Estação experimental de Biologia da Universidade de Brasília, sendo avaliado no período de 5 a 12 de fevereiro de 2010, em casa de vegetação com duração de 7 dias. As mudas foram distribuídas inteiramente ao acaso com 3

repetições por planta sobre uma bancada no interior da casa de vegetação, devidamente identificadas, para a subsequente inoculação dos nematoides.

Os acessos Grande Naine (AAA) e Yangambi Km5 (AAA), suscetível e resistente respectivamente, foram obtidos a partir do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, onde as plantas foram produzidas por micropropagação e aclimatadas por três semanas em câmara de crescimento (27-28 °C) com 12 horas de fotoperíodo. As mudas foram transplantadas para vasos de 1,5 l. contendo uma mistura de solo e areia autoclavada, na proporção 3:1. O solo foi corrigido com calcário e adubado atendendo as necessidades recomendadas para a cultura (Borges, 2004). Após transplântio, as mudas foram mantidas em casa de vegetação por um período de 30 dias, até o momento da inoculação.

As raízes foram coletadas em quatro períodos de tempo distintos, 0, 3, 5 e 7 dias após inoculação. A primeira coleta no tempo “0”, em plantas não inoculadas com nematoides, foi realizada logo após a inoculação do restante das plantas. Aproximadamente 5 gramas de raiz de cada repetição e de cada tempo foram coletadas, imediatamente lavadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até o uso.

O restante das raízes foi levado para o laboratório onde foram picadas, homogeneizadas e trituradas para posterior extração de nematoide em 20g de raiz, com intuito de confirmar a atividade dos nematoides nas raízes. Os nematoides foram extraídos das raízes de bananeiras pelos métodos modificados de Coolen e D’Herde (1972) e de Jenkins (1964). Após a extração os nematoides de cada amostra foram visualizados e contados sob microscópio estereoscópico, sendo os mesmos contados em três alíquotas de 2 ml, compondo uma média. Todas as plantas tiveram suas raízes bem lavadas antes do processo de extração para remoção das partículas de solo, que eventualmente poderiam conter nematoides.

2.2. Multiplicação e inoculação de nematoides

Uma população agressiva de *R. similis* proveniente de bananeiras da cv. Pacovan originárias do estado de Pernambuco-Brasil, mantida em plantas da cv. Grande Naine cujos nematoides foram posteriormente extraídos e multiplicados *in vitro* em cilindros de cenoura, utilizando frascos com ágar-água conforme descrito no segundo capítulo desta tese.

Após a multiplicação dos nematoides, estes foram extraídos dos cilindros de cenoura de acordo com Coolen e D'Herde (1972). A suspensão de nematoides foi vertida em uma peneira de 140 mesh e os nematoides coletados em peneira de 400 mesh. A parede dos frascos foram lavadas com água estéril e os nematoides também foram recuperados em peneiras de 400 mesh.

A suspensão de inóculo em béqueres, depois de haver sido submetida à contagem foi calibrada para 300 nematoides/ml, sendo que apenas nematoides ativos foram contados. Dois orifícios opostos foram abertos ao redor das mudas expondo as raízes e a suspensão de nematoides (1 ml) foi depositada sobre as raízes. Os vasos com as plantas relativas ao tempo 0, foram inoculadas apenas com água destilada estéril.

2.3. Protocolos de extração do RNA total

O reagente *Concert™ Plant RNA*, da Invitrogen, é um reagente que permite o isolamento de RNA total de alta qualidade de tecidos de plantas, especialmente aquelas ricas em polifenóis e amido.

O procedimento utilizado foi o de grande escala sugerido pelo fabricante com pequenas modificações. Aproximadamente 3 gramas de raiz, por repetição, foram maceradas em nitrogênio líquido. Duas gramas da raiz macerada foi transferida para tubos tipo Falcon de 15 ml e então, foi adicionado 5 ml do reagente *Concert Plant RNA*, por grama de tecido. A amostra foi misturada com o auxílio de um agitador do tipo vortex até ser completamente ressuspenida. Após a ressuspenção, os tubos com as amostras foram mantidos em temperatura ambiente por 5 minutos com os tubos deitados para aumentar a superfície de contato durante a extração do RNA. A mistura foi então centrifugada por 5 minutos a 2600 g à temperatura de 4 °C e, na sequência transferida para novo tubo, por duas vezes. Foi adicionada e misturada 2 ml de solução NaCl 5M para cada 10 ml de sobrenadante. Adicionam-se 6 ml de clorofórmio para cada 10 ml iniciais e, misturando-se com o vortex. A amostra foi centrifugada por 30 minutos a 2600g na temperatura de 4 °C. Posteriormente, a fase aquosa de cada amostra foi transferida para novos tubos, sendo completada com 0,9 volumes de isopropanol gelado. Em seguida as amostras foram misturadas por inversão e mantidas por 10 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi novamente centrifugada por 30 minutos a 2600g na temperatura de 4 °C. Logo depois da centrifugação o sobrenadante foi descartado e ao tubo, adicionados 5 ml de etanol 75%. Novamente as amostras foram centrifugadas por 5 mim a 2600g na temperatura de 4 °C. O

sobrenadante mais uma vez foi descartado e uma centrifugação rápida (*spin*) foi aplicada para retirar cuidadosamente o excesso de etanol com auxílio de uma pipeta. O pellet formado foi colocado para secar por aproximadamente 15 minutos à temperatura ambiente. Finalmente o RNA foi ressuscitado em 30 µl de água Milli-Q estéril (Millipore Corporation).

Foram também testados outros cinco protocolos de extração de RNA. Portanto além do descrito acima, foram testados os protocolos CTAB (Chang *et al.*, 1993, com pequenas modificações), o mesmo método CTAB com adição de cloreto de lítio, o protocolo de Cloreto de lítio (Santos *et al.*, 2009), o protocolo do reagente Trizol (Invitrogen) conforme descrito pelo fabricante e por último o protocolo Tri-phasis (BioAgency) que seguiu o mesmo protocolo do Trizol (Invitrogen), apenas com a substituição do reagente Trizol por Triphasis.

A quantidade e qualidade de todos os RNAs extraídos foram mensuradas em espectrofotômetro (Nanodrop® Espectrophotometer ND-1000) e em uma corrida com 2 µl de RNA total em gel de agarose 1,5% com TBE 1X, corados com brometo de etídio a 0,15 µg/ml.

2.4. Tratamento do RNA com DNase

Uma amostra (*pool*) foi preparada com as três repetições de cada tempo de avaliação em uma concentração final de 2 µg de RNA por µl para cada repetição, totalizando um amostra com 6 µg de RNA. Os “pools” então foram tratados com DNase (Invitrogen) conforme o protocolo do fabricante, onde para cada amostra foi adicionado 1U de DNase, 1 µl do tampão de reação DNase I 10X e água Milli-Q (Millipore Corporation) estéril para ajustar o volume para 50 µl finais. Conforme o fabricante as amostras foram mantidas por 15 minutos a temperatura ambiente e posteriormente a inativação da DNase foi feita. Para a inativação da reação foi misturado 1 µl de solução de EDTA 25 mM que então foi aquecida a 65 °C por 10 minutos. Ao finalizar a inativação da DNase, as amostras foram precipitadas e ressuscitadas com adição de 2,5 volumes de etanol 100% gelado e 0,1 volume de acetato de sódio 3M pH 5,2. As amostras foram deixadas “overnight” em freezer – 20 °C e centrifugadas por 12000 rpm a 4 °C por 30 min. Após a centrifugação foi adicionado 1 ml de etanol 75% gelado e novamente, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Finalmente as amostras foram

secas à temperatura ambiente e ressuspendidas em 30 µl de água Milli-Q estéril (Millipore Corporation).

2.5. Síntese de cDNA

O RNA tratado com DNase, resultante de cada tempo de avaliação, foi submetido à síntese de cDNA com uma transcriptase reversa. A síntese de cDNA foi realizada com o Kit SuperScript II (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante com pequenas modificações. Para a síntese do cDNA uma reação com 20 µl contendo aproximadamente 6 µg do RNA total foi usada. Um primeiro mix foi preparado com 10 µl de água com o RNA, 1 µl de dNTP 10 mM e 1 µl de oligoDT 50 µM. A mistura foi mantida na temperatura de 65 °C por 5 minutos e então, rapidamente, foi colocada no gelo por mais 5 minutos. Uma rápida centrifugação foi feita para concentrar o conteúdo do tubo e então, foi adicionado um segundo mix com 4 µl de tampão de primeira fita 5X, 2 µl de DTT 0,1M e 1 µl da Superscript II. Os reagentes foram misturados delicadamente com o auxílio de uma pipeta e na sequência mantidos na temperatura de 42 °C por 60 minutos. Para a inativação da reação, esta foi mantida a 70 °C por 15 minutos.

Após os processos acima, o cDNA de cada um dos tempos, preparado a partir de uma amostra das três repetições, foi diluído para a concentração de 1:100 para a utilização em PCR.

2.6. Síntese dos *primers* específicos de RGAs e reação de PCR

A partir de sequências de RGAs obtidas por Miller *et al.*, (2008), que com a utilização de *primers* degenerados para monocotiledôneas amplificou 174 genes análogos de resistência de Calcutta 4 que formaram 52 *contigs* pertencentes à subfamília non-TIR NBS-LRR, quatro pares de *primers* específicos foram aqui desenhados para amplificação em RT-PCR, para análise de expressão de 4 dos 52 RGAs *contigs*. Esses quatro pares de *primers* são resultantes de mais de uma sequência próxima de RGAs (*contigs*). O *primer* referente ao RGA10 foi desenhado para amplificar o *contig* dos RGAs (10, 44, 29, 20, 23, 15, 11, 08, 09, 17, 21 e 19), o RGA14 para o *contig* (14, 18, 24, 25 e 28), o RGA37 para o *contig* (37 e 39) e o RGA41 para os RGAs (41 e 46). Os *contigs* foram construídos com o auxílio do software CAP3 Sequence Assembly Program (Huang e Madan, 1999). Após a construção dos *contigs*, as ORFs (open reading frame) foram encontradas com o auxílio do

programa ORF Finder (NCBI, 2010a) com o intuito de separá-las do resto do cDNA obtido nesse ensaio. A partir da sequência que compõe apenas a região codante, os *primers* foram desenhados para esses genes com o uso do programa PRIMER3Plus (Rozen e Skaletsky, 2000). Dois pares de *primers* específicos que amplificam genes constitutivos, Actina e Elongation fator, foram desenhados a partir de sequências de *Musa* depositadas no banco de dados do National Center Biotechnology Information (NCBI). Portanto, foi realizada uma busca dos genes da actina (gi 151413782) e elongation factor (gi 66775523) de *M. acuminata* no banco de dados (NCBI, 2010b). As sequências completas dos genes em questão foram submetidas à versão on-line do programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997) para confirmação de identidade e funcionalidade no genoma de *M. acuminata*. A partir disso, foi desenhado *primers* para esses genes com o uso do programa PRIMER3Plus (Rozen e Skaletsky, 2000). Os *primers* desenhados flanqueiam em exons diferentes com o objetivo de amplificar uma região não codificante e com isso, esses *primers* puderam ser utilizados como controle para detectar qualquer contaminação com DNA genômico e para determinar a qualidade e concentração dos cDNAs.

Para checar a funcionalidade dos *primers* desenhados foi conduzida uma PCR eletrônica utilizando a sequência completa dos genes e seus respectivos pares de *primers*. Para isso foi usado a versão *on line* do software EMBOSS GUI (Rice *et al.*, 2000). Foi adotado um percentual de 15% de não coincidência, ou seja, como os *primers* possuem 20 bases, tolerou-se que até 3 bases não anelassem adequadamente.

Outros quatro pares de *primers* de genes candidatos de resistência da classe NBS-LRR, desenhados por Peraza-Echeverria *et al.*, (2008), também foram utilizados. E mais quatro pares de *primers* de genes completos de resistência do grupo de genes RGA08 que foram expressos em diferentes tecidos de *M. balbisiana*, desenhados por Baurens *et al.*, (2010) também foram utilizados. Todos os 12 pares de *primers* utilizados no presente estudo amplificam sequências de genes análogos de resistência da classe NBS-LRR, subclasse não-TIR.

Todos os pares de *primers* foram sintetizados por IDT – Integrated DNA Technologies (Tabela 1).

Tabela 1. Lista de *primers* específicos usados para análise de expressão de RGAs em *Musa* por RT-PCR.

<i>Primers</i>	<i>Sequencia sentido 5'--> 3'</i>	<i>Sequencia reversa 5' --> 3'</i>	(T _m) °C	Produto (pb)
Actin1_RT	AGCACCCCTGTATTGCTCACC	TGTGATCTCCTTGCTCATGC	55	656
Elongation_factor_RT	CGCTTTCCTCTTGGTGTCA	ATCGCCTGTCAATCTTGGTC	50	695
RGA10	GCACGGAGCACTGTATCTGA	GACCGTAAGGTTGCGATTGT	55	233
RGA14	TTTCGAGCTTTGTGCATTTG	CAGTGCCTTCCCTGCTAAAG	55	121
RGA37	TGGGAGGAGATACCTGCTTG	TTCTTCGATTCTGGTGGTCA	55	130
RGA41	CCTTGTGGGAAACTCCGTAA	CAACTGCCACAAGCTGAAAA	55	722
RGC1	CAAGTCTTGTCGAATCGAAC	TCGTCGGCATGCCAGAATAC	55	375
RGC2	CCATTGAGAATGTGGGTGTG	ACTCCTCGAGAACGTATGG	55	320
RGC3	ACCCGCGATTACCATGTGG	GCGCTTCTTCTCATGTCGC	55	420
RGC5	CTGCTACCAAGGTGGAACAATC	GCACAATTCTTGAACAGCTCC	55	290
Franc_MbPKW_RGA08E_qRTPCR	ACGTCTTCTGGTTTTGGAGTGGCA	CGCAACCAACCTCGATATCTGTGC	58	194
Franc_MbPKW_RGA08K_qRTPCR	AGATGCAGACCTGTGAGTCTGTCAA	TGAGTGTTTTTGCAGTATGCACGTTTC	60	248
Franc_MbPKW_RGA08L_qRTPCR	ACGTCTTCTGGTTTTGGAGTGGCA	GCAGCCAACCTATCGATCTGCG	60	193
Franc_MbPKW_RGA08O_qRTPCR	ACGTCTTCTGGTTTTGGAGTGGCA	CGCAACCAACCTCTCGATCTGCAT	58	194

As reações de PCR foram realizadas com o volume final de 25 µl, contendo 20 ng de cDNA, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1X de tampão de PCR alta fidelidade, 0,1 µg de cada *primer* e 0,08 U/µl de Taq polimerase Platinum (Invitrogen). O cDNA foi desnaturado a 94 °C por 3 minutos, seguido por 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 50-60 °C, e 1 minuto a 72 °C com extensão final a 72 °C por 30 minutos, usando um Termociclador Veriti (Applied Biosystems). Os produtos de PCR foram separados por eletroforese sobre gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X. A especificidade dos produtos de PCR e contaminação potencial com DNA genômico foram verificadas por meio de comparação de tamanhos de produtos de PCR obtidos com marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA *Ladder* (Invitrogen).

3. RESULTADOS

Um bioensaio foi realizado em condições de casa de vegetação com mudas de bananeiras resistentes (Yangambi Km5) e suscetíveis (Grande Naine) ao nematoide *R. similis*. Este bioensaio foi realizado para estudar a expressão de genes análogos de resistência. O RNA total extraído das raízes, durante a cinética da interação, foi transcrito reversamente em cDNA para a amplificação de fragmentos de RGAs com 12 pares de *primers* específicos. A presença de fragmentos resultantes da amplificação por RT-PCR indica a ocorrência de acúmulo de RGAs expressos e, portanto, será considerado como expressão de RGAs.

3.1. Bioensaio para confirmação da infecção de nematoides nas raízes.

O bioensaio realizado em casa de vegetação para a indução de expressão de RGAs durante o processo de infecção, foi realizado por um período de 7 dias, onde nos tempos 0, 3, 5 e 7 dias foram coletadas amostras de raízes para a extração de RNA. O restante das raízes foram lavadas e foi feita a extração de nematoides das raízes. A partir do terceiro dia após a inoculação, já foi possível encontrar em média 1,3 nematoides presentes em 20 gramas de raiz de 'Grande Naine' (suscetível) e 1,7 nematoides em 20 gramas de raiz de Yangambi Km5 (resistente). Nematoides também foram encontrados nas raízes nos tempos subsequentes de avaliação (Tabela 2).

Tabela 2. Número médio de nematoides encontrados em 20 gramas de raiz de bananeiras ao longo do tempo de interação.

Acesso	Quantidade média de nematoides			
	0 dias	3 dias	5 dias	7 dias
Grande Naine (Suscetível)	0	1,3	2,3	1,3
Yangambi Km5 (Resistente)	0	1,7	1,4	1,7

3.2. Avaliação dos protocolos de extração de RNA.

O protocolo que teve maior rendimento de RNA total extraído das cultivares Grande Naine e Yangambi Km5, tanto para amostras de folha quanto de raiz foi o protocolo de extração com o reagente Cloreto de lítio (LiCl), mas as razões de absorvância 260/280 e 260/230 foram baixas, indicando que a qualidade do RNA extraído não era boa e continha alta quantidade de contaminantes. Os protocolos do reagente Trizol (Invitrogen) e do Tri-phasis (BioAgency) tiveram rendimentos elevados, apresentando uma grande quantidade de RNA por grama de raiz, mas de baixa qualidade já que a razão 260/230 apresentou valor abaixo de 1,8. Os métodos de CTAB e CTAB + LiCl foram testados apenas para amostras de folhas e apesar de terem rendimento baixo na extração de RNA, estes apresentaram razões de 260/280 e 260/230 satisfatórias. O protocolo com o reagente *Concert Plant RNA*, além de ter um bom rendimento para ambos os materiais vegetais, teve também razões de absorvância próximas do ideal (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação do rendimento e qualidade do RNA total obtido de folhas e raízes de bananeira usando diferentes protocolos de extração.

Protocolos testados	Material vegetal	Quantidade de MVI (g)	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Absorbância		Rendimento ($\mu\text{g}/\text{g}$ MVI)*
				260/280	260/230	
LiCl	Folha	3,01	2,57	1,16	0,60	85,47
LiCl	Raiz	2,40	0,54	1,27	0,41	22,57
CTAB	Folha	1,20	0,07	2,06	2,14	0,91
CTAB	Raiz	*	*	*	*	*
CTAB +						
LiCl	Folha	0,50	0,07	2,05	2,12	2,11
CTAB +						
LiCl	Raiz	*	*	*	*	*
Trizol	Folha	0,50	0,02	1,30	0,60	0,56
Trizol	Raiz	0,50	0,45	1,82	0,76	13,49
Triphasis	Folha	0,50	0,03	1,28	0,27	0,79
Triphasis	Raiz	0,50	0,61	1,81	0,58	18,43
Concert	Folha	0,50	0,14	2,17	1,86	5,43
Concert	Raiz	1,00	1,54	2,15	1,85	46,06

* O rendimento é dado em relação à quantidade de material vegetal inicial (MVI) utilizada.

De modo geral, os RNAs extraídos pelos diversos protocolos se mostram preservados quando revelados em gel, com exceção do RNA extraído pelo protocolo de Cloreto de lítio que se apresentou degradado em gel. Como exemplo do bom funcionamento do reagente Concert, escolhido para o uso no presente estudo, o RNA total e o RNA tratado com DNase do acesso Grande Naine pode ser visualizado em gel (Figura 1.)

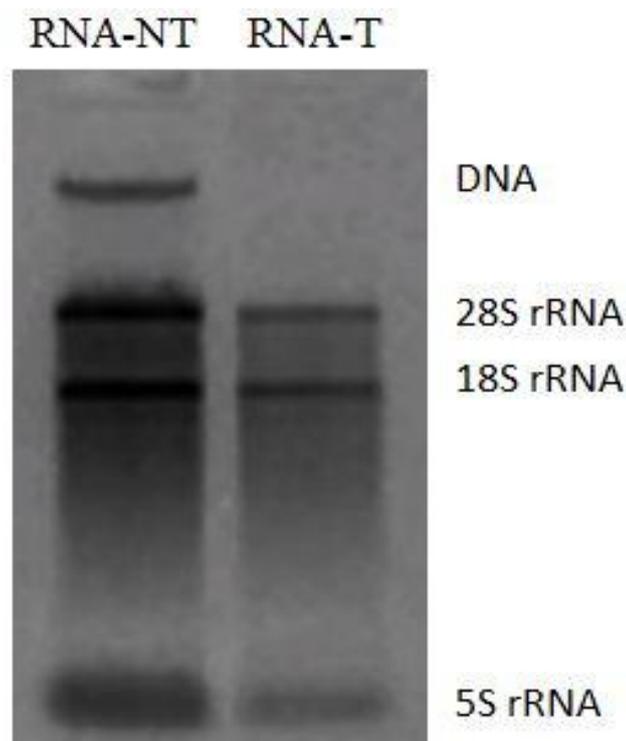


Figura 1. RNA do acesso Grande Naine no tempo 7, não tratado (NT) e tratado com DNase (T), revelado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

3.3. Padronização da concentração dos cDNAs usando genes constitutivos.

Os *primers* Actin1_RT e Elongation_factor_RT, desenhados para amplificarem genes constitutivos da banana com o intuito de assegurar que os produtos da amplificação não fossem resultantes de DNA contaminante e para garantir a padronização das concentrações de cDNA usados, foram efetivos. Estes pares de *primers* amplificaram bandas esperadas de fragmento de ~650 e 690 pb para o cDNA e de ~750 e 800 pb para o DNA, indicando que os *primers* detectaram a ausência de um intron esperado de ~100 e 110 pb nos produtos amplificados de cDNA e que as amostras de cDNA não estavam contaminadas com DNA genômico. As amplificações com os *primers* de genes constitutivos (Actin1_RT e Elongation_factor_RT), também, foram úteis para a padronização da concentração dos cDNAs, pois estes revelaram bandas evidentes e com intensidade semelhantes entre as amostras (Figura 2).

3.4. Análise de expressão de RGAs em acessos de *Musa acuminata* resistentes e suscetíveis ao nematoide *Radopholus similis*.

Além de comprovar que as amostras de cDNA não estavam contaminadas com DNA genômico, também foi possível verificar que os genes alvos de cada um dos *primers* estão presentes tanto no genoma de *M. acuminata* Grande Naine quanto Yangambi Km5, independente de estarem ou não sendo expressos, já que estes *primers* amplificaram fragmentos no DNA de ambos os acessos, suscetível e resistente. Todos os fragmentos amplificados a partir do DNA dos dois acessos tiveram o tamanho esperado, com exceção do Franc_MbPKW-RGA08E, que no acesso Grande Naine também houve a amplificação de um intron de aproximadamente 100 pb.

Em relação a expressão dos genes análogos de resistência, apenas o RGC5 não foi expresso. A análise da expressão do RGA14 mostrou produtos não específicos, não amplificando para nenhum dos acessos e tempos, ou amplificando múltiplos produtos de tamanhos não esperados. Todos os outros genes RGA estavam sendo expressos em pelo menos um dos tempos ou acessos de bananeira e, apresentaram produtos de tamanho esperado.

Produtos de amplificação foram detectados nas raízes de ambos os acessos e em todos os tempos avaliados usando os pares de *primer* RGA10, Franc_MbPKW-RGA08L e Franc_MbPKW-RGA08O, sugerindo que estes três genes são expressos constitutivamente e não diferem entre os acessos resistente e suscetível.

O *primer* RGA37 amplificou fragmentos de aproximadamente 120 pb para ambos os acessos, sendo que para o acesso suscetível (Grande Naine) não houve expressão nos tempos 0 e 5. Para o acesso resistente (Yangambi Km5) houve expressão em todos os tempos com um pequeno aumento de expressão com o decorrer do tempo. Já em relação ao RGA41, apenas em Grande Naine houve um acúmulo de mRNA no momento da inoculação e aos 7 dias. O RGC1 teve expressão semelhante entre os dois acessos, ocorrendo apenas no momento da inoculação e aos 7 dias após esta. Já o par de *primers* RGC2 amplificou um fragmento para o acesso resistente apenas 5 dias após a inoculação do nematoide. Para o gene RGC3 houve expressão tanto para o acesso resistente quanto para o suscetível. Para Grande Naine a expressão ocorreu nos tempos 0 e 7 e para Yangambi Km5 apenas no tempo 7. Entre os pares de *primer* do grupo RGA08, o Franc_MbPKW_RGA08E amplificou para o acesso resistente a partir de 3 dias após a

inoculação e para o suscetível apenas na avaliação aos 7 dias, sendo um indicativo potencial de expressão de um gene envolvido na resposta de resistência ao nematoide. Já o Franc_MbPKW_RGA08K amplificou no cDNA de Grande Naine no tempo 7 e para Yangambi Km5 somente no tempo 0 (Figura 2).

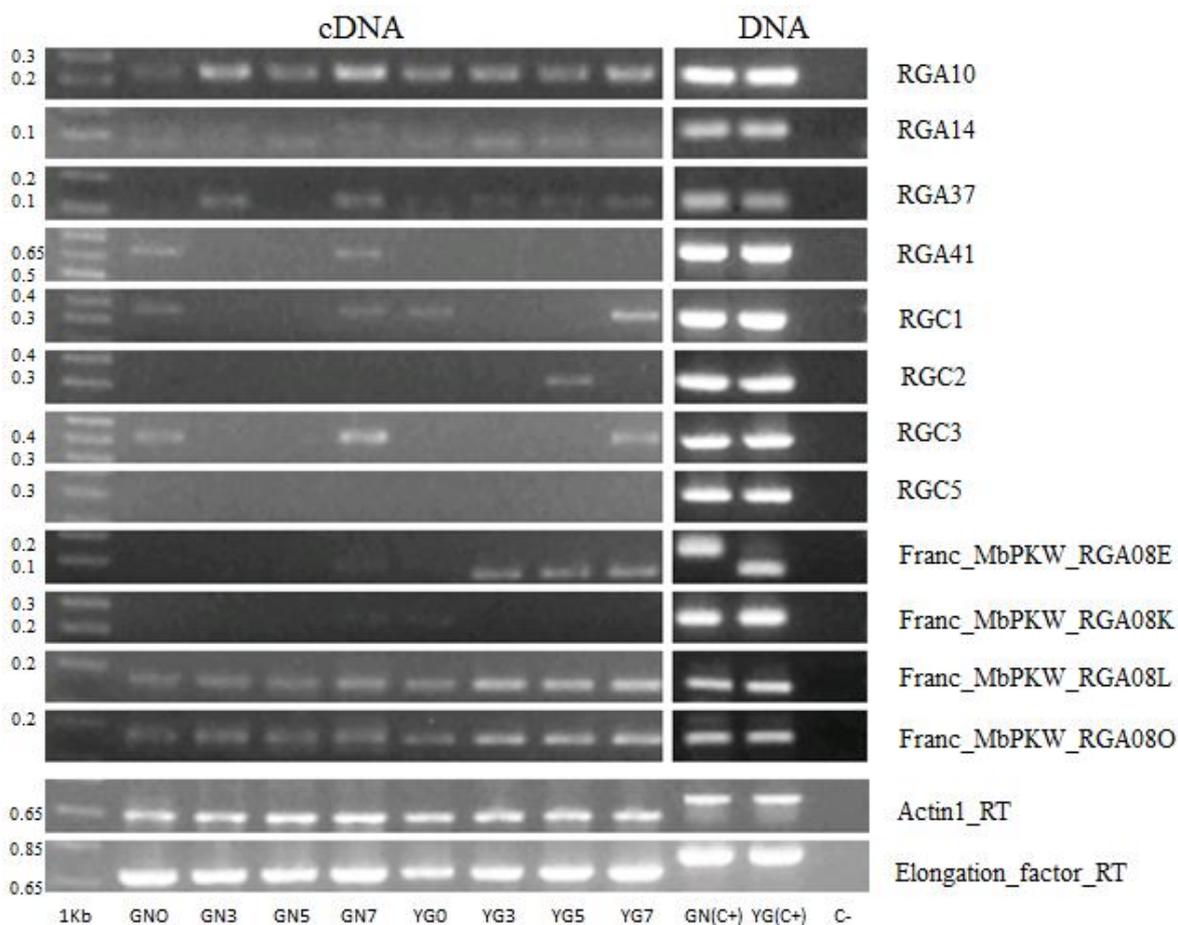


Figura 2. Análise da expressão de doze genes análogos de resistência por RT-PCR, ao longo da cinética da interação de *Radopholus similis* e plantas resistentes e suscetíveis de *Musa*. 1Kb (Plus): marcador 1 kb (Invitrogen); GN: Grande Naine (Suscetível); YG: Yangambi Km5 (Resistente); 0, 3, 5 e 7: tempos de coleta após inoculação em dias; Tempo 0: Planta não inoculada; C+: controle positivo; C-: Controle negativo. O peso molecular do marcador (Kb) estão indicados à esquerda de cada gel.

4. DISCUSSÃO

Diante dos resultados obtidos podemos verificar que a metodologia foi adequada, pois foi possível detectar a expressão dos genes análogos de resistência. Conforme esperado, em apenas três dias os nematoides já estavam parasitando as raízes e por isso podemos inferir que o nematoide interagiu com a planta. Orsi (2003) ao analisar expressão

de RGAs em cafeeiro para a resistência a *Meloidogyne exigua* verificou que picos de expressão de RGAs no terceiro dia ocorreram e, possivelmente, estavam associados à penetração dos nematoides. Em relação aos protocolos de extração de RNA verificamos que o Reagente Concert se adequou melhor às nossas condições laboratoriais, permitindo extrair RNA em quantidade e qualidade aceitáveis em curto espaço de tempo. As razões A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} aqui obtidas foram satisfatórias por estarem próximas aos valores ideais 1,8 a 2,0. Uma razão A_{260}/A_{230} alta sugere uma baixa contaminação com polifenóis e polissacarídeos (Warburg e Christian, 1942). A presença de carboidratos afeta drasticamente a eficiência no isolamento de mRNA (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2008). Já a razão A_{260}/A_{280} próxima de 2 indica uma baixa contaminação com proteínas. Campos e colaboradores (2010) otimizando alguns protocolos de extração de RNA de raiz de milho, obtiveram resultados semelhantes como o Reagente Concert (Invitrogen).

De modo geral, os pares de *primers* desenhados e sintetizados amplificaram de forma específica. Os *primers* para os genes Actina e Elongation Factor, específicos para *M. acuminata*, provaram que as amostras de cDNA não estavam contaminadas e tinham basicamente a mesma concentração. Resultado semelhante a este foi observado por Peraza-Echeverria *et al.* (2008), que desenharam outro par de *primer* para o gene da Actina para detectar contaminação de DNA genômico. Já em relação ao *primer* do gene Elongation_factor, ainda não há relato de outros autores que o desenharam para a expressão diferencial entre cDNA e DNA genômico e o tenha usado para mostrar seu comportamento constitutivo em *Musa* durante estresse biótico. Todos os *primers* específicos para RGAs funcionaram e sempre amplificaram um loco no DNA dos acessos testados.

O fato de que os *primers* RGC5 e RGA14 não amplificaram para nenhum dos acessos, Grande Naine e Yangambi Km5, não significa que estes não foram ou não podem ser expressos. Segundo Peraza-Echeverria e colaboradores (2008) a aparente ausência dos transcritos de um gene, sugere que um promotor não funcional precede este gene e alternativamente, o gene pode estar sendo expresso em outro tecido ou pode ser induzido por outro estímulo desconhecido. Orsi (2003) conseguiu amplificar um fragmento, que não foi revelado anteriormente, ao aumentar a quantidade de RNA para a transcrição reversa e por isso certo cuidado deve ser tomado ao se referir a transcritos não expressos.

Relatos anteriores tem demonstrado que os genes de resistência pertencentes à classe NBS-LRR não são induzidos mas são expressos de maneira constitutiva. Análises de *Northern Blot* ou RT-PCR sobre diversos genes de resistência, como *RPM1* (Grant *et*

al., 1995) *Prf* (Sameron *et al.*, 1996), *RPP5* (Parker *et al.*, 1997), *Mi* (Milligan *et al.*, 1998), *I2* (Mes *et al.*, 2000) entre outros, têm revelado a presença de baixos níveis de transcritos em plantas não infectadas com o patógeno. Portanto, estes relatos estão de acordo com a ideia de que as proteínas NBS-LRR agem como receptores que reconhecem um patógeno (Van Der Biezen e Jones, 1998). Os genes RGA10, Franc_MbPKW_RGA08L, Franc_MbPKW_RGA08O, se revelaram como constitutivos para ambos os acessos, pois mesmo na ausência do patógeno apresentaram os transcritos. Estes genes, além de serem constitutivos, foram expressos em todos os tempos e apresentaram diferenças de intensidade na expressão. Para os genes Franc_MbPKW_RGA08L e Franc_MbPKW_RGA08O foi nítido um aumento na intensidade de transcritos ao longo do tempo para o acesso resistente, sugerindo sua participação na resposta de defesa. Orsi (2003) verificou que alguns *primers* amplificaram fragmentos de genes que têm sua expressão, basal, alterada ao longo do tempo.

Outros genes que apresentaram uma expressão basal foram os RGA37, RGA41, RGC3 e RGC1, sendo que o primeiro foi expresso de forma constitutiva apenas para Yangambi Km5, os dois seguintes apenas para Grande Naine e o último para ambos acessos. Os transcritos de RGA37 foram aumentando a concentração ao longo do tempo para o acesso resistente, sugerindo sua participação na defesa da planta contra o nematoide. A planta suscetível, curiosamente, expressou este mesmo gene nos tempos 3 e 7. Isto sugere que o gene foi expresso inicialmente em resposta à penetração do nematoide, que de alguma forma conseguiu silenciar a expressão desse gene até que este penetrasse. A expressão volta a ocorrer no tempo 7, o que aumenta a chance deste gene estar relacionado à penetração do nematoide. Portanto, após a penetração, o processo não teria mais como impedir a multiplicação do nematoide no interior da raiz, fazendo deste acesso suscetível ao nematoide. Algo parecido pode ter ocorrido com o gene RGA41, sendo que este gene inicialmente estava sendo expresso de forma basal para o acesso suscetível e de repente parou de ser transcrito no tempo 3, onde o nematoide poderia estar penetrando na raiz, se mantendo assim até o tempo 7, quando este gene volta a ser expresso. De forma semelhante aconteceu com os genes RGC1 e RGC3, sendo que no caso do primeiro a expressão ocorreu da mesma forma para os dois acessos de bananeira e no caso do RGC3 da mesma forma, mas não sendo constitutivo para o resistente. Nestes três últimos casos os genes podem estar envolvidos na resposta de defesa, porem estão sendo silenciados pela ação do patógeno, ou podem estar envolvidos em outra função que não seja a resposta de

resistência. De acordo com Orsi (2003), genes do grupo NBS-LRR podem participar de outros processos celulares incluindo defesa a outros patógenos.

É importante ressaltar, que por outro lado, existe a ação do gene de avirulência do patógeno o qual pode secretar proteínas que controlem a expressão dos genes de resistência das plantas. Relatos realizados para nematoides endoparasitas sedentários provam que os nematoides produzem ampla gama de proteínas de secreção (Hussey *et al.*, 2002) que são secretadas na interface do nematoide com as células hospedeiras e que assim, o estabelecimento e a manutenção do parasitismo têm sido fortemente correlacionados com essas secreções protéicas dos nematoides (Vanholme *et al.*, 2004). Essas proteínas estão relacionadas com os processos de migração e formação do sítio de alimentação, onde promovem uma mudança radical na expressão de genes e no metabolismo das células vegetais (Davis *et al.*, 2000).

Os transcritos formados pelo gene Franc_MbPKW_RGA08E começaram a ter um aumento na sua concentração a partir do tempo 3 para o acesso resistente, sendo que para a planta suscetível este gene só foi começar a ser expresso no tempo 7. Devido à expressão tardia do gene o nematoide, provavelmente, conseguiu penetrar e se estabelecer no interior da raiz, tornando o acesso suscetível ao nematoide cavernícola. O mesmo não ocorreu com Yangambi Km5 o qual é resistente. Sabe-se que a resposta de defesa só é bem sucedida quando esta ocorre no momento certo. Aparentemente este gene é o mais promissor e se revela um candidato para a resistência a *R. similis*. Outro gene que pode ser promissor é o RGC2, já que este foi expresso apenas no acesso resistente no tempo 5.

O gene Franc_MbPKW_RGA08K foi expresso tardiamente em Grande Naine e para Yangambi Km5 é constitutivo e parou de ser expresso a partir do tempo 3. Provavelmente este gene não está ligado a resistência ao nematoide.

Como já discutimos anteriormente, perdas econômicas substanciais são ocasionadas por nematoides parasitas de raízes, que obtêm seu alimento exclusivamente de células vivas. Para a diminuição de tais perdas, a melhor alternativa para o controle dos nematoides até hoje é a utilização da resistência natural do hospedeiro. Conseqüentemente, alguns trabalhos têm sido realizados visando a identificação e clonagem de possíveis genes de resistência a estresses bióticos em *Musa* (Peraza-Echeverria *et al.*, 2007; Pei *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2008; Peraza-Echeverria *et al.*, 2009). Apesar dos poucos trabalhos realizados, os RGAs em *Musa* são diversos e são encontrados em abundância. Miller e colaboradores (2008) ao realizar uma análise filogenética de 33 RGAs, junto a 21 sequências representativas da classe non-TIR NBS-LRR de *A. thaliana* e 43 de *O. sativa*,

observaram a formação de 22 clados, onde dois deles continham sequências específicas a *M. acuminata* Calcutta 4, evidenciando uma grande diversidade de genes NBS-LRR neste genótipo e, conseqüentemente em *M. acuminata* em geral. Este mesmo autor sugere que *muitos loci* podem ser encontrados dentro do genoma *Musa*, já que usando uma sonda apenas do gene RGA08, foi possível identificar 11 clones BAC contendo este gene para Calcutta 4.

Diante desta grande diversidade de genes análogos de resistência presentes no genoma de *Musa*, mais estudos devem ser realizados com ênfase na expressão de genes de resistência a *R. similis*, outros nematoides e patógenos.

O primeiro passo para o entendimento dos mecanismos de resistência ao nematoide cavernícola foi dado neste trabalho ao tentar correlacionar fenótipo de resistência e expressão diferencial de genes análogos de resistência, mas este estudo ainda deve ser repetido com o intuito de confirmar os resultados aqui obtidos. Outras técnicas como qRT-PCR e *Northern Blot* devem ser utilizadas, sendo que a qRT-PCR têm uma maior sensibilidade na expressão diferencial e possibilita a quantificação dos transcritos e, no caso da técnica de *Northern Blot* poderemos hibridar uma sonda com os RGAs para ter certeza de que realmente os transcritos são do gene alvo.

O sequenciamento do genoma do acesso duplo haploide *Musa acuminata* ‘Pahang’ (DH Pahang) está em andamento (Wincker e D’Hont, 2011) e o mapeamento de RGAs nos *scaffolds* do genoma facilitará a descoberta de genes completos de resistência. Uma vez tendo em mãos as sequências completas dos genes, novas tecnologias poderão ser utilizadas para comprovar a funcionalidade desses genes. A técnica de RNA de interferência (RNAi) (Waterhouse e Helliwell, 2003) é uma tecnologia que pode ser usada para esta finalidade pelo silenciamento destes genes no genótipo resistente. As plantas resistentes a doenças quando transformadas com um *construct* do gene candidato-RNAi tornam-se suscetíveis. A técnica de RNAi tem sido recentemente utilizada com sucesso para determinar a função dos genes envolvidos na resistência a doença (Douchkov *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2006). Outra estratégia promissora para facilitar a identificação de múltiplos genes de resistência em banana é o uso de bibliotecas BIBAC (Binary Bacterial Artificial Chromosome). Um vetor BIBAC pode ser usado para transferir fragmentos grandes de DNA (acima de 120 kb) para dentro do genoma da planta via *Agrobacterium tumefaciens* (He *et al.*, 2003). Uma biblioteca BIBAC está agora disponível para a cultivar ‘Tuu Gia’ (*M. acuminata*) que é resistente às mais sérias doenças da banana (Ortiz-Vázquez *et al.*, 2005). Esta biblioteca pode ser utilizada para seleção, usando sondas de

genes candidatos para identificar e recuperar clones BIBAC que abrigam os genes candidatos isolados ou em *clusters*. Estes, então, poderão ser usados para a transformação de cultivares suscetíveis de banana via *Agrobacterium* com alta eficiência (Khanna *et al.*, 2004).

A construção de marcadores moleculares do tipo RGA tem auxiliado o melhoramento genético para resistência por possibilitar uma seleção assistida por estes marcadores. Portanto, o desenvolvimento de marcadores a partir desses genes é uma ferramenta promissora para a identificação de *loci* associados à resistência, uma vez que já foi estabelecido que uma grande parte de RGAs de várias espécies de plantas estão ligada ou faz parte dos genes de resistência (Collins *et al.*, 2001). Leal-Bertioli e colaboradores (2004) desenvolveram marcadores RGA que foram incluídos em um mapa genético de *Arachis*, o qual poderá ser útil para os programas de melhoramento do amendoim cultivado.

Com o advento de tecnologias de sequenciamento massal, clones BAC contendo genes análogos de resistência podem ser sequenciados, possibilitando o desenvolvimento e mapeamento de marcadores moleculares (Souza Júnior *et al.*, 2005). A presença potencial de marcadores do tipo SSR (*Simple Sequence Repeats*) próximos a genes análogos de resistência, poderia fazer deles marcadores moleculares úteis em programas de melhoramento, já que estes marcadores podem ser utilizados para a seleção assistida de acessos resistentes a doenças. Marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) em RGAs também podem ser utilizados para o mesmo fim, já que dados de sequenciamento massal do transcriptoma podem revelar informações de expressão de RGAs e a abundância de SNPs.

5. CONCLUSÕES

Concluimos que a metodologia utilizada no presente estudo foi eficiente para analisar a expressão diferencial de RGAs em plantas resistente e suscetível de *M. acuminata* ao nematoide cavernícola. Diferenças de expressão foram visualizadas entre os acessos e os tempos de avaliação. Os genes Franc_MbPKW_RGA08E e RGC2 se destacaram como genes candidatos à resistência a *R. similis*, ainda que o estudo deva ser repetido. Após a obtenção das sequências completas a função destes genes deve ser confirmada através de técnicas recentes de biologia molecular e marcadores moleculares devem ser desenvolvidos para auxiliar o melhoramento genético por seleção assistida.

6. LITERATURA CITADA

ALTSCHUL, S.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. e LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucl. Acid Res. 25:3389-3402. 1997. Versão ON-LINE: (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)

ARAYA, M; CENTENO, M. e CARILLO, W. Densidades poblacionales y frecuencia de los nematodos parasitos del banano (*Musa AAA*) em nueve cantones de Costa Rica. Corbana 20: 6-11. 1995.

AYELE-GEDIL, M.; SLABAUGH, M.B.; BERRY, S.; JOHNSON, R.; MICHELMORE, R.; MILLER, J.; GULYA, T. e KNAPP, S. (2001) Candidate disease resistance genes in sunflower cloned using conserved nucleotide-binding site motifs: genetic mapping and linkage to the downy mildew resistance gene P11. Genome 44:205–212. 2001.

AZHAR, M. e HESLOP-HARRISON, J.S. Genomes, diversity and resistance gene analogues in *Musa* species. Cytogenetic Genome Resistance 121: 59-66. 2008.

BAURENS, F.C.; BOCS, S.; ROUARD, M.; MATSUMOTO, T.; MILLER, R.; RODIER-GOUD, M.; MBEGUIE-A-MBEGUIE, D. e YAHIAOUI, N. Mechanisms of haplotype divergence at the RGA08 nucleotide-binding leucine-rich repeat gene locus in wild banana (*Musa balbisiana*). BMC Plant Biology 10: 149. 2010.

BORGES, A.L. Recomendação de adubação para a bananeira. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. (Embrapa CNPMF, Comunicado Técnico, 106). 4 p. 2004.

CAI, D.; KLEINE, M.; KIFLE, S.; HARLOFF, H.-J.; SANDAL, N.N.; MARKER, K.A.; KLEIN-LANKHORST, R.M.; SALENTIJN, E.M.J; LANGE, W., STIEKEMA, W.J.; WYSS, U.; GRUNDLER, F.M.W. e JUNG, C. positional cloning of gene for nematode resistance in sugar beet. Science 275: 832-834. 1997.

CALENGE, F.; VAN DER LINDEN, C.G.; VAN DE WEG, E.; SCHOUTEN, H.J.; VAN ARKEL, G.; DENANCE, C. e DUREL, C.E. Resistance gene analogues identified through

the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. *Theor. Appl. Genet.* 110:660–668. 2005.

CHANG, S.; PRYER, J. e CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 113-117. 1993.

COLLINGBORNE, F.M.B. e GOWEN, S.R. Screening of banana cultivars for resistance to *Radopholus similis* and *Pratylenchus coffeae*. INTERNATIONAL NETWORK FOR IMPROVEMENT IN BANANAS AND PLANTAINS. Montpellier: Infomusa 6: 3. 1997.

COLLINS, N.; PARK, R.; SPIELMEYER, W.; ELLIS, J. e PRYOR, A. J. Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance. *Gene* 44: .375-381, 2001.

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

COSTA, D. da C.; SILVA, S. de O. e ALVES, F. R. Reação de genótipos de bananeira (*Musa* sp.) a *Radopholus similis* e *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Brasileira* 22: 49 - 56. 1998.

DANGL, J.L. e MCDOWELL, J.M. Two modes of pathogen recognition by plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 8575–8576. 2006.

DAVIS, E.L.; HUSSEY, R.S.; BAUM, T.J.; BAKER, J.; SCHOTS, A.; ROSSO, M. e ABAD, P. Nematode parasitism genes. *Annual Review Phytopathology* 38: 365-396. 2000.

DIZON, T.O.; PINILI, M.R.; CRUZ JR, F.S; DAMASCO, O.P.; VAN DEN BERGH, I. e DE WAELE, D. Response of Philippine banana (*Musa* spp.) cultivars to *Radopholus similis* (Thorne) and *Meloidogyne incognita* Chitwood under greenhouse conditions. *Philippine Journal of Crop Science* 35: 36-51. 2010.

DONG, W.; NOWARA, D. e SCHWEIZER, P. Protein polyubiquitination plays a role in basal host resistance of barley. *Plant Cell* 18: 3321–3333. 2006.

DOUCHKOV, D.; NOWARA, D.; ZIEROLD, U. e SCHWEIZER, P. A high-throughput gene-silencing system for the functional assessment of defense-related genes in barley epidermal cells. *Mol Plant Microbe Interact.* 18: 755–76. 2005.

- ELLIS, J. e JONES, D. Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogen resistance in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 1: 288–293. 1998.
- ELSEN, A.; STOFFELEN, R.; TUYET, N.T.; BAIMEY, H.; BOULOIS, H.D. e DE WAELE, D. In vitro screening for resistance to *Radopholus similis* in *Musa* spp. *Plant Science* 163: 407–416. 2002.
- ERNST, K.; KUMAR A.; KRISELEIT, D.; KLOOS, D.U. e PHILLIPS M.S. The broad-spectrum potato cyst nematode resistance gene (Hero) from tomato is the only member of a large gene family of NBS-LRR genes with an unusual amino acid repeat in the LRR region. *The Plant Journal* 31: 127–136. 2002.
- FALLAS, G. e MARBÁN-MENDOZA. Respuesta de tres cultivares y un híbrido de *Musa* a *Radopholus similis* en Costa Rica. *Nematropica* 24: 161-164. 1994.
- FAO. Agricultural Data – FAOSTAT, 2008. Visualizado em Dezembro de 2006. Online. Disponível na Internet. <http://www.fao.org>
- FLOR, H.H. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* 9: 275-296. 1971.
- FLUHR R. Sentinels of disease: plant resistance genes. *Plant Physiology* 127: 1367–1374. 2001.
- FOGAIN, R. e GOWEN, S.R. Damage to roots of *Musa* cultivars by *Radopholus similis* with and without protection of nematicides. *Nematropica* 27: 27-32. 1997.
- GAO, Y.; XU, Z.; JIAO, F.; YU, H.; XIAO, B.; LI, Y. e LU, X. Cloning, structural features, and expression analysis of resistance gene analogs in Tobacco. *Mol. Biol. Rep.* 37: 345-354. 2010.
- GOWEN, S.; QUÉNÉHERVÉ, P. e FOGAIN, R. Nematode parasites of banana, plantains and abaca. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Eds.). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. CAB International, Wallingford, UK. pp. 611-644. 2005.
- GOWEN, S. R. Some considerations of problems associated with the nematode pests of bananas. *Nematropica* 9: 79-91. 1979.

GRAHAM, M.; MARECK, L.; LOHNES, D.; CREGAN, P. e SHOEMAKER, R. Expression and genome organization of resistance gene analogues in soybean. *Genome* 43:86–93. 2000.

GRANT, M.; GODARD, L.; STRAUBE, E.; ASHFIELD, T.; LEWARD, J.; SATTLER, A.; INNES, R. e DANGL, J. Structure of the *Arabidopsis* RPM1 enabling dual specificity disease resistance. *Science* 269: 843–846. 1995.

HAUGE, B.M.; WANG, M.L.; PARSONS, J.D. e PARNELL, L.D. Nucleic acid molecules and other molecules associated with soybean cyst nematode resistance. WO 01/51627 PCT/US01/00552 Patent # 20030005491. 2001.

HE, R.F.; WANG, Y.; SHI, Z.; REN, X.; ZHU, L.; WENG, Q. e HE, G.C. Construction of a genomic library of wild rice and *Agrobacterium*-mediated transformation of large insert DNA linked to BPH resistance locus. *Gene* 321: 113–121. 2003.

HUANG, X. e MADAN, A. “CAP3: A DNA Sequence Assembly Program”. *Genome Research*, 9(9): 868-877. 1999.

HUSSEY, R.S.; DAVIS, E.L. e BAUM, T.J. Secrets in secretions: genes that control nematode parasitism of plants. *Brazilian Journal Plant Physiology* 14: 183-194. 2002.

IBGE. Produção Agrícola Municipal. Rio de Janeiro. Disponível: site. IBGE. <http://www.ibge.gov.br>. Consultado em Janeiro de 2011. 2009.

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

KHANNA, H.; BECKER, D.; KLEIDON, J. e DALE, J. Centrifugation assisted *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (CAAT) of embryogenic cell suspensions of banana (*Musa* spp. Cavendish AAA and Lady finger AAB). *Mol. Breed.* 14: 239-252. 2004.

LEAL-BERTIOLI, S.C.M., GUIMARÃES, P.M.; JOSÉ, A.C.V.F., PARNISKE, M. e BERTIOLI, D.J. RGA-Display: Uma nova estratégia de utilização de RGAs como marcadores moleculares. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, 1676-1340; 60. 22 p. 2004.

- LEISTER, D.; BALLVORA, A.; SALAMINI, F. e GEBHARDT, C. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potencial for wide application in plants. *Nature Genetics* 14:421-429. 1996.
- LEISTER, D. KURTH, J.; YANO, M.; SASAKI, T.; DEVOS, K.; GRANER, A. e SCHULZE-LEFERT, P. Rapid reorganization of resistance gene homologues is cereal genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 370-375. 1998.
- LÓPEZ, C.; ACOSTA, I.; JARA, C.; PEDRAZA, F.; GAITAN-SOLIS, E.; GALLEGU, G.; BEEBE, S. e TOHME, J. Identifying resistance geneanalogs associated with resistance to different pathogens in common bean. *Phytopathology* 93:88–95. 2003.
- MALVAS, C.C. Clonagem e caracterização genética de locos homólogos a genes de resistência em *Brassica oleracea* L. e *Zea mays* L. Tese (Doutorado em Fitopatologia) _ Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 79p. 2003.
- MACKEY, D.; HOLT, B.; WIIG, A.; DANGL. J. RIN4 Interacts with *Pseudomonas syringae* Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated Resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108: 743-754. 2002.
- MARTIN, G.B.; BOGDANOVE, A.J. e SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review Plant Biology*.54: 23-61. 2003.
- MARTÍNEZ-ZAMORA, M.G.; CASTAGNARO, A.P. e DÍAZ-RICCI, J.C. Isolation and diversity analysis of resistance gene analogues (RGAs) from cultivated and wild strawberries. *Mol Genet Genomics* 272: 480–487. 2004.
- MEKSEM, K.; PANTAZOPOULOS, P.; NJIT, V.N.; HYTEN, L.D.; RAO-ARELLI, A.P. e LIGHTFOOT, D.A. ‘Forrest’ resistance to the soybean cyst nematode is bigenic: saturation mapping of the Rhg1 and Rhg4 loci. *Theoretical Applied Genetics* 103: 710-717. 2001.
- MES, J.; VAN DOORN, A.; WIJBRANDI, J.; SIMONS, G.; CORNELISSEN, B. e HARING, M. Expression of the *Fusarium* resistance gene I-2 colocalizes with the site of fungal containment. *Plant Journal* 23: 183–193. 2000.

MEYERS, B.C.; KAUSHIK, S. e NANDETY R.S. Evolving disease resistance genes. *Current Opinion Plant Biology* 8: 129-134. 2005.

MEYERS, B.; DICKERMAN, A.; MICHELMORE, R.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; SOBRAL, B. e YOUNG, N. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant Journal* 20: 317–332. 1999.

MILLER, R.N.G.; BERTIOLI, D.J.; BAURENS, F.C.; SANTOS, C.M.R.; ALVES, P.C.; MARTINS, N.F.; TOGAWA, R.C.; SOUZA JÚNIOR, M.T e PAPPAS JÚNIOR, G.J. Analysis of non-TIR NBS-LRR resistance gene analogs in *Musa acuminata* Colla: Isolation, RFLP marker development, and physical mapping. *BMC Plant Biology* 8: 1-15. 2008.

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

MOENS, T.; ARAYA, M.; SWENNEN, R. e DE WAELE, D. Enhanced biodegradation of nematicides after repetitive applications and its effect on root and yield parameters in commercial banana plantations. *Biology and Fertility of Soils* 39: 407-414. 2004.

NCBI, 2010a. Endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>. Acesso em 10.07.2010.

NCBI, 2010b. Endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em 10.07.2010.

ORSI, C.H. Identificação e análise da expressão de sequencias de genes tipo RGA em espécies de *Coffea* resistentes e suscetíveis ao nematoide *Meloidogyne exigua*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, - São Paulo. 100 p. 2003.

ORTIZ, R.; MADSEN, S. e VUYLSTEKE, D. Classification of African plantain landraces and banana cultivars using a phenotypic distance index of quantitative descriptors. *Theo. Appl. Genet.* 96: 904-911. 1998.

PARKER, J.E.; COLEMAN, M.J.; SZABÒ, V.; FROST, L.N.; SCHMIDT, R.; VAN DER BIEZEN, E.A.; MOORES, T.; DEAN, C.; DANIELS, M.J. e JONES, J.D.G. The

Arabidopsis downy mildew resistance gene RPP5 shares similarity to the Toll and interleukin-1 receptors with N and L6. *Plant Cell* 9: 879–894.1997.

PEI, X.; LI, S.; JIANG, Y.; ZHANG, Y.; WANG, Z. e JIA, S. Isolation, characterization and phylogenetic analysis of the resistance gene analogues (RGAs) in banana (*Musa* spp.). *Plant Science* 172:1166-1174. 2007.

PERAZA-ECHEVERRIA, S.; DALE, J.L.; HARDING, R.M. e COLLET, C. Molecular cloning and in silico analysis of potencial *Fusarium* resistance genes in banana. *Mol. Breeding* 23: 423-443. 2009.

PERAZA-ECHEVERRIA S.; DALE J.L.; HARDING R.M.; SMITH M.K. e COLLET, C. Characterization of disease resistance gene candidates of the nucleotide binding site (NBS) type from banana and correlation of a transcriptional polymorphism with resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4. *Mol. Breeding* 22(4): 565-579. 2008.

PERAZA-ECHEVERRIA, S.; JAMES-KAY, A.; CANTO-CANCHÉ, B. e CASTILLO-CASTRO, E. Structural and phylogenetic analysis of Pto-type disease resistance gene candidates in banana. *Molecular Genetics e Genomics*.278: 443-453. 2007.

PINOCHET, J., ROWE, P.R. Reaction of two banana cultivars to three different nematodes. *Plant Disease Reporter* 62(8): 727-729, 1978.

PINOCHET, J. e VENTURA, O. Plant parasitic nematodes associated with bananas in Belize. *Trop. Agric.* 54: 349 -352. 1977.

PROITE, K. Busca de genes envolvidos na resistência de amendoim silvestre ao nematoide das galhas (*Meloidogyne arenaria*). Tese de Doutorado – Universidade de Brasília. 213 p. 2007.

QUÉNÉHERVÉ, P.; VALETTE, C.; TOPART, P.; TEZENAS DU MONTCEL, H. e SALMON, F. Nematode resistance in bananas: screening results on some wild and cultivated accessions of *Musa* spp. *Euphytica* 165: 123-136. 2009.

QUIRINO, B.F. e BENT, A.F. Deciphering host resistance and pathogen virulence: the Arabidopsis/Pseudomonas interaction as a model. *Molecular Plant Pathology*. 4: 517–530. 2003.

RICE, P.; LONGDEN, I. e BLEASBY, A. EMBOSS: the European molecular biology open software suite. Trends Genet 16(6): 276–277. 2000. Versão on-line: (<http://bips.u-strasbg.fr/EMBOSS/>)

ROMMENS, C.M. e KISHMORE, G.M. Exploiting the full potential of disease-resistance genes for agricultural use. Current Opinion in Biotechnology 11: 120-125. 2000.

ROSSI, M.; ARAUJO, P.G.; PAULET, F.; GARSMEUR, O.; DIAS, V.M.; CHEN, H.; VAN SLUYS, M.-A. e D'HONT, A.D.. Genomic distribution and characterization of EST-derived resistance gene analogs (RGAs) in sugarcane. Molecular Genetics and Genomics 269: 406-419. 2003.

ROZEN, S. e SKALETSKY, H.J. “Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers”. Methods in Molecular Biology 132: 365-386. 2000. on-line: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

SALMERON, J.M.; OLDROYD, G.E.D.; ROMMENS, C.M.T.; SCOFIELD, S.R.; KIM, H.-S.; LAVELLE, D.T.; DAHLBECK, D. e STASKAWICZ, B.J. Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the Pto kinase gene cluster. Cell 86: 123-133. 1996.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, A.; PORTAL, O.; ROJAS, L.E.; OCAÑA, B.; MENDOZA, M.; ACOSTA, M.; JIMÉNEZ, E. e HÖFTE, M. An efficient method for the extraction of high-quality fungal total RNA to study the *Mycosphaerella fijiensis*-*Musa* spp. interaction. Mol. Biotechnol. 40: 299-305. 2008. DOI 10.1007/s12033-008-9092-1.

SANTOS, J.R.P. Caracterização de genótipos de *Musa* com base na reação a *Radopholus similis* e de genótipos contrastantes para a resistência com base em marcadores moleculares RAPD. 72p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília. 2007.

SANTOS, R.C; DUARTE, E.A.A.; MELO FILHO, P.A.; LIMA, L.M.; SILVA, C.R.C.; PINHEIRO, M.P.N. e BATISTA, V.G.L. Extração rápida e fácil de RNA a partir de diferentes tecidos de algodoeiro. Embrapa – Brasil. Comunicado Técnico 365: 1-4. 2009.

- SARAH, J. L.; BLAVIGNAC, F.; SABATINI, C. e BOISSEAU, M. Differences in pathogenicity on bananas among populations of *Radopholus similis*. *Nematropica* 22: 135. 1992.
- SEAH, S.; SPIELMEYER, W.; JAHIER, J.; SIVASITHAMPARAM, K. e LAGUDAH, E.S. Resistance gene analogs within an introgressed chromosomal segment derived from *Triticum ventricosum* that confers resistance to nematode and rust pathogens in wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(3): 334-341. 2000.
- SHEN, K.; MEYERS, B.; ISLAM-FARIDI, M.; CHIN, D.; STELLY, D. e MICHELMORE, R. Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. *Mol Plant Microbe Interact.* 11: 815–823. 1998.
- SILVA, S.O.; FLORES, J.C.O. e LIMA NETO, F.P. Avaliação de cultivares e híbridos de bananeira em quatro ciclos de produção. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37: 567-1574. 2002.
- SILVA, S.O.; SOUZA JUNIOR, M.T.; ALVES, E.J.; SILVEIRA, J.R.S. e LIMA, M. Banana breeding program at Embrapa. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 1: 399-436. 2001.
- SOUZA JÚNIOR, M.T.; SANTOS, C.M.R; MARTINS, N. F.; SILVA, F.R.; TOGAWA, R.C.; CASSIANO, L.P.; ALMEIDA, E.R.P; COELHO, M.C.F.; CAETANO, A.R; CIAMPI, A.Y.; MOTA, M., PIFFANELLI, P. e MILLER, R.N.G. DATAMUSA, Banco de dados de genômica de *Musa* spp. *Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia / Boletim de pesquisa e desenvolvimento* 107, 24 p. 2005.
- SPEIJER, P.R. e FOGAIN, R. *Musa* and *Ensete* nematode pest status in Africa. In: KARAMURA, E.B. e GOLD, C.S. (eds.). *Banana IPM. Proceedings of the workshop*, Nelspruit, South Africa, 23–26 November, 1998. INIBAP, Montpellier, France pp 99–118. 1999.
- STOVER, R.H. Fungi associated with nematode and non-nematode lesions on banana roots. *Canadian Journal of Botany* 44: 1703–1710. 1966.
- THURAU, T.; KIFLE, S.; JUNG, C. e CAI, D. The promoter of the nematode resistance gene *HSI^{pro1}* activates a nematode-responsive and feeding site-specific gene expression in

sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 52: 643-660. 2003.

VAN DER BIEZEN, E. A. e JONES, J.G.D. The NBARC domains: A novel signaling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Current Biology* 8:226-228. 1998.

VANHOLME, B.; DE MEUTTER, J.; TYTGAT, T.; VAN MONTAGU, M.; COOMANS, A. e GHEYSEN, G. Secretions of plant-parasitic nematodes: a molecular update. *Gene*. 332:13-27. 2004.

VOS, P.; SIMONS, G.; JESSE, T.; WIJBRANDI, J.; HEINEN, L.; HOGERS, R.; FRIJTERS, A.; GROENENDIJK, J.; LIHARSKA, T.; HONTELEZ, J. e ZABEAI, M. The tomato Mi-1 gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nature Biotechnology* 16: 1315-1336. 1998.

WARBURG, O. e CHRISTIAN, W. Isolation and crystallization of enolase. *Biochem. Z.* 310: 384-421. 1942.

WATERHOUSE, P. e HELLIWELL, C. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Genetics* 4: 29–38. 2003.

WEHUNT, E.; HUTCHINSON, D. e EDWARDS, D. I. Reaction of banana cultivars to the burrowing nematode (*R. similis*). *Journal of Nematology* 10: 368-370. 1978.

ZEM, A. C. e ALVES, E. J. Observações sobre perdas provocadas por nematoides em bananeira (*Musa acuminata*) cultivar Nanicão. Bahia, Cruz das Almas, Brasil, EMBRAPA/CNPMPF, Boletim de pesquisa N° 6. 10 p. 1981.