

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE  
E BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**DISSERTAÇÃO**

**Levantamento de Nematóides Associados à Cultura do Caupi no  
Estado do Rio de Janeiro e Avaliação de Linhagens de Caupi à  
Infecção por *Meloidogyne incognita* raça 1, *M. javanica* e  
*Rotylenchulus reniformis*.**

Rhadyson Reinaldo Silva do Nascimento

2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E  
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**LEVANTAMENTO DE NEMATÓIDES ASSOCIADOS À CULTURA DO  
CAUPI NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO E AVALIAÇÃO DE  
LINHAGENS DE CAUPI À INFECCÃO POR *MELOIDOGYNE  
INCOGNITA* RAÇA 1, *M. JAVANICA* E *ROTYLENCHULUS  
RENIFORMIS*.**

**Rhadyson Reinaldo Silva do Nascimento**

Sob a Orientação do Professor  
**João Pedro Pimentel**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência**, no Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em Fitopatologia Aplicada.

Seropédica, RJ  
Setembro de 2008

633.33

N2441

T

Nascimento, Rhadyson Reinaldo Silva do,  
1979-

Levantamento de Nematóides associados à cultura do Caupi no Estado do Rio de Janeiro e avaliação de linhagens de Caupi à infecção por *Meloidogyne incógnita* raça 1,M. javanica e *Rotylenchulus reniformis* / Rhadyson Reinaldo Silva do Nascimento - 2008.

42f. : il.

Orientador: João Pedro Pimentel.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada.

Bibliografia: f. 4-5, 22-25 e 39-41.

1. Feijão de corda - Cultivo - Teses. 2. Nematoda em plantas - Teses. 3. Nematoda - Identificação - Teses. I. Pimentel, João Pedro. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA  
APLICADA**

**RHADYSON REINALDO SILVA DO NASCIMENTO**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, área de concentração em Fitopatologia Aplicada.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 03/09/2008.

---

**João Pedro Pimentel Dr. UFRRJ  
Orientador**

---

**Ricardo Luis Louro Berbara Ph. D. UFRRJ**

---

**Luís Antônio Siqueira de Azevedo Dr. UFRRJ**

---

**Daniel Vazquez Figueiredo Dr. ISTP**

Aos meus pais e familiares que tanto se sacrificaram para que eu pudesse chegar onde estou, e aos amigos, que não me deixaram fraquejar diante das dificuldades desta longa jornada e sempre mantiveram a confiança no meu trabalho.

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

Nesta longa caminhada, tive o privilégio de receber a ajuda de muitas pessoas, algumas com rosto bem familiar, outras recém apresentadas, mais nem por isto, deixaram de ser gentis, ou atenciosas.

O apoio dos amigos, colegas de curso foi fundamental para superar os longos períodos de trabalhos laboratoriais.

Sem o apoio da família esta jornada seria muito mais difícil.

Portanto, só posso agradecer muito, a Deus, a minha família, aos amigos e amigas, professores, funcionários, e a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigado!

## RESUMO

NASCIMENTO, Rhadyson Reinaldo Silva do. **Levantamento de Nematóides Associados à Cultura do Caupi no Estado do Rio de Janeiro e Avaliação de Linhagens de Caupi à Infecção por *Meloidogyne incognita* raça 1, *M. javanica* e *Rotylenchulus reniformis*.** 2008, 42p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Biologia, Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

O caupi (*Vigna unguiculata* Walp.) é uma cultura de grande importância para o país, principalmente na região Norte e Nordeste e vem ganhando espaço na região Sudeste. Nesta cultura, os nematóides possuem influência significativa, chegando ao ponto de limitar a sua produção. As informações sobre estes patógenos no Estado do Rio de Janeiro são escassas. Assim, numa primeira etapa, este trabalho teve por objetivo fazer um levantamento de nematóides fitoparasitas associados a cultura do caupi no Estado do Rio de Janeiro, por meio de coletas realizadas em alguns municípios produtores de caupi cultura. Foram encontrados, um total de oito gêneros de nematóides fitoparasitas, além de outros de vida livre não identificados. Em nível de espécie foram identificadas *Meloidogyne incognita* raça 2 e *Rotylenchulus reniformis*. As identificações foram efetuadas a partir de características morfológicas e auxílio de chaves descritivas. *M. incognita* foi identificada pelas características dos juvenis (J<sub>2</sub>) e de machos, configuração do modelo perineal das fêmeas e perfil de esterases. Foram realizados ensaios com o objetivo de detecção de atividade de esterase, para uma população do nematóide *R. reniformis*. Para tanto foram testados protocolos rotineiramente usados em análises isoenzimáticas, que apresentaram resultados negativos. Entretanto, ensaios montados em microtubos para PCR, evidenciaram atividade esterásica para *R. reniformis*. Finalmente, modificações nos protocolos usuais como mudanças na concentração da solução tampão de revelação, assim como a fixação do pH da mesma próximo a neutralidade, permitiram estabelecer um padrão com três bandas distintas de esterases na população de *R. reniformis* estudada. Em uma segunda etapa deste trabalho, seis linhagens de caupi em fase avançada de melhoramento para resistência a viroses, foram testadas visando determinar a reação das mesmas quando inoculadas com *M. incognita* raça 1, ou *M. javanica*, ou *R. reniformis*. A cultivar de tomate “TRural” foi usada como testemunha suscetível nos testes com as duas espécies de nematóide das galhas radiculares. Os experimentos foram realizados em casa de vegetação e usou-se uma carga de inóculo de 5000 ovos + juvenis/repetição; para as espécies de *Meloidogyne* a avaliação ocorreu 50 dias após inoculação e os parâmetros usados foram: índice de galhas (IG), índice de massa de ovos (IMO) e fator de reprodução (Fr) calculado pela relação Pf/Pi (Pf = população final e Pi = população inicial). Das cinco linhagens testadas, RJ 04-04, RJ 04-08, RJ 04-26, RJ 04-48 e RJ 04-65 comportaram-se como altamente resistentes e a linhagem RJ 04-29 como moderadamente resistente para *M. incognita* raça1. Enquanto que, para *M. javanica*, todas as linhagem foram altamente suscetíveis. Para avaliação de *R. reniformis* foi usado como inóculo uma população “pura” multiplicada em casa de vegetação. Inoculou-se 5000 ovos e/ ou juvenis de machos e de fêmeas imaturas. Como parâmetro para avaliação da resistência das linhagens de caupi ao nematóide, foi usado o fator de reprodução (Fr) avaliado aos 45 dias após inoculação. Verificou-se que todas as linhagens testadas foram consideradas suscetíveis; a cultivar “Costelão” incluída como testemunha mostrou igual comportamento.

**Palavras-Chave:** *Vigna unguiculata*, nematóides fitoparasitas, identificação, meloidoginose, resistência, nematóide reniforme.

## ABSTRACT

NASCIMENTO, Rhadyson Reinaldo Silva do. **Survey of Nematodes Associated with Cowpea Crop in the State of Rio de Janeiro and Evaluation of Cowpea Lines to Infection by *Meloidogyne incognita* raça 1, *M. javanica* and *R. reniformis*. 2008, 42p.** Dissertation (Master of Science in Fitossanidade and Biotecnologia Aplicada). Institute of Biology, Department of Entomology and Plant Pathology Universidad Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) is a very important crop in Brazil, mainly in the north and northeast regions of the country, and is gaining importance in the southeast region. In this crop, nematodes are a great threat, because they can cause yield decrease. Information about these pathogens is very few. In a first approach this work aimed at surveying for the occurrence of plant parasitic nematodes that are associated to cowpea in the State of Rio de Janeiro, through sampling achieved in some locations of Nova Iguaçu, Magé, Seropédica, São Francisco de Itabapoana, and Itaguaí, where cowpea is grown cultivated. Eight genera of plant parasitic nematodes we found, besides others, that are free living that were not identified. At the level of species *M. incognita* and *Rotylenchulus reniformis* were identified. Nematode identification was done on the bases of morphometric characteristics descriptive keys *M. incognita* by juvenile ( $J_2$ ) and males characteristics and perineal female patterns and esterases profile. In this step, surveys were carried out aiming at the detection of esterases activity for a population of *R. reniformis*. Protocols routinely used in isoenzymes analysis were tested and showed negative results. On the other hand, assays using PCR tubes with the objective to identify esterase activity demonstrated that it was positive for *R. reniformis*. Modifications in the common protocols, such as changes in buffer solution at the and steps of the procedures, as well as adjusting pH near to neutrality enabled the establishment of a three band pattern of esterase in the studied populations of *R. reniformis*. In another phase of this work, six cowpea lines in advanced phase of improvement from determining their behavior when inoculated with *M. incognita* race 1, *M. javanica* and *R. reniformis*. The tomato cv. "TRural" was used as susceptible pattern. The experiments were carried out under greenhouse condition, using 5,000 eggs + juveniles per experimental plots, as inoculum level; for *Meloidogyne* species evaluation was done 50 days after nematodes inoculations based in the following parameters: galls indices (IG), egg mass indices (IMO) and reproductions rate (FR), calculated by the relation  $Pf/Pi$  ( $Pf$  = final populations and  $Pi$  = start population). Among the tested lines, five of them RJ 04-04, RJ 04-08, RJ 04-26, RJ 04-48 and RJ 04-65 showed to be highly resistant and line RJ 04-29 was moderately resistant to *M. incognita* race 1. In the case of *M. javanica* all lines were highly susceptible. For evaluation of *R. reniformis* it was used as inoculum and "pure" population multiplied vegetation home. It was inoculated 5000 eggs and juvenile of males and of immature females. As parameter for evaluation of the resistance of the cowpea lineages to the nematode, the reproduction factor was used ( $Fr$ ) appraised to the 45 days after inoculation. It was verified that all of the tested lineages were considered susceptible; to cultivate "Costelão" included as witness showed equal behavior.

**Key words:** *Vigna unguiculata*, plant parasite nematodes, identification, root-Knot, resistance, reniform nematode.



## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO I

- Figura 1.** Dano causado por *Meloidogyne* sp. em raízes de caupi. A- sintoma de galha; B- raízes necrosadas.....10
- Figura 2.** Mapa do Estado do Rio de Janeiro destacando, em vermelho, os município onde foram realizadas coletas para amostragens de solo e raízes de caupi. Da esquerda para a direita tem-se Itaguaí, Seropédica, Nova Iguaçu, Magé e São Francisco de Itabapoan.....11
- Figura 3.** Raízes de caupi parasitadas por *R. reniformis* coradas pela metodologia de Byrd, (1983). A – Fêmeas em vários estádios de desenvolvimento; B – Fêmeas adultas no início da fase reprodutiva.....17
- Figura 4.** Eletroforese para esterase de *R. reniformis* usando o protocolo padrão. Mj perfil esterásico para o controle positivo *M. javanica*, R1- uma fêmea adulta usada de *R. reniformis* , R2 – duas fêmeas adultas usada de *R. reniformis*, R4 –quatro fêmeas adulta usadas de *R. reniformis* e R6 – seis fêmeas adustas usadas de *R. reniformis*.....18
- Figura 5.** Detecção de atividade de esterase em microtubos para PCR, Mj - *M. javanica*, Cn - controle negativo e Rr - *R. reniformis*.....18
- Figura 6.** Apresenta as bandas, que formam o perfil de esterase para *R. reniformis* (Rr), indicadas por setas, assim como, as bandas típicas do controle positivo *M. javanica* (Mj)....20
- Figura 7.** Apresenta o esquemas das bandas de esterase para *R. reniformis* e *M. javanica*....20

### CAPITULO II

- Figura 1.** Planta de caupi infestada pelo vírus do mosaico severo (CPSMV).....32
- Figura 2.** Experimento montado para reação de linhagens de caupi à *R. reniformis*.....32
- Figura 3.** Raízes infectadas por *M. javanica* exibindo massa de ovos coradas com floxina B. A, B e C observa-se massas de ovos bem desenvolvidas com galhas ausentes ou reduzidas. Em D tem-se o sintoma de proliferação de raízes nas galhas.....36

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO I

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Nematóides associados ao caupi encontrados no Estado do Rio de Janeiro..... | 16 |
|--|----|

### CAPITULO II

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Escala de Taylor e Sasser (1978) para classificação da resistência a nematóides... | 33 |
| <b>Tabela 2.</b> Reação de linhagens de caupi à <i>Meloidogyne incognita</i> raça 1.....            | 35 |
| <b>Tabela 3.</b> Reação de linhagens de caupi à <i>Meloidogyne javanica</i> .....                   | 36 |
| <b>Tabela 4.</b> Reação de linhagens de caupi à <i>R. reniformis</i> .....                          | 37 |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO.....  | 1         |
| REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....  | 4         |
| <b>CAPÍTULO I - LEVANTAMENTO DE NEMATÓIDES ASSOCIADOS À CULTURA DO CAUPI NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO E CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO DE ESTERASE PARA <i>Rotylenchulus reniformis</i>. Linford &amp; Oliveira (1940).</b> ..... | 6         |
| RESUMO.....  | 7         |
| ABSTRACT.....  | 8         |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>11</b> |
| <b>2.1</b> Levantamento de nematóides fitoparasitas associados à cultura do caupi no Estado do Rio de Janeiro.....   | 11        |
| <b>2.2</b> Caracterização do fenótipo de esterase para <i>R. reniformis</i> .....  | 12        |
| <b>2.2.1</b> Ensaio I. Perfil de esterase usando protocolo padrão.....   | 12        |
| <b>2.2.2</b> Ensaio II. Detecção de atividade da enzima esterase para <i>R. reniformis</i> em microtubos para PCR .....  | 13        |
| <b>2.2.3</b> Ensaio III. Perfil eletroforético de esterases para <i>R. reniformis</i> usando protocolo padrão com modificações.....  | 14        |
| <b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..</b> .....   | <b>15</b> |
| <b>3.1</b> Levantamento de nematóides associados a cultura do caupi no Estado do Rio de Janeiro.....   | 15        |
| <b>3.2</b> Caracterização do fenótipo de esterase para <i>R. reniformis</i> .....  | 17        |
| <b>4. CONCLUSÕES.....</b>  | <b>21</b> |
| <b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>22</b> |

|   |    |
|---|----|
| <b>CAPITULO II AVALIAÇÃO DE LINHAGENS DE CAUPI À INFECCÃO DE</b><br><i>Meloidogyne incognita</i> raça 1, <i>M. javanica</i> e <i>Rotylenchulus reniformis</i> ..... | 26 |
| <b>RESUMO</b> .....   | 27 |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | 28 |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 29 |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 31 |
| 2.1 Reação de linhagens de caupi à infecção por <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>M. javanica</i> .....   | 31 |
| 2.1.1 Montagem dos experimentos.....  | 31 |
| 2.1.2 Avaliação dos experimentos.....   | 33 |
| 2.2 Reação das linhagens de caupi à infecção por <i>Rotylenchulus reniformes</i> .....  | 33 |
| 2.2.1 Preparo do inóculo inicial.....   | 33 |
| 2.2.2 Preparo do substrato.....   | 34 |
| 2.2.3 Preparo do inóculo e inoculação.....  | 34 |
| <b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | 35 |
| <b>4. CONCLUSÕES</b> .....  | 38 |
| <b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 39 |
| <b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....  | 42 |

## INTRODUÇÃO

O caupi (*Vigna unguiculata* Walp.) é uma Eudicotiledônea da família Fabaceae, foi introduzido no Brasil no século XVII pelos colonizadores portugueses, espanhóis e pelos escravos africanos, provavelmente no Estado da Bahia, sendo originário do continente Africano. A espécie recebe ainda diversos nomes vulgares como feijão fradinho, feijão macassar, feijão macasso, feijão de corda, feijão Mauá, feijão miúdo, feijão da praia entre outros.

Quanto ao ciclo da planta, as cultivares podem ser agrupadas segundo Freire *et al* (2005) em superprecoce (maturidade alcançada até 60 dias após sementeira), precoce (maturidade alcançada entre 61 e 70 dias após sementeira), médio (maturidade alcançada entre 71 e 90 dias após sementeira), médio-precoce (maturidade alcançada entre 71 e 80 dias após sementeira), médio-tardio (maturidade alcançada entre 81 e 90 dias após sementeira) e tardio (maturidade alcançada a partir de 91 dias após sementeira).

Por ser uma cultura amplamente adaptada ao clima tropical, o caupi assume uma importância especial no Brasil, pois possui excelente valor nutritivo. Em nosso país o caupi é plantado principalmente para a produção de grãos secos ou verdes para o consumo humano *in natura*, em conserva ou desidratado. Em outros países, são diversas as suas utilizações, com o aproveitamento de todas as partes da planta para o consumo humano. Pode ser também utilizado na alimentação animal, na forma de forragem verde, ensilagem, pastagem e ração, além do uso como adubo verde e na rotação de culturas.

No Norte e Nordeste do Brasil, é o feijão tradicional, consumido no dia-a-dia da população e, em especial no Estado da Bahia, onde faz parte de pratos típicos regionais. Pode ser cultivado tanto no clima seco do Nordeste como no clima úmido do Norte. A região Centro-Oeste possui alto potencial para produzi-lo e a região Sudeste, em especial o Rio de Janeiro, pode vir a ser outro produtor de importância local devido a expansão crescente do cultivo. Neste último estado mencionado, o caupi é cultivado principalmente nos municípios de Cachoeiras de Macacu, Itaboraí, Itaguaí, Magé, Nova Iguaçu e Seropédica.

As doenças que afetam o caupi ocasionam perdas acentuadas na sua produção (Kimati *et al.*, 1997), sendo vários os agentes patogênicos que provocam a perda na qualidade e no seu rendimento em especial vírus, fungos, bactérias e nematóides (Araújo & Watt, 1988). A suscetibilidade da cultivar, a idade da planta, a virulência do fitopatógeno, a presença ou não de vetores, além das condições ambientais na época da infecção, irão determinar o grau de severidade das doenças. No Estado do Rio de Janeiro, as informações referentes a fitopatógenos que afetam o caupi são praticamente inexistentes, restringindo-se aos registros de Kitajima *et al.*(1984) que mencionam ocorrência do “cowpea severe mosaic virus” e aos de Nogueira *et al.* (2007) que identificaram alguns fungos associado a esta planta.

Grande tem sido a preocupação dos pesquisadores em identificar, de maneira rápida e eficiente, os fitopatógenos associados a cultura do caupi, em nível regional e desenvolver cultivares resistentes aos vários patógenos associados a ela, diminuindo a possibilidade de tais infecções e conseqüentemente reduzindo possíveis perdas em áreas de cultivo emergentes.

Para a cultura do caupi mundialmente são registrados cerca de 30 nematóides (Silva, 2005). No Brasil, até o momento, são catalogadas três espécies de bactérias, 20 espécies de fungos, 23 espécies de nematóides e oito espécies de vírus (Ponte, 1987; Kitajima, 1986; Kitajima, 1995; Kimati *et al.*, 1997).

Entre os gêneros de nematóides associados ao caupi figura, com destaque, o gênero *Meloidogyne* (Silva, 2005), conhecido vulgarmente como nematóide das galhas radiculares, cujos sintomas apresentados por estes nematóides são divididos em, primários, visualizados

nas regiões de infecção, comumente subterrâneos, e os secundários manifestados em pontos afastados da região de infecção (parte aérea). Dentre os sintomas primários, a formação de galhas é o mais freqüente este sintoma consiste no engrossamento das raízes nos pontos de infecção; isto ocorre devido a ação das substância contidas na saliva destes nematóides, produzidas pelas glândulas esofagianas e liberadas durante o processo de alimentação (Agrios, 2005); os sintomas secundários são tamanho desigual de plantas, formação de 'reboleiras' (áreas encontradas nas lavouras que apresentam diferenças no tamanho ou coloração nas plantas), deficiência nutricional, murchamento nos períodos mais quente do dia e queda na produtividade (Ferraz & Monteiro, 1995). O gênero *Meloidogyne* é considerado o único a limitar a produção do caupi, por debilitar as plantas além de predispor-las ao ataque de outros patógenos como os fungos *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* (Pio-Ribeiro e Assis Filho, 1997; Silva, 2005).

No Brasil, cinco espécies do gênero *Meloidogyne* foram observadas em associação ao caupi, sendo elas *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. hapla*, *M. javanica* e *M. thamesi* (Ponte, 1987; Pio-Ribeiro e Assis Filho, 1997). Merecem destaque *M. incognita* e *M. javanica*, cuja dispersão abrange toda área Norte e Nordeste, por sua constância e severidade, estas duas espécies são responsáveis pelos maiores danos atribuídos a nematóides em caupi (Ponte, 1987).

Além do nematóide das galhas radiculares, os outros gêneros e espécies destes parasitos mencionados em caupi, no Brasil, são *Aorolaimus holdemani*, *Criconemella sp.*, *Helicotylenchus dihystrera*, *H. multicinctus*, *Hemicycleophora sp.*, *Paratricodorus sp.*, *Pratylenchus brachyurus*, *P. vulnus*, *Radopholus similis*, *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, *Trichodorus sp.*, *Xiphinema brasiliensis* e *Xiphinema sp.* (Ponte, 1987; Silva, 2000).

Geralmente os nematóides fitoparasitas são rotineiramente identificados por microscopia ótica com base em características morfométricas e classificados com o auxílio de chaves taxonômicas (Cares & Huang, 2000; Cares & Huang, 2001). Outras abordagens para a identificação também tem sido adotadas como a eletroforese de isoenzimas (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985). Cares & Huang (2000), cita outras técnicas relacionadas ao processo de identificação de nematóides como citogenética, ensaios imunológicos além de mencionarem como tendência atual técnicas de biologia molecular tais como o polimorfismo de fragmentos de DNA por enzimas de restrição (RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism) além de reação em cadeia da polimerase (PCR) e sua variante a RAPD-PCR.

A eletroforese de isoenzimas é uma ferramenta importante na diagnose e caracterização de diversos nematóides fitoparasitas (Dickson *et al*, 1971; Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Carneiro *et al*, 1996; Charchar *et al*, 2008.), principalmente devido as suas características de especificidade, robustez dos resultados, além de baixa complexidade de execução, permitindo o uso na rotina dos laboratórios de análise nematológica. Mesmo sendo uma técnica bem difundida, muitos nematóides de importância agrícola, encontram-se desprovido de caracterização isoenzimática, tal como ocorre com *Rotylenchulus reniformis*, indicando a necessidade de maiores estudos neste âmbito.

Como o caupi é uma cultura de subsistência que não suporta grandes níveis de insumos, considera-se prioritário a obtenção de cultivares que tenham resistência genética para os problemas fitossanitários desta planta (Guazzelli, 1988). Desse modo, para o controle de nematóides em caupi o uso cultivares resistentes ou tolerantes constitui uma forma altamente eficiente e econômica de controle (Sharma, 1981; Ponte & Carvalho, 1984; Ponte, 1988; Pio-Ribeiro & Assis Filho, 1997).

Tendo em vista a importância dos nematóides para a cultura do caupi e do potencial desse problema fitossanitário para as condições do Estado do Rio de Janeiro, além da escassez de informações sobre o assunto para este Estado, o presente trabalho teve por

objetivos: i - Levantar e identificar os nematóides associados a cultura do caupi nas principais regiões produtoras do Estado do Rio de Janeiro; ii – Caracterizar pelo fenótipo de esterases uma população de *R. reniformis* através da técnica de eletroforese de isoenzimas; iii – Avaliar a resistência de linhagens de feijão-caupi adaptadas as condições regionais à infecção por *M. incognita* raça 1, *M. javanica* e a *R. reniformis*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, J.P.P. ed. **Cultura do caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp.** Descrição e recomendações técnicas de cultivo. EMBRAPA/CNPAF. Goiânia, GO. Circular Técnica N° 18, 82p. 1984.
- ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E.E. eds. **O caupi no Brasil.** IITA/EMBRAPA, Brasília. 722 p. 1988.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, A.R.A.; CARNEIRO, R.G. Enzyme phenotypes of Brazilian isolates of *Meloidogyne* spp. **Fundamental and Applied Nematology**, v.19, p.555-560, 1996.
- CARES, J.E.; HUANG, S.P. Taxonomia atual de fitonematóides: chave sistemática simplificada para gêneros – parte I. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p.185-223, 2000.
- CARES, J.E.; HUANG, S.P. Taxonomia de fitonematóides: chave sistemática simplificada para gêneros – parte II. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 9, p.177-235, 2001.
- CHARCHAR, J.M.; EISENBACK, J.D.; CHARCHAR, M.J.; BOITEUX, M.E.N.F. *Meloidogyne phaseoli* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising bean in Brazil. **Nematology**. v.10, n.4, p.525-538, 2008.
- DICKSON, D.W.; HUISINGH, D.; SASSER, J.N. Dehydrogenases, acid and alkaline phosphatases, and esterases for chemotaxonomy of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera*, and *Aphelenchus* spp. **Journal of Nematology**, v.3, p.1-16, 1971.
- ESBENSHADE, P.R.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. a. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida). **Journal of Nematology**, v.17, p.6-20, 1985.
- FERRAZ, L.C.C.B.; MONTEIRO, A.R. Nematóides In: BERGAMIM FILHO; KIMATI, H.; AMORIM, L. Manual de fitopatologia. Editora Agronômica Ceres, São Paulo. p.169-201, 1995.
- FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q. BARRETO, P.D.; SANTOS, A.S. Melhoramento genético. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (eds). **Feijão-caupi: Avanços tecnológicos.** Brasília, EMBRAPA INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA. p.29-75, 2005.
- GUAZZELLI, R.J. Histórico das pesquisas com o caupi no Brasil. In: Araújo, J.P.P.; Watt, E.E. (ed.). **O caupi no Brasil.** IITA/EMBRAPA, Brasília, p.49-59, 1988.
- KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. eds. **Manual de Fitopatologia.** Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas. Terceira Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo, SP, 1997, 776p.
- KITAJIMA, E.W. Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil (1911 - 1985). **Fitopatologia Brasileira** (suplemento). 1986.



KITAJIMA, E.W. Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil (1986 - 1993). **Fitopatologia Brasileira** (suplemento), p.1-92, 1995.

KITAJIMA, E.W.; RIBEIRO, R.L.D.; LIN, M.T.; RIBEIRO, M.I.S.D.; KIMURA, O.; COSTA, C.L.; PIMENTEL, J.P. Lista comentada de vírus e organismos do tipo micoplasma em plantas cultivadas e silvestres do Estado do Rio de Janeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.9, p.607-625, 1984.

LINFORD, M.B.; OLIVEIRA, J.M. *Rotylenchulus reniformis* nov. gen. n. sp. a nematode parasite of roots. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**. v.7, p.35-42, 1940.

NOGUEIRA, M.S.R.; CARVALHO, E.M.; BRIOSO, P.S.T. Ocorrência de patógenos em feijão-caupi no Estado do Rio de Janeiro. In: XXXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, Salvador. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília: **Sociedade Brasileira de Fitopatologia**. v.31, p.S303-S303. 2006.

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F.M. Doenças do caupi. In: Kimati, H.; Amorim, A.; Bergamin Filho, L.E.A.; Rezende, J.A.M. (ed.). **Manual de Fitopatologia** vol. 2: Doenças de plantas cultivadas. Editora Agronômica Ceres, São Paulo. p.233-244, 1997.

PONTE, J.J.; CARVALHO, V.N.R. Uma nova variedade de caupi, comprovadamente resistente à Meloidoginose. **Nematologia Brasileira**, v.8, p.113-119, 1984.

PONTE, J.J. Os nematóides do caupi e sua importância. **Nematologia Brasileira**, v.20, p.36-40, 1987.

PONTE, J.J. Nematóides do caupi. In: Araújo, J.P.P.; Watt, E.E. (ed.). **O caupi no Brasil**. IITA/EMBRAPA, Brasília. p.593-601, 1988.

PONTE, J.J.; LEMOS, J.W.V.; MONTE, E.V. Seleção de variedades de *Vigna sinensis* resistentes à Meloidoginose. **Fitopatologia Brasileira**, v.1, p.96-97, 1977.

SHARMA, R.D. Susceptibilidade de cultivares de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) ao nematóide *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. **Sociedade Brasileira de Nematologia**, v.5, p.159-169, 1981.

SILVA, G.S. Nematóides In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. **Feijão-caupi avanços tecnológicos**. Embrapa Informações Tecnológica. Brasília-DF, 2005, p.487-496.

TIHOHOD, D. 1993. **Nematologia Agrícola Aplicada**. FUNEP, Jaboticabal. 372.

## **CAPITULO I**

**LEVANTAMENTO DE NEMATÓIDES ASSOCIADOS À CULTURA DO  
CAUPI NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO E CARACTERIZAÇÃO DO  
FENÓTIPO DE ESTERASE PARA *Rotylenchulus reniformis* Linford &  
Oliveira (1940).**

## RESUMO

Na cultura do caupi, os nematóides exercem influência significativa, chegando ao ponto de limitar a sua produção. As informações sobre estes patógenos no Estado do Rio de Janeiro são escassas. O presente trabalho teve como objetivo levantar a ocorrência de nematóides fitoparasitas associados a cultura do caupi no Estado do Rio de Janeiro, através de coletas realizadas em alguns municípios produtores desta cultura. Foram encontrados um total de oito gêneros de nematóides fitoparasitas com as seguintes frequências *Meloidogyne* 20%, *Aphelenchoides* 20%, *Criconemella* 30%, *Helicotylenchus* 40%, *Pratylenchus* 60%, *Rotylenchulus* 70% e *Tylenchus* 70%, além de outros de vida livre não identificados. Em nível de espécie foram identificadas *M. incognita* raça 2 e *Rotylenchulus reniformis*. As identificações foram efetuadas a partir de características morfométricas e auxílio de chaves descritivas. *M. incognita* foi identificada pelas características J<sub>2</sub> e de machos, configuração do modelo perineal das fêmeas e perfil de esterases. Em seguida foram realizados ensaios com o objetivo de detecção de atividade de esterase, para uma população do nematóide *R. reniformis*. Para tanto foram testados protocolos rotineiramente usados em análises isoenzimáticas, que apresentaram resultados negativos. Já os ensaios montados em microtubos permitiram a detecção da atividade esterásica. Finalmente, modificações introduzidas nos protocolos usuais como, mudanças na concentração da solução tampão de revelação, assim como a fixação do pH da mesma próximo a neutralidade, permitiram estabelecer um padrão com três bandas distintas de esterases na população de *R. reniformis* estudada.

Palavras-chaves: *Vigna unguiculata* , nematóides fitoparasitas e identificação.

## ABSTRACT

In the cowpea crop, nematodes are a great threat and can cause yield decrease. Information about these parasites in the State of Rio de Janeiro are scarce. The present work aimed at the survey of the occurrence of plant parasite nematodes associated to the cowpea crop in the State of Rio de Janeiro, through samplings accomplished in some locations, of the producing areas of this culture. A total of eight plant parasite nematodes genera were found, with the following frequencies *Meloidogyne* 20%, *Aphelenchoides* 20%, *Criconemella* 30%, *Helicotylenchus* 40%, *Pratylenchus* 60%, *Rotylenchulus* 70% and *Tylenchus* 70%, besides other free living not identified. At the species level *M. incognita* race 2 and *Rotylenchulus reniformis* were identified. The identifications were done starting from morphometrics characteristics and with the aid of descriptive keys. *M. incognita* was identified by juvenile (J<sub>2</sub>) and adults males, females perineal pattern and esterases profile. In a second step, assays were accomplished with the objective of detecting esterase activity, for a population of *R. reniformis* using routin protocol for isoenzymes analyses. The result obtained was negative. On the other hand, assay done in PCR tubes with the purpose of identifying esterases activity, showed enzymatic activity. Finally, modifications in the routine protocols, as changes in the concentration of the buffer at the end steps, as well as the adjustment of pH near neutrality, enabled to establish a three band pattern of esterases from the studied *R. reniformis* population.

**Key-words:** *Vigna unguiculata*, plant parasite nematodes, identification .

# 1 INTRODUÇÃO

O caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) Eudicotiledônea da família Fabaceae, foi introduzido no Brasil no século XVII pelos colonizadores portugueses, espanhóis e pelos escravos africanos, provavelmente no Estado da Bahia, originário da África. (Freire Filho *et al*, 2005), é considerada uma das mais versáteis leguminosas produtoras de grãos, devido suas alta capacidade de adaptação aos mais variados ambientes (Freire Filho, 1988; Ehles & Hall, 1997; Silva, 2000; Freire Filho *et al*, 2005 ).

O caupi, por ser uma cultura amplamente adaptada ao clima tropical, assume uma importância especial no Brasil sendo responsável pela geração de mais de 2 milhões de empregos diretos, fazendo parte da dieta alimentar de 27 milhões de nordestinos (FNP, 1998).

Possui excelente valor nutritivo e, nas condições brasileiras é plantado principalmente para a produção de grãos secos ou verdes para o consumo humano *in natura*, em conserva ou desidratado. Em outros países, são diversas as suas utilizações, com o aproveitamento de todas as partes da planta para o consumo humano. Pode ser também utilizado na alimentação animal, na forma de forragem verde, ensilagem, pastagem e ração, além do uso como adubo verde e na rotação de culturas. No Norte e Nordeste, é o feijão tradicional, consumido no dia-a-dia da população e, em especial no Estado da Bahia, faz parte de pratos típicos regionais. Pode ser cultivado tanto no clima seco do Nordeste como no clima úmido do Norte. A região Centro-Oeste possui alto potencial para produzi-lo e a região Sudeste, em especial o Rio de Janeiro, pode vir a ser outro produtor de importância. devido a expansão crescente do cultivo. No Estado do Rio de Janeiro o caupi é cultivado, principalmente nos municípios de Cachoeiras de Macacu, Itaboraí, Itaguaí, Magé, Nova Iguaçu e Seropédica.

Os nematóides fitoparasitas têm grande importância por sua ação danosa induzida por meio mecânico e ou distúrbios fisiológicos, sobre as plantas hospedeiras afetando assim o desenvolvimento normal das plantas, o que resulta, para as culturas comerciais, em queda na produtividade e na qualidade final da produção (Lordello, 1984; Tihohod, 1993; Ferraz, 1995; Agrios, 2005).

Dentre os nematóides associados ao caupi Roberts *et al* (1996) e Ehlers, *et al* (2000) relatam que o gênero *Meloidogyne* é o mais importante, conhecido vulgarmente como nematóide das galhas radiculares, esse gênero é considerado o único a limitar a produção de caupi, por debilitar as plantas (Figura 1) além de poder predispor as plantas ao ataque de outros patógenos como os fungos de solo *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* (Pio-Ribeiro & Assis Filho, 1997; Silva, 2005). No Brasil, cinco espécies desse gênero foram observadas associadas ao caupi *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. hapla*, *M. javanica* e *M. thamesi* (Ponte, 1987; Pio-Ribeiro & Assis Filho, 1997). Merecem destaque *M. incognita* e *M. javanica*, cuja dispersão nessa cultura abrange toda área Norte e Nordeste do Brasil.

Além do nematóide das galhas radiculares, os outros gêneros mencionados em caupi no Brasil são *Aorolaimus holdemani*, *Criconemella* sp., *Helicotylenchus dihystrera*, *H. multincinctus*, *Hemicycleophora* sp., *Paratricodorus* sp., *Pratylenchus brachyurus*, *P. vulnus*, *Radopholus similis*, *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira (1940) , *Trichodorus* sp., *Xiphinema brasiliensis*, *Xiphinema* sp. ( Ponte, 1987; Silva, 2000; Silva, 2005.).

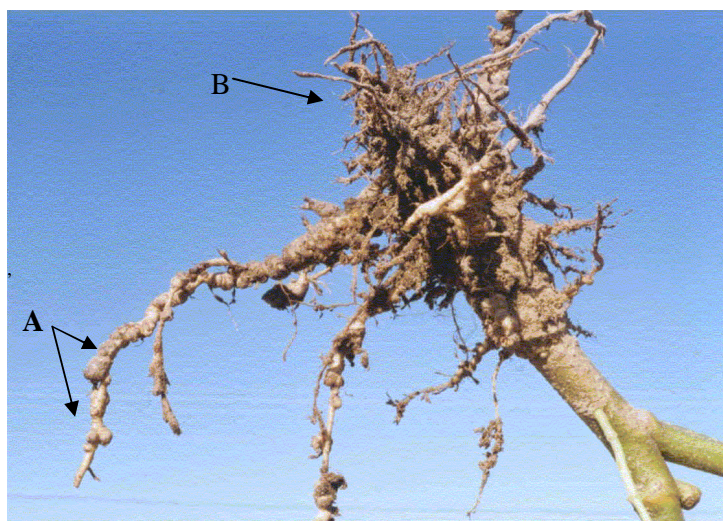
Para a cultura do caupi, no Brasil, os gêneros *Meloidogyne*, *Rotylenchulus* e *Pratylenchus* são considerados os mais prejudiciais (Sharma, 1983; Sharma 1984, Ponte, 1987; Siqueira, 2007). Informações sobre a ocorrência de nematóides associados à cultura do caupi no Rio de Janeiro são inexistentes.

Os nematóides fitoparasitas geralmente são identificados por microscopia ótica com base em características morfométricas e auxílio de chaves taxonômicas (Cares & Huang, 2000; Cares & Huang, 2001). Outras abordagens para a identificação também tem sido adotadas como a eletroforese de isoenzimas (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985), ensaios imunológicos e de biologia molecular (Cares & Huang, 2000) visando maior acurácia de resultados.

A eletroforese de isoenzima é uma ferramenta importante na diagnose e caracterização de diversos nematóides fitoparasitas (Dickson *et al*, 1971; Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Carneiro *et al*, 1996; Charchar *et al*, 2008.) principalmente, devido as suas características de especificidade, robustez dos resultados, além de baixa complexidade de execução, permitindo uso na rotina dos laboratórios de análise nematológica. Entretanto sendo uma técnica bem difundida, muitos nematóides de importância agrícola, encontram-se desprovido de caracterização isoenzimática, como ocorre com *Rotylenchulus reniformis*, indicando a necessidade de maiores estudos neste âmbito.

Como o caupi é cultura de subsistência que não suporta grandes níveis de insumos, considera-se prioritário a obtenção de cultivares que tenham resistência genética para os problemas fitossanitários da cultura (Guazzelli, 1988). Desse modo, para o controle de nematóides em caupi são recomendadas cultivares resistentes ou tolerantes (Sharma, 1981; Ponte & Carvalho, 1984; Pio-Ribeiro & Assis Filho, 1997), constituindo uma forma altamente eficiente e econômica de controle (Ponte, 1988).

Tendo em vista a importância dos nematóides para a cultura do caupi e do potencial desse problema fitossanitário para as condições do Estado do Rio de Janeiro e, da escassez de informações sobre o assunto, o presente trabalho teve por objetivos: Levantar e identificar os nematóides associados a cultura do caupi nas principais regiões produtoras do estado do Rio de Janeiro e caracterizar pelo fenótipo de esterases, uma população de *R. reniformis*, através da técnica de eletroforese de isoenzima.



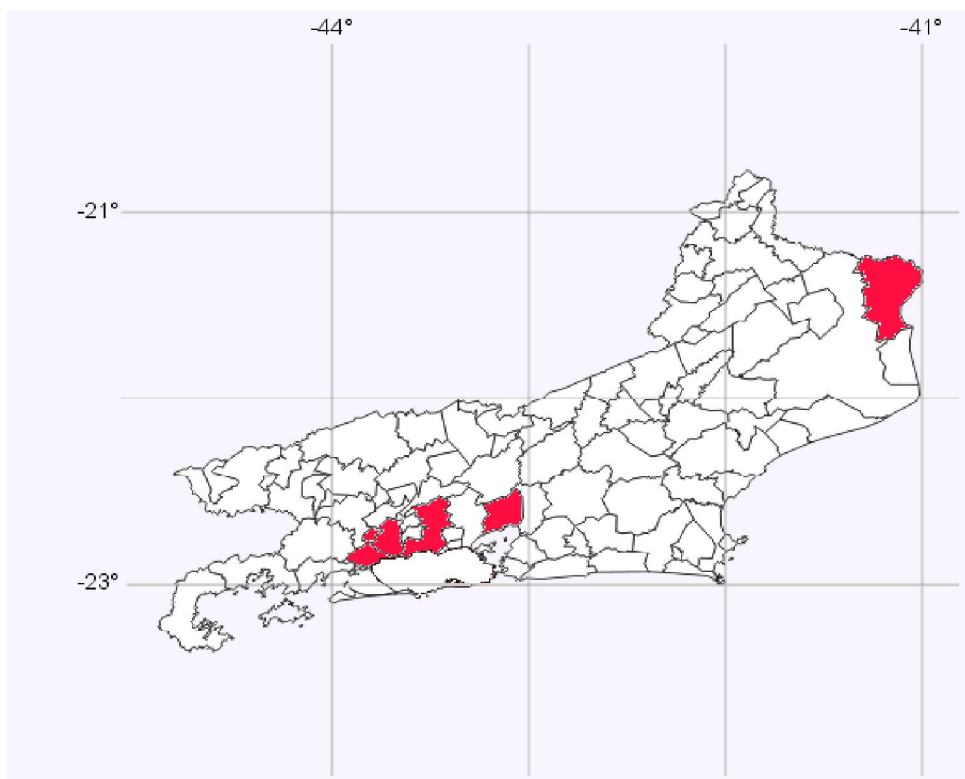
Fonte: agroecology.ifas.ufl.edu/Cowpea.htm  
acessado em 25/09/2008

**Figura 1.** Dano causado por *Meloidogyne* sp. em raízes de caupi. A – sintoma de galha; B- raízes necrosadas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Levantamento de nematóides fitoparasitas associados à cultura do caupi no Estado do Rio de Janeiro.

Foram realizadas visitas para as coletas das amostras visando levantar e identificar os nematóides fitoparasitas na cultura do caupi no Estado do Rio de Janeiro, no período de 11/2006 a 05/2008 nas regiões produtoras dos municípios de Itaguaí, Magé, Nova Iguaçu, São Francisco de Itabapoana, Distrito de João Pessoa (pertencente ao município de São Francisco de Itabapoana) e Seropédica e, prontamente encaminhadas para o Laboratório de Nematologia, do Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário/DEF/IB/UFRRJ para as análises nematológicas.



**Figura 2.** Mapa do Estado do Rio de Janeiro destacando, em vermelho, os municípios onde foram realizadas coletas para amostragens de solo e raízes de caupi. Da esquerda para a direita tem-se Itaguaí, Seropédica, Nova Iguaçu, Magé e São Francisco de Itabapoana.

As coletas foram tomadas ao acaso, seguindo uma trajetória em zig-zague nas culturas de meio para o final de ciclo, cerca de dez sub-amostras de solo rizosférico recolhidas do perfil, a uma profundidade de 0 a 20 cm. Este material foi colocado em um recipiente de polietileno e, após homogeneização, recolheu-se cerca de 1litro do produto. Em seguida a embalagem era devidamente etiquetada e levada ao laboratório para as análises. As raízes

das 10 plantas dos mesmos locais de onde foram coletadas as amostras de solo foram colhidos e, acondicionados da mesma forma com descrito para solo, para posterior análise.

A extração dos nematóides foi realizada, a partir de 250 ml de solo rizosférico pelo método de Jenkis (1964) + caolim, e das raízes pelo método de Coolen & D'Herde (1972). A seguir, as amostras foram fixadas em formalina a 4%, após relaxamento dos nematóides à temperatura de 55 °C, por cinco minutos. As preparações em suspensão aquosa contendo os nematóides foram observadas sob microscópio estereoscópico e, lâminas semi-permanentes foram montadas, incluindo espécimes fitoparasitas, principalmente de machos e fêmeas adultas. A partir de características morfométricas e do uso de chaves descritivas (Monteiro & Ferraz, 1990; Cares & Huang, 2000; Cares & Huang, 2001), os indivíduos foram identificados em nível de gênero ou de espécie. Para estudos futuros as amostras foram acondicionadas em frasco de vidro e devidamente arquivadas sendo mantidas no Laboratório de Nematologia, do Departamento de Entomologia e Fitopatologia, do Instituto de Biologia da UFRRJ.

## **2.2 Caracterização do fenótipo de esterase para *R. reniformis*.**

Na tentativa de caracterizar a população de *R. reniformis* estudada, através do perfil eletroforético de esterase foram realizados três ensaios: Ensaio I. Perfil eletroforético de esterases de *R. reniformis* usando-se protocolo padrão; Ensaio II. Detecção de atividade de esterase de *R. reniformis* em microtubos para PCR com capacidade de 0,5 ml; e Ensaio III. Perfil eletroforético de esterases de *R. reniformis* usando-se protocolo padrão com modificações.

A população original de *R. reniformis*, foi obtida a partir de plantas de caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivadas em uma pequena propriedade do município de Seropédica – RJ. Procedeu-se, então, a multiplicação dos nematóides em casa de vegetação, extraindo-se juvenis do solo rizosférico de plantas coletadas no campo, pela metodologia de Jenkis, (1964) + caolim.

A hospedeira usada para a multiplicação foi o caupi cultivar 'Costelão', que recebeu uma carga de inóculo de 5.000 juvenis por vaso, previamente preenchido com substrato esterilizado por autoclavagem e com plântulas de caupi apresentando folíolos estendidos. Aguardou-se um período de 60 dias após inoculação para o desenvolvimento dos nematóides.

Para os ensaios visando a detecção de atividade de esterases, efetuou-se uma nova multiplicação dos nematóides, para tanto, os mesmos foram extraídos do substrato, pelo método de Jenkis (1964) + caolim e das raízes por Coolen & D'Herde (1972). Procedeu-se a determinação da concentração e calibração do inóculo pela contagem de ovos, juvenis e machos adultos, sob microscópio óptico em lâmina de contagem de Peters.

Para a inoculação foram usados 5000 ovos + juvenis e machos adultos para cada vaso contendo substrato esterilizado e com plântulas de caupi cultivar 'Costelão', com dez dias após semeadura, num total de 20 vasos.

Após o período de 35 dias o sistema radicular das plantas foi coletado e as raízes foram gentilmente lavadas sob água de torneira e examinadas sob microscópio estereoscópico. Fêmeas e massas de ovos foram selecionadas e extraídas para os ensaios conforme a necessidade.

### **2.2.1 Ensaio I : Perfil de esterase usando protocolo padrão.**

Fêmeas adultas de *R. reniformis* foram separadas, com o auxílio de uma pinça de ponta fina, individualmente e, em grupos de 2, 4 e 6 espécimes, que foram cuidadosamente



aconicionados em microtubos para PCR com capacidade de 0,5 ml contendo 100µL de solução salina NaCl a 0,9%. Para cada situação utilizou-se dois microtubos, acrescentou-se ainda dois outros tubos em cada um dos quais foi depositado uma fêmea adulta de *M. javanica* que serviram como controle positivo do perfil de esterase. Com o auxílio de uma pipeta automática de 100 µL retirou-se o excesso de solução salina, macerando-se a seguir, as fêmeas e as massas de ovos com auxílio de um bastão de vidro de 5 mm de diâmetro. Em seguida, adicionou-se 20 µL do tampão de extração para esterase, constituído de 2 g de glicerol, 0,2 g de Triton X-100, e 7,8 ml de água destilada (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Carneiro & Almeida 2001; Alfenas, 1998), levando-os imediatamente para uma cuba com gelo até a aplicação das amostras no gel.

O tampão do eletrodo e os géis de poli(acrilamida) a 7% foram preparados segundo Carneiro & Almeida (2001). Após a polimerização, o gel foi colocado na cuba de eletroforese e a seguir, preencheu-se a base com o tampão do eletrodo. Todo o conjunto foi acondicionado em geladeira, a 8 °C, até a adição das amostras para o início da corrida. Das oito amostras preparadas anteriormente, foram aplicados 20 µL de cada uma delas individualmente, em cada loja do gel, sendo a primeira e última reservada para a adição do controle positivo. Em seguida com o auxílio de uma pipeta de 100 µl foram adicionadas gotas de azul de bromofenol a 0,1% como referência de corrida sobre cada loja onde foram aplicadas as amostras. Finalmente, a parte superior do suporte do gel foi preenchida com o tampão do eletrodo, iniciando-se a corrida, em geladeira.

A corrida foi realizada em sistema contínuo, refrigerada a 8 °C, com uso de cubas verticais e fonte da Amersham Pharmacia Biotech modelo EPS-601, regulado para 100 V, 40 mA e 10 W por um período de 1,5 horas, quando a frente de corrida estava com cerca de 1,5 cm do final do gel, encerrou-se essa etapa do procedimento.

Ao final da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado da cuba e procedeu-se a revelação usando a solução corante constituída de 50 ml de solução tampão fosfato de sódio a 0,1M e 50 mg de Fast Blue RR Salt, 1,5 ml do substrato (30 mg  $\alpha$ -naftilacetato, e 30 mg  $\beta$ -naftilacetato, 15 ml acetona e 15 ml de água destilada). O substrato  $\alpha$ -naftilacetato foi adicionado a solução de revelação após a homogeneização e filtragem do corante, momento antes de ser adicionada. O processo de revelação ocorreu no escuro, à temperatura de 37 °C, por um período de 30-40 min (Carneiro & Almeida, 2001). Finalmente procedeu-se a fixação e montagem dos géis de acordo com o descrito por Carneiro & Almeida (2001).

### **2.2.2 Ensaio II. Detecção de atividade da enzima esterase para *R. reniformis* em Microtubos para PCR.**

Três fêmeas de *R. reniformis* com suas respectivas massas de ovos ou uma fêmea adulta de *M. javanica* (incluída como controle positivo) foram separadas e, com o auxílio de uma pinça de ponta fina foram cuidadosamente acondicionadas em microtubos para PCR com capacidade de 0,5 ml, contendo 100 µL de solução salina, NaCl a 0,9%. Com o auxílio de uma pipeta automática de 100 µL retirou-se o excesso de solução salina e usando um bastão de vidro de 5 mm de diâmetro macerou-se a seguir, as fêmeas com as massas de ovos. Em seguida adicionou-se em cada tubo a solução de revelação com a seguinte composição: 100µL de solução tampão fosfato de sódio a 0,1M com pH ajustado para 6,90; 0,1 mg de Fast Blue RR Salt, 20µL do substrato (60 mg  $\alpha$ -naftilacetato em 15 ml acetona e 15 ml de água destilada). O substrato  $\alpha$ -naftilacetato foi adicionado a solução de revelação após a homogeneização e filtragem do corante. Os tubos foram colocados em estufa de incubação no escuro à temperatura de 37 °C, por um período de 30-40 min. Como controle negativo

utilizou-se três microtubos que receberam somente a solução de revelação (corante mais substrato).

### **2.2.3 Ensaio III. Perfil eletroforético de esterases para *R. reniformis* usando protocolo padrão com modificações.**

Três fêmeas de *R. reniformis* com suas massas de ovos foram separadas, com o auxílio de uma pinça de ponta fina, e cuidadosamente acondicionados nos microtubos com capacidade de 0,5 ml, contendo 100 µL de solução salina, NaCl a 0,9%. Acrescentou-se ainda um tubo onde foi colocada uma fêmea jovem de *M. javanica* (controle positivo). Com a ajuda de uma pipeta automática de 100 µL retirou-se o excesso de solução salina e com um bastão de vidro de 5 mm de diâmetro macerou-se as fêmeas e suas massas de ovos, efetuando-se o mesmo procedimento para a fêmea de *M. javanica*. Em seguida, adicionou-se 20 µL do tampão de extração para esterase, constituído de 2 g de glicerol, 0,2 g de Triton X-100, e 7,8 ml de água destilada (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Carneiro & Almeida, 2001; Alfenas, 1998), levando-os imediatamente para uma cuba com gelo até a aplicação das amostras no gel.

O tampão do eletrodo e os géis de poliacrilamida a 7% foram preparados segundo Carneiro & Almeida (2001). Após a polimerização e resfriamento do gel, o suporte foi acondicionado na cuba de corrida e, a seguir, preencheu-se a base com o tampão do eletrodo. Todo o conjunto foi mantido em geladeira, a 8 °C, até a adição das amostras para o início da corrida. Das amostras preparadas anteriormente foram aplicados 20 µL de cada uma delas individualmente, em cada loja do gel, sendo a primeira reservada para a adição da amostra controle, como referência do andamento de todo o processo. Em seguida com o auxílio de uma pipeta de 100 µl foram adicionados gotas de azul de bromofenol a 0,1% como referência de corrida, sobre cada loja onde foram aplicadas as amostras. Finalmente a parte superior do suporte do gel foi preenchida com o tampão do eletrodo, iniciando-se a corrida, em geladeira.

A corrida foi realizada em sistema contínuo, refrigerada a 8 °C, com uso de cubas verticais e fonte da Amersham Pharmacia Biotech modelo EPS-601 regulado para 100 V, 40 mA e 10 W por um período de 1,5 horas, quando a frente de corrida estava com cerca de 1,5 cm do final do gel, encerrou-se essa etapa do procedimento.

Ao final da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado da cuba e procedeu-se a revelação usando a solução corante constituída de 50 ml de solução tampão fosfato de sódio a 0,2 M e pH = 6,90; 50 mg de Fast Blue RR Salt, 1,5 ml do substrato  $\alpha$ -naftilacetato (60 mg  $\alpha$ -naftilacetato, 15 ml acetona e 15 ml de água destilada). O substrato  $\alpha$ -naftilacetato foi adicionado à solução de revelação após a homogeneização e filtragem do corante, momentos antes de ser adicionada. O processo de revelação ocorreu no escuro, à temperatura de 37 °C, por um período de 30-40 min; finalmente, procedeu-se a fixação e montagem dos géis de acordo com o descrito por Carneiro e Almeida (2001).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.

#### 3.1 Levantamento de nematóides associados a cultura do caupi no Estado do Rio de Janeiro.

Os resultados do levantamento, assim como, os municípios onde foram realizadas as amostragens, estão expostos na tabela 1. Os nematóides foram identificados na sua maioria em nível de gênero, e dois até espécie.

Oito gêneros foram encontrados no levantamento, suas frequências relativas em ordem crescente expostas a seguir *Meloidogyne* (20 %), *Aphelenchoides* (20 %), *Criconemella* (30 %), *Helicotylenchus* (40 %), *Pratylenchus* (60 %), *Aphelenchus* (70 %), *Rotylenchulus* (70%), *Tylenchus* (70 %).

Todos os gêneros encontrados no presente trabalho já foram previamente registrados para a cultura do caupi no Brasil; entretanto para as condições do Estado do Rio de Janeiro não se tem relato dos mesmos. Dos gêneros encontrados, são considerado mais importante para a cultura do caupi *Meloidogyne*, *Pratylenchus* e *Rotylenchulus* (Lordello, 1984; Ponte, 1987; Silva, 2005). Apesar da sua importância, o gênero *Meloidogyne* foi encontrado em baixa frequência (20%). Uma possível explicação para estes resultados, seria o uso habitual da cultivar local denominada ‘Costelão’, por boa parte dos agricultores fluminenses, considerada moderadamente resistente a *M. incognita* (Goulart *et al*, 2004 ).

O gênero *Pratylenchus*, conhecido como nematóides das lesões radiculares, é considerado o segundo grupo de fitonematóides mais importante (Lordello, 1984; Tihohod, 1993), foi um dos nematóides de maior frequência nas amostragens, com (60 %) de ocorrência. Essa alta incidência encontrada no presente trabalho confirma o que já é registrado no Brasil para várias culturas, como batata baroa, citros, abacaxi, quiabo, Eucalipto, batata, soja, algodão, café, cebola, dentre outras (Lordello, 1984; Tihohod, 1993). No tocante a importância deste gênero para a cultura do caupi no Brasil os estudos são escasso. Entretanto, Siqueira (2007) verificou que *P. brachyurus* provoca danos ao caupi refletidos pela redução do peso seco de vagens em experimento conduzido em condições de casa de vegetação, quando inoculado em nível crescente de inóculo.

Os resultados observados no presente trabalho, mostraram, ainda, uma alta frequência de ocorrência (70%) de *R. reniformis* em caupi no Estado do Rio de Janeiro, tratando-se do primeiro registro desta espécie na cultura, no Estado. Trata-se de uma espécie cosmopolita e considerada de importância para a cultura do caupi em outros locais do mundo (Khan & Husain, 1988; Robinson *et al*, 1997). Vários relatos indicam a importância do nematóide para várias cultura no Brasil (Sharma, 1983; Lordello, 1984; Sharma 1984, Ponte, 1987; Silva, 2005; Siqueira, 2007) Entretanto, o nematóide foi pouco estudado na cultura do caupi nas condições brasileiras. Altos níveis populacionais foram encontrados em algumas amostras analisadas no presente trabalho (dados não publicados), isto sugere uma importância potencial deste nematóide para a agricultura do Estado do Rio de Janeiro.

**Tabela 1.** Nematóides associados ao caupi encontrados no Estado do Rio de Janeiro.

| Municípios                  | Nematóides |     |     |     |     |     |     |     |
|-----------------------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                             | Mel        | Aph | Cri | Hel | Pra | Apu | Rot | Tyl |
| Frequência relativa (%)     | 20         | 20  | 30  | 40  | 60  | 70  | 70  | 70  |
| Itaguaí                     | -          | -   | -   | +   | +   | +   | -   | +   |
| Magé                        | -          | -   | +   | +   | -   | +   | +   | +   |
| Nova Iguaçu                 | -          | -   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| São Francisco de Itabapoana | +          | +   | -   | -   | +   | +   | +   | +   |
| Distrito de João Pessoa     | -          | +   | -   | -   | +   | +   | +   | -   |
| Seropédica                  | +          | -   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |

Mel - *Meloidogyne* sp; Aph - *Aphelenchoides* sp; Cri - *Criconemella* sp; Hel - *Helicotylenchus* sp; Pra - *Pratylenchus* sp; Apu - *Aphelenchus* sp; Rot - *Rotylenchulus reniformis*; Tyl - *Tylenchus* sp.

Os gêneros *Aphelenchus* e *Tylenchus*, apesar de suas alta frequências não são considerado problemáticos por serem, a princípio, de hábito alimentar micófito. No entanto, Mendes *et al* (1996) relata a interceptação realizada pelo serviço quarentenário da Embrapa/Cenargen, de *Aphelenchus* sp. e também *Aphelenchoides* sp., em sementes importadas de feijão-caupi, o que indica a necessidade de estudos mais aprofundados sobre o assunto.

Dentre as espécies de nematóides fitoparasitas de importância econômica citadas para o caupi, *R. reniformis* foi a mais frequentemente encontrada, com 70% de ocorrência nas amostras analisadas. Com base nas informações do levantamento de nematóides associados a cultura do caupi em municípios do Estado do Rio de Janeiro, pode-se afirmar que a distribuição da espécie *R. reniformis* no Estado, é ampla e incluem a região onde a fruticultura destaca-se e vem expandindo (Norte Fluminense), graças aos incentivos do governo estadual, como o programa Frutificar, que financia produção principalmente das culturas de abacaxi e maracujá, porém, ambas as culturas são altamente suscetíveis ao *R. reniformis*, portanto, existe a necessidade de estudos para a avaliação da distribuição desta espécie nas culturas mencionadas, pois esta espécie de nematóide é capaz de levar o declínio de lavouras tanto de abacaxi como de maracujá.

Os resultados aqui observados corroboram aqueles obtidos por outros autores que mostram uma ampla dispersão do parasito no Brasil, sendo importante para várias culturas como cacau (Sharma, 1982); caupi (Ponte, 1987., Silva, 2005); tomate (Campos & Sturhan, 1987); Algodão (Asmus, 2007).



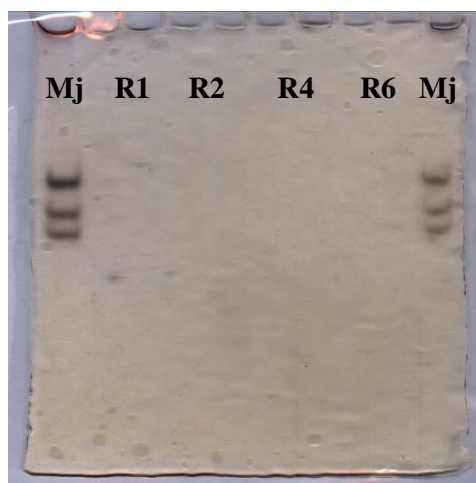
**Figura 3.** Raízes de caupi parasitadas por *R. reniformis* coradas pela metodologia de Byrd, (1983). A – Fêmeas em vários estádios de desenvolvimento; B – Fêmea adulta no início da fase reprodutiva.

### 3.2 Caracterização do fenótipo de esterase para *R. reniformis*.

O resultado do ensaio visando determinar o perfil de esterase de *R. reniformis* utilizando o protocolo padrão proposto por Esbenshade e Triantaphyllou a,b, 1985 Carneiro & Almeida 2001; Alfenas, 1998, não revelou atividade desta enzima para *R. reniformis* como pode ser visto na Figura 4. A presença de três bandas típicas de esterase para *M. javanica* na mesma figura comprova a validade do ensaio e a eficácia do protocolo para a análise do fenótipo de esterase deste último nematóide.

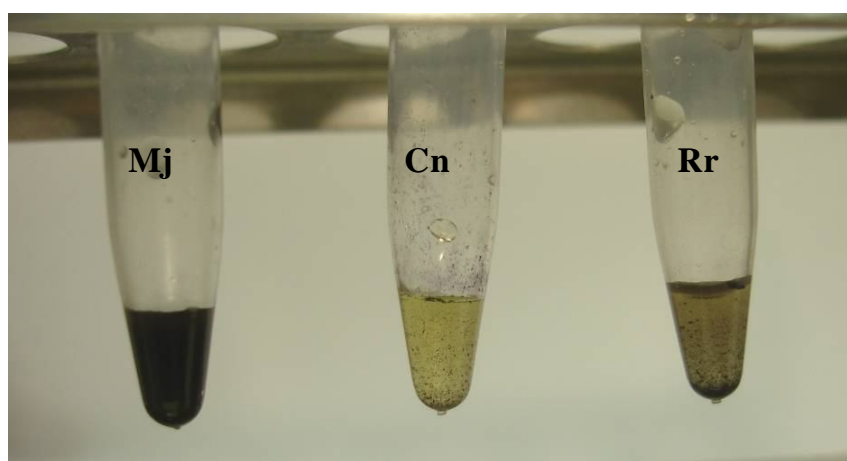
Usando protocolo padrão para análise de isoenzimas Soares & Santos (2000) também não encontraram atividade de esterase em *R. reniformis*, confirmando o resultado do presente trabalho. Da mesma forma, Torres *et al.* (2006), usando o protocolo de Esbenshade & Triantaphyllou (1985) com modificações, não obtiveram êxito na tentativa de identificar *R. reniformis* pela análise do perfil de esterase.

A falta da detecção de atividade de esterase para *R. reniformis* sugere a inexistência de atividade desta enzima ou ainda indica possibilidade de inadequação do protocolo para este caso.



**Figura 4.** Eletroforese para esterase de *R. reniformis* usando o protocolo padrão. Mj perfil esterásico para o controle positivo *M. javanica*, R1- uma fêmea adulta usada de *R. reniformis*, R2 – duas fêmeas adultas usada de *R. reniformis*, R4 –quatro fêmeas adulta usadas de *R. reniformis* e R6 – seis fêmeas adustas usadas de *R. reniformis*.

O resultado da tentativa de detecção de atividade de esterase de *R. reniformis* em microtubos para PCR é mostrado na Figura 5. Pode ser vista claramente a reação enzima-substrato pela mudança de cor, tanto no tubo onde foi adicionada a amostra do controle positivo (*M. javanica*), como naquele que recebeu a amostra em teste, quando comparados aos tubos do controle negativo, que foi a solução de revelação (corante mais substrato). Isto confirma a existência de alguma atividade de esterase em *R. reniformis* que, em tese, possibilita o uso do perfil eletroforético desta enzima com a finalidade de diagnose deste nematóide



**Figura 5.** Detecção de atividade de esterase em microtubos para PCR, Mj - *M. javanica*, Cn -controle negativo e Rr - *R. reniformis*.

Os resultados negativos, até então, encontrados, podem ser explicados em princípio pela inadequação dos protocolos que foram anteriormente utilizados para análise de atividade

de esterases de *R. reniformis*. Voet (2002) e Lehninger (2002) deixam claro que a atividade de enzimas ocorre geralmente numa faixa restrita de pH, embora o comportamento possa ser variável. Em ensaios preliminares verificou-se que a atividade de esterases em *M. javanica* ocorria em uma faixa de pH entre 6,0 e 7,4, enquanto para *R. reniformis* aparentemente, o ideal fica em torno de 6,9. Isto sugere que o pH da solução de revelação pode ter sido o fator limitante para a detecção de atividade de esterase em *R. reniformis*.

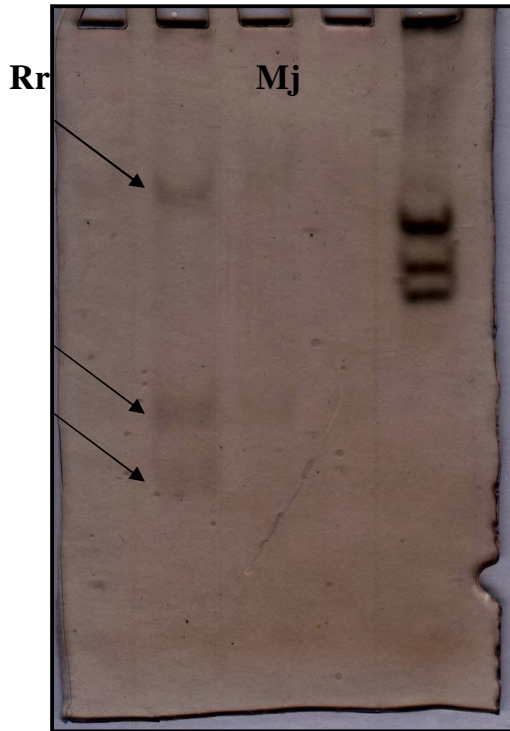
O tipo de amostra biológica, como o estágio das fêmeas, pode também ser outro fator determinante no sucesso de detecção de atividade de esterases em *R. reniformis* e, conseqüentemente, no uso da técnica para diagnose do nematóide. Assim, para a identificação de espécies de *Meloidogyne* pelo uso do perfil de esterases Esbenshaide & Tiantaphyllou (1985) recomendam o uso de fêmeas jovens leitosas. Por outro lado, no presente trabalho resultados positivos foram alcançados com fêmeas de *R. reniformis*, portando massas de ovos bem desenvolvidas, com a matriz gelatinosa de aspecto translúcido.

Os resultados do ensaio visando determinar o fenótipo de esterases pela eletroforese, da população de *R. reniformis* extraída de caupi, usando os protocolos conhecidos (Esbenshaide & Triantaphyllou 1985, Carneiro et al, 2001), com modificações, são exibidos na Figura 6. As alterações efetuadas no protocolo, no presente trabalho, não afetaram os resultados da análise, já que o perfil de esterases para *M. javanica* usado como controle positivo é claramente observado. Tanto a presença de três bandas, como as posições relativa das mesmas encontradas no gel, são compatíveis com as descrições para o referido nematóide de acordo com Esbenshaide & Triantaphyllou (1985) e Carneiro *et al.* (2001).

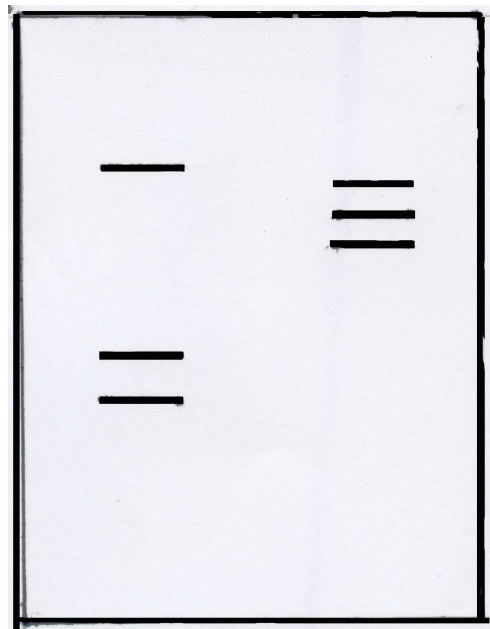
Neste ensaio verificou-se a atividade de esterases em *R. reniformis* evidenciada pela presença de três bandas distintas daquelas observadas para o controle, como pode ser visto na Figura 6. Apesar da intensidade das bandas ter sido fraca, e terem aparecido em apenas uma das linhas de corrida, elas podem ser claramente notadas. Estes resultados confirmam aqueles obtidos no ensaio com microtubos.

Os resultados aqui observados estão em desacordo com os de Soares & Santos (2000), que trabalhando com populações de *Rotylenchulus* spp. em uma PhastSystem (Pharmacia) em mini-gel e, adotando protocolo padrão na tentativa de obtenção de bandas de  $\alpha$  e  $\beta$  esterase, superóxido dismutase e fosfatase ácida de alcalina, não lograram êxito. Da mesma forma, Torres *et al.* (2006) também não conseguiram adequar protocolo para detecção de atividade de  $\alpha$  esterase tanto em sistema contínuo como em descontínuo, a partir de uma população de *R. reniformis* obtida de melão.

Os resultados positivos aqui verificados podem ser explicados pelas alterações introduzidas no protocolo, como o aumento na concentração do tampão de revelação e ajuste do seu pH para 6,9; uso somente do  $\alpha$ -naftilacetato como substrato; além disso a própria qualidade das amostras biológicas usadas nos ensaios pode ter sido outro fator relevante para o sucesso.



**Figura 6.** Apresenta as bandas, que formam o perfil de esterase para *R. reniformis* (Rr), indicadas por setas, assim como, as bandas típicas do controle positivo *M. javanica* (Mj).



**Figura 7.** Apresenta o esquemas das bandas de esterase para *R. reniformis* e *M. javanica*.



## 4 CONCLUSÕES

As análises procedidas com finalidade de levantar os nematóides fitoparasitas associado à cultura do caupi no Estado do Rio de Janeiro, assim como, os ensaios com objetivo de caracterizar o fenótipo de esterase de *R. reniformis*, permitiram concluir que:

1. Pelo menos oito gêneros de nematóides fitoparasitas podem ser encontrados associados à cultura do caupi, em municípios do Estado do Rio de Janeiro.
2. O gênero *Meloidogyne*, considerado de maior importância para a cultura do caupi no Brasil, encontrado em apenas 20% das amostras analisadas, possivelmente não o é para o Estado do Rio de Janeiro.
3. A presença de *R. reniformis* em 70% das amostras analisadas sugere que esta espécie possa ser um problema potencial para a agricultura no Estado do Rio de Janeiro, em especial para fruticultura. Este é o primeiro relato da espécie em caupi no Estado.
4. Os protocolos de rotina de análise isoenzimática para esterase, não permitem detectar a presença de atividade dessas enzimas em *R. reniformis*. No entanto, modificações nos protocolos permitem a caracterização do fenótipo das enzimas esterases para *R. reniformis*, que é constituído de três bandas distintamente separadas.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5 ed. Elsevier Academic Press. 2005, 903p.

ALFENAS, A.C. (editor). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, p. 1998.

ARAÚJO, J.P.P. ed. **Cultura do caupi**, *Vigna unguiculata* (L.) Walp.; descrição e recomendações técnicas de cultivo. EMBRAPA/CNPAF. Goiânia, GO. Circular Técnica N° 18. 82p. 1984.

ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E.E. eds. **O caupi no Brasil**. IITA/EMBRAPA, Brasília. 722 p. 1988.

ASMUS, G.L.; Ishimi, C.M. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento 39**. Flutuação populacional e biologia de *Rotylenchulus* (Nemata: Rotylenchulinea) em algodoeiro sob sistema plantio direto. Embrapa Agropecuária Oeste. Dourados, MS. 2007, 27p.

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

CARES, J.E.; HUANG, S.P. Taxonomia atual de fitonematóides: chave sistemática simplificada para gêneros – parte I. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.8, p.185-223, 2000.

CARES, J.E.; HUANG, S. P. Taxonomia de fitonematóides: chave sistemática simplificada para gêneros – parte II. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 9, p.177-235, 2001.

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

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

CARNEIRO, R. M. D.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.35-44. 2001.

CARVALHO, J.C. *Rotylenchus elisensis* nova espécie associada com raízes de soja. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. v. 17, p. 43-46, 1957.

CASTRO, J.M.C.; LIMA, R.D'A.; CARNEIRO, R.M.D.G. Variabilidade isoenzimática de populações de *Meloidogyne spp.* provenientes de regiões brasileiras produtoras de soja. **Nematologia Brasileira**. v.27, n.1, p.1-12, 2003.

CHARCHAR, J.M.; EISENBACK, J.D.; CHARCHAR, M.J.; BOITEUX, M.E.N.F. *Meloidogyne phaseoli* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising bean in Brazil. **Nematology**. v. 10, n. 4, p. 525-538, 2008.

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

DICKSON, D.W.; HUISINGH, D.; SASSER, J.N. Dehydrogenases, acid and alkaline phosphatases, and esterases for chemotaxonomy of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera*, and *Aphelenchus* spp. **Journal of Nematology**, v. 3, p. 1-16, 1971.

EHLERS, J.D.; HALL, A.E. Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Field Crops Res.* v. 53, p.187-204, 1997.

EHLERS, J.D., MATTHEWS, W.C., HALL, A.E., ROBERTS, P.A. Inheritance of a broad-based form of root-knot nematode resistance in cowpea. **Crop Sci.** v.40, p.611-618, 2000.

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

ESBENSHADE, P.R.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. b. Electrophoretic methods for the study of root-knot nematodes enzymes. *In*: BARKER, K.R.C.C.; CARTER, C.C.; SASSER, J.N. (eds). **An advanced treatise on Meloidogyne Volume II**, North Carolina State university Graphics, North Carolina, USA, p.115-123, 1985.

ESBENSHADE, P.R.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**. v.22, n.1, p.10-15, 1990.

FNP Consultorias e Agroinformações. Feijão. *In*: Agianual 1998: **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo, 1998. p.85-86.

FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q. BARRETO, P.D.; SANTOS, A.S. Melhoramento genético. *In*: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (eds). **Feijão-caupi avanços tecnológicos**. Brasília, EMBRAPA INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA. p.29-75, 2005.

GOULART, R.R.; NASCIMENTO, R.R.S.; NASCIMENTO, R.J.; SANTOS, C.L.R.; SILVA, P.C.P.; GAVAZZA, M. I. A ; FREIRE FILHO, F.R.; PIMENTEL, J. P . Avaliação de linhagens e cultivares de caupi à infecção por *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. *In*: XIV Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ., 2004, Seropédica (RJ). **XIV Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ.**, v.1. 2004

GUZZELLI, R.J. Histórico das pesquisas com o caupi no Brasil. *IN*: Araújo, J.P.P.; Watt, E.E. (ed.). **O caupi no Brasil**. IITA/EMBRAPA, Brasília, p.49-59, 1988.

KHAN, T.A.; HUSAIN, S.I. Response of cowpea cultivars to *Rotylenchulus reniformis*. **Nematropica**, v.18, n.2, p.159-162. 1988.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J. A. M. eds. **Manual de Fitopatologia**. Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas. Terceira Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo, SP, 1997, 776p.

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

LEHNINGER, A.L. **Lehninger princípios de bioquímica**/ NELSON, D. L.; COX. M.M. Editora Sarvier. 2002, p.189-224.

LINFORD, M.B.; OLIVEIRA, J.M. *Rotylenchulus reniformis* nov. gen. n. sp., a nematode parasite of roots. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**. v.7, p.35-42, 1940.

LORDELLO, L.G.E. O nematóide reniforme (*Rotylenchulus reniformis*). In: **Nematóide das plantas cultivadas**. Livraria Nobel S.A 6° ed. 314p, 1984.

MOLINARI, S.; LAMBERTI, F.; CROZZOLI, R.; SHARMA, S.B.; SÁNCHEZ PORTALES, L. Isozyme patterns of exotic *Meloidogyne* spp. populations. **Nematologia Mediteranea**. v.33, p.61-65, 2005.

MONTEIRO, A.R.; L.C. FERRAZ. **Curso de Identificação de Nematóides Parasitos de Plantas** USP-ESALQ - Departamento de Zoologia/ FEALQ. Piracicaba, SP. p.313, 1990.

NOGUEIRA, M. S. R.; CARVALHO, E. M.; BRIOSO, P. S. T. Ocorrência de patógenos em feijão-caupi no Estado do Rio de Janeiro. In: XXXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, Salvador. Fitopatologia Brasileira. Brasília : **Sociedade Brasileira de Fitopatologia**. v.31, p.S303-S303, 2006.

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F.M. Doenças do caupi. In: Kimati, H.; Amorim, A.; Bergamin Filho, L.E.A; Rezende, J.A.M. (ed.). **Manual de Fitopatologia** vol. 2: Doenças de plantas cultivadas. Ed. Agron. Ceres, São Paulo. p.233-244, 1997.

PONTE, J.J.; CARVALHO, V.N.R. Uma nova variedade de caupi, comprovadamente resistente à Meloidoginose. **Nematologia Brasileira**, v.8, p.113-119, 1984.

PONTE, J.J. Os nematóides do caupi e sua importância. **Nematologia Brasileira**, v.20, p.36-40, 1987.

PONTE, J.J. Nematóides do caupi. In: Araújo, J.P.P. e Watt, E.E. (ed.). **O caupi no Brasil**. IITA/EMBRAPA, Brasília. p.593-601. 1988.

PONTE, J.J.; LEMOS, J.W.V.; MONTE, E.V. Seleção de variedades de *Vigna sinensis* resistentes à Meloidoginose. **Fitopatologia Brasileira**, v.1, p.96-97, 1977.

ROBERTS, P.A., MATTHEWS, W.C. AND EHLERS, J.D. New resistance to virulent root-knot nematodes linked to the Rk locus of cowpea. **Crop Sci.**, v.36, p.889-894, 1996.

ROBINSON, A.F.; INSERRA, R.N.; CASWELL-CHEN, E.P.; VOVLAS, N.; TROCCOLI, A. *Rotylenchulus* species: Identification, distribution, host range, and crop plant resistance. **Nematropica**, v.27, n.2, p.127-180, 1997.

SHARMA, R.D. Susceptibilidade de cultivares de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) ao nematóide *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. **Sociedade Brasileira de Nematologia**, v.5, p.159-169, 1981.

SHARMA, R.D. Susceptibilidade de cultivares de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) ao nematóide formador das galhas, *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. **Sociedade Brasileira de Nematologia**, v.7, p.137-148, 1983.

SHAMA, R.D. Reaction of cowpea genotypes to *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**. v.8, 1984.

SHARMA, R.D.; RITZINGER, C.H.S.P.; JUNQUEIRA, N.T.V.; GOMES, A.C. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento 86**. Reação de genótipos de maracujá-azedo ao nematóide *Rotylenchulus reniformis*. Embrapa Cerrado. Planaltina, DF. p.14, 2003.

SILVA, G.S. Nematóides *In*: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. **Feijão-caupi avanços tecnológicos**. Embrapa Informações Tecnológica. Brasília-DF, 2005, p.487-496.

SIQUEIRA, K.M.S. Importância de *Pratylenchus brachyurus* na cultura do caupi e estudos morfológicos e morfométricos sobre populações de *P. brachyurus* no Brasil. **Tese de Doutorado**, Escola Superior de Agricultura Luís de Queiróz. Piracicaba-SP. 2007.

SOARES, P. L. M.; SANTOS, J. M. Variabilidade morfológica e bioquímica em populações de *Rotylenchulus* Linford & Oliveira, 1940 do Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.26, p.101, 2000.

TORRES, G.R.C.; PEDROSA, E.M.R.; MOURA, R.M.; REHN, V.N.C.; SALES JÚNIOR, R. Estudos morfométricos, fisiológicos de uma população de *Rotylenchulus reniformis* associada a *Cucumis melo*. **Revista Caatinga. Mossoró**, RN, v.19, n.4, p.350-359, 2006.

TIHOHOD, D. 1993. **Nematologia Agrícola Aplicada**. FUNEP, Jaboticabal. 372.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. Fundamentos de bioquímica. Tradução Artur Germano Fett Neto, *et al.* Editora Artmed. 2002, p.292.

## **CAPITULO II**

**AVALIAÇÃO DE LINHAGENS DE CAUPI À INFECCÃO por  
*Meloidogyne incognita* raça 1, *M. javanica* e *Rotylenchulus reniformis*.**

## RESUMO

Na cultura do caupi, os nematóides possuem influência significativa, chegando ao ponto de limitar a sua produção. As informações sobre estes patógenos no Estado do Rio de Janeiro são escassas. O presente trabalho teve como objetivo, a avaliação de seis linhagens de caupi em fase avançada de melhoramento para resistência a viroses, que foram testadas visando determinar a reação das mesmas quando inoculadas com *Meloidogyne incognita* raça 1 ou *M. javanica* ou *R. reniformis*. A cultivar de tomate TRural foi usada como testemunha suscetível nos testes com as duas espécies de nematóide das galhas radiculares. As duas primeiras espécies foram escolhidas por serem consideradas altamente prejudiciais á cultura, já a última foi incluída devido ao fato de ter sido encontrada em 70% das amostras analisadas no levantamento.

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação e usou-se uma carga de inóculo de 5000 ovos + juvenis/repetição; para as espécies de *Meloidogyne*, a avaliação ocorreu 50 dias após inoculação e os parâmetros usados foram: índice de galhas (IG), índice de massa de ovos (IMO) e fator de reprodução (Fr), calculado pela relação Pf/Pi (Pf= população final e Pi= população inicial). Cinco das linhagens testadas, RJ 04-04; RJ 04-08; RJ 04-26; RJ 04-48 e RJ 04-65 se comportaram como altamente resistentes e a linhagem RJ 04-29 como moderadamente resistente para *M. incognita* raça 1. Enquanto que, para *M. javanica*, todas as linhagem foram altamente suscetíveis. Para avaliação de *R. reniformis* foi usado como inóculo uma população “pura” multiplicada em casa de vegetação. Inoculou-se 5000 ovos e ou juvenis de machos e de fêmeas imaturas. Como parâmetro para avaliação da resistência das linhagens de caupi ao nematóide, foi usado o fator de reprodução (Fr) avaliado aos 45 dias após inoculação. Todas as linhagens foram consideradas suscetíveis a este parasita, a cultivar Costelão incluída como padrão também mostrou igual comportamento.

Palavras-chaves: *Vigna unguiculata*, meloidoginose, resistência, nematóide reniforme.

## ABSTRACT

In the cowpea crop, nematodes are a great threat and can cause yield decrease. Information about these parasites in the State of Rio de Janeiro are scarce. The present work aimed at the evaluation of six cowpea lines in advanced breeding stages and that are resistant to virus diseases, for their reaction when inoculated with *M. incognita* race 1, or *M. javanica* or/and *Rotylenchulus reniformis*. The cultivar TRural was used as susceptible pattern in the tests with the two species of root-knot nematodes. The first two species were chosen because they are very damaging to the crop, while the last one was included due to the fact that it was found in 70% of the analyzed samples.

The experiments were accomplished under greenhouse conditions, using of 5000 eggs or juveniles per experimental plots; for *Meloidogyne* species; the evaluation was done 50 days after inoculation, and galls index (GI), egg mass index (EMI) and reproduction factor (RF) was calculated by the relation  $Pf/Pi$  ( $Pf$  = final population and  $Pi$  = start population) were used as parameters for resistance. Among the evaluated lines, five of them, RJ 04-04; RJ 04-08; RJ 04-26; RJ 04-48 and RJ 04-65 behaved as highly resistant, and the line RJ 04-29 was moderately resistant for *M. incognita* race 1, while for *M. javanica*, all lines were highly susceptible. In the case of *R. reniformis* a "pure" population reproduced under greenhouse conditions, five thousand eggs and/or males and/or young females were used as inoculum. As evaluation parameter for the resistance of cowpea lines to *R. reniformis* the reproduction factor (Fr) was evaluated 45 days after inoculation. All lines were found susceptible to this parasite, the cultivar "Costelão", that included as susceptible pattern, showed the same behavior.

Key-words: *Vigna unguiculata*, root-Knot, resistance, reniform nematode.



# 1 INTRODUÇÃO

O caupi (*Vigna unguiculata* Walp.), Eudicotiledônea da família Fabaceae, foi introduzido no Brasil no século XVII pelos colonizadores portugueses, espanhóis e pelos escravos africanos provavelmente no Estado da Bahia, originário da África. A cultura do caupi está amplamente distribuída no mundo, e no Brasil é responsável pela geração de mais de 2 milhões de empregos diretos, fazendo parte da dieta alimentar de 27 milhões de nordestinos (FNP, 1998).

O caupi, por ser uma cultura amplamente adaptada ao clima tropical, assume uma importância especial no Brasil. Possui excelente valor nutritivo e, nas condições brasileiras é plantado principalmente para a produção de grãos secos ou verdes para o consumo humano *in natura*, em conserva ou desidratado. Em outros países, são diversas as suas utilizações, com o aproveitamento de todas as partes da planta para o consumo humano. Pode ser também utilizado na alimentação animal, na forma de forragem verde, ensilagem, pastagem e ração, além do uso como adubo verde e na rotação de culturas. No Norte e Nordeste, é o feijão tradicional, consumido no dia-a-dia da população e, em especial no Estado da Bahia, faz parte de pratos típicos regionais. Pode ser cultivado tanto no clima seco do Nordeste como no clima úmido do Norte. A região Centro-Oeste possui alto potencial para produzi-lo e a região Sudeste, em especial o Rio de Janeiro, pode vir a ser outro produtor de importância nacional devido a expansão crescente do cultivo. No Estado do Rio de Janeiro o caupi é cultivado, principalmente nos municípios de Cachoeiras de Macacu, Itaboraí, Itaguaí, Magé, Nova Iguaçu e Seropédica.

Os nematóides fitoparasitas possuem grande importância devido a ação danosa, induzida por meio de injúrias mecânica e/ou distúrbios fisiológicos, sobre as plantas hospedeiras afetando, assim, o seu desenvolvimento normal e resultando em quedas de produtividade e da qualidade final da produção (Lordello, 1984; Tihohod, 1993; Ferraz, 1995; Agrios, 2005).

Grande tem sido as preocupações dos pesquisadores em identificar, rapidamente e eficientemente, os fitopatógenos associados à cultura do caupi, em nível regional e conseguir cultivares resistentes aos vários patógenos associados a ela, diminuindo a possibilidade de tais infecções e, conseqüentemente, reduzindo possíveis perdas em áreas de cultivo emergentes.

O caupi é hospedeiro de diversos gêneros de nematóides, figurando com destaque o gênero *Meloidogyne* (Ehlers, *et al* 2000; Silva, 2005), conhecido vulgarmente como nematóide das galhas, sendo considerado fator limitante na produção do caupi, por debilitar as plantas além de poder predispor as plantas ao ataque de outros patógenos, como os fungos *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* (Pio-Ribeiro & Assis Filho, 1997; Silva, 2005). No Brasil, cinco espécies desse gênero foram observadas associadas ao caupi, *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. hapla*, *M. javanica* e *M. thamesi* (Ponte, 1987; Pio-Ribeiro & Assis Filho, 1997). Merece destaque *M. incognita* e *M. javanica*, cuja dispersão abrange toda área Norte e Nordeste. Por sua constância e severidade, a meloidoginose não é simplesmente a principal nematose do caupi, mas insere-se como uma das mais importantes enfermidades da cultura, prevalecendo como fator limitante da sua produção (Ponte, 1987). Os sintomas apresentados por este grupo de nematóides podem ser divididos em, primários, visualizados

nas regiões de infecção, comumente subterrâneos, e os secundários manifestados em pontos afastados da região de infecção (parte aérea). Dentre os sintomas primários, a formação de galhas é o mais freqüente este sintoma consiste no engrossamento das raízes nos pontos de infecção; Isto ocorre devido a ação das substância contidas na saliva destes nematóides, produzidas pelas glândulas esofagianas e liberadas durante o processo de alimentação.

Como o caupi é cultura de subsistência que não suporta grandes níveis de insumos, considera-se prioritário a obtenção de cultivares que tenham resistência genética para os problemas fitossanitários da cultura (Guazzelli, 1988; Cardoso, 2000). Desse modo, para o controle de nematóides em caupi o uso cultivares resistentes ou tolerantes constitui uma forma altamente eficiente e econômica de controle (Sharma, 1981; Ponte & Carvalho, 1984; Ponte, 1988 Pio-Ribeiro & Assis Filho, 1997)

Na busca por cultivares resistente às principais espécies do gênero *Meloidogyne*, diversos programas de melhoramento e seleção vêm sendo realizados em todo o mundo. Ensaio com o objetivo de comprovar a presença de resistência nas linhagens e cultivares de caupi vem sendo realizados por diversos autores (Sharma, 1983; Sharma, 1984, Ponte, 1984; Roberts *et al.*, 1996; Goulart *et al.*, 2004; Roberts *et al.*, 2005; Silva, 2007.). Linhagens resistentes a *M. incognita* e/ou *M. javanica* foram encontradas nos trabalhos de Ponte, (1984); Khan & Husain (1988); Roberts *et al.*, (1996); Goulart *et al.*, (2004); Roberts *et al.*, (2005) e Silva(2007).

Tendo em vista a importância dos nematóides para a cultura do caupi e do potencial desse problema fitossanitário para as condições do Estado do Rio de Janeiro e, da escassez de informações sobre o assunto o presente trabalho teve por objetivo: avaliar a resistência de linhagens de feijão-caupi adaptadas às condições regionais, à infecção por *M. incognita* raça 1 ou *M. javanica* ou *R. reniformis*.

## 2 MATERIAL E MÉTODO

### 2.1 Reação de linhagem de caupi à infecção por *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*.

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação, localizada no Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário, Departamento de Entomologia e Fitopatologia da UFRRJ, município de Seropédica-RJ

#### 2.1.1 Montagem do experimento.

Na montagem do experimento, foram usados vasos plásticos com capacidade de 1,3 L. Cada recipiente recebeu 1L de substrato esterilizado por autoclavagem durante uma hora, à 120°C, cuja composição formada pela mistura de terra, areia e uma fonte de matéria orgânica (esterco) na proporção de 1:1:1.

Em cada um dos vasos foram então semeadas duas sementes de caupi com posterior desbaste, mantendo-se apenas uma plântula por recipiente priorizando a uniformização. Seis dias a contar da semeadura, com as plântulas já com dois folíolos estendidos, foi realizada a inoculação.

O inóculo inicial foi obtido das populações puras de *M. incognita* raça I e *M. javanica* mantidos em tomate TRural I (Pimentel *et al*, 2003), em casa de vegetação do Departamento de Entomologia e Fitopatologia, da UFRRJ. A pureza das populações foi confirmada através das análises dos padrões perineais (Taylor & Sasser, 1978; Nickle, 1991) e pela técnica de eletroforese de isoenzima (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Carneiro & Almeida, 2001; Alfenas, 1998). A raça de *M. incognita* foi caracterizada de acordo com metodologia proposta por Taylor & Sasser (1978).

A multiplicação foi realizada em tomate TRural I por um período de 50 dias, antes da realização da extrações para a montagem do experimento. As extrações foram realizadas segundo metodologia de Coolen & D'Herde, (1972). A determinação da concentração do inóculo foi realizada pela contagem de ovos e/ou juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) dos nematóides sob microscópio ótico, em lâmina de Peters.

As linhagens utilizadas no experimento foram obtidas a partir do cruzamento de duas cultivares, a 'BR 17 Gurguéia', que se apresenta imune ao CPSMV (*Cowpea severe mosaic virus*), e tem aceitação comercial de produtores e consumidores piauienses e, a cultivar 'Costelão', que se apresenta suscetível ao CPSMV sorotipos I e II (Figura X) e tem a preferência por produtores e consumidores do Estado do Rio de Janeiro (Nogueira, 2007). As linhagens foram pré-selecionadas na Embrapa Meio-Norte, localizada em Teresina (PI), junto ao Programa de Melhoramento Genético de Feijão-caupi e passaram por ensaio de resistência e produtividade realizado por Nogueira, (2007). As linhagens selecionadas para o teste de resistência a nematóides foram: RJ 04-04; RJ 04-08; RJ 04-26; RJ 04-29; RJ 04-48; RJ 04-65. A cultivar de tomate TRural 35 foi adotada como testemunha suscetível.



Fonte Nogueira

**Figura 1.** Planta de caupi infestada pelo vírus do mosaico severo (CPSMV).

A inoculação foi feita adicionando-se, com o auxílio de uma pipeta automática, 5 mL de uma suspensão contendo 5000 ovos + juvenis mL<sup>-1</sup>, distribuídos em quatro orifícios abertos no substrato com um centímetro de profundidade próximo as plântulas. Foram usadas 5 repetições para cada linhagem testada.



**Figura 2.** Experimento montado para reação de linhagens de caupi à *R. reniformis*.

### 2.1.2 Avaliação dos experimentos.

A avaliação ocorreu cinquenta dias a contar da inoculação. Os parâmetros usados foram índice de galhas (IG) e índice de massa de ovos (IMO) (Taylor & Sasser, 1978) além do fator de reprodução (FR = população final/ população inicial).

O sistema radicular das plantas de cada parcela experimental foi lavado sob água em baldes, corados com floxina B por cerca de 20 minutos e, após nova lavagem procedeu-se a avaliação. Cada sistema radicular foi examinado individualmente sob microscópio estereoscópico, para a determinação do IG e IMO. Em seguida as raízes foram processadas também individualmente em sua totalidade pela metodologia de Coolen & D'Herde, (1972). Após a extração, conduziu-se a fixação em formalina à 4% e, posteriormente, determinou-se a população final pela contagem dos nematóides com o auxílio de lâmina de Peters, sob microscópio ótico.

As linhagens foram classificadas de acordo com a escala descrita na Tabela 1.

**Tabela 1.** Escala de Taylor e Sasser (1978) para classificação da resistência a nematóides.

| Grau ou nota | Reação     | Número de galhas e/ou massas de ovos |
|--------------|------------|--------------------------------------|
| 0            | Resistente | 0                                    |
| 1            | Resistente | 1-2                                  |
| 2            | Resistente | 3-10                                 |
| 3            | Suscetível | 11-30                                |
| 4            | Suscetível | 31-100                               |
| 5            | Suscetível | >100                                 |

### 2.2 Reação das linhagens de caupi à infecção por *Rotylenchulus reniformes*.

O experimento foi realizado em casa de vegetação, localizada no Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário, Departamento de Entomologia e Fitopatologia da UFRRJ, município de Seropédica-RJ.

#### 2.2.1 Preparo do inóculo inicial.

O inóculo inicial de *R. reniformis* usado para a avaliação do experimento de resistência das linhagens de caupi, foi obtido de solo rizosférico, naturalmente infestado, de plantas desta espécie, cultivadas em uma pequena propriedade do município de Seropédica –

RJ. Procedeu-se à extração dos nematóides pela metodologia de Jenkins (1964) mais caolim, obtendo-se fêmeas, machos e juvenis. Após a extração dos nematóides preparou-se uma suspensão aquosa que foi calibrada em lâmina de contagem de Peters, para uma concentração final de 1000 nematóides mL<sup>-1</sup>.

Três sementes de caupi, da cultivar 'Costelão' foram semeadas em vasos com 1,3 L de capacidade contendo uma mistura esterilizada, por autoclavagem a 120 °C, de terra, esterco bovino curtido e finamente peneirado mais areia lavada, na proporção 1:1:1. Quando as plântulas estavam com cinco dias de germinadas, efetuou-se o desbaste priorizando a uniformidade, deixando-se uma por recipiente, Cada planta recebeu cinco ml do inóculo que foi depositado em quatro orifícios de cerca de 2 cm de profundidade abertos no substrato próximos as plantas. Para multiplicação do inóculo, as plantas foram mantidas em casa de vegetação recebendo os tratos culturais necessários, durante um período de 60 dias.

### **2.2.2 Preparo do substrato.**

O substrato usado para o experimento foi de composição idêntica e preparado de forma semelhante ao usado para a multiplicação do inóculo. Da mesma forma, usou-se o mesmo volume de substrato.

### **2.2.3 Preparo do inóculo e inoculação.**

O inóculo foi obtido do substrato e das raízes das plantas inoculadas no item anterior. A metodologia adotada na extração para o substrato foi Jenkis, (1964) + caolim; já as raízes foram processadas de acordo como método Coolen & D'Herde, (1972). Em seguida, procedeu-se à determinação da concentração do inóculo pela contagem dos nematóides sob microscópio ótico em lâmina de Peters.

Para avaliar a reação das linhagens de caupi a *R. reniformis* o ensaio foi montado sob condições de casa-de-vegetação. No experimento foram usados vasos plásticos com capacidade de 1,3 L, onde foram semeadas duas sementes pré-germinadas de cada linhagem por recipiente. Após a emergência das plântulas, foi feito desbaste mantendo-se, assim, uma plântula por vaso. Quando as plântulas estavam com as folhas primárias 1/3 expandidas foram realizada as inoculações.

As linhagens utilizadas neste experimento foram as mesmas descritas para a reação de resistência à *Meloidogyne* spp (RJ 04-04; RJ 04-08; RJ 04-26; RJ 04-29; RJ 04-48; RJ 04-65). A cultivar de caupi 'Costelão' foi usada como testemunha suscetível.

A inoculação foi feita adicionando-se, com o auxílio de uma pipeta automática, 5 mL de uma suspensão contendo 5000 ovos + juvenis mL<sup>-1</sup>, distribuídos em quatro orifícios abertos no substrato, com um centímetro de profundidade, próximo às plântulas. Foram usadas 5 repetições para cada linhagem testada.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das avaliações das reações das linhagens de feijão-caupi obtidos sob condições de casa de vegetação, a partir da inoculação com *Meloidogyne incognita* raça I ou *M. javanica* estão na Tabela 2 e na Tabela 3 respectivamente.

Os parâmetros utilizados, propostos por Taylor & Sasser (1978), ou seja, índice de galhas (IG), índice de massa de ovo (IMO), juntamente com o fator de reprodução (FR), verificou-se que cinco (RJ 04-04; RJ 04-08; RJ 04-26; RJ 04-48; RJ 04-65), das seis linhagens de caupi avaliadas comportaram-se como altamente resistente a *M. incognita* raça I. Por outro lado, a linhagem RJ 04-29 comportou-se como moderadamente suscetível, com o fator de reprodução 2, apesar de ter apresentado IG 3 e IMO 5. Aparentemente, o valor alto deste último parâmetro não refletiu, proporcionalmente em incremento populacional. Ponte & Carvalho (1984) também verificaram a resistência, em caupi, a *Meloidogyne*. Entretanto estes autores trabalharam com mistura de espécies de nematóides dificultando a interpretação de resultados. Roberts *et al.*, (1996) Ehlers *et al.*, (2000); Roberts *et al.*, (2005); Silva *et al.*, (2007) encontraram resultado semelhante ao apresentado no presente trabalho.

**Tabela 2.** Reação de linhagens de caupi à *Meloidogyne incognita* raça I.

| Linhagens  | IG | IMO | FR    | Reação |
|------------|----|-----|-------|--------|
| RJ 04-04   | 1  | 1   | 0,28  | R      |
| RJ 04-08   | 2  | 3   | 0,78  | R      |
| RJ 04-26   | 3  | 1   | 0,0   | R      |
| RJ 04-29   | 3  | 5   | 2,00  | MS     |
| RJ 04-48   | 1  | 2   | 0,19  | R      |
| RJ 04-65   | 1  | 1   | 0,25  | R      |
| Testemunha | 5  | 5   | 45,80 | S      |

Baseado na escala de TAYLOR e SASSER (1978); **IG**: Índice de galha; **IMO**: Índice de massa de ovos; **MS**: Moderadamente suscetível ; **S**: Suscetível; **R**: Resistente; **FR**: Fator de reprodução.

Em relação a *M. javanica* os resultados do presente trabalho apresentados na tabela 3 mostraram que todas as linhagens foram suscetíveis ao nematóide segundo os parâmetros analisados. Estes resultados estão de acordo com os de Sharma (1983) que, testando vinte e seis cultivares de feijão-caupi, à infecção por *M. javanica*, considerou todas altamente suscetíveis. Em trabalho subsequente, Sharma (1984) encontrou resultados semelhantes ou seja a predominância da reação de suscetibilidade das cultivares, mencionando a tolerância em apenas algumas delas.

**Tabela 3.** Reação de linhagens de caupi à *Meloidogyne javanica*.

| Linhagens         | IG | IMO | FR    | Reação |
|-------------------|----|-----|-------|--------|
| RJ 04-04          | 3  | 5   | 37,26 | S      |
| RJ 04-08          | 5  | 5   | 22,36 | S      |
| RJ 04-26          | 5  | 5   | 18,30 | S      |
| RJ 04-29          | 5  | 5   | 34,60 | S      |
| RJ 04-48          | 5  | 5   | 36,19 | S      |
| RJ 04-65          | 5  | 5   | 27,56 | S      |
| <b>Testemunha</b> | 5  | 5   | 53,32 | S      |

Baseado na escala de TAYLOR & SASSER (1978); **IG**: Índice de galha; **IMO**: Índice de massa de ovos; **MS**: Moderadamente suscetível; **S**: Suscetível; **R**: Resistente; **FR**: Fator de reprodução.

Durante o processo de avaliação das linhagens inoculadas com *M. javanica*, algumas características da interação patógeno x hospedeira foram observadas e estão ilustradas na Figura 1, merece destaque o tamanho reduzido das galhas, porém, com elevado número de massas de ovos. Além disso, foi verificada proliferação de raiz a partir das galhas, sintoma este mencionado por Taylor & Sasser (1978) como sendo típico de *M. hapla*. Fica descartada a possibilidade de contaminação uma vez que se trabalhou com inóculo puro no presente trabalho.



**Figura 3.** Raízes infectadas por *M. javanica* exibindo massa de ovos coradas com floxina B. A, B e C observa-se massas de ovos bem desenvolvidas com galhas ausentes ou reduzidas. Em D tem-se o sintoma de proliferação de raízes nas galhas.



Os resultados das reações das linhagens de feijão-caupi obtidos sob condições de casa de vegetação, a partir da inoculação de *Rotylenchulus reniformis*, estão na Tabela 4.

Tanto as linhagens testadas como a testemunha suscetível responderam de forma semelhante. Porém em todos os casos foram observadas baixas taxas de reprodução; isto pode ser atribuído ao período curto de observação (45 dias). Além disso, durante o período experimental prevaleceram condições de baixas temperaturas, com as médias noturnas registradas abaixo de 19 °C e as médias diurnas de 28 °C, já que o ensaio foi conduzido durante o inverno. Heald (1975), avaliando patogenicidade de *R. reniformis* em melão, demonstrou que a temperatura exerce influência na interação parasita x hospedeira quando abaixo da ideal para o desenvolvimento da espécie, provocando um aumento da duração do seu ciclo.

Usando-se como critério de resistência o fator de reprodução ( $Fr < 1$ ), todas as linhagens de caupi avaliadas comportaram-se como suscetíveis à população de *R. reniformis* testada. Estes resultados confirmam em parte aqueles obtidos por Khan & Husain (1988) que, trabalhando com 20 acessos de feijão caupi na avaliação da resistência a *R. reniformis*, encontraram 3 linhagens resistentes com as restantes mostrando-se suscetíveis.

**Tabela 4.** Reação de linhagens de caupi à infecção por *R. reniformis*.

|                          | FR= Pf/Pi | Reação |
|--------------------------|-----------|--------|
| Testemunha<br>(Costelão) | 2,65      | S      |
| RJ 04-04                 | 2,03      | S      |
| RJ 04-08                 | 2,22      | S      |
| RJ 04-26                 | 1,94      | S      |
| RJ 04-29                 | 1,76      | S      |
| RJ 04-48                 | 2,45      | S      |
| RJ 04-65                 | 2,03      | S      |

Reação: **S**: Suscetível; **R**: Resistente.

## 4 CONCLUSÕES

Os resultados dos ensaios realizados visando verificar o comportamento de linhagens de caupi frente a *M. incognita*, ou *M. javanica* e/ou *R. reniformis* permitem concluir que:

1. Das seis linhagens testadas, cinco (RJ 04-04; RJ 04-08; RJ 04-26; RJ 04-48 e RJ 04-65), comportaram-se como altamente resistentes à infecção de *M. incognita* e uma linhagem comportou-se como moderadamente suscetível (RJ 04-29);
2. Todas as linhagens estudadas foram suscetíveis à infecção por *M. javanica* ou *R. reniformis*.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5 ed. Elsevier Academic Press. 2005, 903p.

ASMUS, G.L.; ISHIMI, C.M. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento 39**. Flutuação populacional e biologia de *Rotylenchulus* (Nemata: Rotylenchulina) em algodoeiro sob sistema plantio direto. Embrapa Agropecuária Oeste. Dourados, MS. 2007, 27p.

ARAÚJO, J.P.P. ed. **Cultura do caupi**, *Vigna unguiculata* (L.) Walp.; descrição e recomendações técnicas de cultivo. EMBRAPA/CNPAF. Goiânia, GO. Circular Técnica N° 18. 82p. 1984.

ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E.E. eds. **O caupi no Brasil**. IITA/EMBRAPA, Brasília. 722 p. 1988.

CARES, J.E.; HUANG, S.P. Taxonomia atual de fitonematóides: chave sistemática simplificada para gêneros – parte I. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.8, p.185-223, 2000.

CARES, J.E.; HUANG, S.P. Taxonomia de fitonematóides: chave sistemática simplificada para gêneros – parte II. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 9, p.177-235, 2001.

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

CARVALHO, J.C. *Rotylenchus elisensis* nova espécie associada com raízes de soja. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. v.17, p.43-46, 1957.

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

EHLERS, J.D.; HALL, A.E. Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Field Crops Res.** v.53, p.187-204, 1997.

EHLERS, J.D.; MATTHEWS, W.C.; HALL, A.E.; ROBERTS, P.A. Inheritance of a broad-based form of root-knot nematode resistance in cowpea. **Crop Sci.** v.40, p.611-618, 2000.

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

ESBENSHADE, P.R.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. Electrophoretic methods for the study of root-knot nematodes enzymes. In: BARKER, K.R.C.C.; CARTER, C.C.; SASSER, J.N. (eds). **An advanced treatise on Meloidogyne Volume II**, North Carolina State university Graphics, North Carolina, USA, p. 115-123, 1985.b.

FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q. BARRETO, P.D.; SANTOS, A.S. Melhoramento genético. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. (eds). **Feijão-caupi avanços tecnológicos**. Brasília, EMBRAPA INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA. p.29-75, 2005.

GUAZZELLI, R.J. Histórico das pesquisas com o caupi no Brasil. *IN: Araújo, J.P.P. & Watt, E.E. (ed.). O caupi no Brasil. IITA/EMBRAPA, Brasília, p.49-59, 1988.*

GOULART, R.R.; NASCIMENTO, R.R.S.; NASCIMENTO, R.J.; SANTOS, C.L.R.; SILVA, P.C.P.; GAVAZZA, M. I. A ; FREIRE FILHO, F.R.; PIMENTEL, J. P . Avaliação de linhagens e cultivares de caupi à infecção por *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. In: XIV Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ., 2004, Seropédica (RJ). **XIV Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ.**, v.1, 2004.

HEALD, C.M. Pathogenicity and Histopathology of *Rotylenchulus reniformis* infecting Cantaloup. **Journal of Nematology.** v.7, n.2, 1975.

KHAN, T.A.; HUSAIN, S.I. Response of cowpea cultivars to *Rotylenchulus reniformis*. **Nematropica**, v.18, n.2, p.159-162. 1988.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J. A.M. eds. **Manual de Fitopatologia.** Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas. Terceira Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo, SP, 1997, 776p.

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

LINFORD, M.B.; OLIVEIRA, J.M. *Rotylenchulus reniformis* nov. gen. n sp. A nematode parasite of roots. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington.** v.7, p.35-42, 1940.

LORDELLO, L.G.E. O nematóide reniforme (*Rotylenchulus reniformis*). In: **Nematóide das plantas cultivadas.** Livraria Nobel S.A 6° ed. 314p, 1981.

MONTEIRO, A.R.; L.C. FERRAZ. **Curso de Identificação de Nematóides Parasitos de Plantas** USP-ESALQ - Departamento de Zoologia/ FEALQ. Piracicaba, SP. p.313, 1990.

NOGUEIRA, M.S.R.; CARVALHO, E.M. ; BRIOSO, P.S.T. Ocorrência de patógenos em feijão-caupi no Estado do Rio de Janeiro. In: XXXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, Salvador. Fitopatologia Brasileira. Brasília : **Sociedade Brasileira de Fitopatologia.** v.31, p.S303-S303, 2006.

NOGUEIRA, M. S. R. Herança da resistência a Viroses, Caracterização molecular parcial de vírus de feijão-caupi. **Tese de Doutorado.** Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro- RJ. 2007.

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F.M. Doenças do caupi. In: Kimati, H.; Amorim, A.; Bergamin Filho, L.E.A & Rezende, J.A.M. (ed.). **Manual de Fitopatologia** vol. 2: Doenças de plantas cultivadas. Ed. Agron. Ceres, São Paulo. p.233-244, 1997.

PIMENTEL, J.P.; NASCIMENTO, R.J.; GOULART, R.R.; COSTA, L.H.; GAVAZZA, M. I.A.; SANTOS, C.S.; NASCIMENTO, R.R.S. Tomato cv TRural I: a new alternative for maintenance and inoculum production of *Meloidogyne incognita* and *M. Javanica*. In:

XXXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 2003, Uberlândia (MG). **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.S257-S257, 2003.

PONTE, J.J.; LEMOS, J.W.V.; MONTE, E.V. Seleção de variedades de *Vigna sinensis* resistentes à Meloidoginose. **Fitopatologia Brasileira**, v.1, p.96-97, 1977.

PONTE, J.J.; CARVALHO, V.N.R. Uma nova variedade de caupi, comprovadamente resistente à Meloidoginose. **Nematologia Brasileira**, v.8, p.113-119, 1984.

PONTE, J.J. Os nematóides do caupi e sua importância. **Nematologia Brasileira**, v.20, p.36-40, 1987.

PONTE, J.J. Nematóides do caupi. In: Araújo, J.P.P.; Watt, E.E. (ed.). **O caupi no Brasil**. IITA/EMBRAPA, Brasília. p.593-601. 1988.

ROBERTS, P.A., MATTHEWS, W.C.; EHLERS, J.D. New resistance to virulent root-knot nematodes linked to the Rk locus of cowpea. **Crop Sci.**, v.36, p.889-894, 1996.

ROBERTS, P.A.; MATTHEWS, W.C.; EHLERS, J.D. Root-knot nematode resistant cowpea cover crop in tomato production systems. **Agronomy Journal**. v.97, p.1626-1635, 2005.

ROBINSON, A.F.; INSERRA, R.N.; CASWELL-CHEN, E.P.; VOVLAS, N.; TROCCOLI, A. *Rotylenchulus* species: Identification, distribution, host range, and crop plant resistance. **Nematropica**, v.27, n.2, p.127-180, 1997.

SHARMA, R.D. Susceptibilidade de cultivares de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) ao nematóide *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. **Sociedade Brasileira de Nematologia**, v.5, p.159-169, 1981.

SHARMA, R.D. Susceptibilidade de cultivares de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) ao nematóide formador das galhas, *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. **Sociedade Brasileira de Nematologia**, v.7, p.137-148, 1983.

SHARMA, R.D. Reaction of cowpea genotypes to *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**. v.8, 1984.

SHARMA, R.D.; RITZINGER, C.H.S.P.; JUNQUEIRA, N.T.V.; GOMES, A.C. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento 86**. Reação de genótipos de maracujá-azedo ao nematóide *Rotylenchulus reniformis*. Embrapa Cerrado. Planaltina, DF. p.14, 2003.

SILVA, G.S. Nematóides In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-caupi avanços tecnológicos**. Embrapa Informações Tecnológica. Brasília-DF, 2005, p.487-496.

SILVA, G.S.; FREIRE FILHO, F.R.; PEREIRA, A.L.; SILVA, C.L.P. Reação de genótipos de caupi à *Meloidogyne incognita* raça 1. **Nematologia Brasileira**. v.32, n.2, 2007.

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

TIHOHOD, D. 1993. *Nematologia Agrícola Aplicada*. FUNEP, Jaboticabal. 372p.

## CONCLUSÕES GERAIS

No presente trabalho, pode-se constatar a presença de pelo menos oito gêneros de nematóides fitoparasitas associadas à cultura do caupi no Estado do Rio de Janeiro. Duas espécies de nematóides fitoparasitas, *M. incognita* e *R. reniformis*, consideradas de grande importância para a cultura, podem ser encontradas associadas a esta leguminosa neste Estado.

*Rotylenchulus reniformis* é assinalado pela primeira vez em caupi no estado do Rio de Janeiro.

Foi possível a detecção da atividade de esterase em *R. reniformis* com as modificações proposta nos protocolos originais para esta finalidade.

As linhagens de caupi estudadas neste trabalho, possuem resistência a *M. incognita* raça 1, porém demonstram alta suscetibilidade a *M. javanica* e a *R. reniformis*.