UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA

ALTERNATIVAS DE MANEJO DE *Meloidogyne enterolobii* e *Meloidogyne incognita* EM TOMATE INDUSTRIAL

JULIANA DE OLIVEIRA SILVA

Orientadora:
Profa. Dra. Mara Rúbia da Rocha

Novembro - 2018

sibi
sistema de bibliotecas ufg

PRPG
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

UFG

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **[ ] Dissertação** **[X] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Juliana de Oliveira Silva

Título do trabalho: Alternativas de Manejo de *Meloidogyne enterolobii* e *Meloidogyne incognita* em Tomate Industrial

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [ ] SIM [X] NÃO[1]

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Juliana de Oliveira Silva
Assinatura do(a) autor(a)[2]

Ciente e de acordo:

Maria Rúbia da Rocha
Assinatura do(a) orientador(a)[2]

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.
Casos de embargo:
- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

[2] A assinatura deve ser escaneada.

Versão atualizada em maio de 2017.

SIBI
SISTEMA DE BIBLIOTECAS UFG

PRPG
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

UFG

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o(a) autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: [ ] Dissertação [X] Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do(a) autor(a): Juliana de Oliveira Silva

Título do trabalho: Alternativas de manejo de *Meloidogyne enterolobii* e *Meloidogyne incognita* em tomate industrial

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [ ] NÃO[1]

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Juliana de Oliveira Silva
Assinatura do(a) autor(a)[2]

Ciente e de acordo:

Maria Rúbia da Rocha
Assinatura do(a) orientador(a)[2]

Data: 15 / 06 / 2022

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

[2] As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento. Imagens coladas não serão aceitas.

Scanned with CamScanner

JULIANA DE OLIVEIRA SILVA

ALTERNATIVAS DE MANEJO DE *Meloidogyne enterolobii* e *Meloidogyne incognita* EM TOMATE INDUSTRIAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial a obtenção do título de Doutor em Agronomia.
Área de concentração: Fitossanidade

Orientadora:
Profa. Dra. Mara Rúbia da Rocha

Goiânia, GO - Brasil
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, Juliana de Oliveira
ALTERNATIVAS DE MANEJO DE Meloidogyne enterolobii e Meloidogyne incognita EM TOMATE INDUSTRIAL [manuscrito] / Juliana de Oliveira Silva. - 2018.
LXXXI, 81 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Mara Rúbia da Rocha.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos (EAEA), Programa de Pós Graduação em Agronomia, Goiânia, 2018.
Bibliografia.

1. Solanum lycopersicum. 2. nematoide-das-galhas. 3. resistência genética. 4. controle químico. 5. indução de resistência. I. da Rocha, Mara Rúbia, orient. II. Título.

CDU 631.4

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

UFG

ATA DE DEFESA DE TESE

Aos vinte e dois dias do mês de novembro do ano de dois mil e dezoito (22.11.2018), às 14h00min, no auditório do PPGA da Escola de Agronomia da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora, composta pelos membros, Profª. Drª. Mara Rúbia da Rocha - Orientadora e Presidente da Banca, Profª. Drª. Débora Cristina Santiago, Prof. Dr. Fernando Godinho de Araújo, Dr. Jadir Borges Pinheiro e Dr. Heriksen Higashi Puerari, para a realização da sessão pública da defesa de Tese intitulada: "**Alternativas de manejo de *Meloidogyne enterolobii e Meloidogyne incognita* em tomate industrial**", de autoria de **Juliana de Oliveira Silva**, discente do curso de **Doutorado**, na área de concentração em **Fitossanidade**, do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UFG. A sessão foi aberta pela presidente, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e deu início às atividades relativas a defesa da Tese. Passou a palavra a doutoranda que em quarenta minutos apresentou o seu trabalho. Após a apresentação a candidata foi arguida pelos membros da banca. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. De acordo com a Resolução CEPEC 1403/2016, de 10 de junho de 2016 que regulamenta os Programas de Pós-Graduação *Stricto Sensu* na UFG, a Banca Examinadora considerou a Tese "**APROVADA**", com as correções recomendadas, estando integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **DOUTORA** em Agronomia, na área de concentração em **FITOSSANIDADE**, pela Universidade Federal de Goiás. A doutoranda poderá efetuar as modificações sugeridas pela Banca Examinadora e encaminhar nova versão eletrônica da Tese à Secretaria do PPGA, no prazo máximo de trinta dias após a data da Defesa. A Banca Examinadora recomendou a publicação de artigo(s) científico(s), oriundo(s) dessa Tese, em periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de acatadas as modificações sugeridas. Para finalizar, a Presidente agradeceu os membros examinadores, congratulou-se com a doutoranda e encerrou a sessão às 17h40min, para constar, eu Welinton Barbosa Mota, secretário do PPGA, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora, em quatro vias de igual teor.

Mara Rúbia da Rocha
Profª. Drª. Mara Rúbia da Rocha
Presidente da Banca - EA/UFG

Heriksen H. Puerari
Dr. Heriksen Higashi Puerari
Bolsista PNPD/PPGA/UFG

Débora C. Santiago
Profª. Drª. Débora Cristina Santiago
Membro - UEL/Londrina

Prof. Dr. Fernando Godinho de Araújo
Membro - IFGoiano/Urutai

Dr. Jadir Borges Pinheiro
Membro - Embrapa Hortaliça

Aos meus pais José Marcos e Elenice,
pela compreensão, confiança, suporte e amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e pelas oportunidades a mim oferecidas.

À minha família, pais e irmãs pelo apoio e incentivo em todos os momentos, fáceis e difíceis.

À Universidade Federal de Goiás, em especial à Escola de Agronomia e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos de doutorado e doutorado sanduíche.

À Profa. Dra. Mara Rúbia da Rocha pela orientação e pelos ensinamentos prestados durante toda a realização do curso.

Ao meu namorado Renato Luis, pelo carinho, ajuda e compreensão durante todos os momentos do curso.

Aos meus amigos queridos que sempre estiveram comigo, mesmo distante, torcendo por mim; aos meus professores e técnicos que me auxiliaram nessa caminhada.

Aos companheiros do Laboratório de Nematologia da Escola de Agronomia-UFG, pela contribuição na realização dos trabalhos que me fizeram chegar até aqui.

Ao Prof. Dr. Renê Carneiro e todos os colaboradores do Instituto de Ciência Biológicas da Universidade Federal de Goiás, pelo auxílio nas análises realizadas neste estudo.

Ao Dr. Ole Becker e a todos do Departamento de Nematologia da Universidade da Califórnia, Riverside, por me receberem tão bem e me ajudarem no período do meu doutorado sanduíche.

A todos os representantes das empresas formuladoras dos produtos utilizados nos experimentos, pela disponibilidade e incentivo à pesquisa.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL 9
GENERAL ABSTRACT 10

1 INTRODUÇÃO GERAL 11

CAPÍTULO 1 - REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE TOMATEIRO E USO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE DE *Meloidogyne enterolobii* 16
ABSTRACT 18
2.1 INTRODUCTION 19
2.2 MATERIAL AND METHODS 20
2.3 RESULTS 23
2.4 DISCUSSION 27
2.5 ACKNOWLEDGEMENTS 31
2.6 LITERATURE CITED 31

CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO DE *Meloidogyne enterolobii* E HISTOPATOLOGIA COMPARADA EM TOMATEIROS TRATADOS COM INDUTORES DE RESISTÊNCIA 37
RESUMO 39
ABSTRACT 40
3.1 INTRODUÇÃO 40
3.2 MATERIAL E MÉTODOS 42
3.3 RESULTADOS 45
3.4 DISCUSSÃO 52
3.5 AGRADECIMENTOS 57
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 57

CAPÍTULO 3 - EFICÁCIA DE NOVOS NEMATICIDAS NO MANEJO DE *Meloidogyne incognita* EM TOMATEIRO 63
ABSTRACT 65
4.1 INTRODUCTION 66
4.2 MATERIAL AND METHODS 67
4.3 RESULTS 69
4.4 DISCUSSION 71
4.5 LITERATURE CITED 72

5 CONCLUSÕES GERAIS 77

6 REFERÊNCIAS 78

RESUMO GERAL

SILVA, J. O. **Alternativas de manejo de *Meloidogyne enterolobii* e *Meloidogyne incognita* em tomate industrial.** 2018. 81f. Tese (Doutorado em Agronomia: Fitossanidade) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018[1].

O nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) é um dos principais problemas fitossanitários que prejudicam o cultivo do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.). Dentre as espécies do gênero *Meloidogyne*, *M. incognita* se destaca como a espécie de maior importância para a cultura do tomateiro. Outra espécie que tem causado preocupação aos produtores é *M. enterolobii*, pois é capaz de se desenvolver em cultivares de tomateiro resistentes a outras espécies de *Meloidogyne*. Para um controle adequado desses fitoparasitas é necessário a utilização de um manejo integrado utilizando práticas como o uso de cultivares resistentes, controle biológico, indução de resistência, aplicação de nematicidas sistêmicos, entre outros. O presente estudo teve como objetivos avaliar genótipos de tomateiro quanto a sua reação ao *M. enterolobii*, assim como, verificar a eficiência de produtos químicos e biológicos na indução de resistência à *M. enterolobii* em plantas de tomateiro, avaliando o desenvolvimento dos nematoides e as modificações histológicas causadas nas células radiculares das plantas quando tratadas com esses produtos e avaliar três novos nematicidas não fumigantes na redução da população de *M. incognita* em tomateiro. Para a avaliação dos genótipos foram utilizados 21 genótipos inoculados com 2000 ovos e eventuais J2 de *M. enterolobii* e mantidos em casa de vegetação por 35 dias após a inoculação (DAI). Todos os genótipos testados foram suscetíveis ao *M. enterolobii*. Para verificar a eficácia dos indutores de resistência foram utilizados quatro genótipos de tomateiro submetidos a tratamentos com *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* + *B. subtilis* + *Trichoderma longibrachiatum*, Acibenzolar-S-Metil (ASM) e extrato de *Reynoutria sachalinensis*, inoculados com *M. enterolobii* e avaliados 60 dias após a inoculação. As plantas que receberam o tratamento com *B. subtilis* apresentaram maior desenvolvimento de parte aérea e raiz. O agente indutor de resistência ASM foi capaz de reduzir o fator de reprodução quando aplicado no genótipo PXT 408. Mudas da cultivar H-9553 foram inoculadas com 2000 ovos e eventuais J2 de *M. enterolobii* e submetidas aos tratamentos descritos e coletadas aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 DAI para avaliações de penetração dos nematoides e histopatologia das células radiculares do tomateiro. Na avaliação do desenvolvimento dos nematoides e histologia das células, o uso de extrato de *R. sachalinensis* reduziu o número de juvenis de quarto estádio e galhas nas plantas aos 20 DAI, reduziu a população final do nematoide e o número de fêmeas por galha. Todas as plantas infectadas pelo nematoide, independente do tratamento, apresentaram cilindro vascular deslocado do centro da estrutura das raízes. Mudas de tomateiro da cultivar Red Gnome foram submetidas a tratamentos com fluensulfone, fluopyran e fluazaindolizine e inoculadas com 5000 ovos e eventuais J2 de *M. incognita* e avaliadas aos 60 DAI para determinar a eficácia dos produtos utilizados. Os nematicidas testados apresentaram eficiência na redução da população de *M. incognita* nas raízes do tomateiro.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*, nematoide-das-galhas, resistência genética, controle químico, indução de resistência

[1] Orientadora: Profa. Dra. Mara Rúbia da Rocha. EA-UFG.

GENERAL ABSTRACT

SILVA, J. O. **Alternatives for *Meloidogyne enterolobii* and *Meloidogyne incognita* management in tomato**. 2018. 81f. Thesis (PhD in Agronomy: Plant Health) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018[2].

Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) is one of the main phytosanitary problems that hinder the cultivation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Among the species of the genus *Meloidogyne*, *M. incognita* stands out as the most important species for the tomato crop. Another species that has caused concern to the producers is *M. enterolobii*, due to its ability to develop in cultivars with resistance to other species of *Meloidogyne*. For an adequate control of these plant parasites it is necessary to adopt an integrated management using practices such as resistant cultivars, biological control, resistance induction, chemical control, among others. This study had the objective to evaluate the reaction of tomato genotypes to *M. enterolobii* and the effect of chemical and biological products on resistance induction of tomato plants to *M. enterolobii*. We also evaluated the efficiency of three non-fumigant nematicides on the *M. incognita* control in tomato plants. the development of nematodes and the histological modifications caused in the root cells of plants when treated with these products and evaluating three new non-fumigant nematicides in the reduction of the population of *M. incognita* in tomato. Twenty-one tomato genotypes were inoculated with 2000 eggs and J2 of *M. enterolobii* and kept in a greenhouse for 35 days after inoculation (DAI) were used. All genotypes tested showed a susceptibility reaction to *M. enterolobii*. Four tomato genotypes were submitted to treatments with *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* + *B. subtilis* + *Trichoderma longibrachiatum*, Acibenzolar-S-Methyl (ASM) and Extract of *Reynoutria sachalinensis*, inoculated with *M. enterolobii* and evaluated 60 days after inoculation. The plants that received the treatment with *B. subtilis* presented greater development of aerial part and root. The ASM resistance-inducing agent was able to reduce the reproductive factor when applied to the PXT 408 genotype. Seedlings of cultivar H-9553 were inoculated with 2000 *M. enterolobii* eggs and J2 and treated with ASM; *B. subtilis*; *B. subtilis* + *B. licheniformis* + *T. longibrachiatum* and Extract of *R. sachalinensis* and collected at 5, 10, 15, 20, 25, and 30 DAI for nematode penetration evaluation and histology of tomato root cells. In the evaluation of the nematode development and cell histology, the use of *R. sachalinensis* showed efficiency in the reduction of fourth stage juveniles and galls in the plants at 20 DAI and in the reduction of the final population of the nematode and reduced the number of females per gall. All the plants infected by the nematode, regardless of the treatment, presented vascular cylinder displaced from the center of the structure of the roots. Tomato seedlings of the Red Gnome cultivar were submitted to treatments with fluensulfone, fluopyran and fluazaindolizine and inoculated with 5000 eggs and J2 of *M. incognita* and evaluated at 60 DAI to determine the efficacy of the products used. The new nematicides tested showed efficiency in the reduction of the *M. incognita* population in the tomato roots.

Key-words: *Solanum lycopersicum*, root-knot nematode, genetic resistance, chemical control, resistance induced

[2] Adviser: Profa. Dra. Mara Rúbia da Rocha. EA-UFG.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais importantes em termos de produção e valor econômico, ocupando o segundo lugar em volume de produção mundial, sendo o primeiro lugar ocupado pela batata (*Solanum tuberosum* L.) (Cunha et al., 2014). De acordo com a Food and Agriculture Organization of the United Nations, no ano de 2016 a produção mundial de tomate ficou em torno de 177 milhões de toneladas, oriundas de aproximadamente 4,8 milhões de hectares de área plantada, com uma produtividade de 23 ton/há (FAO, 2016). Os principais países produtores de tomate para processamento industrial são Estados Unidos, Itália, China, Espanha e Brasil (WPTC, 2018). No Brasil o segmento de tomate industrial contribuiu com 24% da produção total de tomate, equivalentes a 1,4 milhão de tonelada de tomates processados. No Sudeste e Centro-Oeste se concentraram 73% da produção e os estados de Goiás (1329,8 mil t), São Paulo (675,2 mil t), Minas Gerais (558, 9 mil t), Paraná (281,9 mil t) e Bahia (193,0 mil t) foram os maiores produtores (Melo, 2014).

Nos últimos anos a cultura do tomateiro para processamento industrial vem se expandindo mundialmente, tanto em termos de área cultivada como de produtividade, em função de novas tecnologias e ao emprego de variedades melhoradas. A cadeia produtiva do tomateiro apresenta grande importância econômica ao agronegócio brasileiro, responsável por cerca de 16% do PIB gerado pela produção de hortaliças, apresentando um elevado aspecto econômico e social, por meio da geração de empregos e renda no campo (Geraldini et al., 2011).

A cultura do tomate é atacada por diversas pragas e doenças. Dentre os principais problemas fitossanitários dessa cultura se destaca o parasitismo por nematoides. Em áreas de cultivo de tomate pelo mundo os principais gêneros de nematoides que causam danos expressivos são *Meloidogyne*, *Belonolaimus*, *Trichodorus* e *Paratrichodorus* (Pinheiro et al., 2014). No Brasil, nematoides do gênero *Meloidogyne*, conhecidos como nematoide-das-galhas, são os principais causadores de danos econômicos em tomateiro. As espécies com maior distribuição em áreas com o plantio de tomate são *Meloidogyne*

incognita (Kofoid & White) Chitwood, *M. javanica* (Treub) Chitwood, *M. arenaria* (Neal) Chitwood e *M. hapla* Chitwood. São espécies bem adaptadas às condições climáticas, podendo ocorrer em vários tipos de solo, porém, causam maiores prejuízos econômicos em regiões quentes com solos arenosos e com baixos teores de matéria orgânica (Pinheiro et al., 2014).

Meloidogyne enterolobii Yank & Eisenback (sin: *M. mayaguensis* Rammah & Hirschmann) é uma espécie que vem ganhando notoriedade e aumentando a preocupação dos produtores, não só de tomate, mas também de diversas outras culturas. A primeira descrição desse fitonematoide no Brasil foi realizada em 2001 causando severos danos em lavouras de goiabeiras nos municípios de Petrolina (PE), Curaçá e Maniçoba (BA) (Carneiro et al., 2001). Em hortaliças foi relatada pela primeira vez no estado de São Paulo parasitando plantas de tomateiro e pimentão resistentes a outras espécies de *Meloidogyne* (Carneiro et al., 2006).

Com ampla distribuição ao redor do mundo, a espécie *M. incognita* é considerada cosmopolita e bem adaptada às condições climáticas nas regiões produtoras de tomate, aumentando assim a facilidade de disseminação (Freitas et al., 2001). O ciclo biológico dessa espécie dura em média quatro semanas, sendo bastante influenciado por fatores como temperatura, umidade e planta hospedeira. Espécies como *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. enterolobii* têm seu desenvolvimento pleno em temperaturas na faixa de 25 a 30ºC. Cada fêmea, em condições adequadas, é capaz de produzir cerca de 400 ovos, o que gera um rápido aumento da população em um curto período de tempo (Ferraz & Monteiro, 2011).

Plantas de tomateiro, quando atacadas severamente por *Meloidogyne* sp., apresentam aspecto clorótico, diminuição no crescimento, sistema radicular completamente desorganizado e pobres em raízes e com forte presença de galhas, reduzindo o número e qualidade dos frutos. Se a infestação ocorrer no estádio de plântula, essas podem morrer no transplantio para o campo e as que sobrevivem tem a frutificação grandemente afetada em quantidade e qualidade (Vale et al., 2013). *Meloidogyne enterolobii* causa galhas grandes e irregulares nas raízes das plantas, que podem apodrecer rapidamente devido à invasão de patógenos secundários, como *Fusarium* spp., *Verticillium* spp. e *Ralstonia* spp., intensificando os danos (Pinheiro et al., 2014). Essa espécie é considerada umas das mais importantes espécies de nematoide-das-galhas devido a sua agressividade e habilidade em se desenvolver em cultivares resistentes à outras espécies de *Meloidogyne*. *Meloidogyne*

enterolobii consegue se reproduzir em cultivares de tomate que apresentam o gene de resistência *Mi*, responsável por conferir resistência à outras espécies de *Meloidogyne*, e também suplanta a resistência em batata doce e soja resistentes a *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (Carneiro et al., 2001).

O controle do nematoide-das-galhas na cultura do tomate é bastante problemático, já que esses organismos são habitantes do solo e sob condições ambientais favoráveis multiplicam-se com rapidez e ficam protegidos da ação dos agrotóxicos ou dos organismos antagônicos (Pinheiro et al., 2014), devido a isso, vários métodos de controle, visando a supressão desse nematoide, têm sido pesquisados na tentativa de diminuir a densidade populacional do nematoide à um patamar que não cause danos econômicos à cultura, tentando tornar esse processo mais eficiente e econômico. Para o controle das fitonematoses é de grande importância a utilização de um manejo integrado, utilizando práticas como o uso de cultivares resistentes, controle biológico, incorporação de matéria orgânica, rotação de cultura com plantas não hospedeiras, indução de resistência e aplicação de nematicidas sistêmicos (Pinheiro et al., 2014).

A resistência genética é uma das melhores formas de controle de nematoides, e uma das mais buscadas também, pois tem fácil assimilação pelos agricultores, não aumenta os custos de produção, minimizando os riscos à saúde humana e não causa danos ao meio ambiente. Devido à co-evolução entre hospedeiro e patógeno e o consequentemente surgimento de novas espécies e raças, cultivares resistentes necessitam serem desenvolvidas constantemente (Alzate-Marin et al., 2005). A resistência aos nematoides-das-galhas foi identificada há mais de 60 anos. Os genes que contemplam essa resistência apresentam oito alelos (*Mi*1 a *Mi*8), sendo o alelo *Mi*1 o mais usado nos cruzamentos de cultivares comerciais de tomate. Porém, nem sempre esse gene se mostra eficiente na supressão da reprodução dos nematoides-das-galhas, já que ele pode se tornar inativo em temperaturas do solo acima de 30ºC ou pode não abranger determinadas raças ou espécies, como *M. enterolobii* (Pinheiro et al., 2009; Pinheiro et al., 2014; Rosa et al., 2014).

Quando não é possível o uso de cultivares resistentes deve-se fazer uso de outras práticas de manejo para tentar reduzir a população de nematoides nas áreas de cultivos. Uma opção que vem aumentando o número de adeptos dessa prática é a utilização de indução de resistência em plantas. A indução de resistência pode ser definida como uma resistência dinâmica baseada na produção de barreiras físicas e/ou químicas estimuladas pela aplicação de uma substância indutora, que pode ser microrganismos, metabolitos

microbianos, extrato de plantas, agentes químicos, entre outros (Walters et al., 2013). Microrganismos como rizobactérias, *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp., e fungos, *Trichoderma* spp. e *Fusarium* sp p., são usados como indutores bióticos de resistência contra diferentes fitopatógenos (Vu et al., 2006; Adam et al., 2014). Estes indutores ativam genes de defesas que fazem com que a planta responda a estresses, principalmente os causados por fitopatógenos. Ao acionar esses genes há um aumento nos níveis de hormônios o que acarreta na ativação de barreiras físicas e químicas contra os patógenos (Araújo & Menezes, 2009).

No manejo integrado o uso de nematicidas químicos pode ser combinado com outras práticas com o objetivo do uso de baixas dosagens de toxinas. No entanto, atualmente, os principais nematicidas disponíveis no mercado são das classes dos organofosforados e carbamatos, os quais são nematicidas de alta toxicidade aos seres humanos e organismos não alvos, e nas doses recomendadas esses nematicidas paralisam os nematoides (efeito nematostático) ao invés de matá-los ou apenas afetam diferentes aspectos de seu comportamento, sendo esse efeito revertido a remoção do nematicida (Opperman & Chang, 1990; Oka et al., 2009). Novos nematicidas não fumigantes têm sido desenvolvidos com o intuito de reduzir a população de nematoides sem causar danos aos microrganismos benéficos presentes no solo, ao meio ambiente e seres humanos (Oka et al., 2012; Faske et al., 2015; Lahm et al., 2017). Alguns estudos apontam os princípios ativos fluopyran, fluensulfone e fluazaindolizine como promissores nematicidas, com modos de ação distintos dos já conhecidos organofosforados e carbamatos, com atividade nematicida irreversível e com uma maior especificidade aos nematoides parasitas de plantas alvos (Morris et al., 2016; Faske et al., 2015; Lahm et al., 2017)

A busca por melhores e mais eficientes formas de manejo do nematoide-das-galhas nas diversas culturas que sofrem com o parasitismo desse patógeno vem se intensificando, aliada à necessidade de diminuir os danos causados ao meio ambiente, mas também levando em conta a necessidade dos produtores e as exigências dos órgãos reguladores. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos i) avaliar a reação de genótipos de tomateiro ao nematoide-das-galhas *M. enterolobii*; ii) avaliar a performance de produtos a base de microrganismos, extrato de planta ou acibenzolar-s-metil como indutores de resistência à *M. enterolobii*; iii) verificar a ação de indutores de resistência sobre o desenvolvimento do nematoide e nas modificações histológicas em plantas de

tomateiro infectadas; iv) avaliar a eficácia de três novos nematicidas não fumigantes na redução da população de *M. incognita* em tomateiro.

1

CAPÍTULO 1

REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE TOMATEIRO E USO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE DE *Meloidogyne enterolobii*[1,2]

REACTION OF TOMATO GENOTYPES AND USE OF RESISTANCE INDUCING PRODUCTS ON *Meloidogyne enterolobii* CONTROL

Juliana de Oliveira Silva*[3], Marcus Vinícius Santana[3], Franciele Alves Carneiro[3], Mara Rúbia da Rocha[3]

[1] Capítulo elaborado conforme as normas do periódico científico Journal of Nematology

[2] O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) – Código de Financiamento - 001.

[3] Programa de Pós-graduação em Agronomia, Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Avenida Esperança, Campus Samambaia, 74690900, Goiânia-GO, Brasil

REACTION OF TOMATO GENOTYPES AND USE OF RESISTANCE INDUCING PRODUCTS ON *Meloidogyne enterolobii* CONTROL[1]

Juliana de Oliveira Silva*[2], Marcus Vinícius Santana[3], Franciele Alves Carneiro[3], Mara Rúbia da Rocha[3]

*Author for correspondence: julianadeos13@gmail.com

[1] The present study was carried out with the financial support of Coordination of Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) – Financing Code – 001.

[2] Graduate Program in Agronomy, Faculty of Agronomy, Federal University of Goiás, Avenida Esperança, Campus Samambaia, 74690900, Goiânia-GO, Brazil

ABSTRACT

Meloidogyne enterolobii is characterized by its aggressiveness and ability to overcome resistance mediated by the *Mi* gene, this gene confers resistance to the main species of *Meloidogyne*, that are common in commercial tomato cultivars. However, resistant cultivars and resistance induction may be alternatives methods to keep the pest population at levels that do not cause economic damage. The aim of this study was to evaluate the reaction of tomato genotypes to *M. enterolobii* and test the efficacy of resistance inducers products in four tomato genotypes. Twenty-one tomato genotypes were inoculated with 2000 eggs and juveniles of *M. enterolobii* and evaluated after 35 days of inoculation for shoot and root weight, nematode population density and reproduction factor. All genotypes tested were susceptible to *M. enterolobii*. The average of nematode population density in the tested genotypes ranged from 5576 (SX91531) to 13449 (SX991907) eggs and J2 g^{-1} of root. To investigate the effect of resistance inducers, four tomato genotypes (PXT 403, PXT 406, PXT 408 e PXT 409) were selected and the plants were treated with *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* + *B. subtilis* + *Trichoderma longibrachiatum*, Acibenzolar-S-Methyl and Extract of *Reynoutria sachalinensis*. Plants were inoculated with 2000 eggs and J2 of *M. enterolobii* and evaluated after 60 days of inoculation for shoot and root weight, nematode population density and reproduction factor. The plants treated with *B. subtilis* presented greater plant development by showing higher shoot and root weight. The ASM reduced the nematode reproduction factor when applied to the PXT 408 genotype. The use of resistance inducers may be a promising tool to assist in the integrated management system for *M. enterolobii*.

Key-words: resistance induction, genetic resistance, root-knot nematode, *Solanum lycopersicum*

2.1 INTRODUCTION

The attack of the root-knot nematode species is one of the main problems faced by tomato growers (Seid et al., 2015). Species such as *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919; Chitwood, 1949) and *M. javanica* (Treub, 1885; Chitwood, 1949) are the most frequent in the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) producing areas (Seid et al., 2015), both for fresh consumption and industry. However, the species *M. enterolobii* (Yank & Eisenback) has been identified in new areas at an increasing frequency causing concern for the growers (Kiewnick et al., 2008; Pinheiro et al., 2014). This species is characterized by its aggressiveness and ability to overcome the resistance mediated by the *Mi* gene (Kiewnick et al., 2009; Rosa et al., 2014), present in most commercial resistant tomato cultivars. This gene confers resistance to the main species of *Meloidogyne* but do not prevent the development of *M. enterolobii* (Carneiro et al., 2001).

Plant parasitic nematodes management is not simple, the use of chemicals, such as fumigants, carbamates and organophosphates is increasingly restricted due to its high toxicity to non-target organisms, animals, humans and the environment (Molinari, 2011). The use of resistant cultivars is one of the most effective management methods for the reduction of root-knot nematode populations and one of easier practices to be adopted by the farmers (Pinheiro et al., 2014). Although most of the tomato cultivars for industrial processing has the *Mi* resistance gene, this resistance does not protect against *M. enterolobii*, making tomato production difficult in areas infested with this species (Oka et al., 2000).

The difficulty of finding sources of resistance to *M. enterolobii* in tomato (Kiewnick et al., 2009; Rosa et al., 2014) has been increasing the research of alternatives for the management of this pathogen. Resistance induction has been gaining ground in research on nematode control methods (Mostafanezhad et al., 2014; Medeiros et al., 2015). The plants may have resistance mechanisms that are activated when these plants are attacked by pests or

pathogens (Denancé et al., 2013; Mostafanezhad et al., 2014; Medeiros et al., 2015). For resistance to be considered induced, these mechanisms must be present inactive or latent in the plants, being activated after the plants are exposed to induction agents (Kuc, 2001). The inducing agents may be biotic or abiotic. Among the most commonly used resistance inducers studied is the Acibenzolar-S-Methyl (ASM), an analogue of salicylic acid, which activates genes that encode proteins and enzymes related to the production of phytoalexins and lignin (Resende et al., 2000).

Microrganisms and plant extracts can also be resistance inducers in plants (Stangarlin et al., 1999). Fungi and bacteria have been evaluated for their ability to induce resistance, being an alternative to the use of chemicals. Developed studies proved the effect of crude extract or essential oil obtained from medicinal plants on the control of pathogens, since they have secondary compounds responsible for the induction of resistance in plants (Stangarlin et al., 1999).

Assorted products used in the control of fungal and bacterial diseases have been tested as inductors of resistance, aiming to strengthen the plant against biotic and abiotic stresses. Therefore, this work aimed to evaluate the reaction of industry tomato genotypes to the root-knot nematode *M. enterolobii* and the performance of commercial products, formulated with microorganisms, plant extract or ASM as resistance inductors of tomato plants to *M. enterolobii*.

2.2 MATERIAL AND METHODS

Meloidogyne enterolobii was isolated from roots of guava (*Psidium guajava* L.) plant and maintained on roots of tomato cultivar Santa Cruz Kada Gigante grown in sterile soil under greenhouse conditions. For inoculum preparation the roots of tomato infected with *M. enterolobii* were removed from the pots and washed in water. The eggs were extracted

according to the methodology proposed by Bonetti & Ferraz (1981).

The experiments were carried out under greenhouse conditions at the Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil (16°35'S; 49°16'W). In the first study we tested the reaction of 21 tomato genotypes to *M. enterolobii* and the second study we evaluated the efficacy of five treatments on inducing resistance to the nematode in four tomato genotypes. For each study the experiments were conducted twice in the periods of December/15 to February/16 and April to June/16 . All genotypes were obtained from a commercial nursery and are destined for industrial processing purposes having the *Mi* gene, which confers resistance to the major species of *Meloidogyne*.

Seedlings with 30 days were transplanted to polypropylene pots of 1.5 liters (one seedling per pot) containing sand and soil (1:1, by volume) previously autoclaved, incubated in a greenhouse. At 5 days after transplanting, the plants were inoculated with 2000 eggs and any J2 of *M. enterolobii*, dispersed in two holes around the plant collar. Experimental pots were exposed to natural light and photoperiod, and ambient temperature fluctuating approximately 23-39°C during the growing period.

Twenty-one tomato genotypes were used for evaluating the reaction to *M. enterolobii*, as follows: N901, PXT403, PXT406, PXT408, PXT409, PXT412, PXT503, PXT504, PXT506, PXT568, PXT570, PXT571, SX91516, SX91527, SX91531, SX91539, SX91906, SX91907, SX91910, SX91911 and SX91912. The experimental design was completely randomized with ten replications.

Thirty-five days after inoculation (DAI) the plants were removed from the pots and the roots washed in running water. The fresh shoots and roots were weighted. The nematode population density was assessed after extraction of eggs and J2 based on the procedure of Bonetti & Ferraz (1981). Counting was performed under an optical microscope (40x magnification) with the aid of a Peters slide. The result was presented as population

density (number of eggs and J2 g^{-1} of roots). The reproduction factor (RF) was determined according to Oostenbrink (1966). Genotypes with RF less than 1 were considered resistant and those with RF greater than or equal to 1 were considered susceptible to *M. enterolobii* (Oostenbrink, 1966).

Four tomato genotypes (PXT 403, PXT 406, PXT 408 and PXT 409) were selected for the second study. These are advanced genotypes from the nursery breeding program, selected for high productivity, resistance to some of the major tomato diseases and have the *Mi* gene, which confers resistance to *M. incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. The plants were submitted to five treatments, as follows: Acibenzolar-S-Methyl (Bion®-Syngenta) (10g a.i./100L water); *Bacillus subtilis* (Serenade®-Bayer) (2L c.p./ 1000ml water); *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis* and *Trichoderma longibrachiatum* (NemOut™ - Altech CropScience) (8L c.p./1000L water); *Reynoutria sachalinensis* extract (Regalia Maxx®-FMC) (2L c.p./1000L water) and a non-treated control. The experimental design was completely randomized in a 5 x 4 factorial scheme (5 treatments x 4 tomato genotypes) with five replications.

At five days after transplanting, the plants were inoculated with 2000 eggs and J2 of *M. enterolobii*, dispersed in two holes around the plant collar. The products were sprayed on the plant shoots in three applications (7, 14 and 21 days after inoculation) using pressure sprayer (Brudden®, Pompeia, SP, Brazil) with capacity of 1.5L. During the applications the soil was covered with plastic bag to avoid the contact with the products.

Sixty days after inoculation, nematodes were extracted from the roots. The shoot and root weight were determined. The process of extracting eggs and J2 was according to the methodology proposed by Bonetti & Ferraz (1981). The reproduction factor was determined according to Oostenbrink (1966).

Normality of data residues and variance homogeneity were verified using non-parametric Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively. When necessary the data were transformed using Box and Cox (1964) method prior to analysis to stabilize the variance and normalize the data residues. For the genotypes selection experiments, a one-way ANOVA was performed followed by the Scott-Knott test for comparison of means. For the products efficacy on tomato genotypes experiments, a two-way ANOVA was performed followed by the Tukey test for comparison of means. All statistical analysis was performed in the free statistical environment R (R Development Core Team, 2017).

2.3 RESULTS

The phenotypic response of tomato genotypes to *M. enterolobii* differed in fresh shoot weight (FSW) ($F_{20,399}$= 2.64; P< 0.001) and fresh root weight (FRW) ($F_{20,399}$= 2.61; P< 0.001). However, there was no significant difference for nematode population density ($F_{20,399}$= 0.99; P= 0.474) and reproduction factor (RF) ($F_{20,399}$= 0.77; P= 0.754) (Table 1).

Fresh shoot weight averages ranged from 20.57g (SX91539) to 11.27g (SX91907). The highest mean number of FSW was observed in the genotypes PXT403, PXT406, PXT412, PXT504, PXT506, PXT570, PXT571, SX91516, SX91527, SX91531, SX91539, SX91906 and SX91910. For the fresh root weight, the values ranged from 4.81g (SX91527) to 1.75g (SX91907). The genotypes PXT406, PXT570, SX91516, SX91527, SX91539, SX91906, SX91910 and SX91911 had the highest FRW. All tomato genotypes showed susceptible reaction to *M. enterolobii* presenting RF>1.0 (Table 1).

Analysis of variance showed that shoot weight was significantly influenced by resistance inducers ($F_{4,47}$= 4.28; P= 0.002) (Table 2). However, there was no difference between genotypes ($F_{3,47}$= 0.514; P= 0.673). Root weight was significantly influenced by

resistance inducers ($F_{4,47}$= 12.19; P< 0.001) and genotypes ($F_{3,47}$= 3.21; P= 0.024) in isolated effects.

Table 1. Fresh shoot weight (FSW) and fresh root weight (FRW), population density (number of eggs and J2 g^{-1} of roots), reproduction factor (RF) and susceptibility/resistance reaction of tomato genotypes inoculated with *Meloidogyne enterolobii*[1]. The experiments were carried out in the periods from Dec/15 to Feb/16 and April to June/16.

Genotypes	FSW	FRW	Population density[2]	RF[2]	Reaction
PXT570	18.07 a	3.36 a	11603	19.85	S
PXT409	16.16 b	3.52 b	10992	18.57	S
SX91527	19.59 a	4.81 a	7458	15.86	S
SX91539	20.57 a	4.36 a	7808	14.32	S
SX91910	18.1 a	3.64 a	7816	13.84	S
PXT506	18.81 a	3.47 b	8071	13.35	S
PXT408	16.15 b	3.10 b	9844	12.91	S
SX91911	15.40 b	4.25 a	6933	12.84	S
SX91516	20.45 a	4.22 a	6967	12.74	S
PXT412	19.55 a	3.26 b	7884	12.58	S
PXT568	15.45 b	3.04 b	8487	12.56	S
PXT503	16.92 b	3.09 b	9055	12.43	S
SX91906	19.99 a	4.22 a	6288	12.2	S
SX91907	11.27 c	1.75 c	13449	12.1	S
PXT504	18.36 a	3.27 b	9329	11.94	S
PXT406	19.05 a	3.93 a	6662	11.91	S
PXT403	17.94 a	2.94 b	9235	11.7	S
SX91531	18.50 a	3.21 b	5576	9.51	S
SX91912	16.63 b	2.84 b	6746	9.45	S
PXT571	17.94 a	2.73 b	6818	8.97	S
N901	16.92 b	3.43 b	8638	12.64	S
$F_{20,399}$	2.64	2.61	0.99	0.77	-
P value	<0.001	<0.001	0.474	0.754	-
C.V. (%)	33.21	60.55	14.83	47.68	-

[1]Means followed by the same letter in the column do not differ by Scott-Knott's test (p <0.05).

[2] The means were transformed according to Box and Cox (1964). S: Susceptible

No resistance inducers *vs.* genotype interaction was found, indicating that responses of these variables (shoot weight, root weight, and nematodes) to resistance inducers did not change with the change in genotype. Nematode density was not influenced by the treatments. Interaction effect between resistance inducers and genotype was observed only for the reproduction factor ($F_{12,47}$= 2.50; *P*= 0.005).

In relation to the weight, in grams of root, the genotype PXT406 presented greater root weight compared to PXT403, however there was no difference between this genotype and the genotypes PXT408 and PXT409. Also, no differences were observed among genotypes for the variables shoot weight and nematode population density (eggs and J2 g^{-1} root) (Table 3).

Table 2. Two-way ANOVA examining the interaction between tomatoes genotypes and resistance inducers on plant development and nematode density.

Variation factor	DF	Shoot weight (g plant^{-1})[1]		Root weight (g plant^{-1})		Nematodes (eggs and J2 g^{-1} of root)[1]		Reproduction factor[1]	
		F	*P*-value	F	*P*-value	F	*P*-value	F	*P*-value
Genotypes (G)	3	0.514	0.673	3.206	0.024	0.328	0.805	2.212	0.088
Resistance inducers (RI)	4	4.280	0.002	12.194	<0.001	0.246	0.912	2.222	0.068
Interaction (GxRI)	12	0.861	0.5882	0.747	0.704	1.733	0.063	2.501	0.005
C.V. (%)	-	23.03		38.29		10.04		25.32	

[1] Data transformed by Box & Cox (1964) method.

The plants treated with *B. subtilis* had higher shoot weight compared to the plants treated with ASM or *B. licheniformis* + *B. subtilis* + *T. longibrachiatum*, however, none of the treatments were different from the non-treated (Table 3). Plant root weight was also higher with the treatment *B. subtilis* compared to plants receiving ASM, *B. licheniformis* + *B.*

subtilis + *T. longibrachiatum* or *R. sachalinensi*. Only ASM-treated plants had lower values of root weight compared to the non-treated control. The PXT 403 genotype showed the lowest root weight, differing from the PXT406 genotype. However, no difference among genotypes or resistance inducers was observed for nematode population density (Table 3).

Table 3. Effect of tomato genotypes and resistance inducers on shoot and root weight and *Meloidogyne enterolobii* population density (eggs and J2/g of root) in greenhouse[1]. The experiments were carried out in the periods from Dec/15 to Feb/16 and April to June/16.

Shoot Weight (g plant^{-1})						
Genotypes	Resistance inducers					Average
	Non-treated	ASM	*B.s.*	*B.l.+B.s.+T.lon.*	*R.s.*	
PXT 403	19.50	12.58	14.54	11.72	12.51	14.17a
PXT 406	16.14	13.15	17.50	14.46	14.62	15.17a
PXT 408	17.69	11.88	23.53	14.51	12.88	16.10a
PXT 409	16.83	13.63	16.94	13.68	16.32	15.48a
Average	17.54AB	12.81B	18.13A	13.59B	14.08AB	
Root Weight (g plant^{-1})						
Genotypes	Non-treated	ASM	*B.s.*	*B.l.+B.s.+T.lon.*	*R.s.*	Average
PXT 403	4.21	3.28	4.24	3.16	3.27	3.63b
PXT 406	4.85	3.43	6.45	4.19	4.00	4.58a
PXT 408	4.83	2.58	5.64	3.56	3.37	4.00ab
PXT 409	4.59	3.29	5.07	3.99	4.29	4.25ab
Average	4.62AB	3.15C	5.35A	3.73BC	3.73BC	
Eggs and J2 g^{-1} of root						
Genotypes	Non-treated	ASM	*B.s.*	*B.l.+B.s.+T.lon.*	*R.s.*	Average
PXT 403	16238	15203	14598	11425	12857	14064a
PXT 406	16075	22471	9148	21047	18264	17401a
PXT 408	8976	7076	23068	20716	21350	16237a
PXT 409	16369	20384	18563	12526	17699	17108a
Average	14415A	16283A	16344A	16429A	17542A	

[1]Values with the same letter lowercase in the column and capital letters in the row do not differ significantly, according to the Tukey test ($P \geq 0.05$; n=10). ASM: Acibenzolar-S-Methyl; B.s.: *Bacillus subtilis*; B.l.+B.s.+T.lon.: *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis* and *Trichoderma longibrachiatum*; R.s.: *Reynoutria sachalinensis* extract.

The ASM reduced the nematode reproduction factor when applied in the PXT 408 genotype, reaching 57% reduction in relation to the non-treated control. However, this reduction was not maintained for the other genotypes and was also not observed in the other treatments with the different products (Table 4).

Table 4. *M. enterolobii* reproduction factor on different tomato genotypes treated with resistance inducer products[1].

Genotypes	Resistance inducers					F (G)	*P*-value
	Non-treated	ASM	*B.s.*	*B.l.+B.s.+T.lon.*	*R.s.*		
PXT 403	29.44 aA	22.05 aA	30.07 aA	15.03 aA	18.70 aA	1.308	0.269
PXT 406	32.62 aA	37.52 aA	24.03 aA	43.53 aA	29.07 aA	0.764	0.550
PXT 408	19.84 aA	8.68 bB	43.34 aA	30.79 aA	33.16 aA	6.162	<0.001
PXT 409	41.12 aA	31.10 aA	40.04 aA	22.94 aA	34.92 aA	1.490	0.207
F (P)	1.291	6.900	1.171	2.381	0.472	-	-
P-value	0.279	<0.001	0.322	0.071	0.702	-	-

[1]Values with a same letter lowercase in the column and capital letters in the row do not differ significantly, according to the Tukey test ($P \geq 0.05$; n=10). ASM: Acibenzolar-S-Methyl; B.s.: *Bacillus subtilis*; B.l.+B.s.+T.lon.: *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis* and *Trichoderma longibrachiatum*; R.s.: *Reynoutria sachalinensis* extract.

2.4 DISCUSSION

All tomato genotypes tested were susceptible to *M. enterolobii* presenting RF higher then 8.0. These results proved that the *Mi* gene present in the genotypes tested, that confers genetic resistance to *M. javanica*, *M. incognita* and *M. arenaria* is inefficient in reducing *M. enterolobii* population. All the genotypes allowed a good development of the nematode in the roots showing that the *Mi* gene is not activated or is not effective in the presence of this nematode species. Moreover, the best plant development was observed when

treated with *B. subtilis*. The ASM inducer reduced the nematode reproduction factor when applied in the PXT 408 genotype, however only ASM-treated plants presented lower development.

The ability of *M. enterolobii* to overcome genetic resistance can be an intrinsic characteristic of this species (Carneiro et al., 2006; Westerich et al., 2011). This nematode species presents aggressive behavior and wide polyphagia for the majority of cultivated vegetable species when compared to other species of *Meloidogyne*. The mechanism of resistance triggered by the *Mi* gene is known as the hypersensitivity reaction (HR), which causes the death of the cells near the nematode feeding site due to histological changes. This is a rapid reaction occurring within 12 hours after the infection and the attempt of nematode to establish in the plant roots (Pinheiro et al., 2009).

In this study, the genotype SX91907 showed the lowest fresh shoot and root weight, as well as the highest nematode density value per gram of root, thus showing its high susceptibility to this nematode. It was not possible to observe differences among the reproductive factors, but it also showed the efficiency of this nematode to reproduce in tomato genotypes harboring the *Mi* resistance gene, all values were higher than 8.0. Several studies have reported the ability of this nematode to overcome the resistance mediated by the *Mi* gene, both in commercial cultivars and in rootstocks, and the difficulty to find resistance sources for the control of this nematode (Cantu et al., 2009; Kiewnick et al., 2009; Rosa et al., 2014). Melo et al. (2011) reported a high development and reproduction of *M. enterolobii* evaluating tomato genotypes carrying the *Mi* gene, with reproductive factors reaching 18.4. This indicates that resistance to *M. enterolobii* is apparently mediated by different genes than those that provide resistance to other species of *Meloidogyne* (Melo et al., 2011). However, 18 of tomato accesses out, of 83 tomato accessions from Embrapa Hortaliças Germplasm Bank, presented moderate resistance and one of then, CNPH 1543, was highly resistant to *M.*

enterolobii (Pinheiro et al., 2009). Results such as these open the perspective for the discovery of new resistance genes. Therefore, it is important to continue the search for resistance sources especially in advanced tomato lines or genotypes that already carries the *Mi* gene, in order to incorporate the resistance to the commercial cultivars.

As with genetic resistance, other forms of management should be used to reduce nematode populations and improve plant development. Rhizobacteria are known for their ability to promote plant growth and development through various mechanisms. The treatment with *Bacillus subtilis* in this study increased the development of the tomato plants. Several studies have shown the ability that *Bacillus* sp. has to improve the vegetative development of the plants submitted to this rhizobacteria (Araújo and Marchesi, 2009, Oliveira et al., 2009). Tomato plants when treated with *B. subtilis* increased shoot and root weight one week after inoculation with *M. incognita* (Sharaf et al., 2016). This increase in growth is a consequence of increased nitrogen fixation, nutrient solubilization, phytonutrient syntheses and improvements in soil conditions provided by the rhizobacteria *B. subtilis* (Manjula and Podile, 2005).

As with our study, other authors have also shown that with the application of ASM it is possible to observe a reduction of the fresh root mass when compared to the treatment without application (Chinnasri et al., 2006). This can be explained by the fact that every attempt at resistance has a metabolic cost to the plant. When the plant is submitted to a treatment to induce resistance against a particular pathogen it mobilizes part of its energy, destined to its vegetative development, for its defense, thus reducing its growth to try to avoid the colonization of the pathogen in its system (Iriti and Faoro, 2003).

Treatments with ASM delay development and reduce the fertility of *Meloidogyne* sp., which leads to reduced reproduction of this pathogen. In this study the treatment with ASM was not efficient in reducing the nematode density, only the reproduction of the

nematode, since the product does not directly affect the hatching, survival or penetration of the nematode in the host roots, but it acts in the reduction of the development and nematode reproduction (Molinari and Baser, 2010; Puerari et al., 2013). Silva et al. (2004) observed the reduction of the *M. incognita* population in tomato by inducing resistance through ASM spraying seven days after transplanting of the seedlings. It is possible that plants with different genotypes respond in diverse ways to the inducer, varying the time required for the activation of their defense mechanisms, since these mechanisms are regulated by genes present in each plant, and these genes may vary in each genotype. Therefore, additional studies are required to obtain information on the response time of each genotype to the inducing agent.

The time of application of the resistance inductors is another factor to be considered, and that can interfere in the efficiency of the treatment, since the plant needs a period of recognition of the inducer and activation of the defense mechanisms. This period can be a limiting factor when it comes to induction of resistance in annual plants, aiming the control of nematodes, with the use of products of foliar application, since the applications of these products are made after the plant emergence and that the nematode penetrates the roots soon after germination (Brito et al., 2016). However, Silva et al. (2004), Puerari et al. (2013, 2015) and Brito et al. (2016) observed a reduction of the nematode population even with the application of the inducing agent, only in the aerial part of the plants, after inoculation.

The absence of the direct effect of the products on the nematode is evidence that suggests that the control mechanism in question is related to induction of resistance. ASM was able to reduce nematode reproduction when combined with the PXT408 genotype, which shows that there may be influence of both the applied product and the genotype used in areas with the presence of *M. enterolobii*. In addition, the use of different methods of control may minimize the selection pressure on resistant individuals. However, the key element involved

in the induction of resistance against nematodes is the activation of genes encoding proteins or enzymes capable of interfering with nematode development and growth (Chinnasri et al., 2003). Thus, future studies on proteins and enzymes involved in this pathosystem are necessary for a better understanding of how induction of resistance occurs in tomato plants infected by *M. enterolobii* and will be valuable to understanding the mechanisms underlying the resistance inducers agents-genotypes interactions and to validating the efficacy of this integrated control strategy under field conditions.

2.5 ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Vivati® nursery for making available to us the genotypes for testing and the companies formulating the products used in this study for giving us the products for the tests.

2.6 LITERATURE CITED

ARAÚJO, F. F., and MARCHESI, G. V. P. 2009. Use of *Bacillus subtilis* in the control of root-knot nematode and the growth promotion in tomato. Ciência Rural 39(5):1558-1561.

BONETTI, J. I. S.; FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira 6(3):553.

BOX, G. E. P., and COX, D. R. 1964. An analysis of transformations. Journal of the Royal Statistical Society 26(2):211-252.

BRITO, O. D. C., PUERARI, H. H., HERNANDES, I., FERREIRA, J. C. A., CARDOSO, M. R., and DIAS-ARIEIRA, C. R. 2016. Métodos de aplicação e concentrações de acibenzolar-s-metil no manejo de *Meloidogyne javanica* em soja. Nematropica (64):106-113.

CANTU, R. R., WILCKEN, S. R. S., ROSA, J. M. O., and GOTO, R. 2009. Reação de porta-enxertos de tomateiros a *Meloidogyne mayaguensis*. Summa Phytopathologica 35:124-126.

CARNEIRO, M. R. D. G., MOREIRA, W. A., ALMEIDA, M. R. A., and GOMES, A. C. M. M. 2001. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Brasil. Nematologia Brasileira 25(2):223-228.

CARNEIRO, R. M. D. G., ALMEIDA, M. R. A., BRAGA, R. S., ALMEIDA, C. A. de, and GIORIA, R. 2006. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* parasitando plantas de tomate e pimentão resistentes meloidoginose no estado de São Paulo. Nematologia Brasileira 30(1):81-86.

CHINNASRI, B., SIPES, B. S., and SCHMITT, D. P. 2003. Effects of acibenzolar-S-methyl application to *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. Journal of Nematology 35:110-114.

CHINNASRI, B., SIPES, B. S., and SCHMITT, D. P. 2006. Effects of inducers of systemic acquired resistance on reproduction of *Meloidogyne javanica* and *Rotylenchulus reniformis* in pineapple. Journal of Nematology 38:319-325.

DENANCÉ, N., SÁNCHEZ-VALLET, A., GOFFNER, D., and MOLINA, A. 2013. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. Frontiers in Plant Science 4(155):1-12.

IRITI, M., and FAORO, F. 2003. Does benzothiadiazole induced resistance increase fitness cost in bean? Journal of Plant Pathology 85(4):265-270.

KIEWNICK, S., KARSSEN, G., BRITO, J. A., OGGENFUSS, M., and FREY, J. E. 2008. First report of root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* on tomato and cucumber in Switzerland. Plant Disease 92(9):1370-1370.

KIEWNICK, S., DESSIMOZ, M, and FRANCK, L. 2009. Effects of the Mi-1 and the N root-knot nematode- resistance gene on infection and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and pepper cultivars. Journal of Nematology 41(2):134-139.

KUC, J. 2001. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. European Journal of Plant Pathology 107:7-12.

MANJULA, K., and PODILE, A. R. 2005. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. World Journal of Microbiology & Biotechnology 21:1057–1062.

MEDEIROS, H. A., RESENDE, R. S., FERREIRA, F. C., FREITAS, L. G., and RODRIGUES, F. A. 2015. Induction of resistance in tomato against *Meloidogyne javanica* by *Pochonia chlamydosporia*. Nematoda 2: e10015.

MELO, O. D., MALUF, W. R., GONÇALVES, R. J. de S., GONÇALVES NETO, A. C. G., GOMES, L. A. A., and CARVALHO, R. C. 2011. Triagem de genótipos de hortaliças para resistência a *Meloidogyne enterolobii*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 46(8):829-835.

MOLINARI, S. 2011. Natural genetic and induced plant resistance, as a control strategy to plant-parasitic nematodes alternative to pesticides. Plant Cell Report 30:311-323.

MOLINARI, M., and BASER, N. 2010. Induction of resistance to root-knot nematodes by SAR elicitors in tomato. Crop Protection 11:1354-1362.

MOSTAFANEZHAD, H., SAHEBANI, N., and ZARGHANI, S. N. 2014. Induction of resistance in tomato against root-knot nematode *Meloidogyne javanica* with salicylic acid. Journal of Crop Protection 3(4): 499-508.

OKA, Y., KOLTAI, H., BAR-EYAL, M., MOR, M., SHARON, E., CHET, I., and SPIEGEL, Y. 2000. New strategies for the control of plant-parasitic nematodes. Pest Management Science 56:983–988.

OLIVEIRA, D. F., CARVALHO, H. W. P., NUNES, A. S., CAMPOS, V. P., SILVA, G. H., and CAMPOS, V. A. C. 2009. Active substances against *Meloidogyne exigua* produced in a liquid medium by *Bacillus megaterium*. Nematologia Brasileira 33:271-277.

OOSTENBRINK, M. 1966. Major characteristic of relation between nematodes and plants. Mededelingen Landbouwhogeschool 66(4):1-46.

PINHEIRO, J. B.. BOITEUX, L. S., LOPES, C. A., and SILVA, G. O. da. 2009. Identificação de fontes de resistência ao nematoide *Meloidogyne mayaguensis* em acessos de tomateiro (*Solanum* secção *Lycopersicon*). Brasília: Embrapa Hortaliças (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 56).

PINHEIRO, J. B., PEREIRA, R. B., and SUINAGA, F. A. 2014. Manejo de nematoides na cultura do tomate. Embrapa, Circular Técnica.

PUERARI, H. H., DIAS-ARIEIRA, C. R., DADAZIO, T. S., MATTEI, D., SILVA, T. R. B., and RIBEIRO, R. C. F. 2013. Evaluation of acibenzolar-S-methyl for the control of *Meloidogyne javanica* and effects on the development of susceptible and resistant soybean. Tropical Plant Pathology 38:44-48.

PUERARI, H. H., DIAS-ARIEIRA, C. R., CARDOSO, M. R., HERNANDES, I., and BRITO, O. D. C. 2015. Resistance inducers in the control of root lesion nematodes in resistant and susceptible cultivars of maize. Phytoparasitica 14:447-449.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2017. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from http://wwwr-projectorg/.

RESENDE, M. L. V., NOJOSA, G. B. A., AGUILAR, M. A. C., SILVA, L. H. C. P., NIELLA, G. R., CARVALHO, G. A., GIOVANINI, G. R., and CASTRO, R. M. 2000. Perspectivas da indução de resistência em cacaueiros contra *Crinipellis perniciosa* através do benzotiadiazole (BTH). Fitopatologia Brasileira 25(2):152-162.

ROSA, J. M. O, WESTERICH, J. N., and WILCKEN, S. R. S. 2014. Reação de genótipos e híbridos de tomateiro à *Meloidogyne enterolobii*. Ciência Rural 44(7):1166-1171.

SEID, A., FININSA, C., MEKETE, T., DECRAEMER, W., and WESEMAEL, W. M. L. 2015. Tomato (*Solanum lycopersicum*) and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) – a century-old battle. Nematology 17(9):995-1009.

SHARAF, A. E-M. M. A., KAILLA, A. M., ATTIA, M. S., and NOFAL, M. M. 2016. Induced resistance in tomato plants against root knot nematodes using biotic and abiotic inducers. International Journal of Advanced Research in Biological Science 3(11):31-46.

SILVA, L. H. C. P., CAMPOS, J. R., DUTRA, M. R., and CAMPOS, V. P. 2004. Aumento da resistência de cultivares de tomate a *Meloidogyne incognita* com aplicações do acibenzolar-s-metil. Nematologia Brasileira 28:199-206.

STANGARLIN, J. R., SCHAWN-ESTRADA, K. R. F., CRUZ, M. E. S., and NOZAKI, M. H. 1999. Plantas medicinais e o controle alternativo de fitopatógenos. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento 11:16-21.

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

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO DE *Meloidogyne enterolobii* E HISTOPATOLOGIA COMPARADA EM TOMATEIROS TRATADOS COM INDUTORES DE RESISTÊNCIA[1][2]

Meloidogyne enterolobii DEVELOPMENT AND COMPARED HISTOPATHOLOGY IN TOMATO PLANTS TREATED WITH RESISTANCE INDUCERS

Juliana de O. Silva[3]*, Camilla M. Oliveira[4], Renê G. da S. Caneiro[4], Mara R. da Rocha[3]

[1] Capítulo elaborado conforme as normas do periódico Tropical Plant Pathology

[2] O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento - 001.

[3] Programa de Pós Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, Campus Samambaia, 74690-900, Goiânia – GO, Brasil.

[4] Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Campus Samambaia, 74690-900, Goiânia – GO, Brasil.

DESENVOLVIMENTO DE *Meloidogyne enterolobii* E HISTOPATOLOGIA COMPARADA EM TOMATEIROS TRATADOS COM INDUTORES DE RESISTÊNCIA[1]

Meloidogyne enterolobii DEVELOPMENT AND COMPARED HISTOPATHOLOGY IN TOMATO PLANTS TREATED WITH RESISTANCE INDUCERS

Juliana de O. Silva[2]*, Camilla M. Oliveira[3], Renê G. da S. Caneiro[3], Mara R. da Rocha[2]

*Autor para correspondência: julianadeos13@gmail.com

[1] O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento – 001.

[2] Programa de Pós Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, Campus Samambaia, 74690-900, Goiânia – GO, Brasil.

[3] Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Campus Samambaia, 74690-900, Goiânia – GO, Brasil.

RESUMO

Meloidogyne enterolobii tem sido reportada como uma das principais pragas da cultura do tomate. Indução de resistência pode ser uma alternativa viável ao controle desse nematoide. Este estudo objetivou verificar a ação de produtos indutores de resistência sobre o ciclo biológico de *M. enterolobii* e comparar modificações histológicas nas plantas de tomateiro infectadas. Mudas da cultivar de tomate H-9553 foram transplantadas para recipientes plásticos (500 mL), inoculadas com 2000 ovos e eventuais J2 de *M. enterolobii* e submetidas aos tratamentos com Acibenzolar-S-metil (ASM); *Bacillus subtilis*; *B. subtilis+B. licheniformis+Trichoderma longibrachiatum* e extrato de *Reynoutria sachalinensis*. As plantas foram coletadas aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias após a inoculação (DAI) para avaliações de penetração e histologia e, aos 30 DAI para avaliação da população final de nematoides. O uso de extrato de *R. sachalinensis* mostrou eficiência na redução de juvenis de quarto estádio (J4) e galhas nas plantas aos 20 DAI e na redução da população final do nematoide. Nos tratamentos controle, ASM e extrato de *R. sachalinenis* foi possível observar uma fêmea por galha, enquanto que nos outros tratamentos mais de uma fêmea foi observada em cada galha. O extrato de *R. sachalinensis* foi eficiente em reduzir a população final de *M. enterolobii* e a sua reprodução.

Palavras chaves: Indução de resistência, nematoide-das-galhas, controle alternativo, interação nematoide-planta

ABSTRACT

Meloidogyne enterolobii is one of the main pests of the tomato crop. Resistance induction may be a viable alternative to control this nematode. This study aimed verify the action of products used to induce resistance on *M. enterolobii* biological cycle and to compare histological changes in infected tomato plants. Seedlings of cultivar H-9553 were transplanted into plastic cups (500 mL), inoculated with 2000 eggs and any J2 of *M. enterolobii* and treated with Acibenzolar-S-methyl (ASM); *Bacillus subtilis*; *B. subtilis* + *B. licheniformis* + *Trichoderma longibrachiatum* and extract of *Reynoutria sachalinensis*. The plants were collected at 5, 10, 15, 20, 25 and 30 days after inoculation (DAI) for penetration and histological evaluations and at 30 DAI for nematodes extraction. The use of *R. sachalinensis* extract reduced juveniles of fourth stage (J4) and galls in the plants at 20 DAI and the nematode final population. Treatments ASM, *R. sachalinensis* extract and control presented only one female per gall, while in the other treatments more than one female were found in each gall. The extract of *R. sachalinensis* reduced the final population of *M. enterolobii* and its reproduction.

Key words: Induced resistance, root-knot nematode, alternative control, interaction plant-nematode

3.1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) está entre as olerícolas mais cultivadas e processadas do Brasil (IBGE, 2016). O Brasil ocupa o quinto lugar no ranking mundial de produção de tomate para processamento industrial, com uma produção de 1400 mil toneladas (WPTC, 2018). O cultivo dessa cultura é globalizado, sendo o tomateiro considerado uma cultura cosmopolita e de elevada importância socioeconômica. Além de suas propriedades

alimentícias substancialmente benéficas para a saúde humana, a cultura é reconhecida como importante fonte geradora de emprego e renda em todos os segmentos de sua cadeia produtiva (Silva & Giordano, 2000).

O cultivo do tomateiro é dificultado pela alta incidência de pragas e doenças. Entre as principais pragas responsáveis pela queda na produtividade do tomateiro estão os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.). Atualmente, a espécie *Meloidogyne enterolobii* tem sido relatada como de grande impacto negativo no cultivo do tomateiro, devido sua polifagia, de alta virulência e capacidade de suplantar a resistência mediada pelo gene *Mi*, que confere às plantas resistência às principais espécies do nematoide-das-galhas (Carneiro et at., 2007).

Visando o melhor manejo dos nematoides-das-galhas, diversos produtos vêm sendo lançados com o objetivo de reduzir sua população, agindo diretamente sobre eles ou na indução de resistência nas plantas atacadas. A indução de resistência em plantas atua estimulando suas defesas constitutivas, tornando a planta capaz de se proteger de diferentes patógenos e condições ambientais adversas sem entretanto, modificar sua base genética. Diversos microrganismos e substâncias têm a capacidade de induzir as defesas das plantas contra determinados patógenos, entre elas, microrganismos como fungos e bactérias, extratos de plantas e outros agentes químicos (Walters et al., 2013). Esses indutores ativam a expressão de genes de defesas que fazem com que as plantas respondam a estresses, principalmente aqueles causados por fitopatógenos, o que acarreta na ativação de barreiras fisícas e químicas contra os mesmos (Araújo e Menezes, 2009).

O nematoide-das-galhas ataca as raízes das plantas hospedeiras, causando hiperplasia e hipertrofia nas células que o circundam. Em geral, as células alteradas são hipertrofiadas, apresentam citoplasma denso e diminuição da vacuolização normal. Essas células gigantes servem como sítio de alimentação para que o nematoide consiga completar o

seu desenvolvimento de modo endofítico (Ferreira et al., 2012). Plantas que possuem resistência ao nematoide-das-galhas têm mecanismos que impedem tanto a entrada e estabelecimento dos nematoides, quanto o desenvolvimento apropriado dos seus sítios de alimentação, impedindo, assim, que seu ciclo de vida se complete (Pascholati, 2011). Indutores de resistência, bióticos ou abióticos, levam ao acúmulo de hormônios vegetais e de proteínas que atuam modificando o estado da célula vegetal, seja no reforço das paredes celulares ou em modificações na composição do citoplasma (Pieterse et al., 2014). Tendo em vista o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de indutores de resistência sobre o desenvolvimento de *M. enterolobii* e avaliar modificações histológicas em plantas de tomateiros infectados.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Nematologia da Escola de Agronomia e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, ambos da Universidade Federal de Goiás. Foram utilizadas mudas da cultivar H-9553, mais plantada na região, produzidas pelo viveiro comercial Vivati®, em Abadia de Goiás. As mudas foram transplantadas aos 30 dias após a germinação para copos plásticos (500mL), contendo uma mistura de solo + areia (1:1), previamente autoclavados. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com médias de temperatura mínima, máxima e do solo de 22ºC, 38ºC e 31ºC, respectivamente.

Os tratamentos foram compostos por: 1) Controle (sem aplicação de produtos, com inoculação do nematoide); 2) Acibenzolar-S-metil (ASM - Bion® Syngenta - 10g i.a..ha^{-1}); 3) *Bacillus subtilis* (Serenade® Bayer Cropscience - 2L p.c..ha^{-1}); 4) *B. subtilis* + *B. licheniformis* + *Trichoderma longibrachiatum* (NemOut® Altech Cropscience - 8kg p.c..ha^{-1}) e 5) Extrato de *Reynoutria sachalinensis* (Regalia Maxx® FMC - 2L p.c..ha^{-1}). Para estudo de

histopatologia, foi acrescentado um tratamento extra como controle absoluto, sem inoculação do nematoide e sem aplicação dos produtos. Os produtos foram diluídos em água e pulverizados na parte aérea das plantas, sem contato com o solo. Foram realizadas três aplicações, a primeira aos 7 dias antes da inoculação com as mudas ainda na bandeja, a segunda aos 7 dias após a inoculação (DAI) e uma terceira aplicação aos 14 dias após a inoculação. Cinco dias após o transplantio foi realizada a inoculação com 2000 ovos e eventuais J2 de *M. enterolobii* por planta, distribuídos em dois orifícios ao redor do colo da planta. O inóculo foi obtido de plantas de goiabeira (*Psidium guajava*) mantidas em casa de vegetação como multiplicadoras de inóculo.

Desenvolvimento de Meloidogyne enterolobii

As plantas destinadas ao estudo do desenvolvimento de *M. enterolobii* foram mantidas em casa de vegetação, em delineamento experimental inteiramente casualizado, submetidas aos cinco tratamentos acima mencionados. Foram realizadas seis coletas, aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 DAI. Para cada época de coleta, foram retiradas três plantas ao acaso, as quais tiveram a parte aérea descartada e o sistema radicular cuidadosamente lavado em água corrente, seco em papel toalha e pesado em balança digital para obtenção da massa fresca.

As raízes foram submetidas à coloração com fucsina ácida, segundo a técnica de Byrd et al. (1983), e observadas sob microscópio estereoscópico para quantificação e identificação dos diferentes estádios de desenvolvimento de *M. enterolobii*. Foram realizadas as classificações dos diferentes estádios do desenvolvimento do nematoide segundo Siddiqi e Taylor (1970) e a contagem dos seguintes estádios de desenvolvimento: juvenil de segundo estádio (J2); juvenil de terceiro estádio (J3); juvenil de quarto estádio (J4) e fêmeas adultas (Figura 1).

O número de indivíduos foi contado para cada estádio de desenvolvimento. Os

dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observações histopatológicas de tomateiro inoculado com Meloidogyne enterolobii

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, constituído de seis tratamentos, os cinco mencionados anteriormente e um sexto que consistiu em um controle absoluto, sem aplicação de produtos e sem inoculação do nematoide. Foram realizadas seis coletas após a inoculação das plantas, aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 DAI. Para cada coleta foram retiradas três plantas ao acaso, foram descartadas as partes aéreas e os sistemas radiculares foram lavados e secos.

As raízes foram fixadas em solução de FAA 70% (formaldeído + ácido acético + álcool 70%) por 48 horas e depois conservadas em álcool 70%. Posteriormente, as raízes foram cortadas em segmentos de 0,5 cm de comprimento e esses segmentos passaram pelos processos de desidratação em série etílica crescente (70% - 100%), diafanização em álcool-acetato (3:1, 1:1, 1:3 e acetato puro), e foram incluídos e emblocados em Paraplast® (Johansen, 1940). Em seguida, foram feitos cortes transversais (9 µm de espessura) em micrótomo rotativo (Leica RM2245) e a afixação das secções às lâminas foi realizada com adesivo de Haupt (Haupt, 1930). Para desparafinização, as lâminas foram imersas em acetato de butila e hidratadas em série etílica (100% - 30%). Após desparafinizadas e hidratadas, foram submetidas à coloração com azul de Astra 0,3% e safranina 0,1% na proporção 9:1 e montadas em lâminas histológicas e lamínulas com Verniz Vitral® (Paiva et al., 2006).

Para as análises das observações histológicas foi dado foco na sexta coleta de avaliação, aos 30 DAI, já que não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nos demais períodos de avaliação, e aos 30 DAI o desenvolvimento do nematoide estava completo, possibilitando uma melhor observação das alterações anatômicas. Essas

análises foram realizadas com auxílio de microscópio Leica acoplado a câmera digital ICC50, com programa de captura de imagem LAS EZ versão 1.8.1., no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica/ICB/UFG.

Eficácia de diferentes produtos na redução da população de Meloidogyne enterolobii

Plantas de tomateiro da cultivar H-9553 foram mantidas em casa de vegetação, em vasos de polipropileno (1,5L), em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, 1) Controle; 2) Acibenzolar-S-metil; 3) *B. subtilis*; 4) *B. subtilis* + *B. licheniformis* + *T. longibrachiatum* e 5) Extrato de *R. sachalinensis* e cinco repetições. As avaliações foram realizadas aos 30 DAI. Foram coletados dados de massa fresca das raízes dos tomateiros, bem como a densidade populacional e fator de reprodução de *M. enterolobii*.

Aos 30 DAI, as raízes foram lavadas em água corrente, secas em papel absorvente e pesadas em balança digital. Em seguida, as raízes foram processadas para a extração dos nematoides de acordo com a técnica de liquidificador e centrífuga proposta por Bonetti & Ferraz (1981). Foi determinada a densidade populacional do nematoide por meio de contagem sob microscópio ótico (aumento 40x) com auxílio de uma câmara de Peters. A determinação do fator de reprodução foi feita segundo Oostenbrink (1966).

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade das variâncias. Quando os pressupostos foram atendidos, foi realizada ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para comparação das médias. Quando os pressupostos não foram atendidos os dados foram transformados utilizando o método de Box & Cox (1964), e ressubmetidos aos mesmos testes.

3.3 RESULTADOS

Desenvolvimento de Meloidogyne enterolobii

Foram observados e quantificados os diferentes estádios do desenvolvimento de *M. enterolobii* nas plantas de tomateiro submetidas ou não aos tratamentos com os diferentes produtos utilizados. Em todas as amostras foi possível ver a penetração dos juvenis de segundo estádio e seu desenvolvimento dentro das raízes. Nenhum produto utilizado foi capaz de interromper o desenvolvimento do nematoide (Figura 1).

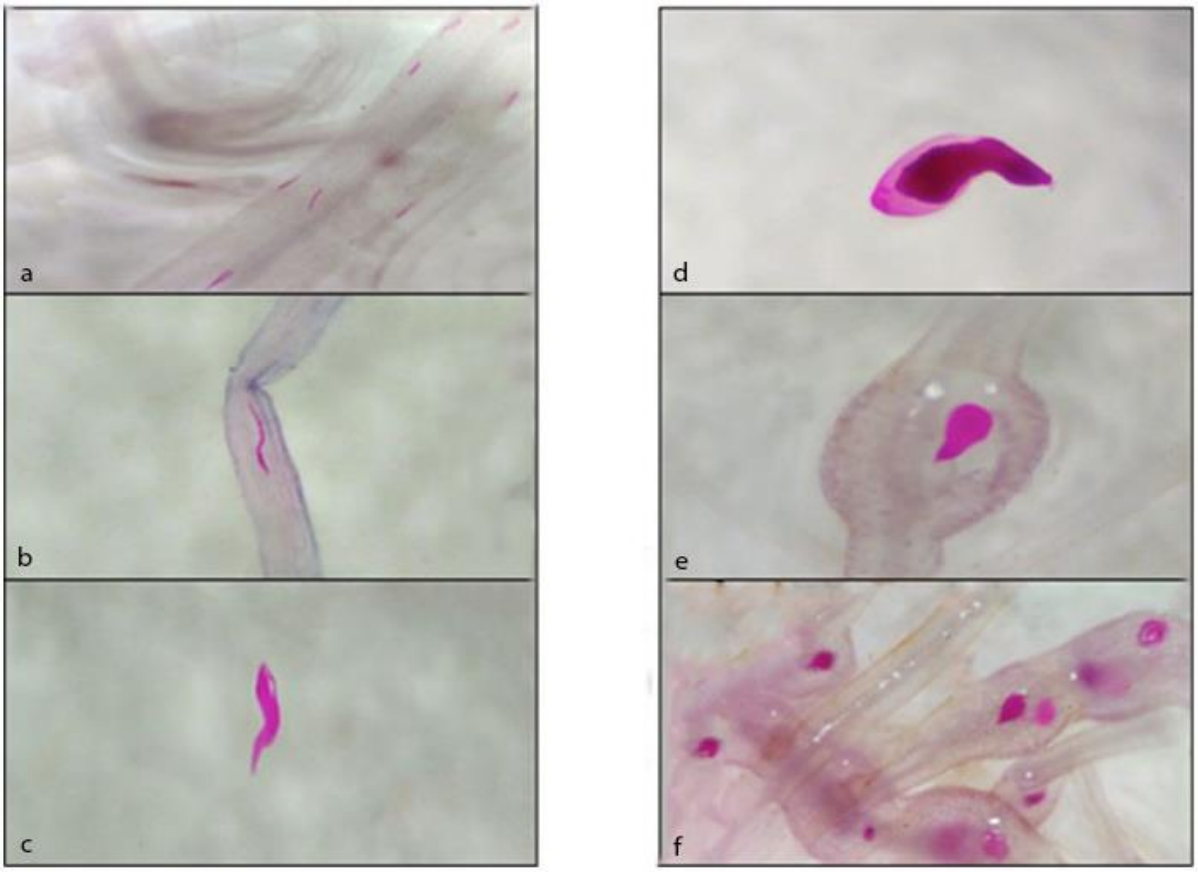

Figura 1. Fases de desenvolvimento de *M. enterolobii* em raízes de tomateiro (H-9553) submetidas a diferentes tratamentos com indutores de resistência, coradas com fucsina ácida. a, b - juvenis de segundo estádio (J2) aos 10 DAI (Dias após a inoculação), c - juvenil de terceiro estádio (J3) aos 20 DAI, d - juvenil de quarto estádio (J4) aos 20 DAI, e – fêmea aos 25 DAI, f - galhas com fêmeas aos 25 DAI.

O uso de *Bacillus subtilis* aumentou massa fresca de raízes quando comparado

aos demais tratamentos (20 DAI). Este mesmo tratamento diferiu dos tratamento com ASM (aos 10, 20 e 30 DAI) e com *B. subtilis* + *B. licheniformis* + *T. longibrachiatum* (aos 20 e 30 DAI) (Figura 2).

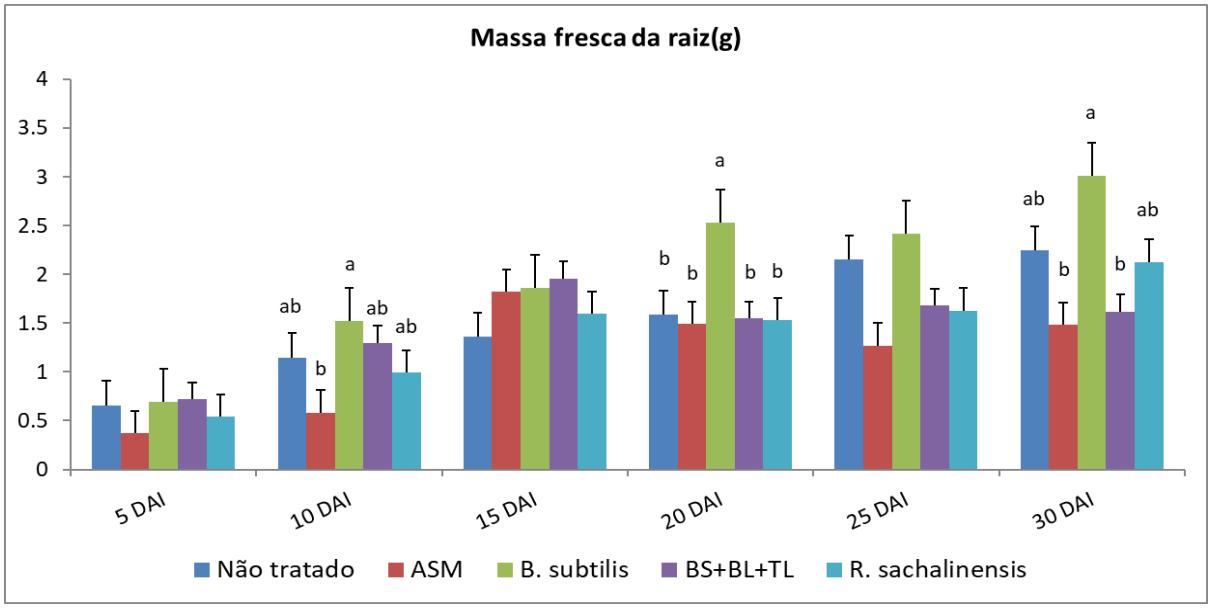

Figura 2. Médias da massa fresca das raízes de tomateiro submetidos à tratamentos com indutores de resistência, em seis datas de coleta. DAI: Dias Após a Inoculação; ASM: Acibenzolar-S-Metil; BS+BL+LT: *Bacillus subtilis*+*Bacullus licheniformis*+*Trichoderma longibrachiatum*

De acordo com as avaliações, foi possível acompanhar cada etapa do desenvolvimento do nematoide. Para o tratamento controle e com extrato de *R. sachalinensis* o pico de penetração de indivíduos estádio J2 foi observado aos 15 DAI, enquanto que, para os demais tratamentos essa maior quantidade de penetração ocorreu aos 10 dias após a inoculação. Para os estádios J3 e J4 a maior quantidade de nematoides foi observada aos 20 DAI. Já para fêmeas e galhas já desenvolvidas nas raízes, esse pico foi observado no final do ciclo do nematoide aos 30 DAI (Figura 3 e 4).

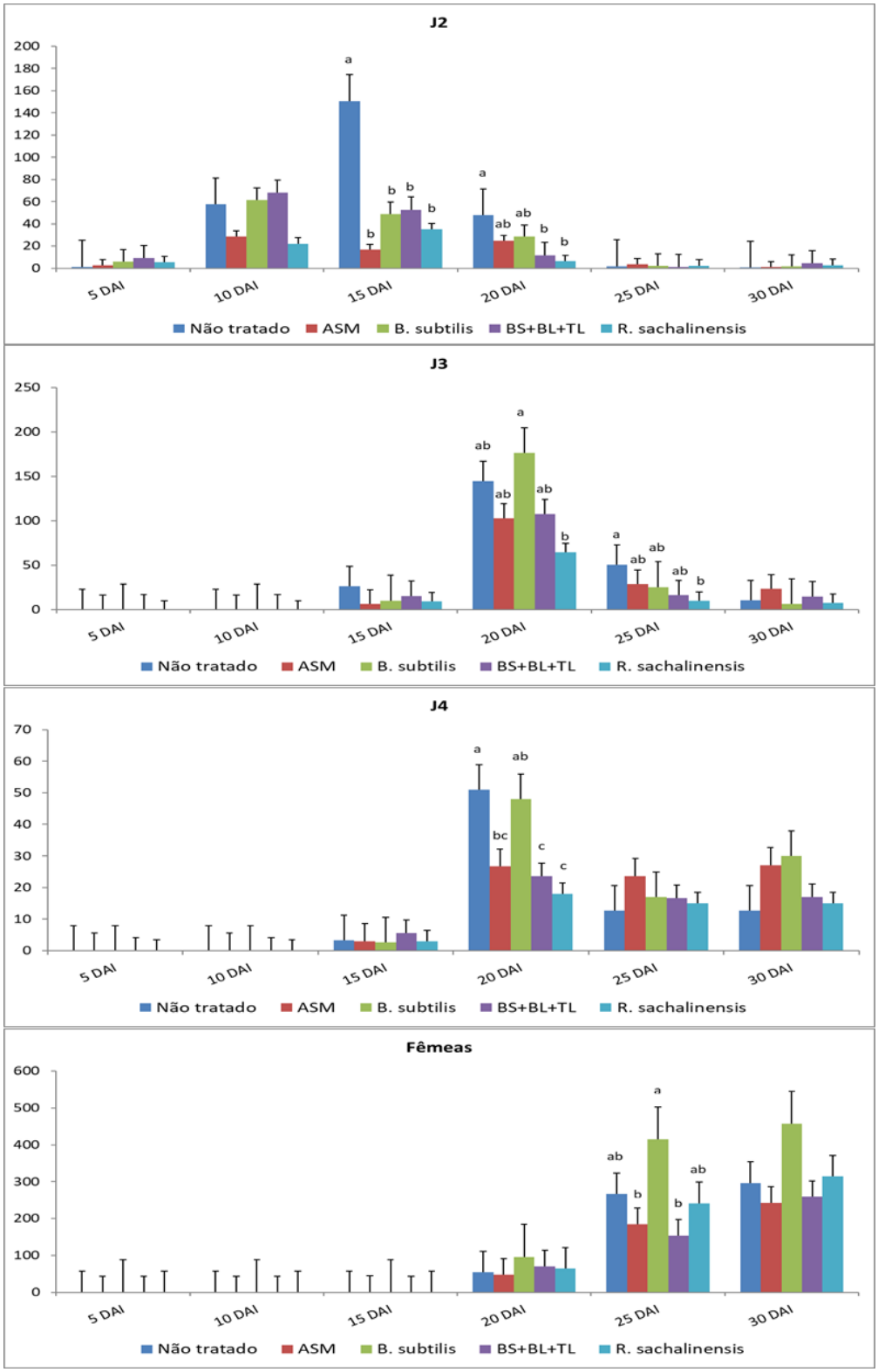

Figura 3. Médias dos diferentes estádios de *M. enterolobi* em plantas de tomateiro, cultivar H-9553, submetidas à tratamentos com indutores de resistência, em seis datas de coletas. DAI: Dias Após a Inoculação; ASM: Acibenzolar-S-Metil; BS+BL+LT: *Bacillus subtilis+Bacullus licheniformis+Trichoderma longibrachiatum*

Foi possível observar redução no número de J2 aos 15 e 30 DAI em todos os tratamentos aplicados em relação ao controle não tratado. Já o número de J3 apenas foi influenciado pelos tratamentos aos 20 e 25 DAI, observando-se redução do número de J3 nas raízes com a aplicação de extrato de *R. sachalinensis*. Esse tratamento também mostrou eficiência na redução de juvenis de quarto estádio (Figura 3) e galhas na avaliação realizada aos 20 DAI, embora este tratamento tenha se igualado a *B. subtilis* + *B. licheniformis* + *T. longibrachiatum* e ASM.

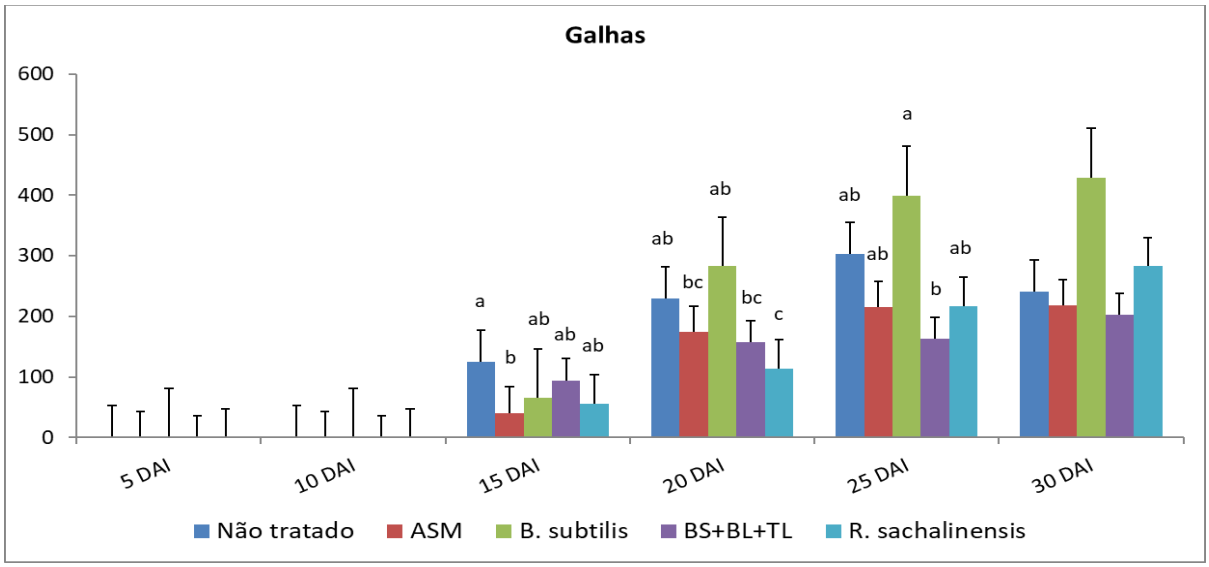

Figura 4. Médias do número de galhas causadas por de *M. enterolobii* em plantas de tomateiro, cultivar H-9553, submetidas à tratamentos com indutores de resistência, em seis datas de coletas. DAI: Dias Após a Inoculação; ASM: Acibenzolar-S-Metil; BS+BL+LT: *Bacillus subtilis*+*Bacullus licheniformis*+*Trichoderma longibrachiatum*

Observações histopatológicas de tomateiro inoculado com Meloidogyne enterolobii

As raízes das plantas do controle absoluto são constituídas por epiderme unisseriada, parênquima cortical constituído de cinco a sete camadas de células e sistema vascular composto por xilema e floema em arranjo protostélico (quando o centro do órgão é

preenchido por tecido vascular), sendo o protoxilema triarco, acompanhado de três polos de floema. Nas raízes avaliadas, foi possível observar o início do crescimento secundário do xilema (Figura 5-A). Todas as raízes analisadas no tratamento controle absoluto apresentaram diâmetro visualmente menor do que as raízes submetidas aos tratamentos controle, ASM, *Bacillus subtilis*, *B. subtilis* + *B. licheniformis* + *Trichoderma longibrachiatum* e extrato de *Reynoutria sachalinensis*, todos estes inoculados com *M. enterolobii*.

Nos tratamentos controle (Figura 5-B) e ASM (Figura 5-C), foi possível observar suberificação nas células epidérmicas e presença de felogênio, durante o início da formação de uma periderme. As células parenquimáticas do córtex apresentam-se com número e tamanho alterados em diferentes graus (Figura 5-C). No controle, observou-se a formação de baixo número de células gigantes, ocorrendo poucos sítios de alimentação característicos de *Meloidogyne* spp. Também foi observado que, geralmente, havia apenas uma fêmea por galha (Figura 5-B).

Nos tratamentos com *B. subtilis* (Figura 5-D) e com *B. subtilis* + *B. licheniformis* + *T. longibrachiatum* (Figura 5-E) foram observados diferentes graus de alterações na epiderme e no parênquima cortical. Enquanto no primeiro houve substituição total da epiderme por periderme e intensa hiperplasia e hipertrofia do córtex. No segundo, essas alterações foram menos intensas. Em ambos tratamentos, foi observado desorganização do tecido vascular, especialmente com a perda da organização triarca do xilema, sem que houvesse hiperplasia e hipertrofia celular. Nesses tratamentos observou-se, geralmente, mais de uma fêmea por galha, embora a visualização de células gigantes não tenha ocorrido (Figura 5-D e E).

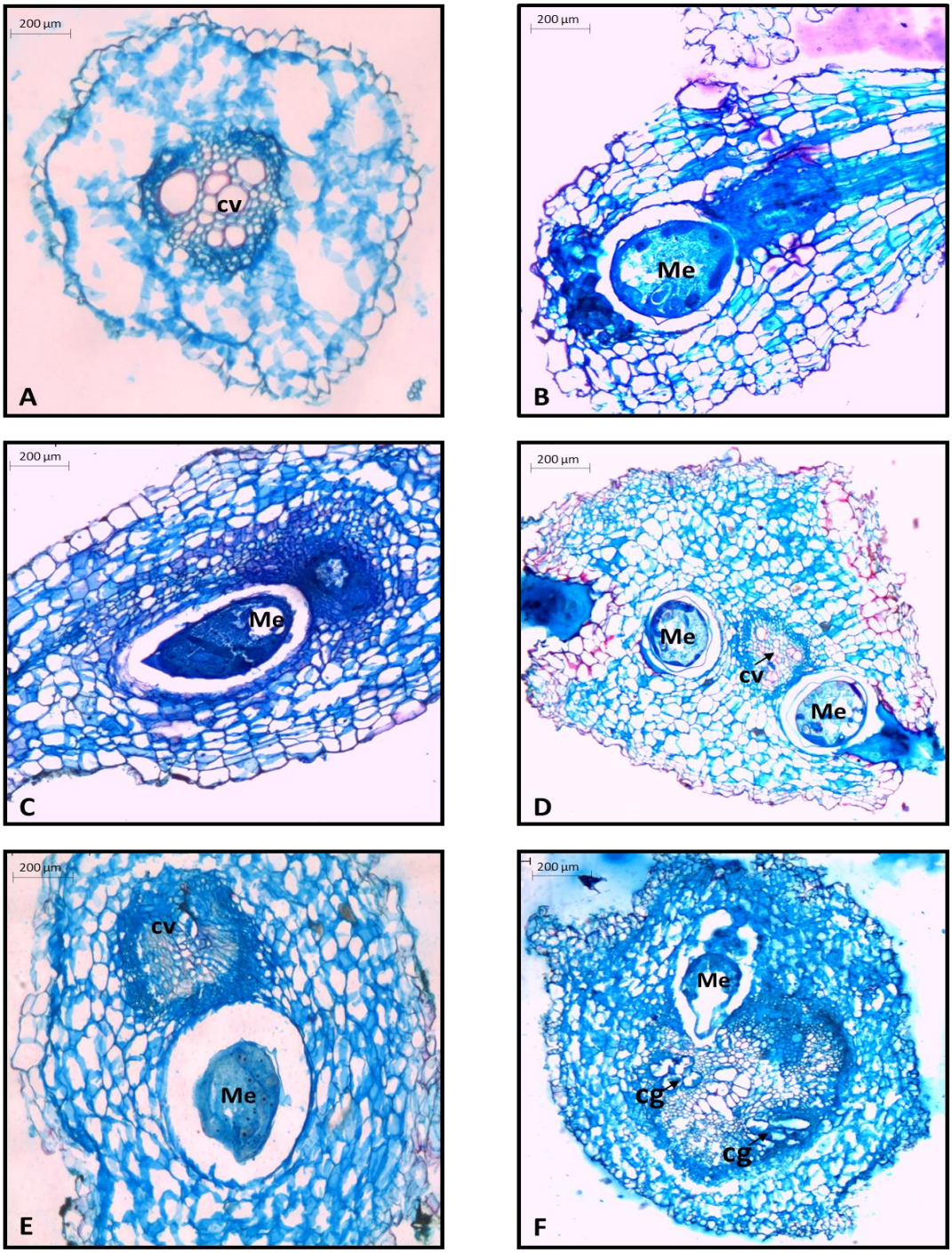

Figura 5. Secções transversais da região mediana das raízes do tomateiro, na sexta coleta (30 dias após a inoculação). A) Controle absoluto (sem aplicação de produtos e sem inoculação com *M. enterolobii*), B) Controle não tratado (sem aplicação de produtos e com inoculação de *M. enterolobii*), C) Acibenzolar-S-Metil, D) *Bacillus subtilis*, E) *B. subtilis+B. licheniformis+T. longibrachiatum*, F) Extrato de *Reynoutria sachalinensis*. cv: cilindro vascular; cg: células gigantes; Me: *Meloidogyne enterolobii*.

No tratamento com extrato de *R. sachalinensis*, observaram-se fêmeas obesas nítidas e isoladas, com presença de massa de ovos e sítios de alimentação bastante desenvolvidos, onde detectaram-se células gigantes, multinucleadas, com três a sete núcleos (Figura 5-F). Houve alterações na epiderme e hiperplasia do parênquima cortical nas plantas tratadas com *R. sachalinensis*. No tecido vascular, observou-se o maior grau de alterações celulares quando comparado aos demais tratamentos. Observou-se muitas células gigantes e intensa hiperplasia e hipertrofia das células do xilema e do floema que desconfiguram por completo a organização celular e tecidual (Figura 5-F) em comparação ao controle absoluto (Figura 5-A). Todos os tratamentos submetidos a inoculação com o nematoide apresentaram cilindro vascular excêntrico na estrutura das raízes.

Eficácia de diferentes produtos na redução da população de Meloidogyne enterolobii

O tratamento com ASM apresentou menor massa fresca da raiz, diferindo do tratamento com *Bacillus subtilis* e do controle não tratado, porém todas as médias foram baixas, variando entre 1,17 e 2,47g de raiz. A densidade populacional do nematoide sofreu uma redução expressiva quando as plantas foram submetidas ao tratamento com extrato de *R. sachalinensis*, a média desse tratamento foi 621 induvíduos.g^{-1}raiz, enquanto que no tratamento controle a média foi 3898 indivíduos.g^{-1}raiz, chegando a 84% de redução da população de *M. enterolobii*. De forma similar, o fator de reprodução apresentou 86% de redução em plantas tratadas com extrato de *R. sachalinensis*, que teve média de 0.68, diferindo do tratamento controle que apresentou média de 5.09 (Tabela 1).

3.4 DISCUSSÃO

A maior penetração de J2 nas raízes do tomateiro ocorreu aos 10 e 15 DAI devido ao fato da inoculação ter sido realizada com ovos. A eclosão dos juvenis depende do estágio

embrionário dos ovos e pode sofrer influência de diversos fatores do solo, como umidade e temperatura. Westerich et al. (2011) observaram que, quando inoculados juvenis de segundo estádio de *M. enterolobii* em raiz de tomateiro, houve máxima penetração de J2 aos 10 DAI, porém aos 3 DAI já foi possível identificar J2 presentes nas raízes. O ciclo do nematoide foi curto, podendo ser observadas fêmeas maduras aos 20 DAI, mostrando a boa adaptação desse patógeno ao genótipo de tomateiro utilizado. Embora o genótipo utilizado seja portador do gene *Mi*, que confere resistência a espécies de *Meloidogyne*, *M. enterolobii* foi capaz de suplantar tal resistência, cofirmando sua alta virulência já reportada para goiabeira, pimentão (*Capsicum annuum*) e soja (*Glycine max*) (Carneiro et al., 2001; Pinheiro et al., 2014).

Tabela 1. Massa fresca da raiz de tomateiro, cultivar H-9553, densidade populacional e fator de reprodução de *M. enterolobii* em plantas de tomate tratadas com diferentes indutores de resistência.

Tratamentos	Massa fresca da raiz (g)	Ovos e J2 g^{-1} raiz[1]	IC (%)	FR[1]	IC (%)
Não tratado	2.33 a	3898.85 a		5.09a	
ASM	1.17 b	1980.69 ab	49.20	1.11ab	78.28
B. subtilis	2.47 a	1905.04 ab	51.14	2.67ab	47.53
BS+BL+TL	1.90 ab	1016.58 ab	73.93	0.99ab	80.48
R. sachalinensis	2.01 ab	621.71 b	84.05	0.68b	86.57
F	3.761	3.411		3.459	
P-valor	0.019	0.028		0.026	
CV (%)	32.47	7.20		39.54	

[1] Dados transformados pelo método de Box & Cox (1964). ASM: Acibenzolar-S-Metil; *BS+BL+LT*: *Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis* + *Trichoderma longibrachiatum*. IC: índice de controle.

Apesar da alta virulência de *M. enterolobii*, os tratamentos foram capazes de induzir diferentes tipos de respostas nos tomateiros com consequentes variações no desenvolvimento do nematoide. Houve aumento da massa fresca das raízes submetidas ao tratamento com *B. subtilis* quando comparado com o tratamento ASM, o que já era esperado,

pois a capacidade dessa rizobactéria em promover o crescimento e desenvolvimento das plantas já é bastante conhecida e relatada em diversos estudos (Araújo & Marchesi, 2009; Szilagyi-Zecchin et al., 2014). Isso pode ter contriibuído com os maiores valores de J3, J4, fêmeas e galhas nas raízes das plantas de tomate tratadas com *B. subtilis* quando comparado com os outros tratamentos, porém, na avaliação da população final do nematoide foi possível observar redução na densidade populacional e no fator de reprodução de *M. enterolobii* nesse tratamento. A quantidade de indivíduos de cada estádio do nematoide foi obtido através da observação no total de raízes, enquanto que o cálculo da população final do nematoide foi estimado por grama de raiz, o que pode eliminar o efeito de diluição quando comparado com quantificação da raiz toda. Isso nos leva a crer que houve maior penetração e desenvolvimento dos nematoides nas raízes pelo fato da rizobactéria ter proporcionado o aumento da massa de raízes e, com isso, uma condição favorável para esse desenvolvimento, devido ao aumento da disponibilidade de sítios de alimentação. No entanto, as endotoxinas produzidas por *B. subtilis* interferiram no ciclo reprodutivo dos nematoides, principalmente na oviposição e eclosão de juvenis, o que afetou a reprodução de *M. enterolobii* neste estudo, reduzindo a quantidade de ovos produzidos pelas fêmeas e, consequentemente, a densidade populacional, assim como relatado por Sharma & Gomes (1996) para *Heterodera glycines.*

Quando comparado com o tratamento com *B. subtilis*, a aplicação de ASM reduziu a massa fresca das raízes do tomateiro, corroborando os resultados obtidos em plantas de abacaxizeiro submetidas a tratamento com ASM (Chinnasri et al., 2006). Tratamentos visando a indução de resistência de plantas contra determinados patógenos faz com que a planta mobilize energia para sua defesa (Iriti & Faoro, 2003). Sendo assim, o investimento de energia em compostos do metabolismo secundário da planta, notoriamente de defesa, ocorre em detrimento daqueles do metabolismo primário, acarretando em diminuição do crescimento vegetativo. De fato, em plantas tratadas com ASM, *Meloidogyne* sp. tem seu

desenvolvimento atrasado e fertilidade reduzida (Brito et al., 2016; Hernandes et al., 2017), com consequente redução da reprodução desse patógeno, como foi observado neste estudo pela redução da densidade populacional de *M. enterolobii*.

O tratamento com extrato de *Reynoutria sachalinensis* promoveu redução do número de J2 aos 15 e 20 DAI, J3 aos 25 DAI e J4 aos 20 DAI nas raízes das plantas de tomateiro. O extrato de *R. sachalinensis* já é conhecido como um eficaz fungicida, capaz de induzir a resistência quando pulverizado na parte aérea das plantas (Daayf et al., 1995). Compostos tóxicos, incluindo compostos liberados por extrato de plantas, têm potencial controle em ovos de nematoides quando estes estão permeáveis pois, nesta fase, os ovos se encontram mais vulneráveis e são sucetíveis ao tratamento (Curtis et al., 2009). Entretanto, há pouca informação científica a respeito das propriedades e benefícios, bem como mecanismos celulares de indução de resistência mediada por este extrato.

No nível bioquímico, alguns estudos relatam o aumento da atividade de enzimas em plantas tratadas com *R. sachalinensis*, como β-1,3-glucanase (Herger & Klingauf, 1990; Daayf et al., 1995), a qual atua na degradação da parede celular do patógeno (Fleuri & Sato, 2008), assim como aumento na produção de etileno, que tem papel fundamental na sinalização da expressão de defesas em plantas via ativação de genes de resistência. Alguns genes de defesa estão sob controle da rota do jasmonato e etileno, como os responsáveis por codificar inibidores de proteínas, que são cruciais para impedir a alimentação e desenvolvimento do nematoide (Gheysen & Fenoll, 2002). Assim, acredita-se que o aumento dessa enzima possa ter ocorrido neste estudo, aumentando assim a resposta de defesa da planta contra *M. enterolobii*, reduzindo a sua multiplicação no sistema radicular do tomateiro.

A batalha bioquímica entre plantas e parasitas ocorre a partir do momento que o nematoide penetra seus tecidos e inicia sua alimentação, acarretando complexas mudanças na expressão dos genes vegetais. As modificações celulares ocasionadas pelos nematoides

decorrem de tais mudanças na expressão gênica e, neste estudo, isso foi observado durante o processo de penetração e desenvolvimento do juvenil, mesmo quando ainda não havia formação dos sítios de alimentação e galhas, porém as células das raízes encontravam-se totalmente desorganizadas. Depois de instalado nos tecidos das raízes, o J2 de *Meloidogyne* injeta nas células próximas à sua região cefálica os produtos de suas glândulas esofagianas, provocando hipertrofia celular (Lordello, 1964) e consequente desorganização dos tecidos. Ainda, em resposta a esse estímulo, se diferenciam as células gigantes, e são estabelecidos os sítios de alimentação dos nematoides, que puderam ser observadas neste estudo em maior ou menor número, em todos os tratamentos inoculados com *M. enterolobii*.

A presença das células gigantes no cilindro vascular nos tratamentos com *B. subtilis*, *B. subtilis* + *B. licheniformis* + *T. longibrachiatum* e *R. sachalinensis*, sugere um possível comprometimento da função radicular, através das alterações no xilema e floema, acarretando em redução do transporte de água e nutrientes, como verificado por Westerich et al. (2012). Na relação *M. enterolobii* – raiz de tomateiro para o tratamento com extrato de *R. sachalinensis*, foi verificada a formação de mais de um sítio de alimentação, constituídos pela presença de várias células gigantes multinucleadas, sugerindo a ocorrência de sucessivas cariocineses, como descrito por Westerich et al. (2012).

A população final e o fator de reprodução do nematoide nas plantas tratadas com *R. sachalinensis* foram inferiores ao tratamento controle. Este fato sugere que houve indução de mecanismo de resistência, o qual acarretou na diminuição da infecção dos J2 de *M. enterolobii* nas raízes do tomateiro. Isso nos leva a crer que somente os indivíduos mais agressivos foram capazes de estabelecer seu sítio de alimentação e completar seu desenvolvimento, ocasionando alterações celulares, presença de células gigantes e intensa hiperplasia e hipertrofia das células do xilema e do floema, desconfigurando por completo a organização normal das células radiculares de uma raiz sadia de tomateiro.

Apesar dos resultados interessantes na redução da densidade populacional de *M. enterolobii*, em todos os tratamentos observou-se que os tecidos vasculares se apresentaram comprimidos e desorganizados, observando-se também hipertrofia de células do parênquima cortical, o que nos mostra que, independente do tratamento aplicado, os nematoides foram capazes de penetrar nas raízes e estabelecer seu sítio de alimentação, proporcionando uma condição minimamente adequada para seu desenvolvimento. Porém, o extrato de *R. sachalinensis* foi eficiente em reduzir a população final de *M. enterolobii* e sua reprodução, enquanto que o tratamento com ASM influenciou negativamente o desenvolvimento do nematoide, atrasando as fases do seu desenvolvimento. Embora não tenha afetado diretamente o desenvolvimento dos nematoides, a aplicação de *B. subtilis* promoveu aumento significativo no crescimento das raízes das plantas de tomateiro, o que pode garantir vantagens frente ao ataque das raízes, como um mecanismo compensatório. Dessa forma, esses produtos se tornam ferramentas interessantes no manejo de *M. enterolobii* na cultura do tomate para processamento industrial.

3.5 AGRADECIMENTOS

A empresa Vivati® pelo fornecimento das mudas de tomateiro utilizadas e ao Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás e seus colaboradores por auxiliarem na realização das análises deste estudo.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO FF, MENEZES D (2009) Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). Summa Phytopathologica 35(3):169-172.

ARAÚJO FF, MARCHESI GVP (2009) Use of Bacillus subtilis in the control of root-knot nematode and the growth promotion in tomato. Ciência Rural 39(5):1558-1561.

BONETTI JIS, FERRAZ S (1981) Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira 6(3):553.

BOX GEP, COX DR (1964) An analysis of transformations. Journal of the Royal Statistical Society 26(2):211-252.

BRITO ODC, PUERARI HH, HERNANDES I, FERREIRA JCA, CARDOSO MR, DIAS-ARIEIRA CR (2016) Métodos de aplicação e concentrações de Acibenzolar-s-metil no manejo de *Meloidogyne javanica* em soja. Nematropica 46(1):106-113.

BYRD DW, KIRKPATRICK T, BARKER KR (1983) An improved technique for clearing and staining tissues for detection of nematodes. Journal of Nematology 15:142–143.

CARNEIRO RMDG, MOREIRA WA, ALMEIDA MRA, GOMES ACMM (2001) Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Brasil. Nematologia Brasileira 25(2):223-228.

CARNEIRO RMDG, CIROTTO PA, SILVA DB, CARNEIRO RG (2007) Resistance to *Meloidogyne mayaguensis* in *Psidium* spp. accessions and their grafting compatibility with *P. guajava* cv. Paluma. Fitopatologia Brasileira 32:281–284.

CHINNASRI B, SIPES BS, SCHMITT DP (2006) Effects of inducers of systemic acquired resistance on reproduction of *Meloidogyne javanica* and *Rotylenchulus reniformis* in pineapple. Journal of Nematology 38:319-325.

CURTIS RHC, ROBINSON AF, PERRY RN (2009) Hatch and host location. In: PERRY RN, MOENS M, STARR J (Eds.) Root-knot nematode. Wallingford, UK. CABI Publishing. pp. 139-162.

DAAYF F, SCHMITT A, BÉLANGER R (1995) The effects of plant extracts of *Reynoutria sachalinensis* on powdery mildew development and leaf physiology of long English cucumber. Plant Disease 79:577–580.

FERREIRA PA, FERRAZ S, FREITAS LG (2012) Sintomas causados por fitonematoides. In: ZAMBOLIN L, JESUS JR WC, PEREIRA OL (Eds.) O essencial da fitopatologia. Viçosa, MG. Editora Suprema. pp. 203-222.

FLEURI LF, SATO HH (2008) β-1,3 Glucanases e quitinases: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. Ciência e Agrotecnologia 32:1224-1231.

GHEYSEN G, FENOLL C (2002) Gene expression in nematode feeding sites. Annual Review of Phytopatology 40:191-219.

HAUPT AW (1930) A gelatin fixative for paraffin sections. Stain Technology 5(3):97-98.

HERGER G, KLINGAUF F (1990) Control of powdery mildew fungi with extracts of the giant knotweed, *Renoutria sachalinensis* (Polygonaceae). Mededelingen van de Faculteit landbouwwetenschappen 55:1007-1014.

HERNANDES I, BRITO ADC, CARDOSO MR, FERREIRA JCA, PUERARI HH, DIAS-ARIEIRA CR (2017) Acibenzolar-s-methyl on *Meloidogyne javanica* control in lettuce. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil & Plant Science 67(7):1-6.

IBGE – Instituto brasileiro de geografia e estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo/lspa_201602.pdf>. Acesso em: 23 ago 2017.

IRITI M, FAORO F (2003) Does benzothiadiazole induced resistance increase fitness cost in bean? Journal of Plant Pathology 85(4):265-270.

JOHANSEN, DA (1940) Plant microtechnique. New York. McGraw-Hill Book Company.

LORDELLO LGE (1964) Contribuição ao conhecimento dos nematoides que causam galhas em raízes de plantas em São Paulo e estados vizinhos. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 21, 181-218. Disponível em: https://dx.doi.org/10.1590/S0071-12761964000100017. Acesso em: 23 ago 2017.

OOSTENBRINK M (1966) Major characteristic of relation between nematodes and plants. Mededelingen Landbouwhogeschool 66(4)1-46.

PAIVA JGA, FRANK-DE-CARVALHO SM, MAGALHÃES MP, GRACIANO-RIBEIRO D (2006) Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. Acta Botanica Brasilica 20(2):257-264.

PASCHOLATI SF (2011) Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM L, REZENDE JAM, BERGAMIM FA (Eds.) Manual de Fitopatologia. 4ª ed. Piracicaba, SP. Agronômica Ceres. pp. 593-633.

PIETERSE CMJ, ZAMIOUDIS C, BERENDSEN RL, WELLER DM, Van WEES SCM, BAKKER PAHM (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. Annual Review of Phytopathology 52:347-375.

PINHEIRO JB, PEREIRA RB, SUINAGA FA (2014) Manejo de nematoides na cultura do tomate. Embrapa. Circular Técnica.

SHARMA RD, GOMES AC (1996) Effect of *Bacillus* spp. toxins on oviposition and juvenile hatching of *Heterodera glycines*. Nematologia Brasileira 20:53-62.

SILVA JBC, GIORDANO LB (2000) Tomate para processamento industrial. Brasília: EMBRAPA Comunicação para transferência de tecnologia: Embrapa-CNPH.

SZILAGYI-ZECCHIN VJ, IKEDA AC, HUNGRIA M, ADAMOSKI D, KAVA-CORDEIRO V, GLIENKE CE, GALLI-TERASAWA LV (2014) Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological

potential in agriculture. Applied Microbiology and Biotechnology Express 4(26):1-9.

WALTERS DR, RATSEP J, HAVIS ND (2013) Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. Journal of Experimental Botany 64(5):1263-1280.

WESTERICH JN, ROSA JMO, WILCKEN SRS (2011) Estudo comparativo da biologia de *Meloidogyne enterolobii (=M. mayaguensis)* e *Meloidogyne javanica* em tomateiros com gene Mi. Summa Phytopathologica 37(1):35-41.

WESTERICH JN, RODELLA RA, ROSA JMO, WILCKEN SRS (2012) Alterações anatômicas induzidas por *Meloidogyne enterolobii* (=*M. mayaguensis*) e *Meloidogyne javanica* em tomateiros resistentes a meloidoginose. Summa Phytopathologica 38(3):192-197.

WPTC – The World Processing Tomato Concil. WPTC World prodution estimate of tomatoes for processing (2018) Disponível em:< https://www.wptc.to/pdf/releases/WPTC%20crop%20update%20as%20of%2025%20October%202018.pdf> Acessado em: 30 outubro 2018.

CAPÍTULO 3

EFICÁCIA DE NOVOS NEMATICIDAS NO MANEJO DE *Meloidogyne incognita* EM TOMATEIRO[1][2]

EFFICACY OF NEW NEMATICIDES FOR MANAGING *Meloidogyne incognita* IN TOMATO PLANTS CROP

Juliana de Oliveira Silva*[3], Angelo Loffredo[4], Mara Rúbia da Rocha[3], J. Ole Becker[4]

[1] Capítulo elaborado conforme as normas do periódico científico Journal of Nematology

[2] O presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (Processo 88881.131556/2016-01).

[3] Programa de Pós-graduação em Agronomia, Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Avenida Esperança, Campus Samambaia, 74690900, Goiânia-GO, Brasil

[4] Department of Nematology, University of California Riverside, 900 University Avenue, 92521, Riverside – CA, United States of America

EFFICACY OF NEW NEMATICIDES FOR MANAGING *Meloidogyne incognita* IN TOMATO CROP[1]

Juliana de Oliveira Silva*[2], Angelo Loffredo[3], Mara Rúbia da Rocha[2], J. Ole Becker[3]

*Author for correspondence: julianadeos13@gmail.com

[1] The present study was carried out with the financial support of CAPES, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brazil (Case 88881.131556 / 2016-01).

[2] Graduate Program in Agronomy, Faculty of Agronomy, Federal University of Goiás, Avenida Esperança, Campus Samambaia, 74690900, Goiânia-GO, Brazil.

[3] Department of Nematology, University of California Riverside, 900 University Avenue, 92521, Riverside - CA, United States of America.

ABSTRACT

New non-fumigant nematicides (fluensulfone, fluopyram and fluazaindolizine) were tested in greenhouse tomato trials aiming to evaluate its efficacy on the control of *Meloidogyne incognita* soil and root populations and plant produtivity. Plants of the cultivar Red Gnome were transplanted into 2.5kg fiber pots inoculated with 5000 eggs and juveniles of *M. incognita* of soil and treated with fluensulfone, fluopyram and fluazaindolizine, in two rates each. Sixty days after inoculation the plants were evaluated for fresh root and shoot weight, weight and number of fruits, egg mass number, population density and nematode reproduction factor. All nematicide treatments reduced the root gall index, the number of *M. incognita* egg masses, eggs/g root and the nematode reproduction factor when compared to the non-treated control.

Key words: chemical control, non-fumigant nematicides, root-knot nematode, *Solanum lycopersicum*

4.1 INTRODUCTION

The root-knot nematode, genus *Meloidogyne*, is one of the main pests that attack several crops, mainly vegetables, in tropical and subtropical regions, causing great economic damages. The most important species is *M. incognita* because of its aggressiveness and for being widespread throughout the world (Sikora and Fernandez, 2005). The pathogen penetrates the roots and establishes its feeding site transforming the cells around the stylet into giant cells and, consequently, provoking the appearance of galls in the roots, thus hindering the absorption of water and nutrients by the plant (Karsen et al., 2013).

Tomato (*Solanum lycopersicum*) production is divided into the fresh market and industrial processing, both of high economic importance. Worldwide losses caused by root-knot nematodes reach 27% (Kaur et al., 2011) making nematodes one of the main research targets for pest and disease management. Since the ban of fumigant methyl bromide in 2005, there is an increasing search for new molecules and efficient modes of action in the control of nematodes (Morris et al., 2016). The most commonly used non-fumigant nematicides are those of the carbamates and organophosphorates, both acetylcholinesterase inhibitors (Opperman and Chang, 1990), and some are already restricted because of high toxicity to invertebrates, non-target organisms, humans and the environment.

New non-fumigant, low toxicity nematicides to non-target microorganisms and the environment have been developed and marketed in the last few years (Faske and Hurd, 2015, Morris et al., 2015, Morris et al., 2016). Fluensulfone is a new nematicide of the fluoroalkenyle chemical class that was registered in the USA in 2014, capable of affecting the nematodes mobility, with an irreversible nematicidal activity, which differs from the nematostatic organophosphates and carbamates (Oka et al., 2009). Studies on the appropriate methods of application and efficacy of fluensulfone are still limited, as their mode of action

remains unknown, however, some studies have shown the effectiveness of this nematicide in the control of *Meloidogyne* (Oka et al., 2009; Oka et al. Morris et al., 2015, Morris et al., 2016).

Some fungicides have also been studied in the control of nematodes. Fluopyram is a fungicide used in the management of soilborne fungi and its efficiency in the control of plant parasitic nematode has also been investigated (Faske and Hurd, 2015, Beeman and Tylka, 2018). Fluopyram has effect on the mobility of nematodes, presenting nematostatic action in species of *M. incognita* and *Rotylenchulus reniformis* (Faske and Hurd, 2015). Fluopyram selectively inhibits Complex II of the mitochondrial respiratory chain in nematodes which leads to a fast and severe depletion of the nematode´s cellular energy (ATP) (Broeksma et al., 2014).

Fluazaindolizine is a new selective product for plant parasitic nematode control acting by contact with the nematodes. This product is not considered systemic in the plants by application to the soil (Lahm et al., 2017). Fluazaindolizine has been tested in laboratories, greenhouses and field trials in various parts of the world and has proved to be very efficient against several nematode species such as *Meloidogyne* spp., *Rotylenchulus* spp., *Xiphinema* spp., *Helicotylenchus* spp. and some species of *Pratylenchus* spp. (Lahm et al., 2017).

The search for less aggressive molecules to non-target organisms, humans and the environment and with high efficacy has been intensified and, thus, increased the development of new products for nematode control, taking into account the needs of farmers and requirements of regulatory agencies and society. The objective of this study was to evaluate two rates of three new nematicides in the control of *Meloidogyne incognita* in tomato plants under greenhouse conditions.

4.2 MATERIAL AND METHODS

The experiment was carried out in a greenhouse at the Department of Nematology

at the University of California, Riverside. The experiments were carried out in the periods from April to June/17 and May to July/17. Four-week-old tomato seedlings (cv. Red Gnome) were transplanted into 2.5 kg fiber pots with pasteurized sandy soil and infested with 5000 eggs and J2 of *M. incognita*. The pots were arranged in a completely randomized design, consisting of seven treatments and five replications. The treatments consisted of: 1) fluazaindolizine 4.49 $L.ha^{-1}$ (Salibro^{TM}-DuPont); 2) fluazaindolizine 2.25 $L.ha^{-1}$; 3) fluensulfone 5.85 $L.ha^{-1}$ (Nimitiz^{TM}-Adama); 4) fluensulfone 8.18 $L.ha^{-1}$; 5) fluopyram 0.95 $L.ha^{-1}$ (Velum-One^{TM}-Bayer); 6) fluopyram 0.48 $L.ha^{-1}$; 7) Non-treated control. The pots were drenched to water-holding capacity with a water suspension of the test products. The rates simulated field application recommendations based on the pot surface area. The non-treated control received water only. The plants were kept in a greenhouse at 25˚C and ambient light for 60 days.

Sixty days after inoculation, the fruits were harvested, counted and weighed. The plants were cut off at the soil level and the fresh and dry weight of shoots was determined. The roots were removed from the soil, rinsed in running water and dried on absorbent paper to obtain fresh weight. Root galling was rated on a scale of 0-10 (Zeck, 1971). After obtaining the gall rating the roots were immersed in erioglaucine dye solution overnight and the stained egg masses of root-knot nematodes were counted (Omwega et al., 1988). The eggs present in the roots were extracted and counted under stereoscope microscope (40x) (Hussey and Barker, 1973). A well-mixed soil sample (50 cm^3) from each pot was incubated in Baermann funnel for 5 days at 26°C. The collected J2 were counted under stereoscope microscope (40x). The reproduction factor was calculated according to Oostenbrink (1966).

The trial was repeated once and combined for statistical analysis. Normality of data residues and variance homogeneity was verified using non-parametric Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively. When necessary the data were transformed using

Box and Cox (1964) method prior to analysis to stabilize the variance and normalize the data residues. A one-way ANOVA was performed followed by the Fisher's LSD test for comparison of means (P=0.05).

4.3 RESULTS

Plant development and production represented by fresh and dry shoot weight, fresh root weight and fruit number and weight were not affected by the nematicides applied, in both rates used (Table 1). The variables gall index, egg masses, population density and reproduction factor of the root-knot nematode were significantly ($p < 0.05$) influenced by nematicides used (Table 2). No evidence of phytotoxicity (chlorosis, growth deformity, necrosis) was observed in the experiments.

All treatments with nematicides reduced the nematode population when compared to the untreated control (Table 2). Plants submitted to treatment with fluensulfone at the lowest dose (5.85 L/ha) presented the lowest gall index, differing from the control treatment and fluazaindolizine at higher dose (4.49 L/ha) (Table 2). For the variables number of egg masses, number of eggs per g of plant and reproduction factor all treatments showed efficiency in reducing *M. incognita* compared to untreated control. Treatment with fluensulfone at 5.85L/ha showed a reduction of 75% in the number of egg masses, 68% in population density and 74% in the nematode reproduction factor when compared to the untreated control (Table 2).

Juveniles of second stage (J2) present in the soil were reduced by fluensulfone at both doses (5.85 and 8.18 L/ha) when they were compared to non-treated control. All other treatments also reduced the number of juveniles in the soil although the differences were not significant at statistical level (Table 2).

121 **Table 1**. Biomass and productivity of tomato plants submitted to treatment with three new

122 non-fumigant nematicides to control *M. incognita*.

Treatment	Fresh shoot weight (g)	Dry shoot weight (g)	Root Weight (g)	Number of fruits	Fruits weight (g)
Fluazaindolizine 4.49 L/ha	264.96±20.11^{ns}	32.41±1.97^{ns}	60.23±4.11^{ns}	16.80±0.94^{ns}	545.31±69.50^{ns}
Fluazaindolizine 2.25 L/ha	245.95±22.01	28.90±2.77	59.18±5.50	14.20±0.87	564.02±55.06
Fluensulfone 5.85 L/ha	250.09±24.70	28.44±2.35	50.06±3.20	15.40±1.06	413.23±57.75
Fluensulfone 8.18 L/ha	257.83±29.23	31.45±2.52	50.70±5.57	13.60±1.38	396.21±27.27
Fluopyram 0.95 L/ha	247.31±24.23	29.44±2.87	53.94±4.95	15.20±1.31	576.89±62.28
Fluopyram 0.48 L/ha	274.41±20.75	32.03±1.98	50.16±3.49	15.30±1.37	539.11±66.62
Non-treated	237.21±25.26	28.57±2.33	63.72±3.44	15.20±1.20	531.84±49.54
F	0.279	0.506	1.592	0.733	1.658
P-value	0.945	0.802	0.164	0.624	0.146
CV (%)	29.80	25.36	25.24	24.66	35.35

123

124 **Table 2**. Effect of three new non-fumigant nematicides on tomato root galling, reproduction

125 of *M. incognita* and juveniles present in the soil.

Treatment	GI (0-10)	IC (%)	Nº of egg masses	IC (%)	Eggs.g^{-1} root[1]	IC (%)	RF[1]	IC (%)	J2 from soil	IC (%)
Fluazaindolizine 4.49 L/ha	4.10b	31	88.7b	66	545.89b	59	6.31b	63	49ab	35
Fluazaindolizine 2.25 L/ha	4.00bc	32	102.5b	61	754.72b	44	7.14b	58	48ab	37
Fluensulfone 5.85 L/ha	3.10c	47	65.2b	75	426.74b	68	4.38b	75	32b	58
Fluensulfone 8.18 L/ha	3.80bc	36	71.6b	73	667.21b	50	5.53b	68	13b	83
Fluopyram 0.95 L/ha	3.50bc	41	81.7b	69	808.48b	40	6.38b	63	41ab	46
Fluopyram 0.48 L/ha	3.60bc	39	125.3b	52	826.5b	38	7.84b	54	35ab	54
Non-treated	5.90a		260.5a		1341.31a		17.2a		76a	
F	7.405		7.247		1.592		4.461		3.032	
P-value	<0.001		<0.001		0.045		<0.001		0.011	
CV (%)	26.2		70.08		32.12		78.23		83.44	

126 [1] Data transformed by Box & Cox (1964) method. G.I.: Gall Index; IC: Control Index; RF:

127 Reproduction Factor.

4.4 DISCUSSION

Significant reduction of *M. incognita* infection in tomato plants was observed after application of the three new non-fumigant nematicides. Our study demonstrated that the use of fluensulfone, fluopyram and fluazaindolizine reduced the population and reproduction of the root-knot nematode in tomato plants, but there was no difference between the two rates used of each nematicide, which shows that in both lower and higher rates these nematicides are capable of interfering with the reproduction of *M. incognita* in tomato plants.

The results obtained with the application of fluensulfone, mainly for the variables galls index and number of juveniles in the soil, showed the efficiency of this nematicide in the control of *M. incognita* in tomato, in greenhouse test. Fluensulfone is a new, non-fumigant nematicide, with a mode of action still unknown, but previous studies showed that this compound has a true nematicidal action capable of killing the nematodes and not only paralyzing them, like the mode of action of organophosphorates and carbamates (Oka et al., 2009, Kearn et al., 2014). In addition, it is a water-soluble compound that moves through soil water, spreading more easily (Morris et al., 2016).

Studies with several species of plants have shown the ability of this nematicide to reduce the galls caused by *Meloidogyne* species in the roots of the cultivated plants and the population density of juveniles in the soil. In a double tomato-cucumber cultivation system, fluensulfone reduced the gall index by 73% in the tomato, persisting suppression of the root-knot nematode in the next crop (Morris et al., 2015). Jones et al. (2017) also observed low rates of gall in lima bean when submitted to treatment with fluensulfone, this treatment also increased the productivity.

Fluopyram was initially discovered as a succinate dehydrogenase inhibitor fungicide. It has an excellent biologically activity against all the stages of growth against various fungal plant pathogens belonging to Ascomycetes and Deuteromycetes on pome and

stone fruit as well as vegetable crops (Veloukas and Karaoglanidis, 2012). Lately, its efficiency in the mitigation of plant-parasitic nematode damage was demonstrated (Broeksma et al., 2014, Kim et al., 2017, Jones et al., 2017). Fluopyram has a nematostatic action, low concentrations of fluopyram are effective in inhibiting the infection of tomato roots by *M. incognita*, as demonstrated in this study and in the study by Faske and Hurd (2015), in which fluopyram presented negative effect on motility of *M. incognita* and *R. reniformis*. These authors reported a 78% reduction in root-knot nematode motility when exposed to fluopyram at 1.0µg/ml for 24 hours. This effect is similar to other non-fumigant nematostatic nematicides, suggesting that the mode of action of fluopyram may be due to interruption of chemoreception and the ability of the nematode to infect the host plant root system (Haydock et al., 2013; Faske and Hurd, 2015).

The application of fluazaindolizine reduced the reproduction of *M. incognita* in tomato plants cultivated in a greenhouse. Fluazaindolizine is another novel fluorine compound with nematicidal activity. It acts by contact and affects muscle function that causes ceasing of feeding, paralysis and eventually mortality (Chen et al., 2018). In aqueous assays, juveniles of the second stage of the *M. incognita* exposed to fluazaindolizine exhibited increased immobility and death between 24-96 hours (Lahm et al., 2017).

Studies related to the appropriate methods of application, the modes of action and the efficacy of these new nematicides are still very limited. However, our study showed that fluensulfone, fluopyram and fluazaindolizine are effective tools in the management of *Meloidogyne incognita* in tomato plants. These compounds signal an important development in the sustainable management of plant-parasitic nematodes.

4.5 LITERATURE CITED

BEEMAN, A. Q., and TYLKA, G. L. 2018. Assessing the effects of ILeVO and VOTiVO seed treatments on reproduction, hatching, motility and root penetration of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. Plant Disease 102:107-113.

BROEKSMA, A., PUETZKUHL, K., LAMPRECHT, S., and FUERSCH, H. 2014. Velum®-An evolutionary nematicide for efficient crop production. Journal of Nematology 46:140-141.

CHEN, X., LI, X., PANG, K., FAN, X., MA, Y., and HU, J. 2018. Dissipation behavior and residue distribution of fluazaindolizine and its seven metabolites in tomato ecosystem based on SAX SPE procedure using HPLC-QqQ-MS/MS technique. Journal of Hazardous Materials 342:698-704.

FASKE, T. R., and HURD, K. 2015. Sensitivity of *Meloidogyne incognita* and *Rotyenchulus reniformis* to fluopyram. Journal of Nematology 47(4):316-321.

HAYDOCK, P. P. J., WOODS, S. R., GROVE, I. G., and HARE, M. C. 2013. Chemical control of nematodes. Pp. 459–479 *in* R. N. PERRY, and M. MOENS, ed. Plant nematology, 2nd ed. Wallingford: CABI Publishing.

HUSSEY, R. S., and BARKER, K. R. 1973. A comparison of methods of collecting inoculum of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter 57:1.025-1.028.

JONES, J. G., KLECZEWSKI, M., DESAEGER, J., MEYER, S. L. F., and JOHNSON, G. C. 2017. Evaluation of nematicides for southern root-knot nematode management in lima

bean. Crop Protection 96:151-157.

KARSSEN, G., WESEMAEL, W., and MOENS, M. 2013. Root-knot nematodes Pp. 73–108 *in* R. N. PERRY, and M. MOENS, ed. Plant nematology, Wallingford, CT: CABI Publishers.

KAUR, D. N., SHARMA, S. K., and SULTAN, M. S. 2011. Effect of different chemicals on root knot nematode in seed beds of tomato. Plant Disease Research 26:170-170.

KEARN, J., LUDLOW, E., DILLON, J., O'CONNOR, V., and HOLDEN-DYE, L. 2014. Fluensulfone is a new nematicide with a mode of action distinct from anthicholinesterases and macrocyclic lactones. Pesticides Biochemistry and Physiology 109:44-57.

KIM, J., MWAMULA, A. O., KABIR, F., SHIN, J. H., CHOI, Y. H., LEE, J. K., and LEE, D. 2016. Efficacy of different nematicidal compounds on hatching and mortality of *Heterodera schachtii* infective juveniles. Korean Journal of Pesticides Science 20:293–299.

LAHM, G. P., DESAEGER, J., SMITH, B. K., PAHUTSKI, T. F., RIVERA, M. A., MELORO, T., KUCHARCZYK, R., LETT, R. M., DALY, A., SMITH, B. T., CORDOVA, D., THODEN, T., and WILES, J. A. 2017. The discovery of fluazaindolizine: A new product of the control of plant parasitic nematode. Biooganic & Medicinal Chemistry Letters 27:1572-1575.

MORRIS, K. A., LANGSTON, D. B., DICKSON, D. W., DAVIS, R. F., TIMPER, P., and NOE, J. P. 2015. Efficacy of fluensulfone in a tomato-cucumber double cropping system. Journal of Nematology 47(4):310-315.

MORRIS, K. A., LANGSTON, D. B., DAVIS, R. F., NOE, J. P., DICKSON, D. W., and TIMPER, P. 2016. Efficacy of various application methods of fluensulfone for managing root-knot nematodes in vegetables. Journal of Nematology 48(2):65-71.

OKA, Y., SHUKER, S., and TKACHI, N. 2009. Nematicidal efficacy of MCW-2, a new nematicide of the fluoroalkenyl group, against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. Pest Management Science 65:1082–1089.

OKA, Y., SHUKAR, S., and TKACHI, N. 2012. Systemic nematicidal activity of fluensulfone against the root-knot nematode Meloidogyne incognita on pepper. Pest Management Science 68:268–275.

OMWEGA, C. O., THOMASON, I. J., and ROBERTS, P. A. 1988. A nondestructive technique for screening bean germplasm for resistance to *Meloidogyne incognita*. Plant Disease 72:970–972.

OOSTENBRINK, M. 1966. Major characteristic of relation between nematodes and plants. Mededelingen Landbouwhogeschool 66(4):1-46.

OPPERMAN, C. H., and CHANG, S. 1990. Plant-parasitic nematode acetylcholinesterase inhibition by carbamate and organophosphate nematicides. Journal of Nematology 22:481–488.

SIKORA, R. A., and FERNANDEZ, E. 2005. Nematode parasites of vegetables. Pp. 319–

392 *in* M. Luc, R. A. Sikora, and J. Bridge, ed. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Wallingford, CT: CABI Publishing.

VELOUKAS, T., and KARAOGLANIDIS, G. S. 2012. Biological activity of the succinate dehydrogenase inhibitor fluopyram against *Botrytis cinerea* and fungal baseline sensitivity. Pest Management Science 68:858-864.

ZECK, W. M. 1971. A rating scheme for field evaluation of root-knot nematode infestations. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 24:141–144.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Todos os genótipos de tomateiro avaliados apresentaram reação de suscetibilidade ao *M. enterolobii*.

O tratamento com *B. subtilis* promoveu o desenvolvimento das plantas quando comparado com os outros produtos.

A aplicação de ASM no genótipo PXT 408 reduziu a reprodução de *M. enterolobii*.

Foram observadas alterações anatômicas, hipertrofia e hiperplasia, nas células radiculares de todas as plantas inoculadas, independente do tratamento aplicado.

A aplicação de *R. sachalinensis* reduziu a densidade populacional e a reprodução de *M. enterolobii* na cultivar H-9553 de tomateiro.

Os princípios ativos fluensulfone, fluopyram e fluazaindolizine foram eficazes na redução da densidade populacional e reprodução de *M. incognita* em tomateiro.

6 REFERÊNCIAS

ADAM, M.; HEUER, H.; HALLMANN, J. Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. **Plos One**, v. 9, n. 2, e90402, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090402. Acesso em: 5 nov. 2017.

ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 333-342, 2005.

ARAÚJO, F.F., MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 169-172, 2009.

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

CARNEIRO, R. M. D. G., ALMEIDA, M. R. A., BRAGA, R. S., ALMEIDA, C. A. de, and GIORIA, R. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* parasitando plantas de tomate e pimentão resistentes meloidoginose no estado de São Paulo. **Nematologia Brasileira**, **v.**30, n.1, p.81-86, 2006.

CUNHA J. P. B; MACHADO T. D. A; SANTOS F.L; COELHO LM. Losses in industrial tomato harvesting according to harvester setting. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 4, p.363-369, 2014.

FASKE, T. R.; HURD, K. Sensitivity of Meloidogyne incognita and *Rotyenchulus reniformis* to fluopyram. **Journal of Nematology**, v. 47, n. 4, p.316-321, 2015.

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

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION (FAO). **FAO Statistical Yearbook 2016**. 2016. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC. Acesso em: 3 nov. 2017.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S. **Introdução à nematologia**. Viçosa:UFV, 2001. 84p.

GERALDINI, F.; JULIÃO, L.; BORGATO, E. **Procuram-se agroindústrias**. Hortifruti Brasil, n. 104, p. 8-23, 2011.

LAHM, G. P.; DESAEGER, J.; SMITH, B. K.; PAHUTSKI, T. F.; RIVERA, M. A.; MELORO, T.; KUCHARCZYK, R.; LETT, R. M.; DALY, A.; SMITH, B. T.; CORDOVA, D.; THODEN, T.; WILES, J. A. The discovery of fluazaindolizine: A new product of the control of plant parasitic nematode. **Biooganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, p.1572-1575, 2017.

MELO, P. C. T. **Avanços recentes na tomaticultura de mesa associadas a mudanças no paradigma tecnológico e desafios a superar**. 2014. Disponível em: http://www.tomatedemesa.com.br/2014/noticia01.html. Acessado: 02 Fev 2018.

MORRIS, K. A.; LANGSTON, D. B.; DAVIS, R. F.; NOE, J. P.; DICKSON, D. W.; TIMPER, P. Efficacy of various application methods of fluensulfone for managing root-knot nematodes in vegetables. **Journal of Nematology**, v. 48, n. 2, p.65-71, 2016.

OKA, Y.; SHUKAR, S.; TKACHI, N. Systemic nematicidal activity of fluensulfone against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on pepper. **Pest Management Science**, v. 68, p.268-275, 2012.

OKA, Y.; SHUKER, S.; TKACHI, N. Nematicidal efficacy of MCW-2, a new nematicide of the fluoroalkenyl group, against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Pest Management Science**, v. 65, p.1082-1089, 2009.

OPPERMAN, C.H.; CHANG, S. Plant-parasitic nematode acetyl-cholinesterase inhibition by carbamate and organophosphate nematicides. **Journal of Nematology**, v. 22, p. 481–488, 1990.

PINHEIRO, J. B.; BOITEUX, L. S.; LOPES, C. A.; SILVA, G. O. da. **Identificação de fontes de resistência ao nematoide *Meloidogyne mayaguensis* em acessos de tomateiro (*Solanum lycopersicon*)**. Brasília: Embrapa Hortaliças (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 56). 2009. Available from: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/783053/1/bpd56.pdf. Accessed: 15 mai. 2017.

PINHEIRO, J. B.; PEREIRA, R. B.; SUINAGA, F. A. **Manejo de nematoides na cultura do tomate**. Embrapa, 2014. Circular Técnica.

ROSA, J. M. O; WESTERICH, J. N.; WILCKEN, S. R. S. Reação de genótipos e híbridos de tomateiro à *Meloidogyne enterolobii*. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p.1166-1171, 2014.

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

VU, T.; HAUSCHILD, R.; SIKORA, R.A. *Fusarium oxysporum* endophytes induced systemic resistance against *Radopholus similis* on banana. **Nematology**, v. 8, n. 6, p.847-852, 2006.

WPTC. The World Processing Tomato Concil. **WPTC World production estimate of tomatoes for processing**. 2018. Disponível em: https://www.wptc.to/pdf/releases/WPTC%20crop%20update%20as%20of%2025%20October%202018.pdf. Acesso: 30 out. 2018.