

*on line*

## Recursos genéticos, biológicos e bioquímicos para o manejo de *Meloidogyne enterolobii* em goiabeira

A contribuição da Embrapa Semiárido



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Semiárido  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**DOCUMENTOS 286**

**Recursos genéticos, biológicos  
e bioquímicos para o manejo de  
*Meloidogyne enterolobii* em goiabeira**

**A contribuição da Embrapa Semiárido**

*Juliana Martins Ribeiro  
José Mauro da Cunha e Castro  
Márcio dos Santos Teixeira Pinto  
Kátia Valevski Sales Fernandes  
Kátia Castanho Scortecci  
Elvira Maria Régis Pedrosa*

**Embrapa Semiárido**  
Petrolina, PE  
2018

Esta publicação está disponibilizada no endereço:  
<http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>  
Exemplares da mesma podem ser adquiridos na:

**Embrapa Semiárido**  
BR 428, km 152, Zona Rural  
Caixa Postal 23  
CEP 56302-970, Petrolina, PE  
Fone: (87) 3866-3600  
Fax: (87) 3866-3815

Comitê Local de Publicações

Presidente  
*Flávio de França Souza*

Secretária-Executiva  
*Lúcia Helena Piedade Kill*

Membros  
*Diana Signor Deon, Elder Manuel Moura Rocha, Francislene Angelotti, Gislene Feitosa Brito Gama, José Mauro da Cunha e Castro, Juliana Martins Ribeiro, Mizael Félix da Silva Neto, Pedro Martins Ribeiro Júnior, Roseli Freire de Melo, Sidinei Anunciação Silva, Tadeu Vinhas Voltolini.*

Supervisão editorial  
*Sidinei Anunciação Silva*

Revisão de texto  
*Sidinei Anunciação Silva*

Normalização bibliográfica  
*Helena Moreira de Queiroga e Sidinei Anunciação Silva*

Tratamento das ilustrações  
*Nivaldo Torres dos Santos*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Nivaldo Torres dos Santos*

Desenho da capa  
*Paulo Pereira da Silva Filho*

**1ª edição: 2018**

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
Embrapa Semiárido

---

Recursos genéticos, biológicos e bioquímicos para o manejo de *Meloidogyne enterolobii* em goiabeira: a contribuição da Embrapa / Juliana Martins Ribeiro... [et al.]. – Petrolina: Embrapa Semiárido, 2018.

25 p. (Documentos / Embrapa Semiárido; ISSN 1808-9992, 286).

1. Variedade resistente. 2. Tecido vegetal. 3. Genética vegetal. 3. Melhoramento genético vegetal. 4. Psidium. I. Ribeiro, Juliana Martins. II. Castro, José Mauro da Cunha e. III. Pinto, Márcio dos Santos Teixeira. IV. Fernandes, Kátia Valevski Sales. V. Scortecci, Kátia Castanho. VI. Pedrosa, Elvira Maria Régis. VII. Título. VIII. Série.

CDD 634.421

## Autores

### **Juliana Martins Ribeiro**

Bióloga, D.Sc. em Produção Vegetal, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

### **José Mauro da Cunha e Castro**

Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

### **Márcio dos Santos Teixeira Pinto**

Biólogo, D.Sc. em Biociências e Biotecnologia, professor da Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, TO.

### **Kátia Valevski Sales Fernandes**

Bióloga, Ph.D. em Bioquímica e Biologia Molecular de Plantas, professora da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ.

### **Kátia Castanho Scortecci**

Bióloga, D.Sc. em Ciências Biológicas, professora da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN.

### **Elvira Maria Régis Pedrosa**

Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Fitopatologia, professora da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.



## Apresentação

A goiabeira é uma importante cultura no cenário do agronegócio nacional e com grande aceitação dos seus frutos no mercado externo, contudo, observa-se que não estão disponibilizadas muitas informações sobre a cultura, principalmente sobre materiais genéticos resistentes a doenças, se comparado a outras culturas.

Da goiaba pode-se originar produtos como sucos, doces, geleias entre outros. O mais popular é a goiabada, comercializada de Norte a Sul do Brasil. Nos Estados Unidos, vem sendo comercializado um ketchup à base de goiaba, o que atesta o potencial de exploração da fruta.

A cultura da goiabeira é atacada por várias doenças como bacteriose, ferrugem e nematoide-das-galhas. Na pós-colheita, as mais comuns são antracnose, pinta-preta e podridão-estilar. Como existe potencial de exploração da fruta, é necessária a realização de pesquisas para desenvolver materiais resistentes a doenças com o objetivo de evitar e ou reduzir o uso de agrotóxicos, uma das exigências dos mercados, principalmente o externo.

Neste trabalho é apresentado um panorama dos resultados de pesquisas realizadas na Embrapa Semiárido em parceria com outras instituições para otimizar o melhoramento genético da goiabeira e desenvolver variedades resistentes a doenças, uma das premissas para o sucesso da cultura.

*Pedro Carlos Gama da Silva*  
Chefe-Geral da Embrapa Semiárido



## Sumário

Introdução .....	10
Recursos genéticos para o manejo de <i>Meloidogyne enterolobii</i> .....	12
A coleção de <i>Psidium</i> spp. da Embrapa Semiárido .....	12
A cultivar BRS Guaraçá .....	13
Espécies vegetais antagônicas a <i>Meloidogyne</i> spp. ....	14
Prospecção de novas espécies de <i>Psidium</i> resistentes a <i>Meloidogyne enterolobii</i> .....	14
Respostas moleculares de <i>Psidium</i> spp. ao <i>Meloidogyne enterolobii</i> ..	16
Considerações finais .....	21
Agradecimentos .....	22
Referências .....	22



## Introdução

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é uma importante cultura, principalmente, nas áreas irrigadas do Nordeste brasileiro. Entretanto, os estados da Bahia e de Pernambuco se destacam na produção da fruta que se destina, em maior parte, ao mercado nacional para consumo in natura e à indústria para produção de sucos, geleias, doces, sorvetes, além de outros produtos mais novos como o “guatchup”. Nas condições climáticas do Nordeste, o manejo da poda possibilita a produção de frutos de alta qualidade em qualquer época do ano. Em 2011, o Nordeste apresentou a maior em produção, seguida pelo Sudeste. No período de 2011 a 2014, Pernambuco se destacou como o segundo estado em produção de goiaba, perdendo apenas para o Estado de São Paulo no ranking nacional. Referente à área colhida, a região Nordeste foi a primeira na escala nacional de 2011 a 2014 (Agriannual, 2017).

A produção de goiaba no Nordeste brasileiro, principalmente no Submédio do Vale do São Francisco, apresenta destaque nacional. Porém, a ocorrência de problemas fitossanitários tem prejudicado a produção e inviabilizado várias áreas de cultivo (Flori; Castro, 2009). Dentre os fitopatógenos que atacam a cultura, os nematoides do gênero *Meloidogyne*, detectados em goiabeiras cultivadas no Nordeste brasileiro (Moura; Moura, 1989), figuram como sérios limitantes ao desempenho das plantas. O nematoide, descrito como *Meloidogyne enterolobii* Yang & Eisenback (sin. *M. mayaguensis*) é considerado como agente causal do declínio-da-goiabeira (Carneiro et al., 2001). Em trabalhos subsequentes, o declínio-da-goiabeira foi considerado uma doença complexa por haver interação do nematoide-das-galhas com *Fusarium solani*, um fungo habitante do solo (Gomes et al., 2011).

O nematoide e o fungo, juntos, estão associados a um declínio generalizado da planta. Nas raízes, a formação de galhas e apodrecimento compõem os sintomas primários da doença. Na parte aérea, observam-se alteração no formato dos frutos e na coloração dos galhos. Em fase mais avançada do parasitismo, é frequente ocorrer a morte da planta afetada (Gomes et al., 2011; Miranda et al., 2011; Biazatti et al., 2016).

O uso de nematicidas, de cultivares resistentes ou tolerantes, inclusive de porta-enxertos com essa característica, e a rotação de culturas com plantas resistentes são as estratégias mais comumente empregadas no manejo de

áreas infestadas com nematoides. No entanto, para a cultura da goiabeira, ainda não existem métodos de controle efetivos. Este fato é agravado pelo elevado risco de disseminação do patógeno por meio de mudas e implementos agrícolas contaminados. Os nematicidas disponíveis no Brasil são de natureza sistêmica, pertencentes aos grupos químicos dos carbamatos e organofosforados, que são altamente tóxicos ao ser humano e ao ambiente e, de modo geral, são ineficientes no controle de *M. enterolobii*. Até o momento, não existem nematicidas registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) para utilização na cultura da goiabeira (Halbrendt; LaMondia, 2004; Agrofit, 2017).

Genótipos com grau máximo de resistência, considerados imunes, seriam ideais para uso como porta-enxertos. Todavia, não sendo encontrado um genótipo com a característica de imunidade, recomenda-se utilizar outros que apresentem resistência, pois os genótipos com essa característica possuem a capacidade de desenvolvimento satisfatório, mesmo quando infectados e, por isso, podem ser considerados uma alternativa viável de manejo. Não existem cultivares de goiabeiras resistentes a *M. enterolobii*. Algumas espécies de araçazeiro demonstraram resistência ao nematoide-das-galhas da goiabeira (Carneiro et al., 2007; Almeida et al., 2009; Biazatti et al., 2016; Castro et al., 2017), mas o menor desenvolvimento das plantas em condições semiáridas e a incompatibilidade de enxertia observada a campo impossibilitaram o uso dessa espécie como porta-enxerto de cultivares comerciais de goiabeira.

A rotação de culturas é muito eficiente e bastante difundida para o controle de várias doenças e pragas. Entretanto, não é recomendada para o manejo de áreas cultivadas com goiabeiras infectadas por nematoides, pois o aspecto perene da cultura limita o alcance de sucesso (Halbrendt; Mondia, 2004).

Em função da importância do tema, não só para o Nordeste, mas para todo o Brasil, várias são as pesquisas, desenvolvidas por diferentes instituições, visando a solucionar o problema causado pelo nematoide-das-galhas à cultura da goiabeira. Sendo assim, esta publicação tem como objetivo reunir dados de pesquisa, gerados pela Embrapa Semiárido em parceria com outras instituições de pesquisa e ensino, que abordam a utilização de recursos genéticos, biológicos e bioquímicos para controle de *M. enterolobii* em goiabeira. São resultados de pesquisa básica publicados, trabalhos finalizados

com eficácia comprovada, bem como dados preliminares obtidos a partir de atividades em andamento. Os dados apresentados servem para mostrar o avanço da pesquisa nesta linha temática, a contribuição da Embrapa Semiárido na obtenção destes resultados e novas abordagens que poderão ser exploradas para que as pesquisas que envolvem este tema se desenvolvam cada vez mais.

## Recursos genéticos para o manejo de *Meloidogyne enterolobii*

### A coleção de *Psidium* spp. da Embrapa Semiárido

A Embrapa Semiárido possui uma coleção de *Psidium*, que contém 118 acessos de goiabeira e 40 de araçazeiros. Os acessos que compõem a coleção foram coletados em 35 regiões ecogeográficas, definidas com base no Zoneamento Agroecológico do Nordeste e em mapas de vegetações do Brasil, de dez estados brasileiros, sendo eles: Maranhão (25 de goiabeira e um de araçazeiro), Piauí (três de goiabeira e um de araçazeiro), Sergipe (12 de goiabeira e dois de araçazeiro), Bahia (dez de goiabeira e sete de araçazeiro), Pernambuco (nove de goiabeira e quatro de araçazeiro), Rio Grande do Sul (cinco de goiabeira e cinco de araçazeiro), Rondônia (15 de goiabeira e cinco de araçazeiro), Roraima (sete de goiabeira e quatro de araçazeiro), Goiás (17 de goiabeira e sete de araçazeiro) e Amazonas (15 de goiabeira e quatro de araçazeiro) (Santos et al., 2008; Silva et al., 2010).

A multiplicação foi realizada por sementes, sendo cada acesso representado por seis indivíduos, no espaçamento de 4 m x 4 m, em Petrolina, PE (Santos et al., 2008, Silva et al., 2010). Além disso, amostras de sementes de cada acesso foram coletadas e armazenadas em câmara fria, caso haja necessidade do reestabelecimento da coleção, bem como para intercâmbio de material com outras instituições de pesquisa (Silva et al., 2010).

Os 118 acessos de goiabeira e 40 de araçazeiros dessa coleção foram caracterizados morfológicamente por meio da utilização de 40 descritores UPOV, constatando-se diferenças entre os espaços das nervuras das folhas, tamanhos e cores de frutos entre araçazeiros e goiabeiras (Santos et al., 2008). Parte da coleção foi caracterizada molecularmente por meio da utilização de dez marcadores microssatélites, resultando na elaboração de um dendro-

grama da dissimilaridade genética entre 54 acessos de *Psidium*, coletados em dez estados brasileiros, analisados com 67 alelos de dez marcadores microssatélites (Oliveira et al., 2009; Silva et al., 2010). Ainda nesse sentido, realizou-se a caracterização proteica, dos teores de açúcares totais, dos sólidos solúveis, da acidez titulável e vitamina C de 70 acessos da coleção (Corrêa et al., 2009a, 2009b).

## **A cultivar BRS Guaraçá**

A cultivar BRS Guaraçá é um híbrido resultante de um único cruzamento entre o acesso Gua161PE (*Psidium guajava*) e o acesso Ara138RR (*Psidium guineense*), realizado em Petrolina, PE, no ano de 2010. A hibridação foi confirmada por marcadores de DNA e por caracteres morfológicos, como nervura das folhas (Santos et al., 2017; Souza et al., 2018).

Em avaliações realizadas no campo, 120 dias após a inoculação com suspensão contendo 10.000 ovos e juvenis de *Meloidogyne enterolobii*, plantas do BRS Guaraçá, com 15 cm a 20 cm de altura apresentaram fator de reprodução zero e ausência de galhas no sistema radicular. Amostras de solo coletadas em 22 plantas do BRS Guaraçá, após 5 anos de transplântio para o campo com presença endêmica do patógeno, apresentaram ausência total de juvenis de segundo estágio (J2), fase infectiva do nematoide. Em avaliações realizadas 24 meses após o transplântio em quatro áreas de produtores em Petrolina, PE, o número de J2 no sistema radicular da cultivar Paluma foi 530 vezes maior que o número encontrado no sistema radicular do BRS Guaraçá. De 45 plantas enxertadas no BRS Guaraçá, apenas uma apresentou declínio visual moderado devido ao ataque do patógeno, enquanto o declínio variou de severo a total, tendo resultado na morte de 15 plantas de 'Paluma'. Em colheitas realizadas 30 meses após o transplântio em áreas de produtores, as cultivares Paluma e Pedro Sato, enxertadas no BRS Guaraçá, apresentaram boa produção, com cerca de 40 toneladas de frutos por hectare, o que foi dez vezes maior que a cultivar Paluma sem enxerto. O diâmetro do caule e a largura do dossel foram maiores para as cultivares enxertadas no híbrido em comparação com aquelas sem enxerto (Santos et al., 2017; Souza et al., 2018).

Essa cultivar foi registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) com RNC 35849 (Santos et al., 2017). O BRS Guaraçá tem

mostrado resistência ao patógeno e alta compatibilidade de enxertia com 'Paluma' e 'Pedro Sato', além de não apresentar custos elevados na obtenção de mudas e ser agrônômica e ambientalmente seguro e viável. Atualmente, se constitui uma opção disponível, com eficiência comprovada e economicamente viável para contornar o problema do nematoide das galhas da goiabeira (Santos et al., 2017; Souza et al., 2018).

### **Espécies vegetais antagônicas a *Meloidogyne* spp.**

Após a eliminação das goiabeiras infectadas por *M. enterolobii* numa área de campo localizado no Núcleo 10, do Perímetro Irrigado Senador Nilo Coelho, em Petrolina, PE, foi feita a aração, gradagem e demarcação das parcelas experimentais para se avaliar a eficiência de amendoim (*Arachis hypogaea*), capim-elefante (*Penisetum purpureum* cv. Napier e *P. purpureum* cv. Napier Roxo), capim-colônia (*Panicum maximum* cv. Mombaça) e milho (*Zea mays* cv. BRS Caatingueiro), consideradas plantas não hospedeiras de diversas espécies de *Meloidogyne* spp.

Apesar das baixas populações de juvenis de segundo estágio (J2) do nematoide no solo por ocasião de instalação do experimento, observou-se que os números médios de ovos e J2 em raízes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv. Santa Clara), utilizado em bioteste conduzido em casa de vegetação, com solo coletado nas parcelas experimentais, variou de 120 (capim-colônia) a 3.413,3 (milho). Estes resultados indicam que o cultivo de plantas antagonistas a *M. enterolobii* pode ser eficiente na desinfestação do solo, porém, um período de cultivo maior da planta antagonista se faz necessário (Santana et al., 2009). Além disso, o consórcio de estratégias com a exposição do solo ao sol poderá aumentar a eficiência de controle do patógeno. Onde a irrigação for possível, maior eficiência poderá ser alcançada, pois a irrigação induz a eclosão de maior número de J2 que, posteriormente, será eliminado pela exposição ao sol.

### **Prospecção de novas espécies de *Psidium* resistentes a *Meloidogyne enterolobii***

A busca por novas espécies que apresentem resistência a *M. enterolobii* é uma atividade constante em projetos que visam à prospecção de recursos genéticos com potencial para controle do nematoide-das-galhas da goiabeira. Novos materiais estão sempre sendo coletados e avaliados quanto à sua

resistência ao patógeno. Castro et al. (2017), visando avaliar a reação de *Psidium* spp. a *M. enterolobii*, observaram que, 7 meses após a inoculação das plantas com ovos do nematoide, ocorreu a formação de galhas em todo o sistema radicular apenas em *P. guajava* 'Paluma', que é suscetível ao nematoide. Em *P. grandifolium* e em *P. cattleianum*, oriundos do estado de São Paulo e em *P. cattleianum*, proveniente do estado do Paraná, não foi observado o desenvolvimento de galhas radiculares. Ao final das análises, observou-se que as três espécies de araçazeiro avaliadas apresentaram fatores de reprodução iguais ou muito próximos a zero e foram consideradas resistentes. No entanto, nas raízes da goiabeira 'Paluma', o fator de reprodução do nematoide foi maior que 1, o que caracteriza a suscetibilidade ao patógeno. O acesso de *Psidium cattleianum*, proveniente de Marialva, no Paraná, apresentou fator de reprodução igual a zero. Nos acessos de *Psidium grandifolium* e de *P. cattleianum*, oriundos de Jaboticabal, São Paulo, os fatores de reprodução foram iguais a 0,004 e a 0,003, respectivamente.

Esses resultados demonstram que os araçazeiros avaliados têm potencial para serem utilizados no desenvolvimento de porta-enxertos resistentes ao declínio-da-goiabeira, apesar de muitos deles apresentarem incompatibilidade de enxertia com a goiabeira 'Paluma'. O material vegetal avaliado se encontra instalado no Campo Experimental de Bebedouro, Petrolina, PE e servirá de base para novas análises nesta linha de pesquisa. Esta coleção, composta atualmente por cinco genótipos de *Psidium* spp., deverá ser incorporada ao BAG de *Psidium*.

Espécies presentes nessa coleção de *Psidium* foram avaliadas quanto à penetração, desenvolvimento, reprodução e respostas celulares induzidas nas raízes por *M. enterolobii*, por meio de um trabalho realizado pela Embrapa Semiárido em parceria com a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). As plantas foram avaliadas aos 5, 10 e 20 dias após a inoculação (DAI) para a penetração e desenvolvimento e aos 60 DAI para a reprodução do nematoide. *Psidium cattleianum*, *P. friedrichstalianum* e *P. guineense* se comportaram como resistentes ao nematoide e *P. guajava* confirmou sua suscetibilidade. Durante o período experimental, em relação às análises histológicas, observou-se que *M. enterolobii* não completou o ciclo de vida nas espécies resistentes que apresentaram sítios de alimentação pouco desenvolvidos (Sousa et al., 2017).

Em outra parceria entre a Embrapa Semiárido e a Universidade Estadual de Feira de Santana (Uefs), situada em Feira de Santana, no estado da Bahia, foi avaliada a reação a *M. enterolobii* de acessos de araçazeiros classificados em *Psidium guineense*, *P. schenchanum* e *Psidium* sp. em comparação com *P. guajava* 'Paluma' sob três densidades de inóculo do nematoide. As menores amplitudes do fator de reprodução do nematoide, nas três densidades de inóculo avaliadas, foram observadas num acesso de araçazeiro de espécie não identificada, proveniente da localidade denominada Caldeirão da Serra, no município de Uauá, BA (Oliveira, 2017).

Com este trabalho, observou-se, ainda, que a taxa de reprodução do nematoide no sistema radicular de cada planta apresentou redução para a maioria dos acessos à medida que as densidades de inóculo aumentaram, com poucos acessos mostrando tendência contrária nas duas densidades maiores. Assim, concluiu-se que a avaliação do processo de reprodução do nematoide em acessos de *Psidium* quanto à resistência a *M. enterolobii* deve ser mensurada em diferentes densidades do inóculo.

### **Respostas moleculares de *Psidium* spp. ao *Meloidogyne enterolobii***

Entre as abordagens adotadas para a prospecção de fatores relacionados com a resistência a *M. enterolobii*, está sendo realizada a prospecção de proteínas diferencialmente expressas em *Psidium* spp. por meio de uma parceria entre a Embrapa Semiárido e a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Uenf). Para estas avaliações, foram utilizadas plantas de araçazeiro 'Costa Rica' cultivadas em casa de vegetação, como espécie resistente, e goiabeira 'Paluma', como espécie suscetível.

As proteínas totais de raízes foram extraídas utilizando-se tampão de extração de proteínas (Tris HCl 0,1 M, pH 8,0 e NaCl 0,5 M) na proporção de 1:2 (um de amostra para 2 de tampão). Os extratos foram transferidos para tubos e centrifugados a 20000 g durante 20 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante das amostras foi transferido para outro tubo para posterior quantificação, sendo a das proteínas realizada segundo a metodologia desenvolvida por Bradford (1976).

O perfil das proteínas extraídas foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, segundo método de Laemmli (1970).

Foi utilizado material liofilizado de seis amostras para a análise do perfil das proteínas. Um gel SDS-PAGE 12% foi carregado com 50 µg de proteína e foi submetido à eletroforese durante 4 horas, sendo corado com corante Coomassie Blue R durante 5 minutos e transferido para solução descorante. Foram detectadas três proteínas ( $M_r \sim 29, 22$  e  $15$  kDa) expressas, exclusivamente, em raízes de plantas resistentes, aos 20 dias de infecção (Resende et al., 2016).

Ao contrário do observado na espécie resistente, não foi verificada a presença de proteínas diferencialmente expressas em plantas suscetíveis, nem mesmo entre plantas inoculadas e não inoculadas com o nematoide, nem entre os diferentes tempos de inoculação testados. Esses resultados sugerem que as proteínas diferencialmente expressas podem estar relacionadas com o processo de resistência a *M. enterolobii*, uma vez que foram expressas apenas nas raízes da espécie resistente, em plantas inoculadas com o nematoide (Resende et al., 2016).

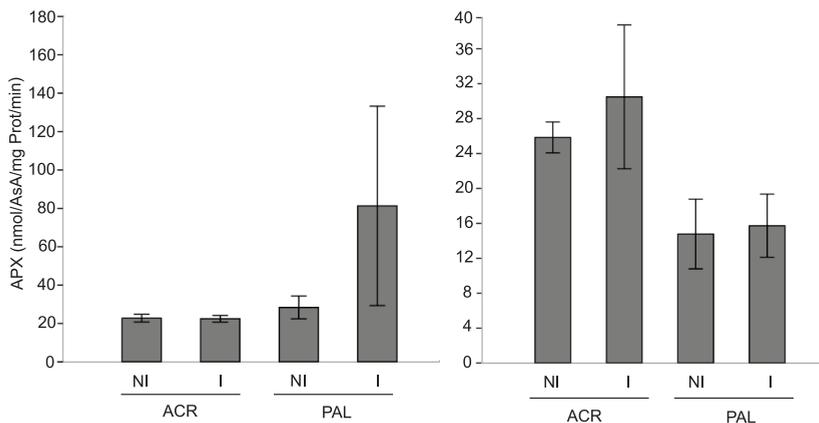
Como perspectivas deste trabalho, pretende-se efetuar o sequenciamento das proteínas diferencialmente expressas em araçazeiro 'Costa Rica' e, posteriormente, desenhar iniciadores baseados nessas sequências proteicas para auxiliarem na prospecção de genes relacionados com a resistência ao nematoide. A obtenção das sequências das proteínas diferencialmente expressas também possibilitará a produção de anticorpos para a realização de ensaios com novas espécies de *Psidium*, buscando-se a caracterização do material quanto à resistência a *M. enterolobii*.

Ainda com o objetivo de prospectar proteínas relacionadas com a resistência a *M. enterolobii*, a Embrapa Semiárido, em parceria com a Uenf e com a Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), incluiu, em suas pesquisas, a medição das atividades de enzimas relacionadas com o estresse oxidativo e metabolismo fenólico, tais como polifenoloxidades (PPO), peroxidases (POX), catalases (CAT), superóxido dismutase (SOD), fenilalanina amônia liase (PAL) e ascorbato peroxidase (APX). Algumas atividades já possuem resultados publicados e outras se encontram em andamento.

Em relação à atividade das PPO nas raízes de *Psidium* spp., não houve efeito dos tempos de inoculação avaliados (10, 20 e 30 dias antes da coleta) na atividade desta enzima, tanto para goiabeira 'Paluma' (espécie suscetível),

quanto para araçazeiro ‘Costa Rica’ (espécie resistente), pois a atividade, nos tempos avaliados, em cada espécie, não diferiu das respectivas testemunhas não inoculadas. Entretanto, foi observado efeito significativo das espécies utilizadas para a atividade dessa enzima, que foi maior em araçazeiro ‘Costa Rica’, quando comparado com goiabeira ‘Paluma’. Nas PPOs, também não foi observado efeito significativo dos tempos de inoculação avaliados na atividade de peroxidases nas raízes, tanto na goiabeira ‘Paluma’, quanto no araçazeiro ‘Costa Rica’, pois a atividade nestes tempos, para cada espécie, não diferiu entre si nem das respectivas testemunhas não inoculadas. Além disso, também não foi observado efeito das espécies de *Psidium* utilizadas na atividade de POXs, pois esta foi estatisticamente igual entre o araçazeiro ‘Costa Rica’ e a goiabeira ‘Paluma’ (Ribeiro et al., 2015).

Foram realizados ensaios enzimáticos para a medição da atividade da enzima CAT em raízes de *Psidium* spp., inoculadas e não inoculadas com o nematoide, aos 10, 20 e 30 dias após a inoculação (DAI); CAT, POX e APX em tecidos de raízes e folhas aos 26 DAI. Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicatas utilizando-se material refrigerado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Houve diferença significativa apenas na atividade da APX aos 26 DAI em tecidos de raízes, que foi maior em araçazeiro ‘Costa Rica’, quando comparado com goiabeira ‘Paluma’ (Figura 1).



**Figura 1.** Atividade enzimática de ascorbato peroxidase (APX) nos tecidos radiculares e foliares aos 26 dias após a inoculação (DAI). Comparação dos níveis da enzima APX nos tecidos de folhas (a) e raízes (b) entre as espécies de araçazeiro (*Psidium* sp.) ‘Costa Rica’ (ACR) vs. goiabeira (*Psidium guajava* L.) ‘Paluma’ (PAL), dos grupos controle (Não Inoculado – NI) e submetido ao estresse biótico pela inoculação com *Meloidogyne enterolobii* (Inoculado – I), aos 26 DAI. Barras simbolizam o desvio padrão. Teste Anova – Tukey ( $p < 0,05$ ). Fonte: Araújo (2016).

As atividades relacionadas à prospecção de proteínas com potencial para controle de *M. enterolobii* se encontram em andamento na Uenf, Campos dos Goytacazes, RJ. Apenas a espécie resistente (araçazeiro 'Costa Rica') foi testada até o momento, tanto para a expressão diferencial de proteínas, quanto para a medição de enzimas relacionadas com o estresse oxidativo e metabolismo fenólico. Espera-se concluir esses estudos para a espécie citada, bem como iniciar atividades nesse sentido com outras espécies que apresentem resistência comprovada ao nematoide, incluindo diferentes tempos de inoculação.

Com o intuito de compreender a resposta transcricional de *Psidium* spp. à inoculação com nematoide *M. enterolobii*, RNAs extraídos de uma espécie resistente (araçazeiro 'Costa Rica') e outra espécie suscetível (goiabeira 'Paluma') foram sequenciados com a utilização da plataforma Illumina.

Essa atividade foi realizada em parceria com a UFRN e foram utilizadas raízes e folhas de plantas resistentes e suscetíveis, inoculadas e não inoculadas com o nematoide, na extração de RNA. Primeiramente, a extração de RNA total foi realizada por método à base de fenol e cloreto de lítio. Um dos primeiros problemas encontrados foi a obtenção de um RNA de qualidade. O material extraído foi analisado, tanto em gel de agarose quanto em espectrofotômetro, e foi constatado que a baixa qualidade do RNA total extraído das plantas não estava associada com inoculação com o nematoide, mas, provavelmente, ao fato de a espécie apresentar muitos compostos fenólicos, ou outros metabólicos secundários e/ou polissacarídeos que poderiam prejudicar a precipitação dos ácidos nucleicos (Loomis, 1974; Salzman et al., 1999, Diaz-de-Ceri et al., 2016).

Em seguida, foram testados quatro kits comerciais, gerais ou específicos para plantas, os quais não resultaram em boa qualidade das amostras de RNA e reprodutibilidade do protocolo. Die e Román (2012) enfatizam a importância dessa qualidade para experimentos de qRT-PCR e sequenciamento de RNA. Sendo assim, foram testados novamente protocolos à base de fenol e cloreto de lítio, normalmente utilizados para plantas que apresentavam alto teor de compostos fenólicos (Kiefer et al., 2000; Azevedo et al., 2003; Gasic et al., 2004; Muoki et al., 2012). Entre os protocolos testados, o que resultou em melhor reprodutibilidade qualidade do RNA total extraído foi aquele com a adaptação de um tampão de extração (0,2 M Tris-HCl pH 5; 0,1 M LiCl; 5 mM EDTA, 1/10 V SDS 10%). O material macerado em nitrogênio líquido foi

misturado ao tampão de extração adaptado, que foi centrifugado e o sobrenadante transferido para um novo tubo. A este sobrenadante foi adicionado um volume de uma solução de 6 M LiCl, o qual foi mantido a 4 °C por 16-18 horas. Decorrido este tempo, o material foi centrifugado, o sobrenadante descartado e o precipitado formado foi ressuspensão em 1 mL de solução 3 M LiCl. Posteriormente, o material foi centrifugado, o precipitado formado foi ressuspensão em água ultrapura previamente tratada com DEPC, centrifugado e o sobrenadante transferido para um novo tubo onde foi adicionado 1/10 volume de 3 M Acetato de Sódio, e dois volumes de etanol 100%. Este material foi misturado e mantido em freezer -80 °C por 15 minutos, depois centrifugado, lavado com etanol 70%, seco e ressuspensão em água ultrapura previamente tratada com DEPC. Finalmente, as amostras passaram por um tratamento com DNase I para eliminar possível contaminação com DNA genômico.

A qualidade do RNA total extraído foi verificada em: a) espectrofotômetro, que revelou a razão A260/A280 com valores satisfatórios (1,85 - 1,9); b) gel de agarose 2%, apresentando número reduzido de bandas e/ou o rastro (Figura 2); e c) por meio do equipamento Bioanalyzer 2000, para a avaliação da integridade, qualidade e quantidade dos RNAs extraídos, fornecendo uma pontuação de integridade (RIN – RNA Integrity Number) para cada amostra, com valores variando de 1 a 10. Os valores de RIN obtidos foram de 8,0 na espécie resistente (araçazeiro ‘Costa Rica’) inoculada; 6,9 na espécie resistente não inoculada; 7,3 na espécie suscetível (goiabeira ‘Paluma’) inoculada e 7,5 na espécie suscetível não inoculada.

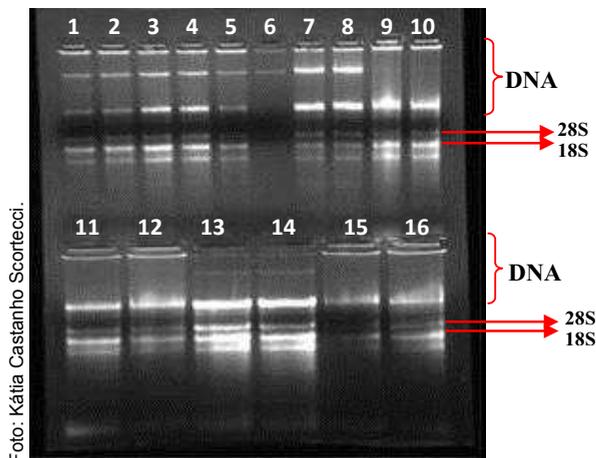


Foto: Kátia Castanho Scortecchi.

**Figura 2.** Gel de agarose 2% com padrão de amostras de RNA total extraídos de folhas de *Psidium* spp. Observa-se a presença de DNA genômico, das bandas padrão de RNA 28S e 18S e, abaixo do RNA 18S, a presença de RNA ribossômico. **1-4:** espécie suscetível (goiabeira ‘Paluma’) inoculada; **5-10:** espécie resistente (araçazeiro ‘Costa Rica’) inoculado; **11-14:** espécie suscetível (goiabeira ‘Paluma’) não inoculada; **15-16:** espécie resistente (araçazeiro ‘Costa Rica’) não inoculado.

A quantidade de RNA total obtida de raízes foi insuficiente para a realização do sequenciamento de RNA, tendo sido utilizado apenas RNA de folhas nesta etapa. Os dados estão sendo analisados utilizando-se diferentes ferramentas de bioinformática, e encontram-se em andamento na UFRN, Natal, RN.

## Considerações finais

Várias são as abordagens adotadas na tentativa de controlar o nematoide das galhas da goiabeira. A prospecção de espécies de *Psidium* que apresentem resistência ao nematoide é uma atividade constante, pois a busca por novas fontes de resistência é necessária para programas de melhoramento genético, visando a contornar problemas de quebra de resistência genética na planta, para a prospecção de fatores relacionados à resistência ao patógeno, bem como para a busca de espécies resistentes que apresentem compatibilidade de enxertia com goiabeiras.

Em estudos realizados pela Embrapa Semiárido e seus parceiros, o melhoramento genético foi utilizado para a obtenção de híbridos resultantes do cruzamento entre goiabeiras e araçazeiros, gerando plantas resistentes ao nematoide e compatíveis para enxertia com goiabeiras. A prospecção de fatores relacionados à resistência ao nematoide está sendo realizada por meio da análise de proteínas e de transcritos diferencialmente expressos em plantas resistentes. O estudo de espécies antagonicas e a rotação de culturas indicou que estas estratégias sozinhas e pelo tempo em que foram avaliadas não foram suficientes para promover o efetivo controle do nematoide-das-galhas da goiabeira. A consorciação de medidas de controle e a avaliação por tempos maiores são necessárias para a obtenção de resultados mais precisos.

Como perspectivas para a prospecção de fatores relacionados à resistência a *M. enterolobii*, espera-se avaliar outras espécies de *Psidium* que apresentem resistência ao nematoide; otimizar protocolos para a extração de RNA de raízes de *Psidium* spp.; incluir diferentes tempos de inoculação com o nematoide e prospectar novos fatores que apresentem potencial para superar os problemas de incompatibilidade de enxertia entre espécies de *Psidium*.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa Semiárido, pelo suporte financeiro, ao Dr. Carlos Antônio Fernandes Santos, pela disponibilização de informações a respeito do híbrido, e aos alunos Emanuela de Oliveira Alves de Araújo (UFRN), Alain Denis de Sousa (UFRPE), Jaqueline Maximiano Resende (Uenf), Patrícia Gomes de Oliveira (Uefs), Soniane Rodrigues da Costa (Uefs) e Rejanildo Robson Cândido de Souza (Uefs) pela participação nas atividades que geraram os resultados apresentados.

## Referências

- AGRIANUAL: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2017.
- AGROFIT: sistemas agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 17 jun. 2018.
- ALMEIDA, E. J.; SANTOS, J. M.; MARTINS, A. B. G. Resistência de goiabeiras e araçazeiros a *Meloidogyne mayaguensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 4, p. 421-423, abr. 2009.
- ARAÚJO, E. de O. A. **Avaliação morfológica e enzimática de plantas de *Psidium* spp. infectadas com *Meloidogyne enterolobii***. 2016. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) — Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.
- AZEVEDO, H.; LINO-NETO, T.; TAVARES, R. M. Na improved method for high quality RNA isolation from needles of adult maritime pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 21, p. 333-338, 2003.
- BIAZATTI, M. A.; SOUZA, R. M.; MARINHO, C. S.; GUILHERME, D. O.; CAMPOS, G. S.; GOMES, V. M.; BREMENKAMP, C. A. Resistência de genótipos de araçazeiros a *Meloidogyne enterolobii*. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 418-420, 2016.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.
- CASTRO, J. M. da C. e; RIBEIRO, J. M.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; ALMEIDA, E. J. de; SOUSA, A. D.; de OLIVEIRA, P. G. de Reprodução do nematoide-das-galhas da goiabeira em acessos de *Psidium*. **Comunicata Scientiae**, v. 8, n. 1, p. 149-154, 2017.
- 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.; CIROTTA, P. A.; QUINTANILHA, A. P.; SILVA, D. B.; CARNEIRO, R. G. Resistance to *Meloidogyne mayaguensis* in *Psidium* spp. Accessions and their grafting compatibility with *P. guajava* cv. 'Paluma'. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 281-284, 2007.

CORRÊA, L. C.; SANTOS, C. A. F.; LIMA, G. P. P.; RODRIGUES, M. A.; RIBEIRO, H. L. C. Aspectos químicos e bioquímicos em goiabas e araçás do banco ativo de germoplasma da Embrapa Semiárido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 12., 2009, Fortaleza. **Desafios para produção de alimentos e bioenergia**. Fortaleza: SBFV, 2009a. 1 CD-ROM.

CORRÊA, L. C.; SANTOS, C. A. F.; LIMA, G. P. P.; OLIVEIRA, M. M. de; ARAÚJO, J. S. Vitamina C em goiabas do banco ativo de germoplasma da Embrapa Semiárido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 12., 2009, Fortaleza. **Desafios para produção de alimentos e bioenergia**. Fortaleza: SBFV, 2009b. 1 CD-ROM

DÍAZ-DE-CERIO, E.; GÓMEZ-CARAVACA, A.M.; VERARDO, V.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, F.; SEGURA-CARRETERO, A. Determination of guava (*Psidium guajava* L.) leaf phenolic compounds using HPLC-DAD-QTOF-MS. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 376-388, 2016.

DIE, J. V.; ROMÁN, B. RNA quality assessment: a view from plant qPCR studies. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 17, p. 6069-6077, 2012.

FLORI, J. E.; CASTRO, J. M. da C. e. A cultura da goiabeira irrigada no Nordeste brasileiro. In: NATALE, W.; ROZANE, D. E.; SOUZA, H. A.; AMORIM, D. A. (Ed.). **Cultura da goiaba do plantio à comercialização**. Jaboticabal: Unesp, 2009. p. 507-524.

GASIC, K.; HERNANDEZ, A.; KORBAN, S. S. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 22, n. 4, p. 437-438, 2004.

GOMES, V. M.; SOUZA, R. M.; MUSS-DIAS, V.; SILVEIRA, S. F. da; DOLINSKI, C. Guava decline: a complex disease involving *Meloidogyne mayaguensis* and *Fusarium solani*. **Journal of Phytopathology**, v. 158, p. 45-50, 2011.

HALBRENDT, J. M.; MONDIA, J. A. Ia. Crop rotation and other cultural practices. In: CHEN, Z. X.; CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. (Ed.). **Nematology: advances and perspectives**. Wallingford: CABI: Tsinghua University, 2004. v. 2, p. 909-930.

KIEFER, E.; HELLER, W.; ERNST, D. A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 18, n. 1, p. 33-39, 2000.

LAEMMLI, L. I. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage. **Nature**, v. 227, p.680-685, 1970.

LOOMIS, W. Overcoming problem of phenolic and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. **Methods in Enzymology**, v. 31, p. 528-545, 1974.

MIRANDA, G. B.; SOUZA, R. M.; GOMES, V. M.; FERREIRA, T. F.; ALMEIDA, A. M. Avaliação de acessos de *Psidium* spp. quanto à resistência a *Meloidogyne enterobii*. **Bragantia**, v. 71, n. 1. p. 52-58, 2011.

MOURA, R. M.; MOURA, A. M. Meloidoginose da goiabeira: doença de alta severidade no Estado de Pernambuco, Brasil. **Nematologia Brasileira**, v. 13, p. 13-19, 1989.

MUOKI, R. C.; PAUL, A.; KUMARI, A.; SINGH, K.; KUMAR, S. Na improved protocol for the isolation of RNA from roots of tea (*Camellia sinensis*) (L.) O. Kuntze. **Molecular Biotechnology**, v. 52, n. 1, p.82-88, 2012.

OLIVEIRA, P. G. de. **Avaliação de acessos do gênero *Psidium* spp. visando resistência ao nematóide *Meloidogyne enterolobii* e à salinidade**. 2017. 73 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) — Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

OLIVEIRA, M. M. de; SANTOS, C. A. F.; CORREA, L. C.; ARAÚJO, J. S.; RIBEIRO, H. L. C. Diversidade genética em acessos de goiabeira (*Psidium guajava* L.) de diferentes origens geográficas avaliadas por marcadores microssatélites. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMI-ÁRIDO, 4., 2009, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2009. p. 94-100. (Embrapa Semi-Árido. Documentos, 221).

RESENDE, J. M.; CASTRO, J. M. da C. e; RIBEIRO, J. M.; FERNANDES, K. V. S. Prospecção de proteínas relacionadas com a resistência à *Meloidogyne enterolobii* em *Psidium* spp. In: CONGRESSO FLUMINENSE DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, 8.; ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UENF, 21.; CIRCUITO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO IFFLUMINENSE, 13.; JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFF, 8., 2016, Campos dos Goytacazes. **Ciência, tecnologia e sociedade**. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro: Instituto Federal Fluminense: Instituto de Ciências da Sociedade e Desenvolvimento Regional da Universidade Federal Fluminense, 2016. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/144494/1/juliana-2016.pdf>>. Acesso em:

RIBEIRO, J. M.; PINTO, M. dos S. T.; CASTRO, J. M. da C. e; MELO, N. F. de; FERNANDES, K. V. S. **Atividade de peroxidases e polifenoloxidasas em *Psidium* spp. resistentes e suscetíveis a *Meloidogyne enterolobii***. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2015. 16 p. il. (Embrapa Semiárido. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 122). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/141646/1/BPD122Juliana.pdf>>. Acesso em: 17 maio 2018.

SALZMAN, R. A.; FUJITA, T.; ZHU-SALZMAN, K.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. An improved method for plant tissues containing high level of phenolic compounds or carbohydrates. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 17, n. 1, p. 11-17, 1999.

SANTANA, T. A. S.; ANTUNES JÚNIOR, E. F.; CARDOSO, J. M. S.; BITENCOURT, N. V.; MOREIRA, J. N.; VOLTOLINI, T. V.; CASTRO, J. M. da. C. e Eficiência de gramíneas na recuperação de áreas infestadas pelo nematóide-das-galhas da goiabeira. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMI-ÁRIDO, 4., 2009, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2009. p. 159-164. (Embrapa Semi-Árido. Documentos, 221)

SANTOS, C. A. F.; CASTRO, J. M. C. E.; SOUZA, F. F.; VILARINHO, A. A.; FERREIRA, F. R.; PADUA, J. G.; BORGES, R. M. E.; RODRIGUES, M. A. Preliminary characterization of *Psidium* germplasm in different Brazilian ecogeographic regions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 3, p. 437-440, 2008.

SANTOS, C. A. F.; COSTA, S. R. da; SOUZA, R. R. C. de. BRS Guaraçá: porta enxerto de goiabeira resistente ao *Meloidogyne enterolobii*. In: CONGRESSO LUSO-BRASILEIRO DE HORTICULTURA, 1., 2017, Lisboa. **Inovação ao serviço dos negócios**. Lisboa: Associação Portuguesa de Horticultura, 2017. p. 202.

SILVA, A. F.; SANTOS, C. A. F.; ARAUJO, F. P. de; LIMA NETO, F. P.; MOREIRA, J. N.; FERREIRA, M. A. J. F.; LEÃO, P. C. de S.; DIAS, R. de C. S.; ALBUQUERQUE, S. G. de Recursos genéticos vegetais conservados na Embrapa Semiárido. In: SÁ, I. B.; SILVA, P. C. G. da. (Ed.). **Semiárido brasileiro**: pesquisa, desenvolvimento e inovação. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. cap. 8, p. 274-315. il.

SOUSA, A. D. de; PEDROSA, E. M. R.; ULISSES, C.; CASTRO, J. M. da C. e; RIBEIRO, J. M. Penetration, development, and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on *Psidium* species and induced cellular responses in the roots. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 2, p. 1-10, 2017.

SOUZA, R. R. C. de; SANTOS, C. A. F.; S.; COSTA, S. R. da. Field resistance to *Meloidogyne enterolobii* in a *Psidium guajava* × *P. guineense* hybrid and its compatibility as guava rootstock. **Fruits**, v. 73, n. 2, p. 118-124, 2018.



---

*Semiárido*

