

## Herança de resistência ao *Meloidogyne incognita* raça 2 em pepino

Ariane Cunha Salata<sup>1</sup>, Antonio Ismael Inácio Cardoso<sup>1</sup>, Sílvia Renata Siciliano Wilcken<sup>2</sup>, Erick Vinicius Bertolini<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, Departamento de Horticultura, Fazenda Lageado, Lageado, CEP 18603-970, Botucatu, SP, Brasil. Caixa Postal 237. E-mail: ariane\_salata@yahoo.com.br; ismaeldh@fca.unesp.br; erickbertolini@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, Departamento de Proteção Vegetal, Fazenda Lageado, Lageado, CEP 18603-970, Botucatu, SP, Brasil. Caixa Postal 237. E-mail: srenata@fca.unesp.br

### RESUMO

Os nematoides de galhas estão entre os principais problemas na produção de pepino, principalmente em ambiente protegido. A utilização de cultivares resistente é o método mais eficiente e barato para o controle. Objetivou-se estudar a herança genética de resistência ao *Meloidogyne incognita* em pepino. Foi feito cruzamento entre uma linhagem obtida a partir do híbrido Tsuyataro (L1), moderadamente resistente, e outra a partir do híbrido Yoshinari (L2), suscetível a *M. incognita* raça 2. Após a obtenção da população  $F_1$  (L1 x L2) entre estas linhagens foram obtidas as gerações  $F_2$  e  $F_1RC_1$  para as duas linhagens ( $F_1RC_{1L1}$  e  $F_1RC_{1L2}$ ). Foram avaliados os seis tratamentos (duas linhagens parentais, gerações  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_1RC_{1L1}$  e  $F_1RC_{1L2}$ ), em um delineamento em blocos ao acaso, com cinco repetições. As plantas foram inoculadas com o nematoide (5.000 ovos por planta) após o transplante. Aos 60 dias após a inoculação avaliou-se o índice de galhas e de massa de ovos no sistema radicular e fator de reprodução (FR). Foram realizadas análises estatístico-genéticas apropriadas para a segregação obtida nas gerações  $F_1$ ,  $F_2$  e retrocruzamentos para se estimar a herança da resistência observada. O FR observado na linhagem L2 (Yoshinari) foi de 7,21, mais que o dobro da linhagem L1 (Tsuyataro) que foi de 3,28. A resistência parcial à *M. incognita* raça 2 observada em pepino 'Tsuyataro' é quantitativa, com predominância de efeitos aditivos, com três genes principais condicionando-a.

**Palavras-chave:** *Cucumis sativus*, fator de reprodução, galhas, nematoide

## Inheritance of resistance to *Meloidogyne incognita* race 2 in cucumber

### ABSTRACT

Root knot nematodes are among main problems in cucumber production, mainly in protected cultivation. The utilization of resistant cultivars is the most efficient and cheapest method of control. The objective of this research was to study the genetic inheritance of resistance to *Meloidogyne incognita* in cucumber. A cross between a inbred line obtained from Tsuyataro hybrid (L1), moderately resistant, and another from the Yoshinari hybrid (L2), susceptible to *M. incognita* race 2 was done. Population  $F_1$  (L1 x L2) between these two lines, generations  $F_2$  and  $F_1BC_1$  were obtained for both lines ( $F_1BC_{1L1}$  and  $F_1BC_{1L2}$ ). Six treatments (two parental lines, generations  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_1BC_{1L1}$  and  $F_1BC_{1L2}$ ) were evaluated in a complete block design with five replications. Plants were inoculated with the nematode (5,000 eggs per plant) after transplantation. At 60 days after inoculation gall and eggs mass index in root and reproduction factor (FR) were determined. Statistical-genetics analyses were performed according to the segregation obtained in generations  $F_1$ ,  $F_2$  and backcrossings to estimate the resistance of inheritance observed. The FR observed for line L2 (Yoshinari) was 7.21, more than twice of the observed for line L1 (Tsuyataro) that was 3.28. The partial resistance to *M. incognita* race 2 in 'Tsuyataro' cucumber is quantitative, with predominance of additive effects, with three main genes conditioning it.

**Key words:** *Cucumis sativus*, reproduction factor, root knot, nematode

## Introdução

Dentre as cucurbitáceas, o pepino é a espécie mais cultivada em ambiente protegido em todo o mundo (Robinson & Decker-Walters, 1999). A maioria dos híbridos de pepino tipo japonês são partenocárpicos, característica que lhes conferem a possibilidade de serem cultivados em ambiente protegido durante o ano todo (Cardoso & Silva, 2003; Filgueira, 2008).

Porém, o uso do solo de forma intensiva favorece a ocorrência de problemas fitossanitários provocados pelos patógenos de solo, dentre os quais se destacam os fitonematóides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.), que infectam as raízes prejudicando a eficiência na absorção de água e nutrientes. Pesquisas demonstraram que os nematóides podem causar perdas de até 80% no campo e de 100% em estufa na cultura do pepino (Charchar & Aragão, 2005).

As espécies *M. incognita* e *M. javanica* são prejudiciais à agricultura devido a sua grande distribuição geográfica e capacidade de atingir níveis populacionais que podem provocar danos em poucos ciclos de cultivo (Schomaker & Been, 2006).

Dentre as principais medidas de controle está a utilização de cultivares resistentes (Walters et al., 1993), sendo este o método mais eficiente e barato, tornando-se a forma mais adequada de controle, sob o ponto de vista agrônomico e ecológico.

Resistência para *M. arenaria* raças 1 e 2 e *M. javanica* foram observadas em *Cucumis sativus* var. *hardwickii*, porém foi considerada suscetível para todas as raças de *M. incognita* testadas (Walters et al., 1993).

Wilcken et al. (2010) observaram que as abóboras mais utilizadas como porta-enxertos para a cultura do pepino no Brasil apresentaram fatores de reprodução variando de 4 a 8 para *M. incognita*, valores estes inferiores aos dos cultivares de pepino avaliados (21 a 38), exceto o híbrido Tsuyataro que apresentou menor fator de reprodução (FR= 5,0) em relação aos outros pepinos comerciais estudados e semelhante aos porta-enxertos, o que foi confirmado por Salata et al. (2012).

Para que se possa utilizar esta resistência moderada do ‘Tsuyataro’ em programas de melhoramento, objetivou-se com este trabalho estudar a herança genética de resistência ao *M. incognita* raça 2 em pepino ‘Tsuyataro’.

## Material e Métodos

Esta pesquisa foi realizada na Fazenda Experimental São Manuel, pertencente à Faculdade de Ciências Agrônomicas (FCA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, localizada no município de São Manuel-SP. Segundo a classificação de Köppen, o clima predominante é tipo Cfa, temperado quente (mesotérmico) úmido e a temperatura média do mês mais quente é superior a 22 °C e precipitação média anual de 1377 mm (Cunha & Martins, 2009). As plantas foram conduzidas em estruturas de cultivo protegido não climatizadas, tipo arco, com pé direito aproximado de 2,8 m, largura de 7 m, comprimento de 20 m e cobertura de polietileno transparente de 150 µm de espessura e com tela antiafídeos fechando as laterais.

Como fonte de resistência moderada ao *M. incognita* raça 2 foi utilizada uma linhagem S5 obtida a partir do híbrido Tsuyataro. Como padrão de suscetibilidade foi utilizada uma linhagem S5 do híbrido Yoshinari.

Plantas da linhagem de Tsuyataro (parental L1) foram cruzadas com plantas da linhagem de Yoshinari (parental L2), obtendo-se a geração F<sub>1</sub> (L1 x L2). Plantas desta geração F<sub>1</sub> foram inter cruzadas ao acaso obtendo-se a geração F<sub>2</sub>. Outra amostra de 20 plantas desta geração F<sub>1</sub> foram retrocruzadas com seus respectivos parentais, obtendo-se as gerações F<sub>1</sub>RC<sub>1</sub> para L1 e L2, denominadas de F<sub>1</sub>RC<sub>1L1</sub> e F<sub>1</sub>RC<sub>1L2</sub>, respectivamente.

Foram avaliados para resistência a *M. incognita* estes seis tratamentos (as duas populações parentais, L1 e L2, as gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> entre estes parentais e as duas populações do retrocruzamento, F<sub>1</sub>RC<sub>1L1</sub> e F<sub>1</sub>RC<sub>1L2</sub>), no delineamento experimental em blocos ao acaso, com cinco repetições. O número de plantas por parcela foi diferente para cada geração de acordo com a variabilidade genética esperada dentro de cada uma. As linhagens e a geração F<sub>1</sub> tinham 10 plantas, a geração F<sub>2</sub> e os retrocruzamentos foram 20 plantas, pois estes apresentam maior variabilidade. Foram, portanto, 50 plantas de cada linhagem, da geração F<sub>1</sub> e 100 plantas das gerações F<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>RC<sub>1L1</sub> e F<sub>1</sub>RC<sub>1L2</sub>.

A semeadura foi realizada em bandejas de “isopor” de 128 células no dia 19 de dezembro de 2012. Quando as plântulas emitiram a segunda folha definitiva foram transplantadas (03 de janeiro de 2013) para vaso plástico (1 planta por vaso) com capacidade para 1L, onde foram inoculadas e cultivadas até a avaliação. Tanto o substrato utilizado na bandeja como nos vasos foram autoclavados.

Populações puras da espécie *M. incognita* raça 2 foram isoladas a partir da retirada da massa de ovos de cada fêmea devidamente identificada e multiplicadas em raízes de tomateiro ‘Rutgers’ em vasos com substratos previamente autoclavado, em casa de vegetação. O preparo do inóculo seguiu o protocolo proposto por Coolen & D’Herde (1972). Foram inoculados 5.000 ovos por planta (vaso), cinco dias após o transplante. A suspensão de nematóides foi distribuída no interior de dois orifícios abertos ao lado da planta. A confirmação da viabilidade do inóculo foi feita utilizando como padrão de suscetibilidade o tomateiro ‘Rutgers’, duas plantas por repetição.

A avaliação foi realizada aos 60 dias após a inoculação. O sistema radicular foi lavado sob água corrente e após a retirada do excesso de umidade com papel toalha foi pesado. Em seguida, as raízes foram imersas em solução de Floxina B por 15 min, para coloração das massas de ovos. Foram contados o número de massas de ovos e avaliado o número total de nematóides da raiz, obtido mediante extração pelo método de Coolen & D’Herde (1972) para o cálculo do fator de reprodução FR = população final do nematoide (Pf)/ população inicial (número de ovos utilizados na inoculação) do nematoide (Pi), segundo Oostenbrink (1966).

Este fator foi utilizado para a classificação das plantas quanto à reação aos nematóides. Plantas com fator de reprodução semelhante ao da linhagem de Tsuyataro (L1) foram consideradas moderadamente resistentes.

Apesar de terem sido obtidos os números de galhas e de massa de ovos, a análise estatístico-genética foi apenas com

o fator de reprodução (FR), pois é o índice que mostra o quanto o nematoide consegue se multiplicar, sendo o índice normalmente utilizado para avaliar resistência (Oostenbrink, 1966; Roberts, 2002).

Após rejeitar-se a igualdade das médias pela análise de variância, elas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Confirmada a diferença significativa entre as populações, foi feita a análise genética, segundo o modelo descrito por Mather & Jinks (1971), estimando-se os efeitos gênicos aditivos (d), de dominância (h) e diferentes interações gênicas (epistasia). As análises foram realizadas com o programa GENES (Cruz, 2013).

## Resultados e Discussão

O tomateiro 'Rutgers' apresentou fator de reprodução (FR) igual a 8,2, comprovando a viabilidade do inóculo utilizado.

A linhagem L2 (Yoshinari) apresentou fator de reprodução superior (aproximadamente o dobro) ao da linhagem L1 (Tsuyataro) e à população  $F_1RC_{L1}$  (Tabela 1), mostrando que a linhagem 'Tsuyataro' é moderadamente resistente à *M. incognita* em comparação a linhagem de 'Yoshinari', segundo os critérios de Roberts (2002) e Cook & Starr (2006). Segundo estes autores, uma população é moderadamente resistente quando permite menor multiplicação do nematoide. Ressalta-se que os retrocruzamentos tiveram valores significativamente iguais aos de seus respectivos parentais recorrentes, enquanto a geração F1 apresentou média intermediária entre as linhagens. O valor obtido para a linhagem L1 (FR = 3,28) é semelhante ao obtido por Salata et al. (2012) para o híbrido Tsuyataro (FR = 3,57) que originou esta linhagem. Já Wilcken et al. (2010) relataram, para *M. incognita*, FR de 5,0 em 'Tsuyataro' e FR de 30,7 para 'Yoshinari', valores superiores aos deste estudo.

Se for considerado o critério de Oostenbrink (1966), todas as populações serão consideradas suscetíveis, pois permitiram a multiplicação dos nematoides (fator de reprodução > 1). Já pelos critérios descritos por Roberts (2002), as plantas que proporcionam menor multiplicação do nematoide podem ser consideradas hospedeiras, porém parcialmente resistentes em comparação com as que permitem maior multiplicação.

Em uma área naturalmente infestada por *M. incognita*, esta menor multiplicação é menos prejudicial, pois quanto maior a população inicial, maior o dano à planta. Esta é a estratégia utilizada pelos produtores quando realizam a enxertia de pepino sobre abóboras que, embora com FR > 1 (Wilcken et al., 2010), multiplicam menos os nematoides e permitem alguns ciclos a mais com produção de pepino. Huang & Viana (1980), em

experimento com pepino 'Aodai', relataram maior perda de produção quanto maior o nível inicial de inóculo, com morte das plantas com o nível de inóculo de  $10^5$  ovos/litro de solo.

Quanto à análise genética, observou-se significância para o modelo mais simplificado (aditivo/dominante), apenas com os efeitos aditivos (d) e de dominância (h), sem as interações gênicas. Este modelo aditivo/dominante, sem interações gênicas (epistasia), apresentou elevada determinação ( $R^2 = 0,92$  - Tabela 2), sendo os dados observados muito próximos dos estimados (Tabela 1).

O valor dos efeitos aditivos (d) foi negativo (-1,926) (Tabela 2). O modelo adotado considera que o parental 1 (linhagem L1 de Tsuyataro) é o de maior valor, ou seja, acima da média (m). Quando ocorre o contrário, ou seja, o parental 2 apresenta valor superior (acima da média: m), como neste caso, a estimativa é apresentada com um valor negativo. Os efeitos aditivos (d) foram muito superiores (mais que o dobro) aos de dominância (h). Considerando-se que os efeitos aditivos são aqueles que podem ser fixados na forma homocigota por seleção, pode-se inferir que a maior parte dos efeitos gênicos responsáveis pela resistência parcial a *M. incognita* raça 2 observada nesta linhagem de Tsuyataro podem ser transferidos para outras linhagens de pepino (Mather & Jinks, 1971). Se os efeitos de dominância fossem maiores, esta resistência seria mais pronunciada nos híbridos.

Os efeitos de dominância (h) também foram negativos (-0,986) (Tabela 2), o que explica a população  $F_1$  ter apresentado média mais próxima do parental moderadamente resistente L1, assim como a população  $F_2$ . Esta última tem, em média, apenas metade dos efeitos de dominância ( $1/2 \cdot h$ ), pois cerca de 50% dos locos já estão em homocigose, ou seja, sem os efeitos de dominância.

Em pepino são poucos os trabalhos sobre resistência aos nematoides de galhas. Walters et al. (1997) relataram que resistência à *M. javanica* é condicionada por um gene recessivo ( $m_j$ ), sendo este o único trabalho encontrado sobre modo de herança da resistência de pepino à nematoide. Devran et al. (2011) encontraram marcadores moleculares fortemente ligados a este gene *mj* que pode facilitar a seleção de plantas resistentes sem a necessidade de inoculação. Porém, este gene não condiciona resistência a *M. incognita*.

Na análise realizada com o programa Genes, há a estimativa do número provável de genes principais, que foi 3 (três). Portanto, apesar da resistência parcial à *M. incognita* raça 2 nesta linhagem de Tsuyataro ser poligênica (quantitativa), são poucos os genes principais, tanto que cerca de 42% das plantas da geração  $F_2$  apresentaram FR próximo da média da linhagem considerada moderadamente resistente (FR médio de 3,28), podendo ser selecionadas em programa de melhoramento visando resistência a este patógeno.

**Tabela 1.** Médias do fator de reprodução obtidas e estimadas segundo modelo de Mather & Jinks (1971) nas populações estudadas

Tratamento	Número de plantas avaliadas	Fator de reprodução	
		Obtido	Estimado
L1 (linhagem de Tsuyataro)	40	3,28 b*	3,15
L2 (linhagem de Yoshinari)	40	7,21 a	7,00
$F_1$ (L1 x L2)	40	4,80 ab	4,09
$F_2$ ( $F_1$ x $F_1$ )	80	5,13 ab	4,58
$F_1RC_{L1}$ ( $F_1$ x L1)	80	3,39 b	3,62
$F_1RC_{L2}$ ( $F_1$ x L2)	80	5,26 ab	5,54
Coefficiente de variação (CV)		12,1%	-

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

**Tabela 2.** Estimativas da média (m), dos efeitos gênicos aditivos (d) e de dominância (h) para o fator de reprodução, segundo o modelo de Mather & Jinks (1971)

Efeito	Estimativa
m	5,073
d	-1,926
h	-0,986
$R^2$	0,92

Deve-se destacar que apesar de parcialmente resistente pelos critérios de Roberts (2002), esta linhagem de Tsuyataro é considerada suscetível pelos critérios de Oostenbrink (1966), pois permitiu a multiplicação do nematoide (FR > 1,0). Porém, é melhor um genótipo que multiplique menos o nematoide do que outro que multiplique muito, principalmente quando for cultivada uma espécie ou cultivar suscetível a este nematoide logo após o pepino. Destaca-se que as principais abóboras utilizadas como porta-enxerto para pepino que são descritas como resistentes à *M. incognita* também multiplicam o nematoide, com FR semelhante ao de 'Tsuyataro' e inferior às demais cultivares de pepino testados (Wilcken et al., 2010; Salata et al., 2012).

## Conclusão

A resistência parcial à *M. incognita* raça 2 observada em pepino 'Tsuyataro' é quantitativa, com predominância de efeitos aditivos, com três genes principais condicionando-a.

## Literatura Citada

- Cardoso, A. I. I.; Silva, N. Avaliação de híbridos de pepino do tipo japonês sob ambiente protegido em duas épocas de cultivo. Horticultura Brasileira, v.21, n.2, p.170-175, 2003. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362003000200010>>.
- Charchar, J. M.; Aragão, F. A. S. Reprodução de *Meloidogyne* spp. em cultivares de tomate e pepino sob estufa plástica e campo. Nematologia Brasileira, v.29, n.2, p.243-249, 2005. <<http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/ol%20292/243-249%20pb.pdf>>. 10 Mar. 2014.
- Cook, R.; Starr, J. L. Resistant cultivars. In: Perry, R. N.; Moens, M. (Eds.). Plant nematology. Cambridge: CABI, 2006. p.370-391.
- Coolen, W. A.; D'Herde, C. J. A method for quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Merebelke: State Nematology Research Station, 1972. 77p.
- Cruz, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. Acta Scientiarum, v.35, n.3, p.271-276, 2013. <<http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v36i3.21251>>.
- Cunha, A. R.; Martins, D. Classificação climática para os municípios de Botucatu e São Manuel, SP. Irriga, v.14, n.1, p.1-11, 2009. <<http://dx.doi.org/10.15809/irriga.2009v14n1p01>>.
- Devran, Z.; Firat, A. F.; Tör, M.; Mutlu, N.; Elekçioğlu, I. H. AFLP and SRAP markers linked to the mj gene for root-knot nematode resistance in cucumber. Scientia Agricola, v.68, n.1, p.115-119, 2011. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162011000100017>>.
- Filgueira, F. A. R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa, 2008. 412p.
- Huang, C. S.; Viana, B. F. Relação entre níveis de inóculo pré-plantio de *Meloidogyne incognita* com o desenvolvimento do pepino. Fitopatologia Brasileira, v.5, p.401-402, 1980.
- Mather, K.; Jinks, J. L. Biometrical Genetics. 2.ed. London: Chapman and Hall, 1971. 382p.
- Oostenbrink, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Mededelingen Landbouwhogeschool, v.66, n.4, p.3-46, 1966.
- Roberts, P. A. Concepts and consequences of resistance. In: Starr, J. L.; Cook, R.; Bridge, J. (Eds.). Plant resistance to parasitic nematodes. Wallingford: CABI, 2002. p.23-42.
- Robinson, R. W.; Decker-Walters, D. S. Cucurbits. Cambridge: CAB International, 1999. 226p.
- Salata, A. C.; Magro, F. O.; Bertolini, E. V.; Wilcken, S. R.; Cardoso, A. I. I. Efeito da enxertia na produção de pepino e na reprodução de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. Horticultura Brasileira, v.30, n.4, p.590-594, 2012. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362012000400005>>.
- Schomaker, C. H.; Been, T. H. Plant growth and population dynamics. In: Perry, R. N.; Moens, M. (Eds.). Plant nematology. Cambridge: CABI, 2006. p.276-300.
- Walters, S. A.; Wehner, T. C.; Barker, K. R. A single recessive gene for resistance to the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in *Cucumis sativus* var. hardwickii. The Journal of Heredity, v.88, n.1, p.66-69, 1997. <<http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a023060>>.
- Walters, S. A.; Wehner, T. C.; Barker, K. R. Root-knot nematode resistance in cucumber and horned cucumber. HortScience, v.28, n.2, p.151-154, 1993. <<http://hortsci.ashspublications.org/content/28/2/151.full.pdf>>. 12 Mar. 2014.
- Wilcken, S. R. S.; Rosa, J. M. O.; Higtuti, A. R. O.; Garcia, M. J. M.; Cardoso, A. I. I. Reprodução de *Meloidogyne* spp. em porta-enxertos e híbridos de pepino. Horticultura Brasileira, v.28, n.1, p.120-123, 2010. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362010000100023>>.