

DECLÍNIO DA GOIABEIRA (*Psidium guajava* L.): ETIOLOGIA E  
CARACTERIZAÇÃO DA SUA PATOGÊNESE

**VICENTE MARTINS GOMES**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
DEZEMBRO DE 2011

DECLÍNIO DA GOIABEIRA (*Psidium guajava* L.): ETIOLOGIA E  
CARACTERIZAÇÃO DA SUA PATOGÊNESE

**VICENTE MARTINS GOMES**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Ricardo Moreira Souza

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

DEZEMBRO DE 2011

**DECLÍNIO DA GOIABEIRA (*Psidium guajava* L.): ETIOLOGIA E  
CARACTERIZAÇÃO DA SUA PATOGÊNESE**

**VICENTE MARTINS GOMES**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutor em Produção Vegetal.

Aprovada em 19 de Dezembro de 2011

Comissão Examinadora:

---

**Prof. Silvaldo Felipe da Silveira ( DSc em Fitopatologia ) – UENF**

---

**Prof. Fabio Ramos Alves ( DSc em Fitopatologia ) – UFES**

---

**Prof<sup>a</sup>. Cláudia Dolinski ( PhD em Fitopatologia ) – UENF**

---

**Prof. Ricardo Moreira de Souza ( PhD em Fitopatologia ) – UENF**  
Orientador

## **DEDICO**

À minha mãe, Etelvina Martins Gomes, e ao meu pai, Antonio Tarcisio Gomes, não somente pela concretização deste trabalho, mas pela sábia lição de vida, amor, respeito e confiança depositados em mim em todos os momentos da minha vida. Aos meus irmãos, Sebastião, Eliane, Natalino, Juvenal e Ernane pelo carinho e compreensão e à minha noiva Denise por compartilhar sua alegria e generosidade e fazer com que meus dias se tornassem mais suaves.

## **OFEREÇO**

A Deus, pela força interior capaz de superar momentos difíceis e pela oportunidade de desfrutar o sucesso de cada etapa da vida.

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela grande oportunidade na pesquisa e conhecimentos adquiridos e ao CNPq pela concessão da bolsa;

Ao Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF), pela oportunidade concedida para a realização deste curso;

Aos meus orientadores, Profa. PhD Claudia M. Dolinski e Prof. PhD Ricardo M. Souza, pela amizade e orientação segura na realização dos experimentos, disponibilizando-se por diversas vezes no interesse de resolver os problemas enfrentados neste trabalho;

A todos os professores do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia da UENF, bem como à secretária Rita Silva e o técnico Vicente Mussi Dias, pela amizade e colaboração;

Aos amigos do Laboratório de Nematologia, Eleodoro Del Vale, Juan Pablo Molina, Juan Carlos Lara, Dimmy Barbosa, Luciano Bellini, Inês Ribeiro, Ramon Minas, Carla Cristina, Rogério Burla, Eduardo Barreto, Paulo Victor Dias, Thiago Ferreira, Fernando Pereira, Liliana Parente, Renata Robaina, Denise Cardoso e Guilherme Miranda, Raphael Sanfine Livia pelo apoio e consideração durante os trabalhos. ■

## SUMÁRIO

|  | Página |
|--|--------|
| Resumo .....   | V      |
| Abstract .....   | vii    |
| 1. Introdução.....   | 1      |
| 2. Revisão de Literatura .....   | 3      |
| 2.1 Aspectos botânicos da goiabeira.....   | 3      |
| 2.2 Aspectos culturais e importância econômica da cultura da<br>cultura da goiabeira.....  | 3      |
| 2.3 Os fitonematoides.....   | 4      |
| 2.3.1 <i>Meloidogyne enterolobii</i> .....   | 5      |
| 2.4 Doenças complexas .....  | 10     |
| 2.4.1 Interação nematoide / planta.....  | 11     |
| 2.4.2 Interações fungo / planta.....   | 12     |
| 2.4.3 Interações fungo / nematoide / planta.....   | 13     |
| 2.5 Alguns aspectos da biologia e sistemática de <i>Fusarium</i> sp.....   | 14     |
| 2.5.1 Utilização de técnicas moleculares na identificação de<br><i>Fusarium</i> sp.....  | 16     |
| 3. Trabalhos .....   | 17     |
| 4. Conclusões.....   | 85     |
| 5. Referências bibliográficas.....   | 86     |
| 6. Apêndice .....  | 102    |
| 6.1 A – (Artigo 1) Guava Decline: A Complex Disease Involving<br><i>Meloidogyne mayaguensis</i> and <i>Fusarium solani</i> ..... | 102    |

**Resumo:** Gomes, V.M.; 2011. Declínio da goiabeira (*Psidium guajava* L.): etiologia e caracterização da sua patogênese.

No Brasil, a morte de goiabeiras associadas ao parasitismo por *Meloidogyne enterolobii* tornou-se uma ameaça para a produção de goiabas. Cerca de um terço da área cultivada está infestada, levando quase inevitavelmente à destruição dos pomares. Devido a severidade desta doença estar associada à extensa podridão radicular leva à hipótese de que outro (s) patógeno (s) além do nematoide estivesse (m) envolvido (s) na etiologia desta doença. A partir de amostras coletadas em vários pomares infestados ou livres do nematoide, observaram-se cerca de 2000 fragmentos de raízes que foram incubados para isolamento de bactérias e fungos. Isolamentos positivos para fungos foram obtidos apenas em zonas infestadas por *M. enterolobii* e as colônias foram predominantemente identificadas como *Fusarium* sp. Em um experimento em microparcels em condição de campo, mudas de goiabeira não inoculadas (controle), ou inoculadas com *M. enterolobii* apenas ou combinadas com isolados de *Fusarium* sp. indicaram isolados de *Fusarium* sp. particularmente associados a danos às mudas. Após a identificação morfológica e molecular desses isolados como *F. solani*, um segundo experimento em microparcela, foi conduzido, no qual mudas de goiabeira foram ou não inoculadas com um dos seguintes tratamentos: (i) *M. enterolobii* apenas, (ii) isolados *F. solani*, (iii) isolados *F. solani* combinado com lesões físicas das raízes provocadas por uma espátula metálica, (iv) *M. enterolobii*, e 21 dias após, com isolados de *F. solani*. Praticamente nenhum efeito foi observado nas mudas inoculadas com os isolados de *F. solani* sozinho, com ou sem lesões. Podridão da raiz principal e um efeito negativo sobre todas as variáveis foram observados nas mudas inoculadas com *M. enterolobii* e todos os quatro isolados de *F. solani*. Isto permitiu a proposição da etiologia do declínio da goiabeira como sendo complexa e causada pelo efeito sinérgico desses organismos, onde o parasitismo pelo nematoide predispõe as plantas à podridão da raiz causada pelo fungo. Objetivando confirmar a etiologia complexa desta doença nos diferentes Estados brasileiros nos quais têm sido relatado o extermínio de pomares de goiabeira, quatorze amostras de raízes de pomares em declínio oriundas de quatro

regiões brasileiras foram utilizadas para se investigar a prevalência e virulência de *F. solani*. Foram processados 680 fragmentos de raízes para o isolamento de fungos, obtendo-se 301 isolamentos positivos para *Fusarium* sp. de todas as regiões amostradas. Desses 301 isolados, 75 foram avaliados em câmara úmida para virulência a estacas de goiabeira, tendo-se como padrão de virulência quatro isolados de *F. solani* obtidos de áreas afetadas pelo declínio da goiabeira no Estado do Rio de Janeiro. Os três isolados mais virulentos de cada região brasileira foram identificados como *F. solani* através da morfologia das colônias e do sequenciamento da região ITS do rDNA. Concluiu-se que o declínio da goiabeira é causado pelo efeito sinérgico da interação entre *M. enterolobii* e *F. solani*, sendo responsável pela morte de extensos plantios de goiabeira em todo o Brasil. Buscando-se entender e estudar os mecanismos da interação patogênica entre *M. enterolobii* e *F. solani* no declínio da goiabeira, um ensaio com plantas de goiabeira com raízes distribuídas em dois vasos separados, inoculadas separadamente com o fungo e/ou o nematoide, não detectou efeito sistêmico do parasitismo do nematoide que causasse a suscetibilidade da planta à podridão radicular causada pelo fungo. Estudou-se também o efeito *in vitro* de exudados radiculares de goiabeiras, parasitadas ou não por *M. enterolobii*, sobre a morfofisiologia de *F. solani*. Exudados radiculares de plantas parasitadas aumentaram *in vitro* ( $P < 0,01$ ) a taxa de crescimento micelial, a massa seca e o número de estruturas reprodutivas (macro e microconídios e clamidósporos) de *F. solani*, em comparação com exudados radiculares de plantas não parasitadas. Realizou-se também um ensaio em caixas tipo Gerbox<sup>®</sup> com papel Germiteste<sup>®</sup>, utilizando-se plântulas de goiabeira irrigadas com exsudatos radiculares de plantas parasitadas ou não por *M. enterolobii*. Na presença de exudados de plantas não parasitadas, as plântulas se desenvolveram normalmente, ao passo que na presença de exudados de plantas parasitadas por *M. enterolobii*, *F. solani* foi capaz de infectar e necrosar as raízes das plântulas, além de reduzir ( $P < 0,01$ ) o peso total do sistema radicular. Conclui-se, portanto, que há um efeito local dos exsudatos radiculares de plantas parasitadas por *M. enterolobii* favorecendo a patogenicidade de *F. solani* às raízes de goiabeira.



**Abstract:** Gomes, V.M.; 2011. Guava decline (*psidium guajava* L.): characterization of its etiology and pathogenesis

In Brazil, *Meloidogyne enterolobii* has become a threat to guava production. Approximately a third of the cultivated area is infested, leading almost inevitably to the decimation of the orchards. Because parasitized trees develop rotten roots as the disease progresses, the possibility that a soil-borne pathogen could be involved was investigated. From several nematode-free or nematode infested orchards, nearly 2000 root fragments were tested for bacteria and fungi. Positive isolations were obtained from nematode infested areas only and were predominantly identified as *Fusarium* sp. In a 5-month microplot experiment, guava seedlings were uninoculated (control) or were inoculated with *M. enterolobii* only or with this nematode and 21 days later with one of 11 *Fusarium* sp. isolates. A Scott-Knot analysis of several vegetative variables and of the extent of root rot allowed the generation of a dissimilarity dendrogram that indicated that four *Fusarium* sp. isolates were particularly associated with damage to the seedlings. Upon identification of these isolates as *Fusarium solani*, a 6-month microplot experiment was set up, in which guava seedlings were uninoculated or were inoculated with one of the following: (i) *M. enterolobii* only, (ii) four *F. solani* isolates, separately, (iii) four *F. solani* isolates separately, combined with physical injury of the roots with a knife, (iv) *M. enterolobii*, and 21 days later with four *F. solani* isolates, separately. No root rot and virtually no effect on all variables were observed in the seedlings inoculated with the fungus isolates, with or without physical injury. Major root rot and a negative effect on all variables were observed in the seedlings inoculated with *M. enterolobii* and all four *F. solani* isolates. This characterizes guava decline as a complex disease caused by the synergistic effect of these organisms, in which parasitism by the nematode predisposes the plants to root decay caused by the fungus. To confirm the nationwide incidence of guava decline, since in many States about five thousand hectares of *M. enterolobii*-infested orchards have been decimated with the same symptoms. Root samples from declining, nematode-infested orchards were received from Southern, Northeastern and Midwestern Brazil. Of the 683 root fragments processed for fungi isolation, about half were positive for *Fusarium* sp., and only 5% were positive for

other fungi. Sixty-nine *Fusarium* sp. isolates were established as representatives of those Brazilian regions. Eleven *Fusarium* sp. isolates whose virulence to guava plants had been assessed in microplot experiments were used to develop a growth chamber assay, in which the virulence to guava stem cuttings, graded according to the symptoms, matched the virulence observed in the field. When this assay was used to assess the virulence of the 69 *Fusarium* sp. isolates, 87% were virulent to stem cuttings, with 42% of these being classified as highly virulent. Among the most virulent isolates, 12 representatives of the different Brazilian regions were selected for taxonomic identification to species level through ITS4 and ITS5 gene sequencing. All isolates were identified as *F. solani*. This confirms the nationwide incidence of guava decline. This work aimed to study the mechanisms of interaction *M. enterolobii* and *F. solani* in the guava decline. A test of guava plants with roots divided into two separate vessels, separately inoculated with the fungus and / or the nematode did not detect a systemic effect of the parasitic nematode that causes the plant susceptibility to root rot caused by fungus. Was also studied *in vitro* the effect of guava root exudates, or not parasitized by *M. enterolobii* on the morphology and physiology of *F. solani*. Root exudates of plants infested increased (P <0.01) the rate of mycelial growth, dry mass and number of reproductive structures (macro and micro conidia and chlamydospores) of *F. solani*, root exudates compared to non-infested plants. There was also a test boxes with paper Germiteste type gerbox® using guava seedlings irrigated with plant-root exudates or not parasitized by *M. enterolobii*. In the presence of exudates collected from non-infested plants, seedlings developed normally, whereas in the presence of exudates of plants infested by *M. enterolobii*, *F. solani* was able to infect and necrotic roots of seedlings, and reduce (P <0.01) the total weight of the root system. We conclude, therefore, a local effect of root exudates of plants infested by *M. enterolobii* the pathogenicity of *F. solani* to the roots of guava.

## 1 INTRODUÇÃO

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é considerada uma planta rústica e pouco exigente em solo e, apesar de não ser de grande porte, possui elevada capacidade produtiva (de 60 a 100 t.ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>), quando comparada a outras frutíferas (Pereira e Martinez Júnior, 1986; Natale *et al.*, 1996). No Brasil, esta cultura presta-se à exploração por pequenos e médios produtores, estendendo-se por milhares de hectares e oferecendo boa rentabilidade.

Entre as principais limitações ao aumento da produtividade agrícola em todo o mundo estão os nematoides fitoparasitos. De fato, estimativas indicam perdas de produção média em torno de 12% nas principais culturas, o que em 1994 totalizava cerca de 80 bilhões de dólares (Barker *et al.*, 1994). Os fitonematoides têm uma ação espoliadora sobre as plantas hospedeiras, sendo o dano variável com a espécie, o nível populacional, o hospedeiro e as condições ambientais, dentre outros fatores. Além das deformações anatômicas dos tecidos dos hospedeiros, muitos dos principais processos fisiológicos, como respiração, fotossíntese, absorção e translocação de água e nutrientes e balanço hormonal, podem ser afetados direta ou indiretamente pelo parasitismo por nematoides (Wang e Bergeson, 1974). Conseqüentemente, as plantas podem apresentar desfolha, murcha, queda acentuada na produção, amarelecimento, crescimento reduzido ou nanismo, clorose e sintomas de deficiências nutricionais (Moreira & Sharma, 2001; Gomes *et al.*, 2008); dentre outros sintoma.

Em goiabeiras, o principal problema com fitonematoides é causado pelo nematoide de galhas da goiabeira (NGG), *Meloidogyne enterolobii* Yang and Eisenback, 1983. Em diversas cultivares de goiabeira, o parasitismo por esse nematoide está associado a um declínio generalizado da planta, com sintomas nas raízes (galhas e apodrecimento) e reflexos na parte aérea (bronzamento, amarelecimento, queima dos bordos e queda das folhas), com frequência advindo a morte da planta (Souza *et al.*, 2007; Gomes, 2007; Gomes *et al.*, 2011). Tais sintomas podem estar associados a processos já relatados em outros patossistemas envolvendo *Meloidogyne* spp., tais como a obliteração de vasos condutores, alteração no padrão de absorção e / ou translocação de água e de nutrientes, alterações fisiológicas e predisposição da planta a patógenos secundários (Melakeberhan & Webster, 1993).

A caracterização parcial do declínio das goiabeiras parasitadas pelo NGG feita por Gomes *et al.* (2008), mostrou que em comparação com plantas saudáveis, os sintomas do declínio na parte aérea estão associados à carência de nitrogênio, fósforo e potássio. Plantas em declínio apresentaram tendência de menor absorção de cálcio e magnésio (cujos teores foliares atingiram valores próximos à carência) e tendência de acúmulo de manganês, sem, entretanto atingir os níveis fitotóxicos relatados na literatura, o mesmo ocorreu para cloro e sódio. O acentuado apodrecimento de raízes de goiabeira parasitadas pelo NGG e a agressividade desta doença sugerem que outros patógenos de solo possam estar associados ao NGG, causando o declínio e a morte das plantas. Doenças complexas envolvendo a associação de nematoides, fungos e bactérias já foram relatadas em diversas culturas (Hirano & Kawamura 1965; Power 1971; France & Abawi 1994; Abawi & Chen 1998; Back *et al.*, 2002; Haseeb e Shukla 2004; Silva e Pereira, 2008). Não há, entretanto relatos confirmados em relação à goiabeira, nem a *M. enterolobii*.

Por não se entender completamente a etiologia do declínio da goiabeira parasitada pelo NGG, há dificuldades de manejo do nematoide, pois distúrbios fisiológicos, fungos e bactérias residentes no solo podem estar envolvidos neste patossistema.

A caracterização do declínio da goiabeira, tanto de sua etiologia quanto dos mecanismos de sua patogênese, foram os objetivos do presente trabalho.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos botânicos da goiabeira

A goiabeira pertence à família Myrtaceae, sendo amplamente distribuída em países de clima tropical, subtropical e mesmo em países de clima mais frio, sem geadas (Medina, 1991). Quando plantada por sementes, a goiabeira apresenta um sistema radicular axial pivotante característico das dicotiledôneas. Porém, quando plantada por estacas vegetativas, não apresenta uma raiz principal e o sistema radicular se ramifica de modo exuberante entre 0 e 30 cm de profundidade (Manica *et al.*, 2000).

A árvore é de pequeno porte, podendo atingir de 3 a 6 metros de altura. O caule é do tipo tronco lenhoso, bastante ramificado, glabroso e sinuoso. As folhas são opostas, têm formato elíptico-oblongo e caem após a maturação (Antonelli e Cappellini, 1996).

O fruto da goiabeira é uma baga com um mesocarpo de espessura variável, textura firme e numerosas sementes. A maturação dos frutos acontece de janeiro a março (Pereira e Martinez Jr., 1986; Manica *et al.*, 2000).

### 2.2 Aspectos culturais e importância econômica da cultura da goiabeira

No Brasil a cultura da goiabeira é predominantemente desenvolvida em propriedades de três a cinco hectares (ha) e com mão de obra eminentemente familiar. Isto demonstra que essa cultura, é uma boa alternativa para os pequenos

proprietários, contribuindo sobremaneira para valorizar o trabalho dos agricultores familiares (Natale *et al.*, 1996).

A faixa climática favorável a esta cultura dá-se próximo à linha do Equador, em locais de baixa altitude, com temperaturas médias entre 24 e 28°C, umidade relativa média entre 37 e 96% e precipitação pluviométrica em torno de 1.000 mm/ano. Alguns dos fatores limitantes para uma boa produção podem ser a ocorrência de secas, chuvas mal distribuídas ou a falta de irrigação (Manica *et al.*, 2000).

Segundo dados do IBGE (2008), a área de produção de goiaba no Brasil em 2007 foi de aproximadamente 15.000 ha, com uma produção anual de 300.000 toneladas de frutas. No Brasil, a goiabeira pode ser encontrada em todo o território nacional, destacando-se na produção comercial os Estados de São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Paraná (Collovy-Filho *et al.*, 1995; Rocha e Bemelmans, 2005).

### **2.3 Os fitonematoides**

A maioria dos fitonematoides pertence à fauna do solo e depende diretamente da produção primária, constituindo seu sítio de ação o sistema radicular das plantas (Coleman *et al.*, 1995). Os fitonematoides podem causar injúrias ou alterações teciduais nas raízes, predispor a planta a outras doenças e aumentar a sensibilidade a estresses ambientais. Os sintomas diretos nas raízes concorrem, com frequência, para a manifestação de sintomas indiretos ou reflexos na parte aérea das plantas, decorrentes principalmente de dificuldades na absorção e/ou transporte de água e nutrientes disponíveis no solo (Barker, 2003). Além disso, os nematoides constituem fortes drenos metabólicos, utilizando os fotossintatos para o seu desenvolvimento e reprodução. Isto contribui para reduzir de modo apreciável a energia disponível para o crescimento da planta, causando redução do desenvolvimento vegetativo. Pode ocorrer também desfolhamento precoce, declínio prematuro da planta e morte (Bridge e Page, 1982; Prot e Matias, 1995; Silva, 2001; Cofcewicz *et al.*, 2001).

As perdas mundiais devidas aos fitonematoides foram estimadas entre 12 e 15% do valor total da produção agrícola. Na agricultura americana, essas perdas

foram estimadas em US\$ 8 bilhões/ano (Barker *et al.*, 1994). No Brasil, a quantificação das perdas não é precisa devido às interações com os danos provocados por outras pragas e doenças, condições climáticas, presença de plantas invasoras e inadequação de tratamentos culturais (Ritzinger e Fancelli, 2006). Em vista da importância econômica dos nematoides, devido às perdas por eles causadas, esses organismos têm sido frequentemente negligenciados nos agroecossistemas, somente assumindo “status” de patógeno quando sua população se encontra muito elevada, com prejuízos acentuados.

### **2.3.1 *Meloidogyne enterolobii***

*M. enterolobii* Yang & Eisenback, 1983 (sin. *M. mayaguensis* Rammah & Hirschmann, 1988) foi descrito na China parasitando *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.), mas já foi relatado em diversos hospedeiros selvagens e cultivado em vários países. Em uma análise morfológica rápida ou realizada por pessoa inexperiente, o NGG pode ser confundido com *M. incognita* (Kofoid & White 1919) Chitwood 1949 ou *M. arenaria* (Neal) Chitwood 1949 (Moura e Moura 1989; Carneiro *et al.*, 2001), sendo que a reação de hospedeiros diferenciais é idêntica à das raças 2 ou 4 de *M. incognita* (Carneiro, 2003). Além dos caracteres morfológicos que lhe são característicos, o NGG é identificável pelo fenótipo da isoenzima esterase de fêmeas maduras, que revela os fenótipos ‘EST M2’ e ‘MDN N1’ (Carneiro *et al.*, 2001), por sequenciamento do DNA mitocondrial e da região ITS1 (Blok *et al.*, 2002; Carneiro, 2003) e por DNA satélite (satDNA) (Randig *et al.*, 2009).

O formato da configuração perineal das fêmeas varia de circular a ovalado, o arco dorsal é arredondado a trapezoidal, podendo ser baixo ou alto. As estrias são largamente espaçadas, e a região da extremidade da cauda é grande, circular e usualmente sem estrias. Muitas vezes, as linhas laterais estão ausentes. Essa grande variabilidade nos padrões perineais do NGG foi ilustrada por Farguette e Braaksma (1990). Uma detalhada caracterização morfológica e molecular do NGG foi apresentada por Brito *et al.* (2004).

Possivelmente, o NGG foi detectado no Brasil pela primeira vez por Moura e Moura (1989), que descreveram um ataque severo em goiabeiras nos municípios de Curaçá e Maniçoba (Bahia) e Petrolina (Pernambuco). Na época, o nematoide teria

sido erroneamente identificado como *M. incognita* raça 2. Este fitonematoide foi relatado como *M. mayaguensis* por Carneiro *et al.* (2001). Atualmente, *M. mayaguensis* é considerada espécie sinônima de *M. enterolobii* (Hunt & Handoo, 2009; Moens *et al.*, 2009). Em goiabeiras, o NGG parasita todos os tipos de raízes, desde as radículas superficiais até a raiz pivotante mais lignificada, localizada a mais de 50 cm de profundidade.

No Norte Fluminense, condições edafoclimáticas favoráveis somadas à ampla gama de hospedeiros tornaram o NGG um dos principais problemas fitossanitários, uma vez que este nematoide encontra plantas daninhas hospedeiras que garantem sua sobrevivência e aumento populacional. Levantamento de hospedeiros alternativos deste nematoide realizado por Lima *et al.*, (2003) permitiu a detecção do referido patógeno em diversas plantas invasoras comuns no município de São João da Barra (RJ).

O círculo de hospedeiros de *M. enterolobii* é muito amplo, incluindo a berinjela, tomateiro, fumo, pimenta, melancia, repolho (Rodrigues *et al.*, 2003), *Crotalaria juncea* (Guimarães *et al.*, 2003), café robusta (*Coffea canephora*), mamona, *Ziziphus maritima* (Rodriguez *et al.*, 2003), araçá (Maranhão *et al.*, 2002), melão, quiabo (Guimarães *et al.*, 2004), aceroleira, mamoeiro, maracujá-do-mato (*Passiflora serratodigitata* L.) (Lima *et al.*, 2003), calistemo (*Callistemon viminalis* G. Don ex. Loud), caimito (*Crysophyllum cainito* L.), trombeta de anjo (*Datura suaveolens* L.), olho de dragão (*Adenantha pavonina* L.), cambará (*Lantana camara* spp.), murta (*Mytus communis* L.), maria-pretinha (*Solanum americanum* Mill.), borboleta-azul (*Clerodendrum ugandense* L.), hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.), tecomaria (*Tecomaria capensis* Thunb.) (Brito *et al.*, 2004); aipo (*Apium graveolens* L.), beterraba (*Beta vulgaris* L.), feijão de porco (*Canavalia ensiformis* DC.), soja (*Glycine max* L.), salsinha (*Petroselinum crispum* Mill.), batata (*Solanum tuberosum* L.), quaresmeira (*Tibouchina granulosa* Cogn.), algodão (*Gossypium* spp. L.), brócolis (*Brassica oleracea* var. *Itaica* Plenck), abóbora (*Curcubita* spp), batata-doce (*Ipomoea batatas* L. Lam), feijão 'ICA Pijão' (Brito *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007), orquídea (*Oeceoclades maculata* Lind), picão-preto (*Bidens pilosa* L.), abacaxi 'Pérola' (*Ananas comosus* L. Merrill), agriãozinho (*Synedrellapsis grisebachii* Hieron & Kuntze), caruru-amargoso (*Erechtites hieraciifolius* L. Raf.),



(Carneiro *et al.*, 2006a); pimentão (*Capsicum annum* L.) (Carneiro *et al.*, 2006; Cirotto *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2007), maxixe (*Cucumis anguria* L.), apaga-fogo (*Alternanthera tenella* Colla.), jitirana-cabeluda (*Merremia aegyptia* L. Urban), meloso da flor-roxa (*Marsypianthes chamaedrys* Vahl Kuntze) (Castro *et al.*, 2007), ajuga (*Ajuga reptans* L.), mirica (*Myrica cerifera* L.), salgueiro-chorão (*Salix babylonica* L.), solandra (*Solandra glandiglora* Sw.), manjerição (*Ocimum basilicum* L.), caruru-gigante (*Amaranthus retroflexus* L.), mostarda (*Brassica kaber* L.) e erva-botão (*Eclipta prostrata* L.) (Brito *et al.*, 2008).

Várias plantas invasoras, como picão-preto, urtiga, serralha, gaiolinha, fedegoso e maria-preta são hospedeiras do NGG (Lima *et al.*, 2003; Brito *et al.*, 2006). Há fortes indícios de que o NGG irá se tornar um problema sério para o cultivo de hortaliças, soja, fumo, cana-de-açúcar, curcubitáceas e algumas frutíferas como a aceroleira, como indicado por trabalhos recentes (Torres *et al.*, 2007; Cirotto *et al.*, 2007; Muniz *et al.*, 2007; Wilcken *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2007; Moura *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2009; Dias *et al.*, 2009).

Dentre os não hospedeiros experimentais, têm-se o maracujá (*Passiflora setacea*, *P. coccinea*, *P. nítida*, *P. coccinea* x *P. setacea* ‘Estrela-do-cerrado’, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Vermelhinho-pequeno’, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* genótipo GA2 e *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* EC2) (Silva *et al.*, 2009), algodão, amendoim (Rammah & Hirschmann, 1988), *Crotalaria spectabilis* (Guimarães *et al.*, 2004), fruta-de-conde, chirimóia (*Anona cherimolia*), laranja-azedada, “grapefruit” (*Citrus paradisi*), cinamomo (*Melia azedarach*), timo (*Thymus vulgaris*) e alho (Rodriguez *et al.*, 2003). Segundo Dias *et al.* (2009), de 37 genótipos de milho avaliados, apenas seis (‘NB 7361’, ‘SHS 5080’, ‘GNX 1020’, ‘GNX 3010’, ‘BRS 1031’ e ‘BM 1115’) comportaram-se como resistentes a *M. enterolobii*. Moura *et al.* (2003) citam como não hospedeiros o abacateiro, jambeiro, coqueiro, mangueira, pinheira e gravioleira.

O NGG representa um grande desafio aos produtores de goiaba. Nas áreas infestadas, este nematoide constitui-se em um dos principais problemas fitossanitários, reduzindo a produtividade em até 100% com a morte das plantas. De fato, Pereira *et al.* (2009) estimaram o prejuízo direto causado por *M. enterolobii* em torno de 112,7 milhões de reais até o ano de 2008, aos quais se acrescentam o

desemprego de aproximadamente 3.700 trabalhadores rurais em tempo integral devido ao declínio da goiabeira. Vários métodos de controle de *M. enterolobii* têm sido testados nos últimos anos, como o controle biológico, o uso de nematicidas e pousio, ainda sem resultados satisfatórios (Casassa *et al.*, 1996; Moreira *et al.*, 2001; Carneiro 2003; Moura *et al.*, 2003; El-Borai & Duncan 2005, Acevedo *et al.*, 2006; Gomes 2007). Quanto às possibilidades de controle biológico do NGG, Brito *et al.* (2004a) não observaram a adesão de endósporos de três isolados de *Pasteuria penetrans* aos juvenis de nematoides estudados. Resultados negativos com *P. penetrans* também foram observados por Carneiro *et al.* (2004).

Visando à obtenção de genótipos resistentes, Carneiro *et al.* (2007) e Burla *et al.* (2007) testaram diferentes acessos de *Psidium* spp. quanto à resistência a *M. enterolobii*. Os acessos de araçá sp. e *P. friedrichsthalianum* moderadamente resistentes e três acessos de *P. cattleyanum* foram imunes (FR=0). Considerando-se esses resultados, o uso de porta-enxertos resistentes parece ser um método promissor para o controle de *M. enterolobii* em plantios comerciais de goiaba.

Há de se notar que goiabeiras parasitadas convivem com o nematoide por muitos meses, com uma produtividade em torno de 70% daquela obtida em plantas saudas (Souza *et al.*, 2007). No entanto, por motivos ainda desconhecidos, subitamente advém um declínio, caracterizado por forte bronzeamento e queima dos bordos das folhas, seguindo para o amarelecimento total da parte aérea, desfolha generalizada e morte da planta (Fig. 1 A-D). Esta sintomatologia pode estar relacionada ao apodrecimento do sistema radicular, que é uma característica marcante do declínio (Gomes, 2007) (Fig.1 E).

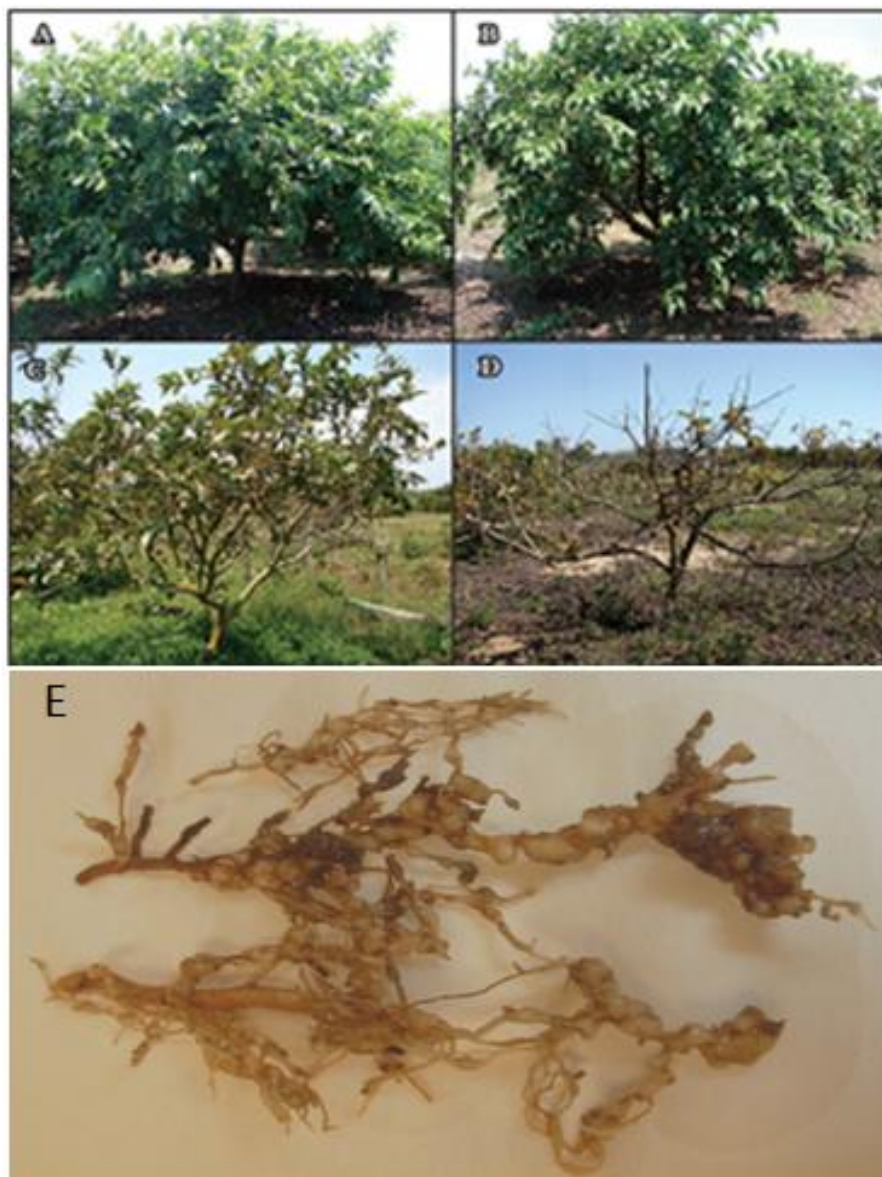


Figura 1A) Goiabeira sadia; B-D) Goiabeiras em diferentes estágios (1 a 3, respectivamente) do declínio associado ao parasitismo pelo NGG. E) Galhas radiculares causadas pelo parasitismo por NGG em raízes de goiabeira, apresentando áreas de apodrecimento.

Em São João da Barra e Cachoeiras de Macacu (RJ), a erradicação das plantas com sintomas severos não impede a disseminação progressiva do nematoide de planta a planta, resultando ao longo do tempo em perda total do pomar. Um experimento piloto em São João da Barra (RJ) indicou que a aplicação de esterco

bovino ao solo reduziu a população do nematoide e manteve a produção comercial (Souza *et al.*, 2007).

Gomes (2007) conseguiu manter a produção comercial de um pomar infestado com níveis moderados do NGG nas raízes e no solo através de adubações foliares e de cobertura, juntamente com a aplicação de esterco bovino ou composto residual de abatedouro avícola ao longo de dois anos (duas safras), sendo esta a única solução até o momento para o convívio com esta doença na região.

#### **2.4 Doenças complexas em plantas.**

O solo é um ambiente complexo, onde inúmeros micro-organismos estão presentes. Na rizosfera das plantas, inúmeras interações podem ocorrer. Não é de surpreender, portanto, que muitos pesquisadores tenham concluído que a maioria das doenças do sistema radicular tem a etiologia complexa, ou seja, são causadas por mais de um patógeno, ou pela interação destes com fatores bióticos e edáficos.

Na natureza, as plantas estão expostas a vários micro-organismos, e estes se influenciam mutuamente já que ocupam o mesmo habitat. Várias interações complexas entre fungos e nematoide têm sido estudadas. Essa investigação é útil para se compreender as contribuições de cada componente e fornecer esclarecimentos sobre aspectos básicos das interações (Hirano & Kawamura, 1965; Pitcher, 1965; Bergeson *et al.*, 1970; Power, 1971).

A possibilidade de fungos de solo interagir com nematoides para promover podridão e necrose radicular, tem sido considerado como uma parte da síndrome causada por fitonematoides. Já, em 1931, Fawcett afirmou que a maioria das doenças das plantas, principalmente das raízes, é influenciada por associações de microrganismos, nas quais raízes infectadas por um patógeno podem modificar a resposta do hospedeiro às infecções posteriores por outros patógenos ou saprófitos. Steiner (1942) discutiu as necroses radiculares em conexão com a infecção por nematoides e chamou atenção para o prejuízo resultante a partir de tais condições.

Certas doenças complexas envolvendo nematoides podem ocorrer porque a penetração dos nematoides fornece pontos de entrada para micro-organismos como fungos e bactérias, entretanto outros mecanismos parecem estar envolvidos. Por exemplo, o fato dos nematoides afetarem a predisposição de plantas à infecção

por certos fungos somente depois de três ou quatro semanas, indica que mais do que ferimentos são necessários (Porter & Powell, 1967).

Os nematoides induzem mudanças nas características morfológicas das plantas e estas alterações anatômicas podem ser acompanhadas por alterações fisiológicas que atingem o seu máximo, dependendo do hospedeiro e influências ambientais, várias semanas após a ocorrência da penetração e início da alimentação do nematoide. Clayton *et al.* (1958), estudando as interações *entre M. javanica* e *Phytophthora parasitica var. nicotianae*, observaram que o crescimento vegetativo do fumo não foi afetado durante o período em que as galhas não apresentavam necroses. Mas eles associaram murcha e retardo do crescimento das plantas com a podridão radicular causada posteriormente com o avanço da infecção fungica.

Assim, a interação entre os nematoides e fungos patogênicos é muitas vezes indireta e ocorre devido às alterações induzidas na planta hospedeira. As modificações podem ser mínimas, como ocorre em interações envolvendo nematoides ectoparasitos, ou podem ser extensas e complexas, envolvendo nematoides endoparasitas sedentários, como os nematoides das galhas, através da modificação e produção de metabólitos (Faulkner & Bolander 1969).

#### **2.4.1 Interações *Meloidogyne* spp. / planta**

A penetração dos nematoides nas raízes é realizada pelo juvenil de segundo estágio ( $J_2$ ), na região de alongamento radicular. Em seguida, o  $J_2$  migra até a zona de maturação dos tecidos, onde estabelece um sítio de alimentação próximo à região vascular, tornando-se sedentário (Gonçalves e Silvarolla, 2001).

O nematoide começa então a se alimentar e a introduzir substâncias nas células da planta, as quais irão alterá-las morfológica e fisiologicamente. Essas alterações abrangem: o aumento da densidade citoplasmática, hipertrofia do núcleo e nucléolo, redução do vacúolo central até seu completo desaparecimento, proliferação de ribossomos, polissomos e complexo de Golgi (Faria *et al.*, 2003). O nematoide passa então por três ecdises, até atingir a fase adulta, quando a fêmea adquire a forma globosa, depositando seus ovos geralmente no exterior da raiz. A massa de ovos permanece unida por uma matriz gelatinosa secretada pela própria fêmea (Costa, 2000).

As secreções esofageanas liberadas no tecido radicular pelos J<sub>2</sub> incitam hipertrofia celular no cilindro central e hiperplasia no periciclo, produzindo as chamadas células gigantes, das quais os J<sub>2</sub> em desenvolvimento passarão a se nutrir. A formação das células-gigante provoca constrição do sistema vascular, com consequente diminuição no transporte de água e nutrientes, o que diretamente influencia o desenvolvimento da planta (Cofcewicz *et al.*, 2001).

#### **2.4.2 Interações fungo / planta**

De modo geral, fungos patogênicos compreendem um amplo e heterogêneo grupo de micro-organismos que ocupam posições de grande importância tanto na agricultura como nas comunidades naturais de plantas. Os fungos mostram uma enorme diversidade dentro de sua estratégia de vida e no modo pelo qual interagem com seus hospedeiros (Barbieri & Carvalho, 2001). Das espécies de fungos conhecidas, aproximadamente 10% podem causar doenças em plantas, sendo que alguns destes são parasitas obrigatórios e outros são parasitas facultativos ou oportunistas. As estratégias de interação estabelecidas variam desde infecções discretas com efeito limitado a infecções que levam rapidamente o hospedeiro à morte (Burdon & Silk, 1997).

Durante o desenvolvimento da patogênese na interação entre fungos e plantas são expressos vários genes envolvidos na formação de estruturas de infecção e síntese de enzimas para a degradação da parede celular do hospedeiro. Estes genes podem se expressar na fase de contato inicial com o hospedeiro, como resposta de defesa da planta, ou na fase de necrose (Kahmann & Basse, 2001).

A infecção por fungos fitopatogênicos ocorre através de hifas especializadas que invadem os tecidos do hospedeiro. A primeira etapa consiste na adesão à barreira representada, por exemplo, no caso de folhas, pela cutícula e o crescimento do tubo germinativo sobre essa superfície. A penetração pode ser realizada com o auxílio de enzimas, como cutinases, pectinases, celulases, hemicelulases e ligninases, que degradam a cutina e compostos da parede celular (Barbieri & Carvalho, 2001).

Após infectar a planta, o fungo pode crescer de maneira biotrófica, obtendo nutrientes do hospedeiro sem provocar a morte das células. Nesse caso, alguns

fungos produzem haustórios, estruturas especializadas na obtenção de nutrientes (vitaminas, aminoácidos, polissacarídeos) a partir de células hospedeiras. Algumas moléculas que desencadeiam reações de defesa nas plantas, denominadas elicitores, têm sido isoladas de um número considerável de fungos.

### **2.4.3 Interação fungo / nematoide / planta**

Doenças complexas envolvendo fungos e nematoides não são limitadas aos ferimentos causados pelos nematoides. Mudanças proteômicas e bioquímicas dos tecidos vegetais são iniciadas logo após a infecção por nematoides (Taylor, 1990), os quais tendem a induzir drásticas mudanças estruturais, bioquímicas e / ou fisiológicas nas raízes, o que as torna adequadas para a penetração e desenvolvimento fúngico. Alguns autores, como Bergeson *et al.*, 1970, consideraram a invasão dos tecidos da planta pelos nematoides como inconsequentes na etiologia das doenças complexas. Contudo, há uma série de relatos que demonstram claramente que os nematoides têm um papel no estabelecimento e no desenvolvimento de doenças causadas por outros patógenos de solo, fungos e bactérias.

O grau ou severidade da doença é influenciado por muitos fatores, incluindo nível de inóculo de ambos os patógenos, espécie do nematoide, idade das plantas no momento da inoculação, sequência de inoculação com o nematoide e com patógeno, tempo de intervalo entre inoculação com ambos os agentes patogênicos, agressividade dos patógenos utilizados, as cultivares utilizadas, método de inoculação, temperatura e umidade do solo (Mai & Abawi, 1987).

Alguns autores apoiam a ideia de que mudanças fisiológicas induzidas pelos nematoides podem ser sistêmicas (Bowman & Bloom, 1966; Batten & Powell, 1971; Hillocks, 1986). Nestes casos, o nematoide induz a formação de substâncias benéficas para os fungos e estas substâncias são translocadas dentro da planta (Khan, 1989). Investigando esse processo, Bowman & Bloom (1966) e Hillocks (1986) empregaram uma técnica em que o sistema radicular da planta de interesse foi dividido em dois recipientes separados. Uma metade do sistema radicular foi infestada com a espécie do nematoide, enquanto a outra foi inoculada com o fungo patogênico. Os resultados revelaram que o desenvolvimento da doença foi

dependente da exposição a ambos patógenos. Estudos similares foram desenvolvidos por Faulkner *et al.* (1970), no qual plantas parasitadas por nematoides influenciaram positivamente o período de incubação, a incidência e a gravidade da murcha causada por *Verticillium Dahliae* Kleb e *Prathylenchus vulnus*, (Allen and Jensen, 1951), mesmo quando os dois patógenos parasitaram sistemas radiculares distintos da mesma planta.

No caso da podridão de raízes causada por *Rhizoctonia solani* Kuhn em tomate, Van Gundy *et al.* (1977) atribuíram a demora no aparecimento de sintomas a uma modificação dos exsudatos radiculares, que ocorre três a quatro semanas após a infecção por nematoides, quando uma alta concentração de compostos nitrogenados nas raízes infectadas favorece a virulência do fungo. Wang e Bergeson (1974) sugeriram que as mudanças na concentração total de açúcar na seiva do xilema, que atinge concentração máxima quatro semanas após inoculação do nematoide, contribuem para os sintomas da murcha de *Fusarium oxysporum* em tomateiro.

Tecidos em torno do nematoide e tecidos hiperplásicos também são facilmente colonizados. Isto sugere que ocorrem alterações histopatológicas em raízes infectadas pelo nematoide, que as tornam muito suscetíveis à subsequente invasão por fungos (Back *et al.*, 2002).

Devido ao intenso apodrecimento do sistema radicular de goiabeiras quando parasitadas pelo NGG, é possível que ocorra uma associação com fungos residentes no solo. Entretanto, esta patogênese não foi caracterizada. De fato, não se conhece que fatores iniciam o declínio das goiabeiras, havendo relatos de produtores de que o excesso de irrigação e podas drásticas facilitam o advento do declínio. Tais relatos sugerem um componente de desbalanço fisiológico no declínio associado ao NGG. Trabalhos preliminares de Gomes *et al.*, (2007) apontam que *Fusarium spp.* está envolvido neste patossistema.

## **2.5 Aspectos da biologia e sistemática de *Fusarium sp.***



O gênero *Fusarium* compreende uma grande quantidade de espécies que comumente são fitopatógenas e saprófitas do solo, sendo uma minoria patogênica ao homem, animais e a insetos. O cultivo in vitro de *Fusarium* sp. é caracterizado pelo crescimento rápido da colônia, com micélio aveludado a levemente cotonoso, opaco ou levemente brilhante. Após 7 a 10 dias de incubação a 25°C, o fungo pode apresentar características de pigmentação do micélio de cor rosa, púrpura, cinza ou amarela, sendo esta característica importante para a identificação das espécies (Guarro e Gene, 1992). Os meios de cultivo utilizados para a determinação das espécies de *Fusarium* sp. são de uso frequente nos laboratórios de rotina, como ágar aveia e BDA, sendo que a utilização de meios pobres em nutrientes, como o ágar folha de cravo, estimula a conidiogênese (Fischer *et al.*,1982; Lacaz *et al.*,1998).

A principal característica deste gênero é a produção de conídios fusiformes, com extremidades afiladas e curvas, chamados macroconídios (levemente curvos ou inclinados) produzidos em fiálides em esporodóquios ou diretamente do micélio aéreo. Os microconídios possuem três ou mais septos. Algumas espécies apresentam macroconídios com uma estrutura pronunciada designada como “célula pé”. Eles emergem de células conidiogênicas (fiálides) que podem apresentar-se isoladamente ou agrupadas em esporodóquios. Os macroconídios em massa estão unidos normalmente por material mucilaginoso e estes podem ter de um até dez septos transversais (Guarro e Gené, 1995).

Sob condições adversas, espécies de *Fusarium* do solo produzem clamidósporos constituídos de uma ou mais células (estruturas de resistência) agrupadas em cadeias, de paredes grossas, lisas ou rugosas e de localização apical, intercalar ou terminal (Samsom e Von Reenen-Hoekstra, 1995).

A identificação de espécies de *Fusarium* sp. é realizada tradicionalmente com base na presença e morfologia destas estruturas do patógeno, o que além de constituir uma tarefa difícil de ser executada, também pode gerar controvérsias devido à variabilidade dos caracteres fenotípicos empregados na classificação taxonômica desse gênero (Booth,1971).

Algumas vezes, os métodos fenotípicos não permitem a correta identificação das espécies deste gênero, constituindo-se em métodos laboriosos e demorados, podendo gerar resultados conflitantes. Pelas limitações em desenvolver

estudos morfológicos do gênero, os métodos moleculares podem auxiliar no esclarecimento da taxonomia, evitando-se classificações artificiais sem consistência filogenética (Manicom *et al.*, 1987; Thomas *et al.*, 1994).

### **2.5.1 Utilização de técnicas moleculares na identificação de *Fusarium* sp.**

A identificação de fungos filamentosos pela metodologia convencional está baseada principalmente nas características fenotípicas estruturais. A identificação em nível de espécie é, classicamente, realizada mediante a observação das estruturas reprodutivas assexuais ou sexuais que os fungos exibem nos diferentes meios de cultivo, sendo necessária sempre a utilização das chaves de classificação (Ventura, 2000). Uma das limitações do método clássico na identificação dos fungos filamentosos é que, na presença de condições nutritivas favoráveis, o fungo não produz suas estruturas reprodutivas, o que pode levar a um diagnóstico errôneo do agente etiológico em questão. O advento dos métodos moleculares tem ajudado a solucionar os complexos agrupamentos taxonômicos, trazendo como principal contribuição o melhor conhecimento das relações evolutivas (Guarro *et al.*, 1999).

De acordo com Steenkamp *et al.* (2000), é pouco precisa a diferenciação das espécies de *Fusarium* sp. de diferentes hospedeiros somente por caracterização morfológica devido à sua grande similaridade. Uma das alternativas encontradas para solucionar o problema é a utilização de técnicas moleculares, mais eficientes por acessar diretamente variações no DNA. Entre as técnicas moleculares utilizadas para discriminação destacam-se: polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) (Duteau & Leslie, 1991; Oullet & Seifert, 1993; Voigt *et al.*, 1995; Viljoen *et al.*, 1997), polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) (Correll *et al.*, 1992; Nicholson *et al.*, 1993), espaços intergênicos transcritos (ITS 1 e ITS 2) (O'Donnell & Cigelnik, 1997; Waalwijk *et al.*, 1996) e dados de sequências gênicas conservadas (Steenkamp *et al.*, 2000a), polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) (Jurgenson *et al.*, 2002) e Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) (Hue *et al.*, 1999; Steenkamp *et al.*, 2000).

### 3 TRABALHOS

#### 3.1 DECLÍNIO DA GOIABEIRA: DOENÇA COMPLEXA ENVOLVENDO

*Meloidogyne enterolobii* E *Fusarium solani* \*

\*Tradução para o português do artigo “Guava Decline: A Complex Disease Involving *Meloidogyne mayaguensis* and *Fusarium solani*”. Journal of Phytopathology, 159, pp. 45-50.

Received February 22, 2010; accepted April 19, 2010, Journal Phytopathology

**Resumo** - Gomes, V.M.; Souza, R.M.; Mussi-Dias, V.; Silveira, S.F. & Dolinski, C., 2011. Declínio da goiabeira: doença complexa envolvendo *Meloidogyne enterolobii* e *Fusarium solani*. Journal of Phytopathology, 159: 45-50.

No Brasil, *Meloidogyne enterolobii* se tornou uma ameaça para a produção de goiaba. Cerca de um terço da área cultivada está infestada, levando quase inevitavelmente à destruição dos pomares. As árvores parasitadas apresentam galhas e raízes podres com o avanço da doença. A partir de vários pomares infestados ou livres de nematoide, cerca de 2000 fragmentos de raízes foram incubados para isolamento de bactérias e fungos. Isolamentos positivos para fungos foram obtidos apenas em áreas infestadas por *M. enterolobii* e as colônias fúngicas foram predominantemente identificadas como *Fusarium* sp. Em um experimento em microparcels, mudas de goiabeira não inoculadas (controle), ou inoculadas apenas com *M. enterolobii* ou combinado com isolados de *Fusarium* sp. A análise de Scott-Knot de várias variáveis vegetativas e da extensão da podridão radicular permitiu a geração de um dendrograma de dissimilaridade que indicou quatro isolados de *Fusarium* sp. particularmente associados a danos às mudas de goiabeira. Após a identificação desses isolados como *F. solani*, um segundo experimento em microparcela por seis meses foi estabelecido, no qual mudas de goiabeira foram ou não inoculadas com um dos seguintes tratamentos: (i) *M. enterolobii* apenas, (ii) 4 isolados de *F. solani*, separadamente, (iii) 4 isolados de *F. solani* separadamente, combinado com lesões físicas das raízes, (iv) *M. enterolobii*, e 21 dias mais tarde, com os 4 isolados de *F. solani*, separadamente. Praticamente nenhum efeito foi observado nas mudas inoculadas com os isolados de *F. solani* sem o nematoide, com ou sem lesões. Podridão da raiz principal e um efeito negativo sobre todas as variáveis foram observados nas mudas inoculadas com *M. enterolobii* e todos os quatro isolados de *F. solani*. Isto permitiu a proposição da etiologia do declínio da goiabeira como sendo complexa e causada pelo efeito sinérgico desses organismos, em que o parasitismo pelo nematoide predispõe as plantas à podridão da raiz causada por *F. solani*.

**Abstract:** Gomes, V.M.; Souza, R.M.; Mussi-Dias, V.; Silveira, S.F. & Dolinski, C., 2011. Guava Decline: A Complex Disease Involving *Meloidogyne enterolobii* and *Fusarium solani*, *Journal of Phytopathology*, 159: 45-50

In Brazil, *Meloidogyne enterolobii* has become a threat to guava production. Approximately a third of the cultivated area is infested, leading almost inevitably to the decimation of the orchards. Because parasitized trees develop rotten roots as the disease progresses, the possibility that a soil-borne pathogen could be involved was investigated. From several nematode-free or nematode infested orchards, nearly 2000 root fragments were tested for bacteria and fungi. Positive isolations were obtained from nematode infested areas only and were predominantly identified as *Fusarium* sp. In a 5-month microplot experiment, guava seedlings were uninoculated (control) or were inoculated with *M. enterolobii* only or with this nematode and 21 days later with one of 11 *Fusarium* sp. isolates. A Scott-Knot analysis of several vegetative variables and of the extent of root rot allowed the generation of a dissimilarity dendrogram that indicated that four *Fusarium* sp. isolates were particularly associated with damage to the seedlings. Upon identification of these isolates as *Fusarium solani*, a 6-month microplot experiment was set up, in which guava seedlings were uninoculated or were inoculated with one of the following: (i) *M. enterolobii* only, (ii) four *F. solani* isolates, separately, (iii) four *F. solani* isolates separately, combined with physical injury of the roots with a knife, (iv) *M. enterolobii*, and 21 days later with four *F. solani* isolates, separately. No root rot and virtually no effect on all variables were observed in the seedlings inoculated with the fungus isolates, with or without physical injury. Major root rot and a negative effect on all variables were observed in the seedlings inoculated with *M. enterolobii* and all four *F. solani* isolates. This characterizes guava decline as a complex disease caused by the synergistic effect of these organisms, in which parasitism by the nematode predisposes the plants to root decay caused by *F. solani*.

## Introdução

No Brasil, o declínio da goiabeira (*Psidium guajava* L.) associado à *Meloidogyne enterolobii* Yang and Eisenback, 1983 (syn *Meloidogyne mayaguensis* Rammah and Hirschmann, 1988) tornou-se o principal problema desta cultura. A área nacional, infestada por este nematoide está estimada em aproximadamente 5.000 ha distribuídos em 16 Estados brasileiros. O impacto econômico desta doença aos produtores de goiaba foi calculado em cerca de 66 milhões de dólares até 2008 (Pereira *et al.* 2009).

No Brasil, mudas de goiaba sadias e transplantadas para aéreas fortemente infestadas com *M. enterolobii* muitas vezes morrem em poucos meses. Já as árvores de goiabeira podem ter raízes apresentando galhas por meses sem apresentar sintomas secundários. O início ou agravamento dos sintomas é frequentemente associado a: (i) um aumento no número de galhas nas raízes em todo o sistema radicular, (ii) após uma temporada de alta produção ou (iii) em seguida a uma poda drástica, que é usada por alguns produtores para sincronizar a produção.

Goiabeiras em declínio mostram clorose, necrose das bordas foliares, murchamento e queda das folhas. Gomes *et al.* (2008) têm demonstrado que estes sintomas estão associados à deficiência foliar de nitrogênio, potássio, fósforo, cálcio e magnésio e a um acúmulo de cloro, manganês e sódio. As árvores em declínio apresentam progressivo apodrecimento de todo o sistema radicular. Normalmente, goiabeiras em declínio não se recuperam e a morte ocorre dentro de alguns meses. Esta sequência de sintomas foi descrita em três estágios por Gomes (2007). Em um experimento conduzido por dois anos, pomares comerciais mostraram consideráveis perdas de rendimento associadas com a densidade da população de nematoides a partir de 10 J<sub>2</sub> por 100 cc de solo e 25 galhas por 10 g de raízes (Gomes *et al.*, 2010).

A gravidade do declínio da goiabeira e a podridão associada ao sistema radicular desencadearam uma investigação sobre a participação de outros patógenos envolvidos neste patossistema, como ocorre em várias doenças complexas envolvendo *Meloidogyne* spp. com fungos habitantes do solo, tais como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Cylindrocladium crotalariae*, *Phytophthora*

*parasitica* f.sp. *nicotianae*, *P. megasperma* f.sp. *medicaginis*, *Thielaviopsis basicola*, *Pythium ultimum*, *P. aphanidermatum* (Powell, 1971; Webster 1985; Hussey e McGuire 1987; Mai e Abawi 1987; Evans e Haydock 1993; Abawi e Chen 1998; Back et al. 2002).

Relataram-se aqui os resultados de dois experimentos conduzidos em laboratório e campo que estabeleceram a natureza complexa do declínio da goiabeira, que é causada por uma associação sinérgica entre *M. enterolobii* e *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.

## **Materiais e Métodos**

### **Amostragens de campo**

Quatro pomares comerciais de goiabeiras (cv. Paluma) livres de *M. enterolobii* e quatro pomares infestados por *M. Enterolobii* localizados no município de São João da Barra, Sudeste do Brasil (21°38'24'' S. 41°03'03'' W.) foram amostrados em diferentes ocasiões, de Janeiro a Novembro de 2008. Em cada pomar, 500 g de amostras de raízes foram coletadas separadamente de oito goiabeiras. No laboratório, 24 fragmentos de raízes de cada uma das 64 amostras foram aleatoriamente selecionados a partir das raízes principal, secundárias e terciárias em proporções iguais, totalizando 1536 fragmentos que foram usados para isolamentos bacterianos ou fúngicos. Além disso, sete amostras de raízes de pomares em declínio foram recebidas dos municípios dos Estados do Paraná, Mato Grosso do Sul e Pernambuco, nas regiões Sul, Centro-oeste e Nordeste do Brasil, respectivamente.

### **Isolamento bacteriano**

Setecentos e sessenta e oito fragmentos de raízes (12 de cada planta amostrada) foram desinfestados em álcool 50% por 25 segundos e Qboa® (2% de hipoclorito de sódio) por três minutos e lavados com água estéril destilada (SDW) (Romeiro, 2001). Os fragmentos foram individualmente macerados em gotas de SDW e então colocados em placas de Petri em meio de cultura 523 (Kado e Heskett, 1970) e incubados por três dias a 25 ° C e 12 h de fotoperíodo antes de ser examinados para o crescimento bacteriano.

### **Isolamento e identificação de fungos**

Setecentos e setenta e oito fragmentos de raízes (colo, raiz principal e raiz secundária), preferencialmente das zonas afetadas com galhas causadas pelo nematoide foram desinfestados em álcool 70% durante um min e Qboa® (2% de hipoclorito de sódio) durante um min e lavados com SDW (Dhingra e Sinclair 1995). Os fragmentos foram incubados por sete dias a 27 ° C e 12 h de fotoperíodo em placas de Petri com méio batata-dextrose-ágar (BDA) contendo sulfato de estreptomicina a 500 mg/L. Os fungos foram repicados e, após a esporulação foram identificados em gênero de acordo com as descrições de Ellis (1971, 1976), Barnett e Hunter (1972) e Sutton (1980).

### **Seleção e identificação de *Fusarium* sp.**

Dos fungos isolados das raízes de goiabeira com sintomas de declínio (ver Resultados), *Fusarium* sp. foi o único gênero investigado. Com base na morfologia das colônias em placas de Petri com meio BDA, macro e microconídios e clamidósporos, 11 isolados de *Fusarium* sp. (designados de UENF/CF 160-170) foram selecionados como representantes da diversidade dos 68 isolados obtidos dos pomares amostrados em São João da Barra. Estes 11 isolados de *Fusarium* sp. foram utilizados no experimento de campo. Com base nos resultados do primeiro experimento, um segundo experimento foi realizado com os isolados UENF/CF 160, 163, 164 e 170. Esses isolados foram primeiramente repicados de um único esporo (culturas monospóricas) e identificados como *F. solani* com base na sua morfologia pelo Dr. Ludwig H. Pfenning (Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, Brasil). Esta identificação foi confirmada por amplificação da região rDNA ITS, utilizando primers para ITS4 e ITS5, pelo Dr. Robert Miller (Universidade de Brasília, Brasil).

### **Preservação e produção de inóculo dos isolados de *Fusarium* sp.**

Todos os isolados de *Fusarium* sp. foram preservados por repicagens periódicas em tubos de ensaio com meio BDA, e em grãos de trigo armazenados em



frascos de vidro mantidos a 4 ° C, e à temperatura ambiente com esporos misturados a sílica gel em dissecador (Dhingra e Sinclair 1995). O inóculo foi produzido após uma modificação do método por Burgess *et al.* (1994) onde 50 g de grãos de trigo (plus vita®) foram embebidos em 50 ml de água destilada e após 24h em geladeira a 5 °C, retirou-se o excesso de água e acondicionou os grãos em saco plástico de (polietileno). Para cada isolado utilizou-se quatro repetições. As sacolas contendo este substrato, foram autoclavadas a 121 °C por 30 min. Uma suspensão de hifas e conídios produzidos sobre a superfície do meio (BDA), em placas de Petri. Incubou-se a 25 ° C e fotoperíodo de 12 h até que os grãos de trigo fossem totalmente colonizados pelo fungo.

### **Experimento 1**

Para investigar se *Fusarium* sp. estava envolvido no declínio da goiabeira, 52 mudas cv. Paluma (30-40 cm altura) foram transplantadas para potes de plástico de 25L parcialmente enterrados em um pomar de goiabeiras infestado por *M. enterolobii*. Para evitar o uso de solo infestado por *M. enterolobii* ou *Fusarium* sp., os vasos foram preenchidos com solo arenoso de uma área próxima, coberta com vegetação natural. Durante o experimento evitou-se que ocorresse a contaminação de solo para os vasos. A água de irrigação foi tratada com 500 ppm de cloro ativo, (Qboa®) 24 h antes do uso. As plantas foram fertilizadas mensalmente com nitrogênio, potássio, cobre, boro e zinco seguindo as recomendações de Pereira (1995), e foram irrigadas por gotejamento, conforme necessário.

Quatro mudas foram mantidas como controle não inoculado. No transplântio, as 48 mudas restantes foram inoculadas com 10 g de fragmentos de raízes de tomateiro apresentando galhas induzidas por *M. enterolobii*, que foram misturadas com o solo. Três semanas depois, os isolados UENF / CF 160 a 170 foram inoculados separadamente em cada planta através da mistura de 10 g de grãos de trigo colonizados por *Fusarium* sp. na camada superior do solo contido nos vasos. Os 13 tratamentos (T1, controle não inoculado; T2 inoculado apenas com o nematoide; T3-T13, inoculados com o nematoide e o fungo) foram dispostos em blocos casualizados com quatro repetições.

Cinco meses após o transplântio, as plantas foram cuidadosamente removidas dos vasos e as raízes separadas do solo. As seguintes variáveis foram avaliadas: número de folhas por planta, massa fresca e seca da parte aérea e de raiz, comprimento total do sistema radicular (distância a partir da região do colo da planta até a ponta mais distal do sistema radicular), o volume do sistema radicular (total, necrosado e sadio, medido através do deslocamento de água em uma proveta graduada) e comprimento estimado do sistema radicular utilizando três alíquotas de 10 g de raiz das diferentes regiões do sistema radicular das mudas. Esta estimativa foi obtida pela aplicação do método de intersecção das quadrículas (Tennant, 1975). O comprimento médio obtido foi relacionado com o peso total do sistema radicular da planta.

No final do experimento, oito fragmentos de raízes de 1 cm de comprimento foram selecionados aleatoriamente de cada uma das 52 plantas experimentais e processados para isolamento de fungos como descrito anteriormente. Quando *Fusarium* sp. foi isolado, o mesmo foi repicado para placas de Petri com meio BDA, e suas características morfológicas foram comparadas com os isolados previamente inoculados.

Os dados originais (não transformados) foram analisados por ANOVA e comparados pelo método de Scott-Knot a 5% de probabilidade. Os resultados também foram analisados pelo método de Ward, para gerar um dendrograma de dissimilaridade com base na distância euclidiana (Mardia *et al.*, 1997).

## **Experimento 2**

Este experimento foi realizado com os quatro isolados mais agressivos de *F. solani* observados no primeiro experimento: UENF/CF 160, 163, 164 e 170. Oitenta e quatro mudas de goiabeiras cv. Paluma (altura média de 30-40 cm) foram transplantadas para vasos de plástico de 25 L parcialmente enterrados, cheios de areia lavada de rio. A adubação e irrigação das plantas, inoculações do nematoide e do fungo e o reisolamento do fungo no final do experimento foram realizados como no primeiro experimento.

Seis mudas foram mantidas como controle não inoculado (T1), sendo transplantadas em areia autoclavada. No transplântio, foram estabelecidos os

seguintes tratamentos: T2 (inoculação apenas com *M. enterolobii*), T6-T3 (inoculação separadamente com os isolados UENF/CF 160, 163, 164, e 170), T7-T10 (inoculação com os isolados fúngicos já referidos, combinado com lesão física das raízes infligidas por uma espátula de metal em quatro posições em torno de cada planta, na profundidade de 0-20 cm), e T11-T14 (inoculação com *M. enterolobii*, seguido 21 dias mais tarde, com inoculação dos isolados fúngicos citados acima). Todos os tratamentos foram dispostos em blocos casualizados com seis repetições.

Seis meses após o transplântio, as plantas foram cuidadosamente removidas dos vasos. O solo foi removido e o sistema radicular lavado. As seguintes variáveis foram avaliadas: peso fresco da parte aérea e das raízes, volume do sistema radicular (total, necrosado e sadio, calculado através do deslocamento da água em uma proveta graduada), área foliar e conteúdo de clorofila, utilizando clorofilômetro SPAD-502® (Minolta, Tóquio, Japão). Os dados originais não transformados foram analisados por ANOVA e comparados pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

## Resultados

Nenhuma bactéria foi isolada a partir de tecidos da raiz coletada em pomares de São João Barra. Além disso, nenhum fungo foi isolado de pomares livres de nematoide. Em pomares infestados pelo nematoide, os fungos isolados foram *Fusarium* sp., *Chaetomium* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Aspergillus niger*, *Nigrospora* sp., *Monilia* sp. e *Rhizoctonia* sp. Dos 68 isolados de *Fusarium* sp. 46 foram obtidos de goiabeiras que estavam em (estágio 3) do declínio, enquanto que das árvores com sintomas leves (estágio 1), obtiveram-se apenas oito isolados.

A partir de amostras recebidas de diferentes regiões brasileiras, 448 fragmentos de raízes foram selecionados aleatoriamente e incubados. Cinquenta por cento foram positivos para *Fusarium* sp. Com base na morfologia das colônias em placas de Petri, 68 isolados (UENF / CF 234-301) foram preservados para estudos futuros.

Os resultados das variáveis da parte aérea e do sistema radicular avaliados no primeiro experimento estão apresentados na Tabela 1. Estes dados foram também analisados pelo método de Ward e dispostos em um dendrograma de dissimilaridade

com base na distância euclidiana (Fig. 1). As variáveis da parte aérea e do sistema radicular avaliadas no segundo experimento são apresentadas na Tabela 2. O típico efeito de *M. enterolobii* e *F. solani* no sistema radicular é mostrado na figura. 2

## Discussão

O fracasso para isolar bactérias ou fungos em amostras de raízes vindas de pomares em áreas livres de nematoide é consistente com a falta de relatos de bactérias e fungos parasitando goiabeiras, apesar do cultivo desta cultura no Brasil (Marques et al 1994;. Piccinin e Pascholati, 1997). É importante notar que os procedimentos e meios de cultura utilizados para isolamento de bactérias e de fungos estão bem estabelecidos para uma ampla gama de patógenos de raiz. Em contraste, vários fungos foram isolados a partir de raízes parasitadas pelo nematoide da goiabeira, com a frequência de *Fusarium* sp. atingindo até 50% dos fragmentos de raízes escolhidos aleatoriamente.

No primeiro experimento, o tratamento com a inoculação de fungos sem nematoide não foi incluído. No entanto, este experimento foi importante para revelar a natureza complexa do declínio da goiabeira. Não ocorreu nenhuma galha nas raízes das plantas controle (T1) (Tabela 1), enquanto abundantes galhas nas raízes e algum grau de apodrecimento ocorreram nas plantas inoculadas apenas com o nematoide (T2). Dessas plantas foram isolados *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizoctonia* sp., mas não *Fusarium* sp. Em contraste, *Fusarium* sp. foi abundantemente re-isolado de T3 a T13. A combinação do nematoide e os 11 isolados de *Fusarium* sp. causou vários graus de danos às plantas de goiabeira, danos que estão sendo associados com a podridão das raízes.

Tabela 1 variáveis do sistema radicular e da parte aérea de goiabeiras cultivadas em microparcelas no campo em São João da Barra, Brasil, cinco meses após a inoculação com *Meloidogyne enterolobii* sozinho ou combinado com *Fusarium solanii*

| Tratamentos <sup>a</sup> | Sistema Radicular                 |                                     |                               |                                   | Número de folhas | Peso Aéreo (g) |        | Peso Radicular (g) |       |
|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|------------------|----------------|--------|--------------------|-------|
|                          | Comprimento total(m) <sup>b</sup> | Maior comprimento (cm) <sup>c</sup> | Volume Total(ml) <sup>d</sup> | Volume Necrosado(ml) <sup>d</sup> |                  | fresco         | seco   | fresco             | seco  |
| 1                        | 13.7 a <sup>e</sup>               | 56. a                               | 113.3a                        | 113.3a                            | 82.3a            | 98.2a          | 53.5a  | 107.1a             | 23.4a |
| 2                        | 11.2 a                            | 55.8 a                              | 140.0a                        | 92.5a                             | 72.8a            | 113.2a         | 70.3a  | 105.8a             | 21.3a |
| 3                        | 7.3 b                             | 55.5a                               | 149.3a                        | 74.3b                             | 44.8b            | 95.7a          | 53.6a  | 138.5a             | 27.7a |
| 4                        | 5.1 b                             | 55.5a                               | 136.0a                        | 52.5b                             | 36.5b            | 66.9b          | 37.6b  | 116.9a             | 24.1a |
| 5                        | 13.2 a                            | 52.4a                               | 141.3a                        | 64.3b                             | 61.5a            | 114.8a         | 60.a   | 126.3a             | 25.3a |
| 6                        | 5.5 b                             | 52.2a                               | 114.8a                        | 55.3b                             | 42.5b            | 69.9b          | 33.6b  | 101.4a             | 18.0a |
| 7                        | 1.9 c                             | 40.0b                               | 97.50a                        | 8.0 b                             | 20.7c            | 27.2b          | 14.4c  | 81.89b             | 13.0b |
| 8                        | 15.9 a                            | 58.0a                               | 192.3a                        | 135.3a                            | 74.3a            | 127.6a         | 61.03a | 172.5a             | 39.7a |
| 9                        | 6.4 b                             | 50.0a                               | 142.5a                        | 54.0a                             | 46.0b            | 115.0a         | 47.8b  | 131.2a             | 27.5a |
| 10                       | 12.9 a                            | 57.5a                               | 165.5a                        | 119.5a                            | 73.3a            | 138.0a         | 62.7 a | 151.7a             | 31.9a |
| 11                       | 11.7 a                            | 52.6a                               | 165.0a                        | 99.0a                             | 71.2a            | 132.4a         | 61.2 a | 136.6a             | 28.2a |
| 12                       | 6.5 b                             | 58.3a                               | 161.3a                        | 100.0a                            | 66.3a            | 106.1a         | 45.4b  | 128.1a             | 25.7a |
| 13                       | 5.5b                              | 53.0a                               | 139.8a                        | 53.5b                             | 22.8c            | 57.4b          | 26.8b  | 129.0a             | 25.0a |
| F. Calc                  | 4,38                              | 2                                   | 1,07                          | 2,68                              | 3,19             | 2,47           | 1,57   | 1,89               | 2,24  |
| Cv (%)                   | 22,7                              | 6,8                                 | 17,3                          | 36,3                              | 24,7             | 24,9           | 30,1   | 13,7               | 17,1  |

Valores seguidos pela mesma letra nas colunas não são significativamente diferentes quando comparados com o método Scott-Knot a P = 0,05. Graus de liberdade dos tratamentos (Df) = 12; Df para o erro = 39; Df total = 51. a=T1: controle não inoculado; T2: inoculação de nematoides; T3-T13: inoculação com uma combinação do nematoide e um dos isolados UENF / CF 160-170. b = Calculado através do método da intersecção da quadricula (Tennant 1975). c = Distância do colo da planta a região mais distal radicular. d = Calculado através do deslocamento de água em uma proveta graduada. e = Valores são média de quatro repetições (plantas).

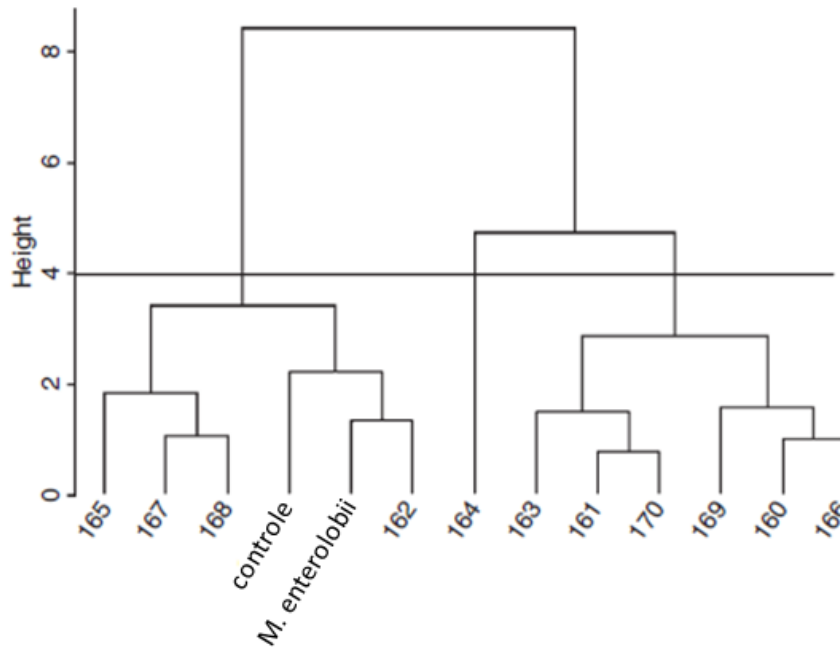


Figura1 – Dendrograma de dissimilaridade com base na distância euclidiana, calculado pelo método de Ward e com base nas variáveis avaliadas em goiabeiras cultivadas em microparcelas no campo, cinco meses após a inoculação com *Meloidogyne enterolobii* sozinho ou em combinação com um dos isolados de *Fusarium* sp. UENF / CF 160-170, em São João da Barra, Brasil. Plantas não inoculadas serviram como controle.

O dendrograma de dissimilaridade (Figura 1) mostrou que isolados *Fusarium* sp. formaram três agrupos e devem ser investigados, sobre a sua participação no declínio da goiabeira.

No segundo experimento, não ocorreu podridão radicular nas plantas controle (T1) (Tabela 2), já nas plantas inoculadas com o nematoide (T2) observou-se galhas radiculares e algum grau de apodrecimento nas raízes. Os fungos *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizoctonia* sp foram isolados a partir dessas plantas, mas não *Fusarium* sp. Não ocorreu reisolamentos nas plantas inoculados com quatro isolados de *F. solani* com ou sem injúrias mecânicas inferidas por uma espátula (T3-T10); praticamente sem efeito sobre as outras variáveis avaliadas. Em contraste, podridão radicular foi observada ( $P < 0,05$ ) quando *M. enterolobii* e *F. solani* foram inoculados juntos. (T11-T14) (Fig. 2).

Tabela 2 Variáveis do sistema raicular e da parte aérea de goiabeiras cultivadas em microparcelsas no campo em São João da Barra, Brasil, cinco meses após a inoculação com *Meloidogyne enetrolobii* sozinho ou combinado com *Fusarium solanii*

| Tratamentos <sup>a</sup> | Foliar                 |                                | Volume radicular <sup>b</sup> |          | Massa fresca |          |
|--------------------------|------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------|--------------|----------|
|                          | Clorofila <sup>c</sup> | Área foliar (cm <sup>2</sup> ) | Total                         | Sadio    | Aérea        | Raiz     |
| 1                        | 48.9 a <sup>d</sup>    | 2171.7 a                       | 139.3 a                       | 139.3 a  | 125.2 a      | 144 a    |
| 2                        | 46 a a                 | 1425.5 b                       | 104.5 a                       | 93.8 b   | 76.3 b       | 112 ab   |
| 3                        | 49.3 a                 | 1966.1 ab                      | 122.8 a                       | 122.8 ab | 115.3 a      | 128 ab   |
| 4                        | 46.9 a                 | 1914.2 ab                      | 103.3 a                       | 103.3 b  | 111.4 a      | 104.7 ab |
| 5                        | 48.7 a                 | 1673.3 ab                      | 111.5 a                       | 111.5 ab | 110.6 a      | 113.1 ab |
| 6                        | 49.4 a                 | 1966.1 ab                      | 111.8 a                       | 111.8 ab | 106 ab       | 117.6 ab |
| 7                        | 48.3 a                 | 1913.5 ab                      | 110.3 a                       | 110.3 ab | 111.5 a      | 114.2 ab |
| 8                        | 47.6 a                 | 1873.4 ab                      | 102.7 a                       | 102.7 b  | 106.6 ab     | 103.1 b  |
| 9                        | 47.7 a                 | 1968.7 ab                      | 105.3 a                       | 105.3 ab | 119.4 a      | 118.1 ab |
| 10                       | 48.6 a                 | 1868.4 ab                      | 115.2 a                       | 115.2 ab | 109.4 ab     | 124.7 ab |
| 11                       | 38.7 b                 | 364.5 c                        | 35.8 b                        | 2.7 c    | 28.6 c       | 43.1 c   |
| 12                       | 39.9 b                 | 284.5 c                        | 44.8 b                        | 2.7 c    | 29 c         | 51.3 c   |
| 13                       | 9.6 b                  | 239.9 c                        | 28.8 b                        | 0.3 c    | 21 c         | 37.3 c   |
| 14                       | 7.2 b                  | 420.6 c                        | 37 b                          | 2.2 c    | 30.3 c       | 45.4 c   |
| F. Calc                  | 21.55                  | 30.12                          | 22.20                         | 51.29    | 33.78        | 20.13    |
| Cv (%)                   | 5.21                   | 23.21                          | 21.14                         | 22.34    | 19.63        | 20.31    |

Valores seguidos pela mesma letra nas colunas não são significativamente diferentes quando comparados com o método Scott-Knot a P = 0,05. Graus de liberdade dos tratamentos (Df) = 13; Df para o erro = 70; Df total = 83. a=T1: o controle não inoculado; T2: inoculação de nematoides; T3 a T6: inoculação com isolados *F. solani* UENF/CF 160, 163, 164, ou 170, separado; T7 a T10: inoculação com os isolados do fungo já referido, combinado com danos físicos das raízes com uma espátula de metal ; T11 a T14: inoculação com nematoide, seguidos 21 dias mais tarde, com os isolados do fungo já referido. b = Calculado através de deslocamento de água em uma proveta graduada. c = Mensurada com um medidor de clorofila SPAD-502 (Minolta). d = Valores são média de seis repetições (plantas).



Fig. 2 Sistema radicular de mudas de goiaba, da esquerda para a direita: controle não inoculado; inoculados com *Fusarium solani* apenas; inoculado com *F. solani* apenas combinado com danos físicos das raízes com uma espátula de metal; inoculado apenas com *Meloidogyne enterolobii* e inoculado com *M. enterolobii* e 21 dias após com *F. Solani*.

O efeito sinérgico de *M. enterolobii* e *F. solani* causando o declínio da goiabeira é claro, e esta combinação reflete a natureza complexa da doença. Curiosamente, uma distinção significativa ( $P < 0,05$ ) entre T7-T10 e T11-T14 sugere que um fator fisiológico está envolvido na indução de susceptibilidade de goiabeiras parasitadas por *M. enterolobii* à podridão radicular causada por *F. solani*, pois as lesões físicas infligidas sobre as raízes não permitiram que *F. solani* causasse o declínio das mudas de goiabeira.

Além disso, este estudo mostra que o declínio da goiabeira não é causado por *M. Enterolobii* apenas, sendo *F. solani*, o agente que estende os danos causados à planta. O (s) mecanismo (s) pelo (s) qual (ais) *M. enterolobii* predispõe goiabeiras a *F. solani* está atualmente sob investigação.



Um aspecto do declínio da goiabeira que permanece sem solução é o possível papel, embora, provavelmente secundário de outros fungos de solo nesta doença complexa. Na verdade, *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizoctonia* sp. têm sido ocasionalmente isolados de pomares de goiabeira, e eles podem ter sido responsáveis pela modesta podridão radicular estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ), observada no segundo experimento (tratamento T2), juntamente com uma redução da área foliar e peso do sistema radicular.

A incidência generalizada do declínio da goiabeira no Brasil levou os autores a solicitar amostras de raiz de outras regiões brasileiras. A chegada tardia das amostras impediu o uso destes isolados de *Fusarium* sp. (UENF / CF 234-301) nos experimentos de campo. Um ensaio em laboratório foi concebido para avaliar os danos causados por estes isolados de *Fusarium* sp., sendo os isolados UENF / CF 160, 163, 164 e 170 padrões patogênicos para as mudas de goiabeira. Os resultados (não publicados) confirmaram o papel em âmbito nacional de *F. solani* no declínio da goiabeira.

Outras associações suspeitas entre nematoides e fungos que afetam goiabeiras foram relatadas. Na Venezuela, Suarez *et al.* (1998) relataram a incidência concomitante de *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne javanica*, *Macrophomina phaseolina*, *F. oxysporum*, *Pythium* sp. e *Phytophthora* sp. Suarez *et al.* (1999) alegaram um efeito sinérgico de *Macrophomina* sp. e *Fusarium* sp. com *Meloidogyne* spp., apesar de seus resultados experimentais não suportarem sua hipótese de uma doença complexa que envolva esses patógenos porque não houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) observada entre as diferentes combinações desses patógenos.

Na Índia, Dwivedi e Dwivedi (1999) consideraram que o declínio da goiabeira é um problema nacional, fazendo com que as perdas estimadas no rendimento cheguem a 30%. Esta doença é relatada em viveiros e pomares. No primeiro caso, manchas castanho-escuras no tronco, morte das mudas nos viveiros e em pomares; murcha parcial ou total das árvores, e em seguida a secagem, rachaduras dos frutos, rachaduras da casca da árvore seguida de morte e as raízes apresentando manchas negras. A partir deste relatório, parece claro que o declínio da goiabeira relatado na

Índia é uma doença distinta do declínio da goiabeira causada por *F. Solani* e *M. enterolobii* no Brasil.

De acordo com Dwivedi e Dwivedi (1999) e Khan *et al.* (2001), a etiologia complexa do declínio da goiabeira na Índia é incerto com os seguintes fungos listados como agentes causais: *F. oxysporum* f.sp. *psidii*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *Macrophomina phaseoli*, *M. phaseolina*, *Rhizoctonia bataticola*, *Cephalosporium* spp., *Cylindrocarpon* sp. e *Myxosporium psidii*.

Alguns autores têm suspeitado que nematoides, especialmente *Helicotylenchus dihystera*, poderiam estar envolvidos com o declínio da goiabeira (Khan *et al.* 2001). Embora este nematoide tenha sido relatado causando danos à mudas (Willers e Gretch, 1986), pesquisas realizadas em pomares sadios e doentes em cinco estados indianos, bem como experimentos sob condições controladas, não obtiveram provas convincentes de que *H. dihystera* está envolvido no declínio da goiabeira. Em conclusão, são necessários mais estudos para melhor caracterizar a etiologia do declínio da goiabeira para estabelecer o papel (se houver) do parasitismo dos nematoides.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem aos Drs. Ludwig Pfenning (Universidade Federal de Lavras, Brasil) e Robert Miller (Universidade de Brasília, Brasil), que identificaram os isolados de *F. solani* utilizados neste trabalho, e aos doutores. Rui Carneiro, Guilherme Asmus e Jose Mauro Castro do Iapar, Embrapa Agropecua Oeste e Embrapa Rido Semi arido, respectivamente, pelo fornecimento de amostras de diferentes regiões do Brasil.

### **Literatura Citada**

Abawi GS, Chen J. (1998) Concomitant pathogen and pest interactions. In: Plant and Nematode Interactions. Agronomy Monograph no 36. Madison, WS, USA, pp 135–158.

Back MA, Haydock PPJ, Jenkinson P. (2002) Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soil-borne pathogens. *Plant Pathol* 51:683–697.

Barnett HL, Hunter BB. (1972) *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. St Paul, MN, USA, APS Press.

Burgess LW, Summerell BA, Bullock S, Gott KP, Backhouse D. (1994) *Laboratory Manual for Fusarium Research*. Sydney, NSW, Australia, University of Sydney.

Dhingra OD, Sinclair JB. (1995) *Basic Plant Pathology Methods*. Boca Raton, FL, USA, CRC Press. Dwivedi SK, Dwivedi P. (1999) Wilt disease of guava: a national problem. *J Appl Hort* 1:151–154.

Dwivedi SK, Dwivedi P. (1999) Wilt disease of guava: a national problem. *J Appl Hort* 1:151–154.

Ellis MB. (1971) *Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew, Surrey, UK, Commonwealth Mycological Institute.

Ellis MB. (1976) *More Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew, Surrey, UK, Commonwealth Mycological Institute.

Evans K, Haydock PPJ. (1993) Interactions of nematodes with rootrot fungi. In: Khan MW. (ed) *Nematode Interactions*. London, UK, Chapman and Hall, pp 104–133.

Gomes VM. (2007) *Meloidoginose da goiabeira: estudos sobre a sua patogenese e formas de convivio com a doenca a campo*. Campos dos Goytacazes, Brazil, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, MS Thesis.

Gomes VM, Souza RM, Silva MM, Dolinski C. (2008) Caracterizacao do estado nutricional de goiabeiras em declínio parasitadas por *Meloidogyne enterolobii*. *Nematol Bras* 32:154–160.

Gomes VM, Souza RM, Correa FM, Dolinski C. (2010) Management of *Meloidogyne mayaguensis* in commercial guava orchards with chemical fertilization and organic amendments. *Nematol Bras* 34, in press.

Hussey RS, McGuire JM. (1987) Interaction with other organisms. In: Brown RH, Kerry BR. (eds) *Principles and Practice of Nematode Control in Crops*. Sydney, NSW, Australia, Academic Press, pp 293–328.

Kado CI, Heskett MG. (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60:969–979.

Khan RM, Kumar S, Reddy PP. (2001) Role of plant parasitic nematode (s) and fungi in guava wilt. *Pest Manag Hortic Ecosyst* 7:152–161.

Mai WF, Abawi GS. (1987) Interactions among root-knot nematodes and *Fusarium* wilt fungi on host plants. *Annu Rev Phytopathol* 25:317–338.

Mardia AKV, Kent JT, Bibby JM. (1997) *Multivariate Analysis*. London, UK, Academic Press.

Marques AS, Robbs CF, Boiteux LS, Parente PMC. (1994) *Indice de Fitobacterioses Assinaladas no Brasil*. Brasilia, Brazil, EMBRAPA.

Pereira FM. (1995) *Cultura da Goiabeira*. Jaboticabal, Brazil, FUNEP.

Pereira FM, Souza RM, Souza PM, Dolinski C, Santos GK. (2009) Estimativa do impacto economico e social direto de *Meloidogyne mayaguensis* na cultura da goiaba no Brasil. *Nematol Bras* 33:176–181.

Piccinin EL, Pascholati SF. (1997) Doenças da goiabeira (*Psidiumguajava*). In: Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM. (eds) *Manual de Fitopatologia. Vol 2, Doenças das Plantas Cultivadas*. São Paulo, Brazil, Editora Agronomica Ceres, pp 335–337.

Powell NT. (1971) Interactions between nematodes and fungi in disease complexes. *Annu Rev Phytopathol* 9:253–274.

Romeiro RS. (2001) *Métodos em Bacteriologia de Plantas*. Vicososa, Brazil, Editora UFV.

Suarez ZH, Rosales LC, Rondon A. (1999) Efecto sinergístico de los hongos *Macrophomina* y *Fusarium* con el nematodo agallador *Meloidogyne* spp. sobre un decaimiento en guayabo. *Nematol Mediterr* 27:79–82.

Suarez ZH, Rosales LC, Rondon A, Gonzalez MS. (1998) Histopatologia de raices de *Psidium guajava* atacada por el nematodo *Meloidogyne incognita* raza 1 y los hongos *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum*. *Fitopatol Venezuelana* 11:44–47.

Sutton BC. (1980) *The Coelomycetes*. Kew, Surrey, UK, Commonwealth Mycological Institute.

Tennant DA. (1975) Test of a modified line intersect method of estimating root length. *J Ecol* 63:995–1001.

Webster JM. (1985) Interactions of Meloidogyne with fungi on crop plants. In: Sasser JN, Carter CC. (eds) An Advanced Treatise on Meloidogyne. Vol 1 – Biology and Control. Raleigh, NC, USA, University of North Carolina Department of Plant Pathology and USAID, pp 183–192.

Willers P, Gretch NM. (1986) Pathogenicity of the spiral nematode *Helicotylenchus dihystra* to guava. *Plant Dis* 70:352.

### **3.2 Declínio da goiabeira: evidência da incidência Nacional no Brasil.**

Vicente M. Gomes<sup>1</sup>, Ricardo M. Souza<sup>1</sup>, Glauca E.O. Midorikawa<sup>2</sup>, Robert N.G. Miller<sup>2</sup>, Alexandre M. Almeida<sup>1</sup>

Endereço dos autores: <sup>1</sup>Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro/CCTA/LEF. Av. Alberto Lamego, 2000, 28015-620, Campos dos Goytacazes (RJ), Brasil. <sup>2</sup>Universidade de Brasília, Dept. Biologia Molecular, Brasília (DF), Brasil.

**Resumo** Gomes, V.M; Souza, R.M; Midorikawa, G.E.O; Miller, R.N.G; Almeida, A.M. 2011. Declínio da goiabeira: evidência da incidência nacional no Brasil

No Estado do Rio de Janeiro, o declínio da goiabeira é uma doença complexa na qual o parasitismo por *Meloidogyne enterolobii* predispõe a planta a extensa podridão radicular causada pelo fungo *Fusarium solani*. O presente estudo teve o objetivo de confirmar que esta doença está presente nos diferentes Estados brasileiros nos quais tem sido relatado o extermínio de pomares de goiabeira. Quatorze amostras de raízes de pomares em declínio oriundas de quatro regiões brasileiras foram utilizadas para investigar a prevalência e virulência de *F. solani*. Foram processados 680 fragmentos de raízes para o isolamento de fungos, obtendo-se 301 isolamentos positivos para *Fusarium* sp. de todas as regiões amostradas. Desses 301 isolados, 75 foram avaliados em câmara úmida para virulência a estacas de goiabeira, tendo como padrão de virulência quatro isolados de *F. solani* obtidos de áreas afetadas pelo declínio da goiabeira no Estado do Rio de Janeiro. Sessenta e dois isolados infectaram e causaram extensas lesões necróticas nas estacas, à semelhança dos quatro isolados padrão. Os três isolados mais virulentos de cada região brasileira foram identificados como *F. solani* através do sequenciamento da região ITS do rDNA. Desta forma, conclui-se que o declínio da goiabeira, causado pelo efeito sinérgico da interação entre *M. enterolobii* e *F. solani*, é responsável pelo extermínio de extensos plantios de goiabeira em todo o Brasil.

Palavras-chave: Nematóide da goiabeira, *Psidium guajava*, etiologia.



**Abstract** - Gomes, V.M; Souza, R.M; Midorikawa, G.E.O; Miller, R.N.G; Almeida, A.M. 2011. Guava decline: evidence of nationwide incidence in Brazil.

In Rio de Janeiro State (Brazil), guava decline is a complex disease in which parasitism by *Meloidogyne enterolobii* predisposes *Fusarium solani*-immune trees to extensive root decay caused by this fungus. In the shoot, the symptoms include chlorosis, wilting, scorching of margin and falling of leaves, severe yield reduction, and plant death within months. This study aimed to confirm the nationwide incidence of guava decline, since in many States about five thousand hectares of *M. enterolobii*-infested orchards have been decimated with the same symptoms. Root samples from declining, nematode-infested orchards were received from Southern, Northeastern and Midwestern Brazil. Of the 683 root fragments processed for fungi isolation, about half were positive for *Fusarium* sp., and only 5% were positive for other fungi. Sixty-nine *Fusarium* sp. isolates were established as representatives of those Brazilian regions. Eleven *Fusarium* sp. isolates whose virulence to guava plants had been assessed in microplot experiments were used to develop a growth chamber assay, in which the virulence to guava stem cuttings, graded according to the symptoms, matched the virulence observed in the field. When this assay was used to assess the virulence of the 69 *Fusarium* sp. isolates, 87% were virulent to stem cuttings, with 42% of these being classified as highly virulent. Among the most virulent isolates, 12 representatives of the different Brazilian regions were selected for taxonomic identification to species level through ITS4 and ITS5 gene sequencing. All isolates were identified as *F. solani*. This confirms the nationwide incidence of guava decline.

Keywords: guava root-knot nematode, *Psidium guajava*, etiology.

## INTRODUÇÃO

No Brasil um dos principais problemas fitossanitários do cultivo da goiaba (*Psidium guajava* L.) é a morte de plantas parasitadas por *Meloidogyne enterolobii* Yang & Eisenback, 1983 (Sinonímia: *Meloidogyne enterolobii* Rammah and Hirschmann, 1988). A destruição de pomares já se estende por cerca de 5 mil hectares em vários Estados brasileiros e já causou prejuízo direto de 112,7 milhões de reais até o ano de 2008, aos quais se acrescentam o desemprego de aproximadamente 3.700 trabalhadores rurais em tempo integral devido ao declínio e à morte dos pomares (Pereira *et al.*, 2009). Várias tentativas para manejar *M. enterolobii* falharam e os esforços na maioria das pesquisas no Brasil estão agora concentradas na triagem de genótipos de *Psidium* sp. para resistência a esse nematoide (Almeida *et al.*, 2009; Burla *et al.*, 2010 ; Miranda *et al.*, 2010., Miranda *et al.*, 2011).

Estudos realizados por Gomes *et al.*, (2011) comprovaram que a podridão do sistema radicular, bem como o efeito negativo sobre o teor de clorofila (SPAD), área foliar, e massa fresca da planta foram observados nas mudas inoculadas com *M. enterolobii* e *F. solani*, caracterizando o declínio da goiabeira como uma doença complexa causada pelo efeito sinérgico desses organismos, nos quais o parasitismo pelo nematoide predispõe as plantas à podridão radicular causada pelo fungo.

No Estado do Rio de Janeiro, Gomes *et al.*, (2011) comprovaram que a podridão progressiva das raízes de goiabeiras parasitadas por *M. enterolobii* é causada por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Nesta doença complexa denominada declínio da goiabeira, o parasitismo pelo nematoide predispõe a planta imune a *F. solani* à extensa podridão radicular causada pelo fungo. Experimentos utilizando um sistema com raízes divididas não detectaram um fator sistêmico envolvido na suscetibilidade ao fungo. Em vez disso, estudos *in vitro* indicaram que alterações químicas nos exsudatos radiculares de plantas parasitadas por *M. enterolobii* alteraram o comportamento do fungo e o habilitou invadir as raízes (Gomes VM, resultados não publicados). O declínio da goiabeira se junta à lista de doenças complexas envolvendo nematoides e fungos em diversas culturas (veja relatos por Evans & Haydock, 1993; Sugawara *et al.*, 1997, Rupe *et al.*, 1999; Avelar *et al.*, 2001; Back *et al.*, 2002.; Gupta *et al.*, 2010, Gomes *et al.*, 2011 ).

O declínio da goiabeira é uma doença complexa que aumenta a sensibilidade da planta a estresses ambientais (Gomes *et al.*, 2011). Os sintomas diretos nas raízes concorrem, com frequência, para a manifestação de sintomas indiretos ou reflexos na parte aérea das plantas; decorrentes principalmente de dificuldades na absorção e/ou no transporte de água e nutrientes disponíveis no solo, evoluindo com frequência para bronzeamento, amarelecimento, queima dos bordos, desfolhamento precoce e morte da planta (Gomes *et al.*, 2008).

No México, Avelar *et al.* (2001) estudando as causas do declínio da goiabeira, relataram a incidência concomitante de *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Verticillium dahliae*, *Fusarium solani*, *Pythium* sp. e *Phytophthora* sp. Já na Venezuela Suarez *et al.* (1999) reivindicaram o efeito sinérgico de *Macrophomina* sp. e *Fusarium* sp. com *Meloidogyne* spp., apesar de seus resultados experimentais não suportarem a existência de doença complexa que envolva esses patógenos, porque não houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) observada entre as diferentes combinações dos patógenos no estudo.

A etiologia do declínio em extensivos pomares de goiaba no Estado do Rio de Janeiro parece, portanto, bem estabelecida. No entanto, não foi confirmado o papel de *F. solani* no declínio generalizado de pomares em vários Estados brasileiros, que é sempre associado com parasitismo por *M. enterolobii* e com os mesmos sintomas como os descritos no Rio de Janeiro (por exemplo, Silva *et al.*, 2008; Charchar *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010). Para confirmar a incidência nacional do declínio da goiabeira com base em muitos isolados de *Fusarium* sp. de diferentes regiões do Brasil um ensaio em câmara de crescimento foi desenvolvido (ver Material e Métodos), para avaliar a virulência de todos os isolados.

Assim, este trabalho relata os esforços, i) avaliar a incidência de *Fusarium* sp. em amostras de raízes coletadas de pomares de goiabeira em declínio parasitadas por *M. enterolobii*, em diferentes regiões brasileiras, ii) estabelecer isolados de *Fusarium* sp. destas regiões e avaliar a sua virulência a estacas de goiabeira, e iii) identificar em nível de espécie isolados de *Fusarium* sp. mais virulentos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostragem

Amostras de raízes de goiabeira parasitadas por *M. enterolobii* compostas de aproximadamente 4 kg de raízes, sendo 8 amostras procedentes de São João da Barra (sudeste), 3 amostras de Petrolina (Nordeste), 2 amostras de Ivinhema (Centro Oeste), 1 amostra de Caropolis e 1 amostra Santa Maria (Sul) do Brasil, foram recebidas. As amostras incluíram radículas e raízes de diferentes calibres, amostradas em uma profundidade de 0 a 30 cm.

### Isolamento de fungos sistêmicos

Fragmentos de raízes de 5 mm (colo, raiz principal e raiz secundária), preferencialmente das zonas afetadas com galhas causadas pelo nematoide foram desinfestados em álcool 70% durante 1 min e Qboa® (2% de hipoclorito de sódio) durante 1 min e lavados com SDW (Dhingra e Sinclair 1995). Os fragmentos foram incubados por 7 dias a 27 ° C e 12 h de fotoperíodo em placas de Petri com meio batata-dextrose-ágar (BDA) modificado, com 500 mg/L de sulfato de estreptomicina. Os fungos foram repicados e, após a esporulação foram identificados em gênero ou em nível de espécie em lâminas de vidro e observados em microscópio de luz, com ou sem coloração com lactofenol e azul de algodão ou fucsina, de acordo com as descrições de Ellis (1971, 1976), Garro & Gene (1992, 1999); Barnett e Hunter (1972).

Os isolados identificados pertencentes ao gênero *Fusarium* sp. foram agrupados com base nas características morfológicas das colônias (coloração, arranjo de macro e microconídios e produção de clamidósporos), época do isolamento e local de coleta. Sessenta e nove isolados de *Fusarium* sp. (a seguir designado UENF/CF 234-301) foram selecionados como representantes da diversidade encontrada nas diferentes regiões brasileiras. Estes isolados foram armazenados em sílica à temperatura ambiente e em grãos de trigo mantidos em freezer a 4°C (Dhingra e Sinclair, 1995).

### **Avaliação in vitro da patogenicidade de isolados de *Fusarium* sp. a estacas de goiabeira**

Estacas de goiabeira (10 cm de comprimento) com um par de folhas foram coletadas em um pomar comercial de goiabeira cultivar 'Paluma'. As estacas foram imersas separadamente por cinco segundos em uma suspensão de conídios ( $10^7$ /mL) de cada um dos 11 isolados de *Fusarium* sp. (UENF / CF 160-170), cuja virulência a plantas de goiabeira foi avaliada em microparcels (Gomes *et al.*, 2011). As estacas foram posteriormente colocadas individualmente em células de plástico com areia esterilizada como substrato, e transferidas para câmara de crescimento vegetal a  $27 \pm 2$  ° C, 95% de umidade relativa e fotoperíodo de 12h. Oito estacas foram inoculadas por isolado e oito foram imersas em água destilada estéril, como controle.

Para a produção de inóculos, os isolados de *Fusarium* sp. foram cultivados por sete dias a 27 ° C e fotoperíodo de 12h, em placas de Petri com meio BDA. Quinze dias após inoculação cada estaca foi avaliada para a incidência e severidade das lesões e queda de folhas, lesões dos pecíolos das folhas, e escurecimento e necrose da haste da estaca. Estes sintomas foram expressos em uma escala de 0 a 2 (Tabela 1;. Fig 1). Este ensaio foi repetido uma vez no tempo.

Para cada isolado de *Fusarium* sp. o grau de virulência (VG) foi calculado da seguinte forma:  $VG = (nx 0) + (nx 1) + (nx 2) / 16$ , em que "n" foi o número de estacas x escala de notas 0, 1 ou 2. O grau de virulência de cada isolado foi expresso como nulo, baixo, médio ou alto de acordo com os seguintes valores de VG: 0; 0,1-0,66; 0,67-1,33 e 1,34-2, respectivamente. Para validar este ensaio em câmara de crescimento, o VG de cada isolado foi comparado com a virulência a goiabeiras observado em experimentos de microparcels por Gomes *et al.* (2011).

Tabela 1 – grau de virulência de isolados de *Fusarium* sp. a estacas de goiabeira imersas em suspensão aquosa de conídios por cinco segundos e mantidas por 15 dias em câmara de crescimento a 95% de umidade relativa, temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 h.

| Nota | Descrição dos sintomas  |
|------|---|
| 0    | saudável (ausência de sintomas).  |
| 1    | presença de lesões necróticas abrangendo pequena área das folhas e no pecíolo e murcha leve com queda ocasional de pelo menos uma folha.                          |
| 2    | lesões necróticas cobrindo grandes áreas das folhas, pecíolo, e na base da estaca que se apresenta moderadamente retorcida e murcha com queda de ambas as folhas. |

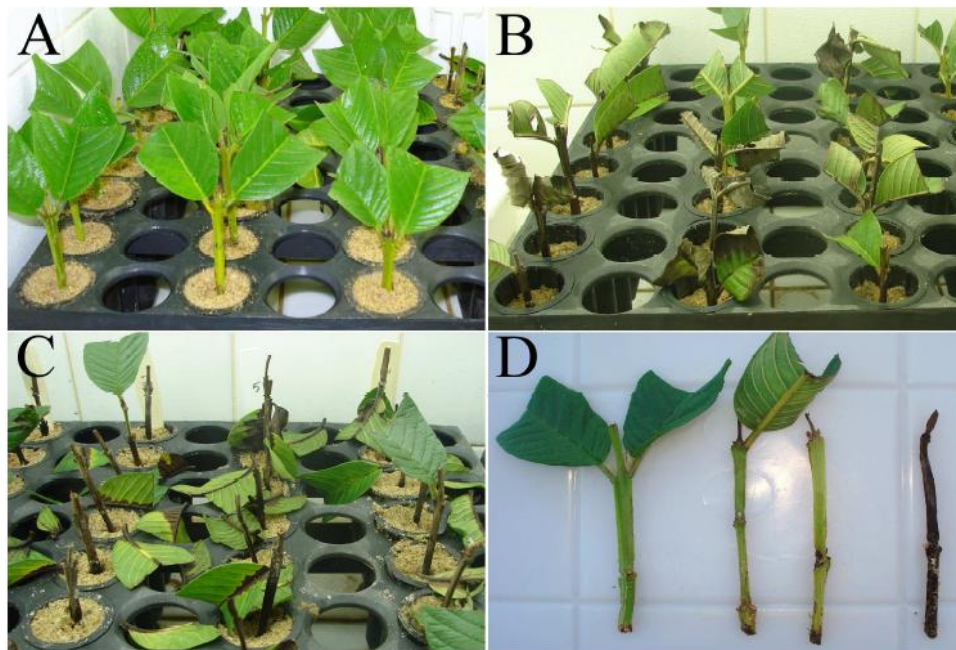


Fig. 1 - Sintomas e graus de virulência de *Fusarium* sp. a estacas de goiabeira imersas em suspensão aquosa de conídios ( $10^7/\text{mL}$ ) por cinco segundos e mantidas por 15 dias em tubetes de plástico com areia esterilizada em câmara de crescimento a 95% de umidade relativa, temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 h. A: grau 0 (sem sintomas); B: grau 1, lesões necróticas que abrangem pequenas áreas de folhas, pecíolos das folhas e caule com leve murchamento das folhas, com queda ocasional de uma folha; C: grau 2, lesões necróticas que cobrem grandes áreas (ou totalmente) de folhas, pecíolos das folhas e caule, haste da estaca muitas vezes fica preto e distorcido. Murchamento severo e distorção das folhas, muitas vezes caindo ambas. D: evolução dos sintomas escalas de 0 a 2.

### **Avaliação da patogenicidade de isolados de *Fusarium* sp. de diferentes regiões brasileiras**

Após a validação do ensaio em câmara de crescimento (ver resultados), esta abordagem foi utilizada para avaliar a virulência de 69 isolados de *Fusarium* sp. provenientes das diferentes regiões brasileiras. O ensaio foi realizado e avaliado como descrito anteriormente, e repetido uma vez. O isolado UENF / CF 163 altamente virulento foi incluído nos ensaios como padrão patogênico.

### **Identificação molecular e seleção de *Fusarium* sp.**

Os doze isolados de *Fusarium* sp. mais agressivos às estacas de goiabeira no teste em câmara de crescimento (ver Resultados), provenientes do Sul, Sudeste, Centro-oeste e Nordeste do Brasil, foram selecionados para identificação em nível de espécie, (UENF/CF 160, 163, 164, 170, 241, 244, 251, 263, 268, 275, 279 e 295) através de PCR e sequenciamento das regiões ITS4 e ITS5.

O material genômico dos isolados foi extraído de acordo com o método fenol-clorofórmio (Raeder & Broda, 1985). Cada isolado de *Fusarium* sp. foi cultivado em Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de meio de cultura líquido Czapeck Yeast Ágar (CYA), e incubado a 25°C a 120 rpm, durante 5 dias. O micélio de cada isolado foi recuperado por filtragem manual e lavado com água destilada e esterilizada, para remoção de todo resíduo do meio de cultura. Os micélios de cada isolado foram acondicionados em tubos Eppendorf® de 1,5 mL, liofilizado e macerado em cadinho de porcelana. Para a extração do DNA genômico, foi utilizado um tampão de extração contendo Tris HCl 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM e SDS 0.5% at pH 7. O DNA foi precipitado com isopropanol a -20°C na proporção de 54% do volume da solução e ressuspendido em TE (10 mM Tris-HCl, pH 8 e 1 mM EDTA). O DNA genômico extraído foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% (5V/cm) na presença de brometo de etídio (1 µg/ml). O marcador padrão utilizado foi low DNA mass ladder® (LDML) (Invitrogen).

Para a amplificação da região rDNA ITS dos isolados de *Fusarium* sp., a reação de PCR foi conduzida com um volume final de 25 µl, contendo 14,37 µl de

água Milli-Q, 2,5 µl de tampão 1X, 1 µl do primer ITS4 (10mM) e 1 µl do primer ITS5 (10mM), 2 µl de dNTPs (2,5 mM), 0,125 µl de Taq Pht (5 U/µl) e 4 µl de DNA (concentração de 5 ng/µl). O programa de temperaturas utilizado foi de desnaturação inicial a 94°C por 4 min, desnaturação do DNA a 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento do primer de 50°C por 1 min, extensão de 72°C por 1 minuto, extensão final de 72°C por 5 minutos e conservação da reação a 10°C. Os três passos de desnaturação do DNA, anelamento e extensão foram repetidos 39 vezes. A visualização da amplificação do fragmento da região rDNA ITS foi realizada por meio de eletroforese em gel agarose a 1% (5V/cm) na presença de brometo de etídio (1 µg/ml). O marcador padrão utilizado foi LDML.

Os produtos do PCR foram sequenciados no sentido forward, sem purificação, de acordo com o método de Sanger *et al* (1977). Cada reação de sequenciamento foi realizada com um volume final de 10 µl, contendo 2 µl do kit Dynamic™ ET Terminator (Pharmacia Biotech), 1 µl do primer (2 µM), 60 ng do produto de PCR e água Milli-Q (Millipore) para completar o volume final. O programa utilizado foi de 30 ciclos de 95°C por 20 s, 50°C por 15 s e 60°C por 1 min. Após a purificação do produto do sequenciamento, este foi ressuscitado em 3-4 µl de Dynamic™ ET loading solution (Amersham Pharmacia Biotech). O sequenciamento foi realizado no sequenciador Applied Biosystems ABI 377 (Applied Biosystems). Para a análise de qualidade das sequências e formação de uma sequência consenso foi utilizado o programa Sequencer V4.8 (Gene Codes Corporation). A análise de sequências homólogas aos isolados de *Fusarium* sp. foi realizada por meio do software BLASTn baseado no Genbank® <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>.

## RESULTADOS

Dos 682 fragmentos de raízes selecionados aleatoriamente e incubados das diferentes regiões brasileiras foram isolados os fungos *Chaetomium* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Aspergillus niger*, *Nigrospora* sp., *Monilia* sp. e *Rhizoctonia* sp., em frequência menor que 5% dos fragmentos. A frequência de isolamentos de *Fusarium* sp. foi de 47%. Para as regiões sul, sudeste, centro-oeste e nordeste foram de 58%, 35%, 37,5% e 44%, respectivamente.



A virulência dos 79 isolados de *Fusarium* sp. feita pelo uso da escala de notas, mostrou que 59% dos isolados foram altamente virulentos, 29% apresentaram virulência moderada e 12% apresentaram virulência nula às estacas de goiabeira. As tabelas 2 e 3 mostram o grau de virulência de isolados de *Fusarium* sp. a estacas de goiabeira.

As sequências obtidas para identificação em nível de espécie de todos os isolados de *Fusarium* sp. feitas pela amplificação da região rDNA ITS, apresentaram homologia com as da espécie *Fusarium solani* e foram depositadas no Genbank, com os respectivos registros JN006807 a JN006818. Observa-se analisando a figura 2 os produtos de amplificação (bandas) dos 12 isolados de *F. solani*, de diferentes regiões brasileiras.

## **DISCUSSÃO**

A metodologia empregada neste trabalho para isolamento de fungos a partir de fragmentos de raízes foi semelhante à utilizada por Gomes *et al.* (2011). Estes estudos alcançaram frequência de isolamentos positivos para *Fusarium* sp. das outras regiões brasileiras semelhante ao Estado do Rio de Janeiro. Isso demonstra que em pomares em declínio, parasitados por *M. enterolobii* raízes são comumente colonizadas por *Fusarium* sp. ,por outro lado não se isolou *Fusarium* sp. a partir de centenas de fragmentos de raízes de árvores de goiabeira livres do nematoide (Gomes *et al.*, 2011).

Observa-se analisando a tabela 2 que o grau de virulência de isolados de *Fusarium* sp. a plantas de goiabeira em experimentos de microparcela (Gomes *et al.*, 2011) e no ensaio em câmara de crescimento que foi testado duas vezes neste trabalho foram semelhantes. A validação de um ensaio rápido era obrigatório para confirmar a incidência nacional do declínio da goiabeira com muitos isolados de *Fusarium* sp. de diferentes regiões brasileiras. Experimentos em microparcela consomem muito mais tempo, espaço e recursos, porque a goiabeira é uma planta perene, com um crescimento relativamente lento.

Tabela 2 – Virulência de isolados de *Fusarium* sp. a estacas de goiabeira imersas em suspensão aquosa de  $10^{-6}$  conídios / mL por cinco segundos e mantidas por 15 dias em câmara de crescimento a 95% de umidade relativa de  $27 \pm 2$ oC temperatura e fotoperíodo de 12 h.

| Isolados              | Local de amostragem<br>(município/região) | Grau de virulência <sup>a</sup> | Degrade de virulência <sup>b</sup> | Virulência microparcela <sup>c</sup> |
|-----------------------|---|---------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
|                       | São João da Barra/Sudeste do Brasil       |                                 |                                    |                                      |
| UENF/CF 160           | Brasil                                    | 1.56                            | Alto                               | +                                    |
| UENF/CF 161           | “   | 1.13                            | Médio                              | +                                    |
| UENF/CF 162           | “   | 0                               | Nulo                               | -                                    |
| UENF/CF 163           | “   | 1.88                            | Alto                               | +                                    |
| UENF/CF 164           | “   | 1.81                            | Alto                               | +                                    |
| UENF/CF 165           | “   | 0                               | Nulo                               | -                                    |
| UENF/CF 166           | “   | 1.56                            | Alto                               | +                                    |
| UENF/CF 167           | “   | 0.25                            | Baixo                              | -                                    |
| UENF/CF 168           | “   | 0                               | Nulo                               | -                                    |
| UENF/CF 169           | “   | 1,5                             | Alto                               | +                                    |
| UENF/CF 170           | “   | 1.63                            | Alto                               | +                                    |
| Controle <sup>d</sup> | --  | 0                               | Nulo                               | -                                    |

<sup>a</sup> média ponderada de graus de virulência em uma escala 0-2 calculada em dois ensaios com oito estacas de goiabeira para cada isolado de *Fusarium* sp.; <sup>b</sup> Baseado nas classes de virulência 0 (Nulo), 0.1-0.66 (Baixo), 0.67-1.33 (Médio) e 1.34-2 (Alto).; <sup>c</sup> Adaptado por Gomes *et al.* (2011); <sup>d</sup> Imersão de estacas em água destilada estéril

Este ensaio em câmara de crescimento, realizado duas vezes com os 68 isolados de *Fusarium* sp. de diferentes regiões brasileiras, mostrou que 87% deles foi virulento para estacas de goiabeira, sendo 42% destes classificados como altamente

virulento. O controle patogênico, isolado UENF / CF 163, também foi altamente virulento. Este ensaio confirma indiretamente a incidência nacional do declínio da goiabeira causado por *Fusarium* sp. em pomares de goiabeira infestados por *M. enterolobii* (Tabela3).

Tabela 3 – Virulência de isolados de *Fusarium* sp. a estacas de goiabeira imersas em suspensão de  $10^{-6}$  conídios / mL, por cinco segundos e mantidas por 15 dias em câmara de crescimento a 95% de umidade relativa de  $27 \pm 2$ oC temperatura e fotoperíodo de 12 h.

| Isolados    | Local de amostragem<br>(município/região) | Grau de virulência <sup>a</sup> | Degrade de virulência <sup>b</sup> |
|-------------|---|---------------------------------|------------------------------------|
| UENF/CF 245 | St <sup>a</sup> Maria/Sul Brasil          | 0.31                            | Baixo                              |
| UENF/CF 246 | “   | 1.38                            | Alto                               |
| UENF/CF 247 | “   | 1                               | Médio                              |
| UENF/CF 248 | “   | 1.3                             | Médio                              |
| UENF/CF 249 | “   | 0                               | Nulo                               |
| UENF/CF 250 | “   | 0.8                             | Baixo                              |
| UENF/CF 251 | “   | 1.69                            | Alto                               |
| UENF/CF 252 | “   | 0                               | Nulo                               |
| UENF/CF 253 | “   | 1.13                            | Médio                              |
| UENF/CF 254 | “   | 1.38                            | Alto                               |
| UENF/CF 255 | “   | 0.44                            | Baixo                              |
| UENF/CF 256 | Carlópolis/Sul Brasil                     | 0.94                            | Médio                              |
| UENF/CF 257 | “   | 1.13                            | Médio                              |
| UENF/CF 258 | “   | 0.56                            | Baixo                              |
| UENF/CF 259 | “   | 1.19                            | Médio                              |
| UENF/CF 260 | “   | 1.56                            | Alto                               |
| UENF/CF 261 | “   | 0.69                            | Médio                              |
| UENF/CF 262 | “   | 1.63                            | Alto                               |
| UENF/CF 263 | “   | 1.5                             | Alto                               |
| UENF/CF 264 | “   | 0.56                            | Baixo                              |

|             |                           |      |       |
|-------------|---------------------------|------|-------|
| UENF/CF 234 | Ivinhema/Centro-oeste     | 1.13 | Médio |
|             | Brasil                    |      |       |
| UENF/CF 235 | “                         | 0.25 | Baixo |
| UENF/CF 236 | “                         | 0    | Nulo  |
| UENF/CF 237 | “                         | 0    | Nulo  |
| UENF/CF 238 | “                         | 1.31 | Médio |
| UENF/CF 239 | “                         | 1.44 | Alto  |
| UENF/CF 240 | “                         | 1.56 | Alto  |
| UENF/CF 241 | “                         | 1.69 | Alto  |
| UENF/CF 242 | “                         | 0.19 | Baixo |
| UENF/CF 243 | “                         | 1.19 | Médio |
| UENF/CF 244 | “                         | 1.69 | Alto  |
| UENF/CF 265 | “                         | 0.31 | Baixo |
| UENF/CF 266 | “                         | 1.56 | Alto  |
| UENF/CF 267 | “                         | 1.63 | Alto  |
| UENF/CF 268 | “                         | 1.94 | Alto  |
| UENF/CF 269 | Petrolina/Nordeste Brasil | 1.63 | Alto  |
| UENF/CF 270 | “                         | 1.69 | Alto  |
| UENF/CF 271 | “                         | 0.44 | Baixo |
| UENF/CF 272 | “                         | 0.5  | Baixo |
| UENF/CF 273 | “                         | 0    | Nulo  |
| UENF/CF 274 | “                         | 1.88 | Alto  |
| UENF/CF 275 | “                         | 1.63 | Alto  |
| UENF/CF 276 | “                         | 0    | Nulo  |
| UENF/CF 277 | “                         | 0.94 | Médio |
| UENF/CF 278 | “                         | 1.88 | Alto  |
| UENF/CF 279 | “                         | 2    | Alto  |
| UENF/CF 280 | “                         | 0.69 | Médio |
| UENF/CF 281 | “                         | 0    | Nulo  |
| UENF/CF 282 | “                         | 1.25 | Médio |
| UENF/CF 283 | “                         | 0.75 | Médio |

|                       |                                      |      |       |
|-----------------------|--------------------------------------|------|-------|
| UENF/CF 284           | “                                    | 0    | Nulo  |
| UENF/CF 285           | “                                    | 0.06 | Baixo |
| UENF/CF 286           | “                                    | 1.31 | Médio |
| UENF/CF 287           | “                                    | 0.75 | Médio |
| UENF/CF 288           | “                                    | 0.75 | Médio |
| UENF/CF 289           | “                                    | 0    | Nulo  |
| UENF/CF 290           | “                                    | 0.69 | Médio |
| UENF/CF 291           | “                                    | 1.19 | Médio |
| UENF/CF 292           | “                                    | 1.44 | Alto  |
| UENF/CF 293           | “                                    | 0.25 | Baixo |
| UENF/CF 294           | “                                    | 1.63 | Alto  |
| UENF/CF 295           | “                                    | 1.5  | Alto  |
| UENF/CF 296           | “                                    | 1.38 | Alto  |
| UENF/CF 297           | “                                    | 0.5  | Baixo |
| UENF/CF 298           | “                                    | 1.56 | Alto  |
| UENF/CF 299           | “                                    | 1.06 | Médio |
| UENF/CF 300           | “                                    | 0.88 | Médio |
| UENF/CF 301           | “                                    | 1.38 | Alto  |
| UENF/CF 163           | São João da<br>Barra/Suldeste Brasil | 1.87 | Alto  |
| Controle <sup>c</sup> | --                                   | 0    | Nulo  |

<sup>a</sup> média ponderada de graus de virulência em uma escala 0-2 calculada em dois ensaios com oito estacas para cada isolado de *Fusarium* sp.; <sup>b</sup> Baseado na série de classes de virulência 0 (Nulo), 0.1-0.66 (Baixo), 0.67-1.33 (Médio) e 1.34-2 (Alto).; <sup>c</sup> Adaptado por Gomes *et al.* (2011)

A Análise das sequências homólogas dos isolados UENF / CF 160, 163, 164, 170, 241, 244, 251, 263, 268, 279, 280 e 295, realizada por meio do Programa Sn, indicou tratar-se de *F. solani* (Figura 2).

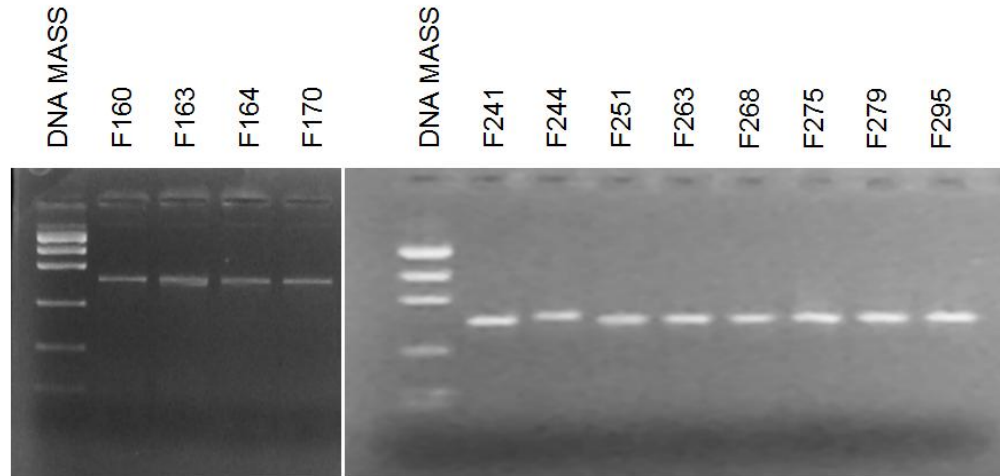


Fig. 2 – Gel de agarose com a amplificação de fragmentos de rDNA região ITS de 12 isolados de *Fusarium solani* virulentos às plantas de goiabeira. Primeira e sexta coluna refere-se ao Marcador de DNA MASS Ladder.

O declínio da goiabeira acrescenta a vários trabalhos de diferentes tipos de interação entre *F. solani* e fitonematoides, como *M. incognita* em mamoeiro (Khan & Hussain, 1991a,b), em tomate (Yeboah e Opoku-Asiamah, 2004; Ganaie & Khan, 2011), em girassol (Mokbel et al, 2007), em maracujá (Fisher et al, 2010), no gengibre e em pimenta (Evans & Haydock, 1993), e grão-de-bico (Mani & Sethi, 1987), com *Radopholus similis* em banana (Stover, 1966, citados por Evans & Haydock, 1993), com *Heterodera glycines* em soja (Rupe et al., 1999), e com *Tylenchulus semipenetrans* em mudas cítricas (Van Gundy & Tsao, 1963).

Além de ser de primordial importância para a cultura da goiabeira no Brasil, a interação sinérgica entre *F. solani* e *M. enterolobii* também pode ser responsável pela dizimação de pomares na Venezuela e no México. Na Venezuela, Suárez et al. (1999) afirmaram que *Macrophomina* sp., *Fusarium* sp. e *Meloidogyne* spp. agem sinérgicamente para debilitar pomares de goiabeira, embora seus resultados experimentais não suportem suas conclusões de uma doença complexa que envolva esses patógenos; pois não houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) observada entre as diferentes combinações desses patógenos. Além disso, os autores não identificaram em nível de espécie os fungos e nematoides envolvidos. No México, Avelar et al. (2001) relataram pomares de goiabeira em declínio, com sintomas um pouco

diferentes daqueles observados no Brasil, tais como folhas laminadas, rosetas de folhas em desenvolvimento da região apical dos ramos e tronco acinzentado. Os autores não foram capazes de determinar o agente causal, mas eles relataram a associação de *M. incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949, *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 e *M. arenaria* (Neal, 1889), Chitwood, 1949 com os fungos *F. solani*, *Verticillium dahliae* Kleb, *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp, *Trichoderma roseum* (Pers.) e *Trichoderma* spp. Os autores consideraram os fungos patógenos secundários da doença, embora não haja dados apresentados para fundamentar as suas conclusões.

É plausível a hipótese de que os experimentos corretamente projetados possam desvendar o papel de *F. solani* no declínio da goiabeira no México e na Venezuela. Além disso, como apontado por Carneiro *et al.* (2001), *M. mayaguensis* (= *M. enterolobii*) é uma espécie polífaga e morfológicamente variável e pode ter sido erroneamente identificada como *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. incognita* em muitas pesquisas nas quais os métodos taxonômicos com marcadores isoenzimáticos ou moleculares não foram utilizados. No Brasil, várias pesquisas têm revelado *M. enterolobii* como a única espécie parasita de goiabeira. Portanto, embora vários estudos listem diferentes espécies de *Meloidogyne* parasitando esta cultura na América Latina, é necessário uma pesquisa por especialista para chegar a uma conclusão semelhante ao verificado no Brasil.

Em conclusão, este trabalho apresenta fortes evidências da incidência nacional do declínio da goiabeira, que é responsável pela dizimação de muitos pomares em vários Estados brasileiros.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem aos pesquisadores José M. Cunha - Embrapa Semi-Árido, Petrolina - RN, Rui G. Carneiro - IAPAR, Londrina - PR, Guilherme L. Asmus - Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados – MS, pela coleta e envio de amostras de raízes de goiabeiras em declínio de diferentes regiões do Brasil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, E.J., J.M. Santos & A.B.G. Martins. 2009. Resistência de goiabeiras e araçazeiros a *Meloidogyne mayaguensis*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 44: 421-423.

Avelar MJJ, Teliz ODY, Zavaleta ME, 2001. Patogenos asociados con el declinamiento de guayabo. Revista Mexicana de Fitopatologia 19: 223-229.

Barnett HL, Hunter BB. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. St Paul, MN, USA, APS Press.

Back MA, Haydock PPJ, Jenkinson P. 2002. Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soil-borne pathogens. Plant Pathology 51: 683-697.

Burla, R.S., R.M. Souza, V.M. Gomes & F.M. Corrêa. 2010. Comparação entre níveis de inóculo, épocas de avaliação e variáveis para seleção de *Psidium* spp. visando à resistência a *Meloidogyne mayaguensis*. Nematologia Brasileira 34: 82-90.

Carneiro RMDG, Moreira WA, Almeida MRA, Gomes ACMM, 2001. Primeiro registro de *Meloidogyne enterolobii* em goiabeira no Brasil. Nematologia Brasileira, 25: 223-228.

Charchar, J.M., M.E.N. Fonseca, L.B. Boiteux & A.F. Lima Neto. 2009. Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no estado de Tocantins. Nematologia Brasileira, 33 (2): 182-186.

Dhingra OD, Sinclair JB, 1995. Basic Plant Pathology Methods. Boca Raton, CRC Press.



Ellis MB. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Kew, Surrey, UK, Commonwealth Mycological Institute.

Ellis MB. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. Kew, Surrey, UK, Commonwealth Mycological Institute.

Evans, K., & P.P.J. Haydock. 1993. Interactions of nematodes with root-rot fungi. Pp. 104-133 in Khan M.W. (ed). Nematode Interactions. London, Chapman and Hall.

France RA, Abawi GS, 1994. Interaction between *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* on selected bean genotypes. Journal of Nematology, Hanover, 26: 467-474.

Fischer, I H L., Almeida, A M., Fileti, M S., Bertani, R M A., Arruda, M C., Bueno, C J. 2010. Avaliação de *Passifloraceas*, fungicidas e *Trichoderma* para o manejo da Podridão-do-colo do maracujazeiro, causada por *Nectria haematococca*. *Rev. Bras. Frutic.* [online], vol.32, n.3, pp. 709-717.

Ganaie, M.A., & T.A. Khan. 2011. Studies on the interactive effect of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium solani* on *Lycopersicon esculentum* Mill. International Journal of Botany..

Gomes VM, Souza RM, Mussi-Dias V, Silveira SF, Dolinski C. 2011. Guava Decline: A Complex Disease Involving *Meloidogyne enterolobii* and *Fusarium solani*. Journal of Phytopathology, 159: 45-50.

Gomes VM, Souza RM, Corrêa FM, Dolinski C. 2010. Management of *Meloidogyne mayaguensis* in commercial guava orchards with chemical fertilization and organic amendments. Nematologia Brasileira 34: 23-30.

Gomes VM, Souza RM, Silva MM, Dolinski C, 2008. Caracterização do estado nutricional de goiabeiras em declínio parasitadas por *Meloidogyne mayaguensis*. Nematologia Brasileira, 32: 154-160

Gomes VM, 2007. Meloidoginose da goiabeira: estudos sobre a sua patogênese e formas de convívio com a doença a campo. Campos dos Goytacazes, Brazil, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, MS thesis.

Guarro J, Gené J, 1992. *Fusarium* infections. Criteria for the identification of the responsible species. Mycoses, 35: 109-114.

Guarro J, Gené J, 1999. STCHIGEL AM – Developments in fungal taxonomy. Clin Microbiol Rev, 12: 454-500.

Gupta VK, Misra AK, Gaur RK, Jain PK, Gaur D, Sharma S, 2010. Current Status of *Fusarium* Wilt Disease of Guava (*Psidium guajava* L.) in India. Biotechnology, 9: 176-195

Haseeb A, Shukla PK, 2004. Management of *Heterodera cajani*, *Meloidogyne incognita* and *Fusarium* wilt on pigeon pea with some chemicals, bio-pesticides and bio-agents. Nematologia Mediterranea, 32: 217-222.

Khan RM, Kumar S, Reddy PP. 2001. Role of plant parasitic nematode(s) and fungi in guava wilt. Pest Management in Horticultural Ecosystems 7: 152-161.

Khan, T.A. & S.I. Husain. 1991a Effect of age of papaya seedlings on the development of disease complex caused by *Meloidogyne incognita* and *Fusarium solani*. Nematologia Mediterranea 19: 327-329.

Khan, T.A. & S.I. Husain. 1991b. Effect of interaction of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium solani* on the growth of papaya and nematode reproduction. Nematologia Mediterranea 19: 195-196.

Khan TA, Husain SI, 1989. Relative resistance of six cowpea cultivars as affected by the concomitance of two nematodes and a fungus. *Nematologica Mediteranea* 17, 39–41.

Mai WF, Abawi GS. 1987. Interactions among root-knot nematodes and *Fusarium* wilt fungi on host plants. *Annual Review of Phytopathology* 25: 317-338.

Mani, A. & C.L. Sethi. 1987.. Interaction of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* with *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* and *F. solani* on chickpea. *Indian Journal of Nematology* 17: 1-6.

Melakeberhan H, Webster JM, 1993. The phenology of plant-nematode interaction and yield loss. In: M. W. Khan. (ed) *Nematode interactions*. Chapman & Hall, London 26-41.

Mokbel, A.A., I.K.A. Ibrahim, M.R.A. Shehata and M.A.M. El-Saedy, 2007. Interaction between certain root-rot fungi and the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on sunflower plants. *Egypt. J. Phytopathol.*, 35: 1-11.

Palmateer, A.J., K.S. Lawrence, E. van Santen & G. Morgan-Jones. 2004. Interaction of *Rotylenchulus reniformis* with seedling disease pathogens of cotton. *Journal of Nematology* 36: 160-166.

Pereira FM, Souza RM, Souza PM, Dolinski C, Santos GK, 2009. Estimativa do impacto econômico e social direto de *Meloidogyne mayaguensis* na cultura da goiaba no Brasil. *Nematologia Brasileira* 33: 176-181.

Pitcher RS, 1965. Interrelationships of nematodes and other pathogens of plants. *Helminth. Abstr.* 34: 1-17

Power NT, 1971. Interactions between nematodes and fungi in disease complexes. *Annual Review of Phytopathology* 9: 253-274.

Raeder U, Broda P, 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol* 1: 17-20.

Rammah, A. & Hirschmann, H. 1988. *Meloidogyne mayaguensis* n.sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode from Puerto Rico. *Journal of Nematology* 20: 58-69.

Rupe JC, Robbins RT, Becton CM, Sabbe WA, Gbur EE, 1999. Vertical and temporal distribution of *Fusarium solani* and *Heterodera glycines* in fields with sudden death syndrome of soybean. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 245–51.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.74, p.5463-5467.

Silva RV, Oliveira RDL, 2010. Ocorrência de *Meloidogyne enterolobii* (sin. *M. mayaguensis*) em goiabeiras no estado de Minas Gerais, Brasil *Nematologia Brasileira* 34: 172-177.

Silva GS, Pereira AL, 2008. Efeito da incorporação de folhas de nim ao solo sobre o complexo *Fusarium x Meloidogyne* em quiabeiro. *Summa Phytopathologica* 34: 368-370

Smith IJ, Dunez R, Lelliott D, Phillips YS, 1992. *Manual de las enfermedades de las plantas*. 671 p. Ediciones Mundi Prensa, Madrid, España.

Souza RM, Nogueira MS, Lima IM, Melarato M, Dolinski CM. 2007. Manejo de nematoides-das-galhas da goiabeira em São João da Barra (RJ) e relato de novos hospedeiros. *Nematologia Brasileira*, 30: 165-169.

Suarez ZH, Rosales LC, Rondon A, 1999. Efecto sinergístico de los hongos *Macrophomina* y *Fusarium* con el nematodo agallador *Meloidogyne* spp. sobre un decaimiento en guayabo. *Nematologia Mediterranea* 27: 79-82.

Sugawara K, Kobayashi K, Ogoshi A, 1997. Influence of the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) on the incidence of brown stem rot in soybean and adzuki bean. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 1491–8.

Van Gundy, S.D. & P.H. Tsao. 1963. Growth reduction of citrus seedlings by *Fusarium solani* as influenced by the citrus nematode and other soil factors. *Phytopathology* 53: 488-489.

Ventura JA, 1983. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados. Parte II - chaves para identificação. *Revisão anual de Patologia de Plantas* 8: 303-338.

Yang B and Eisenback JD, 1983. *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising pacara earpod tree in China. *Journal of Nematology* 15: 381–391.

Yeboah, M.A. & Y. Opoku-Asiamah. 2004. Effect of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium solani* on the growth and yield of three tomato cultivars. *Acta Horticulturae* 635: 175-182.

Webster JM, 1985. Interactions of *Meloidogyne* with fungi on crop plants. In: JN Sasser, CC Carter (eds) *An Advanced Treatise on Meloidogyne*, vol. 1 – Biology and Control. Raleigh, University of North Carolina Department of Plant Pathology and USAID., pp 183-192.

**3.3 O declínio da goiabeira: papel dos exsudados radiculares de plantas parasitadas por *Meloidogyne enterolobii* sobre *Fusarium solani*, in vitro.**

Vicente M. Gomes, Ricardo M. Souza, Silvaldo F. Silveira, Alexandre M. Almeida

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro/CCTA/LEF. Av. Alberto Lamego, 2000, 28015-620, Campos dos Goytacazes (RJ), Brasil. Autor para correspondência: [ricmsouza@censanet.com.br](mailto:ricmsouza@censanet.com.br)

**Resumo** O declínio da goiabeira, causado pela interação entre *Meloidogyne enterolobii* e *Fusarium solani*, tem causado prejuízos diretos e indiretos a toda cadeia produtiva de goiaba. Neste trabalho objetivou-se estudar os mecanismos de interação *M. enterolobii* e *F. solani* no declínio da goiabeira. Um ensaio com plantas de goiabeira com raízes distribuídas em dois vasos separados, inoculadas separadamente com o fungo e/ou o nematoide, não foi detectado efeito sistêmico do parasitismo do nematoide que causasse a suscetibilidade da planta à podridão radicular causada pelo fungo. Estudou-se também o efeito *in vitro* de exsudados radiculares de goiabeiras, parasitadas ou não por *M. enterolobii*, sobre a morfofisiologia de *F. solani*. Exsudados radiculares de plantas parasitadas aumentaram ( $P < 0,01$ ) a taxa de crescimento micelial, a massa seca e o número de estruturas reprodutivas (macro e microconídios e clamidósporos) de *F. solani*, em comparação com exsudados radiculares de plantas não parasitadas. Realizou-se também um ensaio em caixas tipo Gerbox<sup>®</sup> com papel Germiteste<sup>®</sup> utilizando-se plântulas de goiabeira irrigadas com exsudados radiculares de plantas parasitadas ou não por *M. enterolobii*. Na presença de exsudados coletados de plantas não parasitadas, as plântulas se desenvolveram normalmente, ao passo que na presença de exsudados de plantas parasitadas por *M. enterolobii*, *F. solani* foi capaz de infectar e necrosar as raízes das plântulas, além de reduzir ( $P < 0,01$ ) o peso total do sistema radicular. Conclui-se, portanto, um efeito local dos exsudatos radiculares de plantas parasitadas por *M. enterolobii* na patogenicidade de *F. solani* às raízes de goiabeira.

Palavras-chave goiabeira, nematoide das galhas, exsudados radiculares, etiologia, doença complexa.

**ABSTRACT** The guava decline caused by the interaction between *Fusarium solani* and *Meloidogyne enterolobii* has caused direct and indirect damage to the entire production chain of guava. This work aimed to study the mechanisms of interaction *M. enterolobii* and *F. solani* in the guava decline. A test of guava plants with roots divided into two separate vessels, separately inoculated with the fungus and / or the nematode did not detect a systemic effect of the parasitic nematode that causes the plant susceptibility to root rot caused by fungus. Was also studied *in vitro* the effect of guava root exsudates, or not parasitized by *M. enterolobii* on the morphology and physiology of *F. solani*. Root exsudates of plants infested increased (P <0.01) the rate of mycelial growth, dry mass and number of reproductive structures (macro and microconidia and chlamydospores) of *F. solani*, root exsudates compared to non-infested plants. There was also a test boxes with paper Germiteste type gerbox ® using guava seedlings irrigated with plant-root exsudates or not parasitized by *M. enterolobii*. In the presence of exsudates collected from non-infested plants, seedlings developed normally, whereas in the presence of exsudates of plants infested by *M. enterolobii*, *F. solani* was able to infect and necrotic roots of seedlings, and reduce (P <0.01) the total weight of the root system. We conclude, therefore, a local effect of root exsudates of plants infested by *M. enterolobii* the pathogenicity of *F. solani* to the roots of guava.

Keywords: guava, root-knot nematode, root exsudation, *Psidium guajava*, etiology, *Meloidogyne enterolobii*, complex disease.



## INTRODUÇÃO

Goiabeiras (*Psidium guajava* L.) (Myrtaceae) são robustas plantas frutíferas que se originaram nos trópicos americanos e são distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo. No Brasil, a colheita da goiaba gera cerca de 43 milhões de dólares por ano, afetando as cadeias produtivas na indústria de máquinas, pesticidas e fertilizantes. Esta cultura também tem um impacto social importante na medida em que fortalece a agricultura familiar envolvendo pomares de 3 a 5 hectares (ha) (Natale *et al.*, 1996;. Rosane e Couto, 2003;. IBGE, 2006).

No Estado do Rio de Janeiro (Brasil), o declínio da goiaba é a principal doença da cultura (Gomes *et al.*, 2011). Nesta doença complexa, o parasitismo por *Meloidogyne enterolobii* predispõe árvores de goiabeiras imunes a *Fusarium solani* à extensa podridão radicular causada por este fungo, o que leva a perdas de rendimento e morte da planta em poucos meses. O caráter sinérgico desta doença é reforçado pelos resultados de experimentos em microparcela que indicam que *M. enterolobii* é um patógeno pouco agressivo para goiabeira por conta própria (Gomes *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2011). Ensaio em câmara de crescimento utilizando isolados do fungo de diferentes regiões do Brasil confirmaram que o declínio da goiabeira é o responsável pela destruição de âmbito nacional de cerca de 5.000 ha de pomares de goiaba (VM Gomes, UENF, inédito). Isto resultou em um impacto econômico direto aos produtores estimado em mais de \$ 70 milhões de dólares (Pereira *et al.*, 2009).

Doenças da raiz estão entre as principais causas de redução da produção em culturas agrícolas (Hillocks 1986). Estas doenças são menos estudadas do que aquelas que afetam a parte aérea das plantas, devido à complexidade dos fatores envolvidos na interação patógeno-hospedeiro-ambiente. De fato, em doenças do sistema radicular os aspectos dinâmicos bióticos e abióticos do solo, influência da planta, epidemiologia e sintomas da doença têm grande importância. Por exemplo, doenças complexas envolvendo fungos de solo e fitonematoides fatores como a espécie do fungo e do nematoide; nível de inóculo; estágio fenológico das plantas; resistência e / ou tolerância a quaisquer patógenos habitantes do solo e outras

características físico-químicas do solo são alguns dos componentes que interagem (Back, et al 2002).

Grande número de compostos orgânicos, incluindo carboidratos, aminoácidos e ácidos orgânicos são liberados pelo sistema radicular (Bowen & Rovira, 1991; Bertin *et al*, 2003). Estes compostos podem ser separados em três grandes grupos: compostos de alto peso molecular (mucilagem e ectoenzimas), compostos de baixo peso molecular (exsudados livres) e lisatos. A composição química e a quantidade de exsudados da raiz podem mudar em resposta a fatores bióticos e abióticos. Por exemplo, muitos fungos de solo e nematoides parasitas de plantas sobrevivem no solo em estado quiescente, e eles são ativados por exsudados de raiz. Sua atividade, por sua vez, como patógenos biotróficos ou saprófitos, pode alterar a composição do exsudado da raiz (Nelson, 1990; Bowen & Rovira, 1991).

Este trabalho relata as primeiras tentativas para caracterizar a interação entre *M. enterolobii* e *F. solani* no declínio da goiabeira. Considerando-se que este fungo é capaz de atacar e causar decomposição apenas em raízes de goiabeira parasitadas por *M. enterolobii*, pressupõem que essa interação seja mediada por i) fator sistêmico induzido pelo nematoide, capaz de desativar a imunidade das plantas de goiabeira a *F. solani* e / ou ii) mudanças induzidas pelo nematoide nos exsudados de raiz que permitem *F. solani* invadir as raízes e coloniza-las.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Ensaio com plantas com sistema radicular bipartido:**

Mudas de goiabeira cv Paluma (suscetível ao declínio da goiabeira) produzidas a partir de estacas foram transplantadas no estádio de quatro pares de folhas para potes de plástico cheios de areia lavada e autoclavada, de modo que o sistema radicular fosse dividido em duas metades. Quatro tratamentos foram avaliados: i) as duas metades do sistema radicular não inoculadas; ii) metade foi inoculada com 2.000 ovos e juvenis de segundo estádio de *M. enterolobii* (J2) e a outra metade permaneceu sem inoculação; iii) metade foi inoculada com 5 g de

grãos de trigo colonizados com *F. solani* isolado UENF / CF 163 (Burgess *et al*, 1994.), e o outra permaneceu sem inoculação; iv) metade foi inoculada com o nematoide (mesmo inóculo), e a outra metade foi inoculada três semanas depois, com *F. solani* UENF / CF 163 (mesmo inóculo). O inóculo do nematoide foi obtido a partir de plantas de tomate cultivadas em estufa, e aplicado 15 ml da suspensão que foi misturada a areia. O isolado de *F. solani* empregado neste experimento foi patogênico para mudas de goiabeiras na presença do nematoide em experimentos de microparcela e em estacas de goiabeira em condições de câmara de crescimento (Gomes *et al*, 2011; Gomes VM, UENF, inédito). Os grãos de trigo colonizados pelo fungo foram incorporados a areia a uma profundidade de cerca de 10 centímetros.

Esses tratamentos foram dispostos em um padrão inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento. Durante o experimento, as plantas foram regadas quando necessário e na estufa à temperatura média alta e média baixa do ar foi de 36°C e 21°C, respectivamente. Cento e vinte dias após a inoculação do fungo, as seguintes variáveis foram avaliadas: massa fresca da parte aérea (g) e volume de raiz (total, saudável e necrosado) de cada metade por planta. O volume (cm<sup>3</sup>) foi obtido através da imersão das raízes em cilindro graduado com água, observando o deslocamento de água no cilindro. Os dados originais (não transformados) foram submetidos à ANOVA e as médias foram comparadas através de teste de Tukey a 5%. Este experimento foi repetido uma vez.

## **Ensaio *in vitro* com exsudados de raízes de goiabeiras**

### **Produção de mudas e inoculação**

Mudas de goiabeira 'Paluma' foram produzidas a partir de estacas em sacos plásticos cheios de substrato Plantmax®. Na fase de dois pares de folhas, as mudas foram transferidas para tubetes de plástico contendo 100 cm<sup>3</sup> de areia lavada e autoclavada. No fundo aberto dos tubetes foram colocadas buchas de algodão como filtro. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento com 12 h-fotoperíodo dia / noite e temperaturas de 25/23°C, respectivamente, e regadas com água

destilada estéril. Metade das plantas foi inoculada com 2.000 ovos e J<sub>2</sub> de *M. enterolobii* obtidos como descrito anteriormente e a outra metade permaneceu sem inoculação.

### **Coleta de exsudato da raiz**

Três meses após a inoculação das plantas com nematoide a rega dos tubetes foi suspensa por 72 h para aumentar a exsudação radicular (Rovira, 1969). Cada tubete, com planta saudável ou inoculada com *M. enterolobii* foi então irrigado com 50 ml de água destilada estéril, o que resultou em cerca de 10 ml de exsudado percolado e coletado por tubete. O exsudado de plantas saudáveis ou inoculadas foi agrupado separadamente em frascos de vidro estéril. Os exsudados foram passados duas vezes por papel de filtro Whatman® n° 1 e com a ajuda de uma bomba de vácuo, através de filtro de membrana Millipore® (diâmetro dos poros de 0,22 mm) utilizando-se sistema de filtração a vácuo TTP® (Suíça). Os recipientes TTP® esterilizados foram fechados com os exsudados e mantidos em refrigerador a 4 °C. As coletas de exsudados foram realizadas a cada 15 dias e agrupadas nos mesmos recipientes estéreis. O exsudato estéril foi mantido em geladeira por não mais que 90 dias, antes de ser utilizado nos ensaios *in vitro*.

### **Efeito de exsudados radiculares de mudas de goiabeira na produção de propágulos e sobre o crescimento radial de *F. solani* em meio sólido**

Placas de Petri estéreis (7 cm de diâmetro) receberam cerca de 20 ml de meio ágar-água, 1,5% que foi preparado por meio de: i) apenas água destilada (tratamento 1) ou ii) água destilada e exsudado radicular de plantas livres de nematoides, na proporção de 3:1 (tratamento 2) ou iii) água destilada e exsudado radicular de plantas parasitadas por *M. enterolobii*, na proporção de 3:1 (tratamento 3). Nos tratamentos 2 e 3, o exsudado estéril foi adicionado ao meio pouco antes deste ser vertido nas placas de Petri, em ambiente aséptico. Um disco (0,5 cm diâm) de cultura de 2 dias em BDA do isolado de *F. solani* UENF / CF 163 foi transferido para

o centro das placas de Petri, incubando-se em câmara de crescimento, a  $25^{\circ} \text{C} \pm 2$ , sob 12 h de fotoperíodo.

Para a medição do crescimento radial, dez placas de Petri foram utilizadas por tratamento, casualizadas na câmara de crescimento. O crescimento radial foi medido diariamente do segundo ao sétimo dia de incubação, e expresso como diâmetro final e taxa diária de crescimento (ambos em mm). Para a primeira variável, os dados originais foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Para a taxa diária de crescimento, os dados foram submetidos à análise de regressão. Este ensaio foi repetido uma vez.

Para a quantificação de propágulos (macro e microconídios e clamidósporos), cinco placas de Petri foram utilizadas por tratamento, que foram dispostas na câmara de crescimento de uma maneira totalmente aleatória. Sete dias após a inoculação do fungo, 20 ml de água destilada estéril foi adicionado a cada placa de Petri, e os propágulos foram coletados com o auxílio de uma alça de Drigalski. Três alíquotas de 0,1 ml foram utilizadas para contar os propágulos em uma câmara de Neubauer. Os dados originais foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Este ensaio foi repetido uma vez.

### **Efeito de exsudados radiculares de mudas de goiabeira sobre o crescimento micelial de *F. solani* em meio líquido**

Um disco (Diam 0,5 cm) de meio de cultura ágar-água de *F. solani* (isolado UENF / CF 163) foi colocado em Erlenmeyers estéreis com capacidade para 150 ml contendo 100 ml de: i) de água destilada estéril (tratamento 1) ou ii) 100 ml de exsudado de plantas livres de nematoides (tratamento 2) ou iii) 100 ml de exsudado de plantas parasitadas por nematoide (tratamento 3). 0,5 g de ágar foram adicionados em todos os tratamentos. Os Erlenmeyers foram incubados a  $25^{\circ} \text{C} \pm 2$  e 12 h-fotoperíodo, durante sete dias, sob agitação contínua (50 rpm) em um agitador orbital modelo TE420 Tecnal ®. Oito Erlenmeyers foram incubados para cada tratamento, dispostos em uma forma casualizada no agitador.

No sétimo dia, o micélio de cada Erlenmeyer foi separado do líquido por filtração a vácuo em funnil Buchner, utilizando um filtro de papel Whatman # 1. Para

determinar o peso do micélio de cada erlenmeyer, antes da filtração o papel de filtro foi seco a 105 ° C por 24 horas e pesado. Após filtração, o papel de filtro foi seco novamente sob as mesmas condições e a diferença de peso foi expresso em massa seca micelial (g). Os dados originais foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Este ensaio foi repetido uma vez.

### **Experimentos de germinação de esporos de *F. solani***

A germinação conidial foi testada na presença de exsudados de raízes coletadas de mudas de goiabeira não inoculadas e de mudas de goiabeiras inoculadas com *M. Enterolobii*. Como controle positivo foi utilizado caldo Czapek Dox e como controle negativo apenas água esteril. O ensaio de germinação foi realizado em placas de cultura esteril (24 poços, TPP®. 92024, Suíça). Os exsudados foram testados na concentração de 25%, (alíquotas de 300 ul de exsudados foram misturadas com 700 ul de água esteril e com 200 ul de suspensão conidial aquosa); incubados a 24 ° C no escuro, sob agitação a 100 rpm. Após 3 h foi adicionado azul de algodão, lactofenol e a germinação conidial foi determinada pela contagem microscópica de 200 conídios / poço. O conídio foi considerado germinado quando houve emissão do tubo germinativo. Os experimentos de germinação foram realizados com seis repetições por tratamento e com uma repetição do ensaio no tempo.

### **Efeito de exsudados radiculares sobre a patogenicidade de *F. solani* a plântulas de goiabeira.**

#### **Ensaio 1**

Plântulas de goiabeiras 'Paluma' foram obtidas a partir de sementes germinadas em areia esteril em câmara de crescimento. As plântulas foram lavadas em água destilada esteril e desinfestadas em solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1%, por 3 min, seguido de tríplice lavagem em água destilada esteril. As plântulas foram então colocadas sobre duas folhas de papel de germinação de sementes estéreis Germitex ® em caixas de polietileno estéreis (gerbox ®). As mudas foram

incubadas em câmara de crescimento a 25 ° C e 12 h-fotoperíodo, com uma iluminação de 35  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas Grow-Lux ®. As mudas foram regadas diariamente com cerca de 5 ml de: i) água destilada estéril ou exsudato da raiz ii) (ver tratamentos abaixo). As mudas permaneceram: i) não inoculadas ou ii) inoculadas com um disco de cultura de ágar-água (0,5 diam cm) colonizado pelo isolado de *F. solani* UENF / CF 163 posicionado na região do colo da muda (ver tratamentos). O efeito dos seguintes tratamentos foi avaliado: i) a rega das mudas não inoculadas com água destilada estéril; ii) a rega das mudas não inoculadas com o exsudato da raiz de plantas sem nematoide; iii) a rega das mudas não inoculadas com o exsudato da raiz de plantas parasitadas por *M. enterolobii*; iv) rega com água e inoculadas com *F. solani*; v) rega com exsudato coletado de raízes de plantas livres do nematoide e inoculadas com *F. solani*; vi) rega com exsudato coletado de raízes de plantas parasitadas por *M. enterolobii* e inoculadas com *F. solani*. Seis repetições (caixa de plástico com cinco mudas cada) foram testadas para cada tratamento, que foram dispostos de forma casualizada em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12h.

Quinze dias após a inoculação do fungo as raízes das mudas foram examinadas sob um microscópio de luz e os segmentos necrosados foram separados. A massa fresca (g) foi determinada para todo o sistema radicular, bem como a massa de raízes saudáveis e necrosadas. Os dados originais foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Este ensaio foi repetido uma vez.

## Ensaio 2

Plântulas de goiabeira 'Paluma' foram obtidas a partir de sementes germinadas em areia estéril em câmara de crescimento. As plântulas foram lavadas em água destilada estéril e desinfestadas superficialmente em solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1% por 3 min, seguido de tríplice lavagem em água destilada estéril. As plântulas foram então transplantadas individualmente para tubos de ensaio contendo areia esteril. As plântulas foram colocadas em câmara de crescimento a 25 ° C e 12 h-fotoperíodo, com uma iluminação de 35  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas Grow-Lux ®. As plântulas foram regadas diariamente com cerca de 5 ml de: i) água destilada estéril ou com exsudado coletados a partir de plantas livres de

nematoides *in natura* - (NF) ou liofilizado - (NFL), ou com exsudados radiculares coletados de plantas de goiabeira parasitadas por *Meloidogyne enterolobii in natura* - (ME) ou liofilizado - (MEL) (ver tratamentos abaixo). As mudas permaneceram: i) não inoculadas ou ii) inoculadas (F) com um disco de meio de cultura ágar-água (0,5 cm diam) colonizado pelo isolado de *F. solani* UENF / CF 163 posicionado na região do colo da muda (ver tratamentos). Os seguintes tratamentos foram avaliados: i) água destilada estéril; ii) NF, iii) NFL, iv) ME, v) MEL, vi) água destilada estéril + F; vii) NF + F, viii) NFL + F, ix) ME + F, e x) MEL + F. Seis repetições (5 plântulas compondo cada unidade experimental) foram testadas para cada tratamento, as parcelas foram dispostas de forma aleatória em BOD, a 25 °C, com fotoperíodo de 12h.

Quinze dias após a inoculação do fungo as raízes das plântulas foram examinadas sob um microscópio de luz e os segmentos necrosados foram separados. A massa fresca (g) foi determinada para a parte aérea e todo o sistema radicular, bem como a massa de raízes saudáveis e necrosadas. Os dados originais foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Este ensaio foi repetido uma vez.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Gomes *et al.* (2011), estabeleceram em experimentos de microparcela que o parasitismo por *M. enterolobii* é necessário para que ocorra a invasão e colonização das raízes de goiabeira por *F. Solani*, não sendo observado extensas podridões radiculares em plantas parasitadas apenas pelo nematoide, nem em plantas inoculadas apenas com o fungo, com ou sem lesão das raízes. No presente trabalho, o experimento com raízes bipartidas, realizado duas vezes, não mostrou nenhuma evidência de um fator translocado sistemicamente que pode estar envolvido na podridão da raiz (Tabela 1; Fig. 1).





Figura 1 - Sistema radicular de plantas de goiabeira cujas raízes foram divididas em dois vasos de plástico e, separadamente, inoculadas com 2.000 ovos e  $J_2$  de *M. enterolobii* e / ou 5 g de grãos de trigo colonizados por *F. solani* isolado UENF / CF 163. A) ambas as metades do sistema radicular não inoculadas; B) inoculadas com nematoide / não inoculadas; C) ;inoculadas com *M. enterolobii* / inoculadas com *F. solani*. D) inoculadas com o fungo / não inoculadas

Tabela 1 - Efeito de *Meloidogyne enterolobii* e *Fusarium solani* nas raízes e no desenvolvimento da parte aérea das plantas de goiabeira com sistema radicular dividido em dois vasos plásticos (I e II), em casa de vegetação inoculados com 2.000 ovos e J<sub>2</sub> de *Meloidogyne enterolobii* e / ou 5 g de grãos de trigo colonizados por *Fusarium solani* isolado UENF / CF 163. A avaliação ocorreu 120 dias mais tarde.

| Tratamentos aplicados ao sistema radicular |                       | Massa fresca parte aérea (g) | Volume radicular(cm <sup>3</sup> ) <sup>1</sup> |       | Massa fresca radicular (g) |       |
|--|-----------------------|------------------------------|---|-------|----------------------------|-------|
| I  | II                    |                              | I   | II    | I                          | II    |
| Não inoculado                              | Não inoculado         | 130.6a                       | 25.8a   | 24.4a | 27.8a                      | 28a   |
| Não inoculado                              | <i>M. enterolobii</i> | 118.9a                       | 20.8a   | 20.4a | 23.2a                      | 26.9a |
| Não inoculado                              | <i>F. solani</i>      | 125.5a                       | 20.8a   | 24a   | 22.8a                      | 22.5a |
| <i>M. enterolobii</i>                      | <i>F. solani</i>      | 122.8a                       | 18.6a   | 23.6a | 25.6a                      | 28.4a |
| CV%  |                       | 13.4                         | 26.2  | 26.2  | 26.6                       | 26.6  |

<sup>1</sup> Medido através do deslocamento de água em proveta graduada no laboratório. Valores são média de dois experimentos, cada um com seis repetições (plantas) por tratamento. Valores seguidos pela mesma letra na coluna não são diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5%.

Nenhuma podridão radicular ocorreu, nem houve redução no sistema radicular nem no desenvolvimento da parte aérea das plantas inoculadas com *F. solani* isoladamente ou concomitantemente com *M. enterolobii*. Isto sugere a necessidade do nematoide e do fungo estarem fisicamente próximos para que ocorra o declínio da goiabeira, independente do(s) mecanismo (s) envolvido(s) nesta interação sinérgica. A proximidade espacial parece ser necessária em outras interações envolvendo fungos e nematoide; como o nematoide dos cistos e *Verticillium dahliae* em batata e *Meloidogyne incognita* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *coffea* em café (Evans K, 1987, Negrón e Acosta, 1989), enquanto fator (es), sistêmico (s) estão envolvidas em outras interações, como *Rhizoctonia solani* e o nematoide-das-galhas (Van Gundy *et al* 1977).

Baseado neste experimento preliminar com mudas com sistema radicular dividido, a hipótese de que pelo menos três mecanismos, agindo localmente sozinhos ou combinados, podem estar envolvidos no declínio da goiabeira: i) o parasitismo do nematoide altera a fisiologia da raiz nas proximidades, impossibilitando mecanismo de resistência (s) dos tecidos da raiz para invasão do fungo; ii) a invasão das raízes e dos tecidos das galhas das raízes ricos em nutrientes, favorecem a colonização de fungos e deterioração subsequente; iii) o parasitismo da planta pelo nematoide altera a composição química de exsudados radiculares, que de alguma forma permitem que o fungo invada as raízes. No presente trabalho, os ensaios subsequentes foram definidos para investigação da terceira hipótese.

Quando adicionado ao meio sólido, o exsudado de plantas parasitadas por *M. enterolobii* não teve efeito sobre o crescimento micelial radial de *F. solani* (isolado UENF/CF163) com medições feitas entre o segundo e o sétimo dia após a incubação, em comparação com exsudado de plantas sem o nematoide ou o controle com água destilada (curvas de regressão não mostradas). Os três tratamentos apresentaram um crescimento radial máximo de 60 mm, e taxa média de crescimento de 7,4, 7,8 e 9,1 mm / dia, respectivamente (não significativo de  $P < 0,05$ ). Curiosamente, a densidade das colônias de fungos foi muito diferente (Fig. 2A-C).

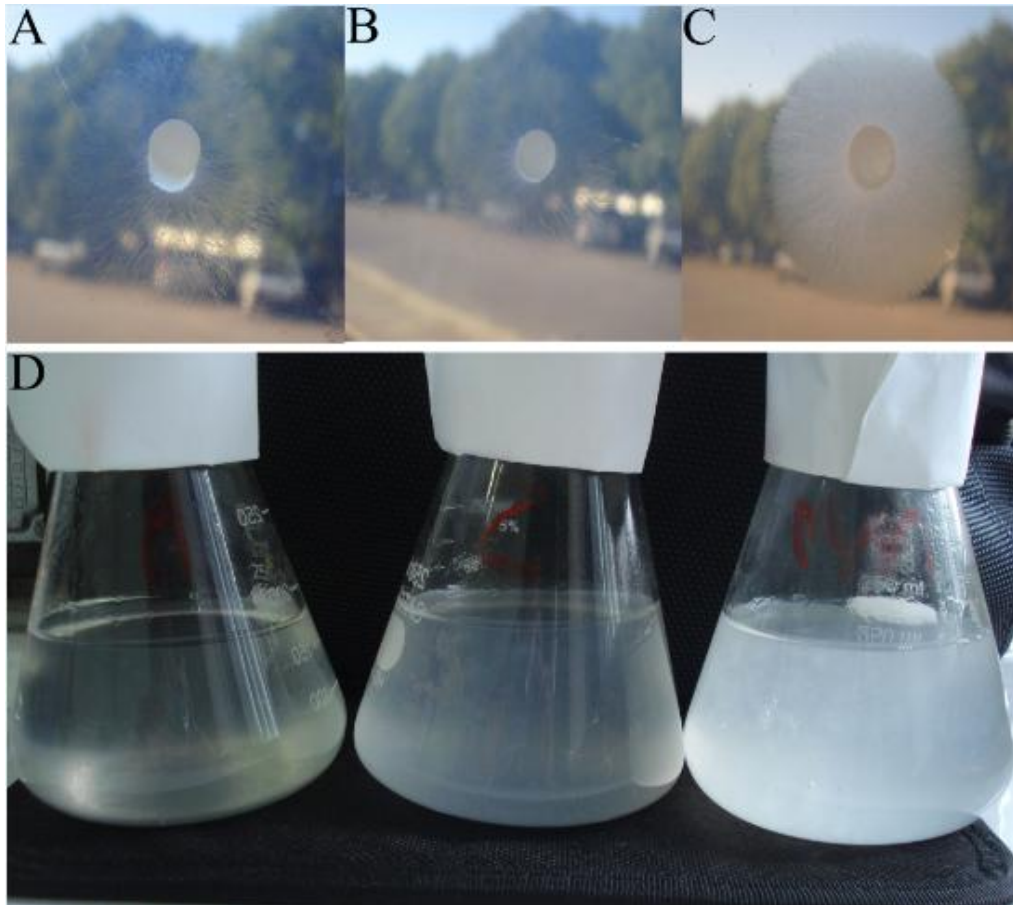


Figura 2 - Efeito do exsudado de raízes de goiabeiras coletados de plantas parasitadas por *Meloidogyne enterolobii* - (ME) ou a partir de plantas livres de nematoides - (NF) na densidade da colônia de *Fusarium solani* em placas de Petri (A-C) e na densidade do crescimento micelial em meio líquido (D). A-C): Da esquerda para a direita, meio preparado apenas com água, NF ou ME em 25%. D): Da esquerda para a direita, 0,5% de ágar meio líquido, preparado com água, NF ou ME .

Isto sugere que as diferentes estruturas do fungo podem ser produzidas na presença de exsudados da raiz de plantas parasitadas por *M. enterolobii*. De fato, quando adicionado ao meio sólido a 25%, o exsudato de plantas parasitadas por *M. enterolobii* induziu o isolado de *F. solani* UENF / CF 163 a produzir significativamente ( $P < 0,05$ ) mais propágulos, em comparação com exsudado de plantas sem nematoide ou água (Tabela 2). Além disso, exsudado de plantas parasitadas por *M. enterolobii* apoiou de forma significativa ( $P < 0,05$ ) maior crescimento micelial em

meio líquido, em comparação com exsudado de plantas sem o nematoide ou o controle com água (Tabela 2; Fig. 2D).

Entretanto, a taxa de germinação de esporos de *F. solani* não sofreu influência dos diferentes exsudados quando comparados ao controle negativo tratado com água destilada esterelizada (Tabela 2). Já a taxa de germinação do tratamento com o caldo Czapek Dox controle positivo foi superior aos demais tratamentos ( $P < 0.05$ ). Resultados encontrados em trabalho de He *et al.* (2001), observaram que não houve nenhum efeito de exsudados radiculares de *Asparagus officinalis*, sobre a germinação de esporos de *F. oxysporum* f.sp. asparagi.

Extensos estudos por Snyder e colaboradores sobre o papel de exsudados de plantas sobre a germinação de clamidósporos de *F. solani* f. sp phaseoli sugerem que o equilíbrio entre a quantidade de fungistáticos e nutrientes fornecidos pela exsudação das plantas regula a germinação.

Tabela 2 - Efeito dos exsudados radiculares coletados de plantas de goiabeira parasitadas por *Meloidogyne enterolobii* - (ME) ou a partir de plantas livres de nematoides - (NF) sobre a produção de propágulos e crescimento micelial do isolado de *Fusarium solani* UENF / CF 163. A produção de propágulos foi medida em meio sólido ágar-água 1,5% em que ME ou NF foi adicionado a 25%. O crescimento micelial foi medido no meio líquido com ágar a 0,5 % em que foi usada a água destilada, ME ou NF.

| Tratamentos              | Número de propágulos <sup>1</sup> (x10 <sup>6</sup> ) |
|--------------------------|---|
| Água                     | 9.3b  |
| 25% NF-75% água          | 10.3b   |
| 25% ME-75% água          | 57a   |
| CV%                      | 8.7   |
| Massa seca micelial (mg) |   |
| Água                     | 42c   |
| NF apenas                | 86.8b   |
| ME apenas                | 149a  |
| CV%                      | 13.2  |
| Germinação de esporos    |   |
| Água                     | 159.6b  |
| 25% NF-75% água          | 159.3b  |
| 25% ME-75% água          | 166.5b  |
| Meio Czapek              | 179.3a  |
| CV%                      | 5.4   |

<sup>1</sup> = propágulos macro e microconídios e clamidospores. Para o número de propágulos, os valores são a média de dois ensaios, cada um com cinco placas de Petri, por tratamento. Para a massa seca micelial, os valores são a média de dois ensaios, cada um com oito frascos Erlenmeyers por tratamento. A germinação de esporos feita pela contagem de 200 esporos. Valores seguidos por letras diferentes na coluna são significativos P <0,05 de acordo com o teste de Tukey.

Estes resultados sugerem que alterações quantitativas e / ou qualitativa ocorrem no exsudado radicular de plantas de goiabeira sobre parasitismo por *M. enterolobii*, podendo ativar prováveis vias bioquímicas no fungo para aumentar a produção de propágulos e aumento do potencial de inóculo, o que poderia fragilizar a resistência das plantas localmente.

Muitas podridões radiculares causadas por fungos patogênicos habitantes do solo dependem do potencial de inóculo para que ocorra a doença. Os exsudados radiculares têm efeitos diretos sobre o potencial de inóculo, fornecendo uma fonte temporária de nutrientes, permitindo o fungo vegetar e aumentar a capacidade de infectar o hospedeiro. Usando a definição de Garrett 1960, potencial de inóculo como a energia de crescimento de um patógeno disponível para a infecção do hospedeiro na superfície do órgão infectado, sendo um pré-requisito para o desenvolvimento de muitas doenças. No caso das fusarioses, um potencial de inóculo adequado envolveria em parte uma alta densidade de propágulos nas proximidades do hospedeiro (Schroth & Hildebrand 1964).

Os resultados obtidos dão suporte a esta hipótese, pois os exsudados radiculares de mudas de goiabeiras parasitadas por *M. enterolobii* estimularam a taxa de crescimento de *F. solani*, maior número de propágulos (macro e microconídios e clamidósporos), sendo possível observar o crescimento do micélio fúngico em direção à raiz de plântulas de goiabeira nos ensaios *in vitro*. Schroth e colaboradores têm sugerido que as plantas doentes podem, ocasionalmente, ser mais suscetíveis à infecção por outros patógenos por causa do aumento da exsudação que fornece um ambiente nutricional favorável para seu desenvolvimento. Como demonstrado em trabalhos de Van Gundy *et al.* (1977) para podridão de raízes causada por *Rhizoctonia solani* Kuhn em tomate. Os autores atribuíram a modificação dos exsudados radiculares, evidenciado por uma alta concentração de compostos nitrogenados nas raízes infectadas, ser mais favorável à virulência do fungo. Trabalhos de Wang e Bergeson (1974) sugeriram que as mudanças na concentração total de açúcar na seiva do xilema, contribuem para o reforço da murcha de *Fusarium oxysporum* em tomateiro.

No ensaio realizado duas vezes em gerbox ®, e em tubos de ensaio, o isolado de *F. solani* UENF / CF 163 foi patogênico a mudas de goiaba apenas quando exsudados de plantas parasitadas por *M. enterolobii* foram utilizados para a rega (Tabela 3 e 4).

**Tabela 3** - Efeito dos exsudados radiculares coletados de plantas de goiabeira parasitadas por *Meloidogyne enterolobii in natura* - (ME) ou liofilizado – (MEL) ou a partir de plantas livres de nematoides *in natura* - (NF) ou liofilizado - (NFL) na patogenicidade de *Fusarium solani* isolado UENF/CF 163, as mudas de goiabeira foram mantidas em gerbox ®. As mudas foram regadas com água destilada estéril, ME, MEL, NF ou NFL, e o fungo foi inoculado pela adição de disco de meio de cultura ágar-água (0,5 cm diâm.) colonizado por *Fusarium solani* isolado UENF/CF 163 posicionado na região de colo da muda. Todos os valores são em massa fresca (mg)

| Plântulas de goiabeira    | Peso aéreo | peso total radicular | peso sadio radicular | Peso necrosado |
|---------------------------|------------|----------------------|----------------------|----------------|
| Água destilada (controle) | 140a       | 31a                  | 31a                  | 0b             |
| Exudado NF                | 135a       | 31a                  | 31a                  | 0b             |
| Exudado NFL               | 122b       | 26ab                 | 26ab                 | 0b             |
| Exudado ME                | 120bc      | 22b                  | 23b                  | 0b             |
| Exudado MEL               | 119c       | 26ab                 | 26ab                 | 0b             |
| Água destilada + fungo    | 120bc      | 27ab                 | 26ab                 | 0b             |
| Exudado NF + fungo        | 133ab      | 26ab                 | 27ab                 | 0b             |
| Exudado NFL+ fungo        | 129b       | 26ab                 | 26ab                 | 0b             |
| Exudado ME + fungo        | 48d        | 21bc                 | 6c                   | 12a            |
| Exudado MEL+ fungo        | 58d        | 17c                  | 5c                   | 16a            |
| CV%                       | 9.9        | 18.5                 | 20.5                 | 46.7           |

Os valores são média de dois ensaios, cada uma com cinco gerbox ® com cinco mudas por tratamento. Valores seguidos por mesma letra na coluna não são diferentes de acordo com o teste de Tukey a P <0,05



Os tratamentos com os diferentes exudados não sofreram influência do processo de liofilização, o que indica que o possível efeito do exsudado de plantas parasitadas por *M. Enterolobii*, não se desnatura quando exposto a variações de temperatura.

**Tabela 4** - Efeito dos exudados radiculares coletados de plantas goiabeira parasitadas por *Meloidogyne enterolobii* - (ME) ou a partir de plantas livres de nematoides - (NF) na patogenicidade de *Fusarium solani* isolado UENF/CF 163, as plântulas de goiabeira, mantidas em gerbox®. As plântulas foram regadas com água destilada estéril, ME ou NF, e o fungo foi inoculado pela adição de disco de meio de cultura ágar-água (0,5 cm diâm.) colonizado por *Fusarium solani* (isolado UENF/CF 163) posicionado na região do colo da plântula. Todos os valores são em massa fresca (mg)

| Plântulas de goiabeira    | Peso aéreo | peso total radicular | peso sadio radicular | Peso necrosado |
|---------------------------|------------|----------------------|----------------------|----------------|
| Água destilada (controle) | 141a       | 36a                  | 36a                  | 0b             |
| Exudado NF                | 143a       | 37a                  | 37a                  | 0b             |
| Exudado ME                | 150a       | 33a                  | 33a                  | 0b             |
| Água destilada + fungo    | 157a       | 36a                  | 36a                  | 0b             |
| Exudado NF + fungo        | 150a       | 36a                  | 36a                  | 0b             |
| Exudado ME + fungo        | 153a       | 24b                  | 13b                  | 11a            |
| CV%                       | 14.6       | 18.5                 | 23.6                 | 20.7           |

Os valores são a média de dois ensaios, cada uma com cinco gerbox® com cinco mudas por tratamento. Valores seguidos de mesmas letras na coluna não são diferentes de acordo com o teste de Tukey a  $P < 0,05$ .

A redução ( $P < 0,05$ ) da massa total de raízes ocorreu, juntamente com necrose de cerca de metade do sistema radicular (Fig. 3 e 4) o que apoia fortemente a hipótese de que no parasitismo por *M. enterolobii*, acarreta mudanças quantitativa e / ou qualitativa dos exudados das raízes e permite que o fungo invada e provoque

necroses do sistema radicular de plântulas de goiabeira. Em trabalhos de Nelson, 1990, exsudados radiculares são bem conhecidos em iniciar e modular as respostas de fungos nas sementes e nas raízes. Os tratamentos com os diferentes exsudados não sofreram influência do processo de liofilização, o que indica que o possível efeito do exsudado de plantas parasitadas por *M. Enterolobii*, não se desnatura quando exposto a variações de temperatura.

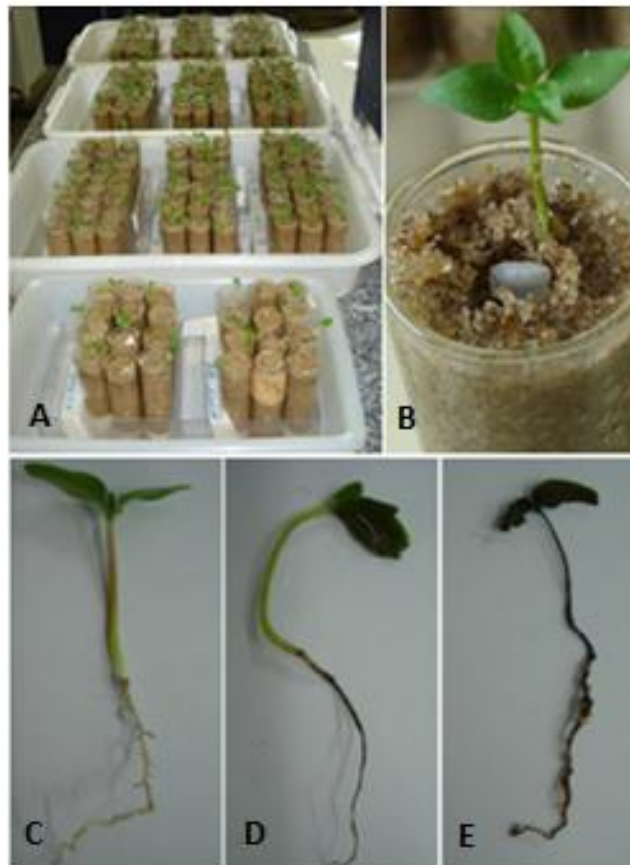


Figura 3 - Efeito dos exsudados radiculares coletados de plantas goiabeira parasitadas por *Meloidogyne enterolobii* - (ME) ou a partir de plantas livres de nematoides - (NF) na patogenicidade de *Fusarium solani* isolado UENF/CF 163. As plântulas de goiabeira foram mantidas em tubetes com areia estéril. As plântulas foram regadas com água destilada estéril, ME ou NF, e o fungo foi inoculado pela adição de disco de meio de cultura ágar-água (0,5 cm diâm.) colonizado por *Fusarium solani* isolado UENF/CF 163 posicionado na região do colo da plântula. A) Aspecto geral do ensaio; B) Detalhe da inoculação de plântulas com o fungo; C) mudas saudáveis; D, E) mudas com raízes necrosadas

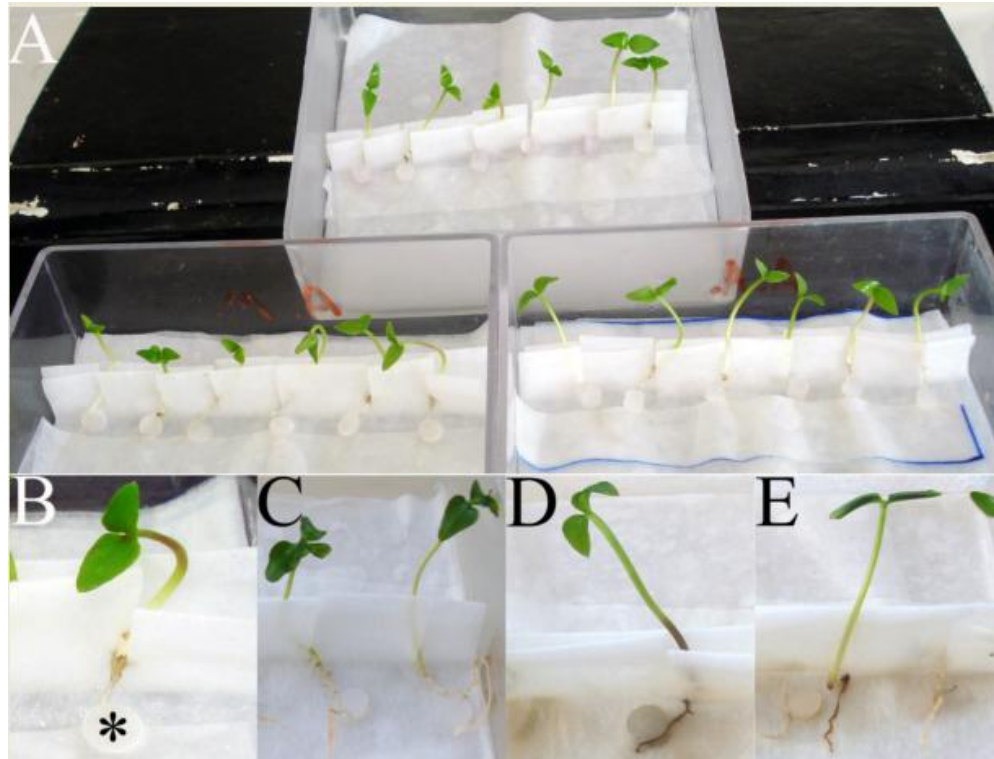


Figura 4 - Efeito dos exsudados radiculares coletados de plantas goiabeira parasitadas por *Meloidogyne enterolobii* - (ME) ou a partir de plantas livres de nematoides - (NF) na patogenicidade de *Fusarium solani* isolado UENF/CF 163, as plântulas de goiabeira foram mantidas em gerbox®. As plântulas foram regadas com água destilada estéril, ME ou NF, e o fungo foi inoculado pela adição de disco de meio de cultura ágar-água (0,5 cm diâm.) colonizado por *Fusarium solani* (isolado UENF/CF 163) posicionado na região do colo da plântula. A) Aspecto geral do ensaio; B) Detalhe da inoculação de plântulas (disco de cultura ágar-água) indicado por asterisco); C) mudas saudáveis; D, E) mudas com raízes necrosadas.

## REFERÊNCIAS

Almeida, E.J., J.M. Santos & A.B.G. Martins. 2009. Resistência de goiabeiras e araçazeiros a *Meloidogyne mayaguensis*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 44: 421-423.

- Almeida, A.M., Souza, R.M. & Gomes, V.M. 2011. Greenhouse and field assessment of rhizobacteria to control guava decline. *Bragantia*, in press.
- Back, M. A., Haydock, P. P. J. and Jenkinson, P. 2002. Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens *Plant Pathology* 51, 683–697
- Barker, K. R. 2003. Perspectives on plant and soil nematology. *Annual Review of Phytopathology*, v. 41, p. 1-25.
- Bergeson Gb, Van Gundy Sd, Thomason I J, 1970. Effect of *Meloidogyne javanica* on rhizosphere microflora and *Fusarium* wilt of tomato. *Phytopathology* 60, 1245–9.
- Bertin C, Yang X, & Wesron A. 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 256: 67-83.
- Bertin, C., Yang, X., & Weston, L. A. 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 256, 67–83
- Bowen, G.D. & Rovira, A.D. 1991. The rhizosphere. In: Waisel, Y., Eshal, A. & Kafkat, U. (Eds.) *Plant Roots*. New York. Marcel Dekker. p. 641-669.
- Burgess, LW. Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P., and Backhouse, D. 1994. *Laboratory Manual for Fusarium Research*. 3<sup>rd</sup> Department of Crop Sciences, University of Sydney.
- Burla, R.S., Souza, R.M., Gonçalves Jr.; E., Pereira, F.O.M. 2007. Reação de acessos de *Psidium* spp. a *Meloidogyne mayaguensis* In: XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Goiania, **Resumos**, *Nematologia Brasileira* 31 (2):127, 2007.
- COSTA, D.C. (2000) Doenças causadas por nematoides. In: CORDEIRO, Z.J.M. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. P. 66-77.

Evans, K., & P.P.J. Haydock. 1993. Interactions of nematodes with root-rot fungi. Pp. 104-133 in Khan M.W. (ed). Nematode Interactions. London, Chapman and Hall.

Evans, K., 1987. The interaction of potato cyst nematodes and *Verticillium dahliae* on early and main crop potato cultivars. Annals of Applied Biology 110: 329-339.

Ferraz, J.F.P. 1990. Importância e dinâmica do inóculo potencial dos fungos fitopatogênicos do solo. Summa Phytopathologica 16: 197-213.

Gomes VM, Souza RM, Mussi-Dias V, Silveira SF, Dolinski C, 2011. Guava Decline: A Complex Disease Involving *Meloidogyne mayaguensis* and *Fusarium solani*. Journal of Phytopathology, 159: 45-50.

Gomes VM, Souza RM, Corrêa FM, Dolinski C, 2010. Management of *Meloidogyne mayaguensis* in commercial guava orchards with chemical fertilization and organic amendments. Nematologia Brasileira 34: 23-30.

Gomes VM, Souza RM, Silva MM, Dolinski C, 2008. Caracterização do estado nutricional de goiabeiras em declínio parasitadas por *Meloidogyne mayaguensis*. Nematologia Brasileira, 32: 154-160

Gomes, V. M. 2007. Meloidoginose da goiabeira: estudos sobre a sua patogênese e formas de convívio com a doença no campo. Universidade Estadual do Norte Fluminense, 80p. Dissertacao de mestrado.

Hillocks Rj, 1986. Localised and systemic effects of root-knot nematode on the incidence and severity of Fusarium wilt in cotton. Nematologica 32, 202–8.

Manica, I.; Icumã, I.M.; Junqueira, N.T.V.; Salvador, J.O.; Moreira, A.; Malavolta, E. 2000. Fruticultura tropical: goiaba. Porto Alegre: Cinco Continentes,. 373p.

Natale, W.; Coutinho, E.L.M.; Boaretto, A.E.; Pereira, F.M. 1996. Goiabeira: calagem e adubação. Jaboticabal: FUNEP. 22p.

- Nelson, E.B. 1990. Exudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots. *Plant and Soil* 129: 61-73.
- Negron JA, Acosta N, 1989. The *Fusarium oxysporum* f.sp. *coffea*±*meloidogyne incognita* complex in 'Bourbon' coffee. *Nematropica* 19, 161-168
- Pereira, F.M., R.M. Souza, P.M. Souza, C. Dolinski & G.K. Santos. 2009. Estimativa do impacto econômico e social direto de *Meloidogyne mayaguensis* na cultura da goiaba no Brasil. *Nematologia Brasileira* 33: 176-181.
- Rovira, A.D. 1969. Plant root exudates. *The Botanical Review* 35:35-57.
- Rovira, A. 1969 Plant root exudates. *The botanical review* 35 (1) 17-34.
- Rozane, D.E.; Couto, F.A. D`A. 2003. Cultura da goiabeira: tecnologia e mercado. Viçosa: UFV, 402p.
- Schroth, M. N. & Hildebrand, D.C., 1964. Influence of plant exudates on root-infecting fungi. *A. Rev. Phytopath.* 2: 101-132.
- Steinkellner S, Mammerler R & Vierheilig H. 2008. Germination of *Fusarium oxysporum* in root exudates from tomato plants challenged with different *Fusarium oxysporum* strains *Eur J Plant Pathol.* 122: 395–401
- Van Gundy Sd, Kirkpatrick Jd, Golden J, 1977. The nature and role of metabolic leakage from root-knot nematode galls and infection by *Rhizoctonia solani*. *Journal of Nematology* 9, 113–21.
- Wang., E.L.H., E Bergeson, G.B. 1974. Biochemical in root exudate and xylem sap of tomato plants infected with *meloidogyne incognita*. *J. Nemstol.* 6: 194-202.

#### 4 CONCLUSÕES

No Estado do Rio de Janeiro, o declínio da goiabeira é uma doença complexa na qual o parasitismo por *Meloidogyne enterolobii* predispõe a planta à extensa podridão radicular causada pelo fungo *Fusarium solani*.

O declínio da goiabeira não é causado por *Meloidogyne enterolobii* sozinho, sendo *F. solani*, o agente que estende os danos às plantas.

A identificação em nível de espécie dos isolados de *Fusarium* sp. feita pela amplificação da região rDNA ITS corrobora com a identificação e apresenta homologia com a espécie *Fusarium solani*.

O declínio da goiabeira, causado pelo efeito sinérgico entre *M. enterolobii* e *F. solani*, é responsável pelo extermínio de extensos plantios de goiabeira em todo o Brasil.

Exsudados radiculares de plantas parasitadas por *M. enterolobii* aumentaram ( $P < 0,01$ ) a taxa de crescimento micelial, a massa seca e o número de estruturas reprodutivas (macro e microconídios e clamidósporos) de *F. solani*, em comparação com exsudados radiculares de plantas não parasitadas.

Na presença de exsudados coletados de plantas parasitadas por *M. enterolobii*, *F. solani* foi capaz de infectar e necrosar as raízes das plântulas de goiabeira; além de reduzir ( $P < 0,01$ ) a massa total do sistema radicular.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E.J., J.M. SANTOS & A.B.G. MARTINS. (2009). Resistência de goiabeiras e araçazeiros a *Meloidogyne mayaguensis*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 44: 421-423.

ALMEIDA, A.M., SOUZA, R.M. & GOMES, V.M. (2011) Greenhouse and field assessment of rhizobacteria to control guava decline. *Bragantia*, in press.

ABAWI, G.S.; CHEN, J. (1998). Concomitant pathogen and pest interactions. In: Barker, K.R.; Pederson, G.A. ; Windham, G.L. (Eds.) . Plant and nematode interactions. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, p. 135-158.

ACEVEDO, J.P.M., DOLINSKI, C. & SOUZA, R.M. (2006). Efeito negativo de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida) sobre a infecção de *Meloidogyne mayaguensis* em tomate. Resumos do XXVI Congresso Brasileiro de Nematologia, p. 63.

ANÔNIMO (2006). Praga gera forte queda no cultivo da goiaba. *Atualidades Agrícolas*, junho, p. 26.



ANTONELLI, M.; CAPPELLINI, P. (1996). Relationship between LAI and tree architecture in peach tree genotypes differing for habit. *Acta Hort.*, Avignon, n.416, p.155-161.

BACK, M. A., HAYDOCK, P. P. J. AND JENKINSON, P. (2002) Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens *Plant Pathology* 51 , 683–697

BATTEN, CK, POWELL NT, (1971). The Rhizoctonia–Meloidogyne disease complex in flue-cured tobacco. *Journal of Nematology* 3, 164–9.

BARBIERI, C. & CARVALHO, N. (2001) Coevolução de Plantas e Fungos Patogênicos *Rev. Bras. de AGROCIÊNCIA*, v.7 n. 2, p. 79-83.

BARKER, K. R. (2003). Perspectives on plant and soil nematology. *Annual Review of Phytopathology*, v. 41, p. 1-25.

BARKER, K.R.; HUSSEY, L.R.; KRUSBERG, L.R.; BIRD, G.W.; DUNN, R.A.; FERRIS, H.; FERRIS, V.R.; FRECKMAN, D.W.; GABRIEL, C.J.; GREWAL, A.E.; MCGUIDWIN, A.E.; RIDDLE, D.L.; ROBERTS, P.A.; SCHIMITT, D.P. (1994). Plant and soil Nematodes: societal impact and e focus for the future. *Journal of Nematology* 26 : 127-137.

BERGESON GB, VAN GUNDY SD, THOMASON IJ, (1970). Effect of *Meloidogyne javanica* on rhizosphere microflora and *Fusarium* wilt of tomato. *Phytopathology* 60, 1245–9.

BLOK, V.C., WISHART, J., FARGETTE, M. BERTHIER, K. & PHILLIPS, M.S. (2002). Mitochondrial DNA differences distinguishing *Meloidogyne mayaguensis* from the major species of tropical root-knot nematodes. *Nematology* 4: 773-781.

BOOTH, C. (1971).The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycology Institute, kew Surrey, England, 237p.

BOWMAN P, BLOOM JR, (1966). Breaking the resistance of tomato varieties to *Fusarium* wilt by *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology* 56, 871.

BRIDGE, J. (2000). Keynote: Nematodes of bananas and plantains in Africa: research trends and management strategies relating to the small scale farmer. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.540, p.391-408.

BRIDGE, J.; PAGE, S. L. J. (1982). The rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*, on deep water rice (*Oryza sativa* subsp. Indica). *Revue Nematologie*, v. 5, n. 2, p. 225-232.

BRITO, J. A.; STANLEY, J.D.; CETINTAS, R.; KAUR, R.; DICKSON, D. W. (2008). Two emerging species of root-knot nematodes in Florida, USA: *Meloidogyne mayaguensis* and *M. floridensis*. 5 TH INTERNATIONAL CONGRESS OF NEMATOLOGY, Australia, Proceedings, p.156.

BRITO, J. INSERRA, R. LEHMAN, P. & DIXON, W. (2006). The root-knot nematode *Meloidogyne mayaguensis* Rammah and Hirshmann, 1988 (Nematoda:Tylenchida). Site <http://www.doacs.state.fl.us/pi/enpp/nema/m-ayaguensis.html>, visitado em 17 de outubro de 2006

BRITO, J., POWERS, T.O., MULLIN, P.G., INSERRA, R.N. & DICKSON, D.W. (2004). Morphological and molecular characterization of *Meloidogyne mayaguensis* isolates from Florida. *Journal of Nematology*, 36: 232-240.

BRITO, J.A., CETINTAS, R., STANLEY, J.D., PRESTON, J.F. & DICKSON, D.W. (2004a). Attachment and development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne mayaguensis*. *Proceedings of the 42nd Annual Meeting of the Society of Nematologists*, p. 58.

BRITO, J.; STANLEY, J.; CETINTAS, R.; POWERS, T.; INSERRA, R.; MCAVOY, G.;

BURDON, J.J.; SILK, J. (1997). Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. *Phytopathology*, St. Paul, v. 87, p. 664-669.

BURGESS, LW. SUMMERELL, B.A., BULLOCK, S., GOTT, K.P., AND BACKHOUSE, D. (1994). *Laboratory Manual for Fusarium Research*. 3<sup>rd</sup> Department of Crop Sciences, University of Sydney.

BURLA, R.S., SOUZA, R.M., GONÇALVES JR.; E., PEREIRA, F.O.M. (2007) Reação de acessos de *Psidium* spp. a *Meloidogyne mayaguensis* In: XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Goiania, **Resumos**, *Nematologia Brasileira* 31 (2):127, 2007.

CASTRO, J.M.C.; SANTANA, T.A.S.; SANTANA, M.L.M.P. e BARBOSA, N.M.L (2009). Identificação de espécies de *Meloidogyne* em aceroleiras de áreas irrigadas de Petrolina – Pe In: XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Maceio, **Resumos**, *Nematologia Brasileira* 33.

CASTRO, J.M.C.; CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; ANTUNES JUNIOR, E.F. (2007). Detecção de hospedeiros alternativos de *Meloidogyne mayaguensis* em área de cultivo de goiabeiras em Petrolina-Pe. In: XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Goiania, **Resumos**, *Nematologia Brasileira* 31 (2):152.

CARNEIRO, R.M.D.G., CIROTTO, P.A., SOUSA, M.G., SILVA, D.B. & GOMES CARNEIRO, R. (2007). SELEÇÃO DE *Psidium* spp. QUANTO A RESISTÊNCIA A *Meloidogyne mayaguensis* E COMPATIBILIDADE DE ENXERTIA COM *P. guajava* CV. PALUMA In: XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Goiania, **Resumos**, *Nematologia Brasileira* 31 (2):145.

CARNEIRO, R.G.; MONACO, A.P.A.; MORITZ, M.P.; NAKAMURA, K.C.; SCHERER, (2006a). Identificação de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira e em plantas invasoras, em solo argiloso, no Estado do Paraná. **Nematologia Brasileira**, 30(3): 293-298.

CARNEIRO, R.G., MORITZ, M.P.; MONACO, A.P.A.; LIMA, A.C.C.; SANTIAGO, D.C. (2006b). Reacao de cultivares de aveia as racas 1 e 3 de *Meloidogyne incognita* e a *M.paranaensis*. Nematologia Brasileira, 30(3): 281-285.

CARNEIRO, R.G., MONACO, A.P.A.; LIMA, A.A.C.; NAKAMURA, K.C.; MORITZ, M.P.; SCHERER, A.; SANTIAGO, D.C. (2006c). Reação de gramineas a *Meloidogyne incognita*, a *M. paranaensis* e a *M. javanica*. Nematologia Brasileira, 30(3): 287-291.

CARNEIRO, R.M.D.G. (2003). Uma visão mundial sobre a ocorrência e patogenicidade de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira e outras culturas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, XXIV, Petrolina. Palestras, p. 22.

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

CARNEIRO,-R.M.D.G, TIGANO, M.S., JORGE, C.L., TEIXEIRA, A.C.O. & CORDEIRO,M.C. (2004). Selection and polymorphism of *Pasteuria penetrans* isolates in relation to *Meloidogyne* spp. from coffee. Nematology, 6: 37-47.

CASASSA, A.M., MATHEUS, J., CROZZOLI, R., BRAVO, V. & GONZÁLEZ, C. (1996). Respuesta de algunas selecciones de guayabo al nematodo *Meloidogyne incognita* en el municipio Mara del estado Zulia, Venezuela. Fitopatología Venezuelana, 10: 5-8.

CIROTTO, P.A., RESENDE, F.O., QUINTANILHA, A.P., CARNEIRO, R.M.D.G. (2007). RESISTÊNCIA DE CULTIVARES DE *Capsicum annum* A *Meloidogyne* spp. In: XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Goiania, **Resumos**, Nematologia Brasileira 31 (2):145.

CIROTTI, P.A.; RESENDE, F.O.; QUINTANILHA, A.P.; CARNEIRO, R.D.G. (2007). Resistencia de cultivares de *Capsicum annum* a *Meloidogyne* spp. Boletim de pesquisa e desenvolvimento. Embrapa, Planaltina (DF), (200): 7p.

CLAYTON, E. E., GRAHAM, T. W., TODD, F. A., GAINES, J. G., CLARK, F. A. (1958). Resistance to the root-knot disease of tobacco. Tobacco Sci. 2:53-63

COFCEWICZ, E.T.; MEDEIROS, A.B.; CARNEIRO, R.M.D.G.; PIEROBOM, C.R. (2001). Interação dos fungos micorrízicos arbusculares *Glomus etunicatum* e *Gigaspora margarita* e o nematoide das galhas *Meloidogyne javanica* em tomateiro. Fitopatologia brasileira, v.26, p. 65-70.

COLEMAN D C, CROSSLEY D AJR, BEARE M H AND HENDRIX P F. (1995) Interactions of organisms at root/soil and litter/soil interfaces in terrestrial ecosystems. Agric. Ecosyst. Environ. 24, 117–134.

COLLOVY-FILHO, C.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E. (1995). Propagacao da goiabeira (*Psidium guajava* L.) pelo metodo de mergulhia de cepa. Revista Brasileira de Agrociência, 1 (2): 112-114.

CORRELL, J.C.; GORDON, T.R.; MCCAIN, A.H. (1992). Genetics diversity in California and Florida populations of the Pitch Canker Fungus *Fusarium subglutinans* f. sp. pini. Phytopathology, St. Paul, v.82, n.4, p.415-420.

COSTA, D.C. (2000) Doenças causadas por nematoides. In: CORDEIRO, Z.J.M. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. P. 66-77.

COSTA, M.J.N.; CAMPOS, V.P.; PFENNING, L.H.; OLIVEIRA, D.F. (2000) Patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne* incógnita em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com aplicação de filtrados fúngicos ou extratos de plantas e de esterco animais. Nematologia Brasileira, v.24, p.219-226.

DE HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M.J.. (2000) Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira Virgili, Reus, Spain.

DIAS, W.P.; SILVA, J.F.V.; RIBEIRO, N.R.; CARNEIRO, R.M.D.G. (2009). Reação de genótipos de milho a *Meloidogyne mayaguensis* In: XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Maceio **Resumos**, Nematologia Brasileira.

DUTEAU, N.M.; LESLIE, J.F. (1991). RAPD markers for *Gibberelia fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). Fungal Genetics Newsletters, Kansas City, v.38, p.37-40.

EL-BORAI, F.E. & DUNCAN, L.W. (2005). Nematode parasites of subtropical and tropical fruit tree crops. In. Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture, second edition (M. Luc, R.A. Sikora e J. Bridge, eds). Wallingford, CABI Publishing, p. 467-492.

FARGUETTE, M.; BRAALKSMA, R. (1990). Use of esterase phenotypes in the taxonomy of the genus *Meloidogyne* 3. A study of some b race lines and their taxonomic position. *Revue de Nématologie*, 13: 375-386.

FAULKNER. L. R., BOLANDER, W. J., SKOTLAND, C. B. (1970). Interaction of *Verticillium dahliae* and *Pratylenchus minyus* in *Verticillium* wilt of peppermint : Influence of the nematode as determined by a c double root technique. *Phytopathology* 60:100-103

FISCHER, N.L.; BURGUESS, L.W.; TOUSSOUN, T.A.; NELSON, P.E. (1982). Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v.72, p.151-153.

FRANCE, R.A.; ABAWI, G.S. (1994). Interaction between *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* on selected bean genotypes. *Journal of Nematology*, Hanover, v.26,n. 4,p.467-474.

GOMES, V. M. (2007). Meloidoginose da goiabeira: estudos sobre a sua patogênese e formas de convívio com a doença no campo. Universidade Estadual do Norte Fluminense, 80p. Dissertacao de mestrado.

GOMES, V.M., SOUZA, R.M., MUSSI-DIAS, V., SILVEIRA, S.F., DOLINSKI, C. (2011). Guava Decline: A Complex Disease Involving *Meloidogyne enterolobii* and *Fusarium solani*. Journal of Phytopathology, 159: 45-50.

GOMES, V.M.; SOUZA, R.M. SILVA, M.M.; DOLINSKI, C. (2008). Caracterizacao do estado nutricional de goiabeiras em declinio parasitadas por *Meloidogyne mayaguensis*. Nematologia Brasileira, 32(2): 154-160.

GONSALVES, W., SILVAROLLA, M. B. (2001). *Nematoides* parasitos do cafeeiro. In: Zambolim, L. (ed). Tecnologias de produção de café com qualidade. Viçosa : UFV, p. 199-268.

GUARRO J, GENÉ J. (1992). *Fusarium* infections. Criteria for the identification of the responsible species. Mycoses, 35: 109-114.

GUARRO J, GENÉ J. (1995). Opportunistic Fusarial infections in humans. Eur J. Clin Microbiol Infect Dis, 14: 741-754.

GUARRO J, GENÉ J, STCHIGEL AM. (1999). Developments in fungal taxonomy. Clin Microbiol Rev, 12 (3): 454-500.

GUIMARÃES, L.M.P., MEDEIROS, J.E., MARANHÃO, S.R.V.L., PEDROSA, E.M.R., MOURA, R.M. (2004) Novas plantas hospedeiras de *Meloidogyne mayaguensis*. In: Anais do XXXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, p. 142.

GUIMARÃES, L.M.P., MOURA, R.M. & PEDROSA, E.M.R. (2003). Parasitismo de *Meloidogyne mayaguensis* em diferentes espécies botânicas. Nematologia Brasileira 27:139-145.

HASEEB, A.; SHUKLA, P.K. (2004). Management of *Heterodera cajani*, *Meloidogyne incognita* and Fusarium wilt on pigeon pea with some chemicals, bio-pesticides and bio-agents. *Nematologia Mediterranea*, Bari, v.32,n.2, p.217-222.

HIRANO, K., KAWAMURA, T. (1965). The disease complex caused by nematodes and other microorganisms. Effect of root-lesion nematodes *Pratylenchus* spp. and responses to *Fusarium* spp. in the soil. *Ann. Phytopathology. Soc.* 30:24-30

HILLOCKS RJ, (1986). Localised and systemic effects of root-knot nematode on the incidence and severity of Fusarium wilt in cotton. *Nematologica* 32, 202–8.

HUE, F.X.; HUERRE, M.; ROUFFAULT, M.A.; BIEVRE, C. (1999). Specific detection of *Fusarium* species in blood and tissues by a PCR technique. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.37, n.8, p.2434-2438.

HUNT, D.J. & Z.A. HANDOO. (2009). Taxonomy, identification and principal species. In: PERRY, R.N., M. MOENS & J.L. STARR (ed) *Root-Knot Nematodes*. CABI, Wallingford, p. 55-97.

JURGENSON, J.E.; ZELLER, K.A.; LESLIE, J.F. (2002). Expanded Genometric Map of *Gibberella moniliformis* (*Fusarium verticillioides*). *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.68, n.4, p.1972-1979.

KAHMANN, R. & BASSE, C. (2001). Fungal gene expression during pathogenesis-related development and host plant colonization. ***Current Opinion in Microbiology***, 4:374-380.

KHAN TA, HUSAIN SI, (1989). Relative resistance of six cowpea cultivars as affected by the concomitance of two nematodes and a fungus. *Nematologica Mediteranea* 17, 39–41.

LACAZ, C.S. In: LACAZ, C.S.; PORTO, C.; MARTINS, J.E.C. (1998). *Guia para Identificação. Fungos Actinomicetos e Algas*, São Paulo, Sarvier.



LIMA, I.M.; C.M. DOLINSKI & R.M. SOUZA. (2003). Dispersão de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabais de São João da Barra (RJ) e relato de novos hospedeiros dentre plantas invasoras e cultivadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, XXIV, Petrolina. Resumos, p. 139.

LIMA, M.A.C.; ASSIS, J.S.; GONZAGA NETO, L. (2001). Caracterização dos frutos de goiabeira e seleção de cultivares na região do Submédio São Francisco. 2001. Disponível em: [www.scielo](http://www.scielo). Acesso em 02-03-06

MAI, W.F.; ABAWI, G.S. (1987). Interactions among root-knot nematodes and *Fusarium* wilt fungi on host plants. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v.25, p.317-338.

MANICA, I.; ICUMA, I.M.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SALVADOR, J.O.; MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E. (2000). Fruticultura tropical: goiaba. Porto Alegre: Cinco Continentes,. 373p.

MANICOM BQ, BAR-JOSEPH M, ROSNER A, VIGODSKY-HAAS H, KÓTZE JM. (1987). Potential applications of random DNA probes and restriction fragment length polymorphisms in the taxonomy of the *Fusaria*. Phytopathology, 77: 669-672.

MARANHÃO, S.R.V.L., MOURA, R.M. & PEDROSA, E.M.R. (2002). Reação de indivíduos segregantes de araçazeiro a *Meloidogyne incognita* raça 1, *M. javanica* e *M. mayaguensis*. Nematologia Brasileira, 27: 173-178.

MEDINA, J.C. Cultura. In: CASTRO, J.V.; SIGRIST, J.M.M.; MARTIN, Z.J.; KATO, KATO, K.; MAIA,M,L.; GARCIA, A.E.B.; FERNANDES, R.S.S. (1991). (Eds.) Série Frutas Tropicais n° 6: Goiaba. ITAL-Campinas. ICEA. p.1-120.

MELAKEBERHAN, H.; WEBSTER, J. M. (1993). The phenology of plant-nematode interaction and yield loss. In: M. W. Khan. Nematode interactions. Champan & Hall, London: 26-41.

MIRANDA, G.B., R.M. SOUZA & A.P. VIANA. (2010). Assessment of methods and criteria for screening *Psidium* spp. for resistance to *Meloidogyne enterolobii*. *Nematologia Brasileira* 34: 211-219.

MIRANDA, G.B., SOUZA, R.M., GOMES, V.M., FERREIRA, T.F. & ALMEIDA, A.M. (2011). Avaliação de genótipos de *Psidium* sp. quanto à resistência a *Meloidogyne enterolobii*. *Bragantia*, in press.

MOENS, M., R.N. PERRY & J.L. STARR. (2009). *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important species. In: PERRY, R.N., M. MOENS & J.L. STARR (ed) *Root- Knot Nematodes*. CABI, Wallingford, p. 1-17.

MOREIRA, W.A. & SHARMA, R.D. (2001). Nematoides. In. *Goiaba Fitossanidade. Série Frutas do Brasil*. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, p. 19-28.

MOREIRA, W.A., NETO, D.H., BARBOSA, F.R., MOURA, A.O. & PAULA, F.R. (2001). Desenvolvimento populacional de *Meloidogyne* spp. em mudas de goiabeira estaqueadas e enxertadas tratadas com nematicidas. XXIII Congresso Brasileiro de Nematologia, Resumos, p. 111.

MOURA, R.M.; ALMEIDA, M.R.A.; COSTA, M.B.; LIMA, S.T.S. E CARNEIRO, R.M.D.G (2009). *Meloidogyne* species detected in sugarcane fields in the State of Pernambuco, Brazil In: XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Goiania, **Resumos**, *Nematologia Brasileira* 33.

MOURA, R.M., MARANHÃO, S.R.V.L., COELHO, R.S.B., CAVALCANTI, V.A.L.B., BEZERRA, J.E.F., LEDERMAN, I.E., FRANÇA, J.G.E., FREITAS, J.L., NEVES, J.D., MOREIRA, W. & NETO, L.G. (2003). O nematoide da goiabeira (*Psidium guajava* L.) IPA Responde, publicação on-line, URL: <http://www.ipa.br/RESP/resp23.htm>, visitado em 30/10/2009.

MOURA, R.M. & MOURA, A.M. (1989) Meloidoginose da goiabeira: doença de alta severidade no Estado de Pernambuco, Brasil. *Nematol. Bras.* v.13, p.13-19.

MUNIZ, M.F.S.; CAMPOS, V.P.; MOITA, A.W.; GONÇALVES, W.; CARNEIRO, R.M.D.G (2007). Reação de genótipos de cafeeiro a diferentes populações de *Meloidogyne* spp. In: XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Goiania, **Resumos**, Nematologia Brasileira 31 (2):125.

NATALE, W.; COUTINHO, E.L.M.; BOARETTO, A.E.; PEREIRA, F.M. (1996). Goiabeira: calagem e adubação. Jaboticabal: FUNEP. 22p.

NICHOLSON, P.; JENKINSON, P.; REZANOOR, H.N.; PARRY, D.W. (1993). Restriction fragment length polymorphism analysis of variation in *Fusarium* species causing ear blight of cereals. *Plant Pathology*, Palo Alto, v.42, p.905-914.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS 2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are non-orthologous. *Molecular Phylogenetics Evolution*, San Diego, n.7, p. 103-117.

OULLET, T.; SEIFERT, K.A. (1993). Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strings using RAPD and PCR amplification. *Phytopathology*, St. Paul, v.83, p.1003-1007.

PEREIRA, F. M.; MARTINEZ JUNIOR, M. (1986). Goiabas para industrialização. Jaboticabal: Legis Summa.

PEREIRA, F.M., R.M. SOUZA, P.M. SOUZA, C. DOLINSKI & G.K. SANTOS. (2009). Estimativa do impacto econômico e social direto de *Meloidogyne mayaguensis* na cultura da goiaba no Brasil. *Nematologia Brasileira* 33: 176-181.

PETERSEN CL; CHARLES JG (1997). Transmission of grapevine leafroll-associated virus by *Pseudococcus longispinus* and *P. calceolariae*. *Plant Pathology*, 46, 509-515.

PITCHER, R. S. (1965). Interrelationships of nematodes and other pathogens of plants. *Helminth. Abstr.* 34: 1-17

PORTER, D. M., AND POWELL, N. T. (1967). Influence of certain *Meloidogyne* species on Fusarium wilt development in flue-cured tobacco. *Phytopathology* 57:282-285.

POWER, N.T. (1971). Interactions between nematodes and fungi in disease complexes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.9, p. 253-274.

PROT, J. C.; MATIAS, D. M. (1995). Effects of water regime on the distribution of *Meloidogyne graminicola* and other root-parasitic nematodes in a rice field toposequence and pathogenicity of *M. graminicola* on rice cultivar UPL R15. *Nematologica*, v. 41, p. 219-228.

RAMMAH, A. & HIRSCHMANN, H. (1988). *Meloidogyne mayaguensis* n.sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode from Puerto Rico. *Journal of Nematology* 20: 58-69.

RANDIG O.; DEAU, F.; SANTOS M.F.A.; TIGANO, M.S.; CARNEIRO, R.M.D.G.; CASTAGNONE-SERENO (2009). A novel species-specific satellite dna family in the invasive root-knot nematode *meloidogyne mayaguensis* and its potential use for diagnostics In: XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Maceio **Resumos**, Nematologia Brasileira 33.

RIBEIRO, N.R.; DIAS, W. P.; HOMECHIN, M.; FERNANDEZ L.A.; PARPINELLI, N.M.B.; FRANCISCO, A.; LOPES, I.O.N. (2007). Reacao de genotipos de soja a *Meloidogyne mayaguensis* e *M. ethiopica*. In: XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Goiania, Resumos, Nematologia Brasileira 31(2):155.

RITZINGER, C.H.S.P.; FANCELLI, M. (2006). Manejo integrado de nematoides na cultura da bananeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.28, n.2, p.331-338.

ROCHA, M. B., BEMELMANS, P. F. (2005) Goiaba para industria: o custo da materia-prima. Extraído em: <http://www.iea.sp.gov.br> Acesso: 09/05/2009.

RODRIGUEZ, M.G., SANCHEZ, L. & ROWE, J. (2003). Host status of agriculturally important plant families to the root-knot nematode *Meloidogyne mayaguensis* in Cuba. *Nematropica*, 33: 125-130.

ROSA, J.M.O.; WILCKEN, S.R.S. (2009). MULTIPLICAÇÃO DOS NEMATOIDES DAS GALHAS (*Meloidogyne javanica* e *M. mayaguensis*) In: XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Maceio **Resumos**, Nematologia Brasileira 33.

ROVIRA, A., (1969). Plant root exsudates. *The botanical review* 35 (1) 17-34.

SAMSON RA, VON REENEN-HOEKSTRA ES (1995). *Introduction to Food Borne Fungi*. 3 ed. Baarn, Delft. Centralbureau voor Schimmelculturs.

SILVA, J.G.P.; SOUSA, M.G.; SOUSA, F.R. e CARNEIRO, R.M.D.G. (2009). Reaction of accessions of passionfruit (*passiflora* spp.) to *meloidogyne mayaguensis*. In: XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Maceio **Resumos**, Nematologia Brasileira 33.

SILVA,G.S.; PEREIRA, A.L. (2008). Efeito da incorporação de folhas de nim ao solo sobre o complexo *Fusarium x Meloidogyne* em quiabeiro. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.4, p.368-370.

SILVA, F.A.S.E. (2001). The Assistat software: Statistical assistente. In: International Conferente On Computers In Agriculture, 6, Cancun, 1996. Anais, Cancun: American Society of Agricultural Engineers. p. 294-298.

SOARES, P.L.M.; ALMEIDA, E.J. DE; SILVA, A.R. DA; BARBOSA, B.F.F. e SANTOS, J.M. (2007). NOVOS REGISTROS SOBRE *Meloidogyne mayaguensis* NO Brasil In: XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Maceio **Resumos**, Nematologia Brasileira 33 (2):p 145,

SOARES, P.L.M.; ALMEIDA, E.J.; BARBOSA, B.F.F.; SANTOS, J.M.; MUSCARI, C. (2007). Controle biologico de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira com fungos nematofagos. XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Goiania, **Resumos**. Nematologia Brasileira 31 (1):142.

SOUZA, R.M., NOGUEIRA, M.S., LIMA, I.M., MELARATO, M. & DOLINSKI, C.M. (2007). Manejo do nematoide-das-galhas da goiabeira em São João da Barra (RJ) e relato de novos hospedeiros. Nematologia Brasileira, v 30. p. 165-169.

STEENKAMP, E.T; BRITZ, H.; COUTINHO, T.A; WINGFIELD, B.D; MARASAS, W.F.O.; WINGFIELD, M.J. Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. Molecular Plant Pathology, London, v.1, n.3, p.187-193, 2000.

THOMAS V, RUTHERFORD MA, BRIDGE PD (1994). Molecular differentiation of two races of *Fusarium oxysporum* especial form cubense. Letters in Applied Microbiology, 18: 193-196,

TORRES, G.R.C.; MEDEIROS, H. A.;SALES-JUNIOR, R.; MOURA, R.M, (2007). *Meloidogyne mayaguensis*: Novos assinalamentos no Rio Grande do Norte associados a goiabeira. Revista Caatinga, 20 (2):106-112.

VAN GUNDY SD, KIRKPATRICK JD, GOLDEN J, (1977). The nature androle of metabolic leakage from root-knot nematode galls and infection by *Rhizoctonia solani*. Journal of Nematology 9, 113–21.

- VENTURA, J., A.. (2000). Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados. Parte II - chaves para identificação. Revisão anual de Patologia de Plantas, v.8, p.303-338.
- VILJOEN, A.; WINGFIELD, M.J.; MARASAS, W.F.O. (1997). Characterization of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* causing root disease of *Pinus patula* seedlings in South Africa. *Mycological Research*, Cambridge, n.101, p.437-445.
- VOIGT, K.; SCHLEIER, S.; BRÜCKNER, B. (1995). Genetic variability in *Gibberella fujikuroi* and some related species of the genus *Fusarium* based on random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Current Genetics*, Göteborg, n.27, p.361-368.
- WANG., E.L.H., e BERGESON, G.B (1974). Biochemical in root exudate and xylem sap of tomato plants infected with *meloidogyne incognita*. *J. Nematol.* 6: 194-202.
- WAALJWIJK, C.; KONING, J.R.A.; BAAYEN, R.P.; GAMS, W. (1996). Discordant groupings of *Fusarium* spp. from the sections *Elegans*, *Liseola* and *Dlaminia* based on ribosomal ITS 1 and ITS 2 sequences. *Mycologia*, New York, n.88, p.361-368.
- WILCKEN, S.R.S.; CANTU, R.R.; ROSA, J.M.O.; GOTO, R (2007). Reação de porta-enxertos comerciais de tomateiro a *meloidogyne mayaguensis* In: XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Maceio **Resumos**, Nematologia Brasileira 33 (2):p 137.

## **6. Apendice**

**6.1 A – (Artigo 1) Guava Decline: A Complex Disease Involving *Meloidogyne mayaguensis* and *Fusarium solani*.**



Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Brazil

## Guava Decline: A Complex Disease Involving *Meloidogyne mayaguensis* and *Fusarium solani*

VICENTE MARTINS GOMES, RICARDO MOREIRA SOUZA, VICENTE MUSSI-DIAS, SILVALDO FELIPE DA SILVEIRA and CLAUDIA DOLINSKI

Authors' address: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, CCTA/LEF. Av. Alberto Lamego, 2000, 28013-620, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil (correspondence to R. M. Souza. E-mail: ricmsouza@censanet.com.br)

Received February 22, 2010; accepted April 19, 2010

**Keywords:** guava root-knot nematode, *Psidium guajava*, pathogen interactions, aetiology, Brazil

### Abstract

In Brazil, *Meloidogyne mayaguensis* has become a threat to guava production. Approximately a third of the cultivated area is infested, leading almost inevitably to the decimation of the orchards. Because parasitized trees develop rotten roots as the disease progresses, the possibility that a soil-borne pathogen could be involved was investigated. From several nematode-free or nematode-infested orchards, nearly 2000 root fragments were tested for bacteria and fungi. Positive isolations were obtained from nematode-infested areas only and were predominantly identified as *Fusarium* sp. In a 5-month microplot experiment, guava seedlings were uninoculated (control) or were inoculated with *M. mayaguensis* only or with this nematode and 21 days later with one of 11 *Fusarium* sp. isolates. A Scott–Knot analysis of several vegetative variables and of the extent of root rot allowed the generation of a dissimilarity dendrogram that indicated that four *Fusarium* sp. isolates were particularly associated with damage to the seedlings. Upon identification of these isolates as *Fusarium solani*, a 6-month microplot experiment was set up, in which guava seedlings were uninoculated or were inoculated with one of the following: (i) *M. mayaguensis* only, (ii) four *F. solani* isolates, separately, (iii) four *F. solani* isolates separately, combined with physical injury of the roots with a knife, (iv) *M. mayaguensis*, and 21 days later with four *F. solani* isolates, separately. No root rot and virtually no effect on all variables were observed in the seedlings inoculated with the fungus isolates, with or without physical injury. Major root rot and a negative effect on all variables were observed in the seedlings inoculated with *M. mayaguensis* and all four *F. solani* isolates. This characterizes guava decline as a complex disease caused by the synergistic effect of these organisms, in which parasitism by the nematode predisposes the plants to root decay caused by the fungus.

### Introduction

In Brazil, guava (*Psidium guajava* L.) decline associated with *Meloidogyne mayaguensis* Rammah and Hirschmann, 1988 has become the main health problem of this fruit crop. Nationwide, the nematode-infested area is estimated to be approximately 5000 ha spread over 16 States, and the economic impact of this disease on guava growers has been calculated to be around US\$ 66 million as of 2008 (Pereira et al. 2009).

In Brazil, *M. mayaguensis*-infected guava seedlings and healthy seedlings transplanted into heavily nematode-infested fields often die within months. By contrast, mature guava trees may have galled roots for several months without secondary shoot symptoms. The onset or worsening of shoot symptoms is often associated with (i) an increase in the number of root galls in the entire root system, (ii) following a high production season or (iii) following drastic pruning, which is used by some growers to synchronize production.

Declining trees show chlorosis, scorching of margin, wilting and falling of leaves. Gomes et al. (2008) have shown that these symptoms are associated with foliar deficiency of nitrogen, potassium and phosphorus, a near-deficiency of calcium and magnesium and an unbalanced accumulation of manganese, chlorine and sodium. Underground, declining trees develop progressive rotting of the entire root system. Usually, declining trees do not recover, and death occurs within weeks to a few months. This sequence of symptoms has been described as Stages 1–3 (Gomes 2007). A 2-year experiment conducted in commercial orchards showed high yield losses associated with nematode population densities as low as 25 root galls per 10 g of roots and 10 second-stage juveniles per 100 cc of soil (Gomes et al. 2010).

The severity of guava decline and its associated root rot has triggered an investigation into whether a soil-borne pathogen could be involved in this pathosystem,

as it occurs in several complex diseases involving *Meloidogyne* spp. In addition to causing wilt diseases when associated with *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*, *Meloidogyne* spp. are known to cause root rotting when in complex with *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Cylindrocladium crotalariae*, *Phytophthora parasitica* f.sp. *nicotianae*, *P. megasperma* f.sp. *medicaginis*, *Thielaviopsis basicola*, *Pythium ultimum* or *P. aphanidermatum* (Powell 1971; Webster 1985; Hussey and McGuire 1987; Mai and Abawi 1987; Evans and Haydock 1993; Abawi and Chen 1998; Back et al. 2002).

We report here the results of laboratory and two field studies that established the complex nature of guava decline, which is caused by a synergistic association between *M. mayaguensis* and *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.

## Materials and Methods

### Field samplings

Four nematode-free and four nematode-infested commercial orchards (cv. Paluma) located in the municipality of São João da Barra, southeast Brazil (21°38'24"S, 41°03'03"W) were sampled on different occasions from January through November 2006. In each orchard, 500 g root samples were collected separately from eight different guava trees. In the laboratory, 24 root fragments from each of the 64 root samples were randomly selected from the main, secondary and tertiary roots in equal proportions, totalling 1536 fragments that were used for bacterial and fungus isolations.

Additionally, seven root samples from declining orchards were received from seven municipalities in the States of Paraná, Mato Grosso do Sul and Pernambuco, in the south, midwest and northeast regions of Brazil, respectively.

### Bacterial isolation

Seven hundred and sixty-eight root fragments (12 from each tree sampled) were cleansed, disinfested in 50% alcohol for 25 s and Qboa<sup>®</sup> commercial bleach (c. 2% sodium hypochlorite) for 3 min and rinsed with sterile distilled water (SDW) (Romeiro 2001). The fragments were individually macerated in drops of SDW and then placed on culture medium 523 in Petri dishes (Kado and Heskett 1970). The dishes were incubated for 3 days at 25°C and 12-h photoperiod before being examined for bacterial growth.

### Fungi isolation and identification

Seven hundred and sixty-eight root fragments were cleansed, disinfested in 70% alcohol for 1 min and Qboa<sup>®</sup> for 1 min and rinsed with SDW (Dhingra and Sinclair 1995). The fragments were incubated for 7 days at 27°C and 12-h photoperiod in Petri dishes with potato-dextrose-agar (PDA) medium amended with 500 p.p.m. of streptomycin sulphate. The resulting fungal colonies were subcultured and, upon sporulation, they were identified at the genus or species level in lactophenol glass slides observed under light microscope, with or without staining with cotton blue or fuchsine, according

to the descriptions by Ellis (1971, 1976), Barnett and Hunter (1972) and Sutton (1980).

### Selection and identification of *Fusarium* sp. isolates

Of the fungi isolated from the roots of declining guava trees (see Results), *Fusarium* sp. was the only genus that was further investigated. Based on the morphology of the colonies in Petri dishes with PDA medium, macro and microconidia and chlamydospores, 11 *Fusarium* sp. isolates (referred to hereafter as UENF/CF 160–170) were selected as representatives of the diversity of the 68 isolates obtained from the orchards in São João da Barra. These 11 isolates were used in the first field experiment.

Based on the results of the first experiment (see below), a second experiment was conducted with the isolates UENF/CF 160, 163, 164 and 170. These isolates were first subcultured from single spores and identified as *F. solani* based on their morphology by Dr. Ludwig H. Pfenning (Dept of Phytopathology, Universidade Federal de Lavras, Brazil). This identification was confirmed by PCR amplification of the rDNA ITS region, using primers for ITS4 and ITS5, by Dr. Robert Miller (Universidade de Brasília, Brazil).

### Preservation of *Fusarium* sp. isolates and inoculum production

All isolates were preserved in glass tubes with PDA medium at 7°C, on wheat grains stored in glass vials maintained at 4°C, and at room temperature mixed with silica gel in the dark (Dhingra and Sinclair 1995).

The inoculum was produced following a modification of the method by Burgess et al. (1994): 50 g of whole wheat grains was embedded in distilled water overnight at 5°C, placed in plastic bags and autoclaved. A mixture of hyphae and conidia was collected from the colonies maintained on PDA, diluted in autoclaved distilled water and applied to the wheat grains. The plastic bags were incubated at 25°C and 12-h photoperiod until the wheat grains were entirely colonized by the fungus.

### Microplot experiment 1

To investigate whether *Fusarium* sp. was involved in the decline of guava, 52 cv. Paluma seedlings (30–40 cm high) were transplanted into 25-l plastic pots partially buried in a nematode-infested orchard. To avoid using either nematode- or *Fusarium*-infested soil, the pots were filled with sandy soil from a nearby area with natural vegetation. During the experiment, care was taken to avoid soil spills into the pots. The irrigation water was treated with Qboa<sup>®</sup> 24 h prior to use. The plants were fertilized monthly with nitrogen, potassium, copper, boron and zinc following recommendations by Pereira (1995), and they were drip irrigated as required.

Four seedlings were kept as uninoculated controls, being transplanted into autoclaved soil. At the transplant, the remaining 48 seedlings were inoculated with 10 g of chopped tomato roots with *M. mayaguensis*-induced galls, which were mixed with the soil. Twenty-one days later, isolates UENF/CF 160–170 were separately inoculated on four seedlings each by mixing

10 g of colonized wheat grains into the top layer of the soil. The 13 treatments (T1, uninoculated control; T2, nematode inoculated; T3–T13, inoculated with the nematode and the fungus) were arranged in randomized blocks, with four replicates.

Five months after transplantation, the plants were carefully removed from the pots, and the soil was washed off the roots. The following variables were assessed: number of leaves per plant, fresh and dry weight of shoot and root, root system depth (distance from the plant's collar region to the most distal rootlet), root system volume (total, rotted and unrotted, calculated through water displacement in a graduated cylinder) and estimated root system length. This estimate was obtained by applying the line-intersect method (Tennant 1975) to three 10 g root aliquots from the top, medium and lower regions of the plant's root system. The average length obtained was related to the weight of the plant's entire root system.

At the end of the experiment, eight 1 cm long root fragments were randomly selected from each of the 52 experimental plants and processed for fungus re-isolation as described before. When *Fusarium* sp. was re-isolated, it was subcultured on PDA medium, and its morphological characteristics were compared to the previously inoculated isolate.

The original data (not transformed) was analysed using ANOVA and compared by the Scott–Knot method at 5% probability. The results were also analysed by the Ward method to generate a dissimilarity dendrogram based on Euclidean distance (Mardia et al. 1997).

#### Microplot experiment 2

This experiment was conducted with the most damaging *F. solani* isolates in the first experiment: UENF/CF 160, 163, 164 and 170. Eighty-four cv. Paluma seedlings (30–40 cm high) were transplanted into partially buried 25-l plastic pots filled with washed river-bed sand. The plants' fertilization and irrigation, the nematode and fungus inoculations and the fungus re-isolation at the end of the experiment were conducted as in the first experiment.

Six seedlings were kept as uninoculated controls (T1), being transplanted into autoclaved sand. At the transplantation, the following treatments were established: T2 (inoculation with *M. mayaguensis* only), T3–T6 (inoculation with isolates UENF/CF 160, 163, 164, and 170 only, separately), T7–T10 (inoculation with the fungus isolates cited above, combined with physical injury of the roots inflicted by four knife strokes around each seedling, at the depth of 0–20 cm), and T11–T14 (inoculation with *M. mayaguensis*, followed 21 days later with the fungus isolates cited above). All treatments were arranged in randomized blocks, with six replicates.

Six months after transplant, the plants were carefully removed from the pots, and the soil was washed off the roots. The following variables were assessed: fresh weight of shoot and root, root system volume

(total, rotted and unrotted, calculated through water displacement in a graduated cylinder), foliar area and chlorophyll content, using a SPAD-502<sup>®</sup> (Minolta, Tokyo, Japan) chlorophyll meter. The original data (not transformed) were analysed using ANOVA and compared by the Tukey test at 5% probability.

#### Results

No bacteria were isolated from root tissues collected in São João da Barra orchards. In addition, no fungi were isolated from nematode-free orchards. In nematode-infested orchards, the following fungi were isolated: *Fusarium* sp., *Chaetomium* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Aspergillus niger*, *Nigrospora* sp., *Monilia* sp. and *Rhizoctonia* sp. Of the 68 *Fusarium* sp. isolates obtained, 46 originated from guava trees that were in Stage 3 of decline, while trees with mild symptoms (Stage 1) yielded only eight isolates.

From the samples received from different Brazilian regions, 448 root fragments were randomly selected and incubated. Fifty per cent were positive for *Fusarium* sp. Based on the morphology of the colonies in Petri dishes, 68 isolates (UENF/CF 234–301) were preserved for future studies (see Discussion).

The shoot and root system variables assessed in the first experiment are shown in Table 1. These data were also analysed by the Ward method and arranged in a dissimilarity dendrogram based on Euclidean distance (Fig. 1).

The shoot and root system variables assessed in the second experiment are shown in Table 2. The typical effect of *M. mayaguensis* and *F. solani* on the root system is shown in Fig. 2.

#### Discussion

The failure to isolate bacteria or fungi in samples from nematode-free orchard areas is consistent with the lack of reports of soil-borne bacteria and fungi parasitizing guava trees on their own in Brazil, despite the nationwide cultivation of this crop (Marques et al. 1994; Piccinin and Pascholati 1997). It is important to notice that the procedures and culture media used for bacterial and fungi isolation are well established for a wide range of root pathogens. In contrast, several fungi were isolated from nematode-parasitized roots, with the frequency of *Fusarium* sp. reaching up to 50% of the root fragments randomly picked for incubation.

In the first experiment, a fungus-only treatment was not included. Nonetheless, this experiment was important in unveiling the nature of guava decline. No root rot or root galls occurred in the control plants (T1) (Table 1), whereas abundant root galls and some rotting occurred in the plants inoculated with the nematode only (T2). *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. and *Rhizoctonia* sp., but not *Fusarium* sp., were re-isolated from these plants. In contrast, *Fusarium* sp. was abundantly re-isolated from T3 to T13. The combination of the nematode and the 11 *Fusarium* sp. isolates caused various degrees of damage to the guava plants, with more damage being associated with more root rot.

Table 1

Root and shoot variables of guava plants grown in microplots in the field in São João da Barra, Brazil, 5 months after inoculation with *Meloidogyne mayaguensis* alone or combined with *Fusarium solani*

| Treatments <sup>a</sup> | Root system                       |                         |                                |                                   | Number of leaves | Shoot weight (g) |        | Root weight (g) |        |
|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|------------------|------------------|--------|-----------------|--------|
|                         | Estimated length (m) <sup>b</sup> | Depth (cm) <sup>c</sup> | Total volume (ml) <sup>d</sup> | Unrotten volume (ml) <sup>d</sup> |                  | Fresh            | Dry    | Fresh           | Dry    |
| T1                      | 13.7 a <sup>e</sup>               | 56 a                    | 113.2 a                        | 113.3 a                           | 82.2 a           | 98.1 a           | 53.5 a | 107 a           | 23.4 a |
| T2                      | 11.2 a                            | 55.7 a                  | 140 a                          | 92.5 a                            | 72.7 a           | 113.2 a          | 70.3 a | 105.8 a         | 21.3 a |
| T3                      | 7.3 b                             | 55.5 a                  | 149.2 a                        | 74.3 b                            | 44.7 b           | 95.7 a           | 53.6 a | 138.5 a         | 27.7 a |
| T4                      | 5.1 b                             | 55.5 a                  | 136 a                          | 52.5 b                            | 36.5 b           | 66.9 b           | 37.6 b | 116.8 a         | 24.1 a |
| T5                      | 13.2 a                            | 52.4 a                  | 141.2 a                        | 64.3 b                            | 61.5 a           | 114.8 a          | 60 a   | 126.3 a         | 25.3 a |
| T6                      | 5.5 b                             | 52 a                    | 114.8 a                        | 55.3 b                            | 42.5 b           | 69.9 b           | 33.6 b | 101.4 a         | 18 a   |
| T7                      | 1.9 c                             | 40 b                    | 97.5 a                         | 8 b                               | 20.7 c           | 27.2 b           | 14.4 c | 81.9 b          | 13 b   |
| T8                      | 15.9 a                            | 58 a                    | 192.2 a                        | 135.3 a                           | 74.2 a           | 127.6 a          | 61 a   | 172.5 a         | 39.7 a |
| T9                      | 6.4 b                             | 50 a                    | 142.5 a                        | 54 a                              | 46 b             | 115 a            | 47.8 b | 131.2 a         | 27.5 a |
| T10                     | 12.9 a                            | 57.5 a                  | 165.5 a                        | 119.5 a                           | 73.2 a           | 138 a            | 62.7 a | 151.7 a         | 31.9 a |
| T11                     | 11.7 a                            | 52.6 a                  | 165 a                          | 99 a                              | 71 a             | 132.4 a          | 61.2 a | 136.6 a         | 28.2 a |
| T12                     | 6.5 b                             | 58.2 a                  | 161.2 a                        | 100 a                             | 66.2 a           | 106.1 a          | 45.4 b | 128.1 a         | 25.7 a |
| T13                     | 5.5 b                             | 53 a                    | 139.7 a                        | 53.5 b                            | 22.7 c           | 57.5 b           | 26.9 b | 129 a           | 25 a   |
| Calculated F            | 4.38                              | 2                       | 1.07                           | 2.68                              | 3.19             | 2.47             | 1.57   | 1.89            | 2.24   |
| CV (%)                  | 22.7                              | 6.8                     | 17.3                           | 36.3                              | 24.7             | 24.9             | 30.1   | 13.7            | 17.1   |

Values followed by the same letter in the columns are not significantly different when compared through the Scott-Knot method at  $P = 0.05$ . Treatment degrees of freedom (Df) = 12; Df for error = 39; total Df = 51.

<sup>a</sup>T1: uninoculated control; T2: nematode inoculation; T3–T13: inoculation with a combination of the nematode and one of the isolates UENF/CF 160–170.

<sup>b</sup>Calculated through the intersect method (Tennant 1975).

<sup>c</sup>Distance from the plant's collar region to the most distal rootlet.

<sup>d</sup>Calculated through water displacement in a graduated cylinder.

<sup>e</sup>Values are average of four replicates (plants).

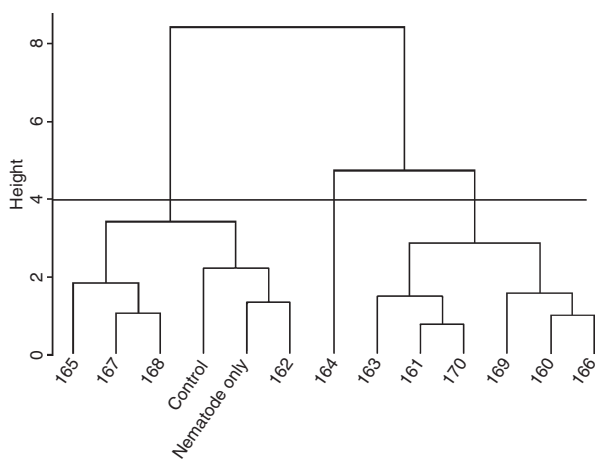


Fig. 1 Dissimilarity dendrogram based on Euclidean distance, calculated by the Ward method and based on the variables assessed in guava plants grown in microplots in the field, 5 months after inoculation with *Meloidogyne mayaguensis* alone or in combination with one of the *Fusarium* sp. isolates UENF/CF 160–170, in São João da Barra, Brazil. Uninoculated plants served as controls

The dissimilarity dendrogram (Fig. 1) indicated which *Fusarium* sp. isolates should be further investigated.

In the second experiment, no root rot occurred in the control plants (T1) (Table 2), whereas abundant root galls, some rotting and damage occurred in the plants inoculated with the nematode (T2). The fungi *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. and *Rhizoctonia* sp., but no *Fusarium* sp., were isolated from these plants. No rot occurred in the plants abundantly inoculated with the four isolates of *F. solani* (T3–T10), with virtually no effect on the other variables assessed. In sharp contrast,

significant ( $P < 0.05$ ) root rot and damage occurred when *M. mayaguensis* and *F. solani* were combined (T11–T14) (Fig. 2).

The synergistic effect of *M. mayaguensis* and *F. solani* in causing guava decline is clear, and this combination reflects the complex nature of the disease. Interestingly, a significant distinction ( $P < 0.05$ ) between T7–T10 and T11–T14 suggests that a physiological factor is involved in the susceptibility of *M. mayaguensis*-parasitized guava plants to root rot, because the physical injuries inflicted on the roots did not enable *F. solani* to cause decay. Furthermore, this study indicates that in guava decline it is *F. solani*, not *M. mayaguensis*, the agent that actually defines the extension of the damage caused to the plant. The mechanism(s) by which *M. mayaguensis* predisposes guava trees to *F. solani* decay is presently under investigation.

One aspect of guava decline that remains unsolved is the possible, although unlikely, secondary role of other soil-borne fungi in this complex disease. Indeed, *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. and *Rhizoctonia* sp. have occasionally been isolated from guava orchards, and they may have been responsible for the modest yet statistically significant ( $P < 0.05$ ) root rot observed in the second experiment (treatment T2), together with a reduction in foliar area and shoot weight.

The widespread incidence of guava decline in Brazil prompted the authors to request root samples from other Brazilian regions. The samples' late arrival precluded the use of the resulting *Fusarium* sp. isolates (UENF/CF 234–301) in the field experiments. A less time-consuming laboratory assay has been devised, which assesses the damage caused by these *Fusarium*

Table 2

Root and shoot variables of guava plants grown in microplots in the field in São João da Barra, Brazil, 6 months after inoculation with *Meloidogyne mayaguensis* or *Fusarium solani* alone or combined

| Treatments <sup>a</sup> | Foliar                           |                         | Root system volume (ml) <sup>b</sup> |          | Fresh weight (g) |             |
|-------------------------|----------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|----------|------------------|-------------|
|                         | Chlorophyll content <sup>c</sup> | Area (cm <sup>2</sup> ) | Total                                | Unrotten | Shoot            | Root system |
| T1                      | 48.9 a <sup>d</sup>              | 2171.7 a                | 139.3 a                              | 139.3 a  | 125.2 a          | 144 a       |
| T2                      | 46 a                             | 1425.5 b                | 104.5 a                              | 93.8 b   | 76.3 b           | 112 ab      |
| T3                      | 49.3 a                           | 1966.1 ab               | 122.8 a                              | 122.8 ab | 115.3 a          | 128 ab      |
| T4                      | 46.9 a                           | 1914.2 ab               | 103.3 a                              | 103.3 b  | 111.4 a          | 104.7 ab    |
| T5                      | 48.7 a                           | 1673.3 ab               | 111.5 a                              | 111.5 ab | 110.6 a          | 113.1 ab    |
| T6                      | 49.4 a                           | 1966.1 ab               | 111.8 a                              | 111.8 ab | 106 ab           | 117.6 ab    |
| T7                      | 48.3 a                           | 1913.5 ab               | 110.3 a                              | 110.3 ab | 111.5 a          | 114.2 ab    |
| T8                      | 47.6 a                           | 1873.4 ab               | 102.7 a                              | 102.7 b  | 106.6 ab         | 103.1 b     |
| T9                      | 47.7 a                           | 1968.7 ab               | 105.3 a                              | 105.3 ab | 119.4 a          | 118.1 ab    |
| T10                     | 48.6 a                           | 1868.4 ab               | 115.2 a                              | 115.2 ab | 109.4 ab         | 124.7 ab    |
| T11                     | 38.7 b                           | 364.5 c                 | 35.8 b                               | 2.7 c    | 28.6 c           | 43.1 c      |
| T12                     | 39.9 b                           | 284.5 c                 | 44.8 b                               | 2.7 c    | 29 c             | 51.3 c      |
| T13                     | 39.6 b                           | 239.9 c                 | 28.8 b                               | 0.3 c    | 21 c             | 37.3 c      |
| T14                     | 37.2 b                           | 420.6 c                 | 37 b                                 | 2.2 c    | 30.3 c           | 45.4 c      |
| Calculated F            | 21.55                            | 30.12                   | 22.20                                | 51.29    | 33.78            | 20.13       |
| CV%                     | 5.21                             | 23.21                   | 21.14                                | 22.34    | 19.63            | 20.31       |

Values followed by the same letter in the columns are not significantly different when compared through Tukey test at  $P = 0.05$ . Treatment degrees of freedom (Df) = 13; Df for error = 70; total Df = 83.

<sup>a</sup>T1: uninoculated control; T2: nematode inoculation; T3–T6: inoculation with *F. solani* isolates UENF/CF 160, 163, 164, or 170, separately; T7–T10: inoculation with the fungus isolates cited above, combined with physical injury of the roots with a knife; T11–T14: inoculation with the nematode, followed 21 days later with the fungus isolates cited above.

<sup>b</sup>Calculated through water displacement in a graduated cylinder.

<sup>c</sup>Measured with a chlorophyll meter SPAD-502<sup>®</sup> (Minolta).

<sup>d</sup>Values are average of six replicates (plants).



Fig. 2 Root system of guava seedlings at conclusion of a 6-month microplot experiment in São João da Barra, Brazil. From left to right: uninoculated control; inoculated with *Fusarium solani* only; inoculated with *F. solani* only combined with physical injury of the roots with a knife; inoculated with *Meloidogyne mayaguensis* only; and inoculated with *M. mayaguensis*, followed 21 days later with *F. solani*

sp. isolates to guava stem cuttings, having the *F. solani* isolates UENF/CF 160, 163, 164 and 170 as pathogenic standards. The results (unpublished) confirm the nationwide role of *F. solani* in guava decline.

Other suspected associations between nematodes and fungi affecting guava have been reported. In Venezuela, Suárez et al. (1998) reported the concomitant incidence of *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne javanica*, *Macrophomina*

*phaseolina*, *F. oxysporum*, *Pythium* sp. and *Phytophthora* sp. Suarez et al. (1999) claimed a synergistic effect of *Macrophomina* sp. and *Fusarium* sp. with *Meloidogyne* spp., although their experimental results do not support their claim of a disease complex involving these pathogens because no significant difference ( $P < 0.05$ ) was observed between the different combinations of those pathogens.

In India, Dwivedi and Dwivedi (1999) considered guava wilt to be a national problem, causing yield losses estimated to be c. 30%. This disease is reported to occur in nurseries and orchards. In the former, the leaves die acropetally, the stem stains blackish brown, and the seedlings die in patches throughout the nursery. In orchards, a partial or complete wilting of the tree is followed by drying and cracking of the hanging fruits, cracking of the tree bark and death. White rhizomorphs and black spots may be seen on the roots. From this report, it seems clear that guava wilt is a disease distinct from guava decline caused by *F. solani* and *M. mayaguensis* in Brazil.

According to Dwivedi and Dwivedi (1999) and Khan et al. (2001), the aetiology of guava wilt is uncertain, with the following fungi being listed as causal agents by different authors: *F. oxysporum* f.sp. *psidii*, *F. solani*, *F. longipes*, *F. moniliforme*, *Macrophomina phaseolina*, *M. phaseolina*, *Rhizoctonia bataticola*, *Cephalosporium* spp., *Cylindrocarpon* sp. and *Myxosporium psidii*.

Some authors have suspected that nematodes, particularly *Helicotylenchus dihystra*, could be involved with guava wilt (Khan et al. 2001). Although this nematode has been reported to cause damage to seedlings on its

own (Willers and Gretch 1986), surveys conducted in healthy and diseased orchards in five Indian States, as well as experiments under controlled conditions, failed to obtain convincing evidence that *H. dihystra* is involved in guava wilt. In conclusion, accurate studies seem necessary to better characterize the aetiology of guava wilt and to establish the role (if any) of plant-parasitic nematodes.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to Drs L.H. Pfenning (Universidade Federal de Lavras, Brazil) and Robert Miller (Universidade de Brasília, Brazil) who identified the *F. solani* isolates used in this work, and to Drs. Rui G. Carneiro, Guilherme L. Asmus and José M. C. Castro from Iapar, Embrapa Agropecuária Oeste and Embrapa SemiÁrido, respectively, for supplying samples from different regions of Brazil.

#### References

- Abawi GS, Chen J. (1998) Concomitant pathogen and pest interactions. In: Plant and Nematode Interactions. Agronomy Monograph no 36. Madison, WS, USA, pp 135–158.
- Back MA, Haydock PPJ, Jenkinson P. (2002) Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soil-borne pathogens. *Plant Pathol* **51**:683–697.
- Barnett HL, Hunter BB. (1972) *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. St Paul, MN, USA, APS Press.
- Burgess LW, Summerell BA, Bullock S, Gott KP, Backhouse D. (1994) *Laboratory Manual for Fusarium Research*. Sydney, NSW, Australia, University of Sydney.
- Dhingra OD, Sinclair JB. (1995) *Basic Plant Pathology Methods*. Boca Raton, FL, USA, CRC Press.
- Dwivedi SK, Dwivedi P. (1999) Wilt disease of guava: a national problem. *J Appl Hort* **1**:151–154.
- Ellis MB. (1971) *Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew, Surrey, UK, Commonwealth Mycological Institute.
- Ellis MB. (1976) *More Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew, Surrey, UK, Commonwealth Mycological Institute.
- Evans K, Haydock PPJ. (1993) Interactions of nematodes with root-rot fungi. In: Khan MW. (ed) *Nematode Interactions*. London, UK, Chapman and Hall, pp 104–133.
- Gomes VM. (2007) Meloidoginose da goiabeira: estudos sobre a sua patogênese e formas de convívio com a doença a campo. Campos dos Goytacazes, Brazil, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, MS Thesis.
- Gomes VM, Souza RM, Silva MM, Dolinski C. (2008) Caracterização do estado nutricional de goiabeiras em declínio parasitadas por *Meloidogyne mayaguensis*. *Nematol Bras* **32**:154–160.
- Gomes VM, Souza RM, Corrêa FM, Dolinski C. (2010) Management of *Meloidogyne mayaguensis* in commercial guava orchards with chemical fertilization and organic amendments. *Nematol Bras* **34**, in press.
- Hussey RS, McGuire JM. (1987) Interaction with other organisms. In: Brown RH, Kerry BR. (eds) *Principles and Practice of Nematode Control in Crops*. Sydney, NSW, Australia, Academic Press, pp 293–328.
- Kado CI, Heskett MG. (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* **60**:969–979.
- Khan RM, Kumar S, Reddy PP. (2001) Role of plant parasitic nematode(s) and fungi in guava wilt. *Pest Manag Hort Ecosyst* **7**:152–161.
- Mai WF, Abawi GS. (1987) Interactions among root-knot nematodes and *Fusarium* wilt fungi on host plants. *Annu Rev Phytopathol* **25**:317–338.
- Mardia AKV, Kent JT, Bibby JM. (1997) *Multivariate Analysis*. London, UK, Academic Press.
- Marques AS, Robbs CF, Boiteux LS, Parente PMC. (1994) *Índice de Fitobacterioses Assinaladas no Brasil*. Brasília, Brazil, EMBRAPA.
- Pereira FM. (1995) *Cultura da Goiabeira*. Jaboticabal, Brazil, FUNEP.
- Pereira FM, Souza RM, Souza PM, Dolinski C, Santos GK. (2009) Estimativa do impacto econômico e social direto de *Meloidogyne mayaguensis* na cultura da goiaba no Brasil. *Nematol Bras* **33**:176–181.
- Piccinin EL, Pascholati SF. (1997) Doenças da goiabeira (*Psidium guajava*). In: Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM. (eds) *Manual de Fitopatologia. Vol 2, Doenças das Plantas Cultivadas*. São Paulo, Brazil, Editora Agronômica Ceres, pp 335–337.
- Powell NT. (1971) Interactions between nematodes and fungi in disease complexes. *Annu Rev Phytopathol* **9**:253–274.
- Romeiro RS. (2001) *Métodos em Bacteriologia de Plantas*. Viçosa, Brazil, Editora UFV.
- Suarez ZH, Rosales LC, Rondon A. (1999) Efecto sinérgico de los hongos *Macrophomina* y *Fusarium* con el nematodo agallador *Meloidogyne* spp. sobre un decaimiento en guayabo. *Nematol Mediterr* **27**:79–82.
- Suárez ZH, Rosales LC, Rondón A, González MS. (1998) Histopatología de raíces de *Psidium guajava* atacada por el nematodo *Meloidogyne incognita* raza 1 y los hongos *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum*. *Fitopatol Venezolana* **11**:44–47.
- Sutton BC. (1980) *The Coelomycetes*. Kew, Surrey, UK, Commonwealth Mycological Institute.
- Tennant DA. (1975) Test of a modified line intersect method of estimating root length. *J Ecol* **63**:995–1001.
- Webster JM. (1985) Interactions of *Meloidogyne* with fungi on crop plants. In: Sasser JN, Carter CC. (eds) *An Advanced Treatise on Meloidogyne. Vol 1 – Biology and Control*. Raleigh, NC, USA, University of North Carolina Department of Plant Pathology and USAID, pp 183–192.
- Willers P, Gretch NM. (1986) Pathogenicity of the spiral nematode *Helicotylenchus dihystra* to guava. *Plant Dis* **70**:352.