

## Seleção de modelos responsivos para parâmetros de resistência de acessos de melancia a *Meloidogyne enterolobii*

Nickson Fernandes de Oliveira Carvalho<sup>1</sup>, Murilo dos Santos Ferreira<sup>2</sup>, Elivelton Odilon Alves de Araújo<sup>3</sup>, Edlaine Sheyla Azevedo do Patrocínio, Amanda Karoliny Fernandes Ramos, Caliane Lília Leite do Nascimento, Mirela Raissa Ferreira dos Santos, Larissa de Oliveira Fontes<sup>4</sup>, Micaelly Regis da Costa<sup>8</sup>, José Hamilton da Costa Filho<sup>9</sup>

### Resumo

O objetivo foi estimar um modelo linear mais responsivo para parâmetros genéticos de resistência de acessos de melancia à *Meloidogyne enterolobii* utilizando a metodologia de modelos mistos. Para isso, foi conduzido um experimento com três acessos de melancia coletados no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. O delineamento experimental utilizado foi completamente ao acaso, com dez repetições. Cada parcela foi constituída de um vaso plástico, contendo solo autoclavado inoculado com 2.200 ovos de *M. enterolobii*, e uma planta. As variáveis avaliadas foram massa do sistema radicular, número de ovos, número de massas de ovos e o fator de reprodução do nematoide. Ao final do ensaio, foi determinado o modelo linear mais responsivo, bem como foi observada variação entre os parâmetros estimados e os preditos nos caracteres Massa, NMO, NO e FR nos acessos A18, A8 e A25 nos dois experimentos.

**Palavras-chave:** análise de variância, efeito misto, *Citrullus lanatus*.

1 Graduando em Engenharia Agrônoma, Escola Agrícola de Jundiá (UAECA/EAJ/UFRN). CEP: 59280-000, Macaíba-RN. E-mail: [agronickson@gmail.com](mailto:agronickson@gmail.com); 2 Graduando em Engenharia Agrônoma, Escola Agrícola de Jundiá (UAECA/EAJ/UFRN). CEP: 59280-000, Macaíba-RN; 3 Graduando em Engenharia Agrônoma, Escola Agrícola de Jundiá (UAECA/EAJ/UFRN). CEP: 59280-000, Macaíba-RN; 4 Graduanda em Engenharia Agrônoma, Escola Agrícola de Jundiá (UAECA/EAJ/UFRN). CEP: 59280-000, Macaíba-RN; 4 Graduanda em Engenharia Agrônoma, Escola Agrícola de Jundiá (UAECA/EAJ/UFRN). CEP: 59280-000, Macaíba-RN; 5 Graduanda em Engenharia Agrônoma, Escola Agrícola de Jundiá (UAECA/EAJ/UFRN). CEP: 59280-000, Macaíba-RN; 6 Graduanda em Engenharia Agrônoma, Escola Agrícola de Jundiá (UAECA/EAJ/UFRN). CEP: 59280-000, Macaíba-RN; 7 Engenheira Agrônoma, Instituto Federal do Ceará (IFCE). CEP: 62930-000, Limoeiro do Norte-CE; 8 Eng. Agr., D.Sc., Professora Adjunta I no Colegiado de Engenharia Agrônoma da Universidade Federal do Piauí (CPCE/UFPI). CEP: 64900-000, Bom Jesus-PI; 9 Eng. Agr., D.Sc., Professor Adjunto I no Colegiado de Engenharia Agrônoma da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (EAJ/UFRN). CEP: 59280-000, Macaíba-RN.

## Introdução

A melancia *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum e Nakai é uma espécie pertencente à família Cucurbitaceae cultivada em quase todo o território nacional. A região Nordeste tem uma produção média estimada de 54.117 toneladas (IBGE, 2014), sendo os estados da Bahia, Rio Grande do Norte e Ceará os maiores produtores com, respectivamente, 122,320; 121,688 e 82,424 t. Contudo, problemas causados por *Meloidogyne enterolobii* figuram como fator limitante potencial para o cultivo.

Dentre as prováveis tecnologias que podem ser utilizadas para mitigação deste problema de difícil controle, figura o melhoramento genético da espécie. Contudo avanços no desenvolvimento de variedades resistentes, ou mesmo tolerantes, demanda a determinação de parâmetros de resistência de acessos para elaboração de estratégias de melhoramento.

Contudo, além da matéria prima desejada para identificação de genes de interesse, subamostras representativas de populações denominadas acessos, devem ser utilizados métodos estatísticos de processamento de dados que retornem resultados robustos. Para tanto a metodologia de modelos mistos é aplicada, de forma que o efeito aleatório, resultantes dos acessos, é inserido em modelos de efeitos fixos para estimação de parâmetros.

Observado o exposto, este experimento foi realizado com o objetivo de estimar um modelo linear mais responsivo para parâmetros genéticos de resistência de acessos de melancia à *Meloidogyne enterolobii* utilizando a metodologia de modelos mistos.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado na em casa de vegetação do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Semiárido, município de Petrolina, Pernambuco.

Os acessos foram obtidos pela coleta de amostras de sementes armazenadas por produtores da agricultura tradicional do estado do Rio Grande do Norte (12 acessos) e de plantas de crescimento espontâneo em Estações Experimentais (sete acessos) e outras áreas (um acesso). As coletas foram feitas nos municípios de Apodi (Latitude: 5° 38' 58" Sul e Longitude: 37° 47' 45" Oeste), Cerro Corá (Latitude: 6° 2' 44" Sul e Longitude: 36° 20' 52" Oeste) e Tibau do Sul (Latitude: 6° 11' 23" Sul e Longitude: 35° 5' 29" Oeste).

Foram realizados dois experimentos de avaliação de reação ao nematoide *M. enterolobii*. O primeiro ensaio compreendeu os meses de março a maio do ano de 2011 e o segundo os meses de abril a junho do ano de 2012. O segundo ensaio foi realizado para avaliar a reafirmação dos resultados observados no primeiro.

A produção de mudas foi realizada em bandejas de poliestireno expandido com 128 células. O substrato utilizado foi um composto comercial a base de vermiculita expandida e matéria orgânica de origem vegetal. Aos quatorze dias, da semeadura as mudas foram transplantadas para o solo contido nos vasos plásticos.

Para obtenção do inóculo foram coletadas raízes infectadas com o fitonematoide em áreas de produção de goiabeira (*Psidium guajava* L. cultivar Paluma) no município de Petrolina, e, por meio da revelação do fenótipo de  $\alpha$ -esterase, segundo a técnica da eletroforese vertical em gel de poliácridamida (Alfenas; Brune, 2006), foi confirmada a espécie *M. enterolobii* presente na amostra.

A extração de ovos para a preparação do inóculo foi realizada ao décimo sétimo dia da semeadura de acordo com a metodologia proposta por Coolen and D'herde (1972). Foram utilizadas alíquotas de 1 mL, nas quais foram feitas a contagem de ovos e a calibração da suspensão para inoculação das plantas em placa de petri utilizando microscópio.

A inoculação foi realizada ao quarto dia do transplantio, colocando-se 1,5 mL da suspensão contendo 2.200 ovos por parcela em dois poços distantes cinco centímetros do colo da planta, a uma profundidade de aproximadamente dois centímetros. O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivar ‘Santa Cruz Kada Gigante’ foi empregado como testemunha para confirmar a viabilidade do inóculo.

Ao décimo sétimo dia do transplantio, as plantas foram tutoradas com fitilhos plásticos. Os ramos foram conduzidos no sentido vertical até o final do experimento, sendo o ajuste dos tutores realizado semanalmente.

O primeiro experimento foi conduzido até os 52 dias após a inoculação. A colheita foi realizada aplicando-se um corte no colo das plantas a cinco centímetros acima da superfície do solo. Cada planta colhida foi armazenada individualmente em saco plástico e encaminhada para avaliação em laboratório.

As variáveis determinadas foram: massa de sistema radicular (Massa) em g, o número de massas de ovos por sistema radicular (NMO), o número de ovos por sistema radicular (NO) e o fator de reprodução  $FR = \frac{NO_f}{NO_i}$ , obtido pelo quociente entre a população final (NO<sub>f</sub>) e a população inicial (NO<sub>i</sub>) do nematoide.

Acessos com FR médio menor do que um foram considerados resistentes ( $FR < 1$ ) e com FR maior ou igual a um ( $FR \geq 1$ ) suscetíveis, conforme Moura e Pedrosa (1987).

Ambos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso com três tratamentos e dez repetições, e procedimentos de instalação, condução e avaliação idênticos. Os três tratamentos corresponderam aos acessos A18, A8 e A25. Cada parcela experimental correspondeu a uma planta por vaso contendo três litros de solo textura média autoclavado, posteriormente inoculado com 2200 ovos de *Meloidogyne enterolobii*.

O processamento de dados foi realizado utilizando a metodologia de modelos lineares generalizados mistos, utilizando a função “lmer” do pacote lme4 (Bates et al., 2011) do programa R (R CORE TEAM, 2015). Foram utilizados os critérios de verossimilhança penalizada de Akaike (AIC) e Bayesiano (BIC), e o teste da razão de verossimilhança (LRT) para seleção do modelo linear mais responsivo.

Os modelos lineares explicativos da reação de resistência dos acessos foram o modelo misto Ma:  $[Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijk}]$ , onde:  $Y_{ijk}$  – é o valor observado na parcela que recebeu o i-ésimo nível do fator acessos (aleatório), o j-ésimo nível do fator experimentos (fixo) e o k-ésimo nível do fator plantas dentro de acessos (aleatório);  $\mu$  – média geral, comum a todas as observações (fixo);  $\alpha_i$  – efeito do nível i (i=1, 2, ..., a) do fator acessos;  $\beta_j$  – efeito do nível j (j = 1, 2, ..., b) do fator experimentos;  $\gamma_k$  – efeito do k-ésimo nível (k = 1, 2, ..., r) do fator plantas (aleatório);  $(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$  – efeito da interação do i-ésimo nível do fator acessos, j-ésimo nível do fator experimentos e do k-ésimo nível (k = 1, 2, ..., r) do fator plantas dentro de acessos (aleatório);  $\varepsilon_{ijk}$  – o erro aleatório associado à observação  $Y_{ijk}$ , tal que  $\varepsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma^2)$  e o modelo misto generalizado Mb:  $[Y_{ijl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}]$ , onde:  $Y_{ijk}$  – é o valor observado na parcela que recebeu o i-ésimo nível do fator acessos (aleatório) e o j-ésimo nível do fator experimentos (fixo);  $\mu$  – média geral, comum a todas as observações (fixo);  $\alpha_i$  – efeito aleatório do nível i (i=1, 2, ..., a) do fator acessos;  $\beta_j$  – efeito fixo do nível j (j = 1, 2, ..., b) do fator experimentos;

$(\alpha\beta)_{ij}$  – efeito da interação do i-ésimo nível do fator acessos e j-ésimo nível do fator experimentos;  $\varepsilon_{ijk}$  – o erro aleatório associado à observação  $Y_{ijk}$ , tal que  $\varepsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma^2)$ .

Sugerido o modelo responsivo, foi aplicado o teste F da análise de variância (anava) para o efeito fixo (experimentos). Para os efeitos aleatórios foi realizada a análise gráfica da distribuição dos resíduos para cada modelo responsivo significativo em cada acesso para todos os caracteres avaliados, e a análise da deviance. Em seguida foram estimadas as médias as médias para o modelo fixo e preditas para o modelo misto, e aplicado o teste de comparações de médias de Tukey ( $p < 0,05$ ) para as primeiras.

### Resultados e Discussão

Para os caracteres Massa, NMO e NO o modelo Ma foi o mais responsivo com base no teste de razão de verossimilhança LRT. Já para o FR, o modelo mais responsivo pelos critérios de AIC, BIC e razão de verossimilhança (LRT) foi o Mb, sendo os menores valores observados para os dois primeiros em relação ao modelo Ma (Tabela 1).

**Tabela 1.** Valores dos critérios de Aike (AIC) e Bayesiano (BIC), deviance e razão de verossimilhança (LRT) para os efeitos aleatórios dos modelos lineares Ma e Mb

<sup>1</sup> Mod	G.L.	MASSA				NMO			
		AIC	BIC	Deviance	LRT	AIC	BIC	Deviance	LTR
Ma	5	321,1	331,5	311,1	0,04**	592,1	602,6	582,1	8,7**
Mb	5	321,1	331,5	311,1	0,00	592,1	602,6	582,1	0,0
		NO				FR			
Ma	5	1397,0	1407,4	1387,0	2,5**	1397	1407,4	1387,0	0,1
Mb	5	1397,0	1407,4	1387,0	0,0	510,6	521,1	500,6	886,3**

\*\* , \* significativo a 1% e 5% pelo teste de qui-quadrado respectivamente; <sup>ns</sup> não significativo.

<sup>1</sup>Modelo linear.

Neste trabalho, o modelo Ma considerou a variação aleatória de parcelas (plantas) dentro de cada tratamento, verificada na explicação dos caracteres Massa, NO e NMO. De forma descritiva, verificou-se que a distribuição dos resíduos dos acessos, em cada modelo, variou de forma aleatória e independente, e assimétrica em todos os caracteres nos modelos Ma e Mb (Figura 1).

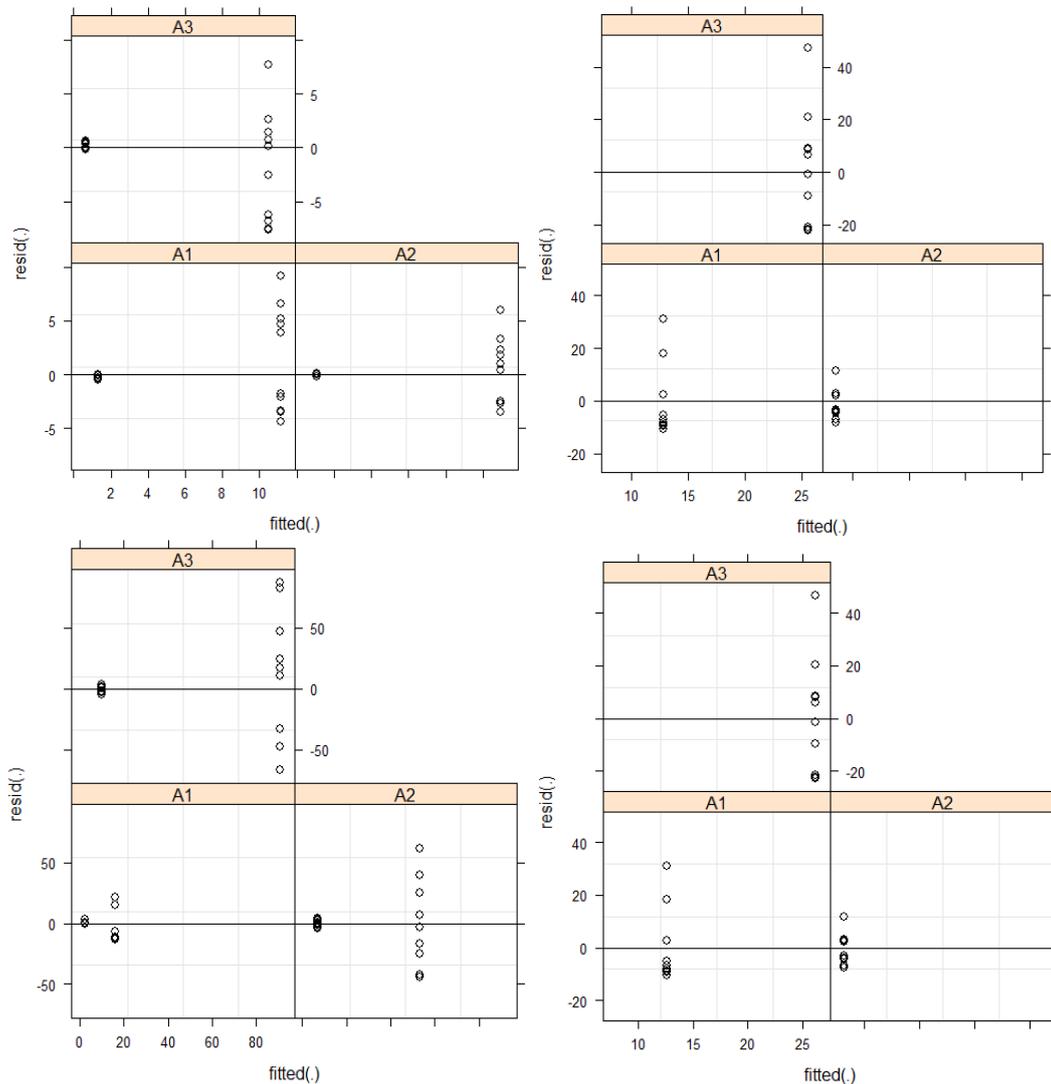


Figura 2 – Distribuição dos resíduos dos modelos lineares mistos Ma (A, B e C) para massa de sistema radicular (A), Número médio de massas de ovos (B) e número médio de ovos em sistema radicular de acessos (C), e Mb para o modelo linear generalizado misto do fator de reprodução (D) do nematoide.

Distribuições amostrais assimétricas dificultam a estimação de parâmetros e a inferência estatística sobre parâmetros de uma dada população. Em vários casos o ajustamento da distribuição amostral a uma dada distribuição teórica se torna quase impraticável, o que acontece frequentemente quando a presença de *outliers*.

Em experimentos avaliando a resistência de acessos a fitopatógenos, além da variação entre genótipos, frequentemente observa-se variação dentro. A variação dentro nem sempre deve ser definida como um mau resultado, pois há probabilidade de que um ou vários *outliers* representem genótipos superiores. Neste trabalho, caracterizados por baixos FR. Neste trabalho, a presença de plantas com baixo FR, dentro de um acesso, caracterizado como suscetível por ter elevado FR médio, normalmente passam despercebidas em experimentos agrícolas desta natureza.

Para a análise isolada do efeito fixo (experimentos I e II), não foi verificado efeito significativo para os caracteres avaliados, provavelmente pela similaridade entre os ambientes (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resumo da análise univariada de variância para o efeito fixo (experimentos) dos modelos lineares para massa de sistema radicular (Massa), Número médio de massas de ovos (NMO) e número médio de ovos em sistema radicular de acessos (NO) e fator de reprodução (FR) do nematoide em dois experimentos (Experimentos)

Caráter	G.L	QM (Experimentos)
Massa	1	1458,8 <sup>ns</sup>
Número de massas de ovos	1	1,8 <sup>ns</sup>
Número de ovos	1	33054 <sup>ns</sup>
Fator de reprodução	1	4,8 <sup>ns</sup>

<sup>ns</sup>Não significativo pelo teste F de Snedecor a 5% de probabilidade. QM: Quadrado médio da análise univariada de variância obtido pelo método de mínimos quadrados.

Dentre métodos estatísticos, a metodologia de modelos mistos tem sido recomendada para processamento de bancos de dados resultantes de experimentos agrícolas, com culturas anuais, repetidos em ambientes diferentes, como abordado por Pimentel et al. (2014), BORGES et al. (2010), Pinheiro et al. (2013), Freitas et al. (2013), Barros et al. (2011) e Bertoldo et al. (2009).

Contudo, neste ensaio, a utilização do segundo ambiente objetivou apenas a investigação da reafirmação da reação de expressão dos caracteres Massa, NMO, NO e FR pelos acessos A18, A8 e A25. Isto, pois as condições ambientais nos dois experimentos foram idênticas.

No presente trabalho, a variação observada na expressão dos caracteres pelos genótipos não deve ser atribuída exclusivamente ao ambiente, mas também a variabilidade genética que constitui cada acesso (subamostra).

Médias estimadas em todas as variáveis aproximaram-se, em valores absolutos, das médias preditas utilizando a metodologia de modelos mistos. De forma geral, observou-se que os parâmetros estimados utilizando os dados do experimento aproximaram-se dos preditos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Médias estimadas ME e preditas (MP) para massa de sistema radicular (Massa), Número médio de massas de ovos (NMO) e número médio de ovos em sistema radicular de acessos (NO) e fator de reprodução (FR) do nematoide em dois experimentos (Experimentos)

Acessos	Experimento I							
	Massa		NMO		NO		FR	
	ME	MP	ME	MP	ME	MP	ME	MP

A18	12,6a	11,1	10,5a	22	26975b	29401,5	12,3	15,5
A8	11,3ab	10,9	53abc	53	15935a	21975,8	7,2	15,4
A25	8,6abc	10,5	96,4c	84,9	60250c	51782,7	27,4	15,6
r	0,99		0,99		1			0,96
Acessos				Experimento II				
A18	1,1a	10,8	2,9a	55,5	145,4b	34399,8	12,3	15,5
A8	1,04ab	10,8	6,9abc	53,7	116c	34416	7,2	15,4
A25	0,8abc	10,9	9,3c	50,7	224,2a	34344,2	27,4	15,6
r	-0,99		-0,96		-0,99			0,96

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de comparações múltiplas de Tukey a 5% de probabilidade. Massa - massa do sistema radicular (g); NMO - número de massas de ovos; NO - número de ovos; FR - fator de reprodução do nematoide. r - coeficiente de correlação de Pearson.

De forma geral, bancos de dados resultantes de experimentação agrícola são permeados pela variação dentro de tratamentos. Na experimentação vegetal, a intensidade da variação é mais acentuada em experimentos em que os tratamentos avaliados são genótipos de indivíduos com constituição variável, sejam estas variedades ou acessos.

### Conclusão

Foi observada variação entre os parâmetros estimados e os preditos nos caracteres Massa, NMO, NO e FR nos acessos A18, A8 e A25 nos dois experimentos.

### Referências Bibliográficas

ALFENAS, A.C.; BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). 2.ed. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 2006. cap. 4, p. 151-182.

BARROS, F.R.; ANUNCIÇÃO FILHO, C.J. da; ROCHA, M. de M.; NUNES, J.A.R.; SILVA, K.J.D. e; FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q. Potencial genético de progênies de feijão-caupi segregantes quanto ao tipo da inflorescência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.182-189, 2011.

BATES, D.; MAECHLER, M.; BOLKER, B. lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes. 2011. Disponível em: <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>. Acessado em: 16 de fevereiro de 2016.

BERTOLDO, J.G.; COIMBRA, J.L.M.; GUIDOLIN, A.F.; NODARI, R.O.; ELIAS, H.T.; BARILI, L.D.; VALE, N.M. do; ROZZETTO, D.S. Rendimento de grãos em feijão preto: o

componente que mais interfere no valor fenotípico é o ambiente. **Ciência Rural**, v.39, p.1974-1982, 2009.

BORGES, V.; SOARES, A.A.; REIS, M.S.; RESENDE, M.D.V.; CORNÉLIO, V.M.O.; LEITE, N.A.; VIEIRA, A.R. Desempenho genotípico de linhagens de arroz de terras altas utilizando metodologia de modelos mistos. **Bragantia**, v.69, p.833-841, 2010.

COOLEN, W.A.; D'HERDE, C.J. **Method for the quantitative extraction of nematode plant tissue**. Ghent State Agriculture Research Center. 1972, 777p.

FREITAS, I.L. de J.; AMARAL JÚNIOR, A.T. do; VIANA, A.P.; PENA, G.F.; CABRAL, P. da S.; VITTORAZZI, C.; SILVA, T.R. da C. Ganho genético avaliado com índices de seleção e com REML/Blup em milho-pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.1464-1471, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Cidades: lavoura temporária. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/home.php>. Acesso em 17 de fevereiro de 2016.

MOURA R.M.; PEDROSA E.M.R. Reações de cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em relação ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* (Nematoda: Heteroderidae). **Nematologia Brasileira**, v.11, p. 215-225 1987.

PIMENTEL, A.J.B.; GUIMARÃES, J.F.R.; SOUZA, M.A.; RESENDE, M.D.V.; MOURA, L.M.; ROCHA, J.R.A.S.C.R.; RIBEIRO, G. Estimação de parâmetros genéticos e predição de valor genético aditivo de trigo utilizando modelos mistos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. vol. 49, n. 11, 2014.

PINHEIRO, L.C. de M.; GOD, P.I.V.G.; FARIA, V.R.; OLIVEIRA, A.G.; HASUI, A.A.; PINTO, E.H.G.; ARRUDA, K.M.A.; PIOVESAN, N.D.; MOREIRA, M.A. Parentesco na seleção para produtividade e teores de óleo e proteína de soja via modelos mistos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.1246-1253, 2013.

R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.