UNIOESTE - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS MARECHAL CÂNDIDO RONDON
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
NÍVEL MESTRADO

VANESSA APARECIDA ANTES

PARASITISMO DE *Meloidogyne* spp. EM PLANTAS NATIVAS DO OESTE PARANAENSE E VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Meloidogyne incognita* RAÇA 3

MARECHAL CÂNDIDO RONDON
AGOSTO/2008

VANESSA APARECIDA ANTES

PARASITISMO DE *Meloidogyne* spp. EM PLANTAS NATIVAS DO OESTE PARANAENSE E VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Meloidogyne incognita* RAÇA 3

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Nível Mestrado, para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR: PROF. DR. CLEBER FURLANETTO

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ADILSON RICKEN SCHUELTER

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

AGOSTO/2008

DEDICATÓRIA

Dedico à todas as pessoas que acreditam que para vencer na vida não é importante chegar em primeiro. Simplesmente é preciso chegar, levantando a cada vez que cair pelo caminho. Em especial, mãe, pai e mano.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pela vida, saúde e por não me deixar abater em nenhum momento.

À minha família (mãe, pai, irmão) pela educação, caráter e incentivo. À vocês devo tudo o que tenho e tudo o que sou hoje.

Ao meu namorado Jackson, que sempre esteve ao meu lado acreditando em mim.

Especialmente ao Prof. Cleber Furlanetto pela oportunidade, ensinamentos, exemplo de garra e otimismo. Meus mais sinceros agradecimentos pela orientação e pela confiança durante a realização dos trabalhos.

Ao Prof. Adilson Ricken Schuelter pela co-orientação, colaboração, disponibilidade, e contribuição de forma grandiosa a este trabalho.

À Profª Lucimar Pereira Bonett pela confiança e cedência do laboratório e de materiais necessários à realização dos experimentos.

À UNIOESTE pela oportunidade concedida.

À UNIPAR pela parceria que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos amigos Ely, Tânia, Heloísa, Anna Paula, Laline, Marta, Vanessa Decker, Aletéia, Clair e Érica pela ajuda e colaboração na realização dos trabalhos e, principalmente pela amizade e convivência durante todo esse período. Sem a ajuda destes “anjos” esse trabalho não teria sido concluído. Obrigada!

A todos os professores e colegas de disciplinas, pela troca de informação, experiência e por agradáveis dias de convivência.

Enfim, a todos que estiveram presentes e participaram de forma direta ou indireta de mais esta conquista, os mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

Objetivou-se com o presente trabalho estudar o parasitismo de *Meloidogyne incognita* em plantas nativas do oeste paranaense, bem como a variabilidade genética de populações de *M. incognita* raça 3 pela técnica RAPD. Trinta e seis espécies de plantas nativas foram analisadas com relação à infecção natural por *Meloidogyne* spp. A identificação de *Meloidogyne* foi feita com base na configuração perineal de fêmeas maduras e no fenótipo para a isoenzima esterase. Espécies nativas com ausência de galhas no sistema radicular foram inoculadas com 1.000 ovos e/ou J2 de uma população de campo de *M. incognita*. Após 60 dias da inoculação, as plantas foram avaliadas com relação ao número de galhas e número de ovos e/ou juvenis por raiz. A variabilidade genética de diferentes populações monoespecíficas de *M. incognita* raça 3 do noroeste paranaense foi estudada pela técnica RAPD com o teste de 10 primers. As plantas nativas hospedeiras de *M. incognita* foram Rabo-de-Bugio (*Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl.), Ipê Roxo (*Tabebuia impetiginosa* Mart. Ex DC. Standl), Sanga D'água (*Croton urucurana* Boill), Ipê Amarelo (*Tabebuia ahrysotricha* Mart ex DC. Standl.), Genipapo (*Genipa americana* L.), Ariticum Comum (*Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.) e Aroeira Vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi.). Já *M. javanica* foi encontrado parasitando Café de Bugre (*Cordia ecalyculata* Vell.), Guatambu Vermelho (*Aspidosperma subincanun* Mart.) e Tarumã Branco (*Cytrarexllum myruanthum* Cham.). A análise do polimorfismo do DNA possibilitou a detecção de variabilidade genética para diferentes populações de uma mesma raça (3) de *M. incognita*, permitindo a separação das populações em 5 grupos genéticos, através de reações com os primers AK20, A10, AQ12, AS08 e F01.

Palavras-chave: Plantas Nativas, RAPD, *Meloidogyne incognita, Meloidogyne javanica,* diversidade genética.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the parasitism of *Meloidogyne incognita* on native plants from Western Paraná, Brazil, as well as to assess the genetic variability among different populations belonging to the race 3 of this nematode by RAPD technique. Natural infection was studied in thirty six native plant species, which were identified on the basis of the perineal pattern from mature females and esterase phenotype. Native species that showed no infestation on the root system were inoculated with 1.000 eggs and/or J2 of *M. incognita*. After 60 days, the inoculated plants were evaluated regarding the number of galls and the number of eggs/or J2 per root. The genetic variability from different single female populations of M. incognita race 3 was studied by RAPD technique, having been tested 10 primers. The native plants that were susceptible to *M. incognita* parasitism were Rabo-de-Bugio (*Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl.), Ipê Roxo (*Tabebuia impetiginosa* Mart. Ex DC. Standl), Sanga D'água (*Croton urucurana* Boill), Ipê Amarelo (*Tabebuia ahrysotricha* Mart ex DC. Standl.), Genipapo (*Genipa americana* L.), Ariticum Comum (*Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.) and Aroeira Vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi.). On the other hand, *M. javanica* was found parasiting Café de Bugre (*Cordia ecalyculata* Vell.), Guatambu Vermelho (*Aspidosperma subincanun* Mart.) and Tarumã Branco (*Cytrarexllum myruanthum* Cham.). The DNA polymorphism showed that there was genetic variability among populations from a same race (3) of *M. incognita*, allowing the separation of them into five genetic groups, through reactions with the primers (O)AK20, A10, AQ12, AS08 and (OP)F01.

Keywords: native plants, RAPD, *Meloidogyne incognita, Meloidogyne javanica, g*enetic diversity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Temperaturas médias, mínimas e máximas semanais observadas de março a junho de 2008, em Marechal Cândido Rondon. 25

Figura 2. Médias, mínimas e máximas de Umidade Relativa do Ar observadas de março a junho de 2008, em Marechal Cândido Rondon.....25

Figura 3. Galhas no sistema radicular de plantas nativas do oeste paranaense: 1. Ipê amarelo; 2. Ipê roxo; 3.Tarumã Branco (Naturalmente infectadas); 4. Ariticum Comum; 5. Aroeira Vermelha (Após inoculação com *M. incognita* 33

Figura 4. Fenótipos de esterase para *M. incognita* (I1) e *M. javanica* (J3) em seis espécies nativas do oeste paranaense: 1 – Rabo-de-Bugio; 2 – Sanga d'água; 3 - Ipê Roxo; 4 – Café de Bugre **(A)**; 5 – Tarumã Branco; 6 - Guatambu Vermelho **(B)** 36

Figura 5. Configuração Perineal de *M. incognita* (A) e *M. javanica* (B) encontrada em espécies de plantas nativas.....36

Figura 6. Padrão de bandas monomórficas obtido pela amplificação de DNA através da técnica RAPD com os primers K12 **(A)** e A07 **(B)**.....40

Figura 7. Padrão de bandas monomórficas obtido pela amplificação de DNA através da técnica RAPD com os primers AB03 **(A)** e H01 **(B)**. 40

Figura 8. Padrão de bandas monomórficas obtido pela amplificação de DNA através da técnica RAPD com o primer A20. 40

Figura 9. Padrão de bandas polimórficas obtido pela amplificação de DNA através da técnica RAPD com os primers A10 **(A)** e AQ12 **(B)**.. 41

Figura 10. Padrão de bandas polimórficas obtido pela amplificação de DNA através da técnica RAPD com os primers AS08 **(A)** e AK20 **(B)**.....41

Figura 11. Padrão de bandas polimórficas obtido pela amplificação de DNA através da técnica RAPD com o primer F01.....41

Figura 12. Dendrograma originado da análise das sete populações de *M. incognita* raça 3 a partir dos primers AK20, A10, AQ12, AS08 e F01 segundo o método UPGMA. Origem das populações: 1 – Altônia, 2 – Iporã, 3 – Moreira Sales, 4 – Pérola, 5 – Mariluz, 6 – Santa Lúcia e 7 – Umuarama.....42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Plantas nativas do Oeste do Paraná estudadas com relação ao parasitismo de *Meloidogyne* spp 23

Tabela 2. Seqüência de primers *Invitrogen* utilizados em reações de RAPD-PCR para o estudo da variabilidade genética de populações de *M. incognita* raça 3 29

Tabela 3. Plantas nativas naturalmente infectadas por *Meloidogyne* spp e avaliadas com relação ao nº de galhas e ovos e ou juvenis de segundo estádio..... 34

Tabela 4. Plantas nativas isentas de infecção natural e inoculadas com 1.000 J2 de *M. incognita* 35

Tabela 5. Valores de absorvância e cálculo da concentração do DNA de diferentes populações de *Meloidogyne incognita* raça 3 37

Tabela 6. Dissimilaridade Genética entre as sete populações de *M. incognita* raça 3 obtidas com os primers AK20, A10, AQ12, AS08 e F01 pelo Método JACCARD 38

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

M. – Meloidogyne

RAPD – Rapid Amplified Polymorphic DNA

PCR – Polymerase Chain Reaction

J1 – Juvenil de 1º estágio

J2 – Juvenil de 2º estágio

J3 –Juvenil de 3º estágio

J4 – Juvenil de 4º estágio

H. – Heterodera

CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamônio

NaCl – Cloreto de Sódio

EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetracético

PVP – Polivinilpirrolidona

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

M – Molar

μL – microlitro

rpm – rotações por minuto

mM – mili molar

mg – miligrama

mL – mililitro

μg – micrograma

nM – nanomolar

pb – pares de bases

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA ..... **ii**
AGRADECIMENTOS ..... **iii**
RESUMO ..... **iv**
ABSTRACT ..... **v**
LISTA DE FIGURAS ..... **vi**
LISTA DE TABELAS ..... **vii**
LISTA DE SÍMBOLOS ..... **viii**
SUMÁRIO ..... **ix**

1 INTRODUÇÃO 11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13
2.1 O GÊNERO *Meloidogyne* 13
2.1.1 Histórico 13
2.1.2 Importância Econômica 14
2.1.3 Posição Sistemática e Círculo de Hospedeiros 14
2.1.3.1 Plantas Nativas como Hospedeiras de *Meloidogyne* 15
2.1.4 Sintomatologia 16
2.1.5 Ciclo de Vida 16
2.1.5.1 Parasitismo 17
2.1.6 Controle 18
2.1.7 Variabilidade Genética 19
2.1.7.1 Técnica RAPD 20
2.2 IDENTIFICAÇÃO DE *Meloidogune* spp. 21
2.2.1 Configuração da região Perineal 21
2.2.2 Análise Bioquímica e Molecular 21
3 MATERIAL E MÉTODOS 23
3.1 PARASITISMO DE *M. incognita* EM PLANTAS NATIVAS 23
3.1.1 Identificação de *M. incognita* em Mudas 23
3.1.2 Inoculação e Avaliação de *M. incognita* em Plantas Nativas e Cálculo do Fator de Reprodução (FR) 24
3.1.3 Identificação de espécies de *Meloidogyne* pelo fenótipo da isoenzima esterase 25

3.2 VARIABILIDADE GENÉTICA DE *M. incognita* RAÇA 3 26
3.2.1 Manutenção de Populações em Vasos 26
3.2.2 Extração de fêmeas 26
3.2.3 Extração de DNA 26
3.2.4 Quantificação do DNA 28
3.2.5 Técnica RAPD-PCR 28
3.2.6 Análise comparativa dos perfis de RAPD 29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 31
4.1 PARASITISMO DE *M. incognita* EM PLANTAS NATIVAS 31
4.2 VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES MONOESPECÍFICAS DE *M. incognita* RAÇA 3 37
4.2.1 Quantificação do DNA 37
4.2.2 Obtenção dos géis RAPD 37
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 44
6 CONCLUSÕES 45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 46
ANEXO I 51

1 INTRODUÇÃO

Os nematóides pertencentes ao gênero *Meloidogyne* estão entre os maiores agentes causadores de dano econômico em plantas. Estes nematóides induzem a formação de galhas no sistema radicular das plantas parasitadas, dificultando a absorção de água e nutrientes pelas raízes. A sua importância econômica se dá pela ampla distribuição geográfica e pelo difícil controle. Assim, esse gênero pode ser considerado um dos mais importantes fitopatógenos e um dos maiores obstáculos à produção de alimentos no mundo (MOURA, 1996).

O gênero *Meloidogyne* ocorre com maior freqüência em países tropicais e subtropicais devido à fatores como temperatura e umidade relativa do ar adequadas ao seu desenvolvimento e à presença de vasta gama de hospedeiros (LUC et al., 1990).

Dentre as oitenta espécies de *Meloidogyne* descritas no mundo, as mais disseminadas são *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949, *M. hapla* Chitwood, 1949, *M. incognita* (Kafoid e White) Chitwood, 1949 e *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 (CARNEIRO e ALMEIDA, 2001). No Brasil, atualmente são conhecidas cerca de 38 espécies, das quais, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. paranaensis* Carneiro et al., 1996 e *M. exigua* Goeldi, 1887, são as mais importantes para a agricultura do Oeste Paranaense (ROESE et al., 2001; PORTZ et al., 2001). No entanto, o parasitismo de nematóides de galha em plantas nativas do oeste paranaense ainda foi não estudado. Considerando a importância que as espécies nativas possuem, seja em reflorestamentos ou na indústria e considerando a necessidade de preservação das mesmas, é de fundamental importância avaliar a hospedabilidade de espécies nativas à nematóides, visto que estes podem afetar programas de reflorestamento, bem como servir de inóculo para outras culturas de importância econômica (SANTOS et al., 2001).

Estudos sobre a variabilidade genética de organismos têm sido viabilizados mediante o uso da técnica RAPD (Rapid Amplified Polymorphic DNA). Esta técnica consiste na amplificação do DNA genômico em reações de PCR, utilizando-se apenas um primer de seqüência curta (decâmero). A técnica RAPD tem sido extensivamente usada, não só em taxonomia, mas também em genética e em diversas outras áreas da ciência (COFCEWICZ et al., 2004). O polimorfismo de DNA é visualizado em géis de agarose e pode revelar diferenças entre populações de

indivíduos geneticamente relacionados ou dentro de uma mesma população. Esse tipo de marcador destaca-se principalmente pela facilidade das análises (ABDELNOOR et al., 2001). Apartir de Paran e Michelmore (1993), marcadores RAPD foram convertidos em SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) para definir aqueles marcadores RAPD cuja seqüência interna tenha sido determinada, permitindo a composição de primers mais longos, ricos em nucleotídeos GC e de seqüência específica. Assim, marcadores SCAR podem ser obtidos a partir de diferenças encontradas no polimorfismo de bandas de DNA por marcadores RAPD, propiciando a obtenção de primers específicos para identificação e separação de espécies de nematóides (ZIJLSTRA et al., 2000; RANDIG et al., 2004).

Com relação às plantas nativas, são poucas as informações sobre a ocorrência de nematóides potencialmente patogênicos a essas plantas. Levantamentos de nematóides de galha em plantas nativas no Brasil foram realizados em diferentes biomas como a Floresta Amazônica (CARES, 1984), Cerrado (MATTOS, 1999) e Mata Altântica (INORBET et al., 2005), mas nenhum específico para plantas nativas da região Oeste do Paraná.

Com base no exposto acima, objetivou-se com o presente trabalho estudar o parasitismo de *Meloidogyne* spp. em plantas nativas do oeste paranaense, bem como a variabilidade genética de populações de *M. incognita* raça 3 pela técnica RAPD.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O GÊNERO *Meloidogyne*

2.1.1 Histórico

O primeiro relato de plantas infectadas por nematóides data de 1855 quando Berkeley, trabalhando na Inglaterra, descobriu que havia uma associação entre um pequeno verme de solo e formação de nódulos em raízes de pepino (MOURA, 1996).

Já o gênero *Meloidogyne* foi observado pela primeira vez em 1877 quando C. Jobert, em viagem ao Brasil, buscava identificar a causa do declínio dos cafezais no Rio de Janeiro, doença que ocasionava o engrossamento das raízes do cafeeiro (FERRAZ e MONTEIRO, 1995).

Coube a Emílio Goeldi, dez anos após as observações de Jobert, a descrição original do gênero *Meloidogyne* e da espécie tipo, a qual foi denominada *M. exigua* e que vem sendo mantida ao longo dos anos. Na sua descrição, o autor relatou ainda a importância econômica desta meloidoginose para a cultura do café (FERRAZ e MONTEIRO, 1995).

Chitwood, em 1949, revisou o gênero *Meloidogyne*, aceitando *M. exigua* como espécie tipo e descrevendo cinco novas espécies e uma variedade. O autor postulou também que todas as espécies formadoras de galha radicular passariam a pertencer ao gênero *Meloidogyne* (LORDELLO, 1992).

Com o decorrer dos anos, outras novas espécies foram sendo descritas e o gênero *Meloidogyne* tornou-se o nematóide de maior importância econômica e de maior interesse no mundo (FERRAZ et al., 2001). Atualmente, cerca de 80 espécies de *Meloidogyne* já foram descritas, sendo *M. incognita, M. javanica, M. arenaria* e *M. hapla* as mais difundidas e as que ocasionam maiores prejuízos para a agricultura mundial (CARNEIRO e ALMEIDA, 2001).

O centro de origem das espécies de *Meloidogyne* ainda é desconhecido. A distinção entre espécies nativas, exóticas e adaptadas a uma determinada área é

dificultada pela ampla distribuição do material vegetal infectado (TAYLOR e SASSER, 1983).

2.1.2 Importância Econômica

Os nematóides das galhas representam um dos principais problemas para diversas culturas de importância agrícola no Brasil e no mundo, ocorrendo com maior freqüência em países tropicais e subtropicais devido à temperatura e umidade do ar adequadas para o seu desenvolvimento (LUC et al., 1990).

O gênero *Meloidogyne* é considerado um dos mais importantes fitopatógenos devido à sua importância econômica e ampla gama de plantas hospedeiras. Plantas infectadas por *Meloidogyne* spp. tornam-se mais suscetíveis a outros fitopatógenos, ficam menos resistentes a estresses, especialmente o hídrico, e não respondem satisfatoriamente às práticas de adubação (MOURA, 1996). Além disso, a produção final pode ser afetada tanto qualitativa quanto quantitativamente (ROESE et al., 2001).

No Brasil, principalmente *M. javanica* e *M. incognita* representam sérios problemas à produção em diversas regiões, como no norte do Rio Grande do Sul, no oeste, sudoeste e norte do Paraná, no sul e norte de São Paulo e no sul do Triângulo Mineiro. Na região central do Brasil, vários focos têm sido detectados e o problema é crescente. A baixa eficiência de alguns sistemas de rotação de culturas na redução populacional desses parasitas e a evidente carência de cultivares resistentes, adaptadas às diferentes regiões do país, são as principais causas deste problema (SILVA, 1998).

2.1.3 Posição sistemática e círculo de hospedeiros

Segundo Moura (1996), o gênero *Meloidogyne* está enquadrado nas seguintes posições taxonômicas: Filo – Nematoda (Diesing, 1861) Potts 1932, Classe – Secernentea (von Linstow,1905), 1958, Ordem – Tylenchida Thorne, 1949, Família – Meloidogynidae Skarbilovich, 1959, Subfamília – Meloidogyninae Skarbilovich, 1959, Gênero – *Meloidogyne* Goeldi, 1887.

De acordo com o mesmo autor, os nematóides causadores de galhas do gênero *Meloidogyne* ocorrem em quase todas as culturas. *Meloidogyne incognita* e

M. javanica incluem em seus largos círculos de hospedeiros, plantas cultivadas e daninhas, pertencentes às mais diferentes famílias botânicas. Dentre as plantas cultivadas encontram-se essências florestais, espécies frutíferas, culturas anuais e perenes, hortaliças e ornamentais (FERRAZ et al., 2001).

2.1.3.1 Plantas nativas como hospedeiras de *Meloidogyne*

Levantamentos de nematóides de galha em plantas nativas no Brasil foram realizados em diferentes biomas como a Floresta Amazônica (CARES, 1984), Cerrado (MATTOS, 1999) e Mata Altântica (INORBERT et al., 2005), mas nenhum específico para plantas nativas da região Oeste do Paraná.

As plantas nativas do oeste paranaense encontram-se espalhadas em reservas legais ou em APAs ou Parques Nacionais desta região (WIKIPÉDIA, 2006b).

Áreas de reserva legal no Oeste do Paraná são compostas por vegetação nativa típica de Floresta Estacional Semidecidual com domínio de Mata Atlântica (WIKIPÉDIA, 2006a), encontrando-se espalhadas pelos municípios da região oeste paranaense, alguns destes denominados “lindeiros” por serem banhados pelo lago artificial de Itaipu (WIKIPÉDIA, 2006b).

A Mata Atlântica está entre as florestas com a maior diversidade de espécies animais e vegetais do mundo, sendo responsável pelas condições ambientais necessárias à sobrevivência e a qualidade de vida de mais de 130 milhões de espécies, abrigando uma enorme variedade de mamíferos, aves, peixes, insetos, além das mais variadas formas de vida como fungos, bactérias e nematóides (WWF-BRASIL, 2005).

Inorbert et al. (2005) relataram o parasitismo de nematóides formadores de galha em dois tipos de vegetação de Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro, Floresta de Montana e Restinga. Foram identificadas as espécies *M. javanica*, *M. incognita*, *M. exigua*, *M. arenaria* e *M. mayaguensis* Rammah e Hirschmann, 1988, além de uma população não identificada.

Em 1971, Ruehle já citava nematóides parasitas de árvores de florestas e em 1988, Sharma e Grof também relataram doenças em raízes de *Centrosema pascuorum* causadas por *M. javanica* nas regiões do Cerrado brasileiro.

2.1.4 Sintomatologia

Os sintomas das meloidoginoses podem ser diretos, observados em raízes de plantas infectadas, ou reflexos, verificados na parte aérea das plantas (FERRAZ e MONTEIRO, 1995).

O principal sintoma direto e característico é a formação de galhas nas raízes das plantas infectadas, cujo tamanho e formato são variáveis, dependendo da espécie do nematóide, do nível de infecção e da suscetibilidade da planta. Quando em número elevado, as galhas tendem a se unir, causando intumescimento de grande parte da raiz (ITO e TANAKA, 1993). Ainda segundo os mesmos autores, as galhas podem ser confundidas com nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio, porém ao contrário destes, as galhas não se soltam facilmente das raízes.

Os sintomas reflexos ou secundários caracterizam-se pelo tamanho desigual das plantas que formam reboleiras a campo, apresentando também sintomas como deficiência mineral, murcha e queda prematura das folhas, além de mudanças em características varietais e diminuição na produção (FERRAZ e MONTEIRO, 1995).

2.1.5 Ciclo de vida

Como a maioria dos nematóides, *Meloidogyne* spp. sofre quatro ecdises durante o seu ciclo de vida que dura de 28 a 35 dias, dependendo das condições ambientais. Cada fêmea, de corpo globoso e região anterior formando um “pescoço”, deposita seus ovos em um único local da raiz, originando aglomerados ou massas. Cada massa reúne cerca de 400 a 500 ovos. No interior dos ovos, encontram-se os juvenis do 1º estádio (J1), que após a primeira ecdise, originam juvenis de 2º estádio (J2). Após a eclosão, esses juvenis, vermiformes e móveis, passam a migrar no solo, a procura de raízes de um hospedeiro favorável. Formas juvenis J1 e J2 são fusiformes ou vermiformes, ou seja, cilíndricas e com as extremidades afiladas (FERRAZ e MONTEIRO, 1995).

A presença de dimorfismo sexual no gênero *Meloidogyne* faz com que as formas J3 e J4 tornem-se salsichóides e as fêmeas assumam o formato de pêra. Em se tratando de um gênero de nematóide endoparasita sedentário, as fêmeas, uma vez formadas, são incapazes de se locomoverem. Já os machos são sempre alongados, mas em menor proporção que as fêmeas (LORDELLO, 1992).

Do ovo de qualquer nematóide nasce um animal com todas as características do adulto (LORDELLO, 1992).

O ciclo biológico dos nematóides varia em função de fatores como umidade, temperatura do ar, planta hospedeira, entre outros. A faixa ideal de temperatura varia de acordo com a espécie, sendo que para *M. incognita* e *M. javanica* a temperatura do ar ideal é de 25 a 30 ºC, enquanto para *M. hapla* vai de 15 a 25 ºC (LORDELLO, 1992).

2.1.5.1 Parasitismo

Os nematóides parasitos podem ser designados endoparasitos ou ectoparasitos. No primeiro caso, podem penetrar no organismo vegetal. Já os ectoparasitos podem parasitar do lado de fora da raiz hospedeira, introduzindo na planta apenas o estilete e parte do pescoço (LORDELLO, 1992; FERRAZ e MONTEIRO, 1995). Os fitonematóides podem ainda ser classificados como migradores ou sedentários, dependendo de sua mobilidade durante o parasitismo. No caso de alguns nematóides, como os do gênero *Meloidogyne*, embora as larvas sejam móveis no início, mais tarde elas aumentam de volume e perdem sua motilidade, sendo por isto classificados como sedentários (TIHOHOD, 1989).

Após a penetração em raiz de planta suscetível, o juvenil infestante se posiciona na região do cilindro central, ao nível da endoderme/periciclo. Neste local incita a formação de células hipertrofiadas, com citoplasma denso, granuloso e com núcleos bem evidentes, denominadas nutridoras, as quais são essenciais à alimentação e ao desenvolvimento do nematóide. Com a formação dessas células, o juvenil toma a forma salsichóide, perde a mobilidade e passa a se alimentar da raiz, ocorrendo o parasitismo (FERRAZ e MONTEIRO, 1995).

Há evidências de que o parasitismo de plantas por nematóides tenha evoluído a partir de formas de vida livre para os parasitas de plantas criptógamas, depois para parasitas de fungos e, finalmente como parasitas de plantas superiores. O surgimento do estilete foi o que possibilitou aos nematóides explorar as plantas como fonte de alimentos, pois a presença de estilete é obrigatória no parasitismo de plantas (BLUM, 2006)

2.1.6 Controle

O controle de *Meloidogyne* spp. é dificultado por diferentes fatores, dentre os quais destacam-se a ampla gama de hospedeiros, a qual facilita a sua sobrevivência e a presença de variabilidade genética, mesmo para as espécies de reprodução partenogenética. Para estas espécies, o grande número de cromossomos tem sido sugerido como um forte mecanismo de variabilidade uma vez que as chances de mutação gênica são bem maiores (FREIRE et al*.,* 2002).

A identificação de espécies de nematóides em culturas de importância econômica é de fundamental importância para o planejamento de medidas de controle, tendo em vista as particularidades de cada região e de cada cultura (ROESE et al., 2001).

O controle de nematóides de galha objetiva a melhoria da qualidade e da produtividade em áreas comerciais. Dessa forma, as medidas de controle implicam em reduzir a população abaixo do nível de dano econômico, já que a eliminação desses nematóides é extremamente difícil (TAYLOR e SASSER, 1983).

Dentre as principais medidas de controle adotadas pode-se citar a inundação de solos, a utilização de culturas armadilhas como *Crotalaria* spp, rotação de culturas, plantio de cultivares resistentes, revolvimentos do solo, cultivo de culturas antagônicas, material de propagação e controle químico e/ou alternativo (LORDELLO, 1992).

A aplicação de nematicidas como controle químico é uma prática pouco eficiente. Vários nematicidas já foram retirados do mercado devido aos efeitos nocivos ao ecossistema, à persistência no solo, à contaminação do lençol freático e à formação de populações resistentes (JATALA, 1985).

A rotação de culturas deve ser bem planejada, uma vez que espécies do gênero *Meloidogyne* são polífagas, podendo infectar plantas de diferentes famílias botânicas. Da mesma forma, a presença de plantas daninhas na área pode possibilitar a reprodução e a sobrevivência dos nematóides (ALMEIDA e CARDOSO, 1997). Assim, a escolha das plantas a serem utilizadas em sistemas de rotação de culturas deve levar em conta a espécie do nematóide predominante na área ou mesmo a raça. Geralmente, dois a três anos de rotação com espécies não hospedeiras reduz as perdas de produção. A rotação com algodão pode ser utilizada para controlar todas as espécies de *Meloidogyne*, exceto *M. incognita. Nicotiana*

tabacum, leguminosas forrageiras e algumas hortaliças não devem ser usadas em rotação com a soja, em virtude de serem suscetíveis a várias espécies de *Meloidogyne* (ITO e TANAKA, 1993). Em áreas infestadas com *M. incognita,* deve-se evitar o cultivo de cana-de-açúcar e rotação com o milho (VALE e ZAMBOLIM, 1997).

Para Almeida e Cardoso (1997), a utilização de plantas resistentes é o método de controle mais barato e eficiente. No entanto, a disponibilidade de variedades é variável de acordo com a espécie vegetal plantada e a espécie de *Meloidogyne* presente.

A semeadura direta também reduz a disseminação dos nematóides. Além disso, pode possibilitar a manutenção de populações de inimigos naturais, contribuindo para a redução populacional. O plantio direto sobre milheto, semeado no inverno, vem trazendo grandes benefícios à produção de soja no Brasil central (ALMEIDA e CARDOSO, 1997).

2.1.7 Variabilidade Genética

Nematóides do gênero *Meloidogyne* reproduzem-se, em sua maioria, por partenogênese mitótica obrigatória ou meiótica facultativa, ocorrendo, porém, espécies de reprodução anfimítica (FREIRE et al*.,* 2002). *Meloidogyne incognita* apresenta partenogênese mitótica obrigatória, contendo células 2n e 3n e variação no número de cromossomos.

As variações no número de cromossomos em *Meloidogyne* deram origem as chamadas raças cromossômicas, as quais não coincidem com as raças parasitárias ou fisiológicas. Como exemplo pode-se citar a raça cromossômica A (3n) de *M. incognita* com 30-46 cromossomos e a raça B (2n) com 32 a 36 cromossomos (MOURA, 1996).

A identificação de raças fisiológicas de *Meloidogyne* é realizada através de testes em plantas hospedeiro-diferenciadoras de famílias botânicas diferentes (HARTMAN e SASSER, 1985). A determinação de raça fisiológica serve como critério auxiliar para a recomendação de controle cultural ou genético.

Para *M. incognita*, existem 4 raças já determinadas, as quais são diferenciadas pela reação (+) ou (-) em plantas diferenciadoras. Pires et al. (2008) relataram a raça 3 de *M. incognita* como a prevalecente no Noroeste do Paraná em

lavouras de algodão. A raça 3 desse nematóide é diferenciada das demais pela reação positiva em algodoeiro e negativa em fumo NC 95.

A variabilidade genética em *Meloidogyne* tem sido estudada por diferentes técnicas, sendo a técnica RAPD a mais usualmente empregada (ZIJLSTRA et al. 2000).

2.1.7.1 Técnica RAPD

A técnica RAPD se baseia na amplificação de fragmentos de DNA utilizando a técnica de PCR com o uso de "primers" curtos (decâmeros) e de seqüência arbitrária. Esse tipo de marcador destaca-se principalmente pela facilidade das análises genéticas (ABDELNOOR et al*.,* 2001), uma vez que é sensível, rápido e relativamente simples, além de não requerer informações acerca da seqüência nucleotídica do DNA genômico (RANDIG et al., 2004).

A técnica RAPD é altamente sensível para a amplificação de seqüências de DNA de nematóides. O polimorfismo de bandas de DNA de nematóides tem sido utilizado para a diferenciação inter e intra-específica de populações (CAVALLI, 2003; RANDIG et al., 2004).

De acordo com Zijlstra et al. (2000), a análise por marcadores RAPD foi utilizada com sucesso na separação de *M. incognita, M. javanica e M. arenaria* por primers SCAR. Randig et al. (2004) também encontraram diferenças no polimorfismo de bandas de DNA por marcadores RAPD, com obtenção de primers SCAR para *M. incognita*, *M. paranaensis*, *M. exigua* e *M. arenaria*.

Lax et al. (2004) diferenciaram duas populações de *H. glycines* por RAPD-PCR, as quais apresentaram alta variabilidade (68%), evidenciada pelo polimorfismo de bandas apresentado.

Da Conceição et al. (2003) analisaram a diversidade genética de 32 populações de *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975, e de 3 populações de *G. pallida* Koritas e Atkinson 1994, pela técnica RAPD-PCR, usando 16 primers decâmeros. A diversidade genética encontrada permitiu a diferenciação das espécies *G. rostochiensis* e *G. pallida*, bem como de populações dentro de uma mesma espécie.

Adam et al. (2007), utilizando a técnica RAPD, encontraram diferenças nos isolados de *M. incognita*, provenientes da Líbia, os quais foram separados de

isolados de outras áreas geográficas.

No entanto, estudos voltados à variabilidade genética intraespecífica em *Meloidogyne* ainda não foram disponibilizados na literatura.

2.2 IDENTIFICAÇÃO DE *Meloidogyne* spp.

2.2.1 Configuração da Região Perineal

Em todo o mundo, uma das principais técnicas utilizadas na identificação de *Meloidogyne* spp. é a configuração perineal de fêmeas maduras (FERRAZ e MONTEIRO, 1995). A região perineal é o nome dado ao desenho formado pelas dobras da cutícula da fêmea ao redor do ânus e da vulva, que formam para cada espécie, um arranjo típico, um desenho próprio, característico ao microscópio óptico (CARNEIRO e ALMEIDA, 2001).

O primeiro trabalho em que se aplicou esta técnica foi realizado por Chitwood em 1949, tendo sido identificadas cinco novas espécies e uma variedade, as quais foram posteriormente confirmadas por Sasser em 1954, utilizando a mesma técnica (MOURA, 1996). Segundo o mesmo autor, a utilização da técnica da configuração perineal na identificação de espécies do gênero *Meloidogyne* têm sido muito criticada devido à ocorrência de variações nas configurações perineais mesmo em populações oriundas de uma mesma massa de ovos. Sendo assim, para algumas espécies, faz-se necessária a aplicação de outras ferramentas auxiliares na identificação, tornando-a mais precisa.

2.2.2 Análise Bioquímica e Molecular

Estudos bioquímicos, envolvendo proteínas solúveis, foram realizados nos últimos 30 anos e têm demonstrado que várias espécies de nematóides de galha podem ser diferenciadas ao nível específico através de fenótipos isoenzimáticos, obtidos por meio de eletroforese em géis de poliacrilamida (CARNEIRO e ALMEIDA, 2001). Trabalhos envolvendo o emprego de isoenzimas na sistemática de nematóides de galha (*Meloidogyne* spp.) foram conduzidos pela primeira vez em

1971, tendo sido detectadas aproximadamente 30 enzimas em várias espécies de *Meloidogyne*. No entanto, apenas esterase, malato desidrogenase, superóxido dismutase e glutamato oxaloacetato transaminase apresentaram interesse do ponto de vista taxonômico (CHARCHAR, 1997).

Ainda segundo este mesmo autor, espécies como *M. incognita, M. javanica, M. arenaria* e *M. hapla* apresentam fenótipos isoenzimáticos que possibilitam a sua diferenciação. Estudos recentes confirmaram que as enzimas esterase e malato desidrogenase, extraídas de fêmeas individuais, contribuem para a identificação dessas quatro espécies citadas acima. No entanto, segundo Formentini (2006), o tamanho das fêmeas pode influenciar na visualização de bandas para a isoenzima esterase.

A amplificação de DNA por PCR contribuiu para a redução da quantidade de material biológico utilizado nas análises, além de permitir uma discriminação interespecífica com a amplificação de regiões do DNA mitocondrial ou ribossômico. Randig et al. (2004) diferenciaram diferentes espécies de *Meloidogyne* parasitas do cafeeiro no Brasil pelo desenvolvimento de primers SCAR específicos à cada espécie.

Subbotin et al. (2001) através de duplex PCR diferenciaram *H. glycines* de outras espécies de nematóides. Os autores utilizaram um par de primers, específico para a região 28S de nematóides, em conjunto com um primer específico para *H. glycines* e outro específico para a região ITS-2 de nematóides. Sendo assim, *H. glycines* foi diferenciado dos demais nematóides pela presença de duas bandas, enquanto as demais espécies apresentaram apenas uma.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PARASITISMO DE *Meloidogyne* spp. EM PLANTA NATIVAS

3.1.1 Identificação de *Meloidogyne spp.* em mudas

Mudas de plantas nativas da região Oeste do Paraná, pertencentes a 36 espécies distintas, foram cedidas pelo Núcleo de Estações Experimentais da UNIOESTE (Tabela 1). O sistema radicular dessas plantas foi analisado quanto à presença de galhas no Laboratório de Nematologia da UNIOESTE. Fêmeas de *Meloidogyne* foram extraídas e identificadas por configuração da região perineal (HARTMAN e SASSER, 1985) e fenótipo para a isoenzima esterase (ESBENSHADE e TRIANTAPHYLLOU, 1990).

Tabela 1. Plantas nativas do Oeste do Paraná estudadas com relação ao parasitismo de *Meloidogyne* spp.

Número	Nome Comum	Nome Científico	Família
1	Açoita-cavalo	*Luehea paniculata* Mart.	Tiliaceae
2	Amendoim	*Pterogyne nitens* Tul.	Caesalpinaceae
3	Angico gurucaia	*Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan	Mimosaceae
4	Angico Vermelho	*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan	Mimosaceae
5	Araçá	*Psidium cattleianum* Sabine	Myrtaceae
6	Ariticum comum	*Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.	Annonaceae
7	Aroeira Vermelha	*Schinus terebinthifolius* Raddi.	Anacardiaceae
8	Cabreúva	*Myrocarpus frondosus* Allemao	Fabaceae
9	Café-de-bugre	*Cordia ecalyculata* Vell.	Boraginaceae
10	Canafístula	*Peltophorum dubium* (Spreng.)Taub.	Caesalpinaceae
11	Canjerana	*Cabralea canjerana* (Vell.) Mart.	Meliaceae
12	Caroba	*Jacaranda micrantha* Cham	Bignoniaceae
13	Cedro	*Cedrelo fissilis* Vell.	Meliaceae
14	Cereja	*Eugenia involucrata* DC.	Myrtaceae
15	Farinha-seca	*Albizia polycephala* (Benth.) Killip ex Record.	Mimosaceae
16	Guabijú	*Myrcianthes pungeus* (Berg) Legr.	Myrtaceae

17	Guajuvira	*Patagonula americana* L.	Boraginaceae
18	Guatambú Vermelho	*Aspidosperma subincanum* Mart.	Apocynaceae
19	Ingá Miúdo	*Inga laurina*	Leguminosae-Mimosoideae
20	Ipê Amarelo	*Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex DC.) Standl.	Bignoniaceae
21	Ipê Rosa	*Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Tol.	Bignoniaceae
22	Ipê Roxo	*Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex DC.) Standl	Bignoniaceae
23	Jenipapo	*Genipa americana* L.	Rubiacea
24	Louro Pardo	*Cordia trichotoma* (Vell.) Arrab. ex Steud.	Boraginaceae
25	Marmeleiro	*Ruprechtia laxiflora* Meisn.	Polygonaceae
26	Olho de pavão	*Adenanthera pavonina* L.	
27	Paineira	*Chorisia speciosa* A. St.-Hil.	Bombacaceae
28	Pata-de-vaca	*Bauhinia longifólia* (Bong.) Steud.	Leguminosae-Caesalpinioideae
29	Páu-Ferro	*Caesalpinia ferrea* Mart. Ex. Tul. var. *leiostachya* Benth.	Caesalpinaceae
30	Pessegueiro Bravo	*Prunus sellowii* Kochne	Rosaceae
31	Pitanga	*Eugenia uniflora* L.	Myrtaceae
32	Rabo-de-Bugio	*Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl.	Fabaceae
33	Sanga D'água	*Croton urucurana* Boill.	Euphorbiaceae
34	Tajuva ou amora Branca	*Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud.	Moraceae
35	Tarumã Branco	*Cytharexyllum myrianthum* Cham	Verbenaceae
36	Timburi	*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong	Mimosaceae

Fonte: Lorenzi, 2002.

3.1.2 Inoculação e avaliação de *M. incognita* em plantas nativas e cálculo do Fator de Reprodução (FR)

Para as espécies nativas, nas quais não foram encontradas galhas no sistema radicular, inoculou-se 1.000 ovos e/ou J2 de uma população de campo de *M. incognita*, em 4 repetições por tratamento (espécie vegetal). As temperaturas no interior do ambiente protegido com polietileno de 120μm de espessura atingiram valores médios mínimos e máximos de 11,1^{o}C e 31,7^{o}C, respectivamente (Figura 1) e a Umidade Relativa do Ar variou de 36,4% a 97,3% (Figura 2). Após 60 dias da inoculação, as plantas foram analisadas com relação ao número de galhas e ovos/juvenis por raiz.

O (FR) foi calculado pela seguinte fórmula: FR= Pf/Pi, onde Pf (população final) e Pi (população inicial), de acordo com HARTMAN & SASSER (1985).

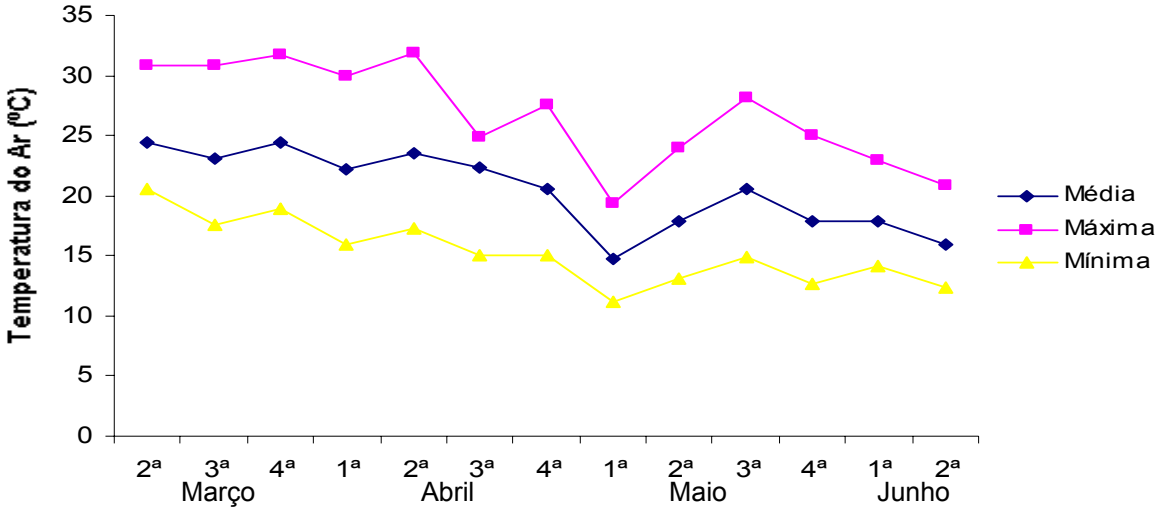

Figura 1. Temperaturas médias, mínimas e máximas semanais, observadas de março a junho de 2008, em Marechal Cândido Rondon.

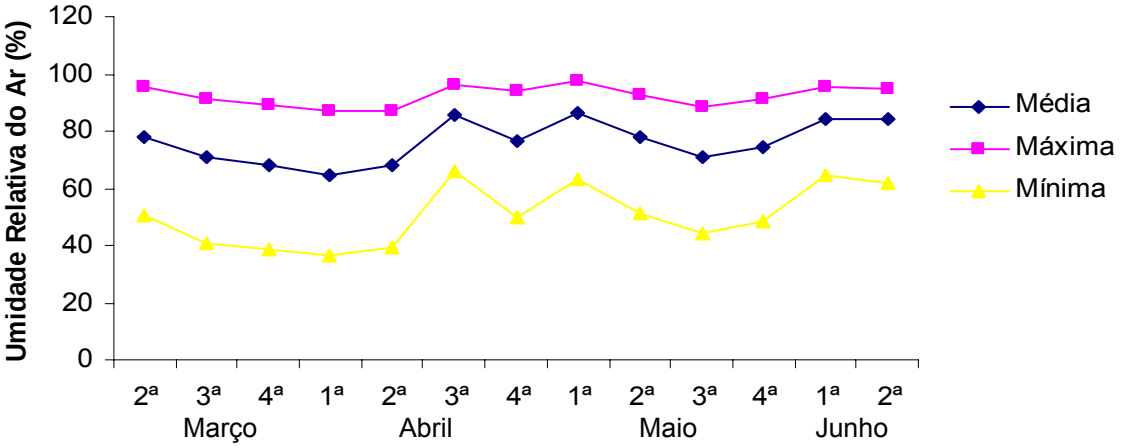

Figura 2. Médias, mínimas e máximas de Umidade Relativa do Ar, observadas de março a junho de 2008, em Marechal Cândido Rondon.

3.1.3 Identificação de espécies de *Meloidogyne*.

Para a análise isoenzimática, seguiu-se a metodologia proposta por Alfenas et al. (1998). Fêmeas de *Meloidogyne* foram maceradas em 10 µl de solução extratora (Anexo I). A corrida eletroforética foi realizada em aparelho vertical modelo MGV-202 (Biosystems), com gel de poliacrilamida na concentração de 8,23%. O gel foi corado em solução contendo os corantes Fast Blue RR e α-naftil acetato e o padrão de

bandas fotodocumentado. Para a técnica da Configuração Perineal, seguiu-se a metodologia proposta por Hartman e Sasser (1985).

3.2 VARIABILIDADE GENÉTICA DE *M. incognita* RAÇA 3

3.2.1 Manutenção e multiplicação de populações em vasos

Populações monoespecíficas de *M. incognita* raça 3, oriundas de diferentes municípios do Noroeste paranaense, foram multiplicadas em plantas de tomate cv. Rutgers e mantidas em casa-de-vegetação a 25 ^{o}C na empresa COODETEC, Cascavel/PR. Foram multiplicados um isolado proveniente de Mariluz (MAR), um de Iporã (IPO), um de Umuarama (UMU), um de Altônia (ALT), um de Pérola (PER), um de Santa Lúcia (SLU) e um de Moreira Sales (MSA), totalizando sete isolados.

3.2.2 Extração de fêmeas

Raízes de plantas de tomate infectadas com *M. incognita* raça 3 foram coletadas e acomodadas em sacos plásticos, etiquetadas e encaminhadas ao Laboratório de Nematologia da UNIOESTE, Marechal Cândido Rondon/PR, para análise.

Galhas do sistema radicular de plantas infectadas com *Meloidogyne incognita* foram dissecadas ao microscópio estereoscópio para a extração de fêmeas maduras.

3.2.3 Extração de DNA

A extração do DNA, bem como as reações RAPD, foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Paranaense – UNIPAR, Campus Toledo – PR.

O DNA de fêmeas maduras de cada população foi extraído conforme o método descrito por Doyle e Doyle (1990), modoficado. Primeiramente o tampão de extração foi preparado, utilizando-se CTAB 1%, NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; Tris HCl

(pH 8,0) 100 mM; PVP sólido 1%; B-Mercaptoetanol 0,1%. As fêmeas foram maceradas diretamente em microtubo de 2mL, previamente resfriados em nitrogênio líquido. Na sequência o tampão de extração foi adicionado e as amostras incubadas em banho-maria a 65ºC por 35 minutos. Durante a incubação, os tubos foram agitados a cada dez minutos. Após esse período, os tubos foram esfriados em temperatura ambiente e centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm em micro-centrífuga e a fase aquosa (sobrenadante) transferida para novos tubos.

A eliminação de proteínas foi realizada adicionando-se ao sobrenadante 700μL de clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1), agitando-se os tubos por inversões suaves por aproximadamente 5 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por mais 5 minutos. Após a centrifugação, a fase superior (aquosa) foi transferida para novos tubos, tendo-se o cuidado para não transferir a interfase e a fase inferior. Nos novos tubos, adicionou-se 700μL de clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1) ao sobrenadante. Os tubos foram agitados por inversões suaves e centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante transferido para novos tubos.

A precipitação dos ácidos nucléicos ocorreu adicionando-se isopropanol gelado ao sobrenadante, na proporção de 1:1. Os tubos foram invertidos suavemente e incubados a 4ºC durante a noite. No dia seguinte, as amostras do DNA foram cetrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante removido e o precipitado lavado uma vez com etanol 70%, para a retirada do sal presente, e uma vez com etanol 95%. O precipitado foi seco à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 20μL de SDS 20%, 10μL de EDTA 0,5M (pH 8,0), 20μL de Proteinase K a 20 $mg.mL^{-1}$, incubando-se a 65ºC por 2 horas. A essa solução adicionou-se Acetato de Amônio 10M em concentração final de 1:10. Após, adicionou-se fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugou-se a 8.000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e acrescentado igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) com nova centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. Novamente a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. Em seguida, adicionou-se 1 mL de etanol absoluto e centrifugou-se a 14.000 rpm por 10 minutos. Após, as amostras foram lavadas 2 vezes com etanol 70%.

A hidrólise do RNA ocorreu ressuspendendo-se o precipitado em 250μL de tampão TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0), contendo RNAse na

concentração final de 40 $\mu g.mL^{-1}$. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37ºC por 30 minutos, para a ressuspensão final do DNA. O DNA obtido foi estocado a – 20ºC.

3.2.4 Quantificação do DNA

Após a extração, o DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro. As amostras de DNA obtidas foram diluídas 10 vezes, proporcionando um fator de diluição f=10. As absorvâncias foram lidas a 260 e 280nm sob luz UV. A concentração do DNA foi estimada com base na equação: $[DNA]\ \mu g.\mu L^{-1} = (A260*f*50)/1000$.

3.2.5 Técnica RAPD-PCR

Para a técnica RAPD, adaptou-se a metodologia proposta Abdelnoor et al. (2001), tendo sido testados 15 marcadores RAPD, sendo que destes, 5 não apresentaram amplificação do DNA (Tabela 2).

Oligonucleotídeos iniciadores de seqüência curta (decâmeros) utilizados em reações de PCR contendo 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 50mM KCl, 2,4mM de $MgCl_2$, 100μM de cada desoxiribonucleotídeo, 0,4μM do primer, uma unidade da enzima taq DNA polimerase e 30ng do DNA extraído da população de *Meloidogyne* isolada. As reações foram realizadas em termociclador Biocycler Peltier Thermal Cycler, programado para 45 ciclos de 15 segundos, a 94ºC, 30 segundos a 35 ºC e 1 minuto a 72ºC. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese horizontal, em gel de agarose 1,2% e submerso em tampão TBE (0,09M Tris-Borato; 0,02M EDTA). O gel foi corado em solução com Brometo de Etídio, fotografado em fotodocumentador Vilber Lourmat e revelado sob luz ultravioleta.

Tabela 2. Seqüência de oligonucleotideos iniciadores *Invitrogen* utilizados em reações de RAPD-PCR para o estudo da variabilidade genética de populações de *M. incognita* raça 3.

Primer	Seqüência
A10	5´GTGATCGCAG 3´
A20	5´GTTGCGATCC 3´
AQ12	5´CAGCTCCTGT 3´
AS08	5´GGCTGCCAGT 3´
A07	5’ GAAACGGGTG 3’
F01	5’ ACGGATCCAG 3’
H01	5’ GGTCGGAGAA 3’
K12	5´TGGCCCTCAC 3´
AB03	5´TGGCGCACAC 3´
AK20	5´TGATGGCGTC 3´
AV09*	5´ACGGCCAATC 3´
AV08*	5´TGAGAAGCGG 3´
AX15*	5´CAGCAATCCC 3´
AQ15*	5´TGCGATGCGA 3´
AQ16*	5´CCCGGAAGAG 3´

*Oligonucleotídeos iniciadores marca Operon Technologies que não apresentaram amplificação de DNA para as populações testadas.

3.2.6 Análise Comparativa dos Perfis RAPD.

Os perfis eletroforéticos obtidos em géis de agarose foram utilizados para a diferenciação de populações de *M. incognita* raça 3 e para a construção de uma matriz de dissimilaridade genética, que foi elaborada com os dados produzidos por cada "primer", registrando-se a presença (1) e ausência (0) de bandas no perfil eletroforético para cada uma das populações.

A presença de uma mesma banda entre duas populações foi considerada como similaridade e a presença de uma banda em uma população e ausência na outra, considerada como diferença.

A distância genética foi calculada aos pares, utilizando-se o complemento aritmético do Índice de Jaccard (JACCARD, 1908), segundo a equação: $dii' = (1 - Sii') * 100$ em que *dii’* = é a distância genética entre os genótipos *i* e *i’*; e *Sii”* o índice de similaridade de Jaccard, sendo: $Sii' = a / a + b + c$ em que *a* = número de bandas presentes nos dois genótipos analisados, *b* = número de bandas presentes apenas no genótipo *i* e *c* = número de bandas presentes apenas no genótipo *i’*.

Realizou-se análise de agrupamento para construir um dendrograma obtido pelo Índice de Jaccard, empregando-se o método UPGMA (Unweighted pair group mean average), de acordo com os dados obtidos com os marcadores RAPD. O método UPGMA tem sido utilizado com maior freqüência em ecologia e sistemática e em taxonomia numérica (CRUZ e CARNEIRO, 2003). É um método não ponderado, onde o critério utilizado para a formação dos grupos é a média das distâncias entre todos os pares de itens que formam cada grupo, que evita caracterizar a dissimilaridade por valores extremos (máximo ou mínimo) entre os genótipos considerados (ELIAS et al., 2007; DIAS, 1998).

Segundo Cruz e Carneiro (2003), no método UPGMA, o dendrograma é estabelecido pelos genótipos com maior similaridade, sendo que a distância entre um indívíduo k e um grupo formado pelos indivíduos i e j é dada pela equação: $d_{(ij)k} = média\{d_{ik};d_{jk}\} = (d_{ik} + d_{jk}) / 2$, ou seja, $d_{(ij)k}$ é a média do conjunto das distâncias dos pares de indivíduos (i e k) e (j e k).

A distância entre dois grupos é fornecida pela equação: $d_{(ij)(Kl)} = média\ \{ d_{ik};d_{jl};\ d_{jk};d_{ji}\} = (d_{ik} + d_{jl} + d_{jk} + d_{ji}) / 4,$ aonde a distância entre dois grupos, formados pelos indivíduos (i s j) e (k e l), é dada pela média do conjunto, cujos elementos são de distâncias entre os pares de indivíduos (i e k), (i e l), (j e k) e (j e l) (CRUZ e CARNEIRO, 2003; DIAS, 1998).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PARASITISMO DE *Meloidogyne* spp. EM PLANTAS NATIVAS

Das 36 espécies avaliadas, sete apresentaram infecção natural por *Meloidogyne* spp., apresentando galhas no sistema radicular (Figura 3). Identificou-se *Meloidogyne incognita* em quatro espécies, sendo elas Rabo de Bugio, Ipê Roxo, Sanga D'água e Ipê Amarelo. Já *M. javanica* foi identificado em Café-de-Bugre, Tarumã Branco e Guatambú Vermelho (Tabela 3). O número de galhas formadas por infecção natural variou de 2 a 102, enquanto que o número de ovos e/ou J2 por sistema radicular foi de 20 a 10.000 (Tabela 3).

Portanto, vinte e nove espécies nativas mostraram-se isentas de infecção natural por *Meloidogyne* spp. Dessas, apenas Genipapo, Aroeira Vermelha e Ariticum Comum mostraram-se infectadas por *M. incognita* quando inoculadas com 1.000 ovos e/ou J2 (Tabela 4). No entanto, as plantas inoculadas não apresentaram uniformidade de infecção, prejudicando o cálculo do FR. O número de galhas nas espécies inoculadas variou de 13 a 212, sendo que o número de ovos e/ou J2 por raiz foi de 400 a 4120.

O padrão de esterase das espécies de *Meloidogyne* revelou o fenótipo I1 para as plantas nativas naturalmente infectadas com *M. incognita* como Rabo de Bugio, Sanga d'água e Ipê Roxo e J3 para as plantas naturalmente infectadas com *M. javanica* como Café de Bugre (Figura 4A), Tarumã Branco e Aroeira Vermelha (Figura 4B). A identidade dessas espécies também foi comprovada pela configuração perineal de fêmeas maduras (Figura 5). Com relação a espécie nativa Ipê Amarelo, a identificação do nematóide presente só pôde ser realizada através da região perineal, devido a falta de material biológico adequado à extração de proteína.

Segundo Inorbert et al. (2005), *Meloidogyne* spp. foram identificados em plantas nativas de floresta de Montana, com domínio de Mata Atlântica, no Estado do Rio de Janeiro. As espécies identificadas foram *M. mayaguensis*, *M. arenaria*, *M. exigua*, *M. incognita* e *M. javanica*, além de uma espécie de *Meloidogyne* não determinada. Destas, *M. incognita* foi encontrado parasitando apenas Jacatirão

(*Miconia cinnamonifolia* Naud.) e Sucupira (*Sclerolobium* sp.), enquanto *M. javanica* foi encontrado parasitando diversas hospedeiras, das quais nenhuma testada nesse estudo. Segundo os mesmos autores, a planta nativa Açoita-Cavalo mostrou-se parasitada apenas por *M. exigua*. Essa mesma planta foi analisada nesse estudo com relação à infecção natural por *Meloidogyne* spp. e inoculação por *M. incognita*, mostrando-se sem qualquer infecção. Esse dado pode ser um forte indício de que a mesma seja hospedeira apenas de *M. exigua* ou de outras espécies de Meloidogyne, mas não de *M. javanica* e *M. incognita*.

As espécies nativas pertencentes à família Myrtaceae mostraram-se não hospedeiras de *M. javanica* ou *M. incognita*. No Brasil, a espécie mais freqüentemente encontrada parasitando mirtáceas é *M. mayaguensis* (CASTRO TORRES et al., 2004; CASTRO TORRES et al., 2005) e *M. incognita* raça 2 (PICCININ e PASCHOLATI, 1997).

A detecção de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em mudas de plantas nativas cultivadas em solo não estéril, alerta para a necessidade de tratamento do solo utilizado na propagação de mudas de plantas nativas. O não tratamento pode implicar na introdução de espécies de *Meloidogyne* em áreas isentas, além de contribuir para o desequilíbrio da microfauna em áreas de preservação ambiental ou de reflorestamento.

Sendo assim, em continuidade a esse estudo, inoculações com maior concentração de inóculo (5.000 ovos ou J2/vaso) deverão ser efetuadas para ambas as espécies encontradas nesse estudo, no sentido de se obter uma melhor uniformidade de infecção que possibilite o cálculo do FR para cada hospedeira.

Figura 3. Galhas no sistema radicular de plantas nativas do oeste paranaense: 1. Ipê amarelo; 2. Ipê roxo; 3.Tarumã Branco (Naturalmente infectadas); 4. Ariticum Comum; 5. Aroeira Vermelha (Após inoculação com *M. incognita*).

Tabela 3. Plantas nativas naturalmente infectadas por *Meloidogyne* spp e avaliadas com relação ao nº de galhas e ovos e/ou juvenis de segundo estádio.

Nome Comum	Rep.	nº de galhas	Ovos e juvenis	Nematóide
Rabo de Bugio	1	87	640	*M. incognita*
	2	102	920	
	3	26	480	
	4	30	**	
Ipê Roxo	1	23	**	*M. incognita*
	2	3	40	
	3	2	200	
	4	5	20	
Café-de-bugre	1	23	580	*M. javanica*
	2	3	100	
	3	7	**	
	4	0	0	
Tarumã Branco	1	193	10.000	*M. javanica*
	2	126	2480	
	3	96	4720	
	4	102	**	
Guatambu Vermelho	1	9	360	*M. javanica*
	2	27	600	
	3	31	440	
	4	26	**	
Sanga D'água	1	16	240	*M. incognita*
	2	30	520	
	3	46	240	
	4	32	**	
Ipê Amarelo	1	32	1060	*M. incognita*
	2	58	580	
	3	74	660	
	4	53	740	

* Repetição

** Plantas retiradas para análise de Isoenzimas

Tabela 4. Plantas nativas isentas de infecção natural e inoculadas com 1.000 J2 de *M. incognita*.

Nome Comum	Nº de galhas			Total de ovos e juvenis		
Genipapo	Rep*	Ino**	NI***	Ino	NI	FR****
	1	24	0	880	0	0,9
	2	0	0	0	0	----
	3	0	0	0	0	----
	4	0	0	0	0	----
Ariticum comum	Rep*	Ino**	NI***	Ino	NI	FR****
	1	0	0	0	0	----
	2	13	0	2400	0	2,4
	3	0	0	0	0	----
	4	0	0	0	0	----
Aroeira Vermelha	Rep*	Ino**	NI***	Ino	NI	FR****
	1	212	0	4120	0	4,1
	2	35	0	720	0	0,7
	3	13	0	400	0	0,4
	4	0	0	0	0	----

* Repetição; ** Plantas Inoculadas; *** Plantas não Inoculadas; **** Fator de Reprodução.

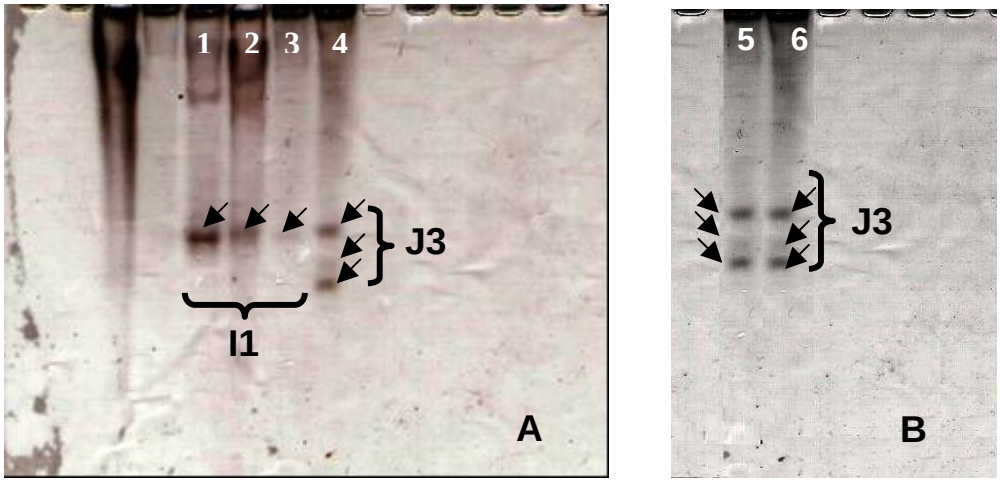

Figura 4. Fenótipos de esterase para *M. incognita* (I1) e *M. javanica* (J3) em seis espécies nativas do oeste paranaense: 1 – Rabo-de-Bugio; 2 – Sanga d'água; 3 - Ipê Roxo; 4 – Café de Bugre **(A)**; 5 – Tarumã Branco; 6 - Guatambu Vermelho **(B).**

Fonte: O autor

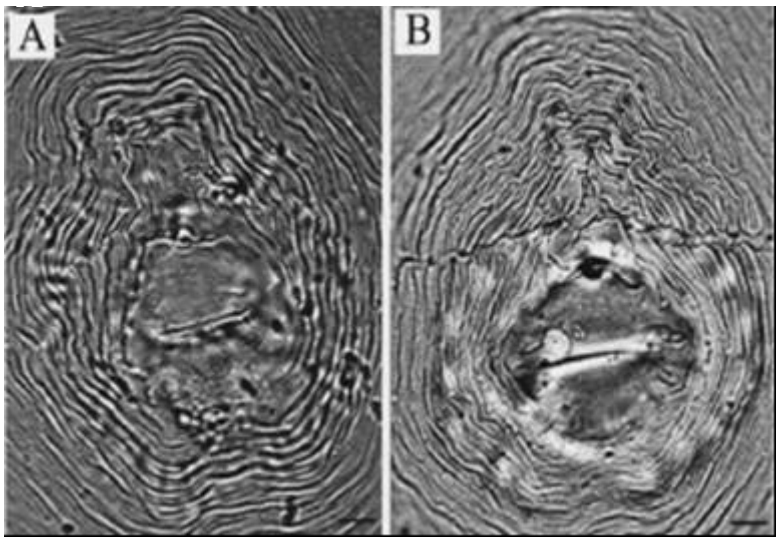

Figura 5. Configuração Perineal de *M. incognita* (A) e *M. javanica* (B) encontrada em espécies de plantas nativas, naturalmente infectadas.

Fonte: o autor

4.2 VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES MONOESPECÍFICAS DE *M. incognita* raça 3.

4.2.1 Quantificação do DNA

Todas as amostras de DNA apresentaram graus de pureza satisfatórios quando mensurados pela relação A260/A280 em espectrofotômetro. Os valores da razão obtidos com as diferentes populações de *M. incognita* raça 3 variaram de 1,71 a 1,84 (Tabela 5), indicando que o DNA purificado possuía pequena contaminação com proteínas e que a metodologia adotada foi eficiente para as análises genéticas propostas, segundo SILVA FILHO (2002).

Tabela 5. Valores de absorvância e cálculo da concentração do DNA de diferentes populações de *Meloidogyne incognita* raça 3.

População	**A260**	**A280**	**A260 / A280**	**[DNA] $\mu g.\mu L^{-1}$**
Altônia	0,390	0,213	1,83	0,195
Iporã	0,368	0,207	1,77	0,184
Moreira Sales	0,624	0,348	1,79	0,312
Mariluz	0,845	0,489	1,72	0,4225
Pérola	0,556	0,301	1,84	0,278
Santa Lúcia	0,450	0,262	1,71	0,225
Umuarama	0,895	0,489	1,83	0,4475

4.2.2 Obtenção dos Géis RAPD

Dos 15 “primers” testados, 10 resultaram na amplificação de fragmentos de DNA, tendo sido obtidos 63 padrões de amplificação (bandas no gel de agarose), com uma média de 6,3 bandas por oligonucleotídeo iniciador. Desse total, 12 (19,05%) foram polimórficas, ou seja, apresentaram diferenças pelo menos entre duas populações, e as 51 restantes (80,95%) apresentaram o mesmo padrão em todas as populações, chamadas monomórficas.

O tamanho dos fragmentos amplificados esteve entre 200 e 2500 pb. O número de bandas amplificadas, bem como a presença de polimorfismo variou de acordo com o nucleotídeo iniciador utilizado, visto que nem todos amplificaram diferenças entre as populações (Figuras 6, 7 e 8). A distância genética variou de 0,0% a 0,5% entre as populações estudadas (Tabela 6), evidenciando o elevado grau de homologia presente entre as populações testadas.

Tabela 6. Matriz de dissimilaridade genética das sete populações de *M. incognita* raça 3 obtidas com os primers AK20, A10, AQ12, AS08 e F01 pelo Método JACCARD.

Populações	1	2	3	4	5	6	7
1	-	-	-	-	-	-	-
2	0,31	-	-	-	-	-	-
3	0,38	0,5	-	-	-	-	-
4	0,18	0,33	0,48	-	-	-	-
5	0,17	0,31	0,39	0,18	-	-	-
6	0,36	0,36	0,43	0,38	0,23	-	-
7	0,19	0,33	0,42	0,0	0,18	0,38	-

Origem das Populações: 1 – Altônia; 2 - Iporã; 3 – Moreira Sales; 4 – Pérola; 5 – Mariluz; 6 – Santa Lúcia e 7 – Umuarama.

Foram obtidos um mínimo de 4 fragmentos com o primer A10 (Figura 9A) e um máximo de 11 fragmentos com o primer AK20 (Figura 10B). Dos 10 primers testados, 5 não foram eficientes na diferenciação dos isolados testados (Primers K12, A07, AB03, H01 e A20) (Figuras 6, 7 e 8). No entanto, os primers A10, AQ12, AS08, AK20 e F01 apresentaram polimorfismo de bandas (Figuras 9, 10 e 11) que permitiram a separação das populações em grupos, os quais foram utilizados na confecção de um dendrograma composto pela junção do polimorfismo dos cinco primers (Figura 12).

A presença ou ausência de bandas em géis RAPD evidencia prováveis diferenças presentes no genoma, já que a diferença de apenas um nucleotídeo ou par de bases na seqüência de DNA pode acarretar na não complementaridade do primer, compromentendo o seu anelamento e conseqüente amplificação do fragmento (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). O primer AK20 possibilitou a amplificação de bandas polimórficas específicas para Iporã e Moreira Sales (Figura 10B). Já o primer A10 permitiu a amplificação de uma banda específica para Umuarama (Figura 9A).

A presença de bandas monomórficas, as quais são idênticas em tamanho (pares de bases) e nas seqüências inicial e final de amplificação (região de anelamento dos primers), não necessariamente siginifica que os fragmentos de DNA amplificados sejam idênticos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Portanto, bandas monomórficas reprodutíveis e intensas, obtidas com os primers K12, A07, AB03, H01 e A20 (Figuras 6 a 8), podem ser utilizadas em estudos futuros para a obtenção de fragmentos polimórficos objetivando a diferenciação das populações testadas. Neste caso, o DNA alvo seria extraído do gel, reamplificado em PCR e digerido com endonucleases (enzimas de restrição de corte freqüente), de acordo com Ferreira e Grattapaglia (1998). No entanto, seqüências originadas de bandas monomórficas de populações geneticamente homogêneas, como as encontradas para *M. incognita* raça 3, provavelmente não poderiam ser utilizadas na confecção de primes SCAR. Neste caso, bandas polimórficas específicas de cada população, como as destacadas nos géis AK20 e A10 (Figuras10B e 9A), devem ser utilizadas.

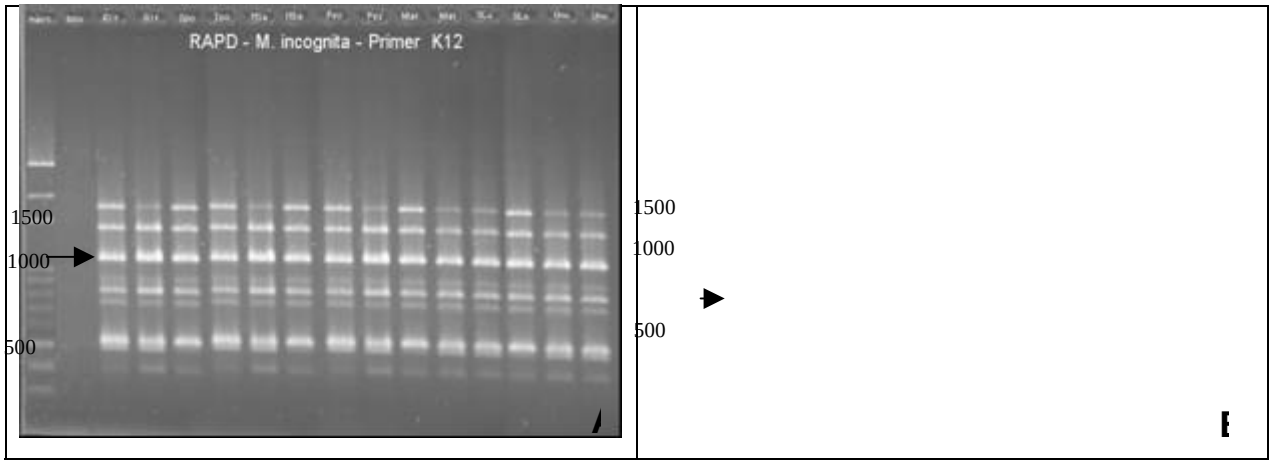

Figura 6. Padrão de bandas monomórficas obtido pela amplificação de DNA através da técnica RAPD com os primers K12 **(A)** e AO7 **(B).**

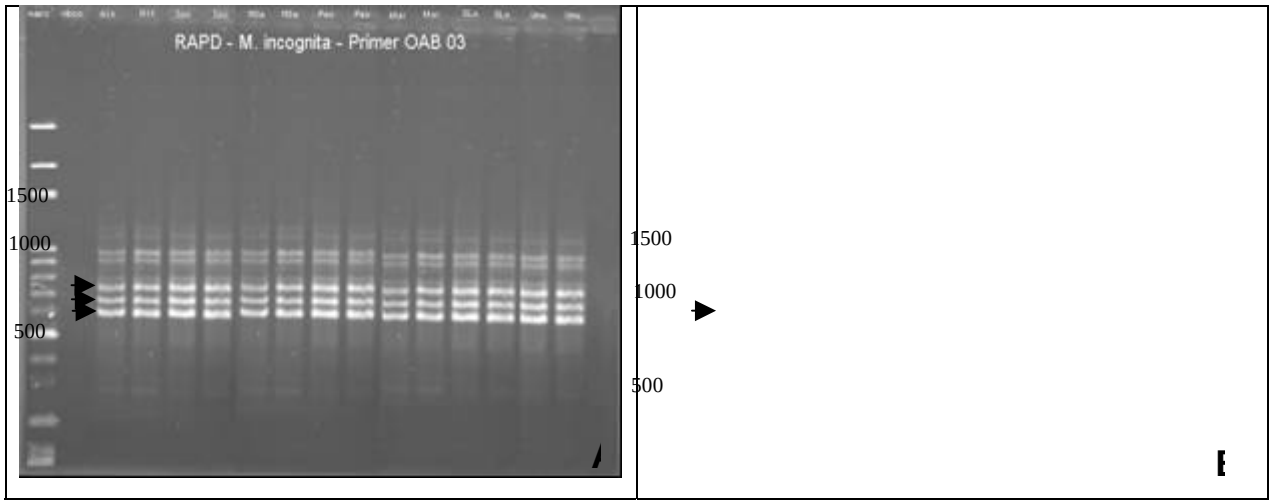

Figura 7. Padrão de bandas monomórficas obtido pela amplificação de DNA através da técnica RAPD com os primers AB03 **(A)** e H01 **(B).**

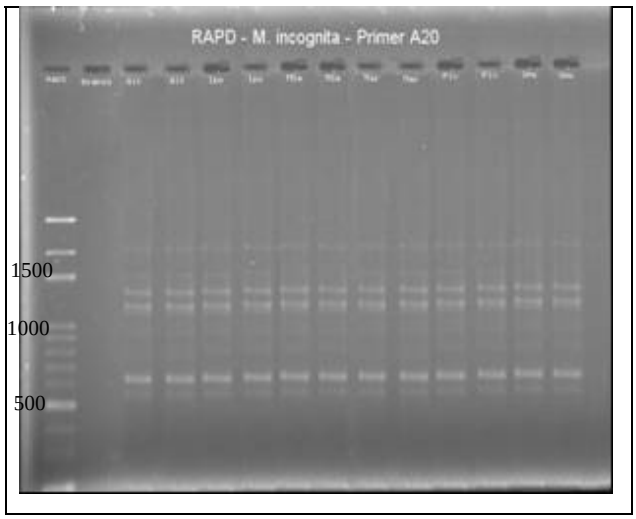

Figura 8. Padrão de bandas monomórficas obtido pela amplificação de DNA através da técnica RAPD com o primer A20.

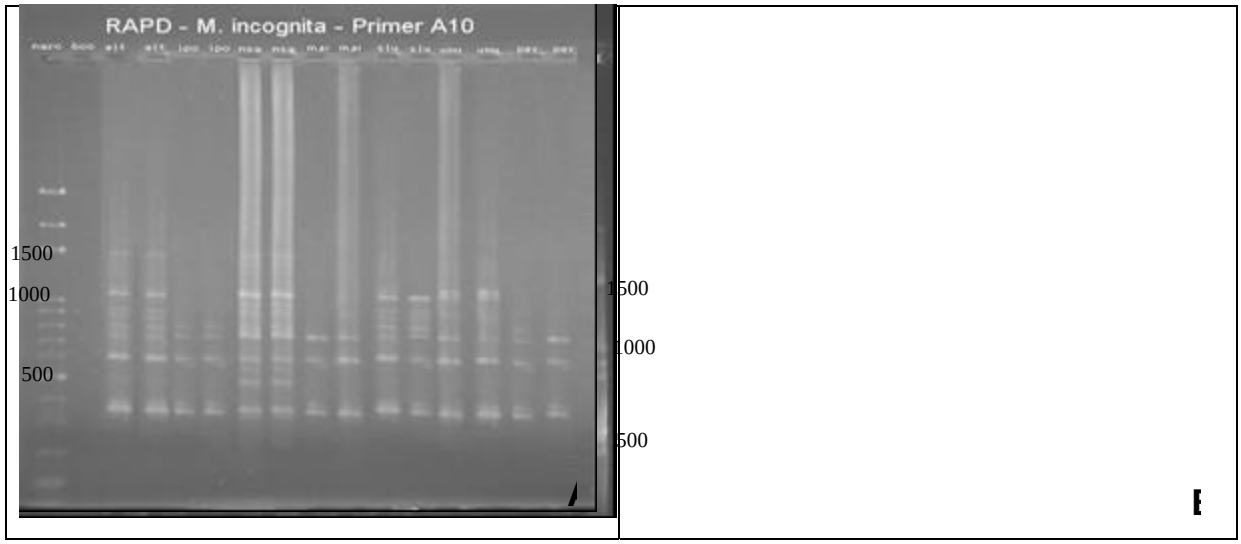

Figura 9. Padrão de bandas polimórficas obtido pela amplificação de DNA através da técnica RAPD com os primers A10 **(A)** e AQ12 **(B).**

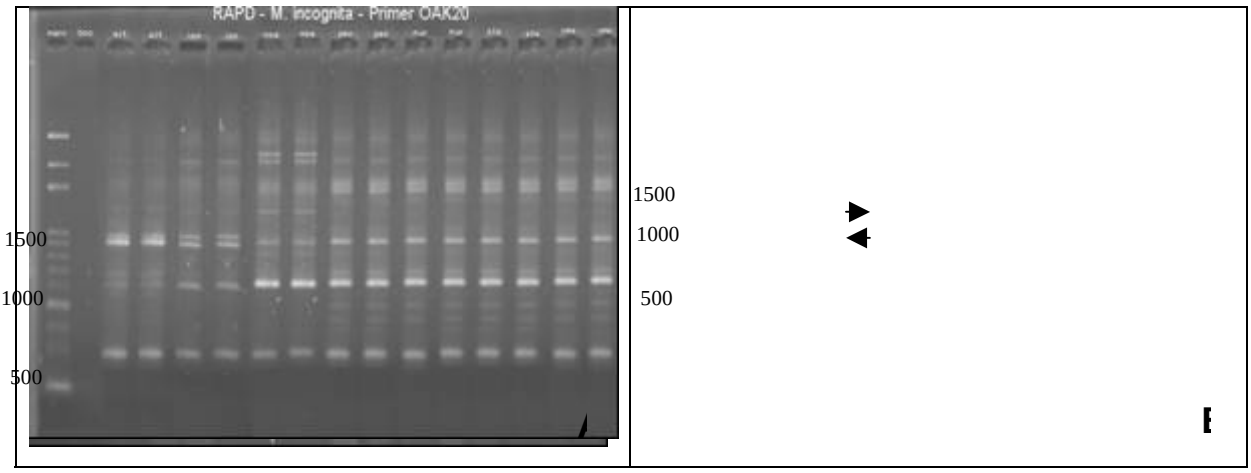

Figura 10. Padrão de bandas polimórficas obtido pela amplificação de DNA através da técnica RAPD com os primers AS08 **(A)** e AK20 **(B).**

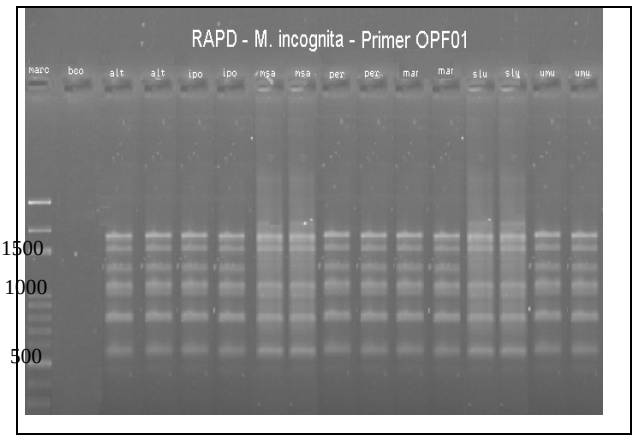

Figura 11. Padrão de bandas polimórficas obtido pela amplificação de DNA através da técnica RAPD com o primer F01.

A análise do dendrograma obtido com base no polimorfismo de bandas originado pelos primers AK20, A10, AQ12, AS08 e F01, possibilitou a separação das populações em cinco grupos geneticamente relacionados (CRUZ, 2001), conforme a a figura 12.

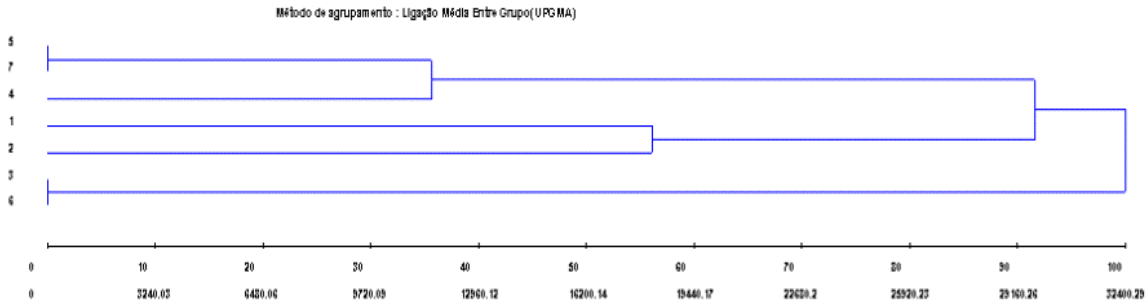

Figura 12. Dendrograma originado da análise das sete populações de *M. incognita* raça 3 apartir dos primers AK20, A10, AQ12, AS08 e F01 segundo o método UPGMA. Origem das populações: 1 – Altônia, 2 – Iporã, 3 – Moreira Sales, 4 – Pérola, 5 – Mariluz, 6 – Santa Lúcia e 7 – Umuarama.

Segundo Pires (2007), três populações de *M. incognita* foram separadas de acordo com sua agressividade com base na reação de diferentes genótipos de algodoeiro frente a inoculação com 5.000 J2. Segundo o mesmo autor, a população de Umuarama mostrou-se mais agressiva que a de Moreira Sales e esta por sua vez mais agressiva que a de Iporã. Como essas mesmas três populações também foram utilizadas nesse estudo, observou-se que a variabilidade genética encontrada nos testes biológicos, também foi detectada por marcadores RAPD, permitindo a sua separação (Figura 12). No entanto, estudos futuros devem ser realizados no sentido de se comprovar se a variabilidade genética encontrada está relacionada ou não à agressividade dessas populações.

Mesmo apresentando reprodução partenogenética obrigatória, a ocorrência de mutações em *M. incognita* é favorecida pelo elevado número de cromossomos (Moura, 1996). Mutações em espécies parasitas são também favorecidas por fatores como ambiente, características do solo e manejo de culturas. Como as populações utilizadas nesse estudo foram coletadas em diferentes municípios do Noroeste do Paraná, cada qual com suas características de solo, clima e manejo, a hipótese de

que as mesmas apresentem diferenças genéticas, mesmo que pequenas, não pode ser descartada, considerando o caráter microevolutivo de cada população.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O parasitismo de *M. incognita* e *M. javanica* em plantas nativas, seja por infecção natural ou por inoculação de *M. incognita*, indicou como hospedeiras as seguintes espécies vegetais: Aroeira Vermelha, Ariticum Comum, Café de Bugre, Genipapo, Guatambu Vermelho, Ipê amarelo, Ipê Roxo, Rabo de Bugio, Sanda D´água e Tarumã Branco. As demais espécies nativas deverão ser melhor estudadas com relação ao parasitismo de ambos os nematóides, mediante novas inoculações.

A análise do polimorfismo do DNA de diferentes populações monoespecíficas de *M. incognita* raça 3 por marcadores RAPD, possibilitou a detecção de variabilidade genética nas populações estudadas. As diferenças genéticas encontradas permitiram a separação das populações em 5 grupos distintos, através de reações com os oligonucleotídeos iniciadores AK20, A10, AQ12, AS08 e F01.

A análise conjunta do polimorfismo de fragmentos de DNA, obtido para os cinco primers citados anteriormente, permitiu o agrupamento das populações como segue: Grupo I – populações 5 e 7; Grupo II – população 4; Grupo III – população 1; Grupo IV - população 2 e Grupo V – Populações 3 e 6.

Considerando o número reduzido de repetições realizadas para cada primer testado (duas), estudos futuros serão enfocados no sentido de se confirmar a variabilidade encontrada para os cinco primers de maior polimorfismo. Os fragmentos de DNA específicos para Umuarama, Moreira Sales e Iporã, poderão ser alvo de estudos futuros objetivando a confecção de primers SCAR para testes visando a seleção de populações agressivas, caso se confirme essa relação.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Dez espécies de plantas nativas do oeste paranaense mostraram-se suscetíveis à *M. incognita* ou *M. javanica*;
- ✓ Inoculações com maior concentração de inóculo (5.000 J2 mL^{-1}), tanto de *M. incognita* quanto de *M. javanica*, deverão ser efetuadas nas plantas não infectadas;
- ✓ Como o solo utilizado para a produção das mudas nativas usadas nesse estudo mostrou-se contaminado com *Meloidogyne* spp., experimentos envolvendo a inoculação de plantas nativas deverão ser realizados em solo estéril com análise prévia do sistema radicular;
- ✓ A técnica RAPD permitiu verificar diferenças no genoma que compõe a raça 3 de *Meloidogyne incognita*;
- ✓ Os primers AK20, A10, AQ12, AS08 e F01 permitiram a geração de fragmentos polimórficos para as populações estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNOOR, R. V.; DIAS, W. P.; SILVA, J. F. V.; MARIN, S. R. R.; KIIHL, R. A. S. Caracterização molecular de populações do nematóide-de-cisto-da-soja com diferentes índices de parasitismo na cultivar Hartwig. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** v. 36, n. 2, p. 331-337, fev. 2001.

ADAM, M. A. M., PHILLIPS, M. S., BLOCK, V. C. Molecular Diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). **Plant Pathology,** v. 56, p. 190-197. 2007.

ALFENAS, A. C.; BRUNE, W.; OLIVEIRA, J. R.; ALONSO, S. K.; SCORTICHINI, M. Extração de proteínas para eletroforese. In: ALFENAS, A. C. (Ed.) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins – Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos.** Viçosa: UFV, 1998. cap. 2, p. 111-114.

ALMEIDA, A. M. R., CARDOSO, J. B. N. Doenças da soja (*Glycine Max* L. Merrill). In: KIMATI, H. **Manual de fitopatologia (doenças das plantas cultivadas)**. v.2, 3 ed. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1997. p. 642-664.

BLUM, L. E. B. Fitopatologia: O Estudo das Doenças de Plantas. In: CARES, J. E.; BLUM, L. E.; ANDRADE, E. P. **Nematologia Vegetal: Uma Introdução.**1. ed. Brasília: Otimismo, 2006. cap. 11, p. 128-166.

CARES, J.E. Comunidades nematológicas de várzea e terra firme nas proximidades de Manaus. Tese de Mestrado, Universidade de Brasília, 251 p., 1984.

CARNEIRO, R. M. D. G., ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira,** v. 25, n. 1, p. 35-44, 2001.

CASTRO TORRES, G. R. de, SALES JÚNIOR, R.,REHN, V. N. C. PEDROSA, E. M., MOURA, R. M. de. Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em Goiabeira no Estado do Ceará. **Nematologia Brasileira,** v. 29, n. 1, p. 105-107, 2005.

CASTRO TORRES, G. R. de, SALES JÚNIOR, V. N. C. PEDROSA, E. M., MOURA, R. M. de. *Meloidogyne mayaguensis* em *Psidium guajava* no Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira (Notas Fitopatológicas),** v. 29, n. 5, 2004.

CAVALLI, S. S. Polimorfismos Moleculares. In: FREITAS, L. B., BERED, F. (org). **Genética & Evolução Vegetal.** Porto Alegre: Editora UFRGS, 2003. cap. 8, p. 325-349.

CHARCHAR, J. M. Novos enfoques na sistemática de nematóides. **Revista Anual de Patologia de Plantas.** v. 5, p. 133-155, 1997.

COFCEWICZ, E. T.; CARNEIRO, R. D. G.; CASTAGNONE-SERENO, P. QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotypes and diversity of root-knot nematodes parasiting *Musa* im Brazil. **Nematology.** v.6, n.1, p. 85-95, 2004.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** Viçosa, MG: UFV, 2003. 585 p.

CRUZ, C. D. **Programa Genes**: versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV, 2001. 648 p.

DA CONCEIÇÃO, I. L. P. M.; DOS SANTOS, M. C. V.; DE OLIVEIRA ABRANTES, I. M.; DE ALMEIDA SANTOS, M. S. N. Using RAPD markers to analyse genetic diversity in Portuguese potato cyst nematode populations. **Nematology.** v. 5, n. 1, p. 137-143, 2003.

DIAS, L. A. dos S. Análises Multidimensionais. In: ALFENAS, A. C. (Ed.) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins – Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos.** Viçosa: UFV, 1998. cap. 9, p. 405-475.

DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. Isolation of Palnt DNA from fresh tissue. **Focus,** v. 12, p. 13-15, 1990.

ESBENSHADE, P. R. TRIANTAPHYLLOU, A. C. Isozyme Phenotypes for the Identification of *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology,** v. 22, n. 1, p.10-15, 1990.

ELIAS, H. T.; VIDIGAL, M. C. G.; GONELA, A.; VOGT, G. A. Variabilidade genética em germoplasma tradicional de feijão-preto em Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** v.42, n. 10, p. 1443-1449, 2007.

FERRAZ, L. C. C. B.; ASMUS, G. L.; CARNEIRO, R. G.; MAZAFFERA, P.; SILVA, J. F. V.; **Relações Parasito-Hospedeiro nas Meloidoginoses da Soja.** Londrina, PR: Embrapa Soja, 2001. 127p.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematóides. In: BERGAMIM FILHO, A., KIMATI H. & AMORIM L. **Manual de fitopatologia,** v.1: Princípios e conceitos. 3 ed. São Paulo: Ceres, 1995. cap. 8, p.168-201.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

FORMENTINI, H.M. Utilização de eletroforese para a determinação do padrão isoenzimático da enzima esterase a partir de ovos, fêmeas e formas juvenis J2 de populações de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. **Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação**, Unioeste, 2006.

FREIRE, C. R.; DAVIDE, L. C., CAMPOS, V. P., SANTOS, C. D., FREIRE, P. W., Cromossomos de três espécies brasileiras de *Meloidogyne*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v.26, n.5, p.900-903, set./out., 2002.

HARTMAN, K.M. & J.N. SASSER. **Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology**. In: BARKER, K.R.; C.C.

INORBERT, M.L.; SOUZA, R.M.; SILVA, C.P. & CARNEIRO, R.M.D.G*. Meloidogyne* spp. from preserved áreas of Atlantic Forest in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Nematologia Brasileira, v. 29, n.1, 31-38, 2005.

ITO, M. F., TANAKA, M. A. S. **Soja: Principais doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides.** Campinas: Fundação Cargill, 1993. 48 p.
JATALA, P. Biology control of nematodes. In: Sasser, J.N.; Carter, C.C. (Ed.). **An Advanced Treatise on *Meloidogyne*.** vol. I. Biology and control. Raleigh. North Carolina State University Graphics. 1985. 89 p.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Societé Vanddoise des Sciences Natureles**, v. 44, p. 223-270, 1908.

LAX, P.; DUEÑAS, J. C. R.; GARDENAL, C. N.; DOUCET, M. E. Genetic variability estimated with RAPD-PCR markers in two populations of *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952 (Nematoda: Hetroderidae) from Argentina. **Nematology.** v. 6. n. 1, p. 13-21, 2004

LORDELLO, L. G. E. **Nematóides das plantas cultivadas.** 8. ed. São Paulo: Nobel, 1992. 315p.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil.** v. 1 e 2. 4 ed. Nova Odessa, SP: Instituo Plantarum, 2002.

LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. London: CAB International, 1990. 648 p.

MATTOS, J.K.A. Caracterização da comunidade de nematóides em oito sistemas de uso da terra nos cerrados do Brasil Central. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, 113 p., 1999.

MOURA, R. M. Gênero *meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. In: **Revisão anual de patologia de plantas,** 1996. v. 4, p.209-245.

PARAN, I.; MICHELMORE R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theor Appl Genet.** v. 85, p. 985-993, 1993

PICCININ, E., PASCHOLAT, S. F. Doenças da Goiabeira (*Psidium guajava).* In: KIMATI, H*.* **Manual de fitopatologia (doenças das plantas cultivadas)**. v.2, 3 ed. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1997. p. 642-664.

PIRES, E. Levantamento de *Meloidogyne incognita* em Lavouras de Algodão no Noroeste do Paraná e Seleção de Genótipos de Algodoeiro com Resistência a *Meloidogyne incognita* raça 3. **Dissertação de Mestrado.** Unioeste, 2007.

PIRES, E.....2008. Ocorrncia de *Meloidogyne incongita* raça 3 na cultura do algodão em municípios do Noroeste do Paraná. Nematologia Brasileira.....

PORTZ, R.L. ;GÄRTNER, M.; VIGO, S.;FRANZENER, G.; STANGARLIN, J.R. & FURLANETTO, C. Ocorrência do nematóide do cisto da soja (*Heterodera glycines*)

no oeste do Paraná. **Fitopatologia Brasileira.** v. 26, (suplemento), p. 502, 2001.

RANDIG, O.; GOMES CARNEIRO, R. M. D.; CASTAGNONE-SERENO, P. Identificação das principais espécies de *Meloidogyne* parasitas do cafeeiro no Brasil com marcadores SCAR-Café em multiplex-PCR. **Nematologia brasileira.** v. 28, n. 1, p. 1-10, 2004.

ROESE, A. D.; ROMANI, R. D.; FURLANETTO, C.; STANGARLIN, J. R.; PORTZ, R. L. Levantamento de doenças na cultura da soja, *Glycine Max* (L.) Merrill, em municípios da região Oeste do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum.** Maringá. v. 23, p. 1293-1297, 2001.

RUEHLE, J. L. Nematodes parasitic on forest trees. 3. Reproduction on selected hardeoods. **Journal of Nematology.** v. 23, n. 2, p. 170, 1971.

SHARMA, R. D.; GROF, B. Root disease of *Centrosema pascuorum* caused by the Javanese root-knot nematode in the cerrado region of Brasil. **Plant Disease.** v. 72, n. 6 p. 546, 1988.

SILVA, J. F. V. Problemas fitossanitários da soja no Brasil com ênfase em nematóides. In: XX Congresso Brasileiro de Nematologia, Maringá, 1998. **Anais.** Maringá: UEM, 1998. p. 20-21.

SILVA FILHO, D.F. **Discriminação de etnovariedades de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal, Solanaceae) da Amazônia, com base em suas características morfológicas e químicas.** Tese de Doutorado, INPA/UFAM, Manaus, AM, 2002.

SANTOS, A. F. dos, MEDEIROS, A. C. de S.; SANTANA, D. L. de Q. Fungos Associados às Sementes de Espécies Arbóreas da Mata Atlântica. **Bol. Pesq. Florestal.** Colombo, n. 42, jan/jun. 2001. p. 57-70.

SUBBOTIN, S. A.; PENG, D.; MOENS, M. A rapid method for the identification of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* using duplex PCR. **Nematology.** v. 3, n. 4, p.365-371, 2001.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. Biología, identificación y control de los nematodos del nódulo de la raíz. **Proyecto internacional de *Melodogyne:*** Departamento de Fitopatología de la Universidad del Estado de Carolina del Norte y Agencia de Estados Unidos para el Desarrollo Internacional. Carolina del Norte, 1983.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola**. V.1, Jaboticabal, FCAV, 1989.

VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas,** v. 2. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa; Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997.

ZIJLSTRA, C.; DONKERS-VENNE, D. T. H. M.; FARGETTE, M. Identification of *Meloidogyne incognita, M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified region (SCAR) based PCR assays. **Nematology,** v. 2, p. 847-853, 2000.

WIKIPÉDIA a. Mata Atlântica. 2006. Retirado do site http://pt.wikipedia.org em 27/05/2006.

WIKIPÉDIA b. Usina Hidrelétrica de Itaipu. 2006. Retirado do site http://pt.wikipedia.org/wiki/Usina_hidrel em 27/05/2006.

WWF-BRASIL. 2005. Retirado do site http://www.wwf.org.br em 27/05/2006.

ANEXO I

REAGENTES UTILIZADOS NA ELETROFORESE DE ISOENZIMAS (solução estoque)

Acrilamida:

Acrilamida → 30 g

Bis-acrilamida → 0,80 g

Água destilada (q.s.p) → 100 ml

Tampão fosfato pH 6,2:

Solução A: Fosfato de sódio monobásico → 13,8 g

Água destilada → 1000 ml

Solução B: Fosfato de sódio dibásico → 1,42 g

Água destilada → 1000 ml

- Junta-se 81,5 ml da solução A com 18,5 ml da solução B para obter tampão fosfato de pH 6,2.

Tampão Tris-HCl 2,25 M pH 8,8:

Tris → 27,2565 g

Água destilada (q.s.p) → 100 ml

Tampão do tanque (10 vezes):

Tris → 15,0 g

Glicina → 71,0 g

Água destilada (q.s.p) → 1000 ml

Solução de Persulfato de amônia a 10%:

Persulfato de amônia → 0,3 g

Água destilada (q.s.p) → 3,0 ml

Solução extratora ou da amostra:

Sacarose → 2,0 g

Triton X 100 → 0,2 mL

Azul de bromofenol 0,01% → 5 a 7 gotas

Água destilada (q.s.p) → 8,0 mL

Solução corante da esterase:

Tampão fosfato pH 6,2 → 100 mL

Corante Fast blue RR → 100 mg

Alfa naftil acetato → 60 mg

Solução descorante:

Etanol absoluto → 300 mL

Ácido acético glacial → 50 mL

Água destilada (q.s.p) → 650 mL

Solução secadora:

Glicerina → 30 mg

Metanol → 400 mL

Água destilada (q.s.p) → 600 mL