



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**OCORRÊNCIA DE *Meloidogyne* spp. EM DIFERENTES FITOFISIONOMIAS DO CERRADO
E HOSPEDABILIDADE DE PLANTAS NATIVAS A *Meloidogyne javanica***

JOELMA GARDÊNIA PEREIRA SILVA

BRASÍLIA

2012

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**Ocorrência de *Meloidogyne* spp. em diferentes fitofisionomias do Cerrado e
hospedabilidade de plantas nativas a *Meloidogyne javanica***

Joelma Gardênia Pereira Silva

Orientador: Dr. Cleber Furlanetto

Co-orientadora: Dra. Regina M.D.G. Carneiro

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Fitopatologia,
do Departamento de Fitopatologia do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade de Brasília, como
requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Fitopatologia.**

BRASÍLIA

2012

Dissertação de Mestrado realizada junto ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Professor Dr. Cleber Furlanetto e Co-orientação da Dra. Regina M.D.G. Carneiro. Apoio institucional da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Comissão examinadora:

Prof. Cleber Furlanetto (Orientador/Presidente)

**Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas / Departamento de Fitopatologia
Brasília, DF**

Prof. Juvenil Enrique Cares (Examinador interno)

**Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas / Departamento de Fitopatologia
Brasília, DF**

Dr. Valdir Ribeiro Correia (Examinador externo)

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF**

DEDICATÓRIA

Dedico ao único e soberano salvador, JESUS CRISTO, que tem olhado por mim em todos os momentos da minha vida, me abençoando e realizando maravilhas dia após dia.

Aos meus pais, José Neto e Joselia, verdadeiros exemplos na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida, por ser minha fortaleza sempre, me concedendo a força e paciência necessária para não desistir diante das inúmeras dificuldades, me permitindo concluir mais uma etapa da vida.

Aos meus orientadores, agradeço por me proporcionarem condições necessárias para o desenvolvimento do meu trabalho e para obtenção do título de Mestre. A minha adorável orientadora, Dra. Regina Carneiro, a quem devo tanto pela excelente orientação, incentivo e paciência, agradeço por ter me proporcionado tantas oportunidades junto a sua equipe de pesquisa, obrigada pela dedicação, amizade, pelo carinho, enfim, agradeço por tudo que tem feito por mim desde a graduação até a obtenção desse título de Mestre. Ao Professor Cleber Furlanetto agradeço por ter me recebido de braços abertos na UNB, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho, concedendo dois alunos de PIBIC para me ajudarem nas coletas de campo e por ter aceitado desenvolver esse trabalho em conjunto com a Embrapa Cenargen.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Juvenil Enrique Cares e Dr. Valdir Ribeiro Correia pela disposição em analisar este trabalho.

Aos Drs. Jean Kleber de Abreu Mattos e Jansen Rodrigo Pereira Santos dispostos a me auxiliarem no momento final da dissertação, muito obrigada!

À Dra. Myrian Tigano pela primeira oportunidade na área de pesquisa, agradeço pelo apoio e ensinamentos de biologia molecular.

Aos meus pais, José Neto e Joselia a quem devo tanto, agradeço por acreditarem em mim e por depositarem a confiança necessária para que eu realizasse todos meus objetivos, me dando amor, carinho e a confiança necessária para vencer as dificuldades da vida. Amo vocês!

Às minhas irmãs Janete e Jussara sempre presentes e companheiras em todos os momentos.

Aos meus sobrinhos Jhuan Pablo e Luíza Victória que tanto amo.

A minha tia Neide pela presença constante em minha vida, pelas orações, confiança e estímulo.

Ao meu namorado Celso, por estar presente em todos os momentos da minha vida, me dando força, carinho e palavras de incentivo desde o começo dessa caminhada.

Ao meu cunhado Carlos pelo apoio, incentivo e pelas cópias feitas, muito obrigada!

A todos meus amigos de laboratório da Embrapa-Cenargen: Mariana (com quem compartilhei todas as alegrias e dificuldades), Fabiane, Vanessa (meu anjo amigo e conselheiro), Marcilene e Valdir (pelos valiosos ensinamentos e pela ajuda nos SCAR), muito obrigada!!! Aprendi muito com vocês. Marina, Ana Cristina, Irene, Dani, Andrea, Fábio, Esdras, Rita (pela ajuda e ensinamentos na técnica de eletroforese), Edriana, Danilo, Miro, sempre presentes, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos e companheiros de mestrado: Ana, Gláucia, Marcelo, Sandro, William, Eugênio, Fernanda, Mariana, Kamila, Bruno, Claudênia, Jessica, Érica, enfim, todos aqueles que conheci e que compartilharam comigo momentos de alegria e dificuldade.

Agradeço a Cecília e Renato por concederem parte das amostras de solos coletadas no Parque Nacional de Brasília e agradeço o apoio do projeto para estudo de fungos e nematoides do PNB financiado pela FAP-DF, pois as coletas no PNB só foram possíveis graças a esse projeto.

Às minhas amigas Natália Orrú, Janaina, Ana Paula, Débora, Luana, Natália, Debinha e Francisco pelos pensamentos positivos, orações e pela amizade.

À Fatinha um anjo da guarda enviado por Deus para vigiar e guiar todos os meus passos, mesmo longe se faz presente em minha vida.

Agradeço ao Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília pela oportunidade. Aos professores, funcionários do laboratório pelo suporte para desenvolvimento das aulas práticas, ao Ribamar pelo suporte em toda a parte burocrática, ao Cesar, Maria, Marivaldo e em especial o Arlindo por me acompanhar nas saídas de campo dirigindo o carro do departamento.

A todos da Estação Biológica da UnB, ao Sr. Fábio, Sr. Geraldo, sempre dispostos a ajudar. Muito obrigada!

Agradeço aos especialistas do Departamento de Botânica e do Departamento da Engenharia Florestal, pela ajuda nas identificações das sementes e plantas obtidas para esse estudo. Meus sinceros agradecimentos também ao responsável pelo banco de sementes que concedeu algumas das sementes para o desenvolvimento desse estudo.

Aos alunos de PIBIC, Laíssa e David, por me ajudarem em todas as coletas de campo e por todos os momentos de diversão e dificuldades que passamos juntos, muito obrigada!

Ao Sérgio pela generosidade, boa vontade e paciência em me ajudar a fazer os mapas e plotar os pontos nas áreas de estudo. Obrigada!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado.

A todos aqueles que estiveram presentes direto ou indiretamente em todos os momentos dessa longa caminhada, o meu muito obrigada!

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO..... | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| 1. INTRODUÇÃO | 5 |
| 2. OBJETIVOS | 8 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 9 |
| 3.1 O bioma Cerrado | 9 |
| 3.2 Nematoides no Cerrado..... | 10 |
| 3.3 <i>Meloidogyne</i> e sua biodiversidade..... | 11 |
| 3.4 Taxonomia de <i>Meloidogyne</i> spp..... | 12 |
| 3.5 Ciclo de vida e comportamento de <i>Meloidogyne</i> spp. | 13 |
| 3.6 Identificação de <i>Meloidogyne</i> spp..... | 15 |
| 3.6.1 Configuração da região perineal | 15 |
| 3.6.2 Análise bioquímica e molecular..... | 16 |
| 3.7 Plantas hospedeiras de <i>Meloidogyne</i> spp. | 18 |
| 3.8 Áreas de preservação de vegetação nativa de Cerrado no Distrito Federal..... | 19 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 21 |
| 4.1 Áreas de estudo..... | 21 |
| 4.2 Coletas de solo em diferentes fitofisionomias do Cerrado | 22 |
| 4.3 Cultivo de tomateiro em solo de vegetação nativa não estéril | 23 |
| 4.4 Avaliação dos tomateiros e caracterização isoenzimática de <i>Meloidogyne</i> spp. | 23 |
| 4.5 Extração de ovos de <i>Meloidogyne</i> spp. | 25 |
| 4.6 Extração de DNA | 26 |

| | |
|--|----|
| 4.7 Marcadores espécie-específicos para identificação de <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> e <i>M. hapla</i> | 27 |
| 4.8 Avaliação da hospedabilidade em plantas nativas a <i>Meloidogyne javanica</i> | 29 |
| 4.8.1 Coleta, identificação e propagação de espécies vegetais nativas..... | 29 |
| 4.8.2 Produção de inóculo e inoculação de <i>Meloidogyne javanica</i> em plantas nativas ... | 31 |
| 4.8.3 Bioensaio para avaliação da infecção causada por <i>Meloidogyne javanica</i> e determinação do Fator de Reprodução (FR)..... | 31 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 33 |
| 5.1 Ocorrência de <i>Meloidogyne</i> spp. no Parque Nacional de Brasília (PNB) e Fazenda Água Limpa (FAL)..... | 33 |
| 5.2 Identificação molecular: marcador espécie-específico SCAR..... | 39 |
| 5.3 Hospedabilidade de plantas nativas do cerrado a <i>Meloidogyne javanica</i> | 45 |
| 6. CONCLUSÕES | 51 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 52 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Áreas de estudo. A- Parque Nacional de Brasília, B- Fazenda Água Limpa. | 21 |
| Figura 2. Esquema ilustrativo dos pontos de coleta em cada um dos quadrantes amostrados. | 23 |
| Figura 3. Perfis de esterase (EST) de populações de <i>Meloidogyne</i> spp. encontradas no cerrado do Parque Nacional de Brasília e da Estação Ecológica da UnB localizada na Fazenda Água Limpa.. | 37 |
| Figura 4. Perfis de amplificação do DNA genômico das populações de <i>Meloidogyne incognita</i> (399 pb), <i>M. morocciensis</i> (420 pb) , <i>M. javanica</i> (670 pb), <i>M. hapla</i> (610 pb) e de populações misturadas..... | 45 |
| Figura 5. Plantas nativas do Cerrado em casa de vegetação inoculadas com <i>Meloidogyne javanica</i> | 46 |
| Figura 6. Aspecto da raiz de <i>Solanum lycocarpum</i> (Lobeira), evidenciando sintomas de meloidoginose (galhas) no sistema radicular após serem inoculadas com <i>M. javanica</i> | 47 |
| Figura 7. Raiz de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomateiro) com sintomas de galhas induzidas por <i>Meloidogyne javanica</i> | 50 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Características de marcadores SCAR espécie-específicos para <i>Meloidogyne</i> spp. | 28 |
| Tabela 2. Espécies botânicas nativas do Cerrado avaliadas em relação à hospedabilidade a <i>Meloidogyne javanica</i> | 30 |
| Tabela 3. Espécies de <i>Meloidogyne</i> encontradas em diferentes fitofisionomias do Parque Nacional de Brasília..... | 33 |
| Tabela 4. Espécies de <i>Meloidogyne</i> encontradas em diferentes fitofisionomias da Fazenda Água Limpa. | 35 |
| Tabela 5. Comparação dos resultados obtidos com utilização da técnica eletroforese de isoenzimas, fenótipos de esterase (EST), e a técnica SCAR-PCR, com a utilização de marcadores para as espécies de <i>Meloidogyne</i> encontradas no Parque Nacional de Brasília e na Fazenda Água Limpa e seus respectivos pontos de coleta..... | 42 |
| Tabela 6. Hospedabilidade de plantas nativas do Cerrado a <i>Meloidogyne javanica</i> | 49 |

RESUMO

Ocorrência de *Meloidogyne* spp. em diferentes fitofisionomias do Cerrado e hospedabilidade de plantas nativas a *Meloidogyne javanica*

O Cerrado (Savana brasileira) é formado por um mosaico heterogêneo de tipos de vegetação, solo e clima, com grande diversidade biológica. Apesar desta biodiversidade, a fauna nematológica nesse bioma é pouco estudada, principalmente no que se refere aos nematoides do gênero *Meloidogyne*. O objetivo deste trabalho foi identificar espécies de *Meloidogyne* presentes em diferentes fitofisionomias de Cerrado do Parque Nacional de Brasília (PNB) e da Fazenda Água Limpa (FAL) no Distrito Federal. Objetivou-se também validar os marcadores SCAR para as diferentes espécies de *Meloidogyne* associadas à vegetação nativa do Cerrado e verificar a hospedabilidade de plantas nativas do Cerrado a *Meloidogyne javanica*. Foram realizadas coletas de solo em cinco fitofisionomias de Cerrado, totalizando 125 amostras em cada um dos locais de estudo (PNB e FAL). Tomateiros suscetíveis a várias espécies de *Meloidogyne* foram cultivados em vasos contendo solo de vegetação nativa do Cerrado e avaliados aos 90 dias após o plantio. A identificação das espécies encontradas foi realizada com base em fenótipos da isoenzima esterase e por marcadores moleculares. Das 125 amostras de solo coletadas no PNB, 9 (7,2 %) estavam infestadas e na FAL das 125 amostras coletadas, 48 (38,4 %) apresentaram os nematoides de galhas. De modo geral, foram detectadas 66 populações de *Meloidogyne* pertencentes a cinco espécies: *M. javanica* (75,76 %), *M. incognita* (10,60 %), *M. hapla* (9,1 %), *M. morocciensis* (3,03 %) e *M. arenaria* (1,51 %). Os pares de primers SCAR incK14F/R, F/Rar, F/Rjav e F/Rh amplificaram os fragmentos específicos de *M. incognita* (399 pb), *M. morocciensis* (420 pb), *M. javanica* (670 pb) e *M. hapla* (610 pb), evidenciando sua

especificidade e maior eficiência em detectar misturas de espécies em comparação com a técnica de eletroforese de isoenzimas. Das 17 espécies de plantas nativas testadas quanto à hospedabilidade a *M. javanica*, apenas *Mimosa caesalpiniiifolia* mostrou ser boa hospedeira com fator de reprodução de 22,73.

Palavras-chaves: Cerrado, esterese, hospedabilidade, marcadores SCAR, nematoide-das-galhas, plantas nativas, savana brasileira.

ABSTRACT

Occurrence of *Meloidogyne* spp. in different physiognomic vegetation of Cerrado, and host suitability of native plants to *Meloidogyne javanica*

Cerrado (Brazilian savannah) is a highly diverse ecosystem composed of a heterogeneous mosaic of vegetation, climates and soils. Despite its biodiversity, there are few studies with nematodes, especially those of the genus *Meloidogyne*. The objectives of this work were (i) to characterize and identify *Meloidogyne* species in different physiognomic vegetation of Cerrado located at the National Park (PNB) and Águas Limpas farm (FAL), (ii) to validate SCAR markers for different *Meloidogyne* spp., found in these sites and (iii) to assess the host responses of Cerrado's native plant to *Meloidogyne javanica*. A total of 125 soil samples in the rhizosphere per area of study (PNB and FAL) were collected in five types of physiognomic vegetation, Soil samples were planted with a susceptible tomato plantlet and evaluated for the presence of root-knot nematodes at 90 days after. *Meloidogyne* spp. were identified using esterase phenotypes and species-specific SCAR-PCR markers. Nine out of 125 samples from PNB (7.2 %) and 48 (38.4 %) from FAL were infested with *Meloidogyne* spp. Overall, there were five species of *Meloidogyne*, including *M. javanica* (75.76 %), *M. incognita* (10.60 %), *M. hapla* (9.1 %), *M. morocciensis* (3.03 %) and *M. arenaria* (1.51 %). The SCAR primer pairs incK14F/R, F/Rar, F/Rjav and F/Rh amplified fragments species-specific for *M. incognita* (399 bp), *M. morocciensis* (420 bp), *M. javanica* (670 bp) and *M. hapla* (610 bp) respectively, and was consistent with the enzymatic phenotypes and more efficient to detected mixed species. Most of the 17 native plant species tested had a reproduction factor (RF) < 1 and only the species *Mimosa caesalpinifolia* was considered a good host for *M. javanica*, with a RF of 22.73.

Key-words: Brazilian Savannah, Cerrado, esterase phenotype, host suitability, native plants, root-knot nematodes, SCAR markers.

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul sendo superado apenas pela Amazônia, é o mais ameaçado entre os biomas brasileiros. Ocupando cerca de 20% do território nacional (WWF, 2010), também é o segundo mais rico em fauna e flora. Cerca de 80% da vegetação de Cerrado encontra-se distribuída pelos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal conforme revisado por Cares & Huang, 1991, abrigando uma grande diversidade de plantas endêmicas, mamíferos, anfíbios, répteis e invertebrados (Prevedello & Carvalho, 2006).

O clima em áreas de Cerrado é tropical, com uma estação seca e uma estação chuvosa bem definida, com amplitude térmica variando de 20 a 26°C e precipitação anual de 1.000 a 2.000 mm (Garrido *et al.*, 1982; Azevedo & Adámoli., 1988). A topografia da região varia entre plana a suavemente ondulada, favorecendo a agricultura mecanizada e a irrigação.

No Cerrado, a vegetação herbácea coexiste com mais de 420 espécies de árvores e arbustos esparsos (WWF, 2010), formando tipologias vegetacionais adaptadas a diferentes tipos de solos como o Cambissolos, Latossolos, Neossolos e Quartzarênicos, os quais apresentam altos teores de alumínio e baixa disponibilidade de macro e micronutrientes (Toledo *et al.*, 2009).

As fitofisionomias predominantes no Cerrado são: cerradão (com árvores altas, densidade maior e composição distinta), cerrado *sensu stricto* (com árvores baixas e esparsas), campo cerrado (predomínio de gramíneas, pequenas árvores e arbustos bastante esparsos entre si), campo sujo (presença marcante de arbustos e subarbustos entremeados no estrato herbáceo), campo limpo (com progressiva redução da densidade arbórea) e

floresta de galeria (mata ciliar com formações florestais geralmente associadas a cursos d'água) (Ribeiro & Walter, 1998).

A vegetação natural do bioma Cerrado é dominada por seis famílias botânicas: Fabaceae, Poaceae, Asteraceae, Rubiaceae, Arecaceae e Cyperaceae (Goodland, 1970), sendo essa diversidade de plantas maior em cerrado *sensu stricto*, seguida por cerradão, depois pelos campos e por último por matas de galeria conforme revisado por (Cares & Huang, 2008).

A vegetação nativa do Cerrado vem sendo gradativamente afetada pela expansão da fronteira agrícola de forma extensiva e intensiva. O desequilíbrio ambiental em áreas de Cerrado nativo é causado pelo desmatamento e contaminação do solo e de fontes de água natural devido ao uso indiscriminado de insumos agrícolas (Mattos, 1999).

Para o entendimento dos processos envolvidos na dinâmica da cadeia alimentar do solo faz-se necessário buscar indicadores biológicos das alterações ocorridas nos diferentes ambientes. No solo, os nematoides aparecem como um grupo capaz de detectar distúrbios ambientais caso ocorra mudanças na estrutura de sua comunidade. A remoção de plantas nativas em áreas preservadas pode causar impactos na comunidade de nematoides do solo, podendo interferir na abundância de espécies fitoparasitas. Dentre os nematoides fitoparasitas, espécies endoparasitas sedentárias como *Meloidogyne* Goeldi, 1887, que dependem de plantas da vegetação nativa para a sua sobrevivência, podendo ser fortemente afetadas pela remoção das mesmas. O parasitismo de plantas nativas por *Meloidogyne* spp. se dá pela capacidade do nematoide de parasitar plantas das mais diversas famílias botânicas (Moura, 1996).

A biodiversidade do Cerrado é um dos recursos mais valiosos para sua preservação e exploração sustentável. No entanto, pouco se conhece da microbiota presente em seus solos, havendo a necessidade de estudos voltados à sua identificação.

Conhecer a biodiversidade em biomas naturais é de importância estratégica para qualquer país, com diversas implicações e usos possíveis, seja para a detecção de alterações ambientais, da qualidade do solo ou da sustentabilidade da produção agrícola (Goulart, 2007). Como os nematoides são bioindicadores das condições ambientais (Huang *et al.*, 1996), levantamentos da fauna nematológica tornam-se importantes para a detecção de distúrbios no meio ambiente.

Apesar da sua relevância, a fauna nematológica tem sido pouco estudada no Cerrado, principalmente aquela referente aos nematoides formadores de galhas do gênero *Meloidogyne*. Esse nematoide causa enormes perdas anualmente na agricultura mundial, são parasitas obrigatórios de raiz, estão entre os mais importantes problemas fitossanitários por serem polípagos e parasitarem várias culturas (Silva, 2005). Este nematoide apresenta uma ampla disseminação e alta capacidade destrutiva, sendo assim considerado o mais importante nematóide fitoparásita na agricultura mundial (Campos *et al.*, 1990).

Especula-se que haja uma maior diversidade em sistemas nativos do que em áreas agrícolas ou degradadas. Estudos anteriores relataram gêneros de diversos nematoides no Cerrado (Huang *et al.*, 1996; Huang & Cares, 1995; Cares & Huang, 1991), mas poucos são os estudos em nível de espécie. Essas informações são importantes na descoberta de novas plantas hospedeiras e para um melhor conhecimento das estratégias gerais de manejo deste grupo de nematoides em áreas agrícolas implantadas em áreas de Cerrado e cultivadas com culturas econômicas como soja, milho, algodão, entre outras.

2. OBJETIVOS

- ✓ Estudar a ocorrência de *Meloidogyne* spp. em diferentes fitofisionomias do Cerrado do Parque Nacional de Brasília e Estação Ecológica da Universidade de Brasília;
- ✓ Identificar espécies de *Meloidogyne* spp. associados à vegetação nativa do Cerrado, com base no fenótipo da isoenzima esterase;
- ✓ Validar primers SCAR para as diferentes espécies de *Meloidogyne* encontradas no Cerrado;
- ✓ Verificar a hospedabilidade de plantas nativas do Cerrado a *Meloidogyne javanica*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O bioma Cerrado

Cerrado é uma palavra de origem espanhola que significa fechado. Este termo busca traduzir a característica geral da vegetação arbustivo-herbácea densa que ocorre na formação savânica. Esse termo também tem sido usado para designar tipos de vegetação (tipos fisionômicos), quanto para definir formas de vegetação (formação ou categoria fisionômica) (Ribeiro & Walter, 1998).

O Cerrado é um complexo vegetacional que possui relações ecológicas e fisionômicas com outras savanas da América tropical e de continentes como África e Austrália (Ribeiro & Walter, 1998).

No Brasil, o bioma Cerrado ocupa 20% do território (WWF, 2010), sendo encontrado nos estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso do Sul, no oeste e no norte de Minas Gerais, oeste da Bahia e no Distrito Federal. Esses estados são considerados centros de áreas nucleares do Cerrado, compartilhando espécies animais e vegetais com a maioria dos biomas brasileiros e apresentando uma biodiversidade comparável à da Floresta Amazônica (Eiten, 1972). Fora do Brasil, o Cerrado ocupa áreas na Bolívia e no Paraguai, enquanto paisagens semelhantes são encontradas na Colômbia, Guianas, Suriname e Venezuela (Ribeiro & Walter, 1998).

O Bioma Cerrado constitui grande riqueza endêmica presente tanto em sua fauna quanto em sua flora. Essa biodiversidade se distribui em um diversificado mosaico de vegetações (Silva, 2009), apresentando desde formas campestres, como os campos limpos de cerrado, até formas relativamente densas, como os cerradões. Entre estes dois extremos fisionômicos, encontra-se toda uma gama de formas intermediárias, como as áreas de

savana, os campos sujos, campos cerrados, o cerrado *sensu stricto* e a mata de galeria (Ratter & Dargie, 1992).

3.2 Nematoides no Cerrado

Os nematoides são organismos invertebrados, integrantes da microfauna do solo. Dentre os animais multicelulares, os nematoides são os mais abundantes. Constituem grupo diverso pertencente a filo próprio (Nematoda). Possuem diversos hábitos alimentares e diferentes papéis ecológicos no solo, sendo relacionados com a condição ecológica dos solos (Yeates *et al.*, 1993).

Os nematoides apresentam grande potencial para serem utilizados como indicadores de alterações ambientais. Estudos de diversidade de nematoides poderiam ser aplicados para avaliar a qualidade ou sanidade de solos, como bioindicadores do impacto de atividades humanas que causam alterações ambientais e da sustentabilidade produtiva (Neher, 2001).

O estudo da biodiversidade em solos agrícolas ou não, tem despertado interesse científico nas últimas décadas. Agrossistemas são geralmente estabelecidos com monoculturas e práticas de manejo que causam modificações na estrutura dos solos, os quais por consequência, passam a mostrar maiores flutuações de umidade e temperatura. Em função disso, esses habitats instáveis, resultantes da ação do homem, acabam por inibir o estabelecimento e/ou a permanência de vários nematoides (Goulart *et al.*, 2003).

Souza *et al.* (1994) estudando a ocorrência de *Meloidogyne* spp. associados a vegetação nativa do em Cerrado do Distrito Federal, detectaram *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, em 26,25% e *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949, em 4,7% de um total de 320 amostras coletadas.

Cares & Huang (1991) relataram a ocorrência de gêneros de nematoides em áreas de Cerrado nativo e cultivado, e encontraram que nematoides dos gêneros *Ditylenchus* e

Tylenchus adaptaram-se melhor em sistemas de cultivo anuais do que em sistemas perenes, enquanto outros como *Ecphyadophora* spp. e *Trophotylenchulus* spp. estabeleciam-se bem apenas em sistemas perenes. Cares & Huang (1991) também compararam a prevalência de gêneros de nematoides em campo cerrado, mata de galeria e campo úmido. De acordo com os autores, espécimes dos gêneros *Aorolaimus*, *Coslenchus*, *Criconema*, *Discocriconemella*, *Hemicriconemoides* e *Trophotylenchulus* foram encontrados com maior frequência em áreas de cerrado *stricto sensu*, enquanto os gêneros *Meloidogyne*, *Hemicycliophora*, *Aphelenchoides*, *Malenchus*, *Helicotylenchus* e *Ditylenchus* em mata de galeria. Nos campos úmidos, os gêneros encontrados com maior frequência foram *Caloosia*, *Criconemella*, *Filenchus*, *Pratylenchus*, *Xiphinema* e *Meloidogyne*.

Huang & Cares (1995) avaliando a composição de comunidades de nematoides parasitas de plantas em Cerrado nativo e cultivado do Brasil Central, considerando cinco diferentes fitofisionomias e tipos de solos, observaram que 90% das amostras continham pelo menos quatro gêneros de fitonematoides, sendo que no Cerrado a comunidade de nematoides era dominada por *Helicotylenchus*, *Meloidogyne*, *Ecphyadophora*, *Discocriconemella*, *Trophotylenchulus* e *Tylenchus*.

Em estudo de grupos composicionais e tróficos de nematoides em amostras de solo coletadas próximo a rizosfera de sucupira branca (*Pterodon pubescens*) em cerrado nativo, observou-se que houve prevalência de nematoides fitoparasitas, sendo em sua maioria espécies do gênero *Trophotylenchulus*, *Coslenchus* e *Meloidogyne* (Huang *et al.* , 1996).

3.3 *Meloidogyne* e sua biodiversidade

Os Nematoides das galhas são membros do gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1887, e constituem um grupo economicamente importante, distribuído em todo o mundo. Apresenta espécies polípagas, altamente adaptadas a diferentes habitats, parasitas obrigatórias de

plantas, parasitando mais de 2.000 espécies de plantas superiores (Moens *et al.*, 2009). Na agricultura, podem parasitar espécies de plantas de importância agrônômica como as produtoras de grãos, frutíferas e ornamentais (Cordeiro *et al.*, 2008).

A primeira descrição de um nematoide indutor de galhas em planta foi feita por Cornu (1879), com base em nematoides encontrados em galhas de raiz de sanfeno (*Onobrychis sativus* Lam.) no vale do Loire, França. Em 1887, Emilio Goeldi descreveu e ilustrou brevemente um nematoide das galhas encontrado em plantas de café no Brasil e o nomeou como *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887 (espécie tipo do gênero) (Moens *et al.*, 2009).

Meloidogyne spp. se alimentam de células vegetais modificadas no interior das raízes das plantas, onde induzem a formação de galhas, recebendo o nome de nematoide das galhas (Moens *et al.*, 2009).

Segundo Karssen & Moens (2006), mais de 90 espécies de *Meloidogyne* já foram descritas. Dentre essas, a maioria apresenta reprodução partenogenética. A sistemática desses organismos não pode ser incluída na definição clássica de espécie, a qual se baseia em formas de reprodução anfimítica. A diversidade biológica e genética que ocorre em *Meloidogyne* spp. é bastante complexa e difícil de ser compreendida. Por um lado, a reprodução partenogenética forma organismos poliplóides e estabiliza o genoma da sua descendência. No entanto, cada mutante que conseguir se reproduzir dará origem a um clone diferente da população original (Trintaphyllou, 1985).

3.4 Taxonomia de *Meloidogyne* spp.

As espécies do gênero *Meloidogyne* constituem uma pequena parte do Filo Nematoda, que inclui parasitas de plantas, de animais e espécies de vida livre em solo, água doce e no mar, além de parasitas do homem (Maggenti, 1981). *Meloidogyne* spp. fazem parte da classe Chromadorea, ordem Rhabditida, subordem Tylenchina, infraordem Tylenchomorpha,

superfamília Tylenchoidea e família Meloidogynidae (De Ley & Blaxter, 2002; Karssen & Moens, 2006).

3.5 Ciclo de vida e comportamento de *Meloidogyne* spp.

Os ovos dos nematoides das galhas são envolvidos por matrizes gelatinosas, que são geralmente depositadas na superfície das galhas. Às vezes as massas de ovos ocorrem sem que haja a presença de galhas. O desenvolvimento embrionário resulta no juvenil de primeiro estágio (J1) que passa por uma ecdise ainda no ovo, dando origem ao juvenil de segundo estágio (J2). A eclosão dos ovos de *Meloidogyne* spp. é influenciada principalmente pela temperatura. Para a maioria das espécies, a eclosão dos ovos não é dependente de estímulo de exsudatos radiculares das plantas. Entretanto, os exsudatos radiculares às vezes estimulam essa eclosão (Karssen & Moens, 2006).

Para que a eclosão ocorra, o invólucro que envolve o ovo de *Meloidogyne* torna-se flexível e a sua estrutura é alterada pela ação de enzimas. Quando os J2 eclode do ovo, eles infectam a mesma raiz ou penetram em raízes próximas. Os J2s e os machos são os estádios do ciclo de *Meloidogyne* que podem ser encontrados livremente no solo. Em algumas espécies, formas J2 podem sobreviver no solo em estado de quiescência por um longo período de tempo. Entretanto, durante esse período, há o consumo de reservas alimentares acumuladas no intestino dos juvenis. Como a infectividade está relacionada ao conteúdo dessas reservas, ela poderá ser reduzida depois de longos períodos fora das raízes (Karssen & Moens, 2006).

Os J2 são atraídos pelas raízes das plantas e a sua localização depende da percepção dos gradientes de atrativos que emanam das raízes. Os J2s infectivos acumulam-se na região de alongação celular, logo atrás da coifa, mesmo em plantas resistentes aos nematoides das

galhas. Eles também são atraídos pelos meristemas apicais, pontos de emergência de raízes laterais e locais de penetração de outros J2s.

Quando os nematoides das galhas entram em contato com as raízes, eles geralmente penetram imediatamente. O J2 penetra as paredes celulares rígidas da raiz por uma combinação de danos físicos, através da perfuração com o estilete e da ação de enzimas celulolíticas e pectolíticas (Karssen & Moens, 2006).

Depois da penetração das raízes, os J2s migram entre as células em direção ao córtex, na região de diferenciação celular. Essa migração através da lamela média causa a separação das células. Para contornar a barreira formada pela endoderme, os J2s migram em direção à ponta da raiz, contornando-a até encontrar a região meristemática apical. Em seguida, eles percorrem o cilindro vascular até a zona de diferenciação. Posteriormente, eles tornam-se sedentários no tecido cortical na zona de diferenciação (Karssen & Moens, 2006).

Os J2s alimentam-se de células especiais denominadas células nutridoras (células gigantes multinucleadas), onde passam por mudanças morfológicas, passando por três ecdises para se transformarem em juvenis de terceiro e quarto estádios. Formando a fêmea jovem iniciando a fase sedentária do nematoide, a qual durará até o final de seu ciclo de vida com o amadurecimento da fêmea, formação e liberação de ovos. As células adjacentes às células gigantes sofrem distúrbio hormonal (hiperauxina), levando à hiperplasia e hipertrofia das mesmas, dando origem às galhas, principal sintoma causado por nematoides desse gênero em plantas (Moens *et al.*, 2009). Durante esse desenvolvimento pós-embrionário, o sistema reprodutivo desenvolve-se e as gônadas tornam-se funcionais (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

A mudança de forma nos machos (piriforme para adulto vermiforme) ocorre antes da ecdise de J4 para adulto. Nesse período, o J4 passa por uma metamorfose na qual o corpo se alonga, assumindo o macho uma forma vermiforme (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). A

duração do ciclo de vida dos nematoides das galhas é bastante afetada pela temperatura. As fêmeas produzem ovos por cerca de dois a três meses, depois cessam a produção, podendo viver um pouco mais. Os machos vivem semanas e os J2s podem viver de poucos dias a meses (Taylor & Sasser, 1983; Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

3.6 Identificação de *Meloidogyne* spp.

3.6.1 Configuração da região perineal

A identificação das espécies do gênero *Meloidogyne* que ocorrem em uma determinada área é um item fundamental na adoção de estratégias de controle. Rotineiramente, o reconhecimento da identidade específica dos *Meloidogyne*, de importância agrícola, é feito por meio do exame da configuração perineal da fêmea ao microscópio óptico (Carneiro *et al.*, 2000).

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 & Almeida, 2001). Com o aumento rápido no número de espécies descritas no gênero, a identificação baseada na configuração da região perineal tem se tornado cada vez mais inapropriada, devido às variações já detectadas nesses padrões e, sobretudo, à similaridade e à sobreposição dessas características entre espécies (Carneiro *et al.*, 2000). Além disso, é comum o surgimento de populações com configurações perineais atípicas, o que aumenta a dificuldade de utilização dessas características para fins taxonômicos (Carneiro *et al.*, 2008a).

Métodos morfológicos também são usados na identificação de *Meloidogyne* spp., utilizando-se fêmeas, machos e juvenis de segundo-estádio (J2). Identificação precisa e confiável, baseada somente na morfologia é tarefa árdua mesmo para nematologistas qualificados e especializados em *Meloidogyne* (Esbenshade & Triantaphyllou, 1990).

3.6.2 Análise bioquímica e molecular

Em razão das dificuldades encontradas com a utilização da configuração perineal em trabalhos de diagnose no Brasil e no exterior, o uso da eletroforese de isoenzimas vem sendo proposto como o mais adequado em estudos de levantamento de *Meloidogyne* spp. O avanço alcançado com essa metodologia transformou-a numa ferramenta indispensável à diagnose diferencial (Carneiro *et al.*, 1996, 2000; Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Castro *et al.*, 2003; Cofcewicz *et al.*, 2004).

Atualmente, a melhor forma de caracterização das diferentes espécies de *Meloidogyne* faz-se pelo polimorfismo das esterases de fêmeas, sendo uma técnica bastante confiável (Carneiro *et al.*, 2000).

Estudos bioquímicos envolvendo proteínas solúveis foram realizados nos últimos 30 anos, demonstrando que várias espécies de nematoides das galhas podem ser diferenciadas, em nível específico, através de fenótipos enzimáticos, que podem ser obtidos através de eletroforese em géis de poliacrilamida (Carneiro *et al.*, 2000).

Os primeiros estudos com enzimas de nematoides usavam extratos de vários indivíduos (Dickson *et al.*, 1971; Hussey *et al.*, 1972). Mais tarde, foi desenvolvida uma técnica que permitiu a extração e eletroforese de enzimas e proteínas de um só indivíduo (Dalmaso & Berge, 1978), permitindo a utilização de um gel fino, contendo várias fêmeas individualizadas. Alguns fenótipos de esterase foram definidos como específicos e receberam designações que representavam as espécies (Janati *et al.*, 1982).

Estudos enzimáticos extensivos, com cerca de 800 populações originárias de diferentes países, têm demonstrado que as espécies de *Meloidogyne* podem ser diferenciadas por meio de marcadores enzimáticos, sobretudo as esterases (EST) e malato desidrogenases (MDH) (Esbenshade & Triantaphyllou 1985; Carneiro *et al.*, 1996; 2000). Infelizmente, não existem padrões enzimáticos para todas as espécies descritas e esses

perfis não fornecem informações suficientes para estudos de raças fisiológicas e variabilidade intraespecífica.

A variabilidade intraespecífica em nível enzimático é geralmente muito baixa. Isso pode ser explicado pelo fato das enzimas serem produzidas, através da expressão de genes altamente conservados e representarem apenas uma fração muito pequena do genoma, enquanto que as regiões não codantes são mais abundantes e submetidas a extensivas mudanças evolutivas (McClain *et al.*, 1987).

Castro *et al.* (2003) caracterizaram isoenzimaticamente populações de *Meloidogyne* spp., provenientes de regiões brasileiras produtoras de soja e constataram, através de revelação das esterases, populações de *M. javanica*, *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, *M. arenaria*, *M. paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes, Santos & Almeida, 1996 e algumas não identificadas a nível de espécie, sendo prevalente o fenótipo de *M. javanica* com 64,10% das 78 populações caracterizadas enzimaticamente.

O desenvolvimento de técnicas moleculares abriu novas perspectivas quanto à identificação de espécies e estudos de variabilidade intraespecífica dos nematoides de galhas. O advento da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) fez progredir de maneira considerável os métodos de análise, sendo que diferentes estudos sobre DNA genômico, mitocondrial e ribossômico foram realizados em isolados de *Meloidogyne* spp. (Harris *et al.*, 1990; Powers *et al.*, 1997; Zijlstra *et al.*, 1997).

Uma abordagem mais recente é a conversão dos marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) em SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions). SCAR é um termo cunhado por Paran & Michelmore (1993) para definir marcadores RAPD cuja sequência interna tenha sido determinada, permitindo compor primers mais longos, ricos em GC (Guanina-Citosina) e de sequência específica.

Entre as vantagens dos marcadores SCAR, em relação aos RAPD, destaca-se a sua maior reprodutibilidade, pois a técnica RAPD, quando executada sob diferentes condições, tais como qualidade e quantidade de DNA, marcas de enzima e de termociclador, pode apresentar variação no perfil de bandas amplificadas (Jones *et al.*, 1997). Os marcadores SCAR podem ser utilizados como pontos de referência física do genoma, servindo para mapeamento, ou como marcadores genéticos, quando estão associados a algum genótipo/fenótipo de interesse (Mienie *et al.*, 2002; Noir *et al.*, 2003).

Para os nematoides das galhas, marcadores SCAR já foram desenvolvidos para identificar duas espécies quarentenárias, *M. chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley, 1980 e *M. fallax* Karssen, 1996, e espécies de clima temperado como *M. hapla* Chitwood, 1949, ou ainda, para separar as três espécies mais comuns: *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, presentes principalmente em regiões tropicais e subtropicais ou em plantios em sistema protegido (Zijlstra, 2000; Zijlstra *et al.*, 2000; Fourie *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2004). Marcadores SCAR espécie-específicos também foram definidos para três das principais espécies de *Meloidogyne* parasitas do cafeeiro: *M. exigua* Goldi, 1887, *M. incognita* e *M. paranaensis* (Zijlstra *et al.*, 2000; Randig *et al.*, 2002).

3.7 Plantas hospedeiras de *Meloidogyne* spp.

Os nematoides das galhas são espécies polípagas e de fácil disseminação. Esses nematoides ocorrem mais frequentemente em áreas cultivadas, podendo ser encontrados também em áreas nativas. Cares & Huang (1991) relataram a ocorrência de *Meloidogyne* em maior frequência em Cerrado natural, principalmente em mata de galeria, do que em áreas cultivadas.

Huang *et al.* (1991) relataram a ocorrência de *M. javanica* e *M. arenaria* em raízes de árvores do Cerrado virgem do Brasil Central como faveira (*Dimorphandra mollis* Benth.) e *Cybianthus gardneri* (A. DC.), respectivamente.

Em estudo de grupos composicionais e tróficos de nematoides em amostras de solo coletadas próximas a rizosfera de sucupira branca (*Pterodon pubescens* Benth.) em Cerrado nativo, observou-se que dentre os nematoides fitoparasitas encontrados, *Meloidogyne* foi um dos predominantes (Huang *et al.*, 1996).

Lima *et al.* (2005) relataram o parasitismo de nematoides formadores de galhas em dois tipos de vegetação da Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro, Floresta de altitude e Restinga, tendo sido identificados *M. javanica*, *M. exigua*, *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. enterolobii* Yang & Eisenback, 1983 (sin. *M. mayaguensis* Rammah & Hirschmann, 1988).

Mattos *et al.* (2008) estudando comunidades de nematoides do solo relacionadas a coberturas vegetais nativas e cultivadas, constataram a prevalência de *Meloidogyne* em sistemas de cultivo, sendo encontrado em citrus, café, feijão-vagem, milho e tomate.

A ocorrência de *Meloidogyne* spp. também foi constatada em diversas amostras de solos e raízes de hortaliças no Distrito Federal. Em pepino, quiabo, feijão-vagem, cenoura, jiló, berinjela, almeirão e alface foi encontrado *M. javanica*; em quiabo, feijão-vagem, cenoura, jiló, berinjela e pimentão foi encontrado *M. incognita*; em iacom e tomateiro foi detectado *M. ethiopica* Whitehead, 1968 e um fenótipo atípico de *Meloidogyne* também foi encontrado parasitando pepino, alface, brócolis, quiabo, feijão-vagem e iacom (Carneiro *et al.*, 2008a).

3.8 Áreas de preservação de vegetação nativa de Cerrado no Distrito Federal

O Parque Nacional de Brasília (PNB) é a maior unidade de conservação de proteção integral no Distrito Federal, com 42.389 ha, área correspondente a 7,31% do Distrito Federal (Ministério do Meio Ambiente & The Nature Conservancy, 2007). O PNB localiza-se dentro

dos limites do Distrito Federal, pela sua posição no Brasil Central, apresentando clima tropical com temperatura média anual de 21°C e duas estações bem definidas, uma seca e outra chuvosa. Apresenta vegetação predominante de Cerrado, em sua maior parte Cerrado *sensu stricto* (Aquino *et al.*, 2009).

A Estação Biológica da Fazenda Água Limpa (FAL) representa uma das áreas ambientalmente preservadas do Distrito Federal, inserida nas Áreas de Proteção Ambiental (APAs) do Gama e Cabeça de Veado. Essa área apresenta 4.340 ha (42,36 Km²) e está localizada na porção Sul-Sudoeste da região administrativa do Lago Sul (Lacerda *et al.*, 2007; Doyle, 2009).

4. Material e Métodos

4.1 Áreas de estudo

O presente estudo foi realizado no Parque Nacional de Brasília (PNB) e na Estação Ecológica da Fazenda Água Limpa (FAL) (Fig. 1 A-B). Estas áreas foram selecionadas por apresentarem parte da vegetação nativa de Cerrado preservada.



Figura 1. Áreas de estudo. A- Parque Nacional de Brasília, B- Fazenda Água Limpa.

4.2 Coletas de solo em diferentes fitofisionomias do Cerrado

As coletas foram realizadas entre o período de janeiro de 2010 a Maio de 2011. Foram realizadas coletas de solo em cinco diferentes fitofisionomias de vegetação nativa do Cerrado, sendo elas: cerrado *sensu stricto*, campo cerrado, campo limpo, campo sujo e mata de galeria. Em cada fitofisionomia, amostras foram coletadas em quadrantes de 50m x 50m (2.500 m²) com cinco repetições selecionadas aleatoriamente. Em cada quadrante foram coletadas amostras em cinco pontos, sendo estes localizados na proximidade dos quatro vértices e ao centro (Fig. 2).

As amostras coletadas nos vértices foram feitas adentrando-se 3 metros em direção ao centro do quadrante. Em cada vértice e no centro dos quadrantes, foram coletadas quatro subamostras equidistantes em um metro (Fig.2), essas subamostras foram misturadas formando uma amostra composta, totalizando, 20 amostras simples e cinco amostras compostas por quadrante. As coletas foram feitas com trado a uma profundidade de 0 a 20 cm. Os pontos de coleta foram demarcados por GPS e as imagens foram geradas pelo software Google Earth com as coordenadas obtidas, visando a localização espacial dos pontos de coleta. Foram coletadas ao todo 25 amostras compostas por fitofisionomia no PNB e na FAL, totalizando 125 amostras compostas por área e 250 amostras nas duas áreas.

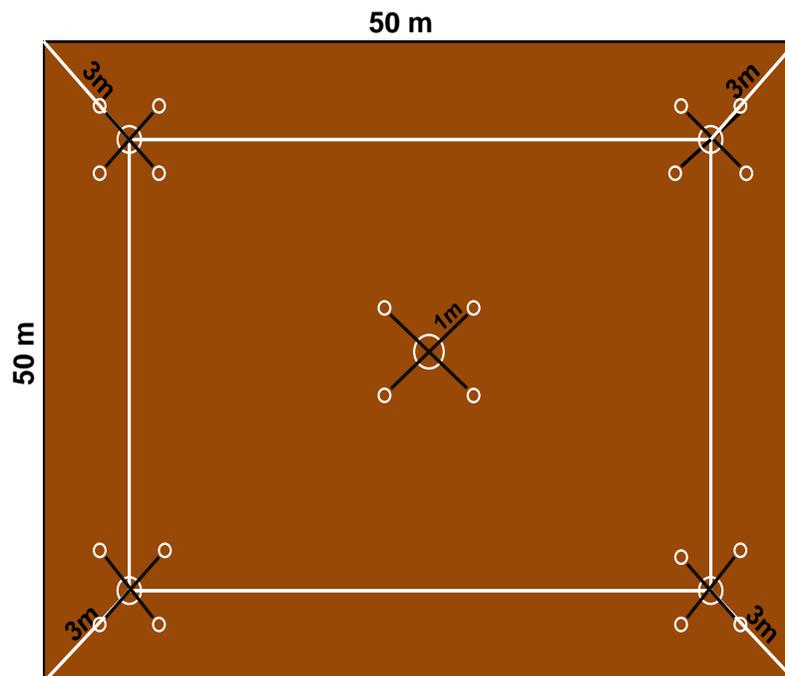


Figura 2. Esquema ilustrativo dos pontos de coleta em cada um dos quadrantes amostrados.

4.3 Cultivo de tomateiro em solo de vegetação nativa não estéril

Sementes de tomateiro (cv. Santa Cruz Kada) foram semeadas em sementeiras de isopor contendo o substrato Bioplant[®]. Cada amostra (5 amostras compostas/quadrante) foram colocadas em vasos de alumínio previamente autoclavados e misturadas 1:1 (v/v) com o substrato Bioplant. Para cada vaso foi transplantada uma muda de tomateiro com ± 10 a 15 cm de altura e 4 folhas definitivas. Os tomateiros foram cultivados em vasos por 90 dias em casa de vegetação com temperatura entre 26 e 30°C e umidade relativa em torno de 80%.

4.4 Avaliação dos tomateiros e caracterização isoenzimática de *Meloidogyne* spp.

Após 90 dias do transplante dos tomateiros, os mesmos foram retirados dos vasos, lavados e avaliados quanto à presença de galhas e massas de ovos no sistema radicular.

A caracterização enzimática das populações de *Meloidogyne* spp. foi realizada com base no fenótipo isoenzimático para esterase (Est), de acordo com a metodologia descrita por Carneiro & Almeida (2001).

Várias fêmeas adultas de cada população de *Meloidogyne* spp., de coloração branco-leitosa, iniciando a fase de oviposição foram extraídas, individualmente de raízes de tomateiro com auxílio de um estilete, sob microscópio estereoscópico e transferidas para tubos hematócrito, contendo 3 µl do tampão de extração (sacarose/Triton X-100, para esterase – EST). Os tubos foram mantidos em recipiente com gelo durante todo o processo de extração das amostras. As fêmeas foram maceradas contra o fundo e paredes dos tubos de extração por meio de um bastão de aço de extremidade arredondada. O extrato obtido foi aplicado, com o auxílio de uma seringa Hamilton, sobre papel Whatman 3mm com dimensões de 1,5 x 4,0 mm e, após este procedimento, foi colocado nas cavidades do gel de poliacrilamida a 7%.

Extratos protéicos de fêmeas de isolados puros de *M. javanica* foram usados na primeira cavidade de cada gel, como fenótipos-referência para a caracterização das esterases (Est). Gotas de bromofenol (azul de bromofenol a 0,1%) foram colocadas sobre as amostras para acompanhamento da migração. A corrida de migração seguiu a voltagem de 80-120 V em temperaturas médias de 4-8°C durante 2 horas.

Os padrões de bandas no gel de poliacrilamida foram obtidos com as soluções reveladoras específicas para a isoenzima esterase (alfa-naftil-acetato, fast blue RR salt e tampão fosfato de sódio) preparadas imediatamente antes do seu uso. Após incubação no escuro, a 37°C, por aproximadamente 20-60 minutos, os géis foram lavados em água corrente e fixados em solução composta de água destilada, álcool metílico e ácido acético na proporção (5:5:1) (v/v) por 30 minutos. Em seguida os géis foram secos entre folhas de papel celofane.

Após serem caracterizadas, essas populações foram multiplicadas em tomateiro contendo solo estéril, por um período de 90 dias para posterior extração de ovos com a finalidade de validar marcadores SCAR espécie-específicos e confirmar a identificação das espécies coletadas em vegetação nativa do Cerrado.

4.5 Extração de ovos de *Meloidogyne* spp.

A extração de ovos foi feita através do método descrito por Carneiro *et al.* (2004), 90 dias após inoculação dos tomateiros. As raízes foram lavadas cuidadosamente, cortadas em pedaços de \pm 2cm, homogeneizadas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,25% e trituradas em liquidificador por 1 minuto a baixa rotação. Em seguida, a suspensão foi passada por um conjunto de peneiras sobrepostas (20-100-500 mesh). Os resíduos das raízes e os ovos de *Meloidogyne* foram lavados com água corrente e coletados em peneira de 500 mesh.

A suspensão foi distribuída em tubos de 15 ml, aos quais adicionou-se uma colher de chá de caulim homogeneizando-se a suspensão. Após centrifugação a 2.000 rpm 5 minutos, o sobrenadante foi eliminado. O volume dos tubos foram completados com solução de sacarose 30% a 4°C e centrifugados na mesma velocidade por 2 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi vertido em peneira de 500 mesh e lavado com água destilada.

Os ovos foram colocados em tubos de 15 ml, completando-se o volume com água estéril e centrifugados por 3 minutos a 2.000 rpm. O sobrenadante foi vertido cuidadosamente, sendo os ovos pipetados e transferidos para tubos “ependorf” de 1,5 ml. Após centrifugação a 10.000 rpm por 2 minutos, a água foi eliminada e os ovos armazenados a -80°C, até serem submetidos à extração de DNA.

4.6 Extração de DNA

O DNA genômico de todas as populações de nematoides foi extraído de alíquotas de 200 a 300 µl de ovos, de acordo com o método descrito por Randig *et al.* (2002).

Ovos armazenados a -80°C foram macerados em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido. Após o resfriamento, o material foi recuperado em tubos de 2 ml, aos quais foram adicionados 500 µl de tampão de extração - NIB (0,1 M NaCl; 30 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA; 0,7 mM β-mercaptoetanol; 5 mM Triton X-100 - NPHO). Efetuada a homogeneização, as amostras foram centrifugadas duas vezes a 14.000 rpm por 2 minutos e eliminado o sobrenadante. Em seguida, foram acrescentados 800 µl de tampão de homogeneização (0,1 M NaCl; 0,2 M sacarose; 10 mM EDTA) e 200 µl do tampão de lise (0,125 M EDTA; 0,5 M Tris-HCl pH 9,2; 2,3% SDS). Após a homogeneização, as amostras foram incubadas a 55°C por 30 minutos e deixadas à temperatura ambiente por 10 minutos.

A purificação foi realizada adicionando-se 1:1 (v/v) de fenol (1 ml), seguindo-se à homogeneização e centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi recuperado e misturado à 1:½ (v/v) fenol (500 µl) + 1:½ (v/v) de clorofórmio (500 µl) e centrifugados a 14.000 rpm por 3 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 200 µl de éter. Após centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos, o éter foi eliminado com auxílio de uma micropipeta.

Para precipitação do DNA, 1:1 (v/v) de etanol a 100% foi adicionado ao sobrenadante, efetuando-se a homogeneização e observando-se a formação do pellet. O DNA foi recuperado com auxílio de uma pipeta Pasteur esterilizada de ponta fechada, em seguida, lavado com etanol 70%, seco à temperatura ambiente, recuperado em 20 µl de água deionizada e esterilizada (Milli-Q) e armazenado a -20°C. Aplicou-se também o método adicional quando o DNA apresentava-se fragmentado. Para isso, a precipitação foi efetuada a -80°C durante 30 minutos. Em seguida efetuou-se uma centrifugação a 14.000 rpm por 10

minutos. O sobrenadante foi descartado e sobre o precipitado adicionou-se etanol 70%. Após a centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos, eliminou-se o etanol. O precipitado foi seco à temperatura ambiente, recuperado em 10-20 µl de água esterilizada e deionizada (Milli-Q) e armazenado a -20°C. A concentração de DNA foi estimada em gel de agarose a 1% por comparação do DNA total com diferentes concentrações de DNA *lambda* (GibcoBRL®). O DNA das amostras foi armazenado a -20°C.

4.7 Marcadores espécie-específicos para identificação de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. hapla*

Marcadores SCAR espécie-específicos, desenvolvidos por Zijlstra (2000), Zijlstra *et al.* (2000) e Randig *et al.* (2002) foram usados para identificação de populações de *Meloidogyne* spp. (Tabela 1).

As reações de amplificação SCAR-PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl, contendo 2 µl de DNA total [3ng/µl]; 1µl de cada primer [10 µM]; 4 µl de dNTPs [1,25 mM] (Invitrogen); 2,5 µl tampão 10X + MgCl₂ (Phoneutria Biotecnologia e Serviços-pht); 0,25 µl da enzima Taq DNA polimerase [5U/ µl] (pht) e 14,25 µl de água deionizada (Milli-Q). Em cada tubo foi adicionada uma gota de óleo mineral para prevenção de evaporação. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100. (MJ Research) programado de acordo com as condições descritas para cada par de primers: incK14F/R (Randig *et al.*, 2002): desnaturação inicial do DNA por 5 min. a 94 °C, 30 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 45 seg. a 64 °C, 1 min. a 70 °C e extensão final de 8 min. a 70 °C. Para os primers Far/Rar (Zijlstra *et al.*, 2000): 2 min. a 94 °C, 35 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 30 seg. a 61 °C, 1 min. a 72 °C e extensão final de 8 min. a 70 °C. As condições para os primers Fjav/Rjav (Zijlstra *et al.*, 2000): 2 min. a 94 °C, 35 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 30 seg. a 64 °C, 1 min. a 72 °C e extensão final de 8 min. a 70 °C; para os primers hF/hR (Zijlstra, 2000): 2 min. a 94 °C, 30 ciclos de 30 seg. a 94 °C,

30 seg. a 60 °C, 1 min. a 72 °C e extensão final de 8 min. a 70 °C. Para *M. morocciensis*, o marcador usado foi o mesmo de *M. arenaria* (Zijlstra *et al.*, 2000) pois não há marcador específico desenvolvido para essa espécie. No entanto, em se tratando de espécie próxima a *M. arenaria*, foram realizadas reações de PCR com marcador específico para *M. arenaria* (Zijlstra *et al.*, 2000), no sentido de testar a especificidade desse marcador. No caso de *M. arenaria*, a população encontrada não foi possível ser multiplicada em vasos, pois não havia inóculo suficiente, uma vez que a população encontrada estava em quantidade ínfima.

Para as amostras que apresentaram misturas de espécies, além do teste simples com SCAR-PCR, foi feito também um SCAR-PCR multiplex de acordo com as condições relatadas para *M. hapla* (Zijlstra, 2000), exceto para a temperatura de anelamento (T_m), a qual foi estabelecida a 61 °C e 35 ciclos de amplificação.

Tabela 1. Características de marcadores SCAR espécie-específicos para *Meloidogyne* spp.

| Espécie | Primer SCAR | Sequência (5' → 3') | Fragmento (pb) | Referência |
|------------------------|-------------|------------------------|----------------|-------------------------------|
| <i>M. incognita</i> | inc-K14-F | GGGATGTGTAAATGCTCCTG | 399 | Randig <i>et al.</i> (2002) |
| | inc-K14-R | CCCGCTACACCCTCAACTTC | | |
| <i>M. arenaria</i> | Far | TCGGCGATAGAGGTAAATGAC | 420 | Zijlstra <i>et al.</i> (2000) |
| <i>M. morocciensis</i> | Rar | TCGGCGATAGACACTACAAC | | |
| <i>M. javanica</i> | Fjav | GGTGCGCGATTGAACTGAGC | 670 | Zijlstra <i>et al.</i> (2000) |
| | Rjav | CAGGCCCTTCAGTGGAACATAC | | |
| <i>M. hapla</i> | hF | TGACGGCGGTGAGTGCGA | 610 | Zijlstra (2000) |
| | hR | TGACGGCGGTACCTCATAG | | |

pb: pares de bases.

4.8 Avaliação da hospedabilidade em plantas nativas a *Meloidogyne javanica*

4.8.1 Coleta, identificação e propagação de espécies vegetais nativas

Para esse experimento foram utilizadas sementes de 17 espécies arbóreas nativas coletadas no Cerrado do Distrito Federal, (Tabela 2), as quais foram identificadas segundo Lorenzi (1992; 1998) ou mediante consulta a especialista junto aos Departamentos de Botânica ou de Engenharia Florestal da Universidade de Brasília.

Essas sementes foram semeadas em sementeiras de isopor preenchidas com substrato autoclavado contendo solo do tipo latossolo vermelho de textura média/areia/composto orgânico/vermiculita, nas proporções de 3:1:1:1. Para sementes não apropriadas para semeadura em sementeiras, realizou-se a semeadura em vasos de 2 litros.

Escarificação mecânica foram realizadas em quase todas as sementes segundo Almeida *et al.* (1998), exceto, *Magonia pubescens* St. Hil., *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl, *Mimosa caesalpinifolia* Benth. e *Dalbergia miscolobium* Benth. Plântulas foram transplantadas para vasos de alumínio contendo até 2 litros de solo esterilizado e ao atingirem entre 10 a 15 cm de altura foram inoculadas com 10.000 ovos de *M. javanica* por planta. Plantas de tomateiro cultivar Santa Cruz Kada, (*Solanum lycopersicum*) foram inoculadas com *M. javanica* como descrito acima e serviram de controle positivo por se apresentarem altamente suscetíveis ao nematoide.

Tabela 2. Espécies botânicas nativas do Cerrado avaliadas em relação à hospedabilidade a *Meloidogyne javanica*.

| Espécie botânica | Nome popular | Família |
|--|-----------------------|----------------|
| <i>Amburana cearensis</i> (Freire Allemão) A. C. Smith | Amburana | Fabaceae |
| <i>Dalbergia miscolobium</i> Benth. | Jacarandá-do- cerrado | Fabaceae |
| <i>Dimorphandra mollis</i> Benth. | Faveira | Fabaceae |
| <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong. | Orelha de macaco | Fabaceae |
| <i>Enterolobium gummiiferum</i> (Mart.) Macb. | Tamboril | Fabaceae |
| <i>Eugenia dysenterica</i> Mart. ex DC. | Cagaita | Myrtaceae |
| <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. Ex Hayne | Jatobá-do-cerrado | Fabaceae |
| <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. ex Saddi | Pau santo | Guttiferae |
| <i>Lafoensia pacari</i> St. Hil. | Pacari | Lythraceae |
| <i>Magonia pubescens</i> St. Hil. | Tingui | Sapindaceae |
| <i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> Benth. | Sabiá | Fabaceae |
| <i>Ormosia arborea</i> (Vell.) Harms. | Olho de cabra | Fabaceae |
| <i>Platypodium elegans</i> Vog. | Canzileiro | Fabaceae |
| <i>Qualea grandiflora</i> Mart. | Pau terra | Vochysiaceae |
| <i>Solanum lycocarpum</i> St. Hil. | Lobeira | Solanaceae |
| <i>Stryphnodendron adstringens</i> mart. coville | Barbatimão | Fabaceae |
| <i>Tabebuia impetiginosa</i> (Mart. ex DC.) Standl | Ipê roxo | Bignoniaceae |

O experimento foi mantido em casa de vegetação com temperatura variando de 25 a 30 °C. O ensaio foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com 17 tratamentos, cinco repetições e uma testemunha positiva (tomateiro).

4.8.2 Produção de inóculo e inoculação de *Meloidogyne javanica* em plantas nativas

Meloidogyne javanica foi escolhida para as inoculações em plantas nativas por ter sido a espécie mais frequente nas amostras de solo coletadas. A população usada no bioensaio foi coletada no Parque Nacional de Brasília na fitofisionomia campo limpo, coordenadas geográficas 15°39'77.7"S; 47°57'52.2"W. A confirmação da identidade taxonômica dessa população foi feita através do fenótipo das esterases (Est) (Carneiro & Almeida, 2001) e do marcador SCAR (Zijlstra *et al.*, 2000). Os ovos desta população foram extraídos pelo método de Hussey & Barker (1973) modificado por Boneti & Ferraz (1981) com 0,5% de hipoclorito de sódio (NaOCl). A concentração de ovos foi determinada em lâmina de Peters ao microscópio óptico, para inoculação de 10.000 ovos/planta. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação por seis meses até serem avaliadas.

4.8.3 Bioensaio para avaliação da infecção causada por *Meloidogyne javanica* e determinação do Fator de Reprodução (FR)

Seis meses após a inoculação, as partes aéreas de cada planta foram cortadas e descartadas. Os sistemas radiculares foram retirados dos vasos, lavados, pesados e corados com floxina B a 0.0015% (15 mg/l) por cerca de 20 minutos; posteriormente foram avaliados os índices de galhas e de massas de ovos, de acordo com a escala de Taylor & Sasser (1978): 0= nenhuma galha ou massa de ovos; 1= 1-2 galhas ou massas de ovos; 2= 3-10; 3= 11-30; 4= 31-100; 5= > 100 galhas ou massas de ovos.

Para a extração de ovos de raízes utilizou-se a metodologia proposta por Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981). Triturou-se, em liquidificador, o sistema radicular de plantas individuais (raízes foram cortadas em pedaços de \pm 2 cm) em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% por 2 minutos. Em seguida, a suspensão foi passada por um conjunto de peneiras de 20, 100 e 500 mesh. Os ovos foram recuperados da peneira de

500 mesh e o volume padronizado para 100 ml. A quantificação foi realizada em lâmina de Peters ao microscópio óptico. Foram feitas três contagens de cada amostra de raiz e a média das contagens utilizada para o cálculo do FR. O FR foi calculado, dividindo-se o número total de ovos/planta pelo número de ovos inoculados (10.000). Foram consideradas más hospedeiras as espécies que apresentaram $FR < 1$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ocorrência de *Meloidogyne* spp. no Parque Nacional de Brasília (PNB) e Fazenda Água Limpa (FAL)

Das 125 amostras de solo coletadas no PNB, nove estavam infestadas com *Meloidogyne* spp., totalizando um percentual de 7,2 %. Das nove amostras infestadas, sete apresentaram *M. javanica*, fenótipo de esterase (EST) J3 (Rm: 1,0, 1,25, 1,4) e duas *M. morocciensis* EST A3 (Rm: 1,1, 1,2, 1,3). Nessas amostras não foram encontradas populações com misturas de espécies. Em quase todas as fitofisionomias do PNB estudadas foram encontrados nematoides das galhas, exceto em campo sujo. Em campo limpo encontrou-se o maior número de populações: três de *M. javanica* e uma de *M. morocciensis* (Tabela 3, Fig. 3).

Tabela 3. Espécies de *Meloidogyne* encontradas em diferentes fitofisionomias do Parque Nacional de Brasília.

| Fitofisionomia do Cerrado | Nº de populações | Espécies | Fenótipo enzimático | Rm* |
|------------------------------|------------------|------------------------|---------------------|--------------|
| Cerrado <i>sensu stricto</i> | 1 | <i>M. morocciensis</i> | A3 | 1,1 1,2 1,3 |
| Campo cerrado | 2 | <i>M. javanica</i> | J3 | 1,0 1,25 1,4 |
| Campo limpo | 3 | <i>M. javanica</i> | J3 | 1,0 1,25 1,4 |
| | 1 | <i>M. morocciensis</i> | A3 | 1,1 1,2 1,3 |
| Campo sujo | - | - | - | - |
| Mata de galeria | 2 | <i>M. javanica</i> | J3 | 1,0 1,25 1,4 |

* Rm= Mobilidade relativa

(-) Ausência de *Meloidogyne* spp.

No PNB, o percentual de ocorrência encontrado para amostras de solo infestadas está de acordo com valores relatados por Souza *et al.* (1994).

Na FAL, das 125 amostras analisadas, 48 apresentaram *Meloidogyne* spp. (38,4 %), sendo 41 populações de ocorrência isolada e sete populações com mistura de espécies. A elevada ocorrência de *Meloidogyne* spp. em amostras coletadas na FAL, quando comparada com a pequena ocorrência encontrada em amostras coletadas no PNB e por outros autores (Cares & Huang, 1991; Souza *et al.*, 1994), indica que a frequência de ocorrência, bem como a diversidade de espécies, pode estar relacionada à vegetação presente nos sítios de coleta, determinada também pelo tipo de solo presente. Segundo Huang & Cares (1995) a maior densidade de nematoides fitoparasitas foi encontrada em áreas contendo solo do tipo acrisolos com vegetação perene.

Em ambos os locais, PNB e FAL, houve predominância de espécies em ocorrência isolada, como demonstrado anteriormente por Carneiro *et al.* (2008a) para espécies de *Meloidogyne* parasitas de hortaliças no Distrito Federal.

Na FAL foram detectadas 57 populações, sendo 43 identificadas como *M. javanica* EST J3 e J2 (Rms: 1,0, 1,25, 1,4 e 1,0, 1,25), sete como *M. incognita* EST I1 e I2 (Rms: 1,0 e 1,1, 1,2), seis *M. hapla* EST H1 (Rm: 1,2) e 1 *M. arenaria* EST A2 (Rm: 1,2 1,3) (Tabela 4, Fig. 3).

Tabela 4. Espécies de *Meloidogyne* encontradas em diferentes fitofisionomias da Fazenda Água Limpa.

| Fitofisionomia do Cerrado | Nº de populações | Espécies | Fenótipo enzimático | Rm* |
|------------------------------|------------------|---|---------------------|---------------------------------|
| Cerrado <i>sensu stricto</i> | 4 | <i>M. javanica</i> | J3 | 1,0 1,25 1,4 |
| Campo cerrado | 3 | <i>M. javanica</i> | J3 | 1,0 1,25 1,4 |
| | 1 | <i>M. javanica</i> | J2 | 1,0 1,25 |
| Campo limpo | 18 | <i>M. javanica</i> | J3 | 1,0 1,25 1,4 |
| | 1 | <i>M. incognita</i> | I2 | 1,1 1,2 |
| | 3 | <i>M. javanica</i> / <i>M. incognita</i> | J3+I2 | 1,0 1,25 1,4 / 1,1 1,2 |
| Campo sujo | 7 | <i>M. javanica</i> | J3 | 1,0 1,25 1,4 |
| | 2 | <i>M. hapla</i> | H1 | 1,2 |
| | 1 | <i>M. incognita</i> | I2 | 1,1 1,2 |
| | 1 | <i>M. javanica</i> / <i>M. arenaria</i> / <i>M. hapla</i> | J3+A2+H1 | 1,0 1,25 1,4 / 1,2 1,3 / 1,2 |
| | 3 | <i>M. javanica</i> / <i>M. hapla</i> | J3+H1 | 1,0 1,25 1,4 / 1,2 |
| Mata de galeria | 2 | <i>M. javanica</i> | J3 | 1,0 1,25 1,4 |
| | 1 | <i>M. javanica</i> | J2 | 1,0 1,25 |
| | 1 | <i>M. incognita</i> | I2 | 1,1 1,2 |
| | 1 | <i>M. incognita</i> | I1 | 1,0 |

*Rm= Mobilidade relativa

Das amostras coletadas nas diferentes fitofisionomias ocorrentes na FAL, as que apresentaram um maior número de amostras positivas para *Meloidogyne* foram campo limpo com 22 amostras, sendo 21 infestadas com *M. javanica* e campo sujo com 14 amostras (11

infestadas com *M. javanica*). Porém, também foram encontrados *Meloidogyne* spp. em campo cerrado, cerrado *sensu stricto* e mata de galeria, embora em menor frequência (Tabela 4, Fig. 3). Esses dados contrastam com os relatados por Cares & Huang (1991) que relataram a mata de galeria como a fitofisionomia de maior ocorrência de *Meloidogyne* sp.

Esperava-se que a diversidade de espécies fosse maior em cerrado *sensu stricto*, uma vez que essa fitofisionomia apresenta uma maior diversidade de plantas (Cares & Huang, 2008). Porém, a maior diversidade de espécies de *Meloidogyne* ocorreu em campo sujo, um tipo fisionômico exclusivamente herbáceo-arbustivo, com arbustos e subarbustos esparsos, cujas plantas, muitas vezes, são constituídas por indivíduos menos desenvolvidos do que as espécies arbóreas de Cerrado *sensu stricto* (Ribeiro & Walter, 1998).

A grande frequência de *M. javanica* no Cerrado pode ser explicada por se tratar de uma espécie de grande ocorrência e distribuição em regiões tropicais e subtropicais, devido a sua ampla gama de hospedeiros (Dong *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2004).

De maneira geral, os resultados desse estudo estão de acordo com os de Souza *et al.* (1994), com prevalência de *M. javanica* em relação a outras espécies de *Meloidogyne*. Segundo esses autores, dos 99 isolados estabelecidos em vasos, oriundos de solo de vegetação nativa do Cerrado, 84 ou 85% dos mesmos foram identificados como *M. javanica* fenótipo EST J3. Nesse estudo, *M. javanica* ocorreu em 75,76 % das amostras que continham *Meloidogyne* spp. coletadas vegetação nativa do Cerrado, com populações apresentando dois fenótipos distintos para esterase, EST J3 e J2 (Tabelas 3 e 4, Fig. 3).

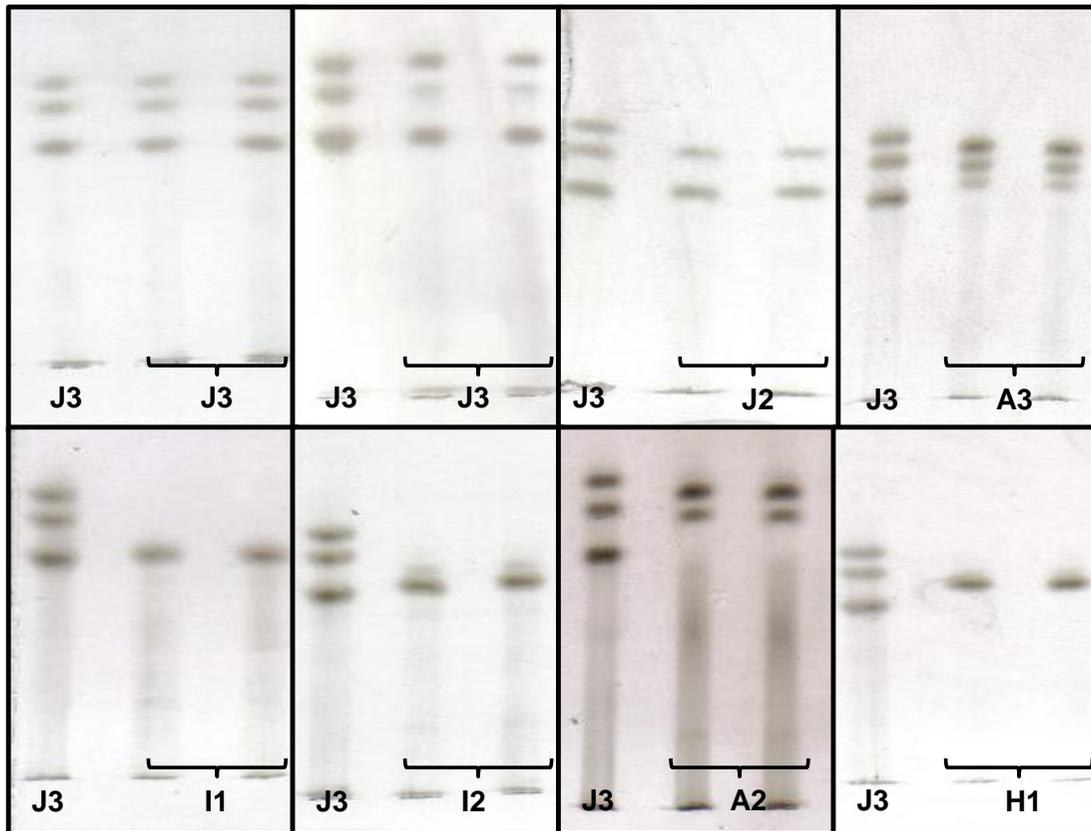


Figura 3. Perfis de esterase (EST) de populações de *Meloidogyne* spp. encontradas no cerrado do Parque Nacional de Brasília e da Estação Ecológica da UnB localizada na Fazenda Água Limpa. J3- *M. javanica*, J2- *M. javanica*, A3- *M. morocciensis*, I1, I2- *M. incognita*, A2- *M. arenaria*, H1- *M. hapla*. *M. javanica* (J3) foi usado como padrão de EST.

Meloidogyne javanica também tem se mostrado predominante em levantamentos realizados na Mata Atlântica (Lima *et al.*, 2005) e em áreas agrícolas cultivadas com culturas de importância econômica como soja (Castro *et al.*, 2003) e banana (Cofcewicz *et al.*, 2004).

A detecção de dois perfis distintos de esterase em populações de *M. javanica* do Cerrado indica a presença de variantes populacionais, aos quais deverão ser consideradas em maior detalhe em estudos posteriores (Fig. 3). Variantes populacionais de *M. javanica* com

os fenótipos EST J2 e J3 (com banda intermediária mais clara) já haviam sido observados e estudados anteriormente no Brasil por Carneiro *et al.* (1996), Castro *et al.*,(2003) e Cofcewicz *et al.* (2004) em culturas de importância econômica em áreas de produção comercial.

A detecção de *M. hapla* nos Cerrados do DF amplia a lista de espécies de *Meloidogyne* associadas à vegetação nativas desse bioma, uma vez que não há relato anterior dessa espécie para o Cerrado. Apesar de *M. hapla* ser uma espécie de clima temperado, também pode ser encontrado em altitudes mais elevadas nos trópicos (Hunt & Handoo, 2009). No Brasil é comum a sua ocorrência na região sul. Essa espécie apresenta uma distribuição restrita no Brasil e já foi detectada em temperaturas de 15 a 25 °C (Lordello, 1992). Randig *et al.* (2002), estudando duas populações brasileiras de *M. hapla* provenientes de Caxias do Sul (clima temperado) e Botucatu (clima tropical de altitude), observaram através de análises moleculares, uma variabilidade de cerca de 67,5 % indicando uma alta diversidade genética. Apesar de *M. hapla* se reproduzir por partenogênese, seja meiótica facultativa ($n= 13-17$ ou poliplóides $n= 28$ e 34) ou mitótica obrigatória ($2n= 30-32, 43-48$) (Chitwood & Perry, 2009), a grande variação no número de cromossomos é um indicativo dessa variabilidade, a qual necessita ser estudada em detalhe (Chitwood & Perry, 2009).

Meloidogyne morocciensis (Sin. *M. arenaria* EST A3) já havia sido relatada em raízes de mudas de mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Tréc.), planta nativa do Cerrado, por Carneiro *et al.*, (2006). No entanto, a planta foi cultivada em área experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, não se tratando de uma população nativa do Cerrado.

Anteriormente, Souza *et al.* (1994) haviam detectado em solo de vegetação nativa do Cerrado do Distrito Federal o fenótipo EST A3, atribuído à época a *M. arenaria*. Recentemente, Carneiro *et al.* (2008b), com base em caracteres morfológicos/morfométricos, citogenéticos e moleculares demonstraram que o fenótipo EST A3, antes atribuído a *M. arenaria*, pertence a *M. morocciensis*.

Meloidogyne arenaria já havia sido detectado no Cerrado do Distrito Federal por Souza *et al.* (1994), em 15 % das amostras coletadas. Nesse levantamento, *M. arenaria* e *M. javanica* (85 %) foram as únicas espécies encontradas. *Meloidogyne arenaria* foi relatado também parasitando raízes de *Cybianthus gardneri* A. DC. (Myrsinaceae), planta nativa do Cerrado (Huang *et al.*, 1991). Dados desse estudo indicaram a presença de apenas uma população de *M. arenaria*, detectada em mistura com *M. javanica* e *M. hapla* em campo sujo.

Meloidogyne incognita foi encontrado nas fitofisionomias campo limpo (uma população isolada e outras três em mistura com *M. javanica*), campo sujo (uma população isolada) e mata de galeria (duas populações isoladas), totalizando 10,60 % das populações encontradas. Nas sete populações relatadas nesse trabalho, foram encontrados dois fenótipos para esterase, EST I1 e I2, sendo EST I2 o mais comumente encontrado (6 populações) e o fenótipo I1 encontrado somente em mata de galeria (Tabela 4, Fig. 3). Trata-se de uma das mais bem sucedidas espécies de *Meloidogyne*, a qual ocorre mundialmente e parasita plantas das mais diferentes famílias botânicas, incluindo espécies de maior importância agrícola. Apesar de *M. incognita* ocorrer em áreas de produção agrícola no Cerrado, este foi o primeiro relato desse nematoide em solo de vegetação nativa preservada do Cerrado. Anteriormente, *M. incognita* já havia sido detectado em solo de vegetação nativa de Mata Atlântica, no Estado do Rio de Janeiro por Lima *et al.* (2005).

5.2 Identificação molecular: marcador espécie-específico SCAR

Das 66 populações identificadas por eletroforese de isoenzimas, 42 foram reproduzidas com êxito em tomateiros e testadas com marcadores espécie-específicos SCAR-PCR. Quatro pares de primers espécie-específicos (Tabela 1) foram testados para 42 populações, sendo sete do PNB e 35 da FAL.

Os resultados do SCAR-PCR confirmaram a identificação por eletroforese de isoenzimas, com uma pequena vantagem na identificação de misturas de espécies (Tabela 5, Fig. 4). Das 42 populações testadas com SCAR, 37 estavam puras e 5 misturadas.

O método SCAR-PCR permitiu a diferenciação das principais espécies de *Meloidogyne* encontradas, através da amplificação de fragmentos específicos para as populações de *M. incognita* (399 pb), *M. morocciensis* (420 pb), *M. javanica* (670 pb) e *M. hapla* (610 pb) (Fig. 4). Os marcadores SCAR não permitiram a diferenciação de variações intra-específicas, como as encontradas em populações de *M. incognita* e *M. javanica* com fenótipos isoenzimáticos distintos (Est I1 e I2) (Est J2 e J3) respectivamente. A técnica SCAR-PCR multiplex, adaptada de Zijlstra (2000), foi utilizada na identificação de misturas de populações de *M. javanica* com *M. hapla* e de *M. javanica* com *M. incognita* (Fig. 4). O par de primers Far e Rar (Zijlstra *et al.*, 2000), desenhados provavelmente com base em DNA de populações de *M. arenaria* de fenótipos distintos (Est A2 e Est A3= *M. morocciensis*) reagiram positivamente com uma população de *M. morocciensis*. A população de *M. arenaria* Est A2 não se multiplicou em vasos, pois não havia inóculo suficiente, uma vez que a população encontrada estava em quantidade ínfima. Sendo assim, não foi possível extrair DNA para as reações SCAR-PCR.

A identificação realizada com marcadores SCAR é simples, rápida, sensível e de baixo custo, permitindo o processamento de um grande número de amostras de *Meloidogyne* spp. ao mesmo tempo (Muniz *et al.*, 2008).

O alto grau de sensibilidade e especificidade do método é evidenciado pela detecção de misturas de espécies (Tabela 5), amplificando a espécie alvo a partir de 1% de DNA em mistura (Randig *et al.*, 2004). Além da alta sensibilidade, o método SCAR-PCR apresenta outras vantagens como: análises com base em DNA obtido a partir de qualquer estágio de

desenvolvimento do nematoide e a simplicidade da interpretação dos resultados de amplificação, com respostas do tipo “positiva/negativa” (Randig *et al.*, 2002).

Os primers utilizados nesse estudo, com excessão de hF e hR (Zijlstra, 2000), foram testados anteriormente por Adam *et al.* (2007) para 7 populações de nematoides de galha, incluindo *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. hapla*, originárias de países como Líbia, Grécia, França, Holanda e Porto Rico. Os autores comprovaram reações específicas dos primers para as populações testadas.

Os primers Fjav e Rjav e Far e Rar já haviam sido testados anteriormente por Zijlstra *et al.* (2000), para 33 isolados pertencentes a 7 espécies de *Meloidogyne*, e por Meng *et al.* (2004), para 42 isolados pertencentes a 5 espécies de nematoides de galha, confirmando a sua eficácia para as populações testadas. Wishart *et al.* (2002) e Tzortzakakis *et al.* (2005) também testaram com sucesso os primers Fjav e Rjav em reações de PCR com DNA extraído a partir de fêmeas individuais. No entanto, segundo Carneiro *et al.* (2008b), os primers Far e Rar, testados anteriormente por Zijlstra *et al.*(2000), Meng *et al.*(2004), Adam *et al.* (2007), Wishart *et al.* (2002) e Tzortzakakis *et al.* (2005), não amplificaram todas as populações de *M. arenaria* testadas, além de não permitir a diferenciação de *M. arenaria* de *M. morocciensis*. Portanto, eletroforese de isoenzimas ainda é a técnica mais recomendada para a identificação de *M. arenaria* e *M. morocciensis*.

Os resultados obtidos com este estudo confirmam e validam os marcadores SCAR usados na identificação de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. hapla*, *M. morocciensis* (Sin. *M. arenaria* Est A3) encontradas nesse estudo associada à vegetação nativas do Cerrado.

A técnica SCAR-PCR se confirmou como ferramenta confiável na identificação molecular dessas espécies mesmo em campo, onde a variação entre isolados é maior dependendo da espécie. Uma das limitações dessa técnica reside no pequeno número de primers espécie-específicos até então desenvolvidos para *Meloidogyne* (Blok & Powers,

2009), a não especificidade e inconsistência de alguns primers para uso em diagnósticos de rotina (Adam *et al.*, 2007), para os quais DNA oriundo de nematoides individuais não é detectável por PCR.

Considerando os resultados obtidos, os primers SCAR-PCR representam uma poderosa e confiável ferramenta na identificação de espécies de *Meloidogyne*.

Tabela 5. Comparação dos resultados obtidos com utilização da técnica eletroforese de isoenzimas, fenótipos de esterase (EST), e a técnica SCAR-PCR, com a utilização de marcadores para as espécies de *Meloidogyne* encontradas no Parque Nacional de Brasília e na Fazenda Água Limpa e seus respectivos pontos de coleta.

| Nº da amostra | Local | Fitofisionomia | Coordenadas geográficas | Espécies identificadas | |
|---------------|-------|------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|------------------------|
| | | | | EST | SCAR |
| 1 | PNB | Cerrado <i>sensu stricto</i> | 15° 41' 25.80"S 15° 41' 25.80"W | <i>M. morocciensis</i> (A3) | - |
| 2 | PNB | Campo cerrado | 15° 42' 47.58"S 47° 55' 56.58"W | <i>M. javanica</i> (J3) | - |
| 3 | PNB | Campo cerrado | 15° 42' 47.76"S 47° 55' 55.02"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 4 | PNB | Campo limpo | 15° 39' 46.62"S 47° 57' 31.32"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 5 | PNB | Campo limpo | 15° 43' 38.28"S 47° 55' 36.90"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 6 | PNB | Campo limpo | 15° 43' 37.26"S 47° 55' 37.38"W | <i>M. morocciensis</i> (A3) | <i>M. morocciensis</i> |
| 7 | PNB | Campo limpo | 15° 43' 38.70"S 47° 55' 37.92"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 8 | PNB | Mata de galeria | 15° 41' 20.28"S 48° 01' 26.94"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 9 | PNB | Mata de galeria | 15° 44' 13.68"S 47° 55' 6.60"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 10 | FAL | Cerrado <i>sensu stricto</i> | 15° 55' 55,4"S 47° 55' 32,2"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 11 | FAL | Cerrado <i>sensu stricto</i> | 15° 55' 54,7"S 47° 55' 30,9"W | <i>M. javanica</i> (J3) | - |
| 12 | FAL | Cerrado <i>sensu stricto</i> | 15° 55' 55,8"S 47° 55' 31,2"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 13 | FAL | Cerrado <i>sensu stricto</i> | 15° 56' 15,3"S 47° 55' 42,0"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |

Tabela 5. Continuação

| Nº da amostra | Local | Fitofisionomia | Coordenadas geográficas | Espécies identificadas | |
|---------------|-------|----------------|-------------------------------|--|---|
| | | | | EST | SCAR |
| 14 | FAL | Campo cerrado | 15° 58' 53,1"S 47° 56' 43,1"W | <i>M. javanica</i> (J3) | - |
| 15 | FAL | Campo cerrado | 15° 56' 47,2"S 47° 57' 00,7"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 16 | FAL | Campo cerrado | 15° 56' 12,9"S 47° 54' 20,8"W | <i>M. javanica</i> (J3/J2) | - |
| 17 | FAL | Campo limpo | 15° 58' 46,8"S 47° 56' 57,6"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 18 | FAL | Campo limpo | 15° 58' 48,2"S 47° 56' 58,4"W | <i>M. javanica</i> (J3) | - |
| 19 | FAL | Campo limpo | 15° 58' 47,5"S 47° 56' 59,9"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 20 | FAL | Campo limpo | 15° 58' 46,1"S 47° 56' 59,2"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 21 | FAL | Campo limpo | 15° 58' 47,3"S 47° 56' 58,8"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 22 | FAL | Campo limpo | 15° 58' 32,7"S 47° 56' 55,5"W | * <i>M. javanica</i> (J3) / <i>M. incognita</i> (I2) | <i>M. javanica</i> |
| 23 | FAL | Campo limpo | 15° 58' 34,2"S 47° 56' 56,1"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 24 | FAL | Campo limpo | 15° 58' 33,8"S 47° 56' 57,8"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 25 | FAL | Campo limpo | 15° 58' 32,2"S 47° 56' 57,2"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> / <i>M. hapla</i> |
| 26 | FAL | Campo limpo | 15° 58' 33,4"S 47° 56' 56,6"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 27 | FAL | Campo limpo | 15° 58' 43,0"S 47° 56' 21,3"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 28 | FAL | Campo limpo | 15° 58' 41,2"S 47° 56' 21,3"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 29 | FAL | Campo limpo | 15° 58' 41,4"S 47° 56' 23,1"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 30 | FAL | Campo limpo | 15° 58' 42,1"S 47° 56' 22,1"W | <i>M. javanica</i> (J3) | - |
| 31 | FAL | Campo limpo | 15° 58' 36,2"S 47° 56' 11,4"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 32 | FAL | Campo limpo | 15° 58' 36,1"S 47° 56' 09,8"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 33 | FAL | Campo limpo | 15° 58' 35,3"S 47° 56' 10,6"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 34 | FAL | Campo limpo | 15° 57' 12,0"S 47° 56' 03,5"W | <i>M. javanica</i> (J3) / <i>M. incognita</i> (I2) | <i>M. javanica</i> / <i>M. incognita</i> |
| 35 | FAL | Campo limpo | 15° 57' 09,7"S 47° 56' 03,0"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 36 | FAL | Campo limpo | 15° 57' 10,7"S 47° 56' 04,3"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> / <i>M. incognita</i> |
| 37 | FAL | Campo limpo | 15° 57' 11,2"S 47° 56' 02,0"W | <i>M. incognita</i> (I2) | - |
| 38 | FAL | Campo limpo | 15° 57' 10,6"S 47° 56' 03,1"W | * <i>M. javanica</i> (J3) / <i>M. incognita</i> (I2) | <i>M. javanica</i> |
| 39 | FAL | Campo sujo | 15° 56' 52,2"S 47° 57' 27,9"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 40 | FAL | Campo sujo | 15° 56' 51,4"S 47° 57' 27,7"W | <i>M. javanica</i> (J3) | - |
| 41 | FAL | Campo sujo | 15° 56' 10,2"S 47° 54' 16,0"W | * <i>M. javanica</i> (J3) / <i>M. arenaria</i> (A2) / <i>M. hapla</i> (H1) | <i>M. javanica</i> |
| 42 | FAL | Campo sujo | 15° 56' 08,0"S 47° 54' 15,2"W | <i>M. hapla</i> (H1) | <i>M. hapla</i> |
| 43 | FAL | Campo sujo | 15° 56' 08,9"S 47° 54' 16,6"W | * <i>M. javanica</i> (J3) / <i>M.</i> <i>hapla</i> (H1) | <i>M. javanica</i> |

Tabela 5. Continuação

| Nº da amostra | Local | Fitofisionomia | Coordenadas geográficas | Espécies identificadas | |
|---------------|-------|-----------------|-------------------------------|---|---|
| | | | | EST | SCAR |
| 44 | FAL | Campo sujo | 15° 56' 09,4"S 47° 54' 14,4"W | <i>M. javanica</i> (J3) / <i>M. hapla</i> (H1) | - |
| 45 | FAL | Campo sujo | 15° 56' 09,0"S 47° 54' 15,4"W | * <i>M. javanica</i> (J3) / <i>M. hapla</i> (H1) | <i>M. javanica</i> |
| 46 | FAL | Campo sujo | 15° 55' 47,4"S 47° 54' 31,0"W | <i>M. javanica</i> (J3) | - |
| 47 | FAL | Campo sujo | 15° 55' 49,0"S 47° 54' 30,6"W | <i>M. hapla</i> (H1) | <i>M. hapla</i> / <i>M. javanica</i> |
| 48 | FAL | Campo sujo | 15° 55' 48,7"S 47° 54' 29,0"W | <i>M. javanica</i> (J3) | - |
| 49 | FAL | Campo sujo | 15° 55' 14,3"S 47° 55' 37,4"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> |
| 50 | FAL | Campo sujo | 15° 55' 13,9"S 47° 55' 39,1"W | <i>M. javanica</i> (J3) | - |
| 51 | FAL | Campo sujo | 15° 54' 53,8"S 47° 55' 16,6"W | <i>M. javanica</i> (J3) | - |
| 52 | FAL | Campo sujo | 15° 54' 53,9"S 47° 55' 14,9"W | <i>M. incognita</i> (I2) | - |
| 53 | FAL | Mata de galeria | 15° 56' 23,6"S 47° 56' 20,8"W | <i>M. incognita</i> (I1) | <i>M. incognita</i> / <i>M. javanica</i> |
| 54 | FAL | Mata de galeria | 15°56'24.8"S 47° 56' 22.0"W | <i>M. javanica</i> (J3) | - |
| 55 | FAL | Mata de galeria | 15° 56' 24,6"S 47° 56' 20,6"W | <i>M. javanica</i> (J3) | <i>M. javanica</i> / <i>M. incognita</i> |
| 56 | FAL | Mata de galeria | 15° 57' 19,7"S 47° 57' 43,1"W | <i>M. javanica</i> (J2) | <i>M. javanica</i> |
| 57 | FAL | Mata de galeria | 15° 55' 53,4"S 47° 55' 49,9"W | <i>M. incognita</i> (I2) | <i>M. incognita</i> |

(-) População identificada apenas por eletroforese de isoenzimas (fenótipos de esterase)

(*) Apenas a população multiplicada com êxito para o SCAR.

PNB: Parque Nacional de Brasília; FAL: Fazenda Água Limpa.

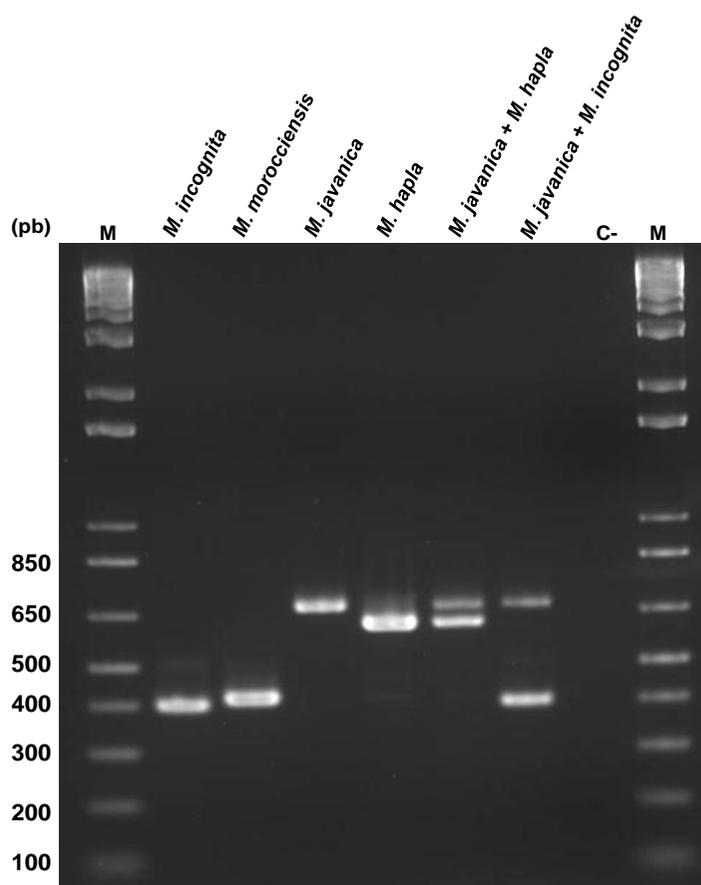


Figura 4. Perfis de amplificação do DNA genômico das populações de *Meloidogyne incognita* (399 pb), *M. morocciensis* (420 pb) , *M. javanica* (670 pb), *M. hapla* (610 pb) e de populações misturadas: *M. javanica* + *M. hapla* e *M. javanica* + *M. incognita* oriunda do Parque Nacional de Brasília e da Fazenda Água Limpa. Dados representam SCAR-PCR simples e multiplex. (C-): Reação sem DNA, (M): 1 kb marcador de peso molecular (invitrogen), (pb): pares de bases.

5.3 Hospedabilidade de plantas nativas do cerrado a *Meloidogyne javanica*

As plantas inoculadas não apresentaram sintomas típicos de meloidoginose na parte aérea como clorose e queda de folhas (Fig. 5), e poucas apresentaram galhas no sistema radicular.



Figura 5. Plantas nativas do Cerrado em casa de vegetação inoculadas com *Meloidogyne javanica*.

Características inerentes a algumas espécies vegetais nativas do Cerrado como a presença de raízes de coloração escura, ou mesmo de raízes espessas com poucas raízes secundárias pode ter contribuído para a não formação de galhas ou mesmo dificultado a sua visualização. No entanto, galhas quando induzidas por *Meloidogyne* spp. em raízes de plantas nativas, nem sempre são fáceis de serem visualizadas.

Do total de dezessete espécies nativas testadas, dezesseis foram consideradas más hospedeiras a *M. javanica*, apresentando um fator de reprodução (FR) menor que 1 (Tabela 6). Das dezessete espécies vegetais, seis apresentaram sintomas de galhas causados por *M. javanica* (Fig. 6), embora cinco dessas espécies tenham apresentado um pequeno número de galhas e massas de ovos (*Enterolobium contortisiliquum*, *E. gummiferum*, *Ormosia arborea*,

Solanum lycocarpum, *Tabebuia impetiginosa*), com o fator de reprodução variando de 0,008 à 0,47, permanecendo as demais espécies com fator de reprodução zero (Tabela 6). O baixo FR apresentado pela maioria das espécies vegetais estudadas evidencia que, provavelmente, ou o nematoide não conseguiu penetrar nas raízes ou penetrou mas não conseguiu estabelecer sítios de alimentação adequados ao seu desenvolvimento e reprodução.



Figura 6. Aspecto da raiz de *Solanum lycocarpum* (Lobeira), evidenciando sintomas de meloidoginose (galhas) no sistema radicular após serem inoculadas com *M. javanica*. Setas indicam as galhas.

De maneira geral, as espécies nativas testadas neste estudo foram consideradas más hospedeiras de *M. javanica* quando comparadas a uma espécie suscetível como o tomateiro, que nesse ensaio atuou como controle positivo, apresentando FR igual a 125,43 (Tabela 6, Fig. 7). Por outro lado, *Mimosa caesalpinifolia* foi a planta nativa que apresentou o maior

número de galhas e massas de ovos, além de um fator de reprodução 22,73 (Tabela 6). Esse resultado demonstra que essa espécie é uma excelente hospedeira de *M. javanica* e provavelmente tem contribuído para a sobrevivência desse nematoide em áreas de Cerrado virgem.

Este é o primeiro estudo envolvendo a produção de mudas de plantas nativas do Cerrado em solo estéril, objetivando testar a hospedabilidade das mesmas a espécies de *Meloidogyne* encontradas em vegetação nativa do Cerrado, no caso *M. javanica*. Dos estudos realizados até então para o Cerrado, há relatos de associações de *Meloidogyne* com a rizosfera de plantas nativas (Cares e Huang, 1991; Huang & Cares, 1996). O único relato de infecção causada por *Meloidogyne* em raízes de plantas do Cerrado é um resumo em congresso (Huang *et al.*, 1991), em que *Dimorphandra mollis* é relatada como hospedeira de *M. javanica* e *Cybianthus gardneri* como hospedeira de *M. arenaria*. No entanto, não há relato do fator de reprodução desses nematoides nas respectivas hospedeiras. Além disso, não está descartada a ocorrência de raízes de outras plantas em mistura com as raízes dessas hospedeiras, já que as mesmas não foram cultivadas em vaso a partir de sementes.

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, *D. mollis* não hospeda *M. javanica*. No entanto, fatores como variabilidade genética da planta, aliada às condições em que o ensaio foi realizado podem ter contribuído para um resultado negativo.

A descoberta dessa hospedeira de *Meloidogyne* abre caminho para novos estudos visando conhecer a hospedabilidade de outras plantas nativas a *M. javanica*, com o intuito de explicar a presença do mesmo em solos sob cobertura vegetal de Cerrado virgem. O conhecimento das espécies vegetais hospedeiras de *M. javanica* no Cerrado pode ser útil em caso de recomposição de áreas degradadas com espécies nativas.

Tabela 6. Hospedabilidade de plantas nativas do Cerrado a *Meloidogyne javanica*.

| Plantas inoculadas | Peso fresco das raízes ¹ | IG ² | IMO ² | Nº Total de ovos | Nº total de ovos/grama de raiz | FR ³ |
|--|-------------------------------------|-----------------|------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------|
| <i>Amburana cearensis</i> (Freire Allemão) A. C. Smith | 33 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Dalbergia miscolobium</i> Benth. | 7,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Dimorphandra mollis</i> Benth. | 5,17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong. | 49,2 | 4 | 3,8 | 4.700 | 95,52 | 0,47 |
| <i>Enterolobium gummiferum</i> (Mart.) Macb. | 19,9 | 1 | 0,8 | 86,66 | 4,35 | 0,008 |
| <i>Eugenia dysenterica</i> Mart. ex DC. | 3,6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. Ex Hayne | 18,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. ex Saddi | 6,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Lafoensia pacari</i> St. Hil. | 14,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Magonia pubescens</i> St. Hil. | 12,83 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth. | 36,33 | 4,66 | 4,66 | 227.333,33 | 6.256,88 | 22,73 |
| <i>Ormosia arborea</i> (Vell.) Harms. | 7,0 | 2 | 1,4 | 2.286,67 | 326,66 | 0,22 |
| <i>Platypodium elegans</i> Vog. | 9,9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Qualea grandiflora</i> Mart. | 5,25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Solanum lycocarpum</i> St. Hil. | 96,1 | 1 | 1 | 2.320 | 24,14 | 0,23 |
| <i>Stryphnodendron adstringens</i> mart. coville | 2,33 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Tabebuia impetiginosa</i> (Mart. Ex DC.) Standl | 14,4 | 1,2 | 0,8 | 386,66 | 26,85 | 0,03 |
| * <i>Solanum lycopersicum</i> (tomateiro) | 56,5 | 5 | 5 | 1.254x10 ⁶ | 22.200,58 | 125,43 |

¹ Valores médios do peso fresco das raízes (g).

² Índices de galhas e massas de ovos de acordo com a escala de Taylor & Sasser (1978). 0= nenhuma galha ou massas de ovos; 1= 1-2 galhas e massas de ovos; 2= 3-10; 3= 11-30; 4= 31-100 galhas e massas de ovos e 5= acima de 100 galhas e massas de ovos.

³ FR= fator de reprodução (população final/população inicial)

* Tomateiro: Usados como controle positivo.



Figura 7. Raiz de *Solanum lycopersicum* (tomateiro) com sintomas de galhas induzidas por *Meloidogyne javanica*

6. CONCLUSÕES

- ✓ *Meloidogyne javanica*, *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. morocciensis* e *M. hapla* são espécies que ocorrem associadas à vegetação nativa do Cerrado do Distrito Federal;
- ✓ *Meloidogyne hapla*, *M. incognita* foram relatados pela primeira vez em Cerrado nativo;
- ✓ Das amostras de solo infestadas, 75,76 % continham *M. javanica*, 10,60 % *M. incognita*, 9,1 % *M. hapla*, 3,03 % *M. morocciensis* e 1,51 % *M. arenaria*.
- ✓ Dos marcadores SCAR testados, Finc e Rinc reagiram especificamente com *M. incognita*, enquanto hF e hR e Fjav e Rjav foram específicos para *M. hapla* e *M. javanica*, respectivamente.
- ✓ A maior ocorrência de *Meloidogyne* spp. se deu nas fitofisionomias campo limpo e campo sujo, *Meloidogyne javanica* foi a espécie predominante em todas as fitofisionomias amostradas.
- ✓ Das plantas nativas inoculadas com *M. javanica*, apenas *Mimosa caesalpinifolia* apresentou um fator de reprodução elevado, sendo considerada uma boa hospedeira desse nematoide em Cerrado virgem.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adam MAM, Phillips MS, Blok VC (2007) Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology* 56: 190-197.

Almeida SP, Proença CEB, Sano SM, Ribeiro JF (1998) Cerrado: espécies vegetais úteis. Embrapa Cerrados- Planaltina-DF. 464p.

Aquino PPU, Schneider M, Martins-Silva MJ, Padovesi-Fonseca C, Arakawa HB, Cavalcanti DR (2009) The fishfauna of Parque Nacional de Brasília, upper Paraná River basin, Federal District, Central Brazil. *Biota Neotropica* 9: 217-230.

Azevedo LG De, Adámoli J (1988) Avaliação agroecológica dos recursos naturais da região do cerrado. In: Simpósio sobre o cerrado savanas: alimento e energia 6, Brasília, DF. 1982. Embrapa Cerrados- Planaltina-DF. pp.729-761.

Blok VC, Powers O (2009) Biochemical and molecular identification. In: Perry R, Moens M, Starr JL, (Eds.) *Root-knot nematodes*. Cambridge, MA, USA, CABI International. pp. 98-118.

Boneti JIS, Ferraz S (1981) Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiros. *Fitopatologia Brasileira* 6: 553.

Campos VP, Sivapalan P, Gnanapragasam NC (1990) Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: Luc M, Sikora RA, Bridge J (Eds) Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. Wallingford UK. CAB International. pp. 387-430.

Cares JE, Huang SP (1991) Nematode fauna in natural and cultivated cerrados of Central Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 16: 199-209.

Cares JE, Huang SP (2008) Comunidades de nematoides de solo sob diferentes sistemas na Amazônia e Cerrados brasileiros. In: Moreira FMS, Siqueira JO, Brussaard L (Eds.) Biodiversidade do solo em Ecossistemas Brasileiros. Universidade Federal de Lavras- MG. pp. 409-444.

Carneiro RMDG, Almeida MRA (2001) Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira* 25: 35-44.

Carneiro RMDG, Almeida MRA, Carneiro RG (1996) Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. *Fundamental and Applied Nematology* 19: 555-560.

Carneiro RMDG, Almeida MRA, Quénehervé P (2000) Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology* 2: 645-654.

Carneiro RMDG, Tigano MS, Randig O, Almeida MRA, Sarah JL (2004) Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology* 6: 287-298.

Carneiro RMDG, Almeida MRA, Silva DB (2006) Ocorrência de *Meloidogyne arenaria* em mama-cadela no Distrito Federal, Brasil. *Nematologia Brasileira* 30: 95-96.

Carneiro RMDG, Almeida MRA, Martins I, Souza JF, Pires AQ, Tigano MS (2008a) Ocorrência de *Meloidogyne* spp. e fungos nematófagos em hortaliças no Distrito Federal, Brasil. *Nematologia Brasileira* 32: 135-141.

Carneiro RMDG, Santos MFA, Almeida MRA, Mota FC, Gomes ACMM, Tigano MS (2008b) Diversity of *Meloidogyne arenaria* using morphological, cytological and molecular approaches. *Nematology* 10: 819-834.

Castro JMC, Lima RD, Carneiro RMDG (2003) Variabilidade isoenzimática de populações de *Meloidogyne* spp. de regiões brasileiras produtoras de soja. *Nematologia Brasileira* 27: 1-12.

Chitwood DJ, Perry RN (2009) Reproduction, physiology and biochemistry. In: Perry RN, Moens M, Starr JL (Eds.) *Root-knot nematodes*, Cambridge, MA, USA, CABI International. pp.182-200.

Cofcewicz ET, Carneiro RMDG, Castagnone-Sereno P, Quénehervé P (2004) Enzyme phenotypes and genetic diversity of root-knot nematodes parasitising *Musa* in Brazil. *Nematology* 6: 85-95.

Cordeiro MCR, Goulart AMC, Costa AM, Sharma RD (2008) Identificação molecular de nematoides de galhas, *Meloidogyne* ssp. Embrapa Cerrados- Planaltina-DF. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 219. 20p.

Cornu M (1879) Etudes sur le *Phylloxera vastatrix*. Memoires Divers Savants a l'Academie Royale des Sciences de l'Institut de France 26: 1-357.

Dalmasso A, Berge JB (1978) Molecular polymorphism and phylogenetic relationship in some *Meloidogyne* spp.: Application to the taxonomy of *Meloidogyne*. Journal of Nematology 10: 323-332.

De Ley P, Blaxter M (2002) Systematic position and phylogeny. In: Lee DL ,ed. The biology of nematodes. Taylor and Francis, London, p. 1-30.

Dickson DW, Huisling D, Sasser JN (1971) Dehydrogenases, acid and alkaline phosphatases and esterases for chemotaxonomy of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera* and *Apphelenchus* spp. Journal of Nematology 3: 1-16.

Dong k, Dean RA, Fortnum BA, Lewis SA (2001) Development of PCR primers to identify species of root-knot nematodes: *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* and *M. javanica*. Nematropica 31: 271-280.

Doyle PMMC (2009) Reserva da biosfera do Cerrado no Distrito Federal p. 1-35.

Eisenback JD, Triantaphyllou HH (1991) Root-knot nematode: *Meloidogyne* species and races. In: Nickle WR, (Ed) Manual of agricultural nematology. New York- USA. pp. 191-274.

Eiten G (1972) The cerrado vegetation of Brazil. The Botanical Review 38: 201-341.

Esbenshade PR, Triantaphyllou AC (1990) Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 22: 10-15.

Esbenshade PR, Triantaphyllou AC (1985) Use of enzyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 17: 6-20.

Fourie H, Zijlstra C, McDonald H (2001) Identification of root-knot nematode species occurring in South Africa using the SCAR-PCR technique. *Nematology* 3: 675-680.

Garrido WE, Azevedo LG, De, Junior MJ (1982) O clima da região dos cerrados em relação a agricultura. Embrapa Cerrados- Planaltina-DF. Comunicado Técnico 4. 37p.

Goodland RJA (1970) Plants of the cerrado vegetation of Brazil. *Phytologia* 20: 57-80.

Goulart AMC (2007) Diversidade de nematoides em agroecossistemas e ecossistemas naturais. Embrapa Cerrados- Planaltina-DF. Documentos- 191. 68p.

Goulart AMC, Monteiro AR, Ferraz LCCB (2003) Comunidades de nematoides em Cerrado com vegetação original preservada ou substituída por culturas. 2.Diversidade taxonômica. *Nematologia Brasileira* 27: 129-137.

Harris TS, Sandall LJ, Powers TO (1990) Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. *Journal of Nematology* 22: 518-524.

Huang SP, Pereira AC, Dristig MCG, Souza RM (1991) Ocorrência de *Meloidogyne javanica* e *M. arenaria* em árvores silvestres no Cerrado virgem do Brasil Central. Fitopatologia Brasileira 16: XXXVII.

Huang SP, Cares JH (1995) Community composition of plant-parasitic nematodes in native and cultivated cerrados of Central Brazil. Journal of Nematology 27: 237-243.

Huang SP, Freire HCA, Cares JE (1996) Grupos composicionais e tróficos dos nematoides associados à sucupira branca (*Pterodon pubescens*) em Cerrado nativo. Fitopatologia Brasileira 21: 156-160.

Hunt DJ, Handoo ZA (2009) Taxonomy, identification and principal species. In: Perry RN, Moens M, Starr JL (Eds.) Root-knot Nematodes, Cambridge, MA, USA. CABI Internacional. North American Office. pp. 55-97.

Hussey RS, Barker KR (1973) A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease 57: 1025-1028.

Hussey RS, Sasser JN, Huising D (1972). Disc-electrophoretic studies of soluble proteins and enzymes of *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne arenaria*. Journal of Nematology 4: 183-189.

Janati AA, Berge AC, Triantaphyllou, Dalmaso A (1982) Nouvelles données sur l'utilisation des isoestérases pour l'identification des *Meloidogyne*. Revue de Nématologie 5: 147-154.

Jones, CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO, Sala F, Van De Wiel C, Bredemeijer G, Vosman B, Matthes M, Brettschneider A, Bettini R, Buiatti M, Maestri E, Malcevski A, Marmioli N, Aert R, Volckaert G, Rueda J, Linacero R, Vazquez A, Karp A (1997) Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3: 381-390.

Karssen G, Moens M (2006) Root-knot nematodes In: Perry RN, Moens M (Eds.) *Plant Nematology*. Cambridge, MA, USA, CABI International. pp.60-90.

Lacerda MPC, Barbosa IO, Campos PM, Papa RA (2007) Utilização de sensoriamento remoto para o estabelecimento de relações entre vegetação nativa e classes de solos em mapeamento pedológico, Distrito Federal. *Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, Florianópolis, Brasil, 21-26 Abril 2007, INPE. p. 3991-3996.

Lima IM, Souza RM, Silva CP, Carneiro RMDG (2005) *Meloidogyne* spp. from preserved areas of Atlantic Forest in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Nematologia Brasileira* 29: 31-38.

Lordello LGE (1992) *Nematóides das plantas cultivadas*. 8ª ed. São Paulo: Editora Nobel. 314p.

Lorenzi H (1992) *Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. v.1. Harri Lorenzi. Ed. Plantarum, Nova Odessa, SP. 366p.

Lorenzil H (1998) *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. v.2. Harri Lorenzi. Ed. Plantarum, Nova Odessa, SP. 368p.

Maggenti A (1981) General nematology. Springer-Verlag, New York. USA. pp.32.

Mattos JKA (1999) Caracterização das comunidades de nematoides em oito sistemas de uso da terra nos cerrados do Brasil Central. Universidade de Brasília. Tese de Doutorado. 113p.

Mattos JKA, Andrade EP, Teixeira MA, Castro APGC, Huang SP (2008) Gêneros-chaves de onze diferentes comunidades de nematoides do solo na região dos Cerrados do Brasil Central. Nematologia Brasileira 32: 142-149.

Mclain DKO, Rai KS, Fraser, JM (1987) Intraespecific and interspecific variation in the sequence and abundance of highly repeated DNA among mosquitos of the *Aedes albopictus* subgroup. Heredity 58: 373-381.

Meng QP, Long H, Xu JH (2004) PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. Acta Phytopathologica Sinica 34: 204-210.

Mienie CMS, Fourie H, Smit MA, Van Staden J, Botha FC (2002) Identification of AFLP markers in soybean linked to resistance to *Meloidogyne javanica* and conversion to sequence characterized amplified regions (SCARs). Plant Growth Regulation 37: 157-166.

Ministério do Meio Ambiente & The Nature Conservancy – MMA/TNC (2007). Unidades de conservação e terras indígenas dos biomas Cerrado e Pantanal. Brasília-DF.

Moens M, Perry RN, Starr JL (2009) *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: Perry RN, Moens M, Starr JL (Eds) Root-knot nematodes, Cambridge, MA, USA, CABI International. pp.1-17.

Moura RM (1996) Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. In: Revisão Anual de Patologia de Plantas 4: 209-244.

Muniz MFS, Campos VP, Castagnone-Sereno P, Castro JMC, Almeida MRA, Carneiro RMDG (2008) Diversity of *Meloidogyne exigua* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations from coffee and rubber tree. *Nematology* 10: 897-910.

Neher DA (2001) Role of nematodes in soil health and their use as indicators. *Journal of Nematology* 33: 161-168.

Noir S, Anthony F, Bertrand B, Combres MC, Lashermes P (2003) Identification of a major gene (*Mex-1*) from *Coffea canephora* conferring resistance to *M. exigua* in *Coffea arabica*. *Plant Pathology* 52: 97-103.

Paran I, Michelmore RW (1993) Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 985-993.

Powers TO, Todd TC, Burnell AM, Murray PCB, Fleming CC, Szalanski AL, Adams BA, Harris TS (1997) The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *Journal of Nematology* 29: 441-450.

Prevedello JA, Carvalho CJB (2006) Conservação do Cerrado brasileiro: o método pan-biogeográfico como ferramenta para a seleção de áreas prioritárias. *Natureza e Conservação* 4: 39-57.

Randig O, Bongiovanni M, Carneiro RMDG, Castagnone-Sereno P (2002) Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome* 45: 862-870.

Randig O, Carneiro RMDG, Castagnone-Sereno P (2004) Identificação das principais espécies de *Meloidogyne* parasitas do cafeeiro no Brasil com marcadores SCAR-CAFÉ em Multiplex-PCR. *Nematologia Brasileira* 28: 1-10.

Ratter JA, Dargie TCD (1992) An analysis of the floristic composition of 26 cerrado areas in Brazil. *Edinburg Journal of Botany* 49: 235-250.

Ribeiro JF, Walter BMT (1998) Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: Sano SM, Almeida SP (Eds.) *Cerrado: ambiente e flora*. Embrapa Cerrados- Planaltina-DF. pp. 89-166.

Silva GS (2005) Nematoides. In: Freire Filho F, Lima JAA, Ribeiro VQ (ed) *Feijão-Caupi: Avanços Tecnológicos*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília. pp. 487-497.

Silva EB (2009) Taxas de desmatamento anuais no bioma Cerrado: Uma análise a partir de dados modis para o período de 2003 a 2007. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás. 102p.

Souza RM, Dolinski CM, Huang SP (1994) Survey of *Meloidogyne* spp. in native cerrado of Distrito Federal, Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 19: 463-465.

Taylor AL, Sasser JN (1978) Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). North Carolina State University, Raleigh, North Carolina. pp. 1-11.

Toledo LO, Anjos LHC, Couto WH, Correia JR, Pereira MG, Correia MEF (2009) Análise multivariada de atributos pedológicos e fitossociológicos aplicada na caracterização de ambientes de cerrado no norte de Minas Gerais. *Revista Árvore* 33: 957-968.

Triantaphyllou AC (1985) Cytogenetics, citotaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. In Carter CC & Sasser, JN (Eds.) *An advanced treatise on Meloidogyne*, v.1 , biology and control. Raleigh, North Carolina. State University Graphics pp. 113-126.

Tzortzakakis EA, Adam MAM, Blok VC, Paraskevopoulos C, Bourtzis K (2005) Occurrence of resistance-breaking populations of root-knot nematodes on tomato in Greece. *European Journal of Plant Pathology* 113: 101-105.

Wishart J, Phillips MS, Blok VC (2002) Ribosomal intergenic spacer: a polymerase chain reaction diagnostic for *Meloidogyne chitwood*, *M. fallax*, and *M. hapla*. *Phytopathology* 92: 884-892.

WWF (2010). Disponível em: www.wwf.org.br. Acesso em 12 de Novembro de 2011.

Yeates GW, Bongers T, De Goede RGM, Freckman DW, Georgieva SS (1993) Feeding habits in soil nematode families and genera - An outline for soil ecologists. *Journal of Nematology* 25: 315-331.

Zijlstra C, Uenk BJ, Van Silfhout CH (1997) A reliable precise method to differentiate species of root-knot nematodes in mixtures on the basis of ITS-RFLPs. *Fundamental and Applied Nematology* 20: 59-63.

Zijlstra C (2000) Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. *European Journal of Plant Pathology* 106: 283-290.

Zijlstra C, Donkers-Venne DTHM, Fargette M. (2000) Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified regions (SCAR) based PCR assays. *Nematology* 2: 847-853.