



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

**VARIABILIDADE GENÉTICA E AGRESSIVIDADE A
SOJA [*Glycine max* (L.) MERRILL] DE POPULAÇÕES DE
Meloidogyne spp. DO CERRADO E DE ÁREAS DE CULTIVO**

VANESSA DA SILVA MATTOS

Brasília – DF

2013

VANESSA DA SILVA MATTOS

**VARIABILIDADE GENÉTICA E AGRESSIVIDADE A SOJA [*Glycine max*
(L.) MERRILL] DE POPULAÇÕES DE *Meloidogyne* spp. DO CERRADO E DE
ÁREAS DE CULTIVO**

Dissertação apresentada à
Universidade de Brasília
como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre
em Fitopatologia pelo
Programa de Pós Graduação
em Fitopatologia.

Orientador

Prof. Dr. Cleber Furlanetto

Co-orientador

Dra. Regina M. D. G. Carneiro

BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Mattos, Vanessa da Silva.

Variabilidade genética e agressividade a soja [*Glycine max* (L.) Merrill] de populações de *Meloidogyne* spp. do Cerrado e de áreas de cultivo/ Vanessa da Silva Mattos

Brasília, 2013. Número de páginas p.: 82 il.

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília-DF

1. Fitopatologia – Nematologia

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Variabilidade genética e agressividade a soja [*Glycine max* (L.) Merrill] de populações de *Meloidogyne* spp. do Cerrado e de áreas de cultivo/ Vanessa da Silva Mattos

O universo é uma harmonia de contrários.
Pitágoras

*Dedicatória, à Marlene do Amaral
Alexandre, exemplo de amor e luta.*

AGRADECIMENTOS

Meu maior agradecimento é dirigido à minha família, por terem sido o contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores e o emprego do amor em cada detalhe da vida

Ao Prof. Cleber Furlanetto, por ter aceitado a tarefa de ser meu orientador contribuindo com este trabalho e com meu aprendizado na área acadêmica. Agradeço profundamente.

À Dra. Regina Carneiro, por ter aceitado ser minha co-orientadora e contribuído de forma notável para a realização deste trabalho e mais ainda por me acolher e ensinar os primeiros passos na área de Nematologia. Agradeço com muito carinho por todos os ensinamentos!

Aos colegas de laboratório que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho: Fábio Rodrigues, Aldemiro Jorge Júnior, Maria Ritta Almeida, Mariana Guimarães, Evellin Guimarães, Valdir Correia, Giulia Lopes, Marcilene Fernandes, Edriana Araújo, Esdras Silva, Marina Carneiro, Ana Paula Pinheiro, Ana Catarina Peres, Vânia Freitas, Fabiane Mota, Ana Cristina Gomes, Daniela Souza.

À colega de trabalho e amiga querida Joelma Gardênia Pereira Silva, pelas informações e materiais fornecidos para este trabalho. É sempre um prazer trabalhar ao seu lado.

A Nick Sekora, pela paciência e companheirismo durante esta fase de minha vida.

À Embrapa Cenargen e a seus funcionários por possibilitarem a realização de parte deste trabalho em seus laboratórios.

À Embrapa Soja pelo envio das sementes para os ensaios e aos doutores Vanoli Fronza, Carlos Alberto Arias e Maria Eugênia Lisei de Sá pela contribuição com informações acerca das cultivares.

À Universidade de Brasília (UnB) pelos recursos oferecidos para a concretização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia-UnB, pelos preciosos ensinamentos e assistência durante os anos de mestrado.

Aos Doutores Antônio Moita e José Ricardo Peixoto, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Dr. Phillippe Castagnone-Sereno pela ajuda nas análises filogenéticas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa concedida durante os anos do curso.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Dr. **Cleber Furlanetto** e co-orientação da **Dra. Regina M.D.G. Carneiro** com apoio institucional da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**VARIABILIDADE GENÉTICA E AGRESSIVIDADE A SOJA [*Glycine max*
(L.) MERRILL] DE POPULAÇÕES DE *Meloidogyne* spp. DO CERRADO E DE
ÁREAS DE CULTIVO**

VANESSA DA SILVA MATTOS

TESE OU DISSERTAÇÃO APROVADA em __/__/____ por:

Cleber Furlanetto, Ph.D
Examinador (orientador)

Juvenil Enrique Cares, Ph.D
Examinador (membro interno)

Valdir Ribeiro Correia, Ph.D
Examinador (membro externo)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL

BRASIL

2013

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	v
Abstract	vii
1. INTRODUÇÃO GERAL	9
2. OBJETIVO GERAL.....	10
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
4. REVISÃO DE LITERATURA	11
4.1. O bioma Cerrado	11
4.2. Nematoides do gênero <i>Meloidogyne</i> em biomas naturais	12
4.3. A cultura da soja.....	14
4.3.1. Origem e histórico	14
4.3.2. Importância econômica e produção mundial.....	16
4.3.3. Aspectos agronômicos.....	16
4.3.4. Pragas e doenças da soja	18
4.3.5. Nematoides da soja.....	20
4.4. Classificação do gênero <i>Meloidogyne</i>	22
4.5. Ciclo de vida e comportamento de <i>Meloidogyne</i> spp.....	22
4.6. Diversidade do gênero <i>Meloidogyne</i> e o uso de marcadores moleculares para o seu estudo	24
4.7. Cultivares de soja resistentes ao nematoide das galhas.....	29
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
5.1. Identificação das populações de nematoides e produção de inóculo.....	33
5.2. Extração dos ovos de <i>Meloidogyne</i> spp. para as análises moleculares	35
5.3. Extração do DNA para as análises moleculares	36

5.4.	Técnica PCR-RAPD	37
5.5.	Técnica PCR-AFLP	38
5.6.	Análises de polimorfismo	39
5.7.	Avaliação das populações de <i>Meloidogyne</i> spp. quanto à reprodução em genótipos de soja em casa de vegetação	39
5.8.	Extração de nematoides do solo	41
6.	RESULTADOS	42
6.1.	Análise da variabilidade genética das populações de <i>Meloidogyne</i> spp	42
	48	
6.2.	Avaliação das populações de <i>Meloidogyne</i> spp. quanto à reprodução em genótipos de soja em casa de vegetação	49
6.3.	Avaliação das populações de <i>Meloidogyne</i> spp. no solo nos genótipos de soja (padrões de resistência e susceptibilidade) em casa de vegetação	50
7.	DISCUSSÃO	56
8.	CONCLUSÕES	63
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Perfis de esterase (EST) de populações de <i>Meloidogyne</i> spp. das populações utilizadas neste estudo.....	35
Figura 2: A – Polimorfismo de fragmentos de DNA de 17 populações de <i>Meloidogyne</i> spp. gerado pelos primers D13 e AFLP05.....	46
Figura 3: Dendrograma gerado a partir da análise conjunta dos marcadores RAPD e AFLP com 17 populações de <i>Meloidogyne</i> spp.....	48
Figura 4: : Raízes de cultivares de soja após 60 dias da inoculação com 5000 ovos de <i>Meloidogyne</i> spp.. ..	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Código das populações, origem geográfica, perfil enzimático, hospedeiro ou fitofisionomia do Cerrado de populações de <i>Meloidogyne</i> spp.	34
Tabela 2: Classificação qualitativa da resistência de hospedeiras, segundo o percentual de redução da reprodução de <i>Meloidogyne</i> spp. (Moura & Régis, 1987).....	41
Tabela 3: Primers utilizados em reações RAPD e número de fragmentos amplificados.	44
Tabela 4: Primers AFLP usados e número de fragmentos amplificados.	45
Tabela 5: Proporção de fragmentos polimórficos de RAPD e AFLP observados a nível de espécie	45
Tabela 6: Reação de cinco cultivares de soja a duas populações de <i>Meloidogyne morocciensis</i> (MOR16 e MOR17).	52
Tabela 7: Reação de cinco cultivares de soja a duas populações de <i>Meloidogyne javanica</i> (JAV1 e JAV12).....	53
Tabela 8: Reação de cinco cultivares de soja a duas populações de <i>Meloidogyne incognita</i> (INC14 e INC15).....	54
Tabela 9: Quantificação de juvenis de segundo estágio em solo inoculado com três populações de <i>Meloidogyne</i> spp. em duas cultivares de soja.....	55

RESUMO GERAL

MATTOS, Vanessa da Silva. **Variabilidade genética e agressividade a Soja [*Glycine max* (L.) Merrill] de populações de *Meloidogyne* spp. do Cerrado e de áreas de cultivo.** 2013. 82p. Dissertação de Mestrado em Fitopatologia – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil

A conversão para a agricultura intensiva, a fim de atender à crescente demanda por soja, cana-de-açúcar e criação de gado, está ocorrendo rapidamente sobre as vastas áreas dos 1,8 milhões de km² do cerrado brasileiro, uma região que é naturalmente um mosaico de vegetação, clima e solos. Apesar de sua biodiversidade, há poucos estudos com nematoides, especialmente os do gênero *Meloidogyne*. O objetivo deste trabalho foi estudar e comparar a variabilidade genética e a variação em agressividade em cultivares de soja de populações de três espécies de *Meloidogyne* (*M. javanica*, *M. incognita* e *M. morocciensis*) provenientes de diferentes fitofisionomias do Cerrado e comparar com populações de áreas de cultivo agrícola. O estudo da variabilidade genética foi realizado através da utilização de 30 primers RAPD e 7 de AFLP. Bandas foram separadas num gel de agarose a 1,5% e contadas como presentes ou ausentes nas fotografias digitalizadas dos géis. Para cada um dos dois marcadores moleculares, esses dados referentes aos fragmentos foram convertidos em uma matriz binária. Análises de clusters mostraram a separação entre as populações do Cerrado e as populações de áreas de cultivo. A variabilidade intra-específica em *M. javanica*, *M. morocciensis* e *M. incognita* representou 26,7; 16,6 e 15,3% dos fragmentos polimórficos, respectivamente. A agressividade dessas populações em cinco diferentes cultivares de soja foi também estudada. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em que cinco cultivares de soja foram inoculadas com 5.000 ovos por planta com cada população selecionada. Sessenta dias após a inoculação (DAI), foi determinado o fator de reprodução (FR). As populações de *Meloidogyne* spp. provenientes da soja e as populações coletadas no Cerrado apresentaram

reações de agressividade semelhantes, com exceção de *M. morocciensis*, cuja população da soja foi bem mais agressiva que a do cerrado

Palavras- Chaves: AFLP, agressividade, nematoide das galhas radiculares, RAPD, savana brasileira

Orientador: Prof. Cleber Furlanetto, Ph.D – UnB

Co-orientadora: Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro, Ph.D – Embrapa Cenargen

ABSTRACT

MATTOS, Vanessa da Silva. **Genetic variability and aggressiveness to soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] of *Meloidogyne* spp. populations from cerrado and cultivated areas.** 2013. 82p. Dissertation (Master in Plant Pathology) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

Conversion to intensive agriculture to meet rising demand for soybeans, sugarcane, and livestock products is rapidly occurring over vast areas of the 1.8 million km² Brazilian Cerrado; a region that is naturally a mosaic of vegetation, climates and soils. Despite a vast biodiversity in the Cerrado, there are few studies with nematodes, especially those of the genus *Meloidogyne*. The aim of this work was to study and compare the genetic variability and variation in aggressiveness in soybean cultivars among populations of three *Meloidogyne* species (*M. javanica*, *M. incognita* and *M. morocciensis*) from different physiognomic vegetation of Cerrado and from crop areas. DNA amplifications were done using 7 AFLP and 30 RAPD primers. Amplified fragments were separated on a 1.5% agarose gel and scored as present or absent from the digitized photographs of the gels. For each of the two markers, DNA fingerprints of the populations were converted into a binary matrix. Cluster analyses separated Cerrado populations and the populations from cropping areas. The intraspecific variability in *M. javanica*, *M. morocciensis* and *M. incognita* represented 26,7%; 16,6% and 15,3% of the polymorphic fragments, respectively. The aggressiveness of the nematode populations on five soybean cultivars was also studied. The experiment was conducted under greenhouse conditions in which soybeans cultivars were inoculated with 5.000 eggs per plant of each population. Sixty days after inoculation, nematode reproduction factor (RF) was determined. Populations of *Meloidogyne* spp. from Cerrado and cultivated areas showed

similar aggressiveness, except for *M. morocciensis*, whose population from soybean field was more aggressive than the one from Cerrado.

Key words: AFLP marker, aggressiveness, brazilian savannah, RAPD marker, root-knot nematodes

Advisor: Cleber Furlanetto, Ph.D - UnB

Co-advisor: Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro, Ph.D – Embrapa Cenargen

1. INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1887, compreende as principais espécies de fitonematoides que afetam a produção de alimentos no mundo devido a sua ampla distribuição geográfica, extensa gama de hospedeiros e envolvimento em complexos de doenças com bactérias e fungos fitopatogênicos (Sasser, 1979; Moens *et al.*, 2009).

Em estudos de fauna nematológica, a presença desse gênero de nematoide em biomas naturais foi relatada: Floresta Amazônica (Cares, 1984; Silva *et al.*, 2008), Mata Atlântica (Lima *et al.*, 2005; Cardoso, 2010) e Cerrado (Cares & Huang, 1991; Souza, *et al.*, 1994; Huang & Cares, 1995; Huang *et al.*, 1996; Silva, 2012).

Silva (2012) relatou em cerrado nativo a presença de cinco importantes espécies fitopatogênicas de *Meloidogyne* [*M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, *M. incognita* (Kofoid & White, 1919), *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949, *M. morocciensis* (Rammah & Hirschmann, 1990) e *M. hapla* (Chitwood, 1949)].

Com a expansão da fronteira agrícola em áreas de cerrado nos últimos anos (Mattos, 1999; Sano *et al.*, 2008), principalmente pela cultura da soja que hoje ocupa 19,2% da área total de cerrado no país (Anderson *et al.*, 2003), há a necessidade de se conhecer estratégias de manejo e controle para grupos de nematoides fitopatogênicos.

Atualmente as medidas de controle mais eficientes para *Meloidogyne* spp. são a rotação/sucessão com culturas não hospedeiras ou más hospedeiras e a utilização de cultivares resistentes (Almeida *et al.*, 2005; Embrapa, 2011).

No entanto, não há estudos prévios acerca da patogenicidade e agressividade de populações de *Meloidogyne* habitantes de cerrado nativo, em plantas cultivadas como a soja e nem a respeito da variabilidade genética dessas populações. Esses estudos são de grande

importância para estratégias de controle assim como para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético.

2. OBJETIVO GERAL

- ✓ Estudar a variabilidade genética e fisiológica de populações de *Meloidogyne* spp. associadas à vegetação nativa do cerrado em comparação com populações de áreas agrícolas plantadas com soja.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estudar a variabilidade genética de populações de *Meloidogyne* spp associadas à vegetação do cerrado e a plantações de soja por meio de marcadores moleculares RAPD e AFLP
- ✓ Analisar a reação de genótipos de soja quanto à resistência ou suscetibilidade a populações de *Meloidogyne* spp. coletadas em áreas de vegetação nativa do cerrado e em áreas plantadas com soja.
- ✓ Comparar a significância da incorporação do número total de juvenis de segundo estágio (J2) extraídos do solo ao cálculo do Fator de Reprodução (FR) de populações de *Meloidogyne* spp., em cultivares de soja resistentes e suscetíveis.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. O bioma Cerrado

O Cerrado faz parte do ecossistema das savanas tropicais, ambientes fitogeográficos que, em sua maioria, estão situados entre os Trópicos de Câncer e de Capricórnio e são caracterizados pela presença de uma camada contínua de vegetação herbácea e um dossel descontínuo de arbustos e árvores, variando desde campos abertos até formações densas de florestas. A vegetação dominante do Cerrado é caracterizada pelas famílias botânicas Fabaceae, Poaceae, Asteraceae e Rubiaceae (Goodland, 1970; Ribeiro & Walter, 1998; Costa & Olszewski, 2008; Goert *et al.*, 2008). É o segundo maior bioma do Brasil, ocupando cerca de 23% do território nacional, sendo encontrado nos estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, oeste e no norte de Minas Gerais, oeste da Bahia e Distrito Federal. É reconhecido como a savana mais rica do mundo em biodiversidade, com as presenças de diversos ecossistemas e riquíssima endemia, segundo Myers *et al.* (2000).

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 Cambissolos, Latossolos, Neossolos e Quartzarênicos, os quais apresentam altos teores de alumínio e baixa disponibilidade de macro e micronutrientes (Azevedo & Adámoli, 1988; Toledo *et al.*, 2009).

As fitofisionomias predominantes no Cerrado são: cerradão (com árvores altas, vegetação densa 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).

No contexto nacional, o valor ecológico do bioma Cerrado se destaca, dentre outros fatores, pela importância que exerce na manutenção de importantes bacias hidrográficas brasileiras, como as dos rios Paraná, São Francisco, Araguaia e Tocantins, bem como no papel de sumidouro dos gases de efeito estufa. Além disso, a consagração como área de expansão agropecuária, incentivada por políticas territoriais de ocupação, conferem ao bioma posição de destaque no cenário econômico brasileiro, principalmente, no que diz respeito à agricultura intensiva, produção de grãos e pecuária extensiva de corte para exportação (Rater *et al.*, 1996).

A expansão da fronteira agrícola tem como principais causas o desmatamento e a contaminação do solo e de fontes de água natural devido ao uso indiscriminado de insumos agrícolas, causando desequilíbrio ambiental (Mattos, 1999; Sano *et al.*, 2008).

4.2. Nematoides do gênero *Meloidogyne* em biomas naturais

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 ou Nemata). Possuem diversos hábitos alimentares e diferentes papéis ecológicos no solo, sendo relacionados com a condição ecológica dos solos (Yeates *et al.*, 1993).

Estudos abordando a diversidade de nematoides em biomas naturais brasileiros já foram realizados. No trabalho de Cares (1984) em áreas de várzea e terra firme na Amazônia brasileira, relatou-se grande diversidade de gêneros de nematoides micofágos e fitoparasitas, incluindo espécies de *Meloidogyne* (*M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria*). Silva *et al.* (2008) estudaram a diversidade de nematoides parasitas de plantas em duas áreas preservadas

da floresta amazônica do estado de Mato Grosso e também avaliaram o uso agrícola dessas áreas sobre as comunidades de nematoides. Devido à baixa similaridade entre as áreas com vegetação primária e as posteriormente cultivadas, concluíram que há forte influência da atividade agrícola sobre essas comunidades de nematoides.

Lima *et al.* (2005) relataram a presença de cinco espécies de *Meloidogyne* [*M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. enterolobii* (Yang & Eisenback, 1983) e *M. exigua* (Goeldi, 1892)] em áreas preservadas de Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro. Cardoso (2010) analisou a diversidade de nematoides em áreas cultivadas de cana-de-açúcar e em área remanescente de Mata Atlântica no estado de Pernambuco, observou-se a prevalência de *Pratylenchus* spp. e *Helicotylenchus* spp. nas áreas de cana-de-açúcar, enquanto que os das famílias Dorylaimidae e Rhabditidae prevaleceram em áreas de Mata Atlântica. A diversidade de nematoides também foi maior nessas áreas. Antes *et al.* (2012) estudaram a hospedabilidade de espécies de *Meloidogyne* em plantas nativas da Mata Atlântica e encontraram como hospedeiras de *M. javanica* as espécies *Cordia ecalyculata* Vell., *Cytharexylum myrianthum* Cham. e *Aspidosperma subincanum* Martius e de *M. incognita*, as espécies *Croton urucurana* Baill., *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl., *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl e *T. serratifolia* (Vahl) Nich.

Cares & Huang (1991) relataram a ocorrência de vários gêneros de nematoides em áreas de Cerrado nativo e cultivado. Os autores 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 *sensu stricto*, enquanto os dos gêneros *Meloidogyne*, *Hemicycliophora*, *Aphelenchoides*, *Malenchus*, *Helicotylenchus* e *Ditylenchus* em mata de galeria. Nos campos

úmidos, os nematoides encontrados com maior frequência foram os dos gêneros *Caloosia*, *Criconemella*, *Filenchus*, *Pratylenchus*, *Xiphinema* e *Meloidogyne*.

Souza *et al.* (1994) estudando a ocorrência de *Meloidogyne* spp., associados a vegetação nativa em cerrado do Distrito Federal, detectaram *M. javanica* e *M. arenaria*.

Huang & Cares (1995), avaliando a composição de comunidades de nematoides parasitas de plantas em cerrado nativo e cultivado do Brasil Central e 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*, *Ecpthyadophora*, *Discocriconemella*, *Trophotylenchulus* e *Tylenchus*.

Em estudo de grupos composicionais e tróficos de nematoides em amostras de solo coletados na rizosfera de sucupira branca (*Pterodon pubescens* Benth.) 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).

Rodrigues (2011) e Silva (2012) estudaram recentemente a fauna nematológica em áreas preservadas de cerrado do Parque Nacional de Brasília (PNB) e Fazenda Água Limpa (FAL-DF). No trabalho de Silva (2012), foram identificadas cinco espécies de *Meloidogyne* (*M. morocciensis*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. incognita* e *M. hapla*), além de estudo da hospedabilidade de plantas nativas do cerrado a *M. javanica*.

4.3. A cultura da soja

4.3.1. Origem e histórico

A soja atualmente cultivada [*Glycine max* (L.) Merrill] é um membro da família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae, gênero *Glycine*. O gênero *Glycine* é composto por dois subgêneros, *Glycine* (plantas perenes) e *Soja* (plantas anuais), que inclui a

espécie *G. max* e sua ancestral selvagem *G. soja* (Siebold & Zucc.). A soja é originária da China e é o resultado da domesticação ocorrida, provavelmente, em torno de 1500-1100 a.C. Assume-se que o antepassado do gênero *Glycine* ($x = 10$) foi submetido à tetraploidização aproximadamente entre 59 e 13 milhões de anos atrás (Schmutz *et al.*, 2010). No entanto, todas as espécies descritas apresentam meiose diplóide normal e são autógamas (Cober *et al.*, 2009). Portanto, a soja ($2n = 4x = 40$) pode ser considerada um paleopoliplóide (Schmutz *et al.*, 2010). Estudos sugerem que a evolução da soja tenha sido iniciada a partir de um progenitor selvagem comum perene ($2n = 4x = 40$) que evoluiu para um selvagem anual ($2n = 4x = 40$) e, finalmente, para a soja domesticada ($2n = 4x = 40$), a qual foi cultivada até o primeiro século a.C. na península da Coreia e China central (Cober *et al.*, 2009).

A introdução da soja no Sudeste Asiático ocorreu em torno do século 15, na Europa por volta de 1713 e na América do Norte em 1765 (Cober *et al.*, 2009).

A soja chegou ao Brasil via Estados Unidos, em 1882. Estudos de avaliação de cultivares introduzidas foram realizadas na Bahia pelo Professor Dutra e pelo Instituto Agrônomo de Campinas, Estado de São Paulo (SP). O primeiro registro de cultivo de soja no Brasil data de 1914 no município de Santa Rosa, RS. Mas foi apenas a partir da década de 60, impulsionada pela política de subsídios ao trigo, visando auto-suficiência, que a soja se estabeleceu como cultura economicamente importante para o Brasil. Em 1970, a soja se consolidou como a principal cultura do agronegócio brasileiro. No Brasil, nas décadas de 1980 e 1990, a produção de soja na região centro-oeste foi incrementada (Bonato & Bonato, 1987), sendo atualmente liderada pelos estados de Mato Grosso, com 29,2% da produção nacional, Paraná com 18,4%, Rio Grande do Sul com 14,0% e Goiás com 10,8% (Conab, 2012).

4.3.2. Importância econômica e produção mundial

Desde a sua domesticação, até agora, a soja evoluiu para uma cultura importante a nível global (Singh & Singh, 2010). Em 2011, a soja foi cultivada mundialmente em 102 milhões de hectares e a produção chegou a 261 milhões de toneladas. Os Estados Unidos da América (EUA), que cobre 35% da produção mundial, é o maior produtor, seguido pelo Brasil, Argentina, China e Índia (FAOSTAT, 2011). A soja é a principal cultura geneticamente modificada (GM) produzida no mundo. Em 2007, mais da metade (58,6%) da soja cultivada foi GM. Na safra de 2010-2011, 85% da produção de soja nos EUA foi GM, na Argentina 98% e no Brasil 64% (FAOSTAT, 2011).

A composição típica da soja de cerca de 20% de óleo e 40% de proteína, tem contribuído para que essa seja considerada uma importante cultura oleaginosa (Cober *et al.*, 2009) e uma apreciada fonte de proteína (Krishnan, 2005). O uso de soja varia de alimentos como óleos comestíveis e outros produtos alimentícios ao uso como biodiesel (Soyatech, 2012). Nos últimos 40 anos, a produção mundial de soja aumentou mais de 500%. As mudanças no padrão de vida de países como China, onde há crescente demanda por carne e, portanto, há um grande investimento na alimentação animal, assim como maior demanda por matéria-prima para biodiesel apontam que a produção mundial de soja continuará a crescer (Soytech, 2012). Além disso, os benefícios nutricionais da soja contribuíram para maior interesse em sua destinação para alimentação. Um nicho de mercado para a soja de qualidade alimentar tem se desenvolvido e ganhado grande importância com a criação de cultivares com alto grau de componentes nutricionais (Jaureguy *et al.*, 2011).

4.3.3. Aspectos agronômicos

A produção de soja é influenciada por fatores como a disponibilidade de água, temperatura de desenvolvimento, fotoperíodo e adubação. A disponibilidade de água é

fundamental em dois períodos de desenvolvimento da soja: germinação e emergência e floração e enchimento de grãos. Durante o primeiro período, tanto o excesso quanto o déficit de água são prejudiciais à obtenção de uma boa uniformidade na população de plantas. A semente de soja necessita absorver, no mínimo, 50% de seu peso em água para assegurar boa germinação. Nessa fase, o conteúdo de água no solo não deve exceder a 85% da capacidade de campo e nem ser inferior a 50% dessa capacidade. A necessidade de água na cultura da soja vai aumentando com o desenvolvimento da planta, atingindo o máximo durante a floração e enchimento de grãos (7 a 8 mm/dia), decrescendo após esse período. Déficits hídricos expressivos, durante a floração e enchimento de grãos, provocam alterações fisiológicas na planta, como o fechamento estomático e o enrolamento de folhas e, como consequência, causam a queda prematura de folhas e de flores, além do abortamento de vagens, resultando, por fim, em redução do rendimento de grãos (Embrapa, 2011).

A soja melhor se adapta melhor a temperaturas do ar entre 20°C e 30°C; a temperatura ideal para seu crescimento e desenvolvimento está em torno de 30°C. Sempre que possível, a semeadura da soja não deve ser realizada quando a temperatura do solo estiver abaixo de 20°C porque prejudica a germinação e a emergência. A faixa de temperatura do solo adequada para semeadura varia de 20°C a 30°C, sendo 25°C a temperatura ideal para uma emergência rápida e uniforme (Sediyama, 2009; Embrapa, 2011)

O fotoperíodo afeta o início da floração e conseqüentemente a duração do ciclo (Gomes, 1990). O crescimento da soja é classificado em três tipos diretamente correlacionados com o porte da planta: indeterminado, semi-determinado e determinado. A planta de soja é fortemente influenciada pelo comprimento do dia (período de iluminação ou fotoperíodo). Em regiões ou épocas de fotoperíodo mais curto, durante a fase vegetativa da planta, ela tende a induzir o florescimento precoce, e apresentar consecutiva queda de produção. Para controlar este problema alguns melhoristas utilizam o artifício do uso do período juvenil longo para

retardar o florescimento em dias curtos. Pois, na fase juvenil, a soja não floresce, mesmo quando submetida ao fotoperíodo indutivo, permitindo assim maior crescimento vegetativo e evitando queda na produção (Sediyama, 2009; Embrapa, 2011)

De modo geral, as cultivares de soja brasileiras têm ciclo entre 100 e 160 dias, e podem ser classificadas em grupos de maturação precoce, semi-precoce, médio, semi-tardio e tardio, dependendo da região. A altura da planta depende da interação da região e da cultivar (Borém, 2005).

O nitrogênio (N) é o nutriente mais requerido pela cultura da soja. Basicamente, as fontes de N disponíveis para a cultura da soja são os fertilizantes nitrogenados e a fixação biológica do nitrogênio (FBN) através da simbiose com as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (Hungria *et al.*, 2001). Essas bactérias quando em contato com as raízes da soja infectam-as via pêlos radiculares e formam nódulos (Quispel, 1988).

O desenvolvimento da planta de soja é dividida em estádios vegetativos e reprodutivos que variam do estágio VE (emergência) até o R8 (maturação plena), segundo modelo proposto por Fehr & Caviness (1977).

4.3.4. Pragas e doenças da soja

A cultura da soja está sujeita ao ataque de insetos desde a germinação à colheita. Logo após a germinação, a partir do início do estágio vegetativo, vários insetos como o bicudo-da-soja (*Sternechus subsignatus* Boheman, 1836), a lagarta elasma (*Elasmopalpus lignosellus* Zeller, 1848), os corós (Scarabaeoidea) e os percevejos-castanhos-da-raiz (*Scaptocoris castanea* Perty, 1830 e *Atarsocoris brachiariae* Becker, 1996) danificam a cultura. Mais adiante, a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818), a lagarta falsa-medideira (*Pseudoplusia includens* Walker, 1857) e vários outros desfolhadores atacam as plantas, ocorrendo em maior número durante as fases vegetativa e de floração. Com o início da fase

reprodutiva, surgem os percevejos sugadores de vagens e sementes (*Nezara viridula* Linnaeus, 1758; *Piezodorus guildinii* Westwood, 1837 e *Euschistus heros* Fabr, 1974), dentre outras espécies, que causam danos desde a formação das vagens até o final do enchimento dos grãos. As principais espécies de pragas em pós-colheita são *Sitotroga cerealella* Olivier, 1819 e *Ephestia kuehniella* Zeller, 1879, ambas lepidopteras. Os insetos-pragas têm suas populações controladas naturalmente por predadores e parasitóides, conhecidos como inimigos naturais. Apesar de os danos causados por insetos serem, em alguns casos, alarmantes, não se recomenda a aplicação preventiva de produtos químicos. O controle mais adequado e racional é através do “Manejo Integrado de Pragas na Soja” (MIP-Soja). Vários métodos como o biológico e o químico podem ser utilizados para o controle das principais pragas. Além disso, a rotação de culturas e a manipulação da época de semeadura têm sido recomendadas principalmente para insetos de ciclo longo (Embrapa, 2011).

Entre os principais fatores limitantes à obtenção de maiores rendimentos em soja estão as doenças. Aproximadamente 125 microrganismos patogênicos à soja são conhecidos no mundo; entretanto, cerca de 40 destes são capazes de provocar doenças de importância econômica. No Brasil, encontram-se aproximadamente 25 patógenos de soja de importância econômica (Dhingra *et al.*, 2009; Embrapa, 2011).

A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra. As perdas anuais de produção por doenças são estimadas em cerca de 15% a 20%, entretanto, algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100%. A expansão de áreas irrigadas nos cerrados vinha possibilitando o cultivo da soja no outono/inverno para a produção de sementes. No inverno de 2006, os estados do Mato Grosso, de Goiás e de Tocantins implementaram o vazio sanitário (período sem plantas vivas de soja no campo), de 60 a 90 dias, com o objetivo de reduzir a quantidade de inóculo da ferrugem (*Phakopsora* spp.) nos cultivos da safra de verão. Em virtude dos

bons resultados, essa medida de manejo foi adotada por outros estados nas safras seguintes. Além da ferrugem, esse cultivo também favorecia a sobrevivência dos fungos causadores da antracnose (*Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & W. D. Moore 1935), do cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* (Cooke & Ellis) Sacc. var. *meridionalis*), da podridão branca da haste (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, 1884), da podridão vermelha da raiz (*Fusarium* spp.) e dos nematoides. O feijão, a ervilha, a melancia e o tomate, cultivados sob irrigação na mesma época, também podem ser afetados por *S. sclerotiorum*, aumentando a quantidade de inóculo desse patógeno para a safra seguinte de soja. A maioria dos patógenos é transmitida, externa e/ou internamente, através da semente. Portanto, o uso de sementes certificadas, oriundas de lavouras saudáveis, beneficiadas adequadamente (livres de torrões, restos de culturas e estruturas de patógenos) e tratadas com fungicidas apropriados é essencial para a prevenção e/ou a redução das perdas por doenças (Embrapa, 2011). O controle de grande parte das doenças além de medidas profiláticas tem sido feito através do uso de cultivares resistentes.

4.3.5. Nematoides da soja

Os principais nematoides que atacam a soja no Brasil são o nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.), nematoide do cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe, 1915), nematoide reniforme (*Rotylenchus reniformis* Linford & Oliveira, 1940) e o nematoide das lesões radiculares (*Pratylenchus brachyuru* (Godfrey, 1929) Filipjev & S. Stekhoven, 1941) (Almeida *et al.*, 2005; Embrapa, 2011). Além desses, há também a ocorrência do nematoide *Tubixaba tuxaua* Monteiro & Lordelo, 1980 nesta cultura (Roese *et al.*, 2001; Franzener *et al.*, 2005; Seifert *et al.*, 2006).

Dentre os nematoides que parasitam a soja, *Meloidogyne* spp. merecem destaque pela ampla distribuição e sobrevivência, infectando plantas das mais diferentes famílias botânicas.

Das espécies de *Meloidogyne* que mais limitam a produção de soja no Brasil estão *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (Almeida *et al.*, 2005). *Meloidogyne javanica* tem ocorrência generalizada, enquanto *M. incognita* predomina em áreas cultivadas anteriormente com café ou algodão (Almeida *et al.*, 2005; Embrapa, 2011). Há registros também da ocorrência das espécies *M. morocciensis* (Castro *et al.*, 2003 e Carneiro *et al.*, 2008) e *M. paranaensis* (Roese *et al.*, 2004). A soja também foi relatada como hospedeira de *M. enterolobii* (Dias *et al.*, 2010), não havendo ainda relato da ocorrência desse nematoide em áreas de produção de soja no Brasil.

Nas áreas onde ocorrem as meloidoginoses, observam-se reboleiras com plantas de soja subdesenvolvidas e folhas amareladas. O sintoma conhecido como folha “carijó”, folhas com manchas cloróticas ou necroses entre as nervuras, também está associado às meloidoginoses (Embrapa, 2011).

O controle de nematoides deve ser planejado com a integração de vários métodos e apresentar baixo custo, sendo recomendados, com frequência, a rotação de culturas, o uso de genótipos resistentes e o controle químico e biológico (Almeida *et al.* 2005). Entretanto, as medidas de controle mais eficientes são a rotação/sucessão com culturas não hospedeiras ou más hospedeiras e a utilização de cultivares de soja resistentes. A rotação de culturas deve ser bem planejada, uma vez que a maioria das espécies cultivadas multiplica os nematoides de galhas. A adubação verde com *Crotalaria spectabilis* Roth, *C. grantiana* Harvey, 1862, *C. mucronata* Desv., *C. paulinea* Schrank, mucuna preta (*Stizolobium aterrimum*, Piper & Tracy), mucuna cinza (*Stizolobium cinereum* Piper & Tracy) ou nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.) contribui para a redução populacional de ambas as espécies, *M. javanica* e *M. incognita* (Ferraz *et al.*, 2010).

4.4. Classificação do gênero *Meloidogyne*

As espécies do gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1887 constituem uma pequena parte do Filo Nematoda, que compreende os nematoides em geral, incluindo os parasitas do homem, dos animais e de plantas, além de espécies de vida livre no solo, água doce e no mar (Maggenti, 1981). O gênero *Meloidogyne* faz parte da classe Chromadorea, ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Infraordem Tylenchomorpha, Superfamília Tylenchoidea e família Meloidogynidae (De Ley & Blaxter, 2002; Karsen & Moens, 2006).

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

O ciclo de vida de *Meloidogyne* inicia-se com a fêmea depositando seus ovos em um único local da raiz, formando uma massa de ovos envolta em uma matriz gelatinosa (Taylor & Sasser, 1983). Essa matriz gelatinosa mantém os ovos unidos e protegidos contra condições ambientais adversas e predação, além de apresentar propriedades antimicrobianas (Orion & Kritzman, 1991). No interior dos ovos, o desenvolvimento embrionário resulta no juvenil de primeiro estágio (J1) que passa por uma ecdise, dando origem ao juvenil de segundo estágio (J2). De maneira geral, o J2 eclode quando há condições ambientais favoráveis à sua sobrevivência, tais como temperatura apropriada, disponibilidade de oxigênio e níveis de umidade do solo adequados e ausência de barreiras fisiológicas, como, por exemplo, a diapausa (Curtis *et al.*, 2009). Esse estágio móvel, vermiforme, infectante migra através do solo atraído por substâncias que emanam das plantas, penetrando nas raízes da hospedeira. Há evidências de que quando presentes ambas raízes de plantas resistentes e suscetíveis, as suscetíveis são mais atraentes (Curtis *et al.*, 2009).

Os J2 movem-se por entre as células dos tecidos da planta perfurando-as com o estilete, migrando até a zona de alongação da raiz, na periferia do cilindro central, onde

estabelecem seus sítios de alimentação no parênquima vascular iniciando um complexo relacionamento com a planta (Taylor & Sasser, 1983). O início da alimentação do J2 em células do protoxilema e protofloema induz a diferenciação dessas células em células especializadas, chamadas células gigantes (Moens *et al.*, 2009). Uma vez que as células gigantes são iniciadas, o nematoide torna-se sedentário e ocorre então a segunda (J2 > J3), a terceira (J3 > J4) e a quarta ecdises (J4 > fêmea jovem) (Eisenback & Triantaphyllou, 1991; Moens *et al.*, 2009). Logo após a última ecdise, a fêmea jovem começa a se alimentar, permanecendo ali o restante de sua vida. Ocorre a hiperplasia e hipertrofia das células comprometidas resultando, via de regra, na formação da galha radicular. (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). A formação de galhas radiculares pode variar entre as espécies de *Meloidogyne* e as plantas hospedeiras. *Meloidogyne hapla*, por exemplo, é particularmente conhecida pela incidência elevada de raízes adventícias que se desenvolvem a partir das galhas radiculares (Sasser, 1954 apud Moens *et al.*, 2009). Em algumas hospedeiras, as galhas podem ser pequenas ou indistintas, resultando muitas vezes na não identificação do parasitismo (Moens *et al.*, 2009).

Os machos, quando presentes, são vermiformes e não há evidências que se alimentam (Moens *et al.*, 2009). A mudança de forma nos machos (piriforme para adulto vermiforme) ocorre durante o quarto estágio juvenil (J4) (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). A maioria das espécies de *Meloidogyne* são partenogénicas. Algumas se reproduzem por partenogênese meiótica facultativa, mas várias das espécies economicamente mais importantes, tais como *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria*, possuem modo de reprodução partenogénico mitótico obrigatório (revisado por Castagnone-Sereno, 2006).

Em condições normais, a quase totalidade dos adultos formados de *Meloidogyne* spp. são fêmeas. Porém, em condições ambientais desfavoráveis, com elevada população de nematoides na raiz ou resistência da planta hospedeira, os juvenis que se desenvolveriam em

fêmeas, tornam-se machos, pois seu primórdio sexual se desenvolve em testículos em vez de ovários. Tal fenômeno é conhecido por reversão sexual e é um dos mecanismos de sobrevivência desses nematoides, pois menos ovos serão produzidos e o parasitismo sobre a planta infectada será mais brando, garantindo a sobrevivência das fêmeas formadas (Freitas *et al.*, 2006).

A duração do ciclo de vida do nematoide das galhas é fortemente afetada pela temperatura, umidade e planta hospedeira. As fêmeas produzem ovos por três semanas, depois cessam a produção, podendo viver um pouco mais. Os machos vivem semanas e os J2 podem viver de poucos dias a meses (Taylor & Sasser, 1983).

4.6. Diversidade do gênero *Meloidogyne* e o uso de marcadores moleculares para o seu estudo

Até junho de 2009, havia 97 espécies válidas pertencentes ao gênero *Meloidogyne* (Hunt & Handoo, 2009). Dentre essas, a maioria tem 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; por outro lado, cada mutante que conseguir se reproduzir dará origem a um clone diferente da população mãe (Triantaphyllou, 1985).

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.*, 1996a; 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 a 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 as regiões não codantes são mais abundantes e submetidas a extensivas mudanças evolutivas (McLain *et al.* 1987).

O desenvolvimento de técnicas moleculares abriu novas perspectivas quanto à identificação de espécies e estudos da variabilidade intraespecífica dos nematoides de galhas. Assim, estudos foram realizados a partir da análise do polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição do DNA (RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Curran *et al.*, 1986; Castagnone-Sereno *et al.*, 1991, 1993a). O advento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) fez progredir de maneira considerável os métodos de análise e diferentes estudos sobre o DNA mitocondrial e ribossômico foram realizados em isolados de *Meloidogyne* spp. (Harris *et al.*, 1990; Powers *et al.*, 1997; Zijlstra *et al.*, 1997).

A técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), baseada na PCR, é utilizada atualmente para os estudos genéticos e para a diferenciação de várias espécies de *Meloidogyne*, a partir de perfis gerados com o auxílio de primers aleatórios (Cenis, 1993; Castagnone - Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997; Randig *et al.*, 2002). A análise de RAPD, além de utilizar pequenas quantidades de material genético (6 - 30 ng DNA), não necessita do conhecimento prévio do genoma a ser estudado, pois se utilizam primers de sequência aleatória (Williams *et al.*, 1990). A técnica é considerada uma técnica simples, rápida e de baixo custo quando comparada a RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). A principal limitação dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informação genética por loco. Apenas um alelo é detectado, o segmento que é amplificado, enquanto que as demais

variações alélicas são classificadas conjuntamente como um alelo nulo. Os marcadores RAPD, portanto, comportam-se como marcadores dominantes: os dados têm natureza binária (presença ou ausência de fragmentos). Genótipos heterozigotos não podem ser diretamente discriminados dos homozigotos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

De forma semelhante à análise de RAPD, a técnica de AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) (Semblat *et al.*, 1998) permite a detecção de polimorfismo a nível específico e/ou subespecífico em *Meloidogyne* spp. A vantagem apresentada por essa técnica é o grande número de fragmentos gerados em um único gel (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Outra vantagem é o grande poder de detecção de variabilidade genética. Ela explora simultaneamente o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição, tal como no ensaio de RFLP, e a ocorrência ou não de amplificação a partir de sequências arbitrárias, tal como o ensaio RAPD, caracterizando-se uma flexibilidade significativa na obtenção de marcadores polimórficos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A limitação da técnica, de forma análoga aos marcadores RAPD, é o baixo conteúdo de informação genética por loco. Além disso, a análise de AFLP envolve maior número de etapas do que a de RAPD (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A conversão dos marcadores RAPD em SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), termo cunhado por Paran & Michelmore (1993) para definir marcadores RAPD cuja seqüência interna tenha sido determinada, permitindo compor primers mais longos, ricos em GC (guanina-citosina) e de seqüência específica tem sido utilizada para a identificação de espécies. Entre as vantagens dos marcadores SCAR, em relação aos marcadores RAPD, destaca-se a maior reprodutibilidade, pois a técnica RAPD, quando executada sob diferentes condições, tais como qualidade e quantidade do DNA, marcas de enzima e de termociclador, pode apresentar variação no perfil amplificado (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 ou fenótipo de interesse (Mienie *et al.* 2002; Noir *et al.*, 2003).

Nos 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, ou ainda, para separar as três espécies: *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 foram definidos para as três principais espécies de *Meloidogyne* do cafeeiro: *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* (Randig *et al.* 2002).

O primeiro estudo sobre diversidade de populações brasileiras de *Meloidogyne* spp. foi realizado por Randig *et al.* (2002) em que foram estudadas através de PCR-RAPD, 18 populações de *Meloidogyne* spp., provenientes de diferentes regiões do Brasil, caracterizadas previamente quanto ao perfil isoenzimático (Carneiro *et al.*, 2000). Nesse estudo, observou-se que as diferentes espécies de *Meloidogyne* se diferenciaram em clusters, de acordo com os perfis enzimáticos e que nenhuma separação de raças através de marcadores moleculares foi observada. Um alto grau de variabilidade intraespecífica foi observado em populações de *M. exigua*, *M. hapla* e *M. arenaria*, que apresentaram: 67,5%, 67,5% e 69,8% de polimorfismo. Diferentemente, populações de *M. javanica* e *M. incognita* apresentaram baixa variabilidade intraespecífica, 19% e 30%, respectivamente.

Meloidogyne javanica tem sido relatada como uma espécie que apresenta baixa variabilidade intraespecífica (Castgnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997). Estudos realizados por Cofcewicz *et al.* (2004) com sete populações de *M. javanica* provenientes de bananeiras de diferentes regiões do Brasil revelaram uma variabilidade intra-específica de 29,1%, que ainda é considerada baixa. Entretanto, estudos realizados por Carneiro *et al.* (1998), com quatro populações brasileiras de *M. javanica*, mostraram variabilidades

morfológica, enzimática, fisiológica e genética. A presença de quatro raças fisiológicas detectadas em *M. javanica* é outro exemplo da variabilidade intra-específica observada nessa espécie (Carneiro *et al.*, 2003).

Estudos realizados por Muniz *et al.* (2008) com 16 populações de *M. exigua*, revelaram polimorfismo intraespecífico elevado (24,6 – 57,8 %) para essa espécie. Entretanto, todas as populações agruparam-se com 100% bootstrap apesar da grande variabilidade intraespecífica encontrada. Diferentemente de *M. exigua*, a grande variabilidade encontrada em populações de *M. arenaria* revelou a presença de espécies distintas dentro da mesma espécie como é o caso de *M. morocciensis* anteriormente identificada como *M. arenaria* (EST A3) (Carneiro *et al.*, 2008).

Estudos sobre a variabilidade genética de *M. incognita* com a utilização de marcadores moleculares demonstraram que a espécie possui baixa variabilidade genética (Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.* 1997; Randig *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2004; Cofcewicz *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2012). Isso pode estar relacionado com o modo de reprodução da espécie, partenogenética mitótica, que em teoria geraria descendentes clonais (Triantaphyllou, 1985).

A variação intraespecífica de *Meloidogyne* spp. em relação à interação planta-nematoide pode ser expressa em três diferentes níveis: hospedabilidade, agressividade e virulência. Nesse contexto, as espécies vegetais podem ser boas hospedeiras, más hospedeiras ou não hospedeiras de determinada espécie de *Meloidogyne* ou grupo de espécies. Diferenças encontradas no círculo de hospedeiras conduziu ao conceito das raças fisiológicas, que foram relatadas para importantes espécies como *M. javanica* (Rammah & Hirschmann, 1990; Carneiro *et al.*, 2003), *M. incognita*, *M. arenaria* (Sasser, 1980), *M. hapla* (Wofford *et al.*, 1989), *M. exigua* (Silva, 2005) e *M. chitwoodi* (Mojtahedi *et al.*, 1988).

A agressividade reflete a habilidade de reprodução dos nematoides em hospedeiras suscetíveis, sendo essas boas ou más hospedeiras, enquanto que a virulência é a capacidade do patógeno em se reproduzir em uma hospedeira resistente. Nesta situação, há interação de genes de virulência do nematoide com genes de resistência da hospedeira (Hussey & Janssen, 2002; Roberts, 2002).

Grande parte das informações sobre virulência em *Meloidogyne* spp. está relacionada com o gene Mi de resistência em tomate. Nos anos de 1950, a ocorrência de quebras de resistência por isolados das espécies *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* foram relatadas e designadas como “B-races” ou raças-B. Observou-se quebra de resistência em campo, inclusive, em populações não expostas anteriormente à cultivar resistente (Roberts & Thomason, 1989 apud Hussey & Janssen, 2002).

Experimentos de seleção de genótipos em laboratórios mostraram que a proporção de nematoides virulentos aumentava gradualmente após sucessivas gerações na cultivar resistente de tomate (Netscher, 1977). Considerando que *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* são espécies partenogéticas mitóticas obrigatórias, mecanismos além da recombinação gênica devem ser responsáveis pela crescente virulência (Triantaphyllou, 1987).

4.7. Cultivares de soja resistentes ao nematoide das galhas

Segundo Hiromoto & Vello (1986), primeiros a estudar a base genética das cultivares de soja no Brasil, a contribuição genética relativa de cada ancestral mostrou que apenas 11 ancestrais representavam 89% do germoplasma brasileiro das 74 cultivares avaliadas. O trabalho também mostrou que a base genética brasileira teve grande influência da norte-americana, sendo que seis dos 11 principais ancestrais brasileiros estavam entre os principais ancestrais do germoplasma norte-americano. Posteriormente, alguns trabalhos foram feitos e

obtiveram resultados bem próximos, concluindo que a população efetiva de melhoramento da soja brasileira variava de 11 a 16 indivíduos (Wysmierski, 2010).

A base americana também apresenta esse problema de base genética estreita. Gizlice *et al.* (1994) concluíram que 50% do germoplasma dependia de 6 ancestrais e 14 contribuía com mais de 80% do germoplasma. Ao contrário, a China apresenta uma ampla base genética em que 35 ancestrais contribuía com 50% da base genética e 190 com 80% (Wysmierski, 2010).

Uma maneira de ampliar a base genética foi através das introduções de plantas (Plant Introduction - PIs). Estima-se que os EUA em meados de 1900, fizeram mais de 10.000 introduções através do Departamento de Agricultura dos EUA, provenientes da China, Japão, Índia, Coreia e região da Manchúria (Morse, 1884).

Quase todas as cultivares resistentes aos nematoides do gênero *Meloidogyne* em uso no Brasil descendem de uma única fonte de resistência: a cultivar norte-americana Bragg. Essa cultivar é originária do cruzamento Jackson X D49-2491, onde Jackson contribuiu com os genes de resistência. Jackson descende de Palmetto² X Volstate, ambos com resistência a *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. incognita*. Bragg foi semeada nos estados do Paraná, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, e tinha especial aceitação entre os agricultores do norte do Rio Grande do Sul e do sudoeste do Paraná, locais onde a soja já vinha sendo cultivada desde a década de 60 e onde nematoides do gênero *Meloidogyne* eram de ocorrência muito frequente. A mancha olho-de-rã (*Cercospora sojina* Hara) limitou o seu cultivo e, finalmente, Bragg não pôde mais ser cultivada após o surgimento do cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* (Cke. & Ell) Sacc. f. sp. *meridionalis* Morgan-Jones) no Brasil, doença fúngica à qual mostrou-se suscetível. Entretanto, essa cultivar foi muito utilizada em diversos programas de melhoramento genético de soja no Brasil, e gerou alguns descendentes, como BR-6 (Nova Bragg) e BR-13. Conquista (MG/BR-46) possui genes de resistência

vindos de Bragg. Essa cultivar apresenta bom nível de resistência a *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. incognita*. Esses atributos contribuíram na obtenção de bom desempenho em diferentes ambientes, tornando-a largamente cultivada no Brasil, a partir do final da década de noventa (Silva, 2001).

PI 595099 é uma linhagem desenvolvida pela Georgia Agricultural Experiment Station (EUA), com resistência a *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* e às raças 3 e 14 do nematoide de cisto da soja, *H. glycines*. Foi obtida pelo cruzamento de G83-559 X (G80-1515 X PI 230977). Tem em sua genealogia cultivares conhecidas por sua resistência como Forrest, Cobb, Bedford, Centennial (Luzzi *et al.*, 1997).

A cultivar de soja BRS Valiosa é essencialmente derivada, obtida por cinco cruzamentos para a cv. MG/BR-46 Conquista. É resistente às principais doenças como cancro da haste, mancha "olho-de-rã", oídio e pústula bacteriana. É resistente também aos vírus do mosaico comum e da necrose da haste, bem como ao nematoide de galhas *M. javanica*, moderadamente resistente ao *M. incognita* e suscetível ao nematoide de cisto da soja (Embrapa, 2010).

A cultivar BRSMG 740S RR da mesma forma que a cultivar Valiosa, teve seu melhoramento a partir da cultivar MG/BR 46 Conquista apresenta resistência à pústula bacteriana, à mancha "olho de rã", ao cancro da haste e ao nematoide de galhas (*M. incognita*) e moderada resistência a oídio e ao nematoide de galhas (*M. javanica*) (Embrapa, 2010).

A cultivar BRSMG 811RR foi obtida a partir da linhagem RRMG03-9183, melhorada via cultivar BRS Piraíba, que é resistente ao nematoide do cisto da soja. Apresenta resistência à pústula bacteriana, à mancha "olho de rã", ao cancro da haste, ao nematoide de galhas (*M. incognita*) e ao nematoide de cisto (raça 3) e moderada resistência a oídio e ao nematoide de galhas (*M. javanica*) (Embrapa, 2010)

Atualmente, informações sobre cultivares brasileiras resistentes às espécies *M. javanica* e *M. incognita* podem ser encontradas na publicação Tecnologias de Produção de Soja – região central do Brasil 2012 e 2013 pela Embrapa Soja (2011). Porém, na literatura a avaliação de genótipos de soja visando a identificação de fontes de resistência ao nematoide de galhas tem resultado em informações contraditórias, em função dos critérios utilizados (Mendes & Rodriguez, 2000). Algumas metodologias consideram apenas os danos causados no hospedeiro como o índice de galhas e de massas de ovos (Taylor & Sasser, 1978). De acordo com Canto-Saénz (1983), o fator de reprodução e o grau de danos no hospedeiro são fatores mais reais para avaliar a reação de plantas aos nematoides de galhas.

Dias *et al.* (2010) testaram a resistência de genótipos de soja brasileiros aos nematoides *M. enterolobii* e *M. ethiopica*. Os autores concluíram que a maioria dos genótipos de soja resistentes a *M. incognita* também apresentou resistência a *M. ethiopica*, as exceções foram as cultivares CD-202, BR-36, BRSGO-Caiapônia e BRSMG-68 Vencedora. E todos os genótipos de soja resistentes a *M. javanica*, incluindo aqueles suscetíveis a *M. incognita*, também apresentaram resistência a *M. ethiopica* Whitehead 1968. No entanto, a disponibilidade de fontes de resistência para *M. enterolobii* no germoplasma de soja é bastante reduzida e que os níveis de resistência das fontes também não são altos, uma vez que mesmo para os genótipos com índice de galhas (IG) ≤ 2 houve multiplicação do parasita (Fator de reprodução $> 1,0$).

Roese *et al.* (2004) avaliaram a reação de cultivares de soja a *M. paranaensis*, espécie descrita por Carneiro *et al.* (1996b). De acordo com o trabalho, todas as cultivares mostraram-se suscetíveis ao nematoide (FR >1), podendo ser apenas indicadas cultivares menos suscetíveis para áreas infestadas. De maneira semelhante, Santos (2011) ao avaliar a resistência de cultivares de soja a *M. morocciensis* relatou que todas as cultivares permitiram a reprodução do nematoide (FR >1).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Identificação das populações de nematoides e produção de inóculo

Foram utilizadas neste estudo 17 (dezesete) populações de *Meloidogyne* spp., sendo 13 (treze) pertencentes a *M. javanica*, 2 (duas) a *M. incognita* e 2 (duas) a *M. morocciensis*. Essas populações foram coletadas em áreas de cerrado nativo do Distrito Federal (Silva, 2012) e em áreas produtoras de soja do Brasil (Tabela 1).

Todas as populações utilizadas nesse estudo foram previamente identificadas pelos fenótipos das esterases (Est) e malato-desidrogenases (Mdh) (Tabela 1 e Figura 1), seguindo a metodologia de Carneiro & Almeida (2001) e por marcadores moleculares SCAR (Zijlstra *et al.*, 2000; Randig *et al.*, 2004). As populações foram multiplicadas e mantidas em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*, grupo Santa Cruz cv. ‘Santa Clara’) em condições de casa de vegetação com umidade e temperatura (25-30° C) controladas, com posterior extração de ovos para inóculo seguindo protocolo descrito por Hussey Baker (1973) modificado por Boneti & Ferraz e para as análises moleculares segundo protocolo de Carneiro *et al.*, 2004.

Tabela 1: Código das populações, origem geográfica, perfil enzimático, hospedeiro ou fitofisionomia do Cerrado de populações de *Meloidogyne* spp.

Código ^a	Espécie	Localidade ^b	Fitofisionomia do Cerrado/ Hospedeiro	Perfil enzimático ^c	
				Est	Mdh
JAV1 ^a	<i>M. javanica</i>	PNB - Brasília/DF	Campo Limpo	J3	N1
JAV2	<i>M. javanica</i>	PNB - Brasília/DF	Campo Limpo	J3	N1
JAV3	<i>M. javanica</i>	PNB - Brasília/DF	Campo cerrado	J3	N1
JAV4	<i>M. javanica</i>	FAL - Brasília/DF	Mata de Galeria	J2	N1
JAV5	<i>M. javanica</i>	FAL - Brasília/DF	Campo Sujo	J3	N1
JAV6	<i>M. javanica</i>	FAL - Brasília/DF	<i>C. sensu stricto</i>	J3	N1
JAV7	<i>M. javanica</i>	FAL - Brasília/DF	<i>C. sensu stricto</i>	J3	N1
JAV8	<i>M. javanica</i>	FAL - Brasília/DF	Campo Sujo	J3	N1
JAV9	<i>M. javanica</i>	FAL - Brasília/DF	Campo Sujo	J3	N1
JAV10	<i>M. javanica</i>	FAL - Brasília/DF	Campo Limpo	J3	N1
JAV11	<i>M. javanica</i>	FAL - Brasília/DF	Campo Limpo	J3	N1
JAV12 ^a	<i>M. javanica</i>	Londrina/PR	Soja	J3	N1
JAV13	<i>M. javanica</i>	Cruz das Almas/BA	Banana	J2a	N1
INC14 ^a	<i>M. incognita</i>	FAL - Brasília/DF	Campo Limpo	I2	N1
INC15 ^a	<i>M. incognita</i>	Londrina/PR	Soja	I2	N1
MOR16 ^a	<i>M. morocchienis</i>	PNB - Brasília/DF	Campo Limpo	A3	N1
MOR17 ^a	<i>M. morocchienis</i>	Santa Rosa - RS	Soja	A3	N1

^a Populações de *Meloidogyne* spp. utilizadas nas análises de diversidade genética e reprodução em genótipos de soja. A população JAV1 foi escolhida para o bioensaio por ter apresentado maior agressividade em tomateiro, em casa de vegetação, dentre as populações de *M. javanica* do cerrado.

^b PNB (Parque Nacional de Brasília) e FAL (Fazenda Água Limpa) designam áreas de cerrado próximas a Brasília-DF.

^c Designações dos fenótipos: Est – esterase, Mdh= malato desidrogenase.

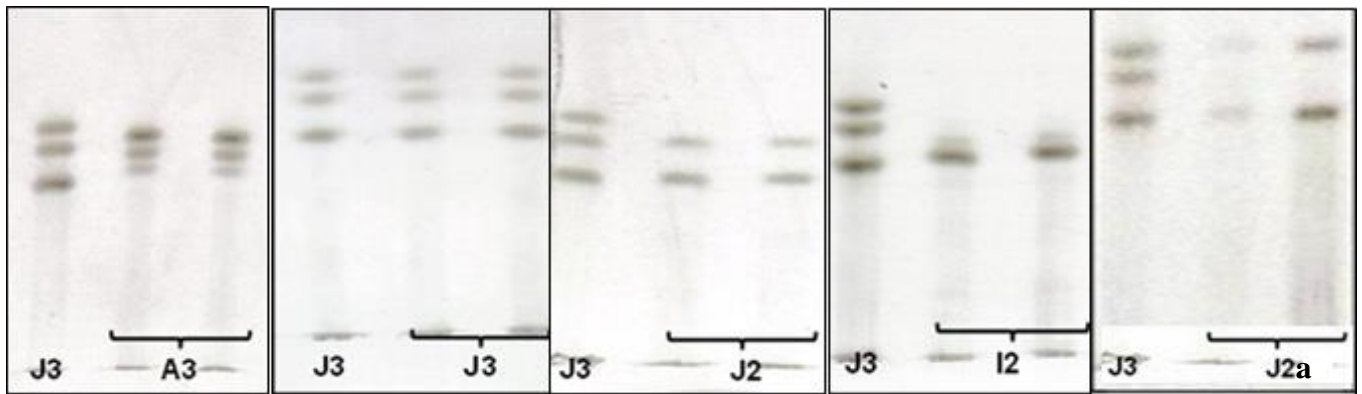


Figura 1: Perfis de esterase (EST) de populações de *Meloidogyne* spp. das populações utilizadas neste estudo. J3- *M. javanica*, J2 e J2a- *M. javanica*, A3- *M. morocciensis*, I2- *M. incognita*. *M. javanica* (J3) foi usado como padrão de EST.

5.2. Extração dos ovos de *Meloidogyne* spp. para as análises moleculares

A extração de ovos para posterior extração de DNA seguiu o protocolo descrito por Carneiro *et al.*, 2004.

Após três meses em casa de vegetação, as raízes dos tomateiros foram lavadas cuidadosamente, cortadas e trituradas em liquidificador com hipoclorito de sódio (NaOCl) 1,25% por 1 minuto a baixa rotação. Em seguida, o triturado foi passado em peneiras sobrepostas de 20, 100 e 500 mesh. Os resíduos da peneira de 500 mesh foram lavados com água corrente e coletados em béquer.

O coletado foi distribuído em tubos de 15 ml, aos quais adicionou-se caulim (aproximadamente uma colher de chá ou 5 gramas) em cada tubo e esses foram centrifugados a 360 g por 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e uma solução de sacarose a 30% foi adicionada e misturada. A suspensão foi então centrifugada na mesma velocidade por dois minutos. Em seguida, o sobrenadante foi vertido em peneira de 500 mesh e lavado com água destilada para retirar os resíduos de sacarose. Os ovos retidos na peneira de

500 mesh foram transferidos para tubos de 15 ml, o volume do tubo foi completado com água destilada e esses foram centrifugados por três minutos a 360 g. O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma micropipeta. Os ovos foram transferidos para tubos Eppendorf de 1,5 ml e centrifugados a 9300 g por 3-4 minutos foi necessária para eliminar o restante de água antes de armazenar o material a -80°C para posterior extração do DNA genômico.

5.3. Extração do DNA para as análises moleculares

O DNA genômico de todas as populações de nematoides foi extraído de 200 a 300 µl ovos, de acordo com o método descrito por Randig *et al.* (2002). Os ovos previamente extraídos e armazenados a -80 °C foram macerados em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido. Após o resfriamento, o material foi recuperado em tubo Eppendorf de 2 mL, ao qual foi adicionado 500 µl de tampão NIB (0,1 M NaCl; 30 mM Tris pH 8; 10 mM EDTA; 0,7 mM β mercaptoetanol; 5 mM Triton - NPHO). Efetuada a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 14.000 g por dois minutos e eliminado o sobrenadante. Esta operação de lavagem foi efetuada duas vezes. 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 pH 9,2; 2,3 % SDS).

Após a homogeneização, as amostras foram incubadas a 55 °C por 30 minutos, seguido de 10 minutos à temperatura ambiente. A purificação foi realizada adicionando-se 1 V (1 ml) de fenol, seguindo-se à homogeneização e centrifugação a 14.000 g por três minutos. O sobrenadante foi recuperado e depois misturado à ½ V (500 µl) de Fenol + ½ V (500 µl) de Clorofórmio e centrifugado a 14.000 g por três minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 200 µl de éter. Após centrifugação a 14.000 g por três minutos, o éter foi eliminado com auxílio de uma micropipeta. Para precipitação do DNA, 1 ml de etanol absoluto foi adicionado ao tubo, efetuando-se a homogeneização e observando-se a formação do pellet. O

material foi então incubado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Em seguida efetuou-se uma centrifugação a 14.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se etanol 70%. Após a centrifugação a 14.000 g por cinco minutos, eliminou-se o etanol 70%. O precipitado foi seco à temperatura ambiente, recuperado em 10-20 μl de água esterilizada (Milli-Q) e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.4. Técnica PCR-RAPD

A técnica PCR-RAPD foi realizada num volume final de 13 μl , contendo: 3 μl de DNA total [3 ng/ μl]; 0,4 μl do primer [10 μM] (Operon Technologies); 2 μl de dNTP [1,25 mM] (Invitrogen); 1,3 μl tampão 10X com MgCl_2 (Phoneutria Biotecnologia e Serviços – Pht); 0,2 μl da enzima Taq DNA polimerase (5U/ μl) (Pht) e 6,1 μl de água Milli-Q, no final, em cada reação foi adicionado um gota de óleo mineral. As amplificações foram realizadas em termociclador (PTC-100, MJ Research) programado nas seguintes condições: 5 min. a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 40 ciclos de 30 seg. a 94°C , 45 seg. a 36°C , 2 min. a 70°C , e uma elongação final de 10 min a 70°C (Randig *et al.*, 2002)

Os fragmentos amplificados de todos os marcadores foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5% (90 mM Tris-básico, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,3) a uma corrente constante de 100 mA por aproximadamente 3 horas e corado com brometo de etídio (0,025 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e visualizados sob luz UV.

Foram usados 30 primers de RAPD para este estudo. A escolha dos primers foi baseada em trabalhos de variabilidade genética anteriores com espécies de *Meloidogyne* (Mattos, 2010; Tigano *et al.*, 2010; Santos, 2012)

5.5. Técnica PCR-AFLP

O protocolo deste marcador seguiu o protocolo descrito por Suazo & Hall (1999). O DNA genômico extraído dos ovos foi clivado por uma enzima de restrição (*EcoRI*). Adaptadores específicos foram ligados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem. Os adaptadores *EcoRI* (upper e lower) foram aquecidos a 95°C durante 5 min no termociclador (PTC-100, MJ Research), e em seguida mantidos à temperatura ambiente durante cerca de 10 min.

A reação de ligação/digestão dos adaptadores ao DNA consistiu num volume final de 20 µl, contendo: 2µl de tampão 10X da T4 DNA Ligase 10X, 2 µl de NaCl 0,5M, 0,5 µl de BSA, 2µl dos adaptadores *EcoRI* (25 µM), 0,5µl de cada enzima *EcoRI* (12 U/µl), 1 µl T4 DNA ligase (1 U/µl), 2µl de água Milli-Q, 10µl de DNA (100 ng/µl). Essa reação foi incubada a 37°C “overnight”. A partir de cada reação retirou-se 5 µl para corrida em gel de agarose 1,5% a fim de se conferir a digestão.

Após a verificação da digestão de cada amostra, o restante da reação (15 µl) foi diluído a um volume de 150 µl para a realização das reações de PCR.

Do total de 150 µl, utilizou-se 1 µl do DNA digerido para cada reação. A reação de PCR com DNA digerido e ligado com adaptadores foi realizada em volume final de 25 µl, contendo: 1 µl de DNA total, 2,5 µl de tampão 10X, 1 µl de MgCl₂ [50 mM], 1 µl do primer [10 µM], 0,5 µl dNTP [10 mM], 0,3 µl da enzima Taq DNA polimerase (5 U/µl), 18,3 µl de água Milli-Q, cada reação foi coberta com óleo mineral para evitar evaporação. O termociclador (PTC-100, MJ Research) foi programado as seguintes condições: 1 min a 95 °C; 37 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 56 °C e 2 min e 30 seg a 72 °C; e um ciclo de extensão final de 5 min a 72 °C.

A subpopulação de fragmentos amplificados foi separada em gel de alta resolução 1,5 % agarose-synergel, sendo 0,7 % agarose e 0,4 % Synergel (Diversified Biotech Synergel™), a uma corrente constante de 100 mA por aproximadamente 3 horas. Para visualização, os géis foram corados com brometo de etídio (0,025 µg/ml) e visualizados sob luz UV.

Foram usados 7 primers AFLP para este estudo. A escolha dos primers foi baseada em trabalhos de variabilidade genética anteriormente realizados com populações de *Meloidogyne* spp. (Mattos, 2010; Tigano *et al.*, 2010).

5.6. Análises de polimorfismo

Os fragmentos revelados nos géis dos dois marcadores moleculares RAPD e AFLP foram registrados como presentes ou ausentes. Para cada isolado, duas reações de PCR independentes foram corridas no mesmo gel, apenas os fragmentos presentes em ambas repetições foram considerados. Os fragmentos de DNA foram então considerados presentes (1) ou ausentes (0) e convertidos em uma matriz binária. Foi realizada uma análise de distância (Neighbour-Joining) combinada de resultados de AFLP e RAPD com 1000 repetições de bootstrap para testar a significância do dendrograma obtido (Felsenstein, 1985). Utilizou-se método filogenético UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). A análise de UPGMA foi realizada utilizando o programa PAUP* v 4.0 (Swofford, 2002)

5.7. Avaliação das populações de *Meloidogyne* spp. quanto à reprodução em genótipos de soja em casa de vegetação

Foram utilizadas no experimento cinco cultivares de *Glycine max* pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Soja: BRS MT Pintado, PI 595099, BRS Valiosa RR, BRMG 811C RR e BRS MG 740S RR. As cultivares BRS MT Pintado e PI 595099 foram utilizadas

como padrão de suscetibilidade e de resistência, respectivamente. A escolha dessas duas cultivares como padrões para o experimento foi baseada em trabalhos de resistência de soja a *Meloidogyne* spp. anteriormente realizados (Dias *et al.*, 2010; Santos, 2011). As outras três cultivares possuem resistência moderada aos nematoides *M. javanica* e *M. incognita* e são recomendadas e indicadas para a região Central do Brasil de acordo com a publicação da Embrapa (2011).

O experimento foi realizado em delineamento de blocos inteiramente casualizados, em esquema fatorial 5 X 6. Foram estudadas as reações de 5 (cinco) cultivares de soja frente a 6 (seis) populações de *Meloidogyne* spp., em 8 (oito) repetições.

As seis populações usadas como inóculo (Tabela 1) foram multiplicadas previamente em tomateiros em condições de casa de vegetação. Os ovos dessas populações foram extraídos, após três meses da inoculação em tomateiros, 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 lâminas de Peters ao microscópio óptico.

As plantas de cada genótipo de soja foram cultivadas individualmente em vasos de 15 cm de diâmetro e 20 cm de altura preenchidos com 50 % de solo esterilizado e 50% do composto Bioplant®. Ao atingirem o estágio vegetativo V3 (segunda folha trifoliada completamente desenvolvida), cada planta foi inoculada com 5.000 ovos de cada população de nematoide, sendo que em cada vaso foram inoculadas populações individuais dos nematoides. As plantas foram avaliadas aos 60 dias após inoculação (DAI) e o número total de ovos/planta/repetição foi avaliado como descrito por Hussey & Barker (1973) com NaOCl a 1 %, utilizando-se o método de extração modificado por Boneti & Ferraz, 1981. O fator de reprodução (FR) de cada planta foi calculado, dividindo-se o número total de ovos/planta ou população final (PF) pelo número de ovos inoculados ou população inicial (PI = 5000). As médias do FR foram transformados em $\text{Log}_1(x+1)$ e após análise de variância as médias

foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As plantas foram classificadas de acordo com a proposta de Oostenbrink (1966), sendo consideradas plantas com $FR < 1$, resistentes e $FR \geq 1$ susceptíveis. Para valores intermediários foram consideradas as reações: AS = altamente suscetível, MR = moderadamente resistente ou PR = pouco resistente, segundo Sasser *et al.* (1987), modificado por Moura & Régis (1987), analisando-se a percentagem de inibição da reprodução em relação ao padrão suscetível (Tabela 2).

Tabela 2: Classificação qualitativa da resistência de hospedeiras, segundo o percentual de redução da reprodução de *Meloidogyne* spp. (Moura & Régis, 1987)

% de redução do fator de reprodução	Classificação da hospedeira
0 - 25	Altamente suscetível (AS)
26 - 50	Suscetível (S)
51 - 75	Pouco resistente (PR)
76 - 95	Moderadamente resistente (MR)
96 - 99	Resistente (R)
100	Altamente resistente (AR) ou Imune (I)

5.8. Extração de nematoides do solo

A quantificação de juvenis de segundo estágio presentes no solo foi realizada para amostras das testemunhas resistente (PI 595099) e suscetível (BRS MT Pintado), em 4 repetições de cada tratamento. Para a extração de nematoides do solo foi empregado o método descrito por Jenkins (1964), uma combinação do método de peneiramento e flutuação em centrífuga.

Alíquotas de 250 cm³ de solo das amostras foram homogeneizadas em recipiente plástico com capacidade para 5 litros de água, desfazendo-se os torrões. A mistura de água e solo do recipiente foi deixada descansar por 30 segundos. O sobrenadante foi vertido sobre peneira de 400 mesh e o resíduo retido transferido para um béquer, sendo posteriormente depositados em tubos de centrífuga de 100 ml devidamente tarados. As suspensões foram centrifugadas por 5 minutos a 360g. Após a centrifugação, o líquido sobrenadante foi descartado, as paredes do tubo limpas, para eliminação de material orgânico eventualmente retido próximo ao bordo. Solução de açúcar com densidade de 1,18 (475 gramas de sacarose por litro de solução) foi adicionada aos tubos, até atingirem um peso balanceado.

Sedimentos e solução de açúcar foram completamente homogeneizados e centrifugados por um minuto. O líquido sobrenadante que continha os nematoides foi colocado sobre peneira de 400 mesh e a solução de açúcar foi lavada sob água corrente. O material extraído foi conservado em geladeira a 4 °C e posteriormente contado.

Foi realizada uma análise estatística de correlação entre o número de ovos nas raízes e o número de J2 no solo.

6. RESULTADOS

6.1. Análise da variabilidade genética das populações de *Meloidogyne* spp

Ao todo foram testados 30 primers decâmeros em reações RAPD para as populações testadas, com um mínimo de 2 e um máximo de 14 fragmentos amplificados por isolado e um mínimo de 11 e um máximo de 33 fragmentos polimórficos (Tabela 3). Os primers RAPD testados geraram fragmentos entre 200 e 4000 pb (Figura 2A).

Os sete primers do marcador AFLP geraram de 4 a 12 fragmentos por isolado com tamanhos variando entre 200 a 2500 bp (Tabela 4 e Figura 2B).

O total de bandas amplificadas para os dois marcadores foi de 727 fragmentos, sendo 619 para RAPD e 108 para AFLP. Os dois marcadores produziram um total de 651 fragmentos polimórficos, sendo 474 interespecíficos e 177 intraespecíficos (Tabelas 3 e 4). O resultado global da análise conjunta dos dois marcadores foi apresentado na tabela 5.

Para as três espécies estudadas (*M. javanica*, *M. incognita* e *M. morocciensis*), 254 a 341 fragmentos foram reproduzidos. A porcentagem de fragmentos de DNA polimórficos para *M. javanica*, *M. incognita* e *M. morocciensis* foi de 26,7, 16,6 e 15,3%, respectivamente. O polimorfismo encontrado nas populações do cerrado (JAV1 a JAV11) em relação às coletadas em áreas de cultura (JAV 12 e JAV13) foi de 14,3%. Em um total de 91 fragmentos polimórficos para as populações de *M. javanica*, 32 foram diferenciais entre as populações do cerrado e as de área de cultivo, sendo 18 exclusivos para o isolado (JAV12) da soja.

Tabela 3: Primers utilizados em reações RAPD e número de fragmentos amplificados para dezessete populações de *Meloidogyne* spp.

Primer RAPD	Sequência do primer (5' - 3')	N° de fragmentos amplificados			
		Mínimo/isolado	Máximo/isolado	Polimórficos	total
A7	GAAACGGGTG	3	10	11	14
A10	GTGATCGCAG	5	8	21	23
A14	TCTGTGCTGG	2	6	12	13
AB02	GGAAACCCCT	5	14	27	27
AB03	TGGCGCACAC	8	11	19	22
AB04	GGCACGCGTT	4	11	23	25
AQ12	CAGCTCCTGT	4	7	14	16
AS08	GGCTGCCAGT	6	8	21	24
B05	TGCGCCCTTC	5	11	13	18
B11	GTAGACCCGT	6	8	17	19
C07	GTCCCGACGA	6	8	16	18
C09	CTCACCGTCC	6	11	14	17
D13	GGGGTGACGA	7	12	20	23
E07	AGATGCAGCC	4	8	17	18
E15	ACGCACAACC	5	11	33	35
E18	GGA CTGCAGA	4	8	18	20
F06	GGGAATTCGG	3	5	12	13
G05	CTGAGACGGA	6	10	31	32
G06	GTGCCTAACC	4	10	19	20
G13	CTCTCCGCCA	4	10	13	15
H01	GGTCGGAGAA	5	10	31	31
J20	AAGCGGCCTC	5	8	10	11
K07	AGCGAGCAAG	5	8	17	19
K19	CACAGGCGGA	3	11	20	22
M10	TCTGGCGCAC	6	10	20	21
M20	AGGTCTTGGG	8	10	23	25
N07	CAGCCCAGAG	6	10	24	25
N10	ACA ACTGGGG	6	8	24	25
P05	CCCCGGTAAC	6	9	11	14
R07	ACTGGCCTGA	4	10	12	14
Total				563	619

Tabela 4: Primers AFLP usados e número de fragmentos amplificados para dezessete populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de áreas de cerrado no Distrito Federal e de áreas agrícolas de soja nos Estados do Paraná e Rio Grande do Sul.

Primer AFLP	Sequência do primer (5' - 3')	N° de fragmentos amplificados		
		Mínimo/isolado	Máximo/isolado	Polimórficos total
AFLP01	GAC TGC GTA CCA ATT CAG T AGT	6	8	16
AFLP02	GAC TGC GTA CCA ATT CAG T ACT	4	10	13
AFLP04	GAC TGC GTA CCA ATT CAG T ATT	7	12	21
AFLP05	GAC TGC GTA CCA ATT CAG T GGC	5	8	9
AFLP06	GAC TGC GTA CCA ATT CAG T CAG	4	10	9
AFLP08	GAC TGC GTA CCA ATT CAG T CCT	6	8	6
AFLP10	GAC TGC GTA CCA ATT CAG T TCG	6	10	14
Total				88

Tabela 5: Proporção de fragmentos polimórficos de RAPD e AFLP observados a nível de espécie para dezessete populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de áreas de cerrado no Distrito Federal e de áreas agrícolas de soja nos Estados do Paraná e Rio Grande do Sul.

Espécies	Fragmentos de RAPD e AFLP	
	Amplificados	Polimórficos(%)
<i>Meloidogyne javanica</i>	341	91 (26,7%)
<i>M. javanica</i> (Isolados JAV1 a JAV11) + (Isolados JAV12 e JAV13)	224	32 (14,3%)
<i>M. incognita</i>	254	39 (15,3%)
<i>M. morocciensis</i>	282	47 (16,6%)
<i>M. javanica</i> + <i>M. incognita</i>	497	399 (80,3%)
<i>M. javanica</i> + <i>M. morocciensis</i>	524	425(81,1%)
<i>M. incognita</i> + <i>M. morocciensis</i>	470	404 (85,9%)

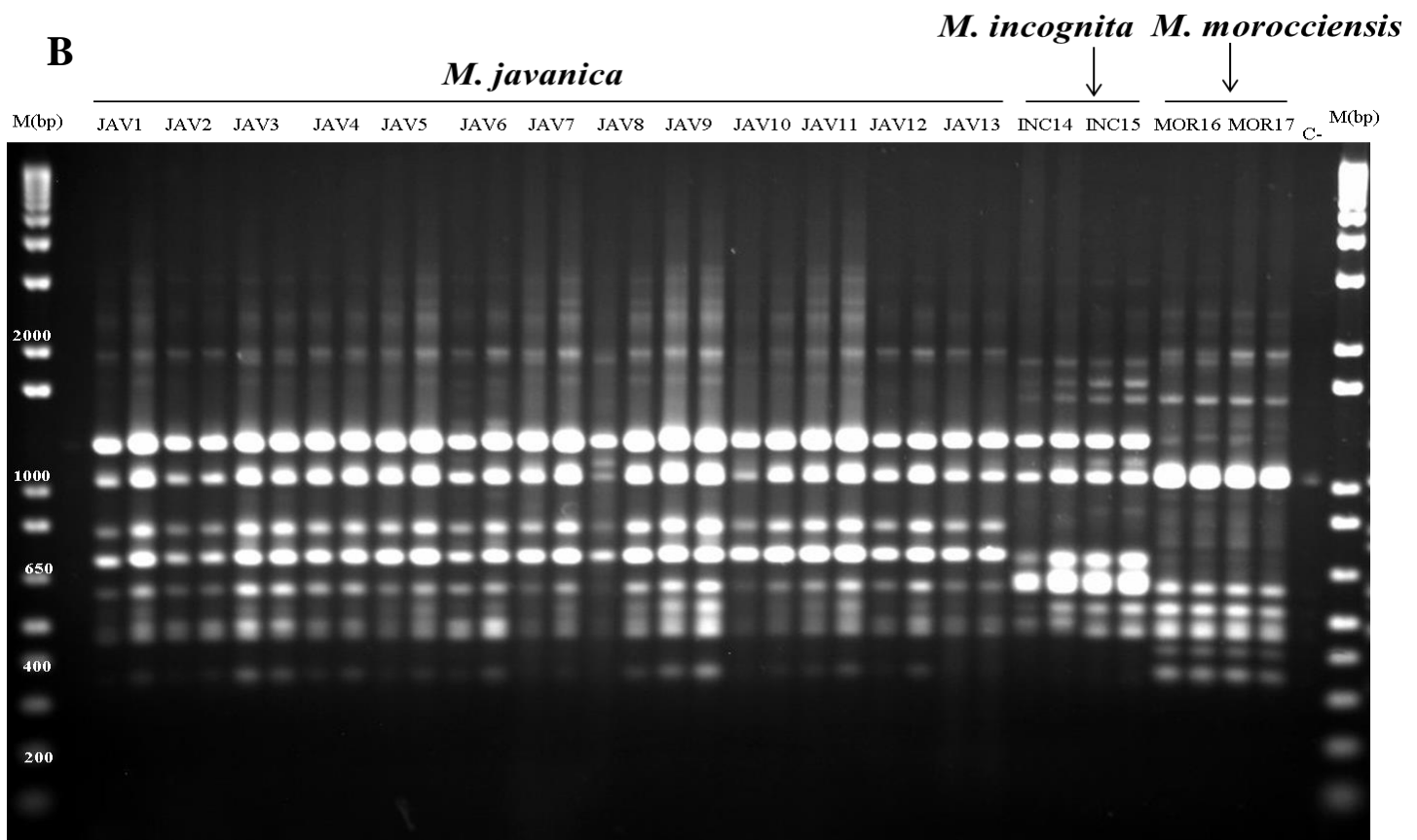
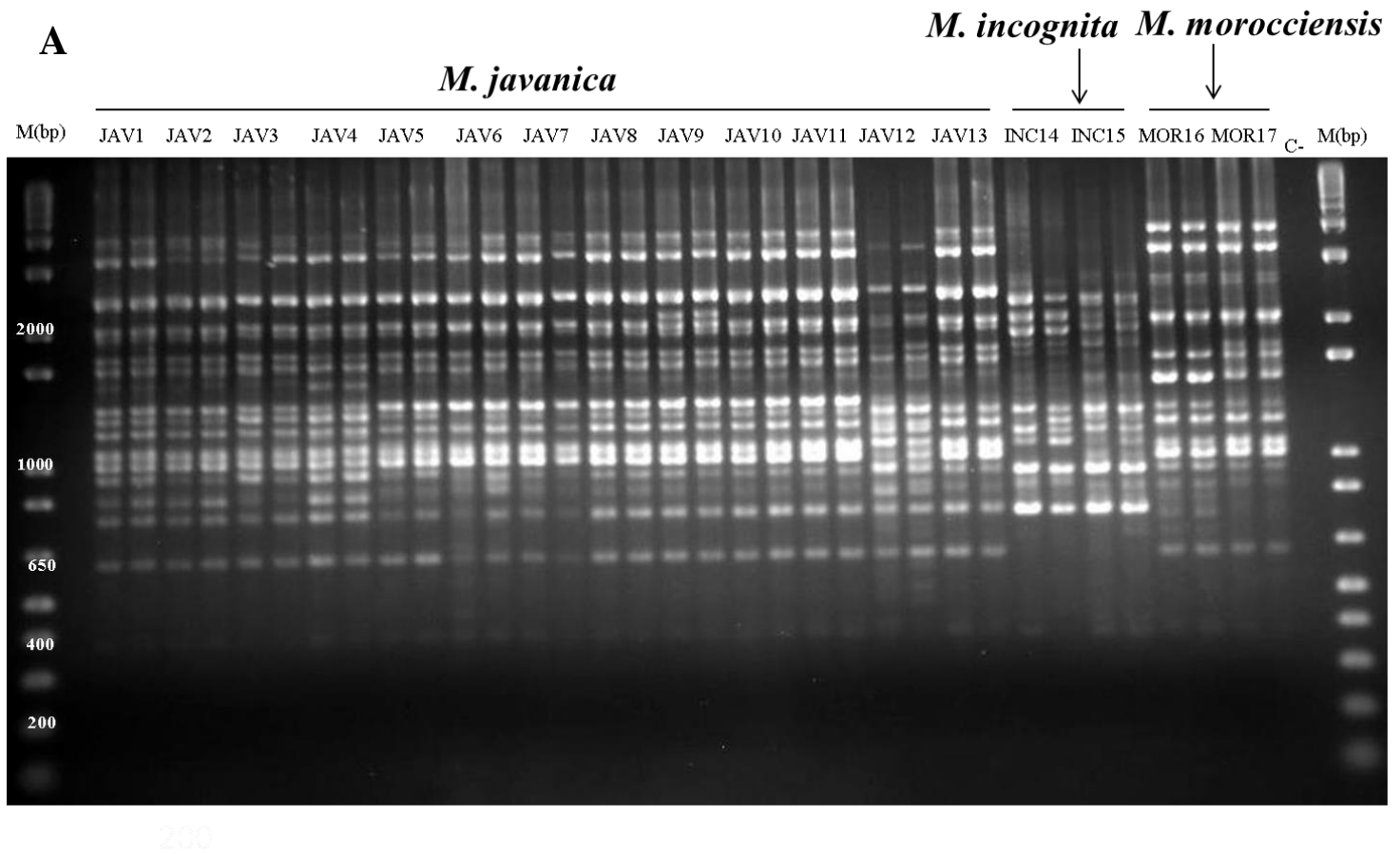
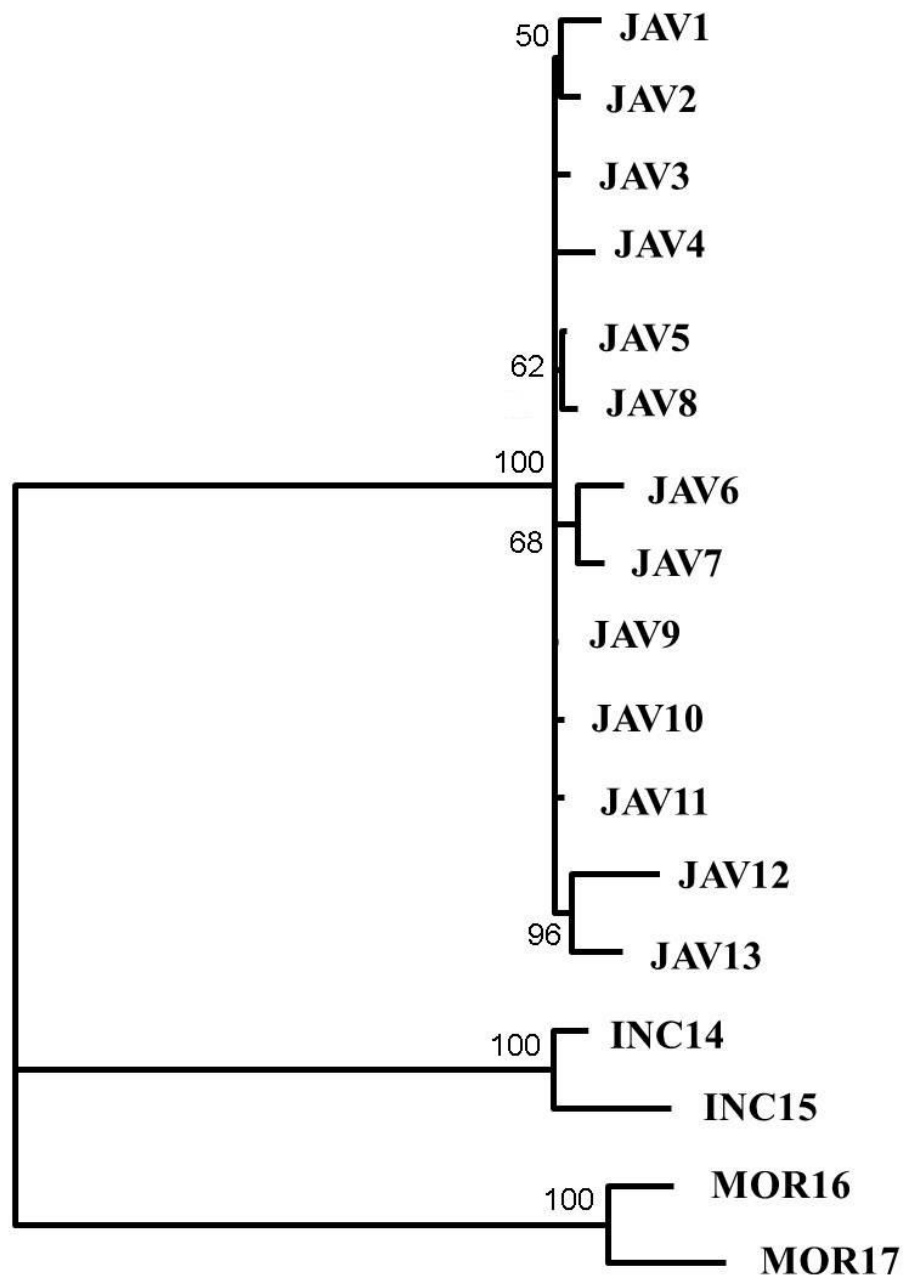


Figura 2: A – Polimorfismo de fragmentos de DNA de 17 populações de *Meloidogyne* spp. gerado pelo primer D13. B – Polimorfismo de fragmentos de DNA de 17 populações de *Meloidogyne* spp. gerado pelo primer AFLP05. Cada isolado foi analisado em duplicata e corrido lado a lado em géis. (C-: reação controle sem DNA; M: marcador de peso molecular 1kb.

No dendrograma (Figura 3) gerado a partir da análise conjunta dos dois marcadores, pode-se observar a formação de três grupos principais correspondentes às diferentes espécies. Em cada grupo, as populações de cada espécie se agruparam com 100% de bootstrap. Houve a separação dentro de cada grupo entre populações do cerrado e de áreas agrícolas. Dentre as populações de *M. javanica*, aquelas advindas de áreas agrícolas (JAV 12 e JAV 13) agruparam-se em um subgrupo com 96% de bootstrap. As populações JAV6 e JAV7 ambas coletadas na FAL e em uma mesma fitofisionomia (Cerrado *Sensu stricto*) agruparam em um subgrupo com 68% de bootstrap. As populações JAV1 e JAV2 agruparam-se com 50% de bootstrap, ambas também coletadas na mesma fitofisionomia e na mesma localidade no Parque Nacional de Brasília (PNB). As populações JAV5 e JAV8 agruparam-se com 62% de bootstrap, ambas foram coletadas em cerrado sujo na FAL, porém a população JAV9 também coletada na mesma região e fitofisionomia não se agrupou às essas outras duas populações.



0.05 changes

Figura 3: Dendrograma gerado a partir da análise conjunta dos marcadores RAPD e AFLP com 17 populações de *Meloidogyne* spp. Somente valores de bootstrap acima de 50% são mostrados. JAV: *M. javanica*, INC: *M. incognita*, MOR: *M. morocciensis*.

6.2. Avaliação das populações de *Meloidogyne* spp. quanto à reprodução em genótipos de soja em casa de vegetação

Os resultados da reação dos diferentes genótipos de soja às populações de *Meloidogyne* spp. estão apresentados nas tabelas 6, 7 e 8. A cultivar ‘Pintado’ (controle suscetível) apresentou-se suscetível para todas as populações, apresentando médias referentes ao FR entre 6,0 e 83,6. A cultivar PI 595099 (controle resistente) apresentou-se moderadamente resistente para todas as populações de *M. morocciensis* e *M. incognita* e resistente para as populações de *M. javanica*. A cultivar BRS MG 740S mostrou-se também moderadamente resistente às populações testadas com exceção da população de *M. morocciensis* proveniente da soja (MOR17), cujo FR foi 37,4. Essa população coletada em área de cultivo de soja em Santa Rosa (RS) apresentou o maior fator de reprodução do ensaio (FR=83,6) para a cultivar ‘Pintado’, sendo muito mais agressiva quando comparada à população MOR 16 do cerrado (FR=10,1). Para a cultivar PI 595099 (padrão de resistência a *M. javanica* e *M. incognita*) (FR=19,3) e demais cultivares (Tabela 6) a maior agressividade da população de *M. morocciensis* da soja em comparação com a do cerrado também foi confirmada.

Para a cultivar BRS Valiosa, houve diferenças de reação de resistência para as espécies *M. javanica* e *M. incognita*. Para a reação com as duas populações de *M. incognita*, a cultivar foi classificada como pouco resistente (PR), enquanto que para as populações de *M. javanica*, a reação foi dada como moderadamente resistente (MR), obtendo-se valores de FR menores. Para a cultivar BRS Valiosa, não houve diferença estatística ou de classificação entre as populações de cerrado e soja para ambas espécies (tabelas 7 e 8)

Para *M. incognita*, a diferença na agressividade entre as populações do cerrado e de área agrícola foi pouco acentuada, sendo a população do cerrado um pouco mais agressiva que a

da soja, e a cultivar BRS MG 811 classificada como pouco resistente para a população do cerrado e moderadamente resistente para a da soja.

6.3. Avaliação das populações de *Meloidogyne* spp. no solo nos genótipos de soja (padrões de resistência e susceptibilidade) em casa de vegetação

Pode-se observar que não houve variação nos valores médios dos FR quando a quantificação dos J2 do solo (Tabela 9) foi somada ao número total de ovos das raízes (Tabelas 6, 7 e 8). Esses resultados mostram que para o cálculo do FR, o número de J2 do solo é não significativo. Além do mais, a análise de correlação entre número total de J2 no solo e número total de ovos nas raízes foi baixa ou seja: $r \leq 0,5$ (significativa a 5%), mostrando que esses dois valores estão pouco correlacionados, ou seja, o uso do número de J2 no solo no cálculo do FR foi desprezível, nas condições do presente ensaio.

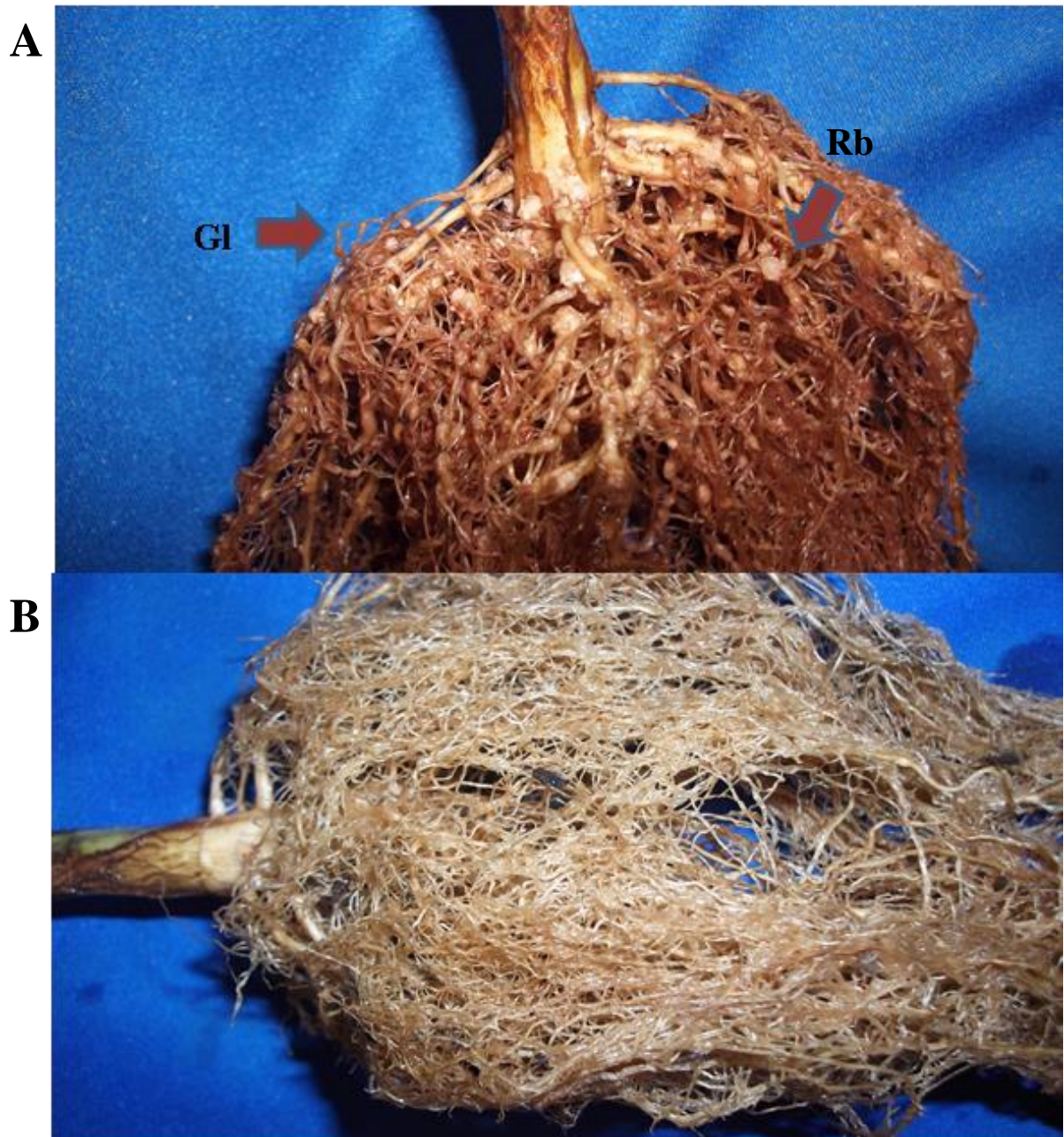


Figura 4: : Raízes de cultivares de soja 60 dias após inoculação com 5000 ovos de *Meloidogyne* spp. A- Cultivar Pintado (padrão de suscetibilidade) inoculada com *M. morocciensis* (MOR17); B- Cultivar PI595099 (padrão de resistência) inoculada com *M. javanica* (JAV1). G1: galhas, Rb: nódulos de *Rhizobium* spp.

Tabela 6: Reação de cinco cultivares de soja a duas populações de *Meloidogyne morocciensis* (MOR16 e MOR17) 60 dias após inoculação com 5000 ovos/planta em casa de vegetação.

Cultivares	<i>M. morocciensis</i> soja (MOR17)						<i>M. morocciensis</i> Cerrado (MOR16)					
	Peso fresco das raízes (g) ¹	N° total de ovos/g de raiz ¹	Total de ovos ¹	Fator de reprodução (FR) ^{1,2}	% de redução ⁺	Reação final ³	Peso fresco das raízes (g) ¹	N° total de ovos/g de raiz ¹	Total de ovos ¹	Fator de reprodução (FR) ^{1,2}	% de redução ⁺	Reação final ³
BRS MT												
Pintado*	92,2	4626,4	417833,3	83,6Aa	0	AS	97,2	554,0	50500,0	10,1Ba	0	AS
BR MG 811c	65,8	3728,1	238208,3	47,6Ab	43	S	79,9	580,1	41250,0	8,3Bb	17	AS
BRSMG 740S	67,5	3154,8	187000,0	37,4Ac	55	PR	84,0	119,3	8583,3	1,7Bd	83	MR
BRS Valiosa	66,1	2325,4	150875,0	30,2Ac	63	PR	79,3	132,1	10250,0	2,1Bc	79	MR
PI 595099**	45,3	2344,7	98571,4	19,3Ad	76	MR	61,5	218,9	10190,5	2,1Bc	79	MR

¹ Os dados são médias de oito repetições.

² Para análise a variável FR foi transformada em $\log(X+1)$, valores seguidos de mesma letra maiúscula, nas linhas, e minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo método de Tukey a 5%. CV = 10,31% e Fcal.=7,79

³ AS=altamente suscetível; S=suscetível; PR=pouco resistente; MR=moderadamente resistente; R=resistente (Oostenbrink 1966; Sasser *et al.* 1987 modificado por Moura & Régis 1987)

* Padrão de suscetibilidade (PS)

** Padrão de resistência (PR)

⁺ Redução em relação ao padrão de suscetibilidade (PS)

Tabela 7: Reação de cinco cultivares de soja a duas populações de *Meloidogyne javanica* (JAV1 e JAV12) 60 dias após inoculação com 5000 ovos/planta em casa de vegetação

Cultivares	<i>M. javanica</i> Soja (JAV12)						<i>M. javanica</i> Cerrado (JAV1)					
	Peso fresco das raízes (g) ¹	Nº total de ovos/g de raiz ¹	Total de ovos ¹	Fator de reprodução (FR) ^{1,2}	% de redução ⁺	Reação final ³	Peso fresco das raízes (g) ¹	Nº total de ovos/g de raiz ¹	Total de ovos ¹	Fator de reprodução (FR) ^{1,2}	% de redução ⁺	Reação final ³
BRS MT												
Pintado*	67,7	768,6	48333,3	9,7Aa	0	AS	54,6	590,4	29833,3	6,0Ba	0	AS
BR MG 811c	53,1	290,0	15166,7	3,0Ab	69	PR	54,1	190,2	9500,0	1,9Bb	68	PR
BRS Valiosa	51,7	116,9	6000,0	1,2Ac	87	MR	43,8	142,1	6083,3	1,2Ac	80	MR
PI 595099**	59,8	108,1	4666,7	0,9Ac	90	R	54,3	81,6	3857,1	0,8Ac	86	R
BRSMG 740S	68,6	59,5	3916,7	0,8Ac	91	R	61,6	89,7	5000,0	1,0Ac	83	MR

¹ Os dados são médias de oito repetições.

² Para análise a variável FR foi transformada em $\log(X+1)$, valores seguidos de mesma letra maiúscula, nas linhas, e minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo método de Tukey a 5%. CV = 21,15% e Fcal.=3,87

³ AS=altamente suscetível; S=suscetível; PR=pouco resistente; MR=moderadamente resistente; R= resistente (Oostenbrink 1966; Sasser *et al.* 1987 modificado por Moura & Régis 1987)

* Padrão de suscetibilidade (PS)

** Padrão de resistência (PR)

⁺ Redução em relação ao padrão de suscetibilidade (PS)

Tabela 8: Reação de cinco cultivares de soja a duas populações de *Meloidogyne incognita* (INC14 e INC15) 60 dias pós inoculação com 5000 ovos/planta em casa de vegetação

Cultivares	<i>M. incognita</i> Soja (INC15)						<i>M. incognita</i> Cerrado (INC14)					
	Peso fresco das raízes (g) ¹	Nº total de ovos/g de raiz ¹	Total de ovos ¹	Fator de reprodução (FR) ^{1,2}	% de redução ⁺	Reação final ³	Peso fresco das raízes (g)	Nº total de ovos/g de raiz	Total de ovos	Fator de reprodução (FR) ^{1,2}	% de redução ⁺	Reação final ³
BRS MT												
Pintado*	82,6	438,2	35583,3	7,1Aa	0	AS	78,1	398,7	30750,0	6,2Aa	0	AS
BRS Valiosa	61,6	224,3	13250,0	2,7Ab	61	PR	68,3	192,0	12750,0	2,6Ab	58	PR
PI 595099**	48,1	142,2	6190,5	1,2Acd	83	MR	42,9	126,6	5142,9	1,0Ac	83	MR
BR MG 811c	68,5	71,5	4666,7	0,9Ac	87	R	66,7	181,7	11916,7	2,4Bb	61	PR
RS MG 740S	78,8	37,5	3000,0	0,6Ad	91	R	70,6	77,4	5500,0	1,1Bc	82	MR

¹ Os dados são médias de oito repetições.

² Para análise a variável FR foi transformada em $\log(X+1)$, valores seguidos de mesma letra maiúscula, nas linhas, e minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo método de Tukey a 5%. CV = 16,88% e Fcal.=9,82

³ AS=altamente; S=suscetível; PR=pouco resistente; MR=moderadamente resistente; R= resistente (Oostenbrink 1966; Sasser *et al.* 1987 modificado por Moura & Régis 1987)

* Padrão de suscetibilidade (PS)

** Padrão de resistência (PR)

⁺ Redução em relação ao padrão de suscetibilidade (PS)

Tabela 9: Quantificação de juvenis de segundo estágio em solo inoculado com três populações de *Meloidogyne* spp. em duas cultivares de soja (BRS MT Pintado e PI 595099).

Cultivares	Total ovos ^{1,3}	J2/250cm ³ de solo ^{1,2}	total de J2 no solo ¹	População final ^{1,3}	FR ¹	Reação Final ⁴	Total de					
							Total ovos ^{1,3}	J2/250cm ³ de solo ¹	J2 no solo ^{1,2}	População final ^{1,3}	FR ¹	Reação Final ⁴
<i>M. morocciensis</i>												
MOR 17 (soja)						MOR 16 (Cerrado)						
BRS MT Pintado	401333,3Aa	83,3	833,3	402166,7Aa	80,4	AS	50500,0Ba	33,3	333,3	50833,3Ba	10,2	AS
PI 595099	98571,4Ab	41,7	416,7	98988,1Ab	19,8	MR	8583,3Bb	16,7	167,0	8750,3Bb	1,8	MR
<i>M. incognita</i>												
INC 15 (soja)						INC 14 (Cerrado)						
BRS MT Pintado	35583,3Aa	25,0	250,0	35833,3Aa	7,2	AS	30750,0Ba	16,6	166,0	30916,0Ba	6,2	AS
PI 595099	6190,5Ab	0,0	0,0	6190,5Ab	1,2	MR	5142,9Bb	0,0	0,0	5142,9Bb	1,0	MR
<i>M. javanica</i>												
JAV 12 (soja)						JAV 1 (Cerrado)						
BRS MT Pintado	48333,3Aa	33,3	333,3	48666,6Aa	9,7	AS	29833,3Ba	33,3	333,3	30166,6Ba	6,0	AS
PI 595099	4666,7Ab	8,3	83,3	4750,0Ab	0,9	R	3857,1Bb	0,0	0,0	3857,1Bb	0,8	R

¹ Os dados são médias de quatro repetições. ² O valor total de J2 no solo corresponde ao volume do vaso de plantio (2500 cm³)

³ Os valores seguidos de mesma letra maiúscula, nas linhas, e minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo método de Tukey a 5%. As análises foram feitas para cada uma das espécies em separado. CV%: 57,03 e Fcal= 19,21. ⁴AS=altamente suscetível; S=suscetível; PR=pouco resistente; MR=moderadamente resistente; R= resistente (Oostenbrink, 1966; Sasser *et al.*, 1987), modificado por Moura & Régis (1987).

7. DISCUSSÃO

Ambos os marcadores, RAPD e AFLP, foram capazes de detectar variabilidade genética intraespecífica e interespecífica nas populações de *Meloidogyne* estudadas. Variabilidade genética intra e interespecífica em *Meloidogyne* spp. já havia sido relatada em estudos anteriores com a utilização da técnica RAPD (Blok *et al.*, 1997; Randig *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2004; Cofcewicz *et al.*, 2004, 2005) e AFLP (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Semblat *et al.*, 1999; Tigano *et al.*, 2010).

A percentagem de fragmentos de DNA polimórficos encontrados para *M. incognita* e *M. javanica*, 16,6 e 26,7 % respectivamente, está, em parte, de acordo com a literatura. A baixa variabilidade genética intraespecífica encontrada para *M. javanica* e *M. incognita* já havia sido relatada em outros trabalhos (Castagnone-Sereno *et al.* 1994; Block *et al.* 1997; Santos *et al.*, 2012). Porém, em estudo realizado por Carneiro *et al.* (1998), onde foram comparadas quatro populações de *M. javanica* provenientes do Brasil, sendo duas altamente agressivas em condições de campo à cultura da soja, os autores constataram significativa variabilidade intraespecífica, observada em caracteres morfológicos (vista de face dos machos e estiletos das fêmeas) e moleculares (marcadores RAPD), sobretudo para as duas populações da soja, o que discorda, em parte, do que foi observado no presente trabalho: baixa variabilidade.

Cofcewickz *et al.* (2004) ao estudarem a diversidade genética de nematoides parasitando *Musa* sp. no Brasil detectou baixa variabilidade intraespecífica em cinco isolados de *M. incognita* e sete isolados de *M. javanica* de 20,1 e 29,1%, respectivamente, através de estudo feito com marcador RAPD. Cofcewicz *et al.* (2005) também relataram variabilidade intraespecífica em populações de *Meloidogyne* spp. parasitas de bananeiras, sendo que o polimorfismo encontrado para as populações de *M. incognita* foi de 14,9%.

Randig *et al.* (2002) testaram 27 primers RAPD e obtiveram como resultado 30% de polimorfismo para quatro populações de *M. incognita* patogênicas ao cafeeiro. Neste mesmo estudo, duas populações de *M. javanica* apresentaram 19,5% de polimorfismo. Uma maior homogeneidade genética foi relatada por Cenis (1993) e Castagnone-Sereno (1994) para populações de *M. javanica*. No entanto, esses autores sugerem que o número reduzido de isolados utilizados no estudo pode ter contribuído para a baixa variabilidade genética encontrada.

Carneiro *et al.* (2004), ao estudarem a variabilidade genética de *Meloidogyne* spp. em cafeeiros no Brasil, América Central e Hawaii pela técnica RAPD, obteve 11% de variabilidade intraespecífica em duas populações de *M. incognita*, uma delas pertencente à raça 3 e apresentando perfil isoenzimático EST II e a outra, raça 1 com perfil EST I2.

A baixa variabilidade genética encontrada em populações de *M. incognita* e *M. javanica* pode ser, em parte, relacionada ao modo de reprodução partenogenético mitótico dessas espécies e que teoricamente gera descendentes clonais (Triantaphyllou, 1985).

Meloidogyne morocciensis foi descrito no Marrocos, parasitando pessegueiro (*Prunus pérsica* (L) Batsch cv. Missouri). Inicialmente teria sido identificado como *M. arenaria* (Neal) Chitwood, com base nos padrões perineais. Segundo Tigano *et al.* (2005) isolados de *M. arenaria* e *M. morocciensis* produziram ampliações de fragmentos 18s rDNA do mesmo tamanho (1112 pb). Estudo apresentado por Carneiro *et al.* (2008) demonstrou que os fenótipos Est A3 de *M. arenaria* provenientes da França e do Brasil se agruparam com alto bootstrap a *M. morocciensis* e completamente separados de *M. arenaria*. Estudos morfológicos comprovaram que essas populações apresentavam características morfológicas e citogenéticas de *M. morocciensis*. Trabalhos anteriores demonstraram alta variabilidade genética em *M. arenaria* (Semblat *et al.*, 1999; Carneiro *et al.*, 2004; Cofcewicz *et al.*, 2004, 2005 e Carneiro

et al. 2008). Em Cofcewickz *et al.* (2004) e Carneiro *et al.* (2008) há separação de isolados de *M. arenaria* com fenótipo EST A3 nos dendogramas apresentados.

A presença de nematoides do gênero *Meloidogyne* spp. em áreas de cerrado nativo sob preservação permanente já havia sido relatada anteriormente (Cares & Huang, 1991; Souza *et al.*, 1994; Huang & Cares, 1995; Huang & Cares, 1996; Rodrigues, 2011; Silva, 2012). No trabalho de Lehmann *et al.* (1977) houve relato da ocorrência de infecções severas de *Meloidogyne* spp. em Minas Gerais, em áreas plantadas com soja pela primeira vez, e que nunca haviam sido antes cultivadas com qualquer outra cultura. Os autores observaram em plantas daninhas das áreas adjacentes a presença de galhas em muitas espécies, incluindo gramíneas, dando a entender que espécies indígenas poderiam servir como fonte de inóculo primário, quando a soja é cultivada em áreas virgens.

A variação fisiológica entre as espécies ou população de nematoide das galhas pode ser expressa na interação planta-nematoide em três níveis: hospedabilidade ou não, agressividade e virulência. Agressividade reflecte a capacidade de reprodução, tal como medida pelo FR, de nematoides em um hospedeiro susceptível, enquanto que a virulência é a capacidade de se reproduzir em uma planta com genes de resistência (Hussey e Janssen, 2002).

A população de *M. morocciensis* (MOR 17) foi a única população realmente mais agressiva do ensaio. Sua agressividade já havia sido relatada em trabalho anterior (Santos, 2011). Esses resultados mostraram que sua inclusão em futuros estudos em busca de novas fontes de resistência para a espécie é importante, embora, sua ocorrência seja ainda restrita na cultura da soja (Castro *et al.*, 2003).

As cultivares de soja testadas, neste trabalho, revelaram resultados compatíveis com os dados anteriormente relatados em literatura. A cultivar BRSMT Pintado é resistente ao nematoide de cisto da soja raças 1 e 3 e susceptível a *M. javanica*, *M. incognita* (Embrapa,

2011) e a *M. morocciensis* (Santos, 2011). Essa mesma cultivar mostrou-se suscetível às seis populações testadas.

O genótipo PI 59509, tido como resistente a *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* (Embrapa, 2011), mostrou-se medianamente resistente e resistente para as populações testadas.

A cultivar de soja BRS Valiosa RR, tida como resistente ao nematoide de galhas *M. javanica* e moderadamente resistente a *M. incognita* (Embrapa, 2010), apresentou-se moderadamente resistente (MR) para as populações de *M. javanica* e pouco resistente (PR) para as populações de *M. incognita*.

A cultivar BRSMG 811RR, tida como resistente a *M. incognita* e com moderada resistência a *M. javanica* (Embrapa, 2010), apresentou-se como pouco resistente a *M. javanica* e resistente a uma das populações de *M. incognita* da soja e pouco resistente à população do cerrado, sendo suscetível a *M. morocciensis*.

A cultivar BRSMG 740S RR, resistente a *M. incognita* e com moderada resistência a *M. javanica* (Embrapa, 2010), apresentou-se moderadamente resistente ou resistente às populações de *M. javanica* e *M. incognita* e também à *M. morocciensis* do cerrado, sendo pouco resistente à *M. morocciensis* da soja.

A resistência da soja para as espécies *M. javanica* e *M. incognita* apresenta elevada herdabilidade e poucos genes envolvidos no mecanismo, indicando ser uma resistência oligogênica (Luzzi *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 2001). Marcadores de várias naturezas, associados a genes de resistência a nematoides do gênero *Meloidogyne*, em soja, foram descritos na literatura: *M. javanica* (Tamulonis *et al.*, 1997), *M. incognita* (Li *et al.*, 2001), *M. arenaria* (Tamulonis *et al.*, 1997b).

Wendland *et al.* (2004) e Morales *et al.* (2009) identificaram, por meio da técnica de microarranjos de DNA, ao estudarem a cultivar PI595099, genes que são diferencialmente

expressos em genótipos de soja inoculados e não inoculados com *M. javanica*. Entre estes genes estão o *chs*, que codifica uma enzima chave na biossíntese dos fenilpropanóides (fitoalexinas); o *xet*, que codifica a enzima xiloglucana endotransglicosilase, catalisadora da quebra intramolecular de polímeros de xiloglucanas; o *hs1pro-1*, responsável pela resistência da beterraba-açucareira (*Beta vulgaris* L. 1753) ao nematoide *Heterodera schachtii* Thorne, 1961, e o gene *sth-2*, que codifica a enzima sulfotransferase hidroxisteroide *preferring 2*, envolvida na reação de hipersensibilidade em plantas. Segundo os autores, tais genes tiveram suas expressões induzidas somente em plantas de soja resistentes e inoculadas com o nematoide.

Os genes *chs*, *xet*, *sth-2* e *hs1pro-1* estão associados a processos de resposta da planta à infecção pelo nematoide como, por exemplo, a síntese de fitoalexinas, o espessamento de parede celular, patogenicidade e resistência a patógenos. Jammes *et al.* (2005) verificaram, também por meio da técnica de microarranjos de DNA, que esses genes de resposta da planta à infecção também são diferencialmente expressos em raízes de *Arabidopsis* inoculadas com *M. incognita*.

Liu *et al.* (2012) ao estudarem o gene Rhg4, identificado como responsável pela resistência a *H. glycines* em soja, relataram que esse gene codifica a serina hidroximetiltransferase, uma enzima que é ubíqua em natureza e estruturalmente conservada entre reinos. A enzima é responsável pela interconversão de serina e glicina, e é essencial para o teor de carbono celular. Os autores concluíram que mutações em alelos desse gene estavam associados à quebra de resistência.

A variabilidade fisiológica entre populações e quebra de resistência em campo de *Meloidogyne* spp. são relatadas em vários trabalhos na literatura. Populações de nematoides das galhas não expostas anteriormente a cultivares resistentes foram virulentas a plantas de tomates portadoras do gene Mi (Netscher, 1977; Roberts & Thomason, 1989; Roberts *et al.*,

1990; Castagnone-Sereno *et al.*,1993b). Carpenter & Lewis (1991) relataram também variabilidade na reprodução de 4 populações de *M. arenaria* em genótipos de soja.

Considerando que *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* são espécies partenogenéticas mitóticas obrigatórias, mecanismos além da recombinação gênica devem ser responsáveis pela crescente virulência. Triantaphyllou (1987), propôs que a ação de uma alta frequência de mutação em genes menores afetaria a virulência em *Meloidogyne*.

Em eucariontes, proteínas de repetição (ou seja, proteínas que contém um arranjo em tandem de elementos estruturais repetidos) são muitas vezes considerados como uma fonte extra de variabilidade, e ganhos e perdas de repetições podem ser uma importante força motriz da evolução e diversificação dessas proteínas, que pode permitir uma rápida adaptação a novos ambientes. Semblat *et al.* (2001) e Castagnone-Sereno *et al.* (2009) estudaram sequencias genômicas da família de proteínas MAP-1 a partir do fitonematoide *Meloidogyne incognita*. As proteínas codificadas exibiram alta repetição de 13 e 58 aminoácidos (aa) conservados, e variação no número e disposição dessas repetições no MAP-1 foram correlacionadas à virulência do nematoide, sugerindo um possível papel dessas proteínas na especificidade da interação planta-nematoide. Pesquisas anteriores confirmaram a presença de uma pequena família de genes abrigando proteínas em repetição de 58 e 13aa no genoma de *M. incognita*, e que a região repetitiva dessas proteínas é modular. Tanto a duplicação de genes como a perda e ganho intragênico têm contribuído para a complexa história evolutiva da família do gene MAP-1 e sua relação na interação planta-patógeno. Diferenças genômicas caracterizadas entre indivíduos avirulentos e virulentos, apresentadas por Castagnone-Sereno *et al.* (2009) em seu estudo, refletiram, em nível de DNA, a capacidade de adaptação desses nematoides cuja reprodução é partenogenética mitótica obrigatória.

A resistência genética é um conceito relativo, derivado por meio de comparações entre genótipos, e freqüentemente inclui uma indicação dos níveis de resistência baseada na

interação planta-patógeno. No caso do nematoide das galhas, os genótipos de plantas são comparados e avaliados com base no número de galhas, de massas de ovos ou no número total de ovos segundo protocolos para screening e avaliação da resistência de genótipos a espécies de *Meloidogyne* apresentados por Hussey & Janssen (2002) ou o Fator de Reprodução (FR) (Oostenbrink 1966; Shepherd, 1979.). A contagem de juvenis de segundo estágio no solo não é incluída como parâmetro de avaliação nos protocolos acima citados e em inúmeros trabalhos publicados na literatura nacional e internacional. No presente trabalho pôde-se observar que a quantidade de J2 no solo foi baixa em relação ao número de ovos nas raízes, o valor de J2 no solo não foi suficiente para alterar significativamente os valores dos FR e a classificação das cultivares nas repetições analisadas,. Herman *et al.* (1991) em estudo sobre a reação de cultivares resistentes e suscetíveis de soja a *Meloidogyne incognita*, observaram que a densidade de J2 no solo até 65 dias após o plantio foi de 19 a 23 J2 por 100 cm³ de solo e os valores não diferiram estatisticamente entre as cultivares resistentes e suscetíveis. O número de J2 no solo passou a ser significativo a partir de 90 dias após o plantio, quando a soja entrou em senescência. No trabalho de Carpenter & Lewis (1991) sobre a relação entre cultivares de soja e o nematoide *M. arenaria*, a quantidade de J2 no solo também foi considerada baixa nos primeiros dias após a inoculação até a primeira avaliação no estágio vegetativo V6 (entre 37 e 153 J2 em 250 cm³ de solo), o número de juvenis foi considerado um pouco maior a partir de R3 (entre 314 e 981/250 cm³ de solo).

Em nosso estudo a correlação entre os valores de J2 no solo e ovos nas raízes foi baixa, Lordello *et al.* (2001) realizaram estudo quantitativo de levantamento de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiros no Estado de São Paulo, nesse trabalho houve grande variação entre o número de J2 no solo e nas raízes, aparentemente não havendo correlação entre os valores.

Teixeira (2007) ao estudarem reação de genótipos de *Musa* spp. a populações de espécies de *Meloidogyne*, ao avaliarem as plantas entre 120 e 180 dias após a inoculação encontraram valores significativos de J2 no solo. Esses valores contribuíram para a classificação e análise da resistência nesses estudos.

A variação em resultados encontrados entre os trabalhos em relação ao número de J2 no solo e a sua contribuição para o estudo da resistência possivelmente pode ser explicada pelas diferenças no tempo de permanência da cultura, da planta hospedeira em questão, ciclo da cultura, espécie de *Meloidogyne* e sintomatologia do sistema radicular.

8. CONCLUSÕES

- ✓ Os marcadores RAPD e AFLP foram eficientes no estudo de variabilidade genética para as populações de *Meloidogyne* spp.
- ✓ A variabilidade genética encontrada para as populações de *M. javanica*, *M. incognita* e *M. morocciensis* foram consideradas baixas.
- ✓ Foi detectada baixa variabilidade genética entre populações coletadas em áreas preservadas de cerrado e populações coletadas em áreas de cultivo.
- ✓ Houve resposta diferencial das cultivares de soja às três espécies de *Meloidogyne* testadas (*M. javanica*, *M. incognita* e *M. morocciensis*)
- ✓ A população de *M. morocciensis*, proveniente de Santa Rosa (RS) e coletada em área de plantio de soja, mostrou-se muito agressiva às cultivares de soja testadas.
- ✓ A hospedabilidade das cultivares de soja testadas às populações de *Meloidogyne* spp. do cerrado, indica a possibilidade de dano em soja dentro de alguns ciclos de cultivo, após a remoção de área nativa.

- ✓ A inclusão do número total de J2 no solo ao número total de ovos nas raízes no cálculo do fator de reprodução não modificou os FR finais e as reações das cultivares suscetíveis e resistentes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A.; GODOY, C.V.; COSTAMILAN, L.M. & MEYER, M.C. 2005. Doenças da soja (*Glycine max*). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamim Filho, A. & Camargo, L.E.A. (Eds.) Manual de Fitopatologia. Vol. 2. Doenças das plantas cultivadas. 4ª ed. Ceres. Piracicaba-SP. pp. 569-588
- ANDERSON, L.O.; ROJAS, E.H.M. & SHIMABUKURO, Y.E. 2003. Avanço da soja sobre os ecossistemas cerrado e floresta no estado do Mato Grosso. Anais XI SBSR, Belo Horizonte, Brasil, 05-10 abril 2003, INPE, p. 19-25.
- ANTES, V. A.; COMERLATO, A. P.; SCHUELTER, A. R.; CARNEIRO, R.M.D.G. & FURLANETTO, C. 2012. Native-plant hosts of *Meloidogyne* spp. from Western Paraná, Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology 55:2: 213-219.
- AZEVEDO, L. G. De. & ADÂMOLI, J. 1988. Avaliação agroecológica dos recursos naturais da região dos cerrados. In: Simpósio sobre o Cerrado savanas: alimento e energia 6, Brasília, DF. 1982. CPAC/ EMBRAPA.
- BLOK, V.C.; PHILLIPS, M.S.; MCNICOL, J.W. & FARGETTE, M. 1997. Genetic variation in tropical *Meloidogyne* spp. as shown by RAPDs. Fundamental and Applied Nematology 20:127-133.
- BONATO, E.R. & BONATO, A.L.V. 1987. A soja no Brasil: história e estatística. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 21). Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 61p.
- BONETI, J.I.S. & FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, v. 6, p. 553.
- BORÉM, A. 2005. Melhoramento de espécies cultivadas. 2ª ed. UFV. Viçosa-MG.
- CANTO-SAENZ, M. 1983. The nature of resistance to *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. In: Third research & planning conference on root-knot nematodes,

- Meloidogyne* spp. Carter, C.C. (Ed). International *Meloidogyne* Project. Lima, Peru. p. 233.
- CARDOSO, M.O. 2010. Relações entre a nematofauna e o grau de compactação do solo em área cultivada com cana-de-açúcar e um remanescente de floresta Atlântica. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.
- CARES, J.E. 1984. Fauna fitonematológica de várzea e terra firme nas proximidades de Manaus, AM. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília DF.
- CARES, J.E. & HUANG, S.P. 1991. Nematode fauna in natural and cultivated cerrados of Central Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 16:199-209.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. & CARNEIRO, R.G. 1996a. Enzyme phenotypes of Brazilian isolates of *Meloidogyne* spp. *Fundamental and Applied Nematology* 19:555-560.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; CARNEIRO, R.G.; ABRANTES, M.O.; SANTOS, M.S.N.A. & ALMEIDA, M.R. 1996b. *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. *Journal of Nematology* 28:177-189.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; CASTAGNONE-SERENO, P. & DICKSON, D. 1998. Variability among four populations of *Meloidogyne javanica* from Brazil. *Fundamental and Applied Nematology* 21:319- 326.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. & QUÉNÉHERVÉ, P. 2000. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology* 2:645-654.
- CARNEIRO, R. M. D. & ALMEIDA, M. R. A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécie. *Nematologia Brasileira*, 25:35-44.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; CARNEIRO, R.G.; NEVES, D.I.N. & ALMEIDA, M.R.A. 2003. Nova raça de *Meloidogyne javanica* detectada em *Arachis pintoi* no estado do Paraná. *Nematologia Brasileira* 27:219-222.

- CARNEIRO, R.M.D.G.; TIGANO, M.S.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A. & SARAH, J.L. 2004. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology* 6:287-298.
- CARNEIRO, RMDG.; SANTOS, MFA.; ALMEIDA, M.R.A.; MOTA, F.C.; GOMES, A.C.M.M. & TIGANO, M.S. 2008. Diversity of *Meloidogyne arenaria* using morphological, cytological and molecular approaches. *Nematology* 10:819-834.
- CARPENTER, A.S. & LEWIS, S.A. 1991. Aggressiveness and reproduction of four *Meloidogyne arenaria* populations of soybeans. *Journal of Nematology* 23:232–238
- CASTAGNONE-SERENO, P.; PIOTTE, C.; ABAD, P.; BONGIOVANNI, M. & DALMASSO, A. 1991. Isolation of a repeated DNA probe showing polymorphism among populations. *Journal of Nematology*, 23:316-320.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; PIOTTE, C.; UIJTHOF, J.; ABAD, P.; WAJNBERG, E.; WANLERBERGHE-MASSUTTI, F.; BONGIOVANNI, M. & DALMASSO, A. 1993a. Phylogenetics relationships between amphimitic and partenogenetic nematodes of the genus *Meloidogyne* as inferred from repetitive DNA analysis. *Heredity*, 70:195-204.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; BONGIOVANNI, M. & DALMASSO, A. 1993b. Stable virulence against the tomato resistance Mi gene in the parthenogenetic root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology* 83:803–805.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; WANLERBERGHE-MASSUTTI, F. & LEROY, F. 1994. Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers. *Genome* 37:904-909.
- CASTAGNONE-SERENO, P. 2006. Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. *Heredity* 96:282–289.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; SEMBLAT, J. P. & CASTAGNONE, C. 2009. Modular architecture and evolution of the map-1 gene family in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Genetics and Genomics* 282:5:547-554

- CASTRO, J.M.C.; LIMA, R.D. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2003. Variabilidade isoenzimática de populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de regiões brasileiras. *Nematologia Brasileira* 27:1:1-12.
- CENIS, J.L. 1993. Identification of four major *Meloidogyne* spp. by Random Amplified Polymorphic DNA (TAPD-PCR). *Phytopathology* 83:76-78.
- COBER, E.R.; CIANZION, S. R.; PANTALONE, V.R. & RAJCAN, I. 2009. Soybean. *In: Oil Crops*. Vollmann, J. & Rajcan, I. (eds). Springer, New York, USA. p: 57-90.
- COFCEWICZ, E.T.; CARNEIRO, R.M.D.G.; CASTAGNONE-SERENO, P.; QUÉNÉHERVÉ, P. 2004. Enzyme phenotypes and genetic diversity of root-knot nematodes parasitising *Musa* in Brazil. *Nematology* 6: 85-95.
- COFCEWICZ, E.T.; CARNEIRO, R.M.D.G.; RANDIG, O.; CHAMBRIER, C. & QUÉNÉHERVÉ, P. 2005. Diversity of *Meloidogyne* spp. on *Musa* in Martinique, Guadeloupe and French Guiana. *Journal of Nematology* 37: 313-322.
- CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento 2012. Soja: Safra 2011-2012 http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_11_09_15_03_02_boletim_2_levantamento_safra_2011_12.pdf. Consultado em Dezembro de 2012.
- COSTA, da M. L. & OLSZEWSKI. 2008. Caracterização da paisagem no Cerrado. *In: Savanas desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais*. Editores técnicos: Faleiro, F.G. & Farias Neto, A.L.F (eds). EMBRAPA Cerrados. Planaltina, D.F.
- CURRAN, J.; MACCLURE, M.A. & WEBSTER, J.M. 1986. Genotypic differentiation of *Meloidogyne* populations by detection of restriction fragment length difference in total DNA. *Journal of Nematology* 18: 83-86.
- CURTIS, R.H.C.; ROBINSON, A.F. & PERRY, R.N. 2009. Hatch and host location. *In: Perry, R.N.; Moens, M.; Starr, J.L. Root Knot Nematodes*. Wallingford, UK, CABI Publishing p. 139-162.

- DE LEY, P. & BLAXTER, M.L. 2002. Systematic position and phylogeny. In: Lee, D.L (ed.). The Biology of Nematodes. Taylor and Francis, London, p. 1-30.
- DHINGRA, O.D.; MENDONÇA, H.L. & MACEDO, D.M. 2009. Doenças e seu controle. In: Sedyama, T. (Ed.). Tecnologias de produção e usos da soja. Mecenas, Londrina, p.133–155.
- DIAS, W.P.; FREITAS, V.M.; RIBEIRO, N.R.; MOITA, A.W.; HOMECHIN, M.; NARPINELLI, M.B. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2010. Reação de genótipos de soja a *Meloidogyne enterolobii* e *M. ethiopica*. Nematologia Brasileira. Vol 34:4:220-225.
- EISENBACK, J.D. & TRIANTAPHYLLOU, H.H. 1991. Root-knot nematode: *Meloidogyne* spp. and races. In: Nickle, W.R (ed.) Manual of agricultural nematology. Marcel Dekker, Inc., New York, USA, p. 191-274.
- EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – 2011. Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil 2012 e 2013. - Londrina: Embrapa Soja. 262 p.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2010. Cultivares de soja de Minas Gerais e região central do Brasil. Safra 2010/2011. Londrina, PR. Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/download/cultivares/Soja_2010-11MG.pdf. Consultado em Fevereiro de 2013.
- ESBENSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida). Journal of Nematology 17: 6-20.
- FAOSTAT- Food and Agricultural Organization in the United Nations. 2011. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Consultado em Janeiro de 2013.
- FEHR, W.R. & CAVINESS, C.E. 1977. Stages of soybean development. Ames: State University of Science and Technology, 11 p. (Special report, 80).
- FERRAZ, S.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A. & DIAS-ARIEIRA, C. R. 2010. Manejo sustentável de fitonematoides. 1ª edição. Ed. UFV, Viçosa-MG.

- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª edição. Embrapa. Brasília-DF
- 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.
- FRANZENER, G.; UNFRIED, J.R.; STANGARLIN, J.R. & FURLANETTO, C. 2005. Nematóides formadores de galha e de cisto patogênicos a cultura da soja em municípios do oeste do Paraná. *Nematologia Brasileira* 29:261-26
- FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L. & FERRAZ, S. 2006. Introdução à Nematologia. 3ª edição. Ed. UFV. Viçosa-MG.
- GIZLICE, Z. CARTER, T.E. & BURTON, J.W. 1994. Genetic base for North American public soybean cultivars released between 1947 and 1988. *Crop Science*, 34:1143-1151.
- GOERT, J. W.; WAGNER, E. & BARCELLOS, O, de. A. 2008. Savanas tropicais: Dimensão, histórico e perspectiva. *In: Savanas desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais*. Faleiro, F.G.; Neto, A.L.F. (eds). EMBRAPA Cerrados. Planaltina, DF.
- GOMES, P. 1990. A soja. 5ª ed. Nobel. São Paulo-SP.
- GOODLAND, R.J.A. 1970. Plants of the Cerrado vegetation of Brazil. *Phytologia* 20:57-80.
- GOULART, A.M.C. 2007. Diversidade de nematoides em agroecossistemas e ecossistemas naturais. Embrapa Cerrados- Planaltina-DF. Documentos- 191. 68p.
- HARRIS, T.S.; SANDALL, L.J. & POWERS, T.O. 1990. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. *Journal of Nematology* 22: 518-524.

- HERMAN, M.R.; HUSSEY S. & BOERMA, H.R. 1991. Penetration and Development of *Meloidogyne incognita* on Roots of Resistant Soybean Genotypes. *Journal of Nematology* 23:155-161.
- HIROMOTO, D.M. & VELLO, N.A. 1986. The genetic base of Brazilian soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars. *Brazilian journal of genetics.*, 9:295-306.
- HUANG, S.P. & CARES, J.H. 1995. Community composition of plant-parasitic nematodes in native and cultivated cerrados of Central Brazil. *Journal of Nematology* 27: 237-243.
- HUANG, S.P.; FREIRE, H.C.A. & CARES, J.E. 1996. Grupos composicionais e tróficos dos nematoides associados à sucupira branca (*Pterodon pubescens*) em Cerrado nativo. *Fitopatologia Brasileira* 21:156-160.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, J. R. & MENDES, I. C. 2001. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 48p.
- HUNT, D.J. & HANDOO, Z.A. 2009. "Taxonomy, identification, and principal species". In Roland N. Perry, Maurice Moens & James L. Starr. *Root-knot Nematodes*. CAB International. pp. 55–97.
- HUSSEY, R.S. & BARKER, K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease* 57:1025-1028.
- HUSSEY, R.S. & JANSSEN, G.J.W. 2002. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: Starr, J.L.; Cook R.; Bridge, J. *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. CAB International, Wallingford. pp. 43-70.
- JAMMES, F.; LECOMTE, P.; ALMEIDA-ENGLER, J.; BITTON, F.; MARTÍN-MAGNIETTE, M.L.; RENO, J.P.; ABAD, P. & FAVERY, B. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 44: 447-458.
- JAUREGUY, L.M.; CHEN, P. & SCABOO, A.M. 2011. Heritability and correlations among food-grade traits in soybean. *Plant Breeding* 130: 647-652.

- JONES, C.J.; EDWARDS, K.J.; CASTAGLIONE, S.; WINFIELD, M.O.; SALA F.; VAN DE WIEL, C.; BREDEMEIJER, G.; VOSMAN, B.; MATTHES, M.; BRETTSCHEIDER, A.; BETTINI, R.; BUIATTI, M.; MAESTRI, E.; MALCEVSCHI, A.; MARMIROLI 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
- KARSSSEN, G. & MOENS, M. 2006. Root-knot nematodes. *In*: PERRY, R.L.; MOENS, M. (eds.) *Plant Nematology*. Cambridge, MA, USA, p. 59-90.
- KRISHNAN, H.B. 2005. Engineering soybean for enhanced sulfur amino acid content. *Crop Science* 45: 454-461.
- LI, Z.; JAKKULA, L.; HUSSEY, R.S.; TAMULONIS, J.P. & BOERMA, H.R. 2001. SSR mapping and confirmation of the QTL from PI96354 conditioning soybean resistance to southern root-knot nematode. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 1167–1173.
- LIU, S.; KANDOTH, P.K.; WARREN, S.D., *et al.* 2012. A soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens. *Nature* 492:256-260.
- LIMA, I.M.; SOUZA, R.M.; SILVA, C.P. & CARNEIRO, R.M.D.G. . 2005. *Meloidogyne* spp. from preserved areas of atlantic forest in state of Rio de Janeiro, Brazil. *Nematologia Brasileira* 29:31-38.
- LORDELLO, A.I.L.; LORDELLO, R.R.A. & FAZUOLI, L.C. 2001. Levantamento de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiros no estado de São Paulo. *In*: II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Vitória-ES.
- LUZZI, B. M.; TAMULONIS J.; HUSSEY, R. S. & BOERMA, H.R.. 1995. Inheritance of resistance to the javanese root-knot nematode in soybean. *Crop Science* 35:1372-1375.
- LUZZI, B.M.; BOERMA, H.R.; HUSSEY, R.S.; PHILLIPS, D.V.; TAMULONIS, J.P.; FINNERTY, S.L. & WOOD, E.D. 1997. Registration of Javanese root-knot nematode resistant soybean germplasm line G93-9223. *Crop Science*. 37:1035-1036.

- MAGGENTI, A. 1981. General Nematology. Springer-Verlag. New York
- MATTOS, J.K.A. 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, V.S. 2010. Variabilidade genética de populações de *Meloidogyne incognita* patogênicas ao algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) através de marcadores moleculares. Monografia (Bacharelado em Agronomia)—Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.
- MCLAIN, D.K.O.; RAI, K.S. & FRASER, J.M. 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.
- MENDES, M.L. & RODRIGUEZ, P.B.N. 2000 Reação de cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] aos nematoides de galhas *Meloidogyne javanica* e a *M. incognita* Raça 1, 2, 3 e 4. *Nematologia Brasileira* 24: 211-217
- MENG, Q.P.; LONG, H. & XU, J.H. 2004. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. *Acta Phytopathologica Sinica* 34:204–10.
- MIENIE, C.M.S.; FOURIE, H.; SMIT, M.A.; VAN STADEN, J. & BOTHA, F.C. 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
- MOENS, M.; PERRY, R. & STARR, J. 2009. *Meloidogyne* species- a diverse group of novel and important plant parasites. Pp. 483 *In*: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (eds). *Root-knot nematodes*, 1. Wallingford, UK
- MOJTAHEDI, H.; SANTO, G.S. & WILSON, J.H. 1988. Host tests to differentiate *Meloidogyne chitwoodi* races 1 and 2 and *M. hapla*. *Journal of Nematology* 20:468-473.

- MONTEIRO, A.R. & LORDELLO, L.G.E. 1980. *Tubixaba tuxaua* n.gen. n.sp. A suspected parasitic nematode of soybean roots (Aporcelaimidae). *Revista de Agricultura* 55:301-304.
- MORALES, A.M.A.P.; LEMOS, E.G.M.; FUGANTI, R.; MARIN, S.R.R.; MARCELINO, F.C.; SILVA, J.F.V.; PEREIRA, A.A. & NEPOMUCENO, A.L. 2009. Expressão de genes envolvidos na resistência da soja a *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira* p. 226-234.
- MORSE, W. J. 1884. Soybeans: culture and varieties. Washington, D.C.. UNT Digital Library. <http://digital.library.unt.edu/ark:/67531/metadc1760/>. Accessed February 15, 2013. (Consultado em 15/02/2013)
- MOURA, R. M. & RÉGIS, E.M.O. 1987. Reação de cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em relação ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* (Nematoda: Heteroderidae). *Nematologia Brasileira* 11: 215-25.
- MUNIZ, M.F.S.; CAMPOS, V.P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CASTRO, J.M.C.; ALMEIDA, M.R.A. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2008. Diversity of *Meloidogyne exigua* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations from coffee and rubber tree. *Nematology* 10: 897-910.
- MYERS, N.; MITTERMAYER, R. A.; MITERMAYER, C. G.; FONSECA, G. A. & KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858.
- NETSCHER, C. 1977. Observations and preliminary studies on the occurrence of resistance breaking biotypes of *Meloidogyne* spp. on tomato. *Cahiers ORSTOM Series Biologie* 11:173-178.
- NOIR, S.; ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; COMBRES, M.C. & 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.
- OOSTENBRINK, M. 1966. Major characteristic of the relation between nematodes and plant. *Mededelingen Landbouwhogeschool, Wageningen (Holanda)* p. 46.

- ORION, D. & KRITZMAN, G. 1991. Antimicrobial activity of *Meloidogyne javanica* gelatinous matrix. *Nematologica* 14:481–483.
- PARAN, I. & MICHELMORE, R.W. 1993. Development of reliable PCR–based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 985-993.
- POWERS, T.O.; TODD, T.C.; BURNELL, A.M.; MURRAY, P.C.B.; FLEMING, C.C.; SZALANSKI, A.L.; ADAMS, B.A. & HARRIS, T.S. 1997. The r DNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *Journal of Nematology* 29: 441-450.
- QUISPEL, A. 1988. Hellnegel and Wilfarth's discovery of (symbiotic) nitrogen fixation hundred years ago. *In*: BOTHE H.; DE BRUIJN FJ.; NEWTON W.E (eds.) *Nitrogen Fixation : Hundred Years After. 7th International Congress on N Nitrogen fixation*. 1 vol. Gustav Fischer, Stuttgart, New York, 1988. p 3-12.
- RAMMAH, A. & HIRSCHMANN, H. 1990. Morphological comparison of three host races of *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 22: 56-68.
- RANDIG, O.; BONGIOVANNI, M.; CARNEIRO, R.M.D.G. & 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, R.M.D.G. & 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
- RATER, J. A; BRIDGWATER, S.; ATKINSON, R. & RIBEIRO, J.F. 1996. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado Vegetation II. Comparison of the woody vegetation of 98 areas. *Edinburgh Journal of Botany* 53:153–180.
- RIBEIRO, J, F. & WALTER, B, M, T, Fitofisionomias do bioma cerrado. 1998. *In*: *Cerrado: ambiente e flora*. Sano, S.M.; Almeida, S.P. (eds). EMBRAPA-CPAC, Planaltina, DF. p.89-166.

- ROBERTS, P. A. & THOMASON, I. J. 1989. A review of variability in four *Meloidogyne* spp. measured by reproduction on several hosts including *Lycopersicon*. *Agricultural Zoology Reviews* 3:225–252.
- ROBERTS, P. A.; DALMASSO, A.; CAP, G. B. & CASTAGNONE-SERENO, P. 1990. Resistance in *Lycopersicon peruvianum* to isolates of Mi genecompatible *Meloidogyne* populations. *Journal of Nematology* 22:585– 589.
- ROBERTS, P.A. 2002. Concepts and Consequences of Resistance. In: STARr, J.L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (eds) *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. CAB International, Wallingford. pp. 25-41.
- RODRIGUES, CS. 2011 Comunidades de nematoides fitoparasitas e de vida livre associadas às principais fitofisionomias do Cerrado do Parque Nacional de Brasília. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília - DF.
- ROESE, A.D.; ROMANI, R.D.; FURLANETTO, C.; STANGARLIN, J.R. & PORTZ, R.L. 2001. Levantamento de doenças na cultura da soja em municípios da região oeste do estado do Paraná. *Acta Scientiarum* 23:1293-1297.
- ROESE, A.D.; OLIVEIRA, R.D.L. & LANES, F.F. 2004. Reação de cultivares de soja (*Glycine max* L. Merrill) a *Meloidogyne paranaensis*. *Nematologia Brasileira* 28:131-135.
- SANO, E. E.; ROSA, R.; BRITO J. L. & FERREIRA, L. G. 2008. Mapeamento semi-detalhado (escala de 1:250.000) da cobertura vegetal antrópica do bioma Cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43:153-156.
- SANTOS, D. F. 2011 Reação de cultivadores de soja a *Meloidogyne morocciensis*. Monografia (Bacharelado em Agronomia)—Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.
- SANTOS, M.F.A.; FURLANETTO, C.; CARNEIRO, M. D. G.; ALMEIDA, M. R.A.; MOTA, F.C.; GOMES, A.C.M.M.; SILVEIRA, N.O.R.; SILVA, J.G.P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; TIGANO, M. S. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2012. Biometrical, biological, biochemical and molecular characteristics of *Meloidogyne*

- incognita* isolates and related species. European Journal of Plant Pathology 134:671–684.
- SASSER, J.N. 1979. Pathogenicity, host ranges and variability in *Meloidogyne* species. In: LAMBERTI, F.; TAYLOR, C.E. (Eds): Root – knot nematodes (*Meloidogyne* species). Systematics, biology and control. New York & London, Academic Press, 257-268p.
- SASSER, J.N. 1980. Root-knot nematodes: a global menace to crop production. Plant Disease 64:36-41.
- SASSER, J.N.; HARTMAN, K.M. & CARTER, C.C. 1987. Summary of preliminary crop germplasm evaluations for resistance to root-knot nematodes. Raleigh North Carolina State University. 88p.
- SCHMUTZ, J.; CANNON, S. B.; SCHLUETER, J.; MA, J.; MITROS, T., NELSON, W.; HYTEN, D. L.; SONG, Q.; THELEN, J. J.; CHENG, J.; XU, D.; HELLSTEN, U.; MAY, G. D.; YU, Y.; SAKURAI, T.; UMEZAWA, T. Bhattacharyya, M. K.; SANDHU, D.; VALLIYODAN, B.; LINDQUIST, E.; PETO, M.; GRANT, D.; SHU, S.; GOODSTEIN, D.; BARRY, K.; FUTRELL-GRIGGS, M.; ABERNATHY, B.; DU, J.; TIAN, Z.; ZHU, L.; GILL, N.; JOSHI, T.; LIBAULT, M.; SETHURAMAN, A.; ZHANG, X. C.; SHINOZAKI, K.; NGUYEN, H. T.; WING, R. A.; CREGAN, P.; SPECHT, J.; GRIMWOOD, J.; ROKHSAR, D.; STACEY, G.; SHOEMAKER, R. C. & JACKSON, S. A. 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. Nature 463: 178-83.
- SEDIYAMA, T. 2009. Tecnologias de produção e usos da soja. Londrina: Mecenias, p.133–155.
- SEIFERT, K.E.; FENSTERSEIFER, C.H.; PAGE, E.; GRABOWSKI, M.M.; DAVI, J.J.S. & FURLANETTO, C. 2006. Levantamento de áreas infestadas pelo nematóide *Tubixaba tuxaua* Monteiro & Lordello e perdas de produção em culturas de importância econômica para o Oeste do Paraná. Fitopatologia Brasileira 31:320-321.

- SEMBLAT, J.P.; WAJNBERG, E.; DALMASSO, A.; ABAD P. & CASTAGNONE-SERENO, P. 1998. High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis. *Molecular Ecology* 7:119-125.
- SEMBLAT, J.P.; ROSSO, M.N.; HUSSEY, R.S.; ABAD, P. & CASTAGNONE-SERENO, P. 2001. Molecular cloning of a cDNA encoding an amphid-secreted putative avirulence protein from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:72-79.
- SHEPHERD, R.L. 1979. A quantitative technique for evaluating cotton for root-knot nematode resistance. *Phytopathology* 69:427-430.
- SILVA, J.F.V. 2001. Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja. Embrapa Soja. Londrina-PR.
- SILVA, J.F.V.; FERRAZ, L.C.C.B. & ARIAS, C. A. 2001. Inheritance of resistance to *Meloidogyne javanica* in soybean. *Nematropica* 31:211-219.
- SILVA, R.V. 2005. Produção de inóculo e diferenciação de raças de *Meloidogyne exigua* em *Coffea* spp. Dissertação de Mestrado. . Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, Brasil.
- SILVA, R. A.; SILVA, E. S.; ANTEDOMÊNICO, S. R. & INOMOTO, M.M. 2008. Fauna of phytonematodes in the Atlantic Forest from Ribeira Valley, São Paulo State, Brazil. *Nematropica* 38:1-12.
- SILVA, J.G.P. 2012. Ocorrência de *Meloidogyne* spp. em diferentes fitofisionomias do Cerrado e hospedabilidade de plantas nativas a *Meloidogyne javanica*. 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.
- SINGH, S.P. & SINGH, D. 2010. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 200-216
- SOUZA, R.M.; DOLINSKI, C.M. & HUANG, S.P. 1994. Survey of *Meloidogyne* spp. in native cerrado of Distrito Federal, Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 19: 463-465.

- SOYATECH: Soy facts. 2012. Consultado em Janeiro de 2013:
http://www.soyatech.com/soy_facts.htm
- TAMULONIS, J.P.; LUZZI, B.M & HUSSEY, R.S. 1997a. DNA marker associated with resistance to Javanese root-knot nematode in soybean. *Crop Science* 37: 783–788.
- TAMULONIS, J.P.; LUZZI, B.M.; HUSSEY, R.S.; PARROTT, W.A & BOOERMA, H.R. 1997b. DNA marker analysis of loci conferring resistance to peanut root-knot nematode in soybean. *Theoretical and Applied Genetics* 95, 664–670.
- TAYLOR, A. L. & SASSER, J. N. 1978. *Biology, Identification and Control of Root-Knot Nematodes (Meloidogyne species)*. Raleigh. North Carolina State University.
- TAYLOR, D.T. & SASSER, J.N. 1983. *Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (Meloidogyne species)*. North Carolina State University and USAID.
- TEIXEIRA, M. A. 2007. Resistência de genótipos de bananeira a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* e variabilidade genética com base em marcadores moleculares RAPD. Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.
- TIGANO, M.S.; CARNEIRO, R.M.; JEYAPRAKASH, A.; DICKSON, D.W. & ADAMS, B. J. 2005. Phylogeny of *Meloidogyne* spp. based on 18S rDNA and the intergenic region of mitochondrial DNA sequences. *Nematology*, 7(6), 851-862.
- TIGANO, M.; SIQUEIRA, K.; CASTAGNONE-SERENO, P.; MULET, K.; QUEIROZ, P.; SANTOS, M.; TEIXEIRA, C.; ALMEIDA, M.; SILVA, J. & CARNEIRO R. 2010. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* and development for SCAR marker for this guava-damaging species. *Plant Pathology* 59: 1054-1061.
- TRIANANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Cytogenetics, cititaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. *In*: CARTER, C.C.; SASSER, J. N. (eds.). *An advanced treatise on Meloidogyne*, vol. I, Biology and control. Raleigh, North Carolina State University Graphics. p. 113 – 126.

- TRIANANTAPHYLLOU, A.C. 1987. Genetics of nematode parasitism on plants. *In*: VEECH, J.A.; DICKSON D. (eds). *Vistas on Nematology*. Society of Nematologists, Hyattsville (MD) EUA, p. 354-363.
- TOLEDO, L.O.; ANJOS, L.H.C.; COUTO, W.H.; CORREIA, J.R.; PEREIRA, M.G. & CORREIA, M.E.F. 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.
- WENDLAND, A.; NEPOMUCENO, A.L.; SILVA, J.F.V.; MENTEN, J.O.M.; BINNECK, E.; MARIN, S.R.R.; SILVEIRA, C.A.; MORALES, A.M.R.; TRAVENSOLO, R.F.; ALVES, L.C.; LOPES, T. & LEMOS, E.G.M. 2004. Genetic expression of soybeans: *Meloidogyne javanica* interaction revealed by analyses of microarrays. *In*: World Soybean Research Conference, VII, Foz do Iguaçu (PR). *Anais*, p. 320.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531-6535.
- WOFFORD, D.S.; GRAY, F.A. & ECKERT, J.W. 1989. Pathogenicity of two populations of *Meloidogyne hapla* Chitwood on alfafa and sainfoin. *Journal of Nematology* 21:87-91.
- WWF. 2010. Disponível em: www.wwf.org.br. Consultado em 12 de Novembro de 2012.
- WYSMIERSKI, P.T. 2010. Contribuição genética dos ancestrais da soja às cultivares brasileira. Dissertação de Mestrado- Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.
- YEATES, G.W.; BONGERS, T.; De GOEDE, R.G.M.; FRECKMAN, D.W. & GEORGIEVA, S.S. 1993. Feeding habits in soil nematode families and genera - an outline for soil ecologists. *Journal of Nematology* 25: 315-331.
- ZIJLSTRA, C.; UENK, B.J. & VAN SILFHOUT, C.H. 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, D.T.H.M. & FARGETTE, M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified regions (SCAR) based PCR assays. *Nematology*, 2:847-853.