

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

**OCORRÊNCIA DE *Meloidogyne graminis* EM GRAMA NO ESTADO  
DE SÃO PAULO**

**SAMARA AZEVEDO DE OLIVEIRA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP  
(NOVEMBRO - 2015)

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

**OCORRÊNCIA DE *Meloidogyne graminis* EM GRAMA NO ESTADO  
DE SÃO PAULO**

**SAMARA AZEVEDO DE OLIVEIRA**

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Renata Siciliano Wilcken

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP  
(NOVEMBRO - 2015)

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Oliveira, Samara Azevedo de, 1990-  
O48o Ocorrência de *Meloidogyne graminis* em grama no Estado de São Paulo / Samara Azevedo de Oliveira. - Botucatu : [s.n.], 2015  
vi, 73 f. : fots. color., grafs. color., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2015  
Orientador: Silvia Renata Siciliano Wilcken  
Inclui bibliografia

1. Gramados - Doenças e pragas. 2. Instalações desportivas. 3. Sequenciamento de nucleotídeo. 4. Nematoda em plantas. I. Wilcken, Silvia Renata Siciliano. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE BOTUCATU  
FACULDADE DE CIENCIAS AGRONOMICAS DE BOTUCATU

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** "OCORRÊNCIA DE *Meloidogyne graminis* EM GRAMA NO ESTADO DE SÃO PAULO"

**AUTORA:** SAMARA AZEVEDO DE OLIVEIRA

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS) , pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN  
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS MARINGONI  
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu

Profa. Dra. JULIANA MAGRINELLI OSORIO ROSA  
Centro Experimental Central do Instituto Biológico

Data da realização: 21 de dezembro de 2015.

À minha sobrinha Anna Liah Azevedo Ribeiro, por renovar as minhas esperanças e proporcionar tantos momentos de felicidade,

DEDICO.

Às minhas irmãs, família e amigos,

OFEREÇO.

*“Les temps sont durs pour les rêveurs”.*

Eva - Le Fabuleux Destin d'Amélie Poulain

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao programa de Pós-graduação em Agronomia (Proteção de Plantas), da Faculdade de Ciências Agronômicas/FCA UNESP – Campus de Botucatu/SP, pela oportunidade da realização desta importante etapa na minha vida acadêmica e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa de estudos concedida para a concretização desta dissertação;

À Profa. Dra. Silvia Renata Siciliano Wilcken pela orientação, ensinamentos, paciência e tempo a mim disponibilizados;

Em especial, ao Dr. Cláudio Marcelo Gonçalves de Oliveira, pesquisador do Instituto Biológico, que despertou em mim, através da sua paixão pela pesquisa, o desejo de seguir na área de Nematologia Agrícola. Sem sua ajuda, seria muito mais difícil concluir essa pesquisa. A ele agradeço pela orientação e conhecimento compartilhado, pelos momentos de descontração e pelos puxões de orelha. Tenho absoluta certeza de que contribuiu muito para meu crescimento profissional e pessoal;

Agradeço a todos os funcionários e professores do Departamento de Proteção de Plantas da FCA, pelo convívio e disponibilidade. Assim como as colegas do Laboratório de Nematologia, que sempre se mostraram presentes;

Agradeço aos amigos e colegas do Laboratório de Nematologia do CEIB - Campinas, Instituto Biológico, especialmente a Juliana Magrinelli Osório Rosa, Juliana Eulálio e Sr. Joaquim Souza Dias, pelo acolhimento e ajuda durante o trabalho, pelos bons momentos em meio a tantos problemas;

Aos administradores dos campos de golfe das cidades de Araras e São Paulo (SP), pelo envio das amostras e pela recepção durante a visita.

Ao Dr. Ricardo Harakava, pela contribuição nas análises moleculares.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito obrigada.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	01
SUMMARY.....	03
1 INTRODUÇÃO.....	04
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	06
2.1 Importância das grammas no Brasil.....	06
2.2 Nematoides associados á grammas.....	08
2.3 Gênero <i>Meloidogyne</i> .....	10
2.3.1 <i>Meloidogyne graminis</i> .....	11
2.3.2 Ciclo de vida.....	12
2.4 Identificação de <i>Meloidogyne</i> .....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Isolamento da espécie .....	16
3.2 Análises morfológicas e morfométricas.....	17
3.2.1 Análises estatísticas.....	19
3.3 Estudos bioquímicos.....	22
3.4 Estudos moleculares.....	22
3.4.1 Extração do DNA.....	22
3.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	23
3.4.3 Sequenciamento e análises filogenéticas.....	24
4 RESULTADOS.....	25
4.1 Morfometria.....	25
4.2 Análises estatísticas.....	28
4.3 Morfologia.....	31
4.4 Sintomas.....	35

4.5 Estudos bioquímicos.....	36
4.6 Estudos moleculares.....	36
4.6.1 Sequenciamento e alinhamento.....	36
4.6.2 Código de barras do DNA.....	37
4.6.3 Análises filogenéticas.....	39
5 DISCUSSÃO.....	42
5.1 Sintomas.....	42
5.2 Morfometria e morfologia.....	43
5.3 Estudos bioquímicos.....	44
5.4 Estudos moleculares.....	45
5.4.1 Código de barras do DNA.....	45
5.4.2 Análises filogenéticas.....	46
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
7 CONCLUSÃO.....	50
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
APÊNDICE.....	59
ANEXO.....	73



## RESUMO

O cultivo de gramas no Brasil está em expansão. O maior mercado consumidor de gramados é a indústria do esporte, principalmente campos de futebol e golfe. A qualidade do gramado nessas áreas esportivas é fundamental, principalmente quando se trata de campos de golfe, nos quais, qualquer imperfeição pode prejudicar o resultado do jogo. Os nematoides parasitos de plantas do gênero *Meloidogyne*, também conhecidos como nematoides formadores de galhas, são considerados os de maior importância econômica devido à intensidade dos danos que causam às plantas cultivadas. As principais espécies associadas às gramas em campos de golfe são *M. graminicola*, *M. graminis*, *M. marylandi*, *M. naasi*, *M. minor* e *M. sasserii*. No Brasil, a ocorrência de espécies de *Meloidogyne* associadas a gramas restringe-se aos relatos de *Meloidogyne* sp. em raízes de grama esmeralda (*Zoysia japonica*) no Estado do Paraná e *M. graminicola* em raízes de arroz irrigado no Rio Grande do Sul e Santa Catarina. No ano de 2006, a espécie *M. graminis* foi detectada pela primeira vez na América do Sul, parasitando raízes de grama Tifdwarf bermuda em campo de golfe na Venezuela. Até o momento esta espécie ainda não foi relatada no Brasil. Assim, o objetivo foi identificar o nematoide das galhas encontrado parasitando raízes de gramas de campos de golfe no Estado de São Paulo. Visando a correta diagnose dessa espécie, foram realizados estudos detalhados englobando o conceito de taxonomia integrativa, que incluiu estudos de morfologia, morfometria, biologia,

estudos bioquímicos, moleculares e filogenéticos. Todas as análises realizadas confirmaram que a espécie presente nos campos de golfe das cidades de Araras e São Paulo - SP trata-se de *M. graminis*, que caracteriza o primeiro relato desta espécie no Brasil.

---

Palavras-chave: Nematóide das galhas, Brasil, campo de golfe, morfometria, código de barras do DNA.

OCCURRENCE OF *Meloidogyne graminis* IN GRASS FROM SÃO PAULO STATE. Botucatu, 2015.79p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Author: SAMARA AZEVEDO DE OLIVEIRA

Adviser: Dra. SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN

## SUMMARY

Currently, the grasses growing in Brazil is expanding. The biggest consumer market for lawns is the industry of sports, especially football and golf courses. The quality of the lawn in these sports areas is crucial, especially when it comes to golf courses, where any imperfection can prejudice the outcome of the game. The nematode parasites of plants of the genus *Meloidogyne*, also known the root-knot nematodes, are considered the most economically important because of the intensity of the damage they cause to crops. The main species associated with grasses on golf courses are *M. graminicola*, *M. graminis*, *M. marylandi*, *M. naasi*, *M. minor* and *M.sasseri*. In Brazil *Meloidogyne* sp. has been reported in esmerald grass roots (*Zoysia japonica*) in the State of Paraná. The species *M. graminicola* was detected in rice roots in Rio Grande do Sul and Santa Catarina. In 2006 the species *M. graminis*, was first detected in South America parasitizing grass roots Tifdwarf shorts on golf course in Venezuela. So far this species has not been reported in Brazil. The objective of this project is to identify the root-knot nematodes found parasitizing roots of grasses of golf courses in the state of Sao Paulo. For this were carried out detailed studies of integrative taxonomy, including morphological and morphometric studies, biology, biochemical, molecular and phylogenetic. All analyzes have confirmed that the species in golf courses in São Paulo state is *M. graminis*, that characterized the first report of the species in Brazil.

---

Keywords: Root-knot nematodes, Brazil, golf courses, morphometry, DNA barcode.

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o cultivo das gramas no Brasil concentra-se nos estados de São Paulo e Paraná, porém a produção tem se expandido para outros Estados como o Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul e Goiás e também do Nordeste do país. As áreas esportivas são as principais responsáveis pelo consumo de grama cultivada, principalmente tratando-se de campos de golfe e estádios de futebol, além dessas, outros consumidores significativos são obras públicas, parques industriais, jardins residenciais (GODOY; VILLAS BÔAS, 2005).

Diferentes espécies de nematoides fitoparasitas já foram encontradas associadas às gramas em diversas partes do mundo. Dentre os nematoides parasitos de plantas, as espécies pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, também conhecidos como nematoides formadores de galhas, são consideradas as de maior importância econômica devido à intensidade dos danos que causam às plantas cultivadas. As principais espécies associadas às gramas em campos de golfe e futebol são *M. graminicola*, *M. graminis*, *M. marylandi*, *M. naasi*, *M. minor* e *M. sasseri*. Os danos causados por esses organismos podem interferir na qualidade do gramado, por meio da redução da tolerância à seca, redução da absorção de nutrientes, aumento de problemas com ervas daninhas, amarelecimento e secamento da

parte aérea, prejudicando a utilização do gramado para práticas esportivas, principalmente em campos de golfe (MOENS, 2009).

A espécie *M. graminis* foi relatada pela primeira vez em 1959, parasitando raízes de grama St. Augustine na Flórida (SLEDGE; GOLDEN, 1964). Trata-se de um nematoide das galhas largamente distribuído pelos Estados Unidos e bastante conhecido pelos danos que causam em gramados esportivos, principalmente em campos de golfe. Essa espécie de nematoide é parasita exclusivo de gramíneas e não se desenvolve em outro tipo de planta (MACGOWAN, 1984). Recentemente, essa espécie foi relatada pela primeira vez na América do Sul, causando danos em grama Tifdwarf bermuda em campo de golfe na Venezuela (PERICHI et al., 2006). Até o momento não há relato dessa espécie no Brasil.

O manejo de *Meloidogyne* em áreas de gramado é indispensável para a utilização de campos desportivos, principalmente de golfe, já que os danos causados podem prejudicar a qualidade do gramado e o desempenho dos jogadores. No entanto, antes de tomar qualquer providência, é necessário conhecer a(s) espécie(s) presente(s) na área. Os nematoides são organismos muito difíceis de serem identificados, por esse motivo é necessária a utilização de diversas técnicas em conjunto para uma diagnose precisa.

O objetivo foi identificar a espécie de nematoide das galhas encontrada causando danos em campos de golfe nas cidades de Araras e São Paulo (SP), utilizando o conceito de taxonomia integrativa para a diagnose segura da espécie no país.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Importância das gramas no Brasil.

As gramas pertencem à família das Gramíneas (*Gramineae*), composta por mais de 10.000 espécies (WATSON; DALLWITZ, 1992). Cerca de 50 espécies de gramíneas possuem utilidade ornamental e são usadas na formação de gramados (GURGEL, 2003). A principal característica morfológica que diferenciam as gramas ornamentais das demais espécies é a localização da região meristemática. As gramas possuem meristema subapical, localizado na base da planta, formado por um grupo de nós e entrenós compactados, conhecido como coroa sendo esta a principal razão pela qual elas podem ser cortadas continuamente (UNRUH, 2004).

Historicamente, o cultivo de grama no Brasil teve seu início nos anos 70, através do engenheiro agrônomo Minoru Ito, que trouxe ao país técnicas de cultivo desenvolvidas nos Estados Unidos. Minoru Ito associou-se ao também engenheiro agrônomo René Luiz Barreto e juntos fundaram a “Itograss”, lançando no mercado as primeiras gramas cultivadas, chamadas *Zoysia* ou grama japonesa (GODOY, 2005). Atualmente, apesar de não estar entre os principais produtores mundiais de grama, o setor encontra-se em pleno crescimento no Brasil. No início, a produção de gramas no país, concentrava-se apenas nos Estados de São Paulo e Paraná. A partir dos anos 90, a produção foi expandida para outras regiões como o Nordeste, Rio de Janeiro e Goiás.

De acordo com a Associação dos Gramicultores do Brasil (Agrabras), o mercado anual brasileiro de grama é de aproximadamente 170 milhões de metros quadrados, destes, 70% de grama nativa e 30% de grama cultivada. Baseado nesses dados, em valores o mercado brasileiro foi dimensionado em aproximadamente R\$ 155 milhões.

O cultivo de um gramado traz diversos benefícios ao ambiente. De acordo com a Associação Internacional dos Produtores de gramas (2002), um gramado proporciona um local ideal para diversão e práticas de esportes, libera oxigênio, refresca o ar, absorve quantidades consideráveis de CO<sub>2</sub>, contribuindo para redução dos efeitos do aquecimento global e efeito estufa, além disso, contribui para a manutenção da microbiota do solo. Um dos principais benefícios da sua utilização na prática é o controle da erosão do solo, os gramados são muito eficazes na absorção da água da chuva, os sedimentos perdidos em uma área gramada é dez vezes menor do que uma cobertura de palha.

Entre os principais mercados consumidores de gramados, destacam-se obras públicas, parques industriais, jardins residenciais e áreas esportivas, sendo este último o responsável pelo consumo da maior parte de grama cultivada, principalmente tratando-se de campos de golfe e estádios de futebol. O Brasil possui, em média, 780 estádios oficiais de futebol, cujos campos possuem área média de 10.000 m<sup>2</sup> (Confederação Brasileira de Futebol, 2014) e cerca de 110 campos de golfe oficiais, além dos particulares, ocupando em média 500.000 m<sup>2</sup> cada (NEWGOLF, 2015). As principais formas de comercialização das gramas cultivadas são os tapetes ou os rolos. Outras formas menos comuns incluem as bandejas (plugs), estolões ou sementes. Recentemente, iniciou-se a comercialização dos “big rolls”, caracterizados por rolos de grama com aproximadamente 1,0 a 1,2 m de largura e mais de 40 m de comprimento.

No Brasil, as principais gramas cultivadas são as de estação quente, porém, há espécies utilizadas durante o inverno, que são importadas e semeadas sobre as falhas de gramados em campos esportivos, para compensar o baixo crescimento das de estação quente no inverno. Essa técnica de cobertura é chamada “overseed” (LAURETTI, 2003). As espécies de gramas de clima quente se caracterizam por não possuírem a capacidade de entrar em dormência em baixas temperaturas, essas possuem capacidade de se desenvolverem em temperaturas elevadas, sempre acima de zero. As principais espécies

consideradas gramas de clima quente utilizadas no Brasil são: ‘Santo Agostinho’ (*Stennotaphrum secundatum*), ‘Bermudas’ (*Cynodon* spp.), ‘Esmeralda’ (*Zoysia* spp.), ‘Centipede’ (*Eremochloa ophiuroides*), ‘Batatais’ (*Paspalum notatum*) e a ‘São Carlos’ (*Axonopus compressus*) (GURGEL, 2003).

Cerca de 80% das gramas cultivadas no país pertencem à variedade ‘Esmeralda’, porém também são comercializadas as gramas ‘São Carlos’, ‘Santo Agostinho’ e ‘Bermudas’, esta última mais utilizada em áreas esportivas. A grama ‘Batatais’ é a principal grama não cultivada e nativa do Brasil. Cada espécie apresenta características específicas como rusticidade, plasticidade, resistência ao pisoteio, capacidade de desenvolvimento em áreas de pouca luminosidade, capacidade de rebrota, entre outras que permitem indicá-las para diferentes usos e manejo (GURGEL, 2003).

Como mencionado anteriormente, a espécie de grama ‘Bermuda’ é a mais utilizada em áreas esportivas, mas também é considerada a planta com maior distribuição geográfica do planeta. Uma das suas principais características é a alta capacidade de recuperação a podas e tráfego excessivo. Segundo Busey e Myers (1979), em um ambiente ideal para crescimento, com multiplicações frequentes e programadas, seria possível no período de um ano, cobrir 50% da área da Terra, a partir de 1 m<sup>2</sup> de grama ‘Bermuda’. No Brasil, a maioria das gramas de campos de futebol, principalmente ‘Esmeralda’, está sendo substituída por variedades de ‘Bermuda’. A maioria dos campos de golfe é composto por essa espécie de grama, sendo que as anãs são utilizadas nos *greens* e outras variedades nos *fairways*.

## **2.2 Nematoides associados às gramas.**

A manutenção dos campos de golfe tem se tornado um desafio em todas as partes do mundo. Entre todas as doenças e pragas que afetam o gramado, os nematoides parasitos de plantas são provavelmente os menos compreendidos e os mais difíceis de manejar. Os nematoides são considerados fatores importantes na perda de qualidade, produção e manutenção de gramas de campos de golfe. Os encontrados normalmente em associação com as gramas são: *Anguina pacificae*; *Criconemella* spp.; *Heterodera* spp.; *Helicotylenchus* spp.; *Hoplolaimus* spp.; *Meloidogyne* spp.; *Pratylenchus* spp.; *Trichodorus* spp.; *Mesocriconema ornatum*; e *Belonolaimus longicaudatus*, considerado,



nos Estados Unidos, o nematoide mais agressivo em gramas de campos de golfe (KARSSSEN, 2006; FLEMING, 2008; PERICHI et al., 2006).

Nos últimos quarenta anos os relatos de associações de nematoides com gramados de campos de golfe apareceram em diversas regiões do mundo como Alemanha, Argentina, Austrália, Bélgica, Canadá, Estados Unidos, Holanda, Inglaterra, Irlanda, Israel, Japão, Reino Unido, Rússia e Venezuela. Os danos causados por esses organismos levam à má qualidade do gramado, redução da tolerância à seca, redução da absorção de nutrientes, aumento de problemas com ervas daninhas e interferência no percurso da trajetória da bola em campos de golfe (CROW, 2014).

Segundo Nelson (1995), muitos profissionais duvidam da ocorrência e das perdas causadas por nematoides em gramas, isso por se tratarem de seres microscópicos e por não causarem danos específicos, que, no mais das vezes, se confundem com deficiência nutricional. Ainda hoje, com todos os subsídios e informações presentes na literatura, alguns preferem não acreditar no seu potencial de danos. O problema de nematoides em gramados começou a ganhar evidencia após diversos relatos desses parasitas causando danos severos em campos de golfe nos Estados Unidos (BRITO et al., 2010; 2015).

O desenvolvimento dos nematoides associados a gramas pode ser influenciado por fatores ambientais como temperatura, pH e umidade. Sua distribuição na área é altamente variável, porém as populações tendem a se agrupar de acordo com a combinação das melhores condições de sobrevivência. Tratando-se de parasitas obrigatórios, necessitam das células vivas do seu hospedeiro para se alimentarem, na ausência de alimento os nematoides podem morrer, no entanto, existem espécies em que os juvenis são capazes de entrar em dormência por um longo período, podendo voltar ao parasitismo após anos, caso o ambiente se torne favorável. Existe também a possibilidade de se alimentarem de outra planta na ausência do seu hospedeiro, já que algumas espécies são polífagas (NELSON, 1995; MITKOWSKI, 2001).

Com exceção da espécie *A. pacifica*, nematoide da parte aérea, todos os nematoides de importância para as gramas são parasitas do sistema radicular. Esses organismos são classificados como ectoparasitas ou endoparasitas, de acordo com o seu hábito alimentar, e ainda migradores ou sedentários, de acordo com sua migração e tipo de

sítio de alimentação no interior do hospedeiro (NELSON, 1995; MITKOWSKI, 2001). Recentemente, os nematoides das galhas, *Meloidogyne* spp., tem chamado a atenção dos produtores de gramas e dos responsáveis pela manutenção dos campos de golfe. Na Flórida, estado norte americano que mais sofre com ataque dos nematoides em gramados de campos de golfe, 89% dos danos são causados por *Meloidogyne* spp. (MCCLURE, 2012). Uma das explicações para o aumento da incidência dos nematoides das galhas é a padronização para a construção dos campos de golfe, que determina que o substrato deve conter cerca 92% de areia, condição ideal para o desenvolvimento dos nematoides desse gênero.

### 2.3 Gênero *Meloidogyne*

Os nematoides formadores de galhas pertencem ao Reino Animal, Filo Nematoda Potts, 1932; Classe Chromadorea Inglis, 1983; Subclasse Chromadoria Pearse, 1942; Ordem Rhabditida Chitwood, 1933; Subordem Tylenchina Thorne, 1949; Infraordem Tylenchomorpha De Ley e Blaxter, 2002; Superfamília Tylenchoidea Örley, 1880; Família Meloidogynidae Skarbilovich, 1959; Subfamília Meloidogyninae Skarbilovich, 1959; Gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1892, conforme a classificação proposta por De Ley e Blaxter (2002).

Neste gênero estão os nematoides fitoparasitos de maior importância econômica mundial, isso se deve a sua ampla distribuição geográfica, ao elevado número de hospedeiros e a severidade dos danos causados (CAMPOS, 1985). No Brasil, estão associados às grandes culturas como café, cana, milho, arroz e batata, além de olerícolas e plantas ornamentais (FREITAS et al., 2001). Dentre as espécies de maior importância destacam-se *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. enterolobii* (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001).

Segundo Hussey (1985), a fisiologia da planta infectada por *Meloidogyne* spp. é drasticamente alterada, o que reflete em sintomas induzidos na parte aérea e raízes. A formação de galhas ocorre devido à atuação de reguladores de crescimento da planta, como etileno, que ficam desregulados com a presença de substâncias injetadas pelo nematoide e causa a hipertrofia e hiperplasia das células do parênquima cortical. Infecções por *Meloidogyne* spp. afetam a absorção e translocação de nutrientes na planta. O grau de dano

causado está frequentemente relacionado ao número de juvenis que penetram nas raízes e se estabelecem. Naturalmente, fatores ambientais como temperatura podem influenciar no nível de dano da planta infectada. Além disso, infecções causadas por nematoides das galhas podem reduzir a taxa de fotossíntese, através de dois diferentes mecanismos: o primeiro supõe que o dano causado na raiz pode provocar estresse hídrico causando parcial fechamento dos estômatos, o que resulta na diminuição da taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> e, o segundo, que os fitonematoídes interferem na síntese e, ou, na translocação de hormônios de crescimento produzidos nas raízes e translocados para a parte aérea da planta, pois sua concentração diminui em plantas infectadas (BIRD,1974).

As principais espécies de *Meloidogyne* associadas à gramas em campos de golfe são: *M. chitwoodi*, *M. graminicola*, *M. graminis*, *M. marylandi*, *M. minor*, *M. naasi*, e *M. sasseri*. Em geral, *M. chitwoodi*, *M. minor* e *M. naasi* são encontrados em regiões mais frias, enquanto que *M. graminicola*, *M. graminis* e *M. marylandi* em regiões mais quentes (NELSON, 1995). No Brasil, *Meloidogyne* sp. já foi relatado em raízes de grama esmeralda no Estado do Paraná (DIAS-ARIEIRA et al., 2007). A espécie *M. graminicola* foi detectada em raízes de arroz irrigado no Rio Grande do Sul e Santa Catarina. *M. javanica* e *M. incognita* já foram relatadas em diversas gramíneas forrageiras no país (NEGRETTI et al., 2014).

### 2.3.1 *Meloidogyne graminis*

Este nematoíde foi inicialmente descrito como *Hypsoperine graminis* Sledge & Golden, 1964 a partir de espécimes extraídos de raízes de grama ‘Santo Agostinho’ na Flórida, EUA. Posteriormente, foi renomeado como *Meloidogyne graminis* (Sledge & Golden, 1964) Whitehead, 1964 e é conhecido por parasitar gramíneas das espécies *Cynodon dactylon.*, *Z. japonica*, *Paspalum notatum*, *Oryza sativa*, *Digitaria sanguinalis*. Além de já ter sido detectada em *Sorghum vulgare* e *Zea mays* (JEPSON, 1987).

É uma espécie considerada frequente em gramado de campos de golfe da região sul dos Estados Unidos, especialmente no estado da Flórida. Na Europa, foi detectado na Alemanha, Bélgica, Holanda, Irlanda e Reino Unido. Na China, sua ocorrência foi relatada em dois campos de golfe (ZHUO et al.,2011). No ano de 2006, esse nematoíde foi detectado pela primeira vez na América do Sul, parasitando raízes de grama Tifdwarf em

campo de golfe na Venezuela (PERICHI et al., 2006). Trata-se de uma espécie bastante conhecida pela severidade de danos causados em gramados de campos de golfe, principalmente dos Estados Unidos. Os principais sintomas são clorose, podendo ser seguida de secamento da planta. Embora o gênero seja conhecido pela formação de galhas no sistema radicular, essas não são observadas em plantas parasitadas por *M. graminis*, observa-se apenas um leve engrossamento no local do parasitismo.

### 2.3.2 Ciclo de vida

O ciclo de vida completo dos nematoides do gênero *Meloidogyne* completa-se entre três a quatro semanas, em condições favoráveis. Em temperaturas acima de 40° C ou abaixo de 5° C qualquer espécie reduz suas atividades vitais, podendo cessá-las por completo (FERRAZ, 2001).

Cada fêmea de *Meloidogyne* deposita seus ovos em apenas um local da raiz, formando assim uma massa, os ovos permanecem unidos por meio de uma substância gelatinosa secretada por glândulas retais que flui durante a ovoposição. As massas gelatinosas podem ser depositadas na parte interna ou externa da raiz, cada uma possui cerca de 500 ovos. No interior dos ovos encontram-se os juvenis de 1° estágio (J1), que após a primeira ecdise origina os juvenis de 2° estágio (J2), forma infectante. Após a eclosão os J2 passam a migrar no solo em busca de raízes de um hospedeiro (FERRAZ; MONTEIRO, 1995).

O J2 é atraído até a raiz através dos exsudados da planta. Sua forma vermiforme auxilia no momento da penetração, que ocorre normalmente próximo a capa protetora da raiz seguindo até o córtex. Durante as primeiras punções do estilete são liberadas secreções que causam o crescimento das células, formando as células nutridoras, ao mesmo tempo, ocorre a multiplicação celular que dá origem as galhas. Após esse período, os juvenis sofrem ecdises originando os J3 e J4 e, finalmente, os adultos (OTT, 2003). Há dimorfismo sexual no gênero *Meloidogyne*, as fêmeas assumem o formato de uma pera e se tornam endoparasitas sedentárias, incapazes de se locomoverem. Já os machos permanecem vermiformes (LORDELLO, 1992).

## 2.4 Identificação de *Meloidogyne*

Os nematoides fitoparasitos são considerados um dos organismos mais difíceis de serem identificados, devido ao seu tamanho diminuto e também pela dificuldade de se observar características chaves para o diagnóstico em microscopia de luz tradicional (OLIVEIRA, 2010). As diferenças morfológicas e morfométricas são relativamente pequenas e exigem considerável conhecimento em taxonomia para a segura determinação das espécies. Ademais, para a maioria das espécies de nematoides parasitas de plantas, são necessárias fêmeas para uma identificação precisa e em alguns casos estas não se fazem presentes nas amostras (OLIVEIRA et al., 2011). Atualmente são poucos os profissionais com treinamento em taxonomia, pela combinação da gradativa diminuição no número de profissionais qualificados, com o declínio no interesse de jovens estudantes em se aprofundar nessa área de conhecimento (FERRIS, 1994; COOMANS, 2001).

A identificação das espécies do gênero *Meloidogyne* é bastante complexa, devido ao alto grau de similaridade. Entretanto, conhecer a espécie é imprescindível para que as práticas culturais tornem-se efetivas (MOURA, 1996). Neste caso, a identificação das espécies pode ser realizada através de diferentes técnicas que envolvem desde aspectos morfológicos até análises de proteínas e de DNA. Em alguns casos, para realizar a identificação correta é necessário utilizar diferentes técnicas em conjunto (HANDOO et al., 2008).

Os dados morfológicos e morfométricos são obtidos através do exame de fêmeas, machos e juvenis (J2). Esses dados são comparados com os presentes na literatura para a identificação da espécie (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001). A característica morfológica mais utilizada para a identificação de espécies é a região perineal das fêmeas maduras, que contem estrias características de cada espécie. Essa técnica é utilizada na rotina da maioria dos laboratórios, porém é bastante delicada e exige técnica, habilidade e conhecimento do operador (PERRY et al., 2009). Segundo Almeida et al. (2008), a morfologia da perineal e da região labial dos machos são suficientes para a distinção segura entre *M. enterolobii* e *M. incognita*. Entretanto, outros autores relatam a dificuldade na identificação dessas espécies apenas por estas características morfológicas (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001; TORRES et al., 2005).

A análise de proteínas solúveis é realizada através de eletroforese de isoenzimas. As espécies de *Meloidogyne* apresentam atividades para diferentes isoenzimas, cujo fenótipo é utilizado para fins taxonômicos (ALFENAS, 1998). Com base nos padrões de esterase, malato desidrogenase e glicerofosfato desidrogenase, é possível diferenciar cerca de quarenta espécies sendo as principais *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. enterolobii* e *M. hapla* (BLOK; POWERS, 2009; DICKSON et al., 1971; HUSSEY et al., 1972; HYMAN; POWERS, 1991). As vantagens da identificação por eletroforese de proteínas são a eficiência do método em diferenciar espécies, a rapidez e o custo reduzido. Porém o método não é sensível para diferenciar raças e, além disso, são utilizadas apenas fêmeas jovens e intactas nos testes (MANSO; TENENTE, 1994).

Diversos estudos moleculares vêm sendo desenvolvidos para realizar uma identificação segura de diferentes espécies de nematoides fitoparasitas. Isso porque as técnicas baseadas no uso de DNA são mais rápidas e mais seguras, comparadas à tradicional identificação morfológica e aos métodos bioquímicos (POWERS et al., 2005). Os métodos mais utilizados no mundo são: RFLPs (Restriction fragment length polymorphisms), AFLP (Amplified fragment length polymorphisms), RAPD (Random amplified polymorphisms DNA), SCAR – PCR (Sequence characterized amplified region markers), satDNA (DNA microssatélite), qPCR (PCR tempo real) (BLOK; POWERS, 2009).

Nematoides podem ser identificados também através do uso do código de barras do DNA. A aplicação dessa técnica para a identificação de organismos foi proposta inicialmente nos Estados Unidos, em 2003, com base na percepção existente de que, em um pequeno trecho do genoma do organismo, específico para cada espécie, geralmente o DNA mitocondrial ou DNA ribossômico, haveria variação suficiente para separar as espécies que habitam o planeta atualmente (POWERS, 2004).

Karssen e colaboradores (2004) utilizaram o método de código de barras do DNA para a identificação de *M. minor* em campos de golfe da Inglaterra, País de Gales e Irlanda. Zeng et al. (2012) também utilizaram o código de barras do DNA juntamente com estudos taxonômicos para identificar 29 espécies de nematoides, entre elas *M. graminis*, provenientes de campos de golfe das Carolinas do Norte e do Sul (EUA).

McClure et al. (2012) utilizaram a técnica de RFLP para diferenciar nematoides das espécies *M. marylandi* e *M. graminis*. Além disso, também utilizaram o código de barras do DNA e estudos filogenéticos para a identificação de *M. naasi*, *M. graminis* e *M. marylandi* em 110 campos de golfe dos Estados Unidos. Neste mesmo estudo os autores diferenciaram, através do estudo filogenético da região citocromo oxidase do mtDNA, dois grupos de *M. graminis*, o grupo A composto por populações originárias da Flórida e Arizona (EUA) e China, e grupo B, formado por populações da Califórnia, Arizona e Texas (EUA).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Isolamento da espécie**

Plantas cloróticas provenientes de campo de golfe da cidade de Araras, SP, foram enviadas para o Laboratório de Nematologia do Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP Campus de Botucatu (SP). Nas amostras observou-se presença de fêmeas do gênero *Meloidogyne* com características morfológicas distintas das espécies frequentemente encontradas em análises de rotina. Para estudo completo, os nematoides foram extraídos das raízes pelo método de Coolen & D'herde inoculados em grama da mesma espécie, para se desenvolverem e multiplicarem sendo os vasos mantidos em ambiente controlado. Além dessas, foram utilizadas no estudo amostras de gramas, com sintomas de deficiência nutricional, de diferentes áreas de campo de golfe da cidade de São Paulo encaminhadas ao Laboratório de Nematologia do Instituto Biológico em Campinas (SP). No total foram enviadas quatro amostras, provenientes de diferentes locais da propriedade, dessa maneira trabalhou-se com uma amostra composta de quatro sub-amostras.

Após análise, constatou-se a presença de nematoides do gênero *Meloidogyne* com características semelhantes às observadas na população de Araras (SP). Os nematoides foram extraídos e inoculados em gramas 'Tifdwarf' onde foram mantidos em casa de vegetação.



Dessa maneira, foram utilizadas para o estudo duas populações, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Populações de *Meloidogyne* sp. utilizadas no estudo para as análises morfológicas, morfométricas e moleculares.

População	Origem Geográfica	Plantas hospedeiras
MgARA	Araras- SP	Grama bermuda cv. Tifdwarf
MgSP* -		
Sub. Mg098SP	São Paulo - SP	Grama bermuda cv. Tifdwarf
Sub. Mg099SP	São Paulo - SP	Grama bermuda cv. Tifdwarf
Sub. Mg100SP	São Paulo - SP	Grama bermuda cv. Tifdwarf
Sub. Mg101SP	São Paulo - SP	Grama bermuda cv. Tifdwarf

\*População MgSP composta de 4 sub-populações provenientes da mesma propriedade.

### 3.2 Análises morfométricas e morfológicas

As seguintes etapas do trabalho foram realizadas no laboratório de Nematologia do Instituto Biológico de Campinas. As plantas infestadas com a população de nematoides provenientes de Araras foram transferidas e mantidas juntamente com as de São Paulo em ambiente controlado.

Após a multiplicação, no mínimo 60 dias da inoculação, os nematoides foram extraídos através de dissecação das raízes sob estereomicroscópio. Realizou-se montagem de lâminas temporárias com exemplares ainda vivos de machos e juvenis, sendo que para a população de Araras foram analisados 30 machos e 40 juvenis, para as populações de São Paulo, foram analisados ao todo 40 machos e 40 juvenis. As lâminas de cada população foram identificadas, os espécimes examinados e mensurados em até três dias após a montagem. As mensurações foram realizadas com escala micrométrica em microscópio de luz. As variáveis utilizadas para o estudo da morfometria dos nematoides estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Características morfométricas mensuradas em machos e juvenis das populações de *Meloidogyne* sp. encontradas em gramados de campos de golfe no estado de São Paulo.

Características morfométricas	Sigla
Comprimento total do corpo	L
Maior diâmetro do corpo	Øc
Diâmetro na altura do bulbo	Øb
Diâmetro na altura do poro	Øp
Diâmetro na altura do ânus	Øa
Comprimento do estilete	St
Distância entre a abertura da glândula esofagiana dorsal e a base do estilete	DGO
Distância do poro até a região anterior	P-RA
Região anterior até base do metacorpo	RA-M
Comprimento do metacorpo	Lm
Diâmetro do metacorpo	Øm
Comprimento da cauda	T
Ânus até primórdio (J2)	A-P
Região hialina (J2)	RH
Espículo (machos)	Esp
Gubernáculo (machos)	G
Comprimento do corpo/maior diâmetro do corpo	A
Comprimento do corpo/cauda	C
Comprimento da cauda /diâmetro na altura do ânus	c'
S-E pore/L x 100	SEpore

Após as medições, as lâminas foram documentadas em um sistema de aquisição de imagens digitais constituído por uma câmara digital (Leica DFC 450), montada sobre um microscópio de luz (Leica DM 2500), acoplado a um microcomputador. Foram fotografadas as principais características de juvenis e machos (Figuras 3, 4, 5 e 6). Ademais, foram separadas dez fêmeas de cada população para exame do padrão da região perineal, preparado conforme Taylor & Netscher (1974) (Figuras 7 e 8). Os padrões encontrados foram comparados com as informações já presentes na literatura.

Utilizou-se também a técnica de coloração de raízes com fuccina ácida pelo método de Byrd et al. (1972), para determinar o desenvolvimento dos nematoides no interior das raízes.

### 3.2.1 Análise estatística

As medidas foram organizadas em planilhas do EXCEL, calculando-se para cada variável o valor médio, valores mínimos e máximos e desvio padrão. A seguir, foram realizadas análises multivariadas utilizando componentes principais. A análise dos componentes principais, ACP ou PCA (do inglês *Principal Component Analysis*) é um método que tem por finalidade básica a análise dos dados usados visando sua redução, eliminação de sobreposições e a escolha das formas mais representativas de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais. É uma maneira de identificar a relação entre as características extraídas de dados (VASCONCELOS, 2007). No teste de PCA deve-se levar em conta a distância a partir do centro do eixo, já que está representa a importância da variável dentro do conjunto, ou seja, quanto menor a distância menor sua relevância na análise. As direções dos vetores também devem ser observadas, já que indicam o sentido da relação, positiva (ângulos menores que 180 °C) ou negativa (ângulos de/ou próximos da 189°C) entre as variáveis (MORA-AGUILERA; CAMPBELL, 1996).

Assim, o presente estudo permitiu reunir os espécimes com características semelhantes em diferentes grupos, de tal forma a existir máxima homogeneidade dentro deles e máxima heterogeneidade entre eles. Para isso, foi necessário utilizar o maior número possível de variáveis.

As análises foram realizadas com o auxílio do Software PCA (Community Analyses Package, PISCES Conservation Ltd, Lymington, UK), utilizando a estrutura da matriz de correlação e um gráfico. Foram utilizadas seis variáveis para machos e sete para juvenis. Nas análises visando a comparação da morfometria, foram incluídos dados morfométricos de populações de *M. graminis*, *M. marylandi* (somente J2, pois não há machos descritos nessa espécie), *M. graminicola*, *M. naasi*, *M. minor* e *M. sasseri*, nematoides considerados importantes em gramados de campos de golfe, conforme Tabela 3 e 4.

Tabela 3 Variáveis de espécies de *Meloidogyne* utilizadas para a comparação morfométrica de machos das populações de *Meloidogyne* sp. encontradas em gramados de Araras - SP (MgARA) e em São Paulo - SP (MgSP).

Variável	Espécies de <i>Meloidogyne</i>						
	<i>M. graminis</i> <sup>1</sup>	<i>M. graminis</i> <sup>2</sup>	<i>M. graminis</i> <sup>3</sup>	<i>M. graminicola</i> <sup>4</sup>	<i>M. naasi</i> <sup>5</sup>	<i>M. minor</i> <sup>6</sup>	<i>M. sasseri</i> <sup>7</sup>
	1512	1248	1456	1222	1148	1045	1746
Øc	34,8	34,8	36,0	29,8	30,0	26,9	43,8
St	18,4	18,1	18,5	16,8	18,0	17,8	20,0
Esp	28,2	27,4	30,0	28,1	28,0	25,6	33,0
G	7,8	8,0	7,4	6,1	6,0	6,1	8,6
a	43,5	36,0	41,0	41,0	40,0	36,0	39,9

<sup>1</sup>SLEDGE; GOLDEN (1964); <sup>2</sup>WHITEHEAD (1968); <sup>3</sup>PERICHI et al. (2006); <sup>4</sup>GOLDEN; BIRCHFIELD (1965); <sup>5</sup>FRANKLIN (1965); <sup>6</sup>KARSSSEN (2004); <sup>7</sup>HANDOO et al. (1993).

Tabela 4. Variáveis de espécies de *Meloidogyne* utilizadas para a comparação morfométrica de juvenis das populações de *Meloidogyne* sp. encontradas em Araras - SP (MgARA) e em São Paulo - SP (MgSP).

Variável	Espécies de <i>Meloidogyne</i>													
	<i>M. graminis</i> <sup>1</sup>	<i>M. graminis</i> <sup>2</sup>	<i>M. graminis</i> <sup>3</sup>	<i>M. graminis</i> <sup>4</sup>	<i>M. marylandi</i> <sup>5</sup>	<i>M. marylandi</i> <sup>6</sup>	<i>M. marylandi</i> <sup>7</sup>	<i>M. marylandi</i> <sup>8</sup>	<i>M. naasi</i> <sup>9</sup>	<i>M. graminicola</i> <sup>10</sup>	<i>M. graminicola</i> <sup>11</sup>	<i>M. minor</i> <sup>12</sup>	<i>M. sasse</i> <sup>13</sup>	<i>M. sasse</i> <sup>14</sup>
L	475,0	463,0	411,7	392,4	424,6	370,1	395,1	392,3	431,9	443,0	441,0	377,0	554,3	619,6
Øc	15,0	13,7	14,7	15,9	14,8	15,2	16,2	15,7	15,0	13,3	17,8	13,3	17,4	18,6
St	12,6	12,4	11,9	11,7	11,4	11,2	10,8	12,9	11,1	10,3	11,4	9,2	13,7	13,7
T	68,0	76,0	61,1	61,0	60,6	54,9	57,9	63,7	53,9	68,7	70,9	54,1	93,4	105,3
RH	14,0	18,9	11,7	11,5	11,8	11,4	11,5	12,3	22,1	20,9	17,9	16,1	18,8	21,5
a	31,1	33,9	28,1	24,9	28,8	24,5	24,5	25,0	28,8	33,5	24,8	28,4	31,1	33,2
c	5,7	6,1	6,8	6,5	7,0	6,7	6,8	6,2	8,0	6,5	6,2	5,7	5,8	5,8

<sup>1</sup>SLEDGE;GOLDEN (1964); <sup>2</sup> WHITEHEAD (1968); <sup>3</sup> e <sup>4</sup> ZENG et al. (2012); <sup>5</sup>, <sup>6</sup> e <sup>7</sup> GOLDEN (1989); <sup>8</sup> OKA (2013); <sup>9</sup> FRANKLIN (1965); <sup>10</sup> GOLDEN; BIRCHFIELD (1965); <sup>11</sup> PASCUAL et al. (2014); <sup>12</sup> KARSSSEN (2004); <sup>13</sup> e <sup>14</sup> HANDOO et al. (1993).

### 3.3 Estudos bioquímicos

Para a identificação da espécie, foi utilizada também a técnica de eletroforese de isoenzimas. Para isso, dez fêmeas branco-leitosas foram extraídas delicadamente do interior das raízes, com auxílio de agulhas sob estereomicroscópio de luz, de maneira que permanecessem intactas até o momento da análise. Em seguida, foram transferidas para um microtubo contendo solução extratora (20% de sacarose, 2% de Triton X-100 e 78% água destilada) e então acondicionadas em freezer até o momento da corrida eletroforética. A metodologia utilizada no estudo dos padrões de esterase para identificação de espécies do gênero *Meloidogyne* seguiu-se o protocolo relatado por Oliveira et al. (2012). A corrida eletroforética dos extratos protéicos foi realizada em gel vertical de poliacrilamida a 6% e como referência utilizou-se o padrão de *M. javanica*.

A eletroforese foi conduzida em um refrigerador com temperatura de 10°C, sob voltagem de aproximadamente 150 V, a migração foi acompanhada através da linha frontal de azul de bromofenol a 0,1%, adicionado às amostras. A corrida eletroforética ocorreu em cerca de 90 minutos.

Após o fim da corrida, retirou-se o gel das placas com auxílio de espátula, mergulhando-o em solução corante, onde permaneceu por cerca de duas horas, em seguida, colocado na solução descorante e os resultados foram observados em transiluminador.

### 3.4 Estudos moleculares

#### 3.4.1 Extração do DNA

O DNA genômico de um único indivíduo das populações MgARA e MgSP foi extraído através de uma versão modificada do método descrito por Holterman et al. (2006). Dessa forma, primeiramente em um tubo de microcentrífuga (0,6 ml) foram diluídos 25 µl de solução de lise denominada HLB (*Holterman Lysis Buffer*), que contém os seguintes reagentes necessários para a reação: proteinase K 800 µg/ml, β-mercaptoetanol 1% (v/v), NaCl 0,2M e Tris HCl 0,2M pH 8, em 25 µl de água mili-Q, totalizando 50 µl. A seguir, sobre uma lâmina de vidro, foi adicionada uma gota dessa solução (5 µl), na qual os nematoides foram seccionados individualmente em três partes

e colocados separadamente em um novo tubo de microcentrífuga (0,2 ml). Utilizou-se o restante da solução (45 µl) para a limpeza da lâmina, sendo posteriormente adicionado ao tubo de microcentrífuga contendo o nematoide seccionado. As amostras foram levadas ao termociclador e encubadas a 65°C, 2 h e 99°C, 5 min., sendo mantidas à -20°C após o resfriamento.

### 3.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Utilizou-se o protocolo descrito por Al-Banna et al. (2004) para amplificação do DNA por PCR. Dessa forma, adicionou-se a um tubo de microcentrífuga 12,5 µl de *Gotaq Hot Start* (Promega, São Paulo, Brasil) que contém os seguintes reagentes necessários para a reação: 5 U/µl *Taq*, 100 µM de cada dNTP e 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 3,5 µl de *Nuclease Free Water* (Promega), 1 µl de cada primer [10 mM] e 1 µl de DNA genômico de cada indivíduo, totalizando o volume final de 25 µl por reação. As condições da PCR utilizadas foram: 95°C por 3 min., seguido por 35 ciclos de 95°C por 1 min., 68°C por 1 min., 72°C por 1 min., e extensão final à 72°C por 7 min.

Foram utilizados primers de acordo com a região de interesse a ser amplificada, sendo esses D2A (5'- ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG -3'), D3B (5'- TCGGAAGGAACCAGCTACTA -3'), da região 28S do rDNA; C2F3 (5'- GGTCAATGTTCAGAAATTTGTGG -3'), MRH106 (5'- AATTTCTAAAGACTTTTCTTAGT -3'), região CO-II do mtDNA; F02 (5'- GGAAGGGCACCACCAGGAGTGG- 3'), R81 (5'- TGATCCWKCYGCAGGTTTAC- 3'); BL18 (5'- CCCGTCGMTACTACCGATT -3'), 5818 (5'- ACGARCCGAGTGATCCAC-3') (CASTILLO et al., 2009; POWERS; HARRIS, 1993; STANTON et al., 1997).

Com objetivo de confirmar a amplificação, foi realizada eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TBE 1X, utilizando cinco microlitros do produto da PCR. Após a corrida, o gel foi corado e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

### 3.4.3 Sequenciamento e análises filogenéticas

O produto obtido da amplificação foi purificado utilizando-se o kit de purificação de DNA ‘Ultraclean PCR Clean-Up’ (MO BioLaboratories, Carlsbad-CA, USA), de acordo com o protocolo do fabricante.

O sequenciamento do DNA das regiões amplificadas foi realizado no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, na cidade de São Paulo-SP, de acordo com os procedimentos descritos por Oliveira et al. (2009).

As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com auxílio do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (versão 7.0.4.1; Hall, 1999) tendo por finalidade a identificação de polimorfismo nas sequências nucleotídicas. As sequências consenso das populações MgARA e MgSP foram comparadas às sequências de outras espécies de nematoides depositadas no banco de dados do ‘*National Center for Biotechnology Information*’ (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a identificação de homologia, utilizou-se o programa BLASTN 2.2.19+ (ZHANG, et al., 2000).

Com os alinhamentos múltiplos entre as diferentes sequências da região D2/D3 e CO-II realizou-se edição manual através do programa *Bio Edit Sequence Aligment*, em que as colunas filogeneticamente não informativas foram excluídas das análises. As análises filogenéticas foram realizadas no programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013), utilizando-se modelo original de substituição de Hasegawa-Kishino-Yano e análises de bootstrap a partir de 1000 repetições. Sequências de *Pratylenchus vulnus* foi selecionada como grupo externo para a região D2/D3 (GI:365192982) e *Meloidogyne enterolobii* para CO-II (FJ159617).



## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Morfometria**

Os dados obtidos na morfometria de machos e juvenis das populações MgARA e MgSP, podem ser observados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente, nas quais constam os valores médios de cada variável mensurada, o valor mínimo e máximo das medidas encontradas nos indivíduos e o desvio padrão.

Tabela 5. Dados morfométricos de machos das populações de *Meloidogyne* sp. encontradas em campos de golfe de Araras (MgARA) e São Paulo (MgSP).

Variável	Machos MgARA			Machos MgSP		
	Média	Min-Max	Desvio	Média	Min-Max	Desvio
L	1269,7	900-1705	240	1288,7	1035-1500	175,4
Øc	36,6	25-47,5	5	32,8	26,8-37,5	3,5
Øb	16,3	13,7-20	2	16,0	14,3-18,1	1,5
Øp	27,9	22,5-42,5	5	25,7	22,5-28,7	2,3
Øa	23,3	17,5-30	3	23,9	20,6-26,8	2,3
St	15,5	13- 17	1	15,2	13,5-16,5	0,9
DGO	3,4	2,5-5	1	2,7	2-3,3	0,6
P-RA	132,9	100-152,5	15	127,0	108,1-149,3	15,2
RA-M	74,6	61-90	9	95,5	66-91,2	9,4
Lm	17,0	13-22	3	16,6	14,2-20,5	2,9
Øm	10,9	10-14	1	10,3	9,5-11,2	0,8
T	26,3	20-37,5	5	29,5	25-35,6	4,0
Esp	30,7	27-34	2	28,3	25,5-30,7	3,4
G	6,3	4-8	1	6,8	6,6-7	0,2
A	34,8	23,1- 45,4	6	39,9	33,4-44,6	4,3
C	0,0	0,01-0,04	0	0,02	0,01-0,02	0,0
S-E pore	10,8	7,3-15,8	2	9,9	8,6-11,7	1,2

Tabela 6. Dados morfométricos de juvenis das populações de *Meloidogyne* sp. encontradas em campos de golfe de Araras (MgARA) e São Paulo (MgSP).

Variável	J2 MgARA			J2 MgSP		
	Média	Min-Max	Desvio	Média	Min-Max	Desvio
L	413,7	365-475	22,6	395,8	325-442,5	40,51
Øc	16,0	13- 18	1,2	15,2	13,5-16,5	1,40
Øb	9,3	8- 10	0,5	9,5	9-11,5	0,67
Øp	14,3	12-16	1,0	13,5	12,5-14	0,46
Øa	10,8	9-13	0,9	10	9-11,5	0,78
St	10,3	9-12	0,9	9,8	9-10,5	0,34
DGO	3,2	2-4	0,5	2,6	2-3,25	0,54
P-RA	71,9	62-90	5,9	68,3	59-72,5	3,32
RA-M	49,2	40-55	3,1	46,1	40-51,5	3,42
Lm	12,5	10-15	1,4	12,9	11-14,5	1,15
Øm	8,4	7 – 8	11,5	8,1	7-9	0,68
T	68,5	52 – 76	4,5	71	61,5-77,5	3,74
A-P	93	85 – 98	5,1	113	113-113	0
RH	13,2	10 – 17	1,8	15,4	12,5-17,5	1,02
A	25,8	21,1 – 31,6	2,5	26,4	21,5-31	3,67
C	6,0	5,5 – 7,7	0,4	5,5	4,5-7	0,67
c'	6,3	4,7 – 8,1	0,7	7,1	6,1-7,9	0,56
SEpore	17,4	13,7 – 22,5	1,7	17,4	14,8-20,8	1,82

## 4.2 Análises estatísticas

A partir dos resultados obtidos com a morfometria, foi possível realizar a análise estatística multivariada, através de PCA. Os resultados obtidos com a análise de machos e juvenis podem ser observados nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

Com a análise dos gráficos observa-se que não houve um agrupamento bem definido para cada espécie. MgARA e MgSP ficaram próximas às populações de *M. graminis*, *M. graminicola* e *M. marylandi*, porém populações das mesmas espécies ficaram distantes umas das outras. Embora a análise de PCA seja eficiente, nesse caso não foi possível afirmar com segurança a que grupo as populações analisadas pertencem.

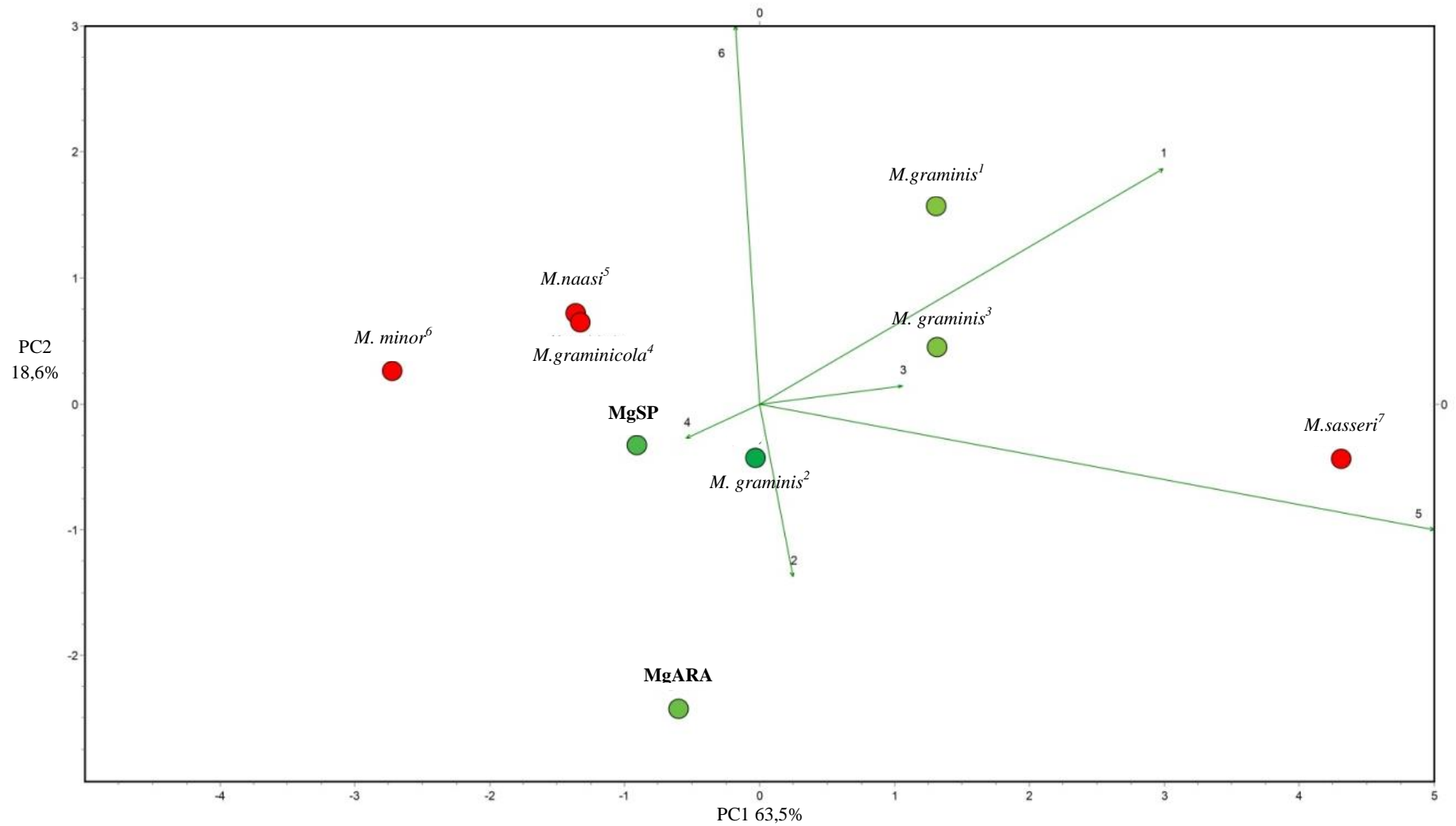


Figura 1. Análise de PCA. Comparação entre os dados morfométricos de machos das populações de *Meloidogyne* sp. estudadas com populações de outras espécies associadas à grama. *Meloidogyne graminis* em verde, sendo MgARA e MgSP as populações de estudo; demais espécies em vermelho.

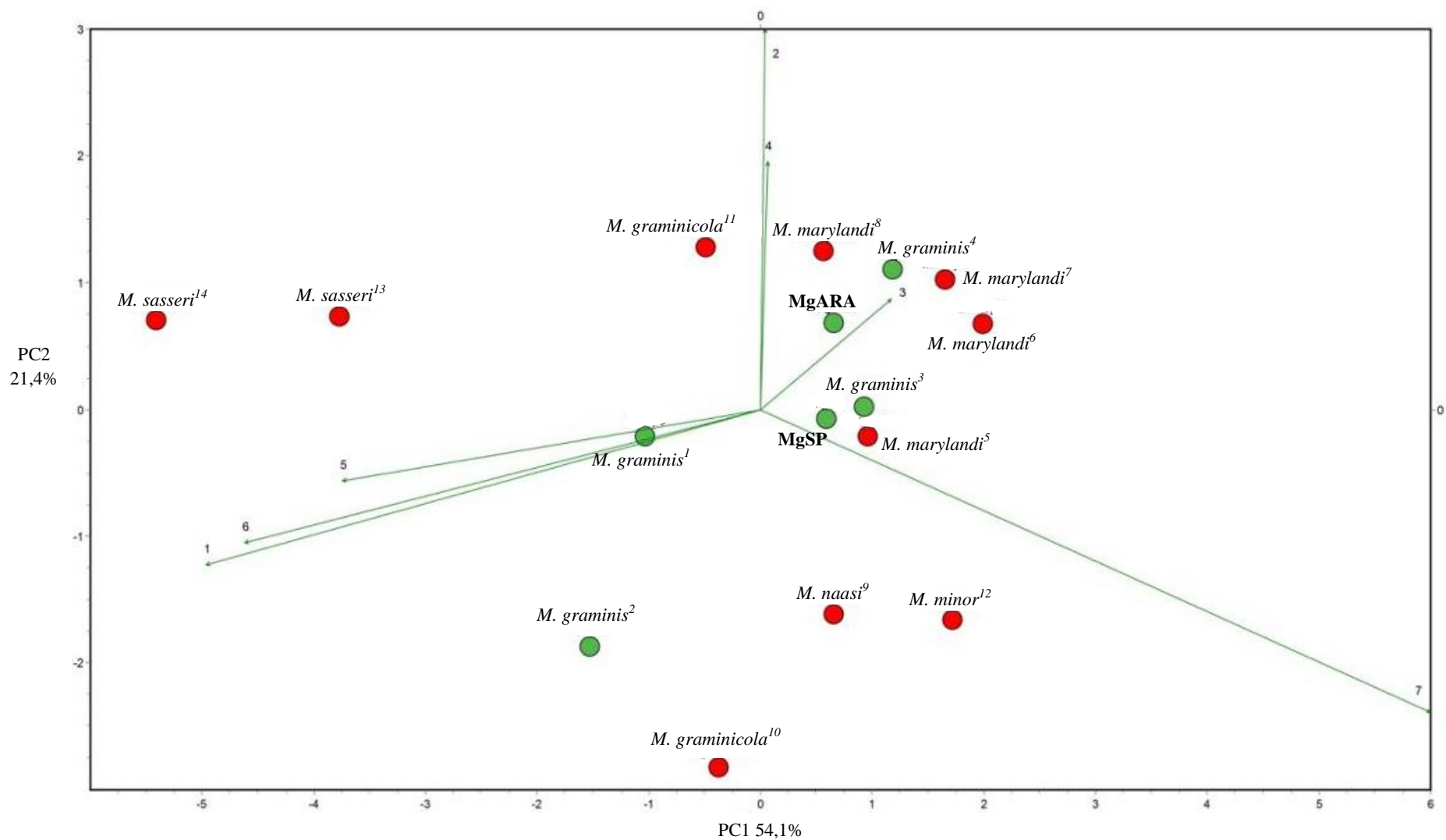


Figura 2. Análise de PCA. Comparação entre os dados morfométricos de juvenis das populações de *Meloidogyne* sp. estudadas com populações de outras espécies associadas à grama. *Meloidogyne graminis* em verde, sendo MgARA e MgSP as populações de estudo; demais espécies em vermelho.

### 4.3 Morfologia

Os aspectos morfológicos mais marcantes, utilizados como suporte na identificação de *Meloidogyne* spp., de indivíduos em estágio juvenil (J2) e machos das populações MgARA e MgSP foram fotografados e estão ilustrados nas Figuras 3, 4, 5 e 6.

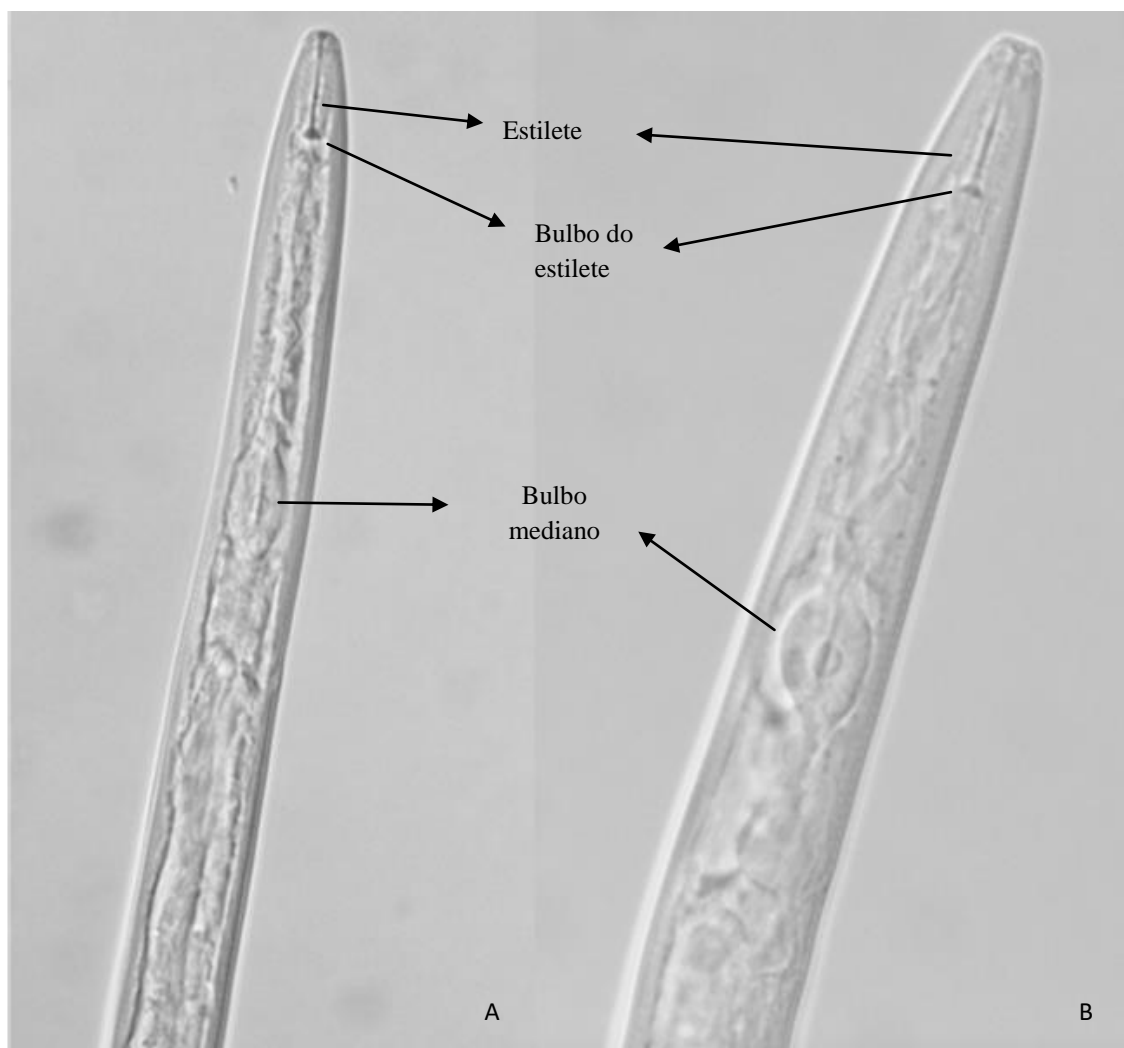


Figura 3. Região anterior de juvenis (J2) da população MgARA (Figura 3A) e MgSP (Figura 3 B).

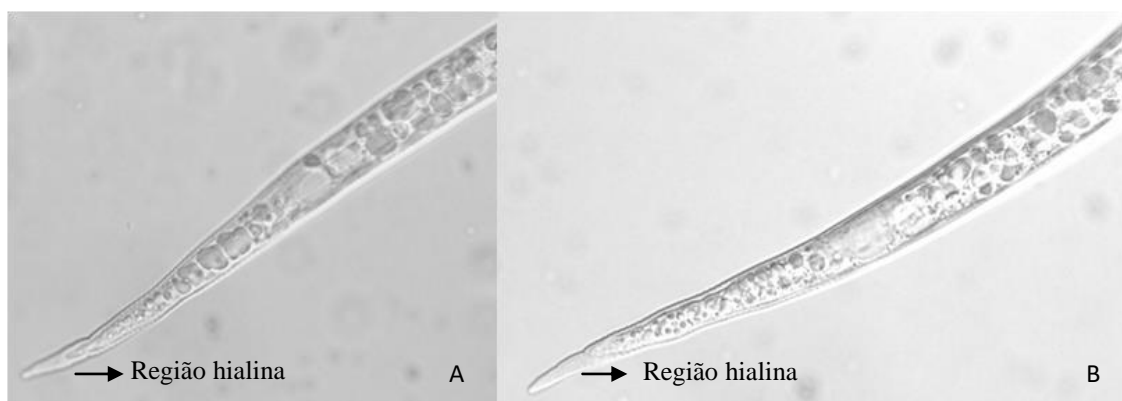


Figura 4. Região posterior de juvenis (J2) da população MgARA (Figura 4A) e MgSP (Figura 4B).

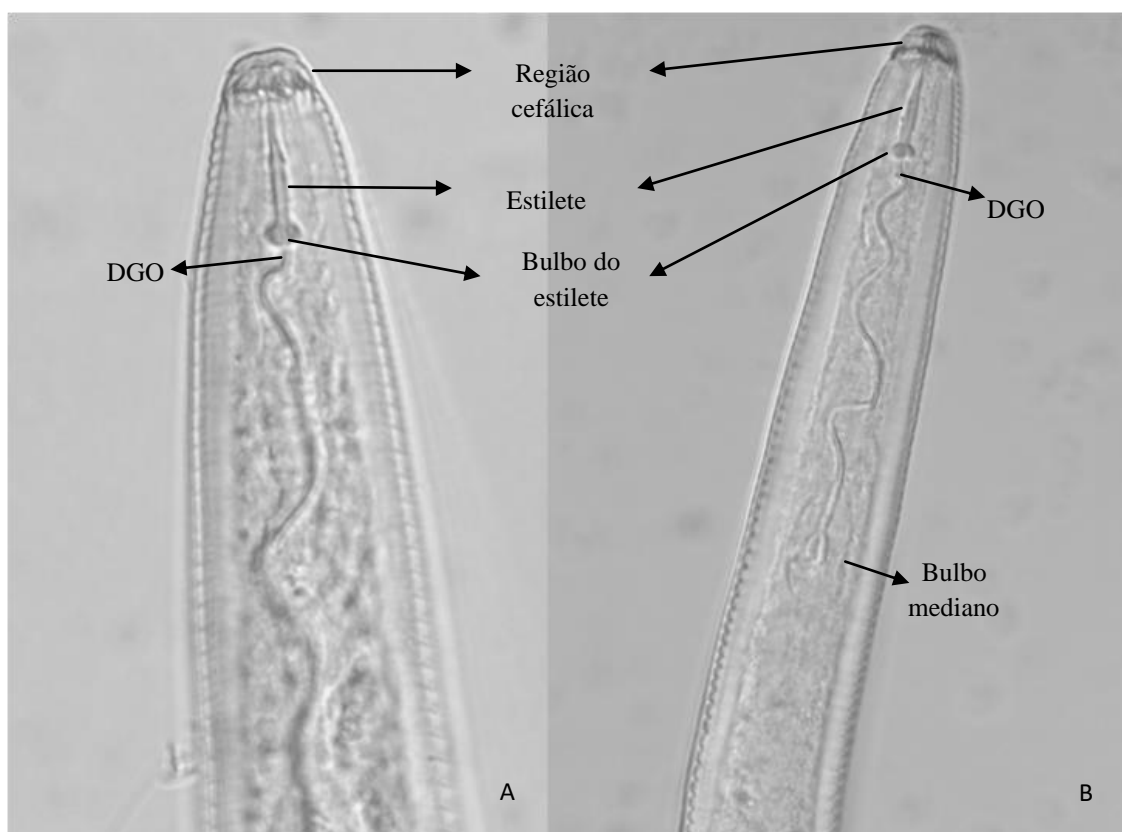


Figura 5. Região anterior de machos da população MgARA (Figura 5A) e MgSP (Figura 5B).



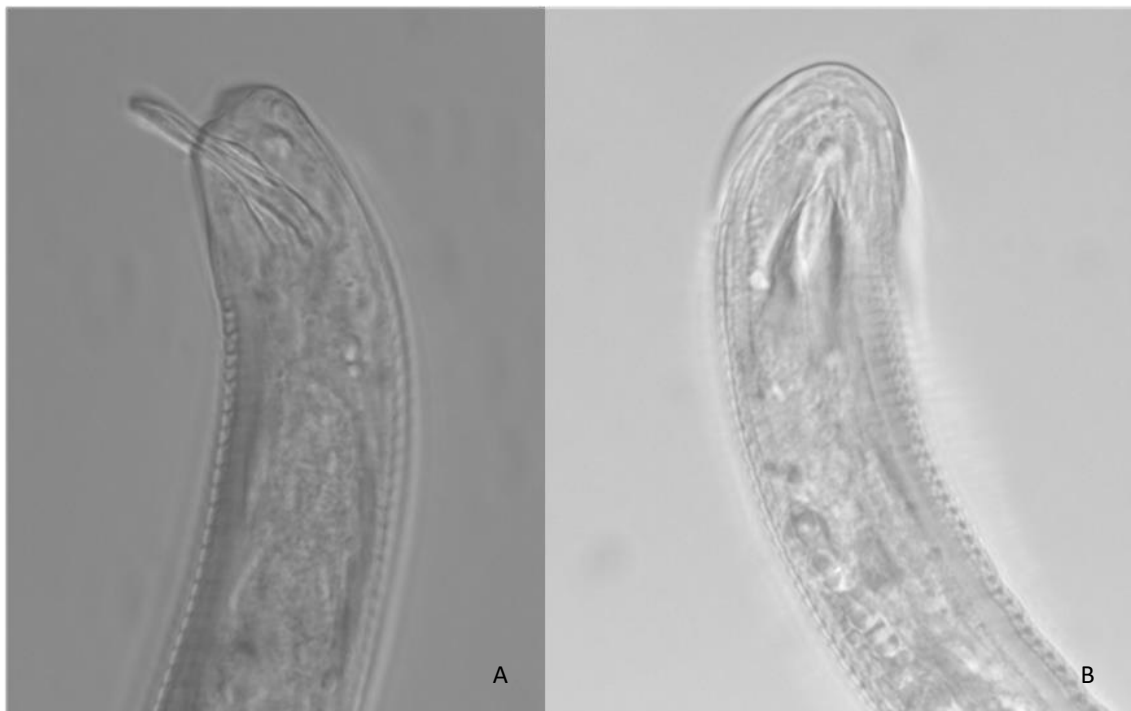


Figura 6. Região posterior de machos da população MgARA (Figura 6A) e MgSP (Figura 6B).

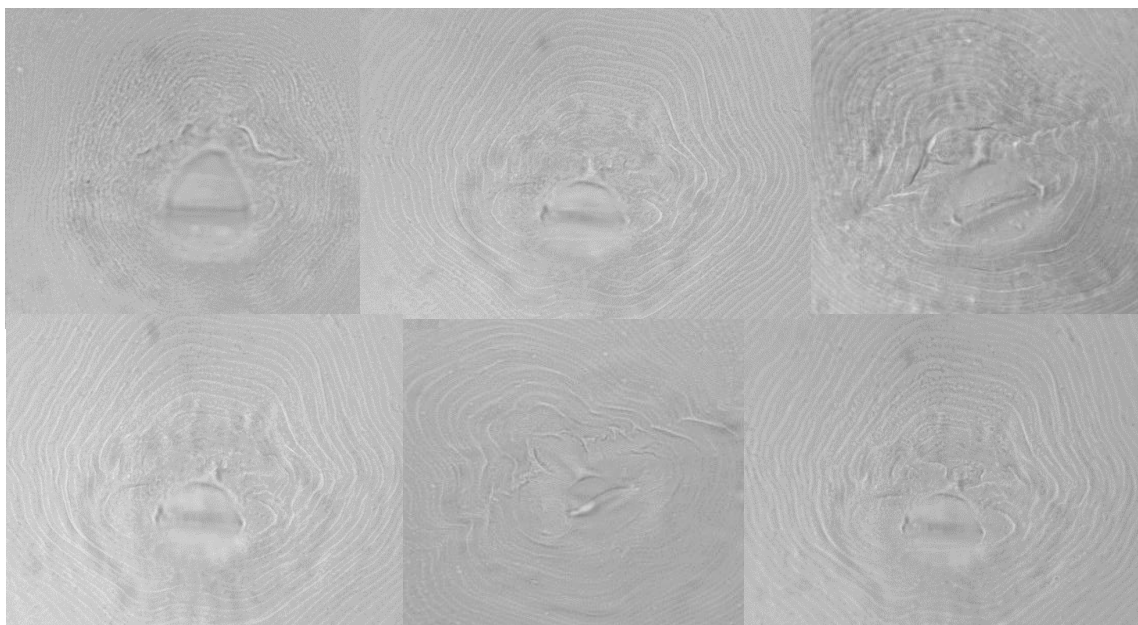


Figura 7. Imagens de regiões perineais de fêmeas da população de *Meloidogyne* sp. encontradas em campos de golfe da cidade de São Paulo.

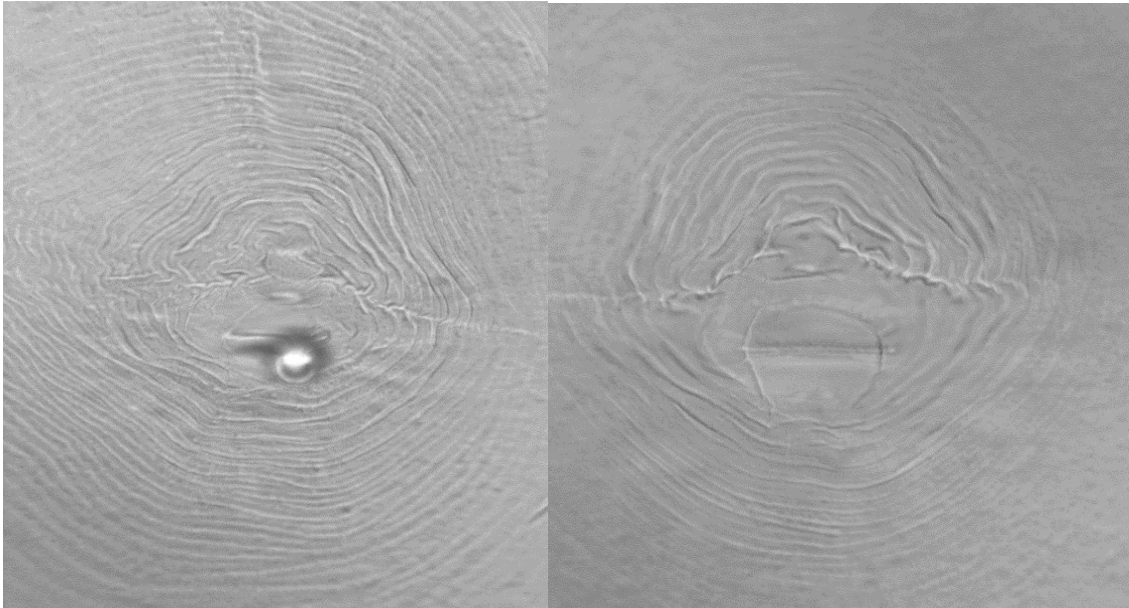


Figura 8. Imagens de regiões perineais de fêmeas da população de *Meloidogyne* sp. encontradas em campos de golfe da cidade de Araras.

Os J2s de *M. graminis* apresentam características típicas de juvenis do gênero *Meloidogyne*, corpo vermiforme e cilíndrico que se afina consideravelmente em direção a extremidade posterior. Cauda fina, com presença de região hialina e ânus evidente. (Figura 4A e B). Na região anterior esta presente um estilete delicado com bulbos arredondados, região DGO bem marcada assim como o poro excretor. Bulbo mediano alongado com válvula bem definida (Figura 3A e B).

Os machos encontrados nas populações estudadas apresentam corpo vermiforme e alongado, presença de estrias na cutícula e campo lateral com quatro linhas. Estilete longo e robusto, bulbos do estilete arredondados, região cefálica alta, bulbo mediano alongado com válvula bem desenvolvida. Na região posterior presença de um par de espículos sustentados pelo gubernáculo, extremidade da cauda com variações, mas na maioria dos casos, arredondada (Figuras 5 A e B e Figura 6 A e B).

As fêmeas encontradas nas populações MgARA e MgSP apresentam corpo esbranquiçado e oval, região anterior longa e corpo revestido por um cutícula muito fina. Os bulbos do estilete são arredondados, esôfago bem desenvolvido, bulbo mediano grande e arredondado com válvula bem desenvolvida. O padrão da região perineal

apresenta linhas laterais definidas e arco dorsal alto, presença de estrias lisas, ausência de pontuações acima do ânus (Figuras 7 e 8).

#### 4.4 Sintomas



Figura 9. Sintomas do ataque de *Meloidogyne* sp. (população MgSP) em gramado de campo de golfe da cidade de São Paulo. Manchas em reboleira caracterizadas por plantas com desenvolvimento insatisfatório, menores e cloróticas.



Figura 10. Raízes de gramas das populações MgARA e MgSP coradas com fuccina ácida. Nas figuras A a E observa-se juvenis em estágio salsichoide (J) estabelecendo o sítio de alimentação (S.A.) no interior das raízes. Nas figuras F a H observa-se um leve engrossamento das raízes (S.A.) causado pela alimentação das fêmeas (F).

Os sintomas observados nas raízes de gramas das populações estudadas são característicos do ataque dos nematoides das galhas, manchas em reboleira caracterizadas por plantas com desenvolvimento insatisfatório, menores e cloróticas (Figura 9). Plantas do interior das reboleiras apresentavam sintomas de deficiência nutricional e sistema radicular danificado. Na Figura 10A a E, observa-se juvenis no interior das raízes de grama, em busca de local ideal para o estabelecimento do sítio de alimentação. Cabe ressaltar que, não foi observada a formação de galhas radiculares típicas nas raízes de gramas estudadas, porém, notou-se um engrossamento sutil nos pontos de alimentação das fêmeas (Figura 10F, G e H).

#### **4.5 Estudos bioquímicos**

Foi realizada eletroforese de isoenzimas para a identificação da espécie através do padrão esterase, essa isoenzima foi utilizada pois é a que possui mais informações na literatura. Não houve migração das amostras das populações MgARA e MgSP no gel de agarose. Já no padrão, *M. javanica*, as bandas apareceram perfeitamente. O teste foi repetido por três vezes, apresentando o mesmo resultado.

#### **4.6 Estudos moleculares**

Não foi possível utilizar os dados obtidos do seqüenciamento do DNA da população MgSP, pois as sequências não apresentaram qualidade suficiente para dar continuidade aos estudos. Já para MgARA, foram utilizadas sequências dos trechos CO-II e 28S. As sequências obtidas com os demais primers, não foram utilizadas devido a má qualidade.

##### **4.6.1 Sequenciamento e alinhamento**

As sequências obtidas das regiões CO-II e 28S da população MgARA, foram alinhadas com sequências de outras populações de *Meloidogyne* presentes no GenBank (Apêndice, Figuras 1 e 2). Os códigos e as espécies utilizadas na comparação podem ser consultados nas Tabelas 1 e 2 do Apêndice. Este alinhamento foi a base para os estudos filogenéticos realizados no presente trabalho.

#### 4.6.2 Código de barras do DNA (*DNA Barcode*)

A comparação das sequências das regiões D2/D3 do 28S rDNA e CO-II do mtDNA da população MgARA com sequências de espécies de nematoides depositadas no GenBank, resultou na primeira conclusão segura em relação a identificação da espécie. Baseando-se na comparação realizada, concluiu-se que o nematoide presente nos campos de golfe da cidade de Araras trata-se de *M. graminis*, pois apresentou alto grau de similaridade com populações desta espécie provenientes dos Estados Unidos. Na comparação da região CO-II, pode-se observar uma pequena diferença entre *M. graminis* e *M. marylandi*, pois a homologia foi de 99% e 98% (Tabela 8), respectivamente, o que poderia gerar dúvidas em relação à identificação, porém, se desconhece a presença de machos na espécie *M. marylandi*, e na população MgARA estudada houve uma incidência muito alta de machos nas amostras. Além disso, a comparação de sequências da região 28S cessa as dúvidas, já que a homologia entre a população de *M. graminis* (JN241915.1) e a população MgARA foi de 100%, enquanto que com *M. marylandi* foi de apenas 84% (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7. Comparação da sequência parcial da região 28S do rDNA da população de *Meloidogyne* proveniente da cidade de Araras (SP), com sequências de outras espécies depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a identificação de homologia (% de identidade genética).

Espécies	% de identidade	Código de acesso no GenBank
<i>M. graminis</i> (EUA)	100	JN241915.1
<i>M. graminis</i>	95	JN241922.1
<i>M. marylandi</i>	84	KC473862.1
<i>M. marylandi</i>	83	JN241917.1

Tabela 8. Comparação da sequência parcial da região CO-II do mtDNA da população de *Meloidogyne* proveniente da cidade de Araras (SP), com sequência de outras espécies depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a identificação de homologia (% de identidade genética).

Espécies	% de identidade	Código de acesso no GenBank
<i>M. graminis</i> (EUA)	99	JN019329.1
<i>M. marylandi</i>	98	JN019350.1
<i>M. ethiopica</i>	91	KF482372.1
<i>M. hispanica</i>	91	EU443606.1
<i>M. javanica</i>	91	JQ317915.1
<i>M. minor</i>	90	KC241977.1
<i>M. enterolobii</i>	90	KP411230.1
<i>M. incognita</i>	90	JQ317917.1
<i>M. fallax</i>	89	JN157848.1
<i>M. arenaria</i>	89	KF112873.1

### 4.6.3 Análises filogenéticas

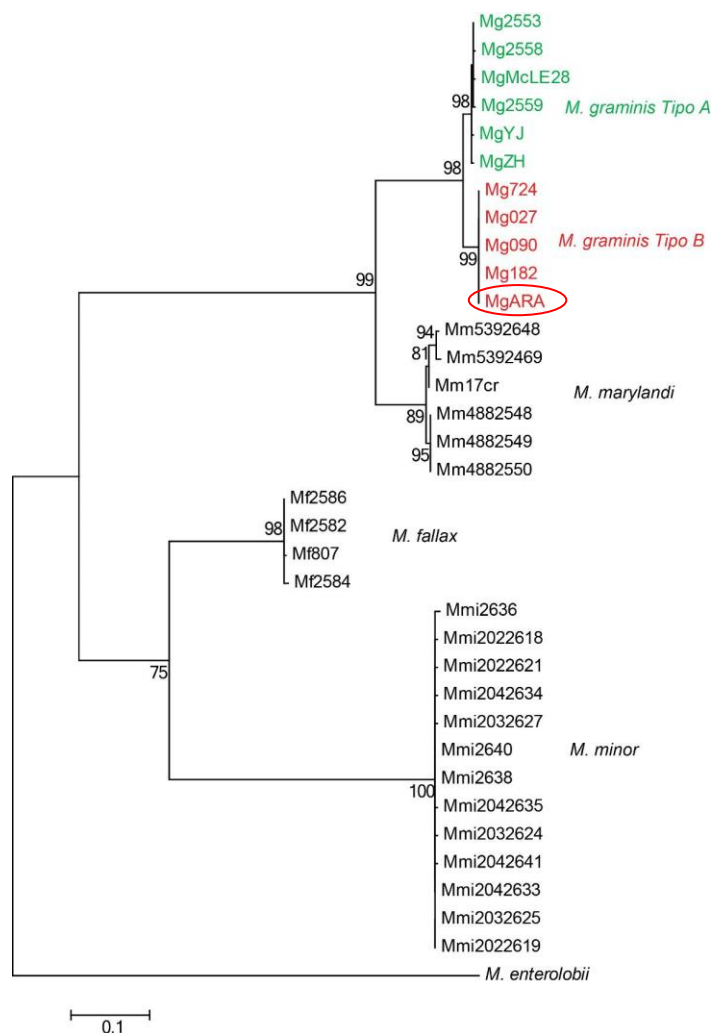


Figura 11. Árvore filogenética mostrando as relações entre as espécies de *Meloidogyne* baseada nas sequências da região CO-II do mtDNA. *M. enterolobii* foi utilizada como grupo externo (FJ159617).

Analisando a árvore filogenética (Figura 11) fica evidente que a população MgARA se agrupou com a espécie *M. graminis* do tipo B, juntamente com populações provenientes da Califórnia e Arizona, Estados Unidos. Observa-se ainda a proximidade filogenética de *M. graminis* com *M. marylandi*, que formaram grupos muito próximos. Esse resultado concorda com as análises realizadas até o momento, sendo fundamental para confirmar a identificação da espécie.

Na árvore filogenética proveniente da região 28S (Figura 12), também ficou clara a divisão dos grupos e MgARA novamente se juntou as populações da espécie *M. graminis*, o que reafirma a identificação da população de estudo e demonstra que as regiões do DNA escolhidas no trabalho contem informações suficientes para a identificação da espécie.



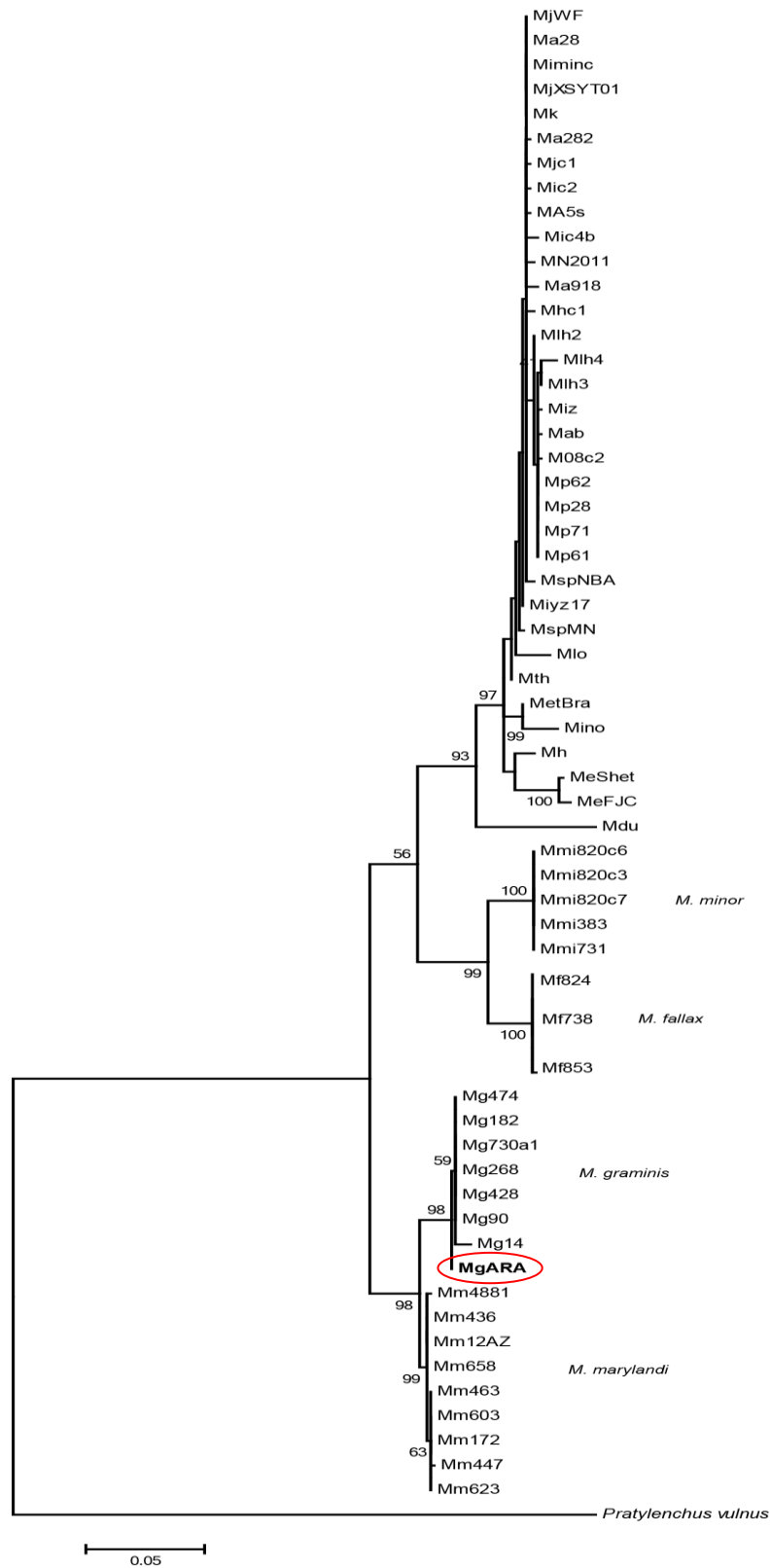


Figura 12 - Árvore filogenética mostrando as relações entre as espécies de *Meloidogyne* baseada nas sequências da região D2/D3 do gene 28S do rDNA. *Pratylenchus vulnus* foi utilizado como grupo externo (GI:365192982).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Sintomas

Os sintomas observados nos locais de infestação por MgARA e MgSP são típicos de nematoides das galhas, os gramados dos campos de golfe apresentaram reboleiras compostas de plantas menores e cloróticas. O parasitismo deste nematoide dificulta a absorção de água e nutrientes necessários para o bom desenvolvimento da planta, por esse motivo os sintomas se confundem com os de deficiência nutricional (DROPKIN, 1989). De acordo com Entwistle (2003), além de prejudicar significativamente a aparência dos campos de golfe, principalmente em áreas de ‘Greens’, esses sintomas podem interferir no andamento dos jogos, já que a trajetória da bola pode ser prejudicada devido à desuniformidade do gramado pela presença de reboleiras.

É importante ressaltar que não foram observadas galhas evidentes nas raízes de gramas estudadas, em alguns casos apenas um leve engrossamento foi notado. Essa característica também foi relatada por Mitkowski (2001), durante suas pesquisas com *M. graminis* presente em campos de golfe dos Estados Unidos.

## 5.2 Morfometria e Morfologia

Os nematoides formadores de galhas, pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, são considerados os fitoparasitas de maior importância do mundo (KARSSSEN; MOENS, 2006) e por esse motivo trata-se do grupo de nematoides mais estudado. Atualmente, diversas ferramentas vêm sendo utilizadas para a identificação rápida e segura das espécies, já que estas apresentam considerável variedade genética e morfométrica, intra e interespecíficas. No presente estudo não foi diferente, as populações estudadas apresentaram diferenças morfológicas entre elas e dentro delas. Os dados morfométricos de machos de *M. graminis* das populações MgARA e MgSP diferem dos dados da descrição original (SLEDGE; GOLDEN, 1964), assim como a morfometria dos juvenis estudados. As mensurações foram comparadas com os dados de outras populações e espécies presentes na literatura (Tabelas 3 e 4), para isso foi realizada a análise de PCA, que demonstrou que devido à variabilidade no tamanho das estruturas medidas não houve agrupamento definido de nenhuma das populações estudadas e nem mesmo das citadas na literatura (Figuras 1 e 2). Pode-se perceber uma sobreposição de dados entre as espécies *M. graminis* e *M. marylandi*, por esse motivo estas formaram um único grupo na análise de PCA. Isso revela a semelhança que há entre essas duas espécies de nematoides presentes em gramas, o que pode levar a erros durante a identificação morfométrica e morfológica. No entanto, observa-se na análise de PCA de juvenis, que a população brasileira MgARA ficou próxima à população MgR (*M. graminis* proveniente dos Estados Unidos). A característica responsável pela proximidade dessas populações foi o tamanho do estilete, medindo 10,4 e 11,7  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Na mesma análise de PCA, a população MgSP também ficou próxima a uma população de *M. graminis* dos Estados Unidos, MgAv, o que se assemelha nessas populações é o valor da variável c (comprimento do corpo/cauda), 5,5 $\mu\text{m}$  na população brasileira e 6,8 $\mu\text{m}$  na norte americana.

As variações morfométricas apresentadas nas populações estudadas podem ser consideradas comuns, já que são provenientes de locais diferentes e não se sabe a origem das mesmas. Segundo Hunt e Handoo (2009), os caracteres morfométricos e morfológicos tendem a variar sob a influência de condições geográficas e ecológicas.

Na diferenciação de *Meloidogyne* spp., os caracteres morfológicos têm sido utilizados com mais frequência que os morfométricos, já que esses podem ser mais afetados pelas condições ambientais (HUNT; HANDOO, 2009). A configuração da região perineal de fêmeas maduras é uma das principais técnicas de identificação através da morfologia, já que esta apresenta estrias características de cada espécie (FERRAZ; MONTEIRO, 1995). Nas populações estudadas o padrão da região perineal se mostrou bastante semelhante entre si, assim como com o padrão da descrição desta espécie. Porém, apesar de ainda ser largamente utilizada na rotina dos laboratórios de nematologia brasileiros, principalmente pelo seu baixo custo, esta técnica, quando usada isoladamente na identificação de espécies, não apresenta resultados completamente confiáveis. Sendo assim, os padrões perineais devem ser utilizados como um complemento a caracterização enzimática ou molecular (CARNEIRO, et al., 2004).

Para uma segura identificação de nematoides é necessária a complementação dos dados morfológicos com os dados moleculares, de acordo com o conceito proposto pela taxonomia polifásica e integrativa (PIRES; MARINOMI, 2010).

### **5.3 Estudos bioquímicos**

A eletroforese de isoenzimas realizada no presente estudo não forneceu dados seguros para a identificação das espécies de nematoides das populações MgARA e MgSP. Não houve um padrão de bandas em nenhuma das repetições realizadas, sendo que estas permaneceram na posição inicial, sem migração no gel de poliacrilamida durante a corrida, enquanto que o padrão utilizado, *M. javanica*, apresentou suas bandas características com qualidade em todos os testes. Existem controvérsias em relação ao padrão de esterase de *M. graminis*. De acordo com Esbenshade e Triantaphyllou (1985), o fenótipo G1 deve ser atribuído a essa espécie, porém, este fenótipo já havia sido atribuído a *M. graminicola*. Por outro lado, Brito et al. (2010) relataram que não há um padrão de esterase para *M. graminis*. No presente estudo os resultados obtidos assemelham-se ao relato de Brito et al. (2010), pois também não foi observada a migração da amostra durante a eletroforese. A semelhança de resultados pode indicar que as populações estudadas são da espécie *M. graminis*, porém, nesse caso, o uso da técnica de eletroforese de isoenzima mostra-se inconclusivo.

## 5.4 Estudos moleculares

Para a caracterização de espécies de nematoides, duas regiões do genoma tem sido utilizadas, o rDNA (DNA ribossômico) e o mtDNA (DNA mitocondrial). O rDNA de nematoides é o mais estudado, pois trata-se de uma região altamente conservada, constituída de três genes, 18S, 5.8S e 28S, além das regiões espaçadoras, ITS-1 e ITS-2. A quantidade de cópias garante uma ótima amplificação e a variedade e estabilidade permite a distinção entre as espécies. O mtDNA é bastante estudado no gênero *Meloidogyne*, apresenta uma alta gama de regiões específicas para cada espécie e essas se repetem múltiplas vezes, o DNA mitocondrial possui diversas cópias no interior de uma única célula, facilitando o resultado da PCR. Além disso, a herança uniparental e a baixa taxa de recombinação facilitam os estudos de filogenia (BLOK; POWERS, 2009).

### 5.4.1 Código de barras do DNA

Os estudos moleculares desenvolvidos no decorrer desse trabalho foram decisivos na identificação da espécie dos nematoides da população MgARA. O código de barras do DNA apresentou o primeiro resultado seguro, demonstrando que a população realmente pertence à espécie *M. graminis*. As sequências utilizadas foram D2/D3 do 28S rDNA e CO-II do mtDNA. A comparação demonstra que os trechos estudados estão intimamente relacionadas à sequências de populações de *M. graminis* depositadas no GenBank, com taxa de similaridade de 99% para a região D2/D3 e 100% para CO-II, com populações provenientes dos Estados Unidos.

No Brasil, o primeiro relato de aplicação dessa tecnologia foi realizado por Oliveira et al., (2009), que relataram que tubérculos de batata provenientes do Canadá apresentavam-se com o nematoide *Pratylenchus penetrans*. Nesse material, devido às condições de transporte e armazenagem, os poucos nematoides presentes na amostra apresentavam-se com a morfologia alterada devido à anidrobiose, sem condições para a segura identificação específica. Para resolver tal questão, utilizou-se uma técnica bastante segura, mas que na época, ainda não se encontrava em uso rotineiro em laboratórios de diagnose de nematoides no Brasil, o chamado código de barras do DNA (DNA *barcode*), através do sequenciamento de um pequeno trecho do genoma do organismo, específico para cada espécie. No presente estudo, utilizou-se metodologia

semelhante, demonstrando-se a utilidade da técnica do código de barras do DNA para a diagnose de população de *Meloidogyne* identificada com segurança como *M. graminis*. Além disso, utilizando-se o conceito de taxonomia integrativa (OLIVEIRA et al., 2011), a identificação dos nematoides extraídos de raízes de gramas foi confirmada pelo estudo de suas características morfológicas e valores morfométricos.

*Meloidogyne graminis* foi descrito pela primeira vez em 1959, na Flórida, nos Estados Unidos, associado à raízes de grama Santo Agostinho (SLEDGE; GOLDEN, 1964). Atualmente, trata-se de um nematoide das galhas largamente distribuído naquele país e bastante conhecido pelos danos que causam em gramados esportivos, principalmente em campos de Golfe.

#### 5.4.2 Análises Filogenéticas

Nos últimos anos a utilização de sequências de DNA vem crescendo em pesquisas de identificação de espécies do gênero *Meloidogyne*. (POWERS, 2004). No presente estudo foram utilizadas informações contidas na expansão D2/D3 do gene 28S rDNA e a região CO-II do mtDNA para a construção de árvores filogenéticas. Esses fragmentos podem mudar de acordo com o gênero estudado, já que as informações neles contidas variam de acordo com as espécies. Apesar da maioria das espécies de *Meloidogyne* serem diferenciadas através da região ITS do rDNA, a heterogeneidade desse fragmento do gene não permite o diagnóstico preciso de *M. graminis* e *M. marylandi*. Já a 18S rDNA trata-se de uma região bastante conservada, por esse motivo não apresenta diferenças suficientes para separar as espécies (McCLURE et al., 2012).

A partir dos resultados do estudo filogenético realizado com sequências da região CO-II de populações de *M. graminis*, provenientes de campos de golfe dos Estados Unidos, desenvolvido por McClure et al. (2012), foi demonstrado a divisão do grupamento de *M. graminis*, o que permite afirmar que esta espécie se diferencia em dois tipos. As populações correspondentes ao tipo A são provenientes dos Estados da Flórida e Arizona (Estados Unidos) e China, enquanto que o tipo B é formado por populações da Califórnia, Arizona e Texas. Nas análises realizadas com a população de *M. graminis* do Brasil, a diferenciação no grupo também ficou evidente, confirmando os estudos de McClure et al. (2012). A população MgARA agrupou-se com as populações

de *M. graminis* do tipo B (Figura 13). Esse resultado pode indicar a origem dessa população, ou seja, é provável que a rota de introdução dessa espécie no Brasil tenha ocorrido através de mudas contaminadas provenientes de locais onde predomina o tipo B da espécie. Na análise também nota-se a proximidade entre *M. graminis* e *M. marylandi*, o que demonstra que essas espécies não são semelhantes apenas nos aspectos morfológicos e que os cuidados na identificação devem ser redobrados, já que a mistura dessas espécies já foi relatada em gramas de campo de golfe da Califórnia (McCLURE et al., 2012).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Além de importar gramas para campos de golfe, o Brasil tem aumentado a importação de mudas para a formação de gramados de estádios de futebol. No ano de 2014, para sediar a copa do mundo, diversas arenas esportivas foram construídas. Visando a aparência e qualidade do gramado, optou-se pela importação de gramas, principalmente ‘Bermuda Celebration’ proveniente da Flórida, para a cobertura dessas áreas (PORTAL BRASIL, 2012). Até o momento não houve relato de sintomas de nematoides nessas áreas, porém, sabe-se que *M. graminis* é bastante disseminado nos Estados Unidos e Europa, principais exportadores, e que sem os devidos cuidados esse fitoparasita poderia ser facilmente introduzido nessas áreas através das mudas, assim como ocorreu nos gramados de campos golfe mencionados nesse trabalho. Além de áreas esportivas, os demais consumidores de gramas devem tomar ciência da presença de *M. graminis* e dos problemas que sua disseminação pode causar no país.

Na situação atual, o método de exclusão deve prevalecer, evitando-se a introdução e disseminação de espécies exóticas em áreas indenes. Essa preocupação em relação à disseminação vem da impossibilidade de erradicação desses organismos, que



após o estabelecimento farão parte da microbiota do solo permanentemente. Monteiro (1981) já alertava sobre os riscos em “não se deve plantar nematoides”; no mesmo trabalho, sugeriu que, para diminuir o risco de introdução de espécies exóticas no país, medidas legislativas deviam ser promulgadas, aplicadas e cumpridas com mais rigor. Mesmo 34 anos após essa a publicação, o alerta continua válido.

Como um exemplo recente de introdução de nematoides no país, podemos citar *M. ethiopica*. Essa espécie foi encontrada pela primeira vez no Brasil em raízes de quivi, provenientes do Chile, no ano de 2003 no Estado do Rio Grande do Sul (CARNEIRO et al., 2003). Até o momento, a espécie foi relatada no Distrito Federal, Paraná e São Paulo. Apesar de poucos relatos sobre a distribuição e patogenicidade deste nematoide, danos significativos desta espécie parecem ser cada vez mais expressivos (MEDINA et al., 2014).

O primeiro registro de ocorrência de *M. graminis* no Brasil vem contribuir, portanto, para expandir o conhecimento da diversidade do gênero *Meloidogyne* no país e sua abrangência geográfica. Cabe ressaltar que essa espécie somente havia sido relatada anteriormente na América do Sul, causando danos em grama ‘Bermuda’ em campo de golfe na Venezuela (PERICHI et al., 2006). Cabe ressaltar que foi realizado o registro de ocorrência dessa espécie junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), visando a implementação de medidas fitossanitárias para minimizar o impacto da introdução de *M. graminis*. A autorização para a publicação da presença da praga no país fornecida pelo MAPA encontra-se no Anexo 1.

Enfatiza-se que, de acordo com Oliveira (2015), é fundamental que nematologistas, com comprovado treinamento em taxonomia, de universidades e centros de pesquisa do Brasil, atuem em colaboração com o MAPA na certificação fitossanitária, por meio do credenciamento para a realização de análises nematológicas oficiais de materiais vegetais importados e exportados, enfatizando o caráter preventivo do controle na entrada de pragas e doenças no Brasil.

## **8 CONCLUSÃO**

Identificou-se a espécie *Meloidogyne graminis* causando danos em gramado de campo de golfe no Estado de São Paulo, trata-se do primeiro relato dessa espécie no Brasil. O diagnóstico seguro realizou-se através do código de barras do DNA e análises filogenéticas.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRABRAS: Associação de gramicultores do Brasil. **Gramicultura em ação**. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/camaras\\_setoriais/Flores\\_e\\_plantas\\_ornamentais/38RO/app\\_GramiculturaAGRABRAS.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Flores_e_plantas_ornamentais/38RO/app_GramiculturaAGRABRAS.pdf)> Acesso em: 15 de Agosto de 2015.

AL-BANNA, L. et al. Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. **Journal of Nematology**, California, v. 36, n. 2, p. 142 - 146, 2004.

ALFENAS, A. C. et al. Extração de proteínas para eletroforese. In: ALFENAS, A.C. (Ed). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins – fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**, Viçosa, Editora: UFV, p. 111 - 114, 1998.

ALMEIDA, E. J. et al. Novos registros sobre *Meloidogyne mayaguensis* no Brasil e estudo morfológico comparativo com *M.incognita*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 32, n. 3, p. 236 - 241, 2008.

BIRD, A. F. Plant response to root-knot nematode. **Phytopathology**, Palo Alto, v.12, p.69 - 85, 1974.

BLOK, V. C.; POWERS, O. Biochemical and molecular identification. In: PERRY, R.; MOENS, M.; STARR, J. L. (eds.) **Root-knot Nematodes**, Wallingford, Editora: CABI International, p. 98 - 118, 2009.

BRITO, J. A. et al. *Meloidogyne* spp. infecting ornamental plants in Florida. **Nematropica**, Bradenton, v.40, n.1, p. 87 - 103, 2010.

- BUSEY, P.; MYERS, B. J. Growth rates of turfgrasses propagated vegetatively. **Agronomy Journal**, Madison, v. 71, n. 5, p. 817 - 821, 1979.
- BYRD, D. W.; FERRIS, H.; NUSBAUM, C. J. A method for estimating number of eggs of *Meloidogyne* spp. in soil. **Journal of Nematology**, Flórida, v. 4, n. 4, p. 266 - 269, 1972.
- CAMPOS, V. P. Doenças causadas por nematoides em alcachofra, alface, chicória, morango e quiabo. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.172, p. 21-28, 1985.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas de nematoides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 25, n.1, p.35 – 44, 2001.
- CARNEIRO, R. M. D. G. et al. Primeiro registro de *Meloidogyne ethiopica* em plantas quivi no Brasil e reação em diferentes plantas hospedeiras. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 27, p. 152 – 158, 2003.
- CARNEIRO, R. M. D. G. et al. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. **Nematology**, Leiden, v. 6, p. 287 – 298, 2004.
- CASTILLO, P.; VOVLAS, N. *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae): Diagnosis, biology, pathogenicity and management. **Nematology monographs and perspectives**, vol 6, 529 p., 2007.
- CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE FUTEBOL (CBF). **Cadastro Nacional de Estádios de Futebol**. Disponível em: <  
<http://www.cbf.com.br/noticias/campeonato/cadastro-nacional-de-estadios-de-futebol-1#.VjEANdKrQdU>> Acesso em: 05 de Outubro de 2015.
- COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. A method for quantitative extration of nematodes from plant tissue. Ghent, State Nematology and Entomology Research Station, 77 p., 1972.
- COOMANS, A. et al. Analysis phylogeny and biogeography of the genus *Xiphinema* Cobb. 1973 (Nematoda: Longidoridae). **Anais do Museu Royal da Africa Central** (Musée Royal de l'AfriqueCentrale). Tervuren, v. 287, p. 1 - 239, 2001.
- CROW, W. T.; LUC, J. E. Field Efficacy of Furfural as a Nematicide on Turf. **Journal of Nematology**, Flórida, v. 46, n.1, p.8 – 11, 2014.
- DE LEY, P.; BLAXTER, M. L. Systematic position and phylogeny. In: LEE. D. L. (Ed.) **The biology of nematodes**, London: Taylor & Francis, p. 1-30, 2002.
- DIAS-ARIEIRA, C. R.; MORITA, D. A. S.; MACHADO, M. H. Nematoides Associados a Plantas Ornamentais em Viveiros do Paraná. **Nematologia Brasileira**. Piracicaba, v. 31, n. 1, 2007.

DICKSON, E.; BOYD, J.; LAIRD, C. D. Sequence diversity of polytene chromosome DNA from *Drosophila hydei*. **J. Mol. Biol.**, v. 61, p. 615 - 627, 1971.

DROPKIN, V. H. **Introduction to Plant Nematology**. Wiley and Sons, New York, p. 158 – 168, 1989.

ESBENSHADE, P. R.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, Flórida, v. 17, p. 6 – 20, 1985.

ENTWISTLE, K. Root knot nematode infection of creeping bentgrass greens. **Greenkeeper International**, Aldwark, Fev. 21-22, 2003.

FELSENSTEIN, J.; CHURCHILL, G. A. A hidden Markov model approach to variation among sites in rate of evolution. **Mol. Biol. Evol.** Oxford, v.13, p. 93 – 104, 1996.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematoides. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos** (3ed). Ceres, São Paulo, v.1, cap. 8, p. 168 – 201, 1995.

FERRAZ, L. C. C. B. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In: SILVA, J. F. V. (Org.). **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: EMBRAPA Soja, p. 15 – 38, 2001.

FERRIS, V. R. The future of nematode systematics. **Fundamental and Applied Nematology**, v.17, p. 97 - 101, 1994.

FLEMING, C. C.; CRAIG, D.; HAINON-MCDOWELL, M. Plant parasitic nematodes: a new turf war? **The Agri-Food and Biosciences Institute**. The Turf Disease centre. UK, v. 55, n. 2, 2008.

FRANKLIN, M. T. *Meloidogyne naasi*, CIH description of plant parasitic nematodes. **Common wealth Institute of Helminthology**. St. Albans, v. 2, n. 19, 1965.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S. **Introdução a Nematologia**. Viçosa: Editora UFV, 84p., 2001.

GODOY, L. J. G. **Adubação nitrogenada para produção de tapetes de grama santo agostinho e esmeralda**. 2005. 106 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura) Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

GOLDEN, A. M. Further details and SEM observations on *Meloidogyne marylandi* (Nematoda: Meloidogynidae). **Journal of Nematology**, Flórida, v. 21, n. 4, p. 453 - 461, 1989.

GOLDEN, A. M.; BIRCHFIELD, W. *Meloidogyne graminicola* (Heteroderidae) a new species of root-knot nematode from grass. **Proceedings of the Helminthology Society of Washington**, v. 32, p. 228 – 231, 1965.

GURGEL, R. A. G. Principais espécies e variedades de grama. In: SIMPÓSIO SOBRE GRAMADOS, 1, 2003, Botucatu. **Anais**. Departamento de Recursos Naturais. Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, 2003. CD-ROM.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. Oxford University Press, Oxford, n. 41, p. 95 - 98, 1999.

HANDOO, Z. A.; HUETTEL, R. N.; GOLDEN, A. M. Description and SEM observations of *Meloidogyne sasseri* n. sp. (Nematoda, Meloidogynidae), parasitizing beachgrasses. **Journal of Nematology**. Flórida, v. 25, p. 628 - 641, 1993.

HANDOO, Z. A.; CARTA, L. K.; SKANTAR, A. M. Taxonomy morphology and phylogenetics of coffee associated root-lesion nematodes. *Pratylenchus* spp. In: SOUZA, R. M. ed. **Plant-parasitic nematodes of coffee**. Springer, Dordrecht, 2008.

HENDERSON, P. A.; SEABY, R. M. H. **Community Analysis Package Version 5**. Pisces Conservation Ltd. Lymington, 2014.

HEYNS, J. Problems of species delimitation in the genus *Xiphinema* with special reference to monosexual species. In: STONE, A. R.; PLATT, H. M.; KHALIL, L. F. (ed). **Concepts in Nematode Systematics**. Systematics Association & Academic Press. London, p.163 - 174, 1983.

HOLTERMAN, M. et al. Phylum-wide analysis of ssU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. **Mol. Biol. Evol.** Wageningenv, v. 23, p. 1798 - 1800, 2006.

HUNT, D. J.; HANDOO, Z. A. Taxonomy, identification and principal species. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. eds. **Root-knot nematodes**, Wallingford, Editora: CABI International, 2009.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**. St. Paul, v.57, p.1025 – 1028, 1972.

HUSSEY, R. S. Host-parasite relationships and associated physiological changes. In: SASSER, J. N.; CARTER, C. C. (Eds.). **An advanced treatise on Meloidogyne: biology and control**. Raleigh: North Carolina State University, p.143 - 153, 1985.

HYMAN, B. C.; POWERS, T. O. Integration of molecular data with systematics of plant parasitic nematodes. **Phytopathology**, v. 29 , p. 89 – 107, 1991.

JEPSON, S. B. **Identification of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* Species)**. CABI International. Wallingford, 1987.

KARSSSEN, G. et al. Description of *Meloidogyne minor* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode associated with yellow patch disease in golf courses. **Nematology**. Leiden, v. 6, p. 59 – 72, 2004.

KARSSSEN, G.; MOENS, M. Root-knot nematodes. In: PERRY, R. N.; MOENS, M. (Eds.). **Plant nematology**. Wallingford. UK: CAB International, p. 59 – 90, 2006.

LAURETTI, R. L. Implantação de gramados por sementes In: SIMPÓSIO SOBRE GRAMADOS, 1, 2003. Botucatu. Produção, implantação e manutenção: **Anais**: Departamento de Recursos Naturais. Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, 2003. CD-ROM.

LORDELLO, L. G. E. **Nematoides das plantas cultivadas**. 8ª ed. São Paulo, Editora Nobel, 314 p., 1992.

MACGOWAN, J. B. *Meloidogyne graminis*, a root knot nematode of grass. **Nematology Circular** n. 107, Florida Department of Agriculture and Consumer Services, 1984.

MANSO, E. C.; TENENTE, R. V. Extração e identificação de fitonematoides. In: LUZ, W. C. (Ed). **Revisão anual de Patologia de Plantas**, v.02, p. 265 – 285, 1994.

McCLURE, A. A. et al. Root-knot nematodes in golf course greens of the Western United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, p. 635 – 647, 2012.

MEDINA, I. L. et al. Ocorrência de *Meloidogyne ethiopica* no Paraná e reação de cultivares de batata ao nematoide das galhas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.32, p. 482 – 485, 2014.

MITKOWSKI, N. Root-knot nematodes on turf in the northeastern United States. **Turf Grass Trends, an independent newsletter for turf managers**, Washington, DC, v.10, n.12, 2001.

MOENS, M.; PERRY, N. R.; STARR, F. L. *Meloidogyne* species - a diverse group of novel and important plant parasites. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. **Root-knot nematodes**, Wallingford, CAB International, p. 1 - 17, 2009.

MONTEIRO, A. R. Não se deve “plantar” nematoides. V Reunião de nematologia. **Soc. Brasil. Nemat.** n. 5, 1981.

MORA-AGUILERA, G.; CAMPBELL, C. L. Multivariate techniques for selection of epidemiological variables. In: FRANK, L.; NEHER, D. A. (Ed). **Exercises in plant disease epidemiology**. Manhattan: American Phytopathological Society. p. 51 – 57, 1996.

MOURA, R. M. Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. In: LUZ, W.C. (Ed) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 4, p. 209 – 244, 1996.

NEGRETTI, R. R. D. Caracterização do nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em cultivo de arroz irrigado nos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina e hospedabilidade de plantas daninhas e forrageiras a *Meloidogyne graminicola*. 2013. 70 f. **Dissertação** (Mestrado em Fitossanidade) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, 2013

NELSON, B. E. Nematode disorders of Turfgrasses: How importante are they? **Turf Grass Trends**.an independent newsletter for turf managers, Washington, v.4, n.10, 1995.

NEW GOLF. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.newgolf.com.br/index.php/historia-estatisticas>>. Acesso em: 03 de Setembro de 2015.

OLIVEIRA, C. M. G.; MONTEIRO, A. R.; BLOK, V. C. Morphological and molecular diagnostics for plant-parasitic nematodes: working together to get the identification done. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, p. 65 - 73, 2011.

OLIVEIRA, C. M. G. Aplicação conjunta de técnicas moleculares e taxonomia clássica na resolução de problemas taxonômicas de nematoides. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.35, p. LVIII, 2010.

OLIVEIRA, C. M. G. et al. Uso de técnicas moleculares e microscopia eletrônica de varredura no esclarecimento da posição taxonômica da população K5 de *Pratylenchus* sp. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.35, p. 36 – 45, 2011.

OLIVEIRA, C. M. G. et al. Nematoides. In: EIRAS, M.; GALLETI, S. R.. (Org.). **Técnicas de Diagnóstico de Fitopatógenos**. 1ed. São Paulo, SP: Devir Livraria, v. 1, p. 103-135, 2012.

OLIVEIRA, C. M. G. Há risco de introdução dos nematoides de cisto da batata no Brasil? **Comunicado técnico** n. 215. 2015. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=215](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=215)>. Acesso em: 22 de outubro de 2015.

OKA, Y.; KARSSSEN, G.; MORDECHAI, M. Identification, host range and infection process of *Meloidogyne marylandi* from turf Grass in Israel. **Nematology**, Leiden, vol.5, p. 727 - 734, 2013.

OTT, A. P. **Parasitologia Agrícola**. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/agrofitossan/AGR04002/nemgalha.htm>> Acesso em 25 de Agosto de 2015.



PASCUAL, M. L. D. et al. Prevalence and characterization of plant-parasitic nematodes in lowland and upland rice agro-ecosystems in Luzon, Philippines. **Nematropica**, Bradenton, v. 44, n. 2, p. 166 – 180, 2014.

PERICHI, G.; CROZZOLI, R.; ALCANO, M. Primer reporte de *Meloidogyne graminis* (nematoda: Tylenchida) en Venezuela / First report of *Meloidogyne graminis* (Nematoda: Tylenchida) in Venezuela. **Fitopatol.Venez.** Maracay, v.19, p. 17 – 18, 2006.

PERRY, R.; MOENS, M.; STARR, J. L. eds. **Root-knot Nematodes**. Cambridge. MA. USA. CABI International, p.98 – 118, 2009.

PIRES, A. C.; MARINONI, L. DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 10, p. 339 – 346, 2010.

POWERS, T. O. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 42, p. 367 – 383, 2004.

POWERS, T. O. et al. Incorporating molecular identification of *Meloidogyne* spp. into a large-scale regional nematode survey. **Journal of Nematology**, Flórida, v. 37, n. 2, p. 226 – 235, 2005.

POWERS, T. O.; HARRIS, T. S. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, Flórida, v. 25, p. 1 – 6, 1993.

SLEDGE, E. B.; GOLDEN, A. M. Hypsoperine graminis (Nematoda: Heteroderidae), a new Genus and Species of Plant-Parasitic Nematode. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v.31, p. 83 - 88, 1964.

STANTON, J.; HUGALL, H.; MORITZ, C. Nucleotide polymorphism and an improved PCR-based mtDNA diagnostic for parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) **Fundamental and Applied Nematology**, v. 20, n. 3, p. 261 – 268, 1997.

STRIMMER, K.; VON HAESLER, A. Quartet puzzling: A quartet maximum-likelihood method for reconstructing tree topologies. **Mol. Biol. Evol.**, Oxford, v. 13, p. 964 – 969, 1996.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Mol. Biol. Evol.**, Oxford, v.30, p. 2725 - 2729, 2013.

TAYLOR, D. P.; NETSCHER, C. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Nematologica**, v. 20, p. 268 – 269, 1974

TORRES, G. R. de C. et al. Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no estado do Ceará. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, n. 1, p. 105 – 107, 2005.

TURFGRASS PRODUCERS INTERNATIONAL **Turfgrass – functional, recreational e aesthetic**. Turf Resource Center, 2002 Disponível em: <<http://www.turgrassod.org/trc/statistics.html>>. Acesso em: 19 de Agosto de 2015.

UNRUH, J. B. Biologia de gramas de clima quente. In: SIMPÓSIO SOBRE GRAMADOS. 2. Botucatu. Manejo das gramas na produção e em gramados formados: **Anais**. Departamento de Recursos Naturais. Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, 2004. CD-ROM.

VASCONCELOS, E. S. et al. Estratégias de amostragem e estabelecimento de coleções nucleares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, p.507 - 514, 2007.

WHITEHEAD, A. G. Taxonomy of *Meloidogyne* (Nematodea: Heteroderidae) with description of four new species. **Zoological society of London**, Londres, v. 31, p. 263 – 401, 1968.

WATSON, L; DALLWITZ, M. F. **The grass genera of the world**. United Kingdom: CAB Publications, 1081 p., 1992.

ZENG, Y. et al. Diversity and occurrence of plant-parasitic nematodes associated with golf course Turfgrasses in North and South Carolina, USA. **Journal of Nematology**, Flórida, v. 44, n. 4, p. 337 - 347, 2012.

ZHANG, Z. S. et al. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7, p. 203 – 214, 2000.



```

*          240          *          260          *          280          *          300          *          320          *
Mmi2640 : GAAATTTTGATTAATAATGATTATAAATAATTTATTA--ATTTTTATTATAAAGTGTGT-----TTTTTAATATTAATTTTATTAATTTA--TAATTTAATTTATTTA : 319
Mmi2032625 : GAAATTTTGATTAATAATGATTATAAATAATTTATTA--ATTTTTATTATAAAGTGTGT-----TTTTTAATATTAATTTTATTAATTTA--TAATTTAATTTATTTA : 318
Mmi2032624 : GAAATTTTGATTAATAATGATTATAAATAATTTATTA--ATTTTTATTATAAAGTGTGT-----TTTTTAATATTAATTTTATTAATTTA--TGATTTAATTTATTTA : 319
Mmi2042634 : GAAATTTTGATTAATAATGATTATAAATAATTTATTA--ATTTTTATTATAAAGTGTGT-----TTTTTAATATTAATTTTATTAATTTA--TAATTTAATTTATTTA : 319
Mmi2042635 : GAAATTTTGATTAATAATGATTATAAATAATTTATTA--ATTTTTATTATAAAGTGTGT-----TTTTTAATATTAATTTTATTAATTTA--TAATTTAATTTATTTA : 319
Mmi2042633 : GAAATTTTGATTAATAATGATTATAAATAATTTATTA--ATTTTTATTATAAAGTGTGT-----TTTTTAATATTAATTTTATTAATTTA--TAATTTAATTTATTTA : 318
Mmi2042635 : GAAATTTTGATTAATAATGATTATAAATAATTTATTA--ATTTTTATTATAAAGTGTGT-----TTTTTAATATTAATTTTATTAATTTA--TAATTTAATTTATTTA : 319
Mmi2042641 : GAAATTTTGATTAATAATGATTATAAATAATTTATTA--ATTTTTATTATAAAGTGTGT-----TTTTTAATATTAATTTTATTAATTTA--TAATTTAATTTATTTA : 319
Mmi2022619 : GAAATTTTGATTAATAATGATTATAAATAATTTATTA--ATTTTTATTATAAAGTGTGT-----TTTTTAATATTAATTTTATTAATTTA--TAATTTAATTTATTTA : 319
Mmi2638 : GAAATTTTGATTAATAATGATTATAAATAATTTATTA--ATTTTTATTATAAAGTGTGT-----TTTTTAATATTAATTTTATTAATTTA--TAATTTAATTTATTTA : 319
Mmi2022618 : GAAATTTTGATTAATAATGATTATAAATAATTTATTA--ATTTTTATTATAAAGTGTGT-----TTTTTAATATTAATTTTATTAATTTA--TAATTTAATTTATTTA : 319
Mmi2022621 : GAAATTTTGATTAATAATGATTATAAATAATTTATTA--ATTTTTATTATAAAGTGTGT-----TTTTTAATATTAATTTTATTAATTTA--TAATTTAATTTATTTA : 319
Mmi2636 : GAAATTTTGATTAATAATGATTATAAATAATTTATTA--ATTTTTATTATAAAGTGTGT-----TTTTTAATATTAATTTTATTAATTTA--TAATTTAATTTATTTA : 319
Mf2586 : GAAATTTTGATTAAGATAAATAATAGTTTTTTTTAT--ATTTTTATAATAA--TGTT-----ATTTTTATAATTTATTTTTTATAAAAAATAATTAATTTATTTA : 311
Mf807 : GAAATTTTGATTAAGATAAATAATAGTTTTTTTTAT--ATTTTTATAATAA--TGTT-----ATTTTTATAATTTATTTTTTATAAAAAATAATTAATTTATTTA : 311
Mf2584 : GAAATTTTGATTAAGATAAATAATAGTTTTTTTTAT--GTTTTTATAATAA--TGTT-----ATTTTTATAATTTATTTTTTATAAAAAATAATTAATTTATTTA : 311
Mf2582 : GAAATTTTGATTAAGATAAATAATAGTTTTTTTTAT--ATTTTTATAATAA--TGTT-----ATTTTTATAATTTATTTTTTATAAAAAATAATTAATTTATTTA : 310
MgMcLE28 : GAAATTAGGCTCTAATTAATTTAGTCTTTAAAAA-AAATTTTTATAATATTTTAGTTAACGGGGTGTGTTAAATATTTTTTTAGAGATAATAATTAATTTATTTA : 328
Mg2558 : GAAATTAGGCTCTAATTAATTTAGTCTTTAAAAA-AAATTTTTATAATATTTTAGTTAACGGGGTGTGTTAAATATTTTTTTAGAGATAATAATTAATTTATTTA : 328
Mg2553 : GAAATTAGGCTCTAATTAATTTAGTCTTTAAAAA-AAATTTTTATAATATTTTAGTTAACGGGGTGTGTTAAATATTTTTTTAGAGATAATAATTAATTTATTTA : 328
Mg2559 : GAAATTAGGCTCTAATTAATTTAGTCTTTAAAAA-AAATTTTTATAATATTTTAGTTAACGGGGTGTGTTAAATATTTTTTTAGAGATAATAATTAATTTATTTA : 328
MgZH : GAAATTAGGCTCTAATTAATTTAGTCTTTAAAAA-AAATTTTTATAATATTTTAGTTAACGGGGTGTGTTAAATATTTTTTTAGAGATAATAATTAATTTATTTA : 328
MgYJ : GAAATTAGGCTCTAATTAATTTAGTCTTTAAAAA-AAATTTTTATAATATTTTAGTTAACGGGGTGTGTTAAATATTTTTTTAGAGATAATAATTAATTTATTTA : 328
Mg724 : GAAATTAGGCTCTAATTAATTTAGTCTTTAAAAA-AAATTTTTATAATATTTTAGTTAACGGGGTGTGTTAAATATTTTTTTAGAGACATAATAATTAATTTATTTA : 325
Mg027 : GAAATTAGGCTCTAATTAATTTAGTCTTTAAAAA-AAATTTTTATAATATTTTAGTTAACGGGGTGTGTTAAATATTTTTTTAGAGACATAATAATTAATTTATTTA : 325
Mg090 : GAAATTAGGCTCTAATTAATTTAGTCTTTAAAAA-AAATTTTTATAATATTTTAGTTAACGGGGTGTGTTAAATATTTTTTTAGAGACATAATAATTAATTTATTTA : 325
Mg182 : GAAATTAGGCTCTAATTAATTTAGTCTTTAAAAA-AAATTTTTATAATATTTTAGTTAACGGGGTGTGTTAAATATTTTTTTAGAGACATAATAATTAATTTATTTA : 325
MgARA : GAAATTAGGCTCTAATTAATTTAGTCTTTAAAAA-AAATTTTTATAATATTTTAGTTAACGGGGTGTGTTAAATATTTTTTTAGAGACATAATAATTAATTTATTTA : 325
Mm5392648 : TAAATTAAGTTAATAATTTAGTCTTTAAAAA-GAATTTTTATAATATTTTTTTT-GTAAATTTATTAATAATTTTTTTAAATTTGATAATTAATTTATTTA : 326
Mm5392469 : TAAATTAAGTTAACAATTAATTTAGTCTTTAAAAA-GAATTTTTATAATATTTTTTTT-GTAAATTTATTAATAATTTTTTTAAATTTGATAATTAATTTATTTA : 326
Mm17cr : TAAATTAAGTTAATAATTTAGTCTTTAAAAA-GAATTTTTATAATATTTTTTTT-GTAAATTTATTAATAATTTTTTTAAATTTGATAATTAATTTATTTA : 324
Mm4882548 : CAATTAAGTTAATAATTTAGTCTTTAAAAA-GAATTTTTATAATATTTTTTTT-GTAAATTTATTAATAATTTTTTTAAATTTGATAATTAATTTATTTA : 324
Mm4882549 : CAATTAAGTTAATAATTTAGTCTTTAAAAA-GAATTTTTATAATATTTTTTTT-GTAAATTTATTAATAATTTTTTTAAATTTGATAATTAATTTATTTA : 324
Mm4882550 : CAATTAAGTTAATAATTTAGTCTTTAAAAA-GAATTTTTATAATATTTTTTTT-GTAAATTTATTAATAATTTTTTTAAATTTGATAATTAATTTATTTA : 324
Menterolob : AAAATTTGTATAAATTAATTTAGTTATTTTAAATAAAAATTTTTTATTAATTT-----GTTTTTTTTATT--TTTTTAAAAAATAATTAATTTATTTATTTA : 325

340          *          360          *          380          *          400          *          420          *
Mmi2640 : TTTTTTAAATATTTATTTA--AATAAATAATATTTT-ATTTAATTAATAATG-ATATAAATAATTTAATAAATTTGATGAAATTTAATTTATTAATTTT : 418
Mmi2032625 : TTTTTTAAATATTTATTTA--AATAAATAATATTTT-ATTTAATTAATAATG-ATATAAATAATTTAATAAATTTGATGAAATTTAATTTATTAATTTT : 417
Mmi2032624 : TTTTTTAAATATTTATTTA--AATAAATAATATTTT-ATTTAATTAATAATG-ATATAAATAATTTAATAAATTTGATGAAATTTAATTTATTAATTTT : 418
Mmi2042634 : TTTTTTAAATATTTATTTA--AATAAATAATATTTT-ATTTAATTAATAATG-ATATAAATAATTTAATAAATTTGATGAAATTTAATTTATTAATTTT : 418
Mmi2032627 : TTTTTTAAATATTTATTTA--AATAAATAATATTTT-ATTTAATTAATAATG-ATATAAATAATTTAATAAATTTGATGAAATTTAATTTATTAATTTT : 418
Mmi2042633 : TTTTTTAAATATTTATTTA--AATAAATAATATTTT-ATTTAATTAATAATG-ATATAAATAATTTAATAAATTTGATGAAATTTAATTTATTAATTTT : 417
Mmi2042641 : TTTTTTAAATATTTATTTA--AATAAATAATATTTT-ATTTAATTAATAATG-ATATAAATAATTTAATAAATTTGATGAAATTTAATTTATTAATTTT : 418
Mmi2042638 : TTTTTTAAATATTTATTTA--AATAAATAATATTTT-ATTTAATTAATAATG-ATATAAATAATTTAATAAATTTGATGAAATTTAATTTATTAATTTT : 418
Mmi2022619 : TTTTCTTAAATATTTATTTA--AATAAATAATATTTT-ATTTAATTAATAATG-ATATAAATAATTTAATAAATTTGATGAAATTTAATTTATTAATTTT : 418
Mmi2022618 : TTTTTTAAATATTTATTTA--AATAAATAATATTTT-ATTTAATTAATAATG-ATATAAATAATTTAATAAATTTGATGAAATTTAATTTATTAATTTT : 418
Mmi2022621 : TTTTTTAAATATTTATTTA--AATAAATAATATTTT-ATTTAATTAATAATG-ATATAAATAATTTAATAAATTTGATGAAATTTAATTTATTAATTTT : 418
Mmi2636 : TTTCTTAAATATTTATTTG--AATAAATAATATTTT-ATTTAATTAATAATG-ATATAAATAATTTAATAAATTTGATGAAATTTAATTTATTAATTTT : 418
Mf2586 : TTTTATTTAAAAAATAATTT--AA-ATTAATTTTTT-GTAAATTTAGCTTTAA-ATATAAATGTTTTTAAAAATCGATGAATTTTTGCTTTAATTTT : 409
Mf807 : TTTTATTTAAAAAATAATTT--AA-ATTAATTTTTT-GTAAATTTAGCTTTAA-ATATAAATGTTTTTAAAAATCGATGAATTTTTGCTTTAATTTT : 409
Mf2584 : TTTTATTTAAAAAATAATTT--AA-ATTAATTTTTT-GTAAATTTAGCTTTAA-ATATAAATGTTTTTAAAAATCGATGAATTTTTGCTTTAATTTT : 409
Mf2582 : TTTTATTTAAAAAATAATTT--AA-ATTAATTTTTT-GTAAATTTAGCTTTAA-ATATAAATGTTTTTAAAAATCGATGAATTTTTGCTTTAATTTT : 408
MgMcLE28 : TT---TTAGTTAATTTCTTTTAAATACAAAATTTTTTAAAAAATAAGTTATAACAAAATGTTTTTAAATCTTTTGTAAATTTGATTTAAATTTATTT : 428
Mg2558 : TT---TTAGTTAATTTCTTTTAAATACAAAATTTTTTAAAAAATAAGTTATAACAAAATGTTTTTAAATCTTTTGTAAATTTGATTTAAATTTATTT : 428
Mg2553 : TT---TTAGTTAATTTCTTTTAAATACAAAATTTTTTAAAAAATAAGTTATAACAAAATGTTTTTAAATCTTTTGTAAATTTGATTTAAATTTATTT : 428
Mg2559 : TT---TTAGTTAATTTCTTTTAAATACAAAATTTTTTAAAAAATAAGTTATAACAAAATGTTTTTAAATCTTTTGTAAATTTGATTTAAATTTATTT : 428
MgZH : TT---TTAGTTAATTTCTTTTAAATACAAAATTTTTTAAAAAATAAGTTATAACAAAATGTTTTTAAATCTTTTGTAAATTTGATTTAAATTTATTT : 428
MgYJ : TT---TTAGTTAATTTCTTTTAAATACAAAATTTTTTAAAAAATAAGTTATAACAAAATGTTTTTAAATCTTTTGTAAATTTGATTTAAATTTATTT : 428
Mg724 : TT---TTAGTTAATTTCTTTTAAATACAAAATTTTTTAAAAAATAAGTTATAACAAAATGTTTTTAAATCTTTTGTAAATTTGATTTAAATTTATTT : 425
Mg027 : TT---TTAGTTAATTTCTTTTAAATACAAAATTTTTTAAAAAATAAGTTATAACAAAATGTTTTTAAATCTTTTGTAAATTTGATTTAAATTTATTT : 425
Mg090 : TT---TTAGTTAATTTCTTTTAAATACAAAATTTTTTAAAAAATAAGTTATAACAAAATGTTTTTAAATCTTTTGTAAATTTGATTTAAATTTATTT : 425
Mg182 : TT---TTAGTTAATTTCTTTTAAATACAAAATTTTTTAAAAAATAAGTTATAACAAAATGTTTTTAAATCTTTTGTAAATTTGATTTAAATTTATTT : 425
MgARA : TT---TTAGTTAATTTCTTTTAAATACAAAATTTTTTAAAAAATAAGTTATAACAAAATGTTTTTAAATCTTTTGTAAATTTGATTTAAATTTATTT : 425
Mm5392648 : TTTATTTTAAATAAGTTATTGAAATAATATTTTTTTT---AAATTAATTTT-ATAAAAATGTTTATAAATGCTTTTGTAAATTTTTTTTTAATTTATTT : 424
Mm5392469 : TTTATTTTAAATAAGTTATTGAAATAATATTTTTTTT---AAATTAATTTT-ATAAAAATGTTTATAAATGCTTTTGTAAATTTTTTTTTAATTTATTT : 424
Mm17cr : TTTATTTTAAATAAATTTATTGAAATAATATTTTTTTT---AAATTAATTTT-ATAAAAATGTTTATAAATCTTTTGTAAATTTTTTTTTAATTTATTT : 422
Mm4882548 : TTTATTTTAAATAAATTTATTGAAATAATATTTTTTTT---AAATTAATTTT-ATAAAAATGTTTATAAATCTTTTGTAAATTTTTTTTTAATTTATTT : 422
Mm4882549 : TTTATTTTAAATAAATTTATTGAAATAATATTTTTTTT---AAATTAATTTT-ATAAAAATGTTTATAAATCTTTTGTAAATTTTTTTTTAATTTATTT : 421
Mm4882550 : TTTATTTTAAATAAATTTATTGAAATAATATTTTTTTT---AAATTAATTTT-ATAAAAATGTTTATAAATCTTTTGTAAATTTTTTTTTAATTTATTT : 422
Menterolob : TTGAGTTAATTTAGTTATTTTAA-AAAAATTTTGT---TAAATAAATTTG-ATATAAATGTTTTTAAATCTTTGAGGTTTTAGTTATGATTTTTT : 423

```

Figura 1. Alinhamento correspondente a região CO-II da população MgARA e outras espécies de *Meloidogyne* (Tabela 1), utilizado para a realização dos estudos filogenéticos.















```

*          700
Mg90      : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 686
Mg182     : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 686
Mg428     : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 686
Mg268     : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 686
Mg730a1   : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 686
Mg14      : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 686
Mg474     : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 686
MgARARAS : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 685
Mm12AZ    : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 686
Mm4981    : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 686
Mm658     : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 686
Mm172     : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 686
Mm447     : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 686
Mm463     : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 686
Mm603     : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 686
Mm623     : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 686
Mm436     : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 686
Mmi731    : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 691
Mmi820c7  : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 691
Mmi383    : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 691
Mmi820c6  : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 691
Mmi820c3  : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 691
Mf824     : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 691
Mf853     : -CGAAGGACTAATCGAACCRTC : 690
Mf738     : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 691
Ma282     : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Mic4b     : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Mjc1      : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
MA5s      : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Mic2      : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Ma28      : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
MjWF      : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Miyz17    : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
MspMN     : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
MN2011    : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
MspNBA    : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 677
Mhc1      : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Mlh4      : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Mlh3      : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Mab       : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
M08c2    : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Mp28      : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Mp71      : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Mp61      : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Miz       : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Mp62      : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Mlh2      : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
MjXSYT01 : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Miminc    : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Ma918     : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Mk        : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Mth       : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Mlo       : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
MeShet    : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
MeFJC     : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Mh        : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
MetBra    : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 678
Mino      : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 676
Mdu       : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 681
Fvulnus   : GCGAAGACTAATCGAACCATC : 692

```

Figura 2. Alinhamento correspondente a região 28S da população MgARA e outras espécies de *Meloidogyne* (Tabela 2), utilizado para a realização dos estudos filogenéticos.

Tabela 1. Populações de *Meloidogyne* utilizadas para comparação com a população MgARA nos estudos filogenéticos da região CO-II. Códigos disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), códigos utilizados no trabalho (Apêndice, Figura 1) e espécie.

Códigos utilizados no trabalho	Espécie de nematoide	Códigos do GenBank
MgZH	<i>M. graminis</i>	gi 300808407
MgYJ	<i>M. graminis</i>	gi 300808409
Mg2553	<i>M. graminis</i>	gi 358444140
MgMcLE28	<i>M. graminis</i>	gi 56089857
Mg2558	<i>M. graminis</i>	gi 358444145
Mg2559	<i>M. graminis</i>	gi 358444143
Mg724	<i>M. graminis</i>	gi 358444095
Mg027	<i>M. graminis</i>	gi 358444101
Mg090	<i>M. graminis</i>	gi 358444099
Mg182	<i>M. graminis</i>	gi 358444126
Mm17cr	<i>M. marylandi</i>	gi 459219052
Mm4882548	<i>M. marylandi</i>	gi 358444132
Mm4882549	<i>M. marylandi</i>	gi 358444134
Mm4882550	<i>M. marylandi</i>	gi 358444136
Mm5392648	<i>M. marylandi</i>	gi 358444203
Mm5392469	<i>M. marylandi</i>	gi 358444130
MmtRNA	<i>M. marylandi</i>	gi 751130996
Mmi2640	<i>M. minor</i>	gi 358444171
Mmi2022621	<i>M. minor</i>	gi 358444177
Mmi2022618	<i>M. minor</i>	gi 358444175
Mmi2638	<i>M. minor</i>	gi 358444163
Mmi2042634	<i>M. minor</i>	gi 358444159
Mmi2032627	<i>M. minor</i>	gi 358444169
Mmi2042635	<i>M. minor</i>	gi 358444167

---

Mmi2032624	<i>M. minor</i>	gi 358444157
Mmi2042641	<i>M. minor</i>	gi 358444155
Mmi2032625	<i>M. minor</i>	gi 358444179
Mmi2022619	<i>M. minor</i>	gi 358444165
Mmi2042633	<i>M. minor</i>	gi 358444151
Mmi2636	<i>M. minor</i>	gi 358444161
Mf2586	<i>M. fallax</i>	gi 358444196
Mf2582	<i>M. fallax</i>	gi 358444194
Mf2584	<i>M. fallax</i>	gi 358444198
Mf807	<i>M. fallax</i>	gi 358444201

---

Tabela 2. Populações de *Meloidogyne* utilizadas para comparação com a população MgARA nos estudos filogenéticos da região 28S. Códigos disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), códigos utilizados no trabalho (Apêndice, Figura 2) e espécie.

Códigos utilizados no trabalho	Espécie de nematoide	Códigos do GenBank
Mg90	<i>M. graminis</i>	gi 358364578
Mg428	<i>M. graminis</i>	gi 358364577
Mg268	<i>M. graminis</i>	gi 358364575
Mg730a1	<i>M. graminis</i>	gi 358364580
Mg474	<i>M. graminis</i>	gi 358364588
Mg182	<i>M. graminis</i>	gi 358364576
Mg14	<i>M. graminis</i>	gi 359300672
Mm658	<i>M. marylandi</i>	gi 358364599
Mm12AZ	<i>M. marylandi</i>	gi 358364582
Mm463	<i>M. marylandi</i>	gi 358364615
Mm603	<i>M. marylandi</i>	gi 358364592
Mm4881	<i>M. marylandi</i>	gi 359300675
Mm172	<i>M. marylandi</i>	gi 358364583
Mm447	<i>M. marylandi</i>	gi 358364613
Mm436	<i>M. marylandi</i>	gi 358364612
Mm623	<i>M. marylandi</i>	gi 358364589
Mh	<i>M. hispanica</i>	gi 183397619
MetBra	<i>M. ethiopica</i>	gi 540070897
Mth	<i>M. thailandica</i>	gi 165972999
MeShet	<i>M. enterolobii</i>	gi 827503247
Mmi731	<i>M. minor</i>	gi 359300669
Mmi383	<i>M. minor</i>	gi 358364571
MeFJC	<i>M. enterolobii</i>	gi 588493655

---

Mmi820c7	<i>M. minor</i>	gi 544183301
Mmi820c6	<i>M. minor</i>	gi 544183300
Mmi820c3	<i>M. minor</i>	gi 544183299
Mlo	<i>M. lopezi</i>	gi 803243371
Mk	<i>M. konaenses</i>	gi 21666619
Miyz17	<i>M. incognita</i>	gi 655350421
Ma918	<i>M. arenaria</i>	gi 507864318
MjXSYT01	<i>M. javanica</i>	gi 530290780
Miminc	<i>M. incognita</i>	gi 21666616
Mlh4	<i>M. lopezi</i>	gi 803243374
MjWF	<i>M. javanica</i>	gi 398363511
Ma28	<i>M. arenaria</i>	gi 165972998
MspMN	<i>Meloidogyne</i> sp.	gi 338808386
Mp62	<i>M. paranaensis</i>	gi 21666621
Miz	<i>M. izalcoensis</i>	gi 803243376
Mp28	<i>M. paranaensis</i>	gi 803243375
Mlh2	<i>M. lopezi</i>	gi 803243372
Ma282	<i>M. arenaria</i>	gi 661918828
Mino	<i>M. inornata</i>	gi 540070899
Mjc1	<i>M. javanica</i>	gi 498827499
Mic2	<i>Meloidogyne</i> sp.	gi 498827495
Mhc1	<i>Meloidogyne</i> sp.	gi 498827490
Mp71	<i>M. paranaensis</i>	gi 21666622
Mp61	<i>M. paranaensis</i>	gi 21666620
MA5s	<i>M. arenaria</i>	gi 1147729
MN2011	<i>Meloidogyne</i> sp.	gi 338808387
Mf824	<i>M. fallax</i>	gi 544183288
Mab	<i>M. arabicida</i>	gi 803243379
Mlh3	<i>M. lopezi</i>	gi 803243373
M08c2	<i>Meloidogyne</i> sp.	gi 498827504

---

---

MspNBA	<i>Meloidogyne</i> sp.	gi 338808383
Mf738	<i>M. fallax</i>	gi 359300671
Mf824	<i>M. fallax</i>	gi 544183290
Mic4b	<i>Meloidogyne</i> sp.	gi 498827506
Mf853	<i>M. fallax</i>	gi 544183294
Mdu	<i>M. dunensis</i>	gi 157367081

---



**ANEXO**

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO  
Secretaria de Defesa Agropecuária  
Departamento de Sanidade Vegetal

Ofício DSV/SDA Nº 182/2013

Brasília, 07 de maio de 2013.

A Professora  
Sílvia Renata Siciliano Wilcken  
Faculdade de Ciências Agrônômicas  
UNESP – Campus de Botucatu

Assunto: autorização de publicação da presença da praga *Meloidogyne graminis* no País.  
Referência: Doc. 70500-001621/2012-88.

Prezada Senhora,

Comunico que, após a análise das informações contidas no documento em referência, verificou-se que a notificação de ocorrência da praga obedece ao disposto na Portaria Interministerial nº 290, de 15 de abril de 1996 e atende plenamente ao disposto na Instrução Normativa n.º 02, de 9 de janeiro de 2002.

AUTORIZAMOS, a publicação da presença da praga *Meloidogyne graminis* no País.

Atenciosamente,

Carlos Artur Franz

Diretor-Substituto do Departamento de Sanidade Vegetal