



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

**Nematoide das Galhas: Hospedabilidade de plantas Ocorrentes no
Bioma Cerrado, Análise Transcritômica e Ação Nematicida de Extratos
Vegetais**

REINALDO RODRIGUES PIMENTEL

BRASÍLIA-DF
2019

REINALDO RODRIGUES PIMENTEL

Tese apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia pelo Programa de Pós-graduação em Fitopatologia.

Orientador: Prof. Cleber Furlanetto

**BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

Pimentel, Reinaldo Rodrigues

Nematoide das Galhas: Hospedabilidade de Plantas Ocorrentes no Bioma Cerrado, Análise Transcritômica e Ação Nematicida de Extratos Vegetais. Reinaldo Rodrigues Pimentel.

Brasília, 2018. Número de páginas p. 184.

Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

1. Fitopatologia-Nematologia

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Hospedabilidade de Plantas Ocorrentes no Bioma Cerrado, Análise Transcritômica e Ação Nematicida de Extratos Vegetais.

*"Mas os que esperam no Senhor renovarão as suas forças; subirão com asas como águias;
correrão, e não se cansarão; andarão, e não se fatigarão. - Isaías 40:31"*

Dedicatória

Dedico essa tese à minha família, em especial a meus pais e irmãos, a Adriana Andrade Ferreira, aos meus professores que me instruíram durante minha longa caminhada e a todos meus amigos e amigas, que estiveram do meu lado nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que me deu forças durante minha longa caminhada e esteve comigo em todas as minhas lutas.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelas bolsas e auxílios durante meu período de Pós-graduação, o que com certeza foi imprescindível para que eu conseguisse alcançar os meus objetivos. Além disso, à Novacap e aos departamentos de Botânica e Farmácia, pelo apoio, pelos equipamentos disponibilizados, estrutura, apoio e doações realizadas.

À minha família que me deu estrutura emocional e apoio durante o período em que estive concentrado nas minhas atividades acadêmicas, em especial à minha mãe que sempre esteve ao meu lado me prestando todo apoio e auxílio diante de meus desafios.

Aos meus professores que me ajudaram, incentivaram e ensinaram, me fazendo ir em busca do meu melhor e me empenhar na busca dos meus sonhos. Meus mais sinceros agradecimentos em especial ao meu orientador Cleber Furlanetto pela paciência comigo, amizade, apoio e orientação e por acreditar no meu potencial e ao professor Juvenil Enrique Cares, um exemplo de professor, de amigo e pesquisador, uma pessoa por quem tenho muita admiração e respeito e sempre foi muito atencioso comigo.

A todos os meus amigos e amigas que estiveram comigo durante os meus momentos alegres e nos difíceis, bons e ruins, e me deram forças para não desistir. Em especial meus agradecimentos a Adriana Andrade Ferreira, uma pessoa por quem tenho grande carinho e admiração e que me apoiou e incentivou a melhorar como ser humano e como profissional.

Trabalho realizado junto ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Professor **Cleber Furlanetto, Ph.D.**, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

Nematoide das Galhas: Hospedabilidade de Plantas Ocorrentes no Bioma Cerrado, Análise Transcritômica e Ação Nematicida de Extratos Vegetais.

REINALDO RODRIGUES PIMENTEL

Tese aprovada em ___ / ___ / _____ por:

Dr. Jadir Borges Pinheiro

Examinador externo

Profa. Pérola de Oliveira Magalhães

Examinador (Externo)

Prof. Juvenil Enrique Cares

Examinador

Dra. Gisele P. Domiciliano

Suplente

Prof. Cleber Furlanetto

Orientador (Presidente)

BRASÍLIA - DISTRITO FEDERAL

2019

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO GERAL	1
GENERAL ABSTRACT	2
CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA.....	8
1 O bioma Cerrado.....	8
2 Ocorrência de <i>Meloidogyne</i> spp. no Bioma Cerrado	9
3 Nematóide das galhas	12
4 <i>Meloidogyne incognita</i>	15
5 <i>Meloidogyne javanica</i>	16
6 <i>Meloidogyne morocciensis</i>	17
7 <i>Meloidogyne paranaensis</i>	18
8 Análise transcritômica de nematoides	19
9 Utilização de extratos vegetais no controle de <i>Meloidogyne</i> spp.	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
CAPÍTULO II - Hospedabilidade de Plantas Ocorrentes no Bioma Cerrado a <i>Meloidogyne</i> spp. 62	
RESUMO	62
ABSTRACT	63
1 MATERIAL E MÉTODOS	64
1.1 Origem, identificação e manutenção dos inóculos de <i>Meloidogyne</i> spp.	64
1.2 Obtenção de mudas de plantas ocorrentes no Cerrado	64

1.3	Avaliação de hospedabilidade de plantas nativas de Cerrado a <i>Meloidogyne</i> spp.	67
1.4	Acompanhamento das condições experimentais	68
1.5	Variáveis Avaliadas	69
1.5.1	Índice de massas de ovos (IMO)	69
1.5.2	Índice de Galhas (IG)	69
1.5.3	Fator de Reprodução (FR)	70
1.5.4	Número de Ovos e/ou J ₂ por grama de Raiz (NOJ2GR)	71
1.6	Sintomatologia das raízes	71
2	RESULTADOS	72
2.1	Análise biológica e física de solo e características físico-químicas do substrato	72
2.2	Confirmação da identidade das espécies de <i>Meloidogyne</i>	73
2.3	Avaliação de hospedabilidade de plantas ocorrentes no bioma Cerrado	73
2.4	Sintomas e reação das plantas à infecção por <i>Meloidogyne</i> spp	76
3	DISCUSSÃO	86
4	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
	CAPÍTULO III - Transcritoma de ovos e J ₂ de <i>Meloidogyne paranaensis</i>	100
	RESUMO	100
1	MATERIAL E MÉTODOS	102
1.1	Obtenção e manutenção de população de <i>Meloidogyne paranaensis</i>	102
1.2	Extração de ovos de <i>M. paranaensis</i>	102
1.3	Obtenção de Juvenis de segundo estágio a partir de ovos	103
1.4	Extração de RNA total	104
1.5	Seleção de RNA mensageiro e sequenciamento	104
1.6	Limpeza e filtragem das sequências	105

1.7	Normalização digital e montagem das sequências.....	106
1.8	Anotação funcional das sequências	107
1.9	Expressão diferencial	109
1.10	Mapeamento dos transcritos de <i>Meloidogyne paranaensis</i> contra genoma de referência mais próximo.....	110
2	RESULTADOS.....	111
2.1	Qualidade do RNA total extraído	111
2.2	Sequenciamento em Plataforma Illumina <i>MiSeq</i> e Qualidade das sequências por base (<i>Per base Sequence quality</i>).....	113
2.3	Anotação de transcritos.....	128
3	DISCUSSÃO	136
4	CONCLUSÕES	145
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146
	CAPÍTULO IV - Prospecção de extratos vegetais com ação nematicida	152
	RESUMO	152
	ABSTRACT	153
1	MATERIAL E MÉTODOS	154
1.1	Prospecção de extratos vegetais de ação nematicida	154
1.2	Preparo dos extratos	155
1.3	Testes <i>in vitro</i>	157
1.4	Determinação do pH	158
1.5	Obtenção das partições do extrato selecionado com ação nematicida.....	158
1.6	Determinação da parte do fruto com ação nematicida.....	159
1.7	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).....	160

2	RESULTADOS.....	162
3.1	Efeito de extratos vegetais sobre J ₂ de <i>M. incognita</i>	162
3.2	Ação nematicida das partes do fruto selecionado	163
3.3	Ação nematicida sobre espécies de <i>Meloidogyne</i> spp.....	163
3.4	Determinação da Concentração Letal para mortalidade de 50% (LC ₅₀).....	166
3.5	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD por parte do fruto avaliada	166
4	DISCUSSÃO	177
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	182

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Extratos vegetais de plantas da família Solanaceae com ação nematicida sobre fitonematoides.	29
Tabela 2. Extratos vegetais de plantas da família Myrtaceae com ação nematicida sobre fitonematoides.	30
Tabela 3. Extratos vegetais de plantas da família Lamiaceae com ação nematicida sobre fitonematoides.	31
Tabela 4. Extratos vegetais de plantas das famílias Liliaceae, Aristolochiaceae, Burseraceae, Lauraceae e Poaceae com ação nematicida sobre fitonematoides.	33
Tabela 5. Extratos vegetais de plantas das famílias Apiaceae, Amaryllidaceae, Piperaceae, Geraniaceae, Meliaceae, Fabaceae, Altingiaceae, Amaranthaceae, Caparaceae e Combretaceae com ação nematicida sobre fitonematoides.	34
Tabela 6. Compostos identificados com ação nematida sobre <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> (Estádios diversos).	36
Tabela 7. Compostos identificados com ação nematida sobre Juvenis de segundo estágio (J ₂) de <i>Meloidogyne incognita</i>	38
Tabela 8. Compostos identificados com ação nematida sobre Juvenis de segundo estágio (J ₂) de Fitonematoides.	40
Tabela 9. Espécies botânicas ocorrentes no bioma Cerrado avaliadas quanto à hospedabilidade a <i>Meloidogyne</i> spp.	65
Tabela 10. Caracterização química dos substratos utilizados nos ensaios em casa de vegetação.	72
Tabela 11. Médias de Fator de Reprodução (FR), Índice de massas de ovos (IMO), Índice de galhas (IG) e Número de ovos e/ou J ₂ por grama de raiz (NOJ ₂ /GR), em espécies vegetais que se comportaram como hospedeiras, após quatro meses da inoculação com 5.000 ovos + J ₂ de <i>Meloidogyne</i> spp.	75
Tabela 12. Número de <i>reads</i> , tamanho e conteúdo GC (%) das replicatas biológicas do estágio J ₂ de <i>Meloidogyne paranaensis</i> (J2R1 e J2R2).	122
Tabela 13. Número de <i>reads</i> , tamanho e conteúdo GC (%) das replicatas biológicas do estágio ovo de <i>Meloidogyne paranaensis</i> (O1 e O2).	122
Tabela 14. Mapeamento de transcritos das replicatas biológicas de ovos (O1 e O2) e de juvenis J ₂ (J2R1 e J2R2) de <i>Meloidogyne paranaensis</i> contra genoma de <i>M. incognita</i>	127
Tabela 15. Mapeamento de transcritos das replicatas biológicas de ovos (O1 e O2) e de J ₂ (J2R1 e J2R2) de <i>Meloidogyne paranaensis</i> contra genoma de <i>C. elegans</i>	127
Tabela 16. Mapeamento de transcritos das replicatas biológicas de ovos (O1 e O2) e de J ₂ (J2R1 e J2R2) de <i>Meloidogyne paranaensis</i> de <i>Meloidogyne paranaensis</i> contra genoma de <i>Meloidogyne hapla</i>	128
Tabela 17. Lista das espécies e extratos testados quanto à atividade nematicida.	154
Tabela 18. Gradiente de eluição para a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Diodos CLAE - DAD na detecção de compostos fenólicos.	161

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida do nematoide das galhas, <i>Meloidogyne</i> spp.	15
Figura 2. Área de Cerrado selecionada onde realizou-se coleta de perfilhos de gramíneas. ..	65
Figura 3. Mistura para obtenção do substrato utilizado nos ensaios.....	67
Figura 4. Perfilhos coletados em campo, cultivados em vasos e mantidos em casa de vegetação.....	67
Figura 5. Distribuição das plantas em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em casa de vegetação.	68
Figura 6. Coloração de raízes com fucsina ácida.....	69
Figura 7. Muda de <i>Guibourtia hymenifolia</i> e raízes infectadas por: <i>Meloidogyne javanica</i> , <i>M. incognita</i> e <i>M. morocciensis</i>	77
Figura 8. Muda de <i>Copaifera langsdorffii</i> e raiz infectada por <i>Meloidogyne javanica</i> , <i>M. incognita</i> e <i>M. morocciensis</i>	78
Figura 9. Muda de <i>Pseudobombax tomentosum</i> , sistema radicular com formação de tuberosidade e raiz infectada com <i>M. incognita</i> apresentando massa de ovos em raiz lateral. 78	
Figura 10. Muda de <i>Esenbeckia leiocarpa</i> e sintomas em raízes causados por <i>Meloidogyne javanica</i>	79
Figura 11. Mudanças de <i>Enterolobium gummiferum</i> e sintomatologia em raízes de infectadas por <i>Meloidogyne incognita</i>	80
Figura 12. Plantas de <i>Andropogon bicornis</i> e massas de ovos (indicadas pelas setas), coradas com fucsina ácida 0,35%, em raízes infectadas com <i>Meloidogyne morocciensis</i> , <i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i>	81
Figura 13. Muda de <i>Handroanthus impetiginosus</i> , raiz com galhas bem desenvolvidas e distribuídas e massas de ovos coradas com fucsina ácida	82
Figura 14. Muda de <i>Handroanthus serratifolius</i> , raiz infectada por <i>Meloidogyne incognita</i> apresentando massas de ovos e rachadura em tecido.....	83
Figura 15. Muda de <i>Triplaris gardneriana</i> . Galha produzida por <i>Meloidogyne morocciensis</i> e massa de ovos produzida por <i>M. javanica</i> e corada com fucsina ácida 0,35%	84
Figura 16. Muda de <i>Handroanthus caribba</i> , sistema radicular e sintomatologia em raízes infectadas com <i>Meloidogyne morocciensis</i>	85
Figura 17. Análise de RNA total de ovos de <i>Meloidogyne paranaensis</i> , amostra O1, realizado em Agilent 2100 Bioanalyzer.....	111
Figura 18. Análise de RNA total de ovos de <i>Meloidogyne paranaensis</i> , amostra O2, realizado em Agilent 2100 Bioanalyzer.....	112
Figura 19. Análise de RNA total de Juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne paranaensis</i> , amostra J2R1, realizado em Agilent 2100 Bioanalyzer.	112
Figura 20. Análise de RNA total de Juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne paranaensis</i> , amostra J2R2, realizado em Agilent 2100 Bioanalyzer.	113
Figura 21. Análise de dados, segundo a escala Phred - score 20, da biblioteca J2R1 na extremidade 5' de <i>Meloidogyne paranaensis</i>	114
Figura 22. Análise de dados, segundo a escala Phred - score 20, da Biblioteca J2R1 na extremidade 3' de <i>Meloidogyne paranaensis</i>	115
Figura 23. Análise de dados, segundo a escala Phred – score 20, da réplica biológica da biblioteca J2R2 na extremidade 5' de <i>Meloidogyne paranaensis</i>	116
Figura 24. Análise de dados, segundo a escala de Phred - score 20, da réplica biológica da biblioteca J2R2 na extremidade 3' de <i>Meloidogyne paranaensis</i>	117

Figura 25. Análise de dados, segundo a escala de Phred – score 20, da biblioteca de ovos O1 na extremidade 5’ <i>Meloidogyne paranaensis</i>	118
Figura 26. Análise de dados, segundo a escala Phred - score 20, da biblioteca de ovos O1 na extremidade 3’ de <i>Meloidogyne paranaensis</i>	119
Figura 27. Análise de dados, segundo a escala Phred - score 20, da réplica biológica de ovos O2 na extremidade 3’ de <i>Meloidogyne paranaensis</i>	120
Figura 28. Análise de dados, segundo escala Phred - score 20, da réplica biológica de ovos O2 na extremidade 3’ de <i>Meloidogyne paranaensis</i>	121
Figura 29. Transcritos diferencialmente expressos nas condições ovo e J ₂ de <i>Meloidogyne paranaensis</i> ..	123
Figura 30. Heatmap dos padrões de expressão nas bibliotecas de ovo e J ₂ de <i>Meloidogyne paranaensis</i> , Cluster hierárquico dos genes de <i>M. paranaensis</i> diferencialmente expressos nas condições ovo e J ₂ . e Análise filogenética das funções celulares dos genes diferencialmente expressos.	125
Figura 31. Distribuição de espécies com Blast Hits obtidos em pesquisa de homologia realizada com o programa BlastX, a partir das sequências de contigs e singletons do transcrito de ovos e J ₂ de <i>Meloidogyne paranaensis</i>	126
Figura 32. Classificação de transcritos de ovos e J ₂ de <i>Meloidogyne paranaensis</i> segundo o programa <i>Gene Ontology</i> e suas respectivas percentagens dentro da categoria componente celular.	129
Figura 33. Classificação de transcritos de ovos e J ₂ de <i>Meloidogyne paranaensis</i> segundo o programa <i>Gene Ontology</i> e suas respectivas percentagens dentro da categoria função molecular.	130
Figura 34. Classificação de transcritos de ovos e J ₂ de <i>Meloidogyne paranaensis</i> segundo o programa <i>Gene Ontology</i> e suas respectivas percentagens dentro da ontologia processos biológicos.	130
Figura 35. Rotas metabólicas de transcritos diferencialmente expressos em J ₂ de <i>Meloidogyne paranaensis</i> . <i>Fold change</i> mínimo de 2,0 e máximo de 5,0.	132
Figura 36. Rotas metabólicas de transcritos diferencialmente expressos em ovos de <i>Meloidogyne paranaensis</i> . <i>Fold change</i> mínimo de 2,0 e máximo de 5,0.	133
Figura 37. Classes de proteases detectadas no transcrito de <i>Meloidogyne paranaensis</i> e sua abundância.	134
Figura 38. Proteases superexpressas no estágio J ₂ de <i>Meloidogyne paranaensis</i> em comparação ao estágio ovo.	134
Figura 39. Processos envolvidos na extração do extrato vegetal aquoso.....	156
Figura 40. Processos envolvidos no preparo de extratos etanólicos.	157
Figura 41. Ilustração da composição do fruto.....	160
Figura 42. Micrografias de microscopia óptica de formas J ₂ de <i>Meloidogyne incognita</i> , submetidas aos tratamentos.....	162
Figura 43. Percentagem de J ₂ de <i>Meloidogyne javanica</i> de cerrado mortos após 24, 48 e 72 hs de exposição aos tratamentos.....	164
Figura 44. Percentagem de J ₂ de <i>Meloidogyne incognita</i> de cerrado mortos após 24, 48 e 72 hs de exposição aos tratamentos.....	164
Figura 45. Percentagem de J ₂ de <i>M. morocciensis</i> de cerrado mortos após 24, 48 e 72 hs de exposição aos tratamentos.....	165
Figura 46. Percentagem de J ₂ de <i>M. paranaensis</i> de cerrado mortos após 24, 48 e 72 hs de exposição aos tratamentos.	165
Figura 47. Cromatograma por CLAE-DAD a 280 nm do extrato etanólico do pericarpo de fruto (10 mg.ml ⁻¹)......	166

Figura 48. Espectro de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para o extrato etanólico do pericarpo do fruto.....	167
Figura 49. Espectros de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para o extrato etanólico do pericarpo do fruto do fruto comparativamente ao composto com maior similaridade.....	168
Figura 50. Cromatograma por CLAE-DAD a 280 nm da partição acetato de etila do pericarpo do fruto(10 mg.ml ⁻¹).....	168
Figura 51. Espectro de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para a partição acetato de etila do pericarpo do fruto.....	169
Figura 52. Espectros de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para partição acetato de etila do pericarpo do fruto comparativamente ao composto com maior similaridade.....	170
Figura 53. Cromatograma por CLAE-DAD a 280 nm da partição hidrometanólica do pericarpo do fruto (10 mg.ml ⁻¹).....	170
Figura 54. Espectro de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para partição hidrometanólica do pericarpo do fruto.....	171
Figura 55. Espectros de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para partição hidrometanólica do pericarpo do fruto do fruto comparativamente ao composto com maior similaridade.	171
Figura 56. Cromatograma por CLAE-DAD a 280 nm do extrato etanólico do mesocarpo do fruto (10 mg.ml ⁻¹).....	172
Figura 57. Espectro de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para o extrato etanólico do mesocarpo do fruto.	172
Figura 58. Espectros de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para o extrato etanólico do mesocarpo do fruto comparativamente ao composto com maior similaridade.....	173
Figura 59. Cromatograma por CLAE-DAD a 280 nm da partição acetato de etila do fruto (10 mg.ml ⁻¹).....	173
Figura 60. Espectro de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para a partição acetato de etila do mesocarpo do fruto.....	174
Figura 61. Espectros de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para partição acetato de etila do mesocarpo do fruto comparativamente ao composto com maior similaridade.....	174
Figura 62. Cromatograma por CLAE-DAD a 280 nm da partição hidrometanólica do mesocarpo do fruto (10 mg.ml ⁻¹).	175
Figura 63. Espectro de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para partição aquosa do mesocarpo do fruto	175
Figura 64. Espectros de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para partição hidrometanólica do fruto comparativamente ao composto com maior similaridade.....	176

LISTA DE ABREVIATURAS

DMSO - Dimetilsulfóxido

EST - marcador de sequência expressa

FPKM - Fragments Per Kilobase of transcript sequence per Millions base pairs sequenced

J₂ - Juvenil de segundo estágio

J₃ - Juvenil de terceiro estágio

J₄ - Juvenil de quarto estágio

LC₅₀ - Concentração letal sobre 50 % de uma população de teste.

SAGE - Serial Analysis of Gene Expression

RESUMO GERAL

Pimentel, Reinaldo Rodrigues. 2019. Nematóide das galhas: hospedabilidade de plantas ocorrentes no bioma Cerrado, análise transcritômica e ação nematicida de extratos vegetais. Tese de Doutorado em Fitopatologia - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Dentre os fitonematóides capazes de causar perdas relevantes à agricultura mundial, o nematóide das galhas radiculares é o principal causador de dano às culturas devido a sua ocorrência generalizada e adaptabilidade a diferentes ambientes. A polifagia presente em *Meloidogyne* faz com que esse nematóide tenha plantas hospedeiras das mais diversas famílias botânicas. Os objetivos desse estudo foram: 1) estudar a reação de espécies vegetais nativas de cerrado a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. morocciensis* e *M. paranaensis*; 2) obter o sequenciamento e análise do transcrito de *M. paranaensis*, espécie emergente, cujo genoma funcional ainda não foi desvendado; (3) Realizar a prospecção de extratos vegetais de plantas do bioma Cerrado com ação nematicida a *Meloidogyne* spp. Trinta e cinco espécies vegetais do cerrado, entre arbóreas e gramíneas, foram inoculadas com 5.000 ovos + J₂ em ensaios de casa de vegetação com 35 tratamentos (espécies vegetais), 6 repetições e 4 isolados de *Meloidogyne* (*M. javanica*, *M. incognita*, *M. morocciensis* e *M. paranaensis*). Após 120 dias da inoculação, as plantas foram avaliadas quanto ao índice de galhas e de massas de ovos, nematóides/grama de raiz e fator de reprodução, além da sintomatologia causada nas raízes de plantas parasitadas. *Triplaris gardneriana* foi considerada hospedeira de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. morocciensis*; *Andropogon bicornis* de *M. javanica* e *M. incognita* e *Copaifera langsdorffii* hospedeira de *M. incognita*. O transcrito de *M. paranaensis* foi sequenciado em Plataforma Illumina MiSeq a partir de RNA total dos estádios ovo e J₂. Foi realizada uma corrida com o Kit 2X300 pair end, a partir de uma biblioteca de cDNA de ovo e uma de J₂, além de uma replicata biológica de cada. Ao todo foram detectados um total de 9.193 sequências diferencialmente expressas entre os estádios de ovo e J₂. As sequências geradas relativas às quatro bibliotecas foram comparadas com sequências do genoma de *M. incognita* (30% de homologia), *M. hapla* (0,2%) e *C. elegans* (0,001%). A classificação funcional de conjuntos de unigenes foi realizada por meio do Gene Ontology (GO) diferenciando-se os transcritos obtidos em três categorias funcionais: processos biológicos, função molecular e componentes celulares. Além disso, fez-se a anotação de algumas classes específicas de enzimas ativadas por carboidratos (CAZy) como proteases e transportadores. Quanto às classes catalíticas de proteases observou-se maior frequência de cisteínas, sendo que o maior número de enzimas com expressão diferencial em J₂ está relacionado ao metabolismo de purinas. A ação nematicida de extratos vegetais foi realizada, mediante testes *in vitro*, pela imersão de formas J₂ nos extratos a 1.500 ppm de concentração por 48 hs. Ao todo foram testados vinte e três extratos vegetais etanólicos e nove aquosos. Desses, apenas o extrato etanólico de fruto maduro de planta da família Rubiaceae demonstrou ter ação nematicida acima de 80 % sobre *M. incognita*. Detectou-se que o mesocarpo é a parte do fruto resonsável pela ação nematicida. O extrato selecionado foi particionado em três frações (hidrometanólica, etanólica e acetato de etila) por técnicas cromatográficas e o efeito testado contra *Meloidogyne* spp. Observou-se atividade nematicida sobre 100 % dos J₂ apenas na partição acetato de etila a 1.500 ppm de concentração. As partições foram submetidas à cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para caracterização. Não foi possível a identificação do composto com ação nematicida.

Palavras-chave: Nematóide das galhas, Hospedabilidade, Cerrado, Transcritoma, Extratos vegetais, ação nematicida.

GENERAL ABSTRACT

Pimentel, Reinaldo Rodrigues. 2019. Root-knot nematodes: hospedability of plants occurring in Cerrado biome, transcriptome analysis and nematicidal action of plant extracts. Doctorate Thesis in Plant Pathology - University of Brasília, Brasília, DF. Brazil.

Root-knot nematodes are the main cause of crop damage in agriculture worldwide due to its widespread occurrence and adaptability to different environments. The polyphagia of *Meloidogyne* makes it capable of parasiting plants from different botanic families. In this sense, the objectives of this study were: **1)** to study the reaction of native cerrado plants to *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. morocciensis* and *M. paranaensis*; **2)** to provide the sequencing and analysis of the transcriptome of *M. paranaensis*, an emerging species whose functional genome has not yet been studied; **3)** To carry out the prospection of extracts from cerrado plants with nematicidal activity on *Meloidogyne* spp. Thirty-five plant species, including trees and grasses, were inoculated with 5,000 eggs + J₂ and left in greenhouse for 120 days. Trials were developed with 35 treatments (plant species), 6 replicates and 4 *Meloidogyne* isolates (*M. javanica*, *M. incognita*, *M. morocciensis* and *M. paranaensis*). The following variables were assessed: gall index and egg mass index, nematodes/gram of roots, reproduction factor, besides the symptomatology on the plant roots. *Triplaris gardneriana* was classified as host of *M. incognita*, *M. javanica* and *M. morocciensis*; *Andropogon bicornis* as host of *M. javanica* and *M. incognita* and *Copaifera langsdorfii* as host of *M. incognita*. The transcriptome of *M. paranaensis* was sequenced in the Platform Illumina MiSeq from total RNA of eggs and J₂. A run was performed with the 2X300 pair end kit, with a cDNA library from eggs and another from J₂, besides one biological replicate of each. A total 9,193 sequences were differentially expressed for both life stages. Sequences were compared to sequences from the genome of *M. incognita* (30% homology), *M. hapla* (0.2%) and *C. elegans* (0.001%). The functional classification of unigene clusters was performed by means of Gene Ontology (GO), differentiating the transcripts obtained in three functional categories: biological processes, molecular function and cellular components. In addition, a few specific classes of carbohydrate-activated enzymes (CAZy) were classified as proteases and transporters. As for the catalytic classes of proteases, a higher frequency of cysteines was observed, and the greater number of enzymes with differential expression in J₂ is related to the metabolism of purines. The nematicide activity of plant extracts was performed by *in vitro* tests, with the immersion of J₂ in each plant extract at 1,500 ppm for 48 hours. In total, twenty-three ethanolic and nine aqueous extracts were tested. Of these, only the ethanolic extract of mature fruits of plant Rubiaceae family, had nematicide activity above 80% on *M. incognita*. The mesocarp is the fruit part with greater nematicide activity. The selected plant extract was partitioned into three fractions (Hydromethanolic, ethanolic and ethyl acetate) by chromatographic techniques and its effect tested against *Meloidogyne* spp. Nematicide activity was observed at 100% of J₂ only in the ethyl acetate partition at 1,500 ppm concentration. The partitions were submitted to high performance liquid chromatography (HPLC) for characterization. It was not possible to identify the compound with nematicide activity.

Keywords: Root-knot nematodes, Host Status, Cerrado, Transcriptome, Plant Extracts, Nematicide Activity.

1. OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho foi estudar a hospedabilidade de plantas ocorrentes no bioma Cerrado à *Meloidogyne* spp., efetuar o sequenciamento e análise do transcrito de *Meloidogyne paranaensis*, uma das espécies utilizadas nos estudos de hospedabilidade, e explorar fontes de compostos secundários produzidos por plantas nativas do cerrado com potencial para o controle de *Meloidogyne* spp.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar e caracterizar a hospedabilidade de plantas ocorrentes no bioma Cerrado a isolados, obtidos a partir de levantamentos em cerrado, de *M. incognita*, *M. javanica*, *M. morocciensis*, além da espécie emergente *M. paranaensis*; identificar as principais rotas metabólicas ativadas por *M. paranaensis* nos estádios de ovo e J₂ e os principais grupos de proteases e transportadores de proteínas presentes; detectar, a partir de bibliotecas de RNAseq de ovos e J₂ de *M. paranaensis*, a presença de expressão diferencial entre os referidos estádios; fazer o mapeamento de transcritos a partir de comparação com bancos de dados de genoma completo dos organismos *Caenorhabditis elegans*, *M. incognita* e *M. hapla*; avaliar a atividade nematotóxica dentre um banco de extratos, aquosos e etanólicos, de espécies de plantas de Cerrado.

3. INTRODUÇÃO GERAL

Nematoides do gênero *Meloidogyne* Göldi, 1892 são endoparasitas sedentários, conhecidos como nematoide das galhas radiculares. As fêmeas são altamente férteis, podendo em condições favoráveis produzir entre 500 e 2000 ovos durante o ciclo de vida (Tyler, 1933; Calderón-Urrea, 2016). Dos ovos eclodem as formas infectantes J₂, capazes de invadir tecidos das raízes e migrar até o cilindro vascular, onde estabelecem células nutridoras conhecidas como células gigantes (Abad *et al.*, 2008). No geral são responsáveis por grandes perdas em diversas culturas.

Nos biomas brasileiros, espécies de *Meloidogyne* ocorrem naturalmente, parasitando raízes de plantas hospedeiras, o que tem sido demonstrado a partir de levantamentos em áreas nativas (Lima *et al.*, 2005; Silva, 2012). A diversidade vegetal presente em biomas naturais é vasta (Klink e Machado, 2005) e pode manter esses nematoides em equilíbrio populacional, ou seja, sem causar danos às plantas, tendo em vista, além da diversidade vegetacional, a presença de muitas espécies de plantas com resistência ou imunidade (Antes *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013).

A ausência de sintomas aparentes e redução no desenvolvimento das plantas nativas parasitadas (Oliveira *et al.*, 1995) tem dificultado a detecção *in loco* desses nematoides, sendo necessários levantamentos em área nativas para a detecção. O monocultivo, por outro lado, pode provocar incremento acentuado da população de fitonematoides (Bélair, 1992) e, tendo em vista a diversidade da vegetação nativa, quando substituída por culturas hospedeiras de interesse econômico, o aumento populacional desses nematoides pode ocorrer de forma exponencial, causando perdas.

Atualmente, pouco se conhece da hospedabilidade de plantas nativas ou ocorrentes no bioma Cerrado a *Meloidogyne* spp. No entanto o conhecimento da microfauna nematológica

associada à flora nativa aumenta a importância da sua preservação, além de abrir portas para uma série de outras aplicações.

Dentre os biomas brasileiros, o Cerrado é um dos mais ricos em biodiversidade animal e vegetal. Nesse bioma, *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood 1949, *M. incognita* Kofoid e White 1919, *M. morocciensis* Rammah e Hirschmann 1990, *M. arenaria* Chitwood 1949 e *M. hapla* Chitwood 1949 já tiveram a sua ocorrência relatada (Souza *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 2013). No entanto, *M. paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes, Santos e Almeida, 1996, apesar de não ter sido relatada em áreas nativas no cerrado, tem ganhado importância para a agricultura mundial devido à ampliação das áreas de ocorrência e as perdas provocadas em culturas de importância econômica.

Meloidogyne paranaensis é um nematoide encontrado causando danos à cultura do café no Brasil e na América Central. Essa espécie foi descrita em café no estado do Paraná por Carneiro *et al.* (1996) e, por ser uma espécie cuja ocorrência em lavouras ocorre quase sempre em regiões cafeeiras, a sua ausência no cerrado é atribuída particularmente ao plantio de outras culturas como soja e algodão que não hospedam o nematoide. Embora *M. paranaensis* seja considerada espécie emergente para a agricultura mundial, pouco se conhece do seu genoma funcional e dos transcritos envolvidos no parasitismo de plantas.

Transcritoma é definido como o conjunto de todos os transcritos celulares e sua abundância em determinado estágio ou condição fisiológica (Tan *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Análises de RNASeq em plataformas de alto rendimento, permitem o sequenciamento de milhões de transcritos expressos em diferentes organismos. Considerando os transcritomas de nematoides já sequenciados e publicados (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. enterolobii* Yang e Eisenback, 1983, etc.), ainda não há relato na literatura do transcritoma de *M. paranaensis*.

A importância do conhecimento do genoma funcional dos nematoides reflete em medidas de controle futuras que visem à redução dos danos causados à agricultura mundial,

sendo que se estimam em 157 bilhões de dólares as perdas econômicas mundiais causadas por nematoides fitoparasitas (Abad *et al.*, 2008; Onkendi *et al.*, 2014).

Por outro lado, o controle de nematoides na agricultura, realizado muitas vezes a partir do uso indiscriminado de moléculas nematicidas pode causar danos ao ser humano, animais, vegetação e ao meio ambiente como um todo devido ao seu efeito não alvo, além de ser caro (Haroon *et al.*, 2018). A maior parte dos nematicidas são moléculas químicas de ação biocida, afetando não apenas os nematoides fitoparasitas, mas toda a fauna nematológica, além de outras formas de vida. Tendo em vista o impacto ambiental causado pelo uso de nematicidas, a busca por novas moléculas de ação mais específica tem sido alvo de vários (Caboni *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2013).

Moléculas com ação específica sobre nematoides fitoparasitas e que preservem outras formas de vida, além de nematoides de vida livre, reduziriam fortemente o impacto ambiental atualmente causado pelo uso de moléculas com amplo espectro de ação.

Nesse contexto, o cerrado ostenta uma das maiores biodiversidades vegetais dentre os biomas brasileiros, com muitas espécies endêmicas (Klink e Machado, 2005). Esta vasta diversidade vegetal oferece inúmeras possibilidades para esse tipo de exploração.

A fitoquímica de espécies vegetais do cerrado tem sido estudada por alguns autores. No entanto, a prospecção por extratos vegetais de ação nematicida, objetivando o seu uso na agricultura ainda é pouco explorada. Nesse contexto, a descoberta de novas moléculas de ação nematicida específica, contribuirá para a preservação do cerrado e sua exploração sustentável.

Considerando o exposto acima, objetiva-se (1) estudar a hospedabilidade de espécies vegetais ocorrentes no bioma Cerrado a três isolados de *Meloidogyne* coletados em cerrado nativo (*M. incognita*, *M. javanica* e *M. morocciensis*), e um isolado de *M. paranaensis* proveniente de área de produção cafeeira; (2) Realizar o sequenciamento e análise do

transcritoma de *M. paranaensis*, cujo genoma funcional ainda não foi estudado; (3) Realizar a prospecção de extratos vegetais da flora do cerrado com ação nematicida a *Meloidogyne* spp.

1 O bioma Cerrado

O Cerrado constitui o segundo maior bioma brasileiro, ocupando uma área aproximada de 204 milhões de hectares (Adámoli *et al.* 1986), o que corresponde a cerca de 24% do território nacional sendo extremamente importante em termos de biodiversidade e preservação.

O clima predominante, de acordo com a classificação climática de Köppen, é o tropical chuvoso (Aw), possuindo duas estações bem definidas, constituído por invernos secos e verões chuvosos com temperatura média do mês mais frio (julho) acima de 18°C e precipitação média predominante de 1.400 a 1.800 milímetros (Silva *et al.*, 2008a).

Devido à sua extensão, esse bioma abriga nascentes de importantes rios que abastecem oito bacias hidrográficas (Lima, 2011), sendo que o subsolo possui uma das principais zonas de recarga subterrâneas do mundo, o Aquífero Guarani (Durigan, 2012).

Quanto à flora possui mais de 12 mil espécies de plantas vasculares catalogadas com pelo menos 11.627 espécies pertencentes à flora vascular nativa (Mendonça *et al.*, 2008). Segundo Aguiar e Camargo (2004) estima-se que 12% das espécies vegetais brasileiras são encontradas nesse bioma. Apesar da grande diversidade da flora nativa, pouco se conhece sobre a microfauna presente nos solos.

O cerrado brasileiro contém cerca de 1,5% das espécies de plantas endêmicas do mundo e vale ressaltar a necessidade da preservação da biodiversidade vegetal nesse bioma, tendo em vista que a extinção em massa de espécies pode se constituir em grande perda sendo que, de acordo com evidências pré-históricas, a evolução não seria suficiente para repor o estoque de espécies em tempo inferior a milhões de anos (Myers, 2000). Daí a necessidade de

preservação da biodiversidade encontrada, ainda pouco estudada e explorada quanto aos usos potenciais nas atividades humanas, garantindo, assim, sua manutenção.

Diferentes fitofisionomias podem ser identificadas: cerradão (com árvores altas, densidade maior e composição distinta), cerrado *sensu stricto* (com árvores baixas e esparsas), campo cerrado (predomínio de gramíneas, árvores de pequeno porte e arbustos bastante esparsos entre si), campo sujo (presença marcante de arbustos e subarbustos entremeados no estrato herbáceo), campo limpo (com progressiva redução da densidade arbórea) e floresta de galeria (mata ciliar com formações florestais geralmente associadas a cursos d'água) (Ribeiro e Walter, 1998).

Já quanto às tipologias vegetacionais, as mesmas são adaptadas a diferentes solos como Cambissolos, Latossolos, Neossolos e Quartzarênicos, os quais apresentam altos teores de alumínio e baixa disponibilidade de macro e micronutrientes (Toledo *et al.*, 2009). A vegetação natural é dominada por seis famílias botânicas: Fabaceae, Poaceae, Asteraceae, Rubiaceae, Arecaceae e Cyperaceae (Goodland, 1970).

2 Ocorrência de *Meloidogyne* spp. no Bioma Cerrado

A microfauna do solo é composta por pequenos animais, dentre os quais os mais abundantes são os nematoides. Diferentes gêneros de nematoides pertencentes a distintos grupos tróficos já foram descritos como membros da fauna nematológica desse bioma. Dentre os nematoides fitoparasitas, os do gênero *Meloidogyne* apresentam relevância por causar danos a diversas plantas cultivadas.

Os nematoides das galhas, pertencentes ao gênero *Meloidogyne* são altamente polípagos (Moens *et al.*, 2009) e amplamente disseminados em vários países (IITA, 1981; De Waele e Elsen, 2007). Além das cultivadas, várias espécies, de diferentes famílias de plantas,

são hospedeiras desses nematoides, incluindo plantas infestantes, espécies nativas e introduzidas.

Dentre as plantas nativas destacam-se as encontradas naturalmente em áreas de cerrado, ainda pouco estudadas em relação à hospedabilidade e multiplicação de *Meloidogyne* spp. Ressalta-se, assim, a importância de novos trabalhos de forma a elencar as plantas hospedeiras que mantêm as populações de *Meloidogyne* sp. em áreas nativas.

Nesse aspecto Huang et al. (1991) detectaram a presença de *M. arenaria* em mistura com *M. javanica* e *M. hapla* em campo sujo e Silva (2012) detectou maior diversidade de espécies em campo sujo, diferente do postulado por Cares e Huang (2008) que acreditam haver maior diversidade em cerrado *sensu stricto*, com maior diversidade de plantas.

Por outro lado Huang et al. (1996) observaram predominância de *Meloidogyne* sp. em cerrado nativo associado à rizosfera de *Pterodon pubescens* Benth. Já em Mata Atlântica e floresta de altitude no Rio de Janeiro, Lima et al. (2005) identificaram ocorrência natural de *M. javanica*, *M. exigua* Göldi, 1892, *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. enterolobii*.

Quanto às espécies de *Meloidogyne* já identificadas em plantas nativas ou áreas de cerrado destacam-se *M. incognita*, *M. javanica*, *M. hapla*, *M. arenaria*, *M. morocciensis* e *M. enterolobii*. No entanto, trabalhos têm demonstrado que a mais frequente em condições naturais é *M. javanica*, como constatado por Souza et al. (1994) - 85% das amostras- e Silva (2012). Essa espécie possui grande ocorrência e distribuição em regiões tropicais e subtropicais devido à ampla gama de hospedeiros (Dong et al., 2001; Meng et al., 2004). Na Mata Atlântica também há relatos de predominância de *M. javanica* (Lima et al., 2005). Antes et al. (2012), além de *M. javanica*, identificaram plantas nativas no Oeste do Paraná capazes de hospedar *M. incognita*.

Além de predominante, essa espécie pode ser encontrada em plantas nativas como, por exemplo, *Dimorphandra mollis* Benth. (Huang et al., 1991), *Enterolobium contortisiliquum*

(Vell.) Morong, *Enterolobium gummiferum* (Mart.) J.F.Macbr., *Mimosa caesalpinifolia* Benth., *Ormosia arborea* (Vell.) Harms, *Solanum lycocarpum* L. e *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos (Silva, 2012).

Quanto a *M. arenaria* há relato de hospedabilidade em *Cybianthus gardneri* (A. DC.) (Huang *et al.*, 1991) e da presença em área de cerrado por Silva (2012) mesmo que em baixas populações.

Já *M. morocciensis* foi relatada em raízes de mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Tréc.), planta nativa do cerrado, por Carneiro *et al.* (2006) e houve confirmação da presença dessa espécie por Silva (2012). Além disso, o fenótipo de *Meloidogyne* EST A3, detectado em vegetação nativa do Cerrado do Distrito Federal por Souza *et al.* (1994), que era atribuído a *M. arenaria*, na verdade foi demonstrado pertencer a *M. morocciensis* por Carneiro *et al.* (2008).

Outra espécie amplamente disseminada em áreas agrícolas é *M. incognita* que foi encontrada em campo limpo (isolada e em mistura com *M. javanica*), em campo sujo (com população isolada) e em mata de galeria (duas populações isoladas) num total 10,60 % das amostras em levantamento de Silva (2012). Na Mata Atlântica *M. incognita* foi detectada em vegetação nativa, no Rio de Janeiro, por Lima *et al.* (2005).

Por outro lado, embora pouco detectada em trabalhos anteriores em cerrado, *M. hapla* foi encontrada por Silva (2012), ampliando a lista de espécies de *Meloidogyne* associadas à vegetação nativa desse bioma.

Além dessas espécies de plantas nativas, *M. enterolobii*, espécie de difícil controle, foi relatada em muricizeiro (*Byrsonima cydoniifolia* A.Juss.) no estado de Mato Grosso (Paes *et al.*, 2012).

Apesar dos diferentes relatos na literatura, ainda há um árduo caminho a percorrer no intuito de se conhecer as plantas hospedeiras de *Meloidogyne* no Cerrado brasileiro.

Por outro lado, o conhecimento de plantas nativas hospedeiras direcionaria o plantio das espécies nativas em áreas degradadas para fins de recomposição da vegetação original e o uso de métodos de controle eficientes próximo a áreas de preservação permanente.

3 Nematóide das galhas

Meloidogyne é conhecido como o nematóide das galhas devido aos sintomas causados nas raízes de plantas infectadas. A descrição do gênero foi realizada por Göldi em 1892 em café no Rio de Janeiro, a partir da espécie tipo *M. exigua*, válida até os dias atuais.

Meloidogyne é um gênero pertence ao Reino Animalia, Filo Nematoda, Classe Chromadorea, Ordem Rhabditida, subordem Tylenchina, infraordem Tylenchomorpha, Família Meloidogynidae e subfamília Meloidogyninae. Atualmente, mais de 100 espécies do gênero estão descritas na literatura e estão validadas.

Algumas espécies como *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* são altamente polífagas (Moens *et al.*, 2009) e amplamente disseminadas nos trópicos, sendo *M. hapla* a espécie de maior ocorrência e importância em clima temperado (Ita, 1981; De Waele e Elsen, 2007). Outras espécies como *M. paranaensis*, *M. enterolobii*, *M. fallax* Karssen, 1996, *M. chitwoodi* Golden *et al.*, 1980 e *M. minor* Karssen, Bolck, van Aelst, van den Beld, Kox, Korthals, Molendijk, Zijlstra, van Hoof & Cook, 2004 são consideradas emergentes em termos de dano econômico às culturas. No Brasil, espécies como *M. ethiopica* Whitehead, 1968, *M. morocciensis*, *M. hispanica* Hirschmann, 1986, *M. exigua* Goeldi 1887, *M. graminicola* Golden e Birchfield, 1965, *M. oryza* Maas, Sanders e Dede, 1978, entre outras, também foram relatadas em culturas de interesse econômico.

A variabilidade genética em *Meloidogyne* pode ocorrer de diferentes formas. As variantes populacionais do nematoide das galhas se expressam na natureza como raças cromossômicas e raças parasitárias.

As raças cromossômicas são caracterizadas por variação no número de cromossomos e representadas por formas haploides e diploides com diferentes tipos de reprodução. Como exemplo tem-se *M. hapla* raça cromossômica A, a qual é um variante haploide com 14 a 17 cromossomos, com reprodução partenogenética meiótica e *M. hapla* raça cromossômica B, variante diploide com 30-31 ou 43-48 cromossomos e reprodução partenogenética mitótica Eisenback *et al.* (1981).

As raças parasitárias são detectadas através de hospedeiras diferenciadoras de espécies e/ou famílias botânicas diferentes, não apresentando relação com as raças cromossômicas. Foram relatadas até então quatro raças parasitárias para *M. incognita*, duas raças para *M. arenaria* (Hartman e Sasser, 1985) e quatro raças para *M. javanica* (Carneiro *et al.*, 2003).

As cultivares diferenciadoras originalmente propostas por Hartman e Sasser (1985) para o estudo das raças parasitárias de *Meloidogyne* são fumo NC-95, algodão deltapine, pimentão California Wonder, melancia Charleston Gray, amendoim Florunner e tomateiro Rutgers. Atualmente, esses cultivares têm sido substituídos por outros devido à dificuldade de obtenção de sementes e multiplicação.

Outras características encontradas em variantes populacionais de *Meloidogyne* são expressas em termos de maior ou menor capacidade reprodutiva (agressividade), virulência, especificidade por determinados hospedeiros e aspectos morfológicos (Roese *et al.*, 2007).

Uma característica morfológica marcante utilizada na identificação de espécies de *Meloidogyne* é a configuração da região perineal. No entanto, esta técnica morfológica atualmente é utilizada como critério adicional na identificação de espécies de *Meloidogyne* em rotina, tendo sido substituída por técnicas como eletroforese de isoenzimas, especialmente

para os fenótipos de esterase e malato-desidrogenase, e por marcadores moleculares espécie-específicos, utilizados em reações de PCR com separação de fragmento de DNA e visualização em gel de agarose.

O ciclo de vida de *Meloidogyne* sp. inicia-se com os os ovos que entram em embriogênese formando, ainda dentro dos mesmos, o juvenil de primeiro estágio (J_1) que passa pela primeira ecdise e origina o Juvenil de segundo estágio (J_2). A eclosão ocorre por força mecânica com auxílio do estomatoestilete e também por ação enzimática, especialmente de quitinases, liberadas pelo estilete.

O J_2 pré-parasítico é o estágio móvel infectante, sendo guiado até as raízes por exsudados radiculares liberados pelas plantas. Ao encontrar uma raiz, o J_2 penetra pela zona de alongação, utilizando a força mecânica do estilete para perfurar os tecidos e enzimas degradantes de parede celular, produzidas nas glândulas esofágicas e liberadas no interior dos tecidos pelo estilete.

Após a penetração ocorre a migração intercelular do J_2 em direção ao cilindro vascular, local em que induz sítio de alimentação com diferenciação de cinco a sete células multinucleadas e hipertrofiadas, as células gigantes (Abad, 2008). Os tecidos adjacentes às células gigantes sofrem hiperplasia, o que leva ao intumescimento do local de infecção e à formação de sintoma conhecido como galha. As células gigantes nutrem o J_2 sedentário, alterando o seu formato e aumentando o volume do corpo.

Em seguida ocorrem sucessivas ecdises que resultam sequencialmente nos estádios J_3 e J_4 , sem estilete e com formato salsichoide e, pós a última ecdise, as fêmeas com formato piriforme e os machos com formato vermiforme. As fêmeas jovens são leitosas e ao final de seu ciclo de vida projetam o seu corpo com a região posterior rumo à superfície da raiz, liberando até 500 ovos envoltos em massa de ovos mucilaginosos protetora. Já os machos deixam as raízes logo após a última ecdise. A cópula das fêmeas

pelos machos ocorre em espécies de reprodução anfimítica. O ciclo de vida do nematoide pode ser visualizado na Figura 1 a seguir.

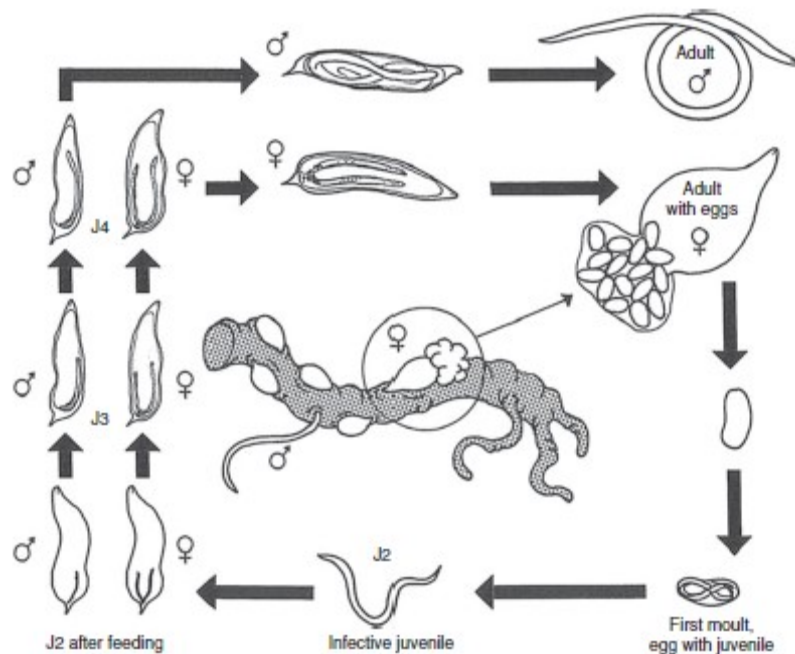


Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida do nematoide das galhas, *Meloidogyne* spp. (Adaptado de Karssen e Moens, 2006).

4 *Meloidogyne incognita*

Meloidogyne incognita (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 é uma das quatro espécies do gênero, mais comuns no mundo. É altamente polífaga, com hospedeiras em quase todas as famílias botânicas e, reconhecida como uma das espécies economicamente mais importantes do mundo (Jepson 1987; Trudgill e Blok, 2001; Hunt e Handoo, 2009). Essa espécie possui reprodução partenogenética mitótica, contudo, possui alta capacidade de adaptação a condições ambientais bióticas ou abióticas desfavoráveis (Abad e Opperman, 2009). Análises citogenéticas revelaram a existência de isolados com número de cromossomos variando de 30

a 39 bem como isolados com 40 a 48 cromossomos (Triantaphyllou, 1985; Castagnone-Sereno, 2006).

O genoma desse nematoide foi sequenciado na França e constitui a primeira sequência do genoma de um animal que se reproduz assexuadamente, fornecendo informações importantes sobre as adaptações exigidas pelos metazoários para parasitar plantas com sucesso (Abad *et al.*, 2008).

A classificação de populações de *M. incognita* de diversos países realizada por Taylor e Sasser (1983) separou a espécie em quatro raças, das quais a mais comum é a raça 1, as outras três ocorrem em diversas regiões do mundo, mas em menor frequência. Essa raça não se reproduz em fumo, algodão e amendoim; a raça 2 não se reproduz em algodão e amendoim; a raça 3 não se reproduz em fumo e amendoim e a raça 4 só não se reproduz em amendoim (Freitas *et al.*, 2006).

Para a agricultura no Brasil, as raças parasitárias têm uma grande relevância, uma vez que muitas cultivares são selecionados com base na resistência a determinadas raças parasitárias e para o direcionamento das pesquisas voltadas à resistência genética de plantas.

5 *Meloidogyne javanica*

Meloidogyne javanica (Treub, 1885) Chitwood, 1949 é um nematoide de ocorrência mundial. Foi relatado originalmente parasitando cana-de-açúcar em Java, Indonésia, porém é uma espécie cosmopolita nas regiões tropical e subtropical, sendo a segunda espécie em termos de dispersão, superada apenas por *Meloidogyne incognita* (Silva, 2013).

Caracterizada por ser altamente polífaga, esta espécie parasita um grande número de plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas (Perry *et al.*, 2009) e é predominante em regiões com estações seca, características, com menos de 5 mm de precipitação por mês durante três

meses ou mais (Eisenback e Triantaphyllou, 1991). *Meloidogyne javanica* foi relatada também em biomas naturais como cerrado (Souza *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 2013), Mata Atlântica (Lima *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2008b).

Ferramentas como a configuração da região perineal, o perfil de esterase por eletroforese de isoenzimas e os marcadores SCAR são utilizadas para diagnosticar essa espécie. Segundo Freire *et al.* (2002), esta espécie normalmente é diploide possuindo de 42 a 44 cromossomos. Existem relatos de baixa variabilidade genética intra-específica em populações causada provavelmente pela reprodução partenogenética mitótica do nematoide (Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997).

Até o momento, quatro raças de *M. javanica* foram descritas (Carneiro *et al.*, 2003). A raça 1 parasita fumo, melancia e tomate; a raça 2 parasita essas plantas e pimentão; a raça 3 parasita as mesmas plantas da raça 1 e o amendoim (Rammah e Hirschmann, 1990); e por fim a raça 4 relatada por Carneiro *et al.*, 2003, parasita fumo, melancia, tomate, pimentão, amendoim, mas não parasita algodão.

6 *Meloidogyne morocciensis*

Meloidogyne morocciensis Rammah & Hirschmann, 1990 foi descrito no Marrocos por Rammah & Hirschmann, 1990, parasitando porta-enxerto de pessegueiro (*Prunus persica* cv. Missouri). Por algum tempo foi identificada como *M. arenaria*, baseado em poucos padrões perineais. Essa espécie possui reprodução partenogenética mitótica e tem um número de 47-49 cromossomos somáticos, assemelhando-se a certas populações hipotriplóides de *M. arenaria* (Triantaphyllou, 1985). Bioquimicamente possui fenótipo de esterase (A3) atribuído anteriormente à *M. arenaria* (Esbenshade, 1985). Estudos detalhados de morfologia, aos

microscópios óptico e eletrônico, revelaram diferenças entre *M. morocciensis* e qualquer outro nematoide do gênero (Carneiro *et al.*, 2008).

Apesar de não ter sido relatada como problema em campos de produção comercial de culturas econômicas, testes em casa de vegetação demonstram que *M. morocciensis* tem potencial de dano às culturas da batata (Lima-Medina *et al.*, 2016) e da soja (Mattos, 2013).

7 *Meloidogyne paranaensis*

Meloidogyne paranaensis Carneiro *et al.*, 1996 está entre as 17 espécies que atacam o cafeeiro no mundo. Inicialmente essa espécie foi identificada como *M. incognita* e por vinte anos foi considerada apenas uma variante de *M. incognita* em cafeeiro (Carneiro *et al.*, 1996). Foi descrita como espécie nova, capaz de parasitar vários hospedeiros incluindo tomate (Carneiro *et al.*, 1996) e soja (Castro *et al.*, 2003; Roese *et al.*, 2004), além de diferentes espécies de plantas daninhas (Roese e Oliveira, 2004).

Os sintomas nas raízes de cafeeiro incluem a indução de rachaduras e necroses e a não formação de galhas, este último considerado sintoma típico de nematoides da família Meloidogynidae em raízes de plantas. *Meloidogyne paranaensis* causa severos danos nas raízes de cafeeiro e é considerada mais agressiva que outras espécies de *Meloidogyne* tais como *M. exigua* e *M. incognita*.

Nas áreas em que ocorre *M. paranaensis* pode ser encontrada em mistura com outras espécies de *Meloidogyne* ou como população única (Carneiro *et al.*, 1996). Atualmente, *M. paranaensis* encontra-se distribuída pela América do Norte (Estados Unidos da América, no Havaí), América Central, Caribe, Guatemala e América do Sul (Brasil).

Devido à sua distribuição geográfica, aos danos causados em suas hospedeiras e às perdas causadas nas culturas, *M. paranaensis* é considerada uma espécie emergente em termos de importância econômica (Moens *et al.*, 2009).

8 Análise transcritômica de nematoides

Uma estratégia promissora a ser utilizada no controle de nematoides fitoparasitas é o uso da genética molecular. No entanto, essa estratégia somente pode ser trabalhada através do conhecimento prévio dos genes. Muitos genes de nematoides fitoparasitas, com envolvimento na relação nematoide-planta, têm sido relatados com base em análise transcritômica. (Haegeman *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014).

Transcritoma é definido como o total de transcritos expressos em uma célula ou tecido de um organismo, em uma determinada condição ou estado, enquanto a transcritômica é a ciência que estuda os transcritomas e os meios para a sua geração e análise (Passos, 2014).

Entende-se por total de transcritos não somente os RNAs mensageiros, que contém informações que são decodificadas nos ribossomos levando à formação de proteínas funcionais, mas também RNAs não codificadores (ncRNAs), os quais são distribuídos em diferentes classes de acordo com suas características como RNAs ribossômicos, RNAs transportadores, pequenos RNAs ou microRNAs como snoRNAs, miRNAs, siRNAs e piRNAs, além de longos RNAs não codificadores como Xist, Evf, Air, CTN e PINK (Arruda, 2015).

Os transcritomas são complexos, pois contém cópias de centenas ou milhares de mRNAs diferentes e sua análise leva à obtenção de perfis de expressão gênica que variam de organismo para organismo e de célula a célula de um mesmo organismo (Passos, 2014).

A análise transcritômica é feita de forma qualitativa, identificando-se os genes que se expressam e os que não se expressam, e quantitativa, avaliando-se os níveis de variação na expressão de diferentes genes (Tan *et al.*, 2009).

Diferentes técnicas podem ser utilizadas na análise global de transcritos de um organismo como os microarranjos de DNA-RNA-Seq, sequenciamento de ESTs por SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), Massive Parallel Signature Sequencing (MPSS) e RNA-Seq.

Os microarranjos permitem o estudo simultâneo de todos os genes expressos em um transcrito, ou mesmo a comparação de transcritomas (Borges-Osório e Robinson, 2013), enquanto a SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) permite a análise digital de padrões gerais de expressão gênica pelo uso de sequências de 10-14 pb, únicas de cada gene (Velculescu *et al.*, 1995); MPSS é uma técnica usada para identificar e quantificar transcritos, porém conferindo uma maior especificidade que o método SAGE (Brenner *et al.*, 2000). RNA-Seq é a técnica que revela os tipos de RNA presentes em uma determinada amostra, bem como a sua quantidade, com base na análise de bibliotecas de cDNA em equipamentos de alto rendimento e sensibilidade (Nygaard e Hovig, 2009).

As novas tecnologias de sequenciamento possibilitaram estudos voltados à genômica estrutural e funcional, mediante o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar milhões de pares de bases em uma única corrida. Os sequenciadores automáticos de melhor rendimento surgiram no final da década de 80 com o AB370, em 1987, e posteriormente o ABI 3730xl, ambos da empresa Applied Biosystems. Sequenciadores de segunda geração surgiram somente em 2005, com o Sistema 454 FLX (Roche), que realiza o sequenciamento baseado em síntese, conhecido como pirosequenciamento (Ronaghi *et al.*, 1998), Genome Analyzer (Solexa/ Illumina), o SOLID (Applied Biosystems) e a HeliscopeTrue Single Molecule Sequencing - tSMS (Helicos) (Carvalho e Silva, 2010).

Em 2010, a terceira geração de sequenciadores de alto rendimento foi lançada com a plataforma HiSeq 2000 da Illumina que consiste no método mais barato de sequenciamento de nova geração em larga escala. Recentemente, foram lançadas plataformas de bancada mais compactas, como o sistema MiSeq da Illumina e o Ion PGM (Personal Genome Machine), desenvolvido pela Ion Torrent, ambas consideradas de quarta geração.

O sistema MiSeq, quando comparado ao sistema HiSeq, apresenta menor capacidade de geração de dados, porém é mais rápido na geração dos mesmos. Destaca-se, no entanto, que ambos consistem no sequenciamento baseado em síntese, onde uma fita de DNA se liga a adaptadores presentes na placa do equipamento, sendo amplificada em fase sólida por PCR em ponte. A amplificação gera aglomerados de sequências com milhões de cópias do mesmo fragmento de DNA dupla fita, os quais são linearizados. Novas fitas do DNA fita simples são sintetizadas base por base, através da adição de deoxinucleotídeos com marcadores fluorescentes cliváveis e uma região bloqueadora removível (Carvalho, 2016).

As sequências geradas em plataformas de nova geração são analisadas por programas de bioinformática e a montagem feita com base em um genoma de referência, quando há disponibilidade em bancos de dados de acesso público; com base em análise *de novo*, quando não há genoma de referência disponível; e com base na combinação dos dois métodos, quando o genoma de referência não foi bem anotado ou apresenta baixa qualidade.

Caenorhabditis elegans Maupas, 1900, nematoide de vida livre, foi o primeiro animal a ter o genoma sequenciado (The *C. elegans* Genome Sequencing Consortium, 1998), bem antes da obtenção de genomas mais complexos, como o humano, concluído apenas em 2003. Este nematoide é utilizado como modelo genético para pesquisas envolvendo genes de animais.

Contudo, o genoma do primeiro nematoide fitoparasita somente foi concluído 10 anos após o genoma de *C. elegans*. A importância econômica de *M. incognita* e sua ocorrência

mundial o habilitaram a ser o nematoide fitoparasita escolhido (Abad *et al.*, 2008). Nesse mesmo ano, *M. hapla* teve o seu genoma desvendado (Opperman *et al.*, 2008). Os autores demonstraram que o genoma de *M. hapla* era mais compacto que o dos demais nematoides fitoparasitas até então sequenciados.

Recentemente, o sequenciamento do genoma de *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner 1934) foi publicado por Kikuchi *et al.* (2011). Essa espécie é a causadora da murcha do pinheiro sendo que parte de sua vida ocorre em um inseto vetor e parte no interior de tecidos vegetais de pinheiros. A análise do genoma desse nematoide pelos referidos autores possibilitou a detecção de grande número de enzimas desintoxicadoras e ausência de proteínas efetoras conhecidas.

O parasitismo de *B. xylophilus* é mediado por um conjunto de genes únicos, formados por eventos como duplicação e transferência horizontal (Kikuchi *et al.*, 2005). O genoma desse nematoide forneceu fortes evidências da ocorrência de transferência horizontal de genes independentes que moldaram a evolução deste fitonematoide (Kikuchi *et al.*, 2011).

Os genomas já sequenciados e as mais de 1.231.447 ESTs de nematoides, depositadas no banco de dados do NCBI (National Centre for Biotechnology Information), impulsionaram os estudos envolvendo o genoma funcional de espécies de nematoides cujo genoma ainda não foi sequenciado. Nesse contexto, os transcritomas de muitos nematoides têm sido gerados em plataformas de nova geração e estudados com base em análises *de novo*. Como exemplo tem-se *Pratylenchus thornei* Sher & Allen, 1953 (Nicol *et al.*, 2012) e *P. coffeae* (Zimmermann, 1898) Filip. & Schu. Stek., 1941 (Haegeman *et al.*, 2011), realizados em Plataforma 454 FLX (Roche).

Meloidogyne graminicola Golden & Birchfield, 1965, nematoide parasita de monocotiledôneas, das quais o arroz é a principal hospedeira, teve o transcritoma gerado a partir de formas infectantes J₂ (Haegeman *et al.*, 2013), enquanto estádios pré-parasíticos J₂ e

adultos (fêmeas) do nematoide de cisto dos cereais, *Heterodera avenae* Wollenweber, 1924, foram alvo de sequenciamento na plataforma Illumina GAIIx (Kumar *et al.*, 2014). O nematoide *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942, parasita da parte aérea de plantas e causador da doença ponta branca do arroz, também teve o seu transcrito revelado por Kikuchi *et al.* (2014).

Recentemente, outros nematoides fitoparasitas também tiveram o transcrito sequenciado em plataforma 454 GS FLX – Roche como, por exemplo, *P. zae* Graham, 1951, a partir de estádios mistos do nematoide (Fosu-Nyarko *et al.*, 2016a) e *H. schachtii* A.Schmidt, (1871) a partir de transcritos extraídos de formas J₂ (Fosu-Nyarko *et al.*, 2016b).

Decifrar os padrões de expressão gênica em diferentes fases do ciclo de vida de fitonematoides permite elucidar os mecanismos de patogenicidade dos mesmos, auxiliando na identificação de sequências de importância para o parasitismo em plantas. Nesse caso, os perfis de expressão temporal de transcritos correspondem à fase de desenvolvimento do nematoide e muitos deles liberados via estilete como secreções do nematoide no interior dos tecidos vegetais (Nguyen *et al.*, 2014).

As secreções liberadas por nematoides podem ter origens diferentes, ou seja, liberadas através da cutícula, dos anfídios, das glândulas retais e do poro excretor. No entanto, as principais moléculas efetoras conhecidas atualmente são oriundas de glândulas esofagianas de nematoides fitoparasitas, as quais são secretadas através do estilete no interior de raízes de plantas (Dubreuil *et al.*, 2007).

Nematoides sedentários como *Meloidogyne* spp., orquestram mudanças na expressão gênica do hospedeiro, levando à formação de células gigantes (Jammes *et al.*, 2005) como a proteína 14-3-3 (Jaubert *et al.*, 2002) e uma calreticulina (Jaubert *et al.*, 2005) em *M. incognita*, e um homólogo da N-acetiltransferase NodL (Scholl *et al.*, 2003) em *M. incognita* e *M. javanica*, além de várias proteínas de função ainda desconhecida (Huang *et al.*, 2003).

O peptídeo 16D10, secretado pelas glândulas subventrais esofágicas de J₂ de espécies de *Meloidogyne*, afeta o crescimento radicular através da interação direta com fatores de transcrição semelhantes aos das plantas (Huang *et al.*, 2006).

A análise funcional também identificou glutathione S-transferases (GST) como molécula efetora do parasitismo necessária para o estabelecimento completo do nematoide no tecido vegetal (Dubreuil *et al.*, 2007). A secreção de GSTs pode proteger o fitonematoide contra espécies reativas de oxigênio produzidas pelas plantas ou modular as respostas das plantas ao parasitismo. O gene MI-GSTS-1 secretado por *M. incognita* pode desintoxicar os hidroperóxidos e aldeídos derivados, gerados por explosão oxidativa na membrana plasmática e na parede celular das células radiculares que cercam espécies migratórias ou ocorrer mais tarde, durante a formação das células gigantes (Melillo *et al.*, 2006). Transcritos Mi-gsts-1 de *M. incognita* foram 27 vezes mais abundantes em J₃ do que em J₂, indicando que o MI-GSTS-1 pode estar envolvido na manutenção do estado sedentário no tecido hospedeiro (Dubreuil *et al.*, 2007).

Rutter *et al.* (2014) estudando mRNAs específicos isolados de células das glândulas esofagianas de *M. incognita*, em várias fases do parasitismo, identificaram 18 supostos efetores. Anotação de sequência combinada com dados de RNA-seq obtidos em oito fases de desenvolvimento de *G. pallida* Stone, 1973 (J₂ nos ovos, estágio J₂ infectante, machos adultos e indivíduos parasitas no início, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a infecção de tubérculos de batata) permitiu a identificação de alguns efetores bem como a descrição dos principais genes envolvidos na invasão de raiz e no estabelecimento de sítios de alimentação (Cotton *et al.*, 2014).

Na interação *Meloidogyne graminicola* - arroz, genes envolvidos na biossíntese da cutícula do nematoide mudaram sua expressão nos estádios J₃, J₄ e adultos (Petitot *et al.* 2016). Esses autores também observaram que genes relacionados ao parasitismo também

foram destaque, tais como enzimas degradantes de parede celular (glicosil hidrolases), que podem desempenhar um papel na invasão de raiz, ou proteases, que podem atuar em várias etapas do parasitismo.

Em *M. graminicola*, o gene *Mg11937* teve forte homologia com a proteína venom allergen-like (VAP), anteriormente descrita em glândulas esofagianas subventrais de formas J₂ de outros nematoides (Haegeman *et al.*, 2012). As proteínas VAP de *G. rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975 (GrVAP1) e *H. schachtii* (HsVAP1 e HsVAP2), têm tido papéis importantes na supressão de respostas de defesa em plantas (Lozano-Torres *et al.*, 2014).

Por outro lado Fosu-Nyarko *et al.* (2016) estudaram mistura, com todas as fases do ciclo de vida de *Pratylenchus zaeae* e identificaram três genes que codificam para proteínas relacionadas ao parasitismo como β -1,4 endoglucanase, calreticulina e SXP-RAL2. Kumar *et al.* (2014) também estudaram estádios realizando transcrito de juvenis pré parasíticos e estágio adulto de *H. avenae*, tendo detectado a presença de enzimas ativadas por carboidratos (Carbohydrate active enzymes - CAZy), glicosil-hidrolases (GHs) e glicosiltransferases (GTs), além de carboidrato esterases (CEs), as quais também estão presentes no genoma de *M. incognita*.

Yang *et al.* (2017), estudando transcritos de diferentes fases do ciclo de vida de *H. avenae*, classificadas como pré-parasíticas (ovos, J₁ e J₂ eclodidos) e pós-parasíticas (J₂, J₃, J₄ e adultos), detectaram que 6 FMRFarmides exibiam pico de expressão no estágio J₂ eclodido em *H. avenae*.

Em *A. besseyi* foram identificadas 14 famílias de glicosídeos hidrolases - GH5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 26, 44, 45, 48, 51, 61 e 74 (Wang *et al.*, 2014), sendo a maioria delas normalmente produzidas por patógenos foliares vegetais (Lynd *et al.*, 2002) e as celulases GH45 que também estão presentes em espécies de *Bursaphelenchus* (Kikuchi *et al.*, 2011).

Além de estudos envolvendo sequências de nematoides, estudos da interação planta-nematoide são cada vez mais frequentes. Para o nematoide *M. incognita* destacam-se os estudos da interação com *Arabidopsis thaliana* L. (Jammes *et al.*, 2005), feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (Santini, 2014), arroz (*Oryza sativa* L.) (Nguyen *et al.*, 2014), alfafa (Postnikova *et al.*, 2015), entre outros. Trabalhos como esses são importantes no entendimento do parasitismo e dos mecanismos de defesa das plantas contra fitonematoides.

Outro estudo realizado por Li *et al.* (2016), relataram a presença de quinases, neuropeptídeos e proteínas efectoras, além do complexo gênico SMA-2/SMA-3/SMA-4 e SMA-9, envolvidos na reação do nematoide a *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) Sayre & Starr, 1986, (Brito *et al.*, 2007).

Quanto a evidências de transferência horizontal de genes (HGT), de bactérias ou fungos para nematoides, as mesmas têm sido relatadas por diferentes autores (Bakhetia *et al.*, 2007; Kikuchi *et al.*, 2011). Como exemplo tem-se o gene GH16 (endo-1,3 betaendoglucanase), adquirido por nematoides como *B. xylophilus* e *Aphelenchus avenae* Bastian, 1865 que alternativamente se alimentam de hifas de fungos. A aquisição de celulases foram imprescindíveis para o desenvolvimento de mecanismos para penetração em raízes de plantas (Jones *et al.*, 2005).

Considerando o nematoide *M. paranaensis*, não há qualquer relato na literatura e nem depósito em bancos de dados de sequências do genoma funcional utilizando sequenciadores de nova geração.

9 Utilização de extratos vegetais no controle de *Meloidogyne* spp.

Os fitonematoides atualmente constituem-se em grande desafio para a agricultura, tendo em vista o manejo sustentável de áreas agrícolas. Para que práticas sustentáveis de uso

da terra possam ser implantadas, o uso indiscriminado de insumos agrícolas, que prejudicam a biodiversidade e contaminam o meio ambiente, devem ser banidos da agricultura.

O controle químico de nematoides é realizado pelo uso de nematicidas, moléculas químicas de amplo espectro de ação e fortemente danosas ao meio ambiente. Nesse contexto, há uma necessidade iminente pela busca de moléculas mais efetivas e com elevada especificidade a nematoides fitoparasitas, podendo ser empregadas na agricultura sem prejuízos ao meio ambiente e a outras formas de vida.

Os vegetais superiores apresentam grande diversidade de moléculas bioativas. Pesquisas envolvendo a bioprospecção de plantas com base em sua fitoquímica viabilizam conhecer os compostos químicos e metabólitos secundários presentes nos vegetais para aplicação em diferentes áreas como agricultura, indústria farmacêutica, saúde animal, indústria de cosméticos, indústria de alimentos, entre outras.

De forma a buscar moléculas bioativas, o preparo de extratos tem sido uma alternativa. Na sua produção, podem ser utilizados diferentes métodos de extração, como maceração, percolação, infusão, decocção, ultrassom e fluídos supercríticos, a partir de diferentes partes vegetais (raízes, folhas, flores, frutos e sementes) que devem estar secas e trituradas. As soluções extrativas são filtradas e, em seguida, o solvente é evaporado em rota-evaporador para concentração do extrato e posterior análise fitoquímica qualitativa. Em caso de extrato aquoso, utiliza-se liofilizador para a evaporação e concentração do mesmo (Oliveira *et al.*, 2016).

Solventes de diferentes polaridades como metanol, etanol, hexano, éter etílico, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, n-butanol, entre outros, são utilizados dependendo das substâncias a serem estudadas. A utilização de água viabiliza a extração de compostos essencialmente polares, além de ser um método mais fácil e de menor custo.

A composição química de um extrato pode ser conhecida através de testes químicos qualitativos, rápidos e de baixo custo, sugerindo as possíveis classes de metabólitos secundários presentes (Matos, 1997). Desta forma, a triagem fitoquímica é um procedimento importante para bioprospecção das espécies vegetais de interesse farmacológico e/ou toxicológico.

O bioma cerrado ostenta uma das mais ricas biodiversidades vegetais dentre os biomas brasileiros. A flora nativa presente no cerrado brasileiro tem grande potencial para a descoberta de novas substâncias e desenvolvimento de novos bioprodutos, agregando valor à biodiversidade e contribuindo para a sua conservação e uso sustentável.

No entanto, pouco foi estudado até então da fitoquímica da flora do cerrado (Bessa *et al.*, 2013). Por outro lado, muitos projetos voltados à prospecção da flora Amazônica têm sido apoiados com recursos nacionais e internacionais (Astolfi Filho *et al.*, 2014).

Sabe-se que as plantas superiores produzem metabólitos secundários que podem ser utilizados no controle de patógenos de plantas como fungos (Bigaton *et al.*, 2013) e bactérias (Amorim *et al.*, 2011) além de nematoides (Park *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2013).

A maior parte dos trabalhos em busca de moléculas bioativas no controle de nematoides, tem sido de extratos aquosos e óleos essenciais, sendo que a literatura relata atividade de vários extratos de plantas pertencentes a diferentes famílias botânicas como Solanaceae (Tabela 1), Myrtaceae (Tabela 2), Lamiaceae (Tabela 3), Liliaceae, Aristolochiaceae, Burseraceae, Lauraceae e Poaceae (Tabela 4) e, Apiaceae, Amaryllidaceae, Piperaceae, Geraniaceae, Meliaceae, Fabaceae, Altingiaceae, Amaranthaceae, Caparaceae e Combretaceae (Tabela 5).

Tabela 1. Extratos vegetais de plantas da família Solanaceae com ação nematicida sobre fitonematoides.

Espécie Vegetal	Extrato/Parte vegetal	Dose correspondente a LC ₅₀ ou superior	Tempos de Exposição	Referências
<i>Datura arborea</i> ^a	Aquoso/ Raiz e parte aérea	25 mg. ml ⁻¹	24, 48, 72 e 96 h	Haseeb e Butool (1996)
<i>D. stramonium</i> ^a	Aquoso/ Raiz e parte aérea	25 mg. ml ⁻¹	24, 48, 72 e 96 h	Haseeb e Butool (1996)
<i>Hyoscyamus albus</i> ^a	Aquoso/ Raiz e parte aérea	25 mg. ml ⁻¹	24, 48, 72 e 96 h	Haseeb e Butool (1996)
<i>H. muacus</i> ^a	Aquoso/ Raiz e parte aérea	25 mg. ml ⁻¹	24, 48, 72 e 96 h	Haseeb e Butool (1996)
<i>Nicotiana tabacum</i> ^a	Etanólico/Folha	1,9 mg. ml ⁻¹	24 h	Wiratno <i>et al.</i> , 2009
<i>Solanum incanum</i> ^a	Aquoso/ Raiz e parte aérea	25 mg. ml ⁻¹	24, 48, 72 e 96 h	Haseeb e Butool (1996)
<i>S. indicum</i> ^a	Aquoso/ Raiz e parte aérea	25 mg. ml ⁻¹	24, 48, 72 e 96 h	Haseeb e Butool (1996)
<i>S. nigrum</i> ^a	Aquoso/ Raiz e parte aérea	25 mg. ml ⁻¹	24, 48, 72 e 96 h	Haseeb e Butool (1996)

Em que: ^aAção nematicida sobre J₂ de *Meloidogyne incognita*.

Tabela 2. Extratos vegetais de plantas da família Myrtaceae com ação nematicida sobre fitonematoides.

Espécie Vegetal	Extrato/P arte vegetal	Dose correspondent e a LC ₅₀ ou superior	Tempos de Exposição	Referências
<i>Eucalyptus citriodora</i> ^a	óleo essencial/ramos	250 ppm	24 h	Pandey <i>et al.</i> (2000)
<i>Eucalyptus hybrida</i> ^a	óleo essencial/ramos	250 ppm	24 h	Pandey <i>et al.</i> (2000)
<i>Eugenia caryophyllata</i> ^b	óleo essencial/botões florais	32 µg ml ⁻¹ (LC ₅₀)	48 h	Sangwan <i>et al.</i> (1990)
<i>Eugenia caryophyllata</i> ^c	óleo essencial/botão floral	1000 µl.L ⁻¹	4 h	Park <i>et al.</i> (2005)
<i>Eugenia caryophyllata</i> ^d	óleo essencial/parte aérea	3000 ppm (3 h), 1500 ppm (6 h)	3 e 6 h	Zouhar <i>et al.</i> (2009)
<i>Leptospermum petersonii</i> ^c	óleo essencial/folha	500 µl.L ⁻¹	4 h	Park <i>et al.</i> (2005)
<i>Pimenta dioica</i> ^c	bagas	0,609 mg.ml ⁻¹	24 h	Park <i>et al.</i> (2007)
<i>Pimenta racemosa</i> ^c	óleo essencial/folha	2000 µl.L ⁻¹	4 h	Park <i>et al.</i> (2005)
<i>Syzygium aromaticum</i> ^a	etanólico/brotos	3,9 mg.ml ⁻¹	24 h	Wiratno <i>et al.</i> , 2009

Em que: ^aAção nematicida sobre J₂ de *Meloidogyne incognita*; ^bAção nematicida sobre J₂ de *Tylenchulus semipenetrans* Cobb, 1913; ^cAção nematicida sobre estádios diversos de *Bursaphelenchus xylophilus*; ^dAção nematicida sobre estádios diversos *Ditylenchus dipsaci* Kuhn, 1857.

Tabela 3. Extratos vegetais de plantas da família Lamiaceae com ação nematicida sobre fitonematoides.

Espécie Vegetal	Extrato/Parte vegetal	Dose correspondente a LC₅₀ ou superior	Tempos de Exposição	Referências
<i>Agastache rugosa</i> ^a	óleo essencial	47.3 µg.ml ⁻¹ (LC ₅₀)	24 h	Li <i>et al.</i> (2013)
<i>Hyssopus cuspidatus</i> ^b	óleo essencial/parte aérea floral	338,7 µg.ml ⁻¹ (LC ₅₀)	24 e 48 h	Li <i>et al.</i> (2012)
<i>Mentha arvensis</i> ^a	óleo essencial/ramos	1000 ppm	24 h	Pandey <i>et al.</i> (2000)
<i>Mentha arvensis</i> ^c	óleo essencial/planta inteira	0,291 mg.ml ⁻¹ (LC ₅₀)	24, 48 e 72 h	Andrés <i>et al.</i> (2012)
<i>Mentha arvensis</i> ^d	óleo essencial/folhas	7500 ppm (3 h) e 1500 ppm (6 h)	3 e 6 h	Zouhar <i>et al.</i> (2009)
<i>Mentha citrata</i> ^d	óleo essencial/planta inteira	5000 ppm (6 h)	3 e 6 h	Zouhar <i>et al.</i> (2009)
<i>Mentha rotundifolia</i> ^c	óleo essencial/folhas	0,204 mg.ml ⁻¹ (LC ₅₀)	24, 48 e 72 h	Andrés <i>et al.</i> (2012)
<i>Mentha rotundifolia</i> ^c	óleo essencial/folhas	0,293 mg.ml ⁻¹ (LC ₅₀)	24, 48 e 72 h	Andrés <i>et al.</i> (2012)
<i>Mentha spicata</i> ^a	óleo essencial/ramos	1000 ppm	24 h	Pandey <i>et al.</i> (2000)
<i>Mentha spicata</i> ^c	óleo essencial/planta inteira	2000 µl.L ⁻¹	4 h	Park <i>et al.</i> (2005)
<i>Ocimum basilicum</i> ^a	óleo essencial/ramos	250 ppm	24 h	Pandey <i>et al.</i> (2000)

<i>Ocimum basilicum</i> ^d	óleo essencial/planta inteira	7500 ppm (3 h) e 5000 ppm (6 h)	3 e 6 h	Zouhar <i>et al.</i> (2009)
<i>Origanum compactum</i> ^d	óleo essencial/parte aérea	1500 ppm	3 e 6 h	Zouhar <i>et al.</i> (2009)
<i>Origanum majorana</i> ^d	óleo essencial/parte aérea	7500 ppm (6 h)	3 e 6 h	Zouhar <i>et al.</i> (2009)
<i>Origanum vulgare</i> ^d	óleo essencial/parte aérea	1500 ppm	3 e 6 h	Zouhar <i>et al.</i> (2009)
<i>Origanum vulgare</i> ^e	óleo essencial/parte aérea e fase de floração	1,984 mg.ml ⁻¹ (LC ₁₀₀)	24 h	Barbosa <i>et al.</i> (2010)
<i>Satureja montana</i> ^c	óleo essencial/folhas	0,041 mg.ml ⁻¹ (LC ₅₀)	24, 48 e 72 h	Andrés <i>et al.</i> (2012)
<i>Satureja montana</i> ^e	óleo essencial/folhas	0,858 mg.ml ⁻¹ (LC ₁₀₀)	24 h	Barbosa <i>et al.</i> (2010)
<i>Thymbra capitata</i> ^e	óleo essencial/parte aérea e fase de floração	0,985 mg.ml ⁻¹ (LC ₁₀₀)	24 h	Barbosa <i>et al.</i> (2010)
<i>Thymus caespititius</i> ^e	óleo essencial/parte aérea e fase de floração	0,874 mg.ml ⁻¹ (LC ₁₀₀)	24 h	Barbosa <i>et al.</i> (2010)
<i>Thymus mastichina</i> ^c	óleo essencial/folhas	0,300 mg.ml ⁻¹ (LC ₅₀)	24, 48 e 72 h	Andrés <i>et al.</i> (2012)
<i>Thymus matschiana</i> ^d	óleo essencial/ inteira	3000 ppm (3 h) e 1500 ppm (6 h)	3 e 6 h	Zouhar <i>et al.</i> (2009)

<i>Thymus vulgaris</i> ^c	óleo essencial/folhas	0,224 mg.ml ⁻¹ (LC ₅₀)	24, 48 e 72 h	Andrés <i>et al.</i> (2012)
<i>Thymus vulgaris</i> ^d	óleo essencial/planta inteira	1500 ppm	3 e 6 h	Zouhar <i>et al.</i> (2009)
<i>Thymus zygis</i> ^c	óleo essencial/folhas	0,226 mg.ml ⁻¹ (LC ₅₀)	24, 48 e 72 h	Andrés <i>et al.</i> (2012)

Em que: ^aAção nematicida sobre J₂ de *Meloidogyne incognita*; ^bAção nematicida sobre J₂ de *Heterodera avenae*; ^cAção nematicida sobre J₂ de *Meloidogyne javanica*; ^dAção nematicida sobre estádios diversos *Ditylenchus dipsaci*; ^eAção nematicida sobre estádios diversos de *Bursaphelenchus xylophilus*.

Tabela 4. Extratos vegetais de plantas das famílias Liliaceae, Aristolochiaceae, Burseraceae, Lauraceae e Poaceae com ação nematicida sobre fitonematoides.

Espécie Vegetal	Extrato/Parte vegetal	Dose correspondente a LC ₅₀ ou superior	Tempos de Exposição	Referências
Família Liliaceae				
<i>Allium sativum</i> ^a	aquoso	1 % (p/v)	6, 12, 24 e 48 h	Gong <i>et al.</i> (2013)
<i>Allium sativum</i> ^b	óleo essencial/bulbo	31.25 µl.L ⁻¹	4 h	Park <i>et al.</i> (2005)
<i>Allium sativum</i> ^c	aquoso/bulbo	983.0 µl. L ⁻¹ (24 h); 708.0 µl.L ⁻¹ (48 h) e 678.0 µl.L ⁻¹ (72 h)	24, 48 e 72 h	Danquah <i>et al.</i> (2011)
Família Aristolochiaceae				
<i>Asiasarum sieboldi</i> ^b	óleo essencial/raízes	2000 µl.L ⁻¹	4 h	Park <i>et al.</i> (2005)
Família Burseraceae				
<i>Boswellia carterii</i> ^b	óleo essencial/resina	1000 µl.L ⁻¹	4 h	Park <i>et al.</i> (2005)
Família Lauraceae				

<i>Cinnamomum verum</i> ^b	óleo essencial/casca	125 $\mu\text{l.L}^{-1}$	4 h	Park <i>et al.</i> (2005)
<i>Litsea cubeba</i> ^b	óleo essencial/frutos	0,504 mg.ml^{-1}	24 h	Park <i>et al.</i> (2007)
Família Poaceae				
<i>Cymbopogon citratus</i> ^b	óleo essencial/folhas	1,984 mg.ml^{-1} (LC ₁₀₀)	24 h	Barbosa <i>et al.</i> (2010)
<i>Cymbopogon citratus</i> ^b	óleo essencial/planta inteira	500 $\mu\text{l.L}^{-1}$	4 h	Park <i>et al.</i> (2005)
<i>Cymbopogon martinii</i> ^a	óleo essencial/ramos	1000 ppm	24 h	Pandey <i>et al.</i> (2000)

Em que: ^aAção nematicida sobre J₂ de *Meloidogyne incognita*; ^b Ação nematicida sobre estádios diversos de *Bursaphelenchus xylophylus*; ^cAção nematicida sobre J₂ de *Globodera pallida*; ^dAção nematicida sobre estádios diversos *Ditylenchus dipsaci*; ^eAção nematicida sobre estádios diversos de *Bursaphelenchus xylophylus*.

Tabela 5. Extratos vegetais de plantas das famílias Apiaceae, Amaryllidaceae, Piperaceae, Geraniaceae, Meliaceae, Fabaceae, Altingiaceae, Amaranthaceae, Caparaceae e Combretaceae com ação nematicida sobre fitonematoides.

Espécie Vegetal	Extrato/Parte vegetal	Dose correspondente a LC ₅₀ ou superior	Tempos de Exposição	Referências
Família Apiaceae				
<i>Coriandrum sativum</i> ^a	óleo essencial/erva	0,6 mg.ml^{-1}	24 h	Kim <i>et al.</i> (2008)
<i>Pimpinella anisum</i> ^a	óleo essencial/botão floral	2000 $\mu\text{l.L}^{-1}$	4 h	Park <i>et al.</i> (2005)
<i>Trachyspermum ammi</i> ^a	óleo essencial/sementes	0,431 mg.ml^{-1}	24 h	Park <i>et al.</i> (2007)
Família Amaryllidaceae				

<i>Allium cepa</i> ^a	óleo/cebola	17.6 µg.ml ⁻¹ (macho), 13.8.µg ml ⁻¹ (Fêmea) e 12.1 µg.ml ⁻¹ (juvenil)	4 h	Choi <i>et al.</i> (2007a)
Família Piperaceae				
<i>Piper betle</i> ^b	etanólico/folha	3 mg.ml ⁻¹	24 h	Wiratno <i>et al.</i> ,2009
Família Geraniaceae				
<i>Pelargonium graveolens</i> ^b	óleo essencial/ramos	1000 ppm	24 h	Pandey <i>et al.</i> (2000)
<i>Pelargonium graveolens</i> ^c	óleo essencial/parte aérea	3000 ppm (6 h)	3 e 6 h	Zouhar <i>et al.</i> (2009)
<i>Pelargonium graveolens</i> ^b	óleo essencial/folhas	2000 µl.L ⁻¹	24 h	Leela <i>et al.</i> (1992)
Família Meliaceae				
<i>Azadirachta indica</i> ^d	aquoso/folhas	1 mg.ml ⁻¹ (48 h)	24 e 48 h	Moosavi <i>et al.</i> (2012)
<i>Azadirachta indica</i> ^d	aquoso/sementes	1 mg.ml ⁻¹ (a partir de 24 h)	24 e 48 h	Moosavi <i>et al.</i> (2012)
<i>Melia azedarach</i> ^b	aquoso/polpa do fruto	955 µg.ml ⁻¹ (EC ₅₀)	48 h	Aoudia <i>et al.</i> 2012
Família Fabaceae				
<i>Chamaespartium tridentatum</i> ^a	óleo essencial/flores	1,981 mg.ml ⁻¹	24 h	Barbosa <i>et. al.</i> (2010)
Família Altingiaceae				
<i>Liquidambar orientalis</i> ^a	óleo essencial/resina	0,6 mg.ml ⁻¹	24 h	Kim <i>et al.</i> (2008)
Família Amaranthaceae				
<i>Chenopodium ambrosioides</i> ^b	óleo essencial/folhas , caule e flores	49.55 µg.ml ⁻¹	24 h	Bai <i>et al.</i> (2011)
Família Caparaceae				
<i>Caparis spinosa</i> ^b	extrato metanólico/haste	215 mg.L ⁻¹	72 h	Caboni <i>et al.</i> (2012a)
Família Combretaceae				

<i>Terminalia nigrovenulosa</i> ^b	extrato metanólico	0,5 mg.ml ⁻¹	12 h	Nguyen <i>et al.</i> (2013b)
--	--------------------	-------------------------	------	------------------------------

Em que: ^aAção nematicida sobre estádios diversos de *Bursaphelenchus xylophilus*; ^bAção nematicida sobre J₂ de *Meloidogyne incognita*; ^cAção nematicida sobre estádios diversos *Ditylenchus dipsaci*; ^dAção nematicida sobre J₂ de *Meloidogyne incognita*.

A ação nematicida, na maioria das vezes, é encontrada diretamente no extrato da planta, no entanto, muitos pesquisadores têm aprimorado técnicas de extração e identificação dos metabólitos secundários com atividade nematicida. Nesse aspecto, embora a maioria dos trabalhos relate ação de extratos como, por exemplo, de *Urginea maritima* (L.) Stearn., *Plantago lanceolata* L., *Plantago rugelli* (L.) Decne e *Quillaja saponaria* Molina no controle *in vitro* de nematoides Meyer *et al.*,2006; (Kaskavalci e Civelek 2009; Giannakou, 2011; Nguyen *et al.*, 2013) há uma tendência à caracterização dos metabólitos presentes nesses e em outros materiais com ação nematicida e que possam ser utilizados na agricultura.

A seguir encontram-se alguns dos compostos já identificados com ação nematicida sobre *Bursaphelenchus xylophilus* (Tabela 6), *Meloidogyne incognita* (Tabela 7) e sobre outras espécies de fitonematoides (Tabela 8).

Tabela 6. Compostos identificados com ação nematida sobre *Bursaphelenchus xylophilus* (Estádios diversos).

Compostos com ação nematicida	Concentração	Referência
Diallyl disulphide	LC ₅₀ de 37,06; 43,2 e 46,48 µl.L ⁻¹ para juvenis, machos e fêmeas respectivamente.	Park <i>et al.</i> (2005)
Diallyl trisulphide	LC ₅₀ de 2,79; 3,72 e 2,79 µl l ⁻¹ para juvenis, machos e fêmeas respectivamente.	Park <i>et al.</i> (2005)
Cinnamyl acetate	LC ₅₀ de 32,81; 39,30 e 36,50 µl.L ⁻¹ para juvenis, machos e fêmeas respectivamente	Park <i>et al.</i> (2005)

Geranial, Neral, Eugenol, isoeugenol e Metil isoeugenol	1 mg.ml ⁻¹	Park <i>et al.</i> (2007)
Octanal, Nonanal, Decanal, Trans-2-decenal, Trans-2-decen-1-ol, Decanol, undecanal, Dodecanal; Cis-asarone	2 mg.ml ⁻¹	Kim <i>et al.</i> (2008)
Propyl trisulphide	LC ₅₀ de 4,8; 3,7 e 5,0 para machos, fêmeas e juvenis respectivamente.	Choi <i>et al.</i> (2007)
Methyl propyl trisulphide	LC ₅₀ de 16,5; 22,6 e 22,9 µg.ml ⁻¹ para machos, fêmeas e juvenis respectivamente.	Choi <i>et al.</i> (2007)
benzaldehyde, trans-cinnamyl alcohol	2 mg.ml ⁻¹	Kim <i>et al.</i> (2008)
Carvacrol	LC ₅₀ de 0,125; 0,097; 0,099 mg.ml ⁻¹ para machos, fêmeas e juvenis respectivamente (4 h)	Choi <i>et al.</i> (2007b)
Citronellol	LC ₅₀ de 0,245; 0,235; 0,169 mg.ml ⁻¹ para machos, fêmeas e juvenis respectivamente (4 h)	Choi <i>et al.</i> (2007b)
Geraniol	LC ₅₀ de 0,540; 0,415; 0,417 mg.ml ⁻¹ para machos, fêmeas e juvenis respectivamente (4 h)	Choi <i>et al.</i> (2007b)
Menthol	LC ₅₀ de 0,985; 0,894; 1,021 mg.ml ⁻¹ para machos, fêmeas e juvenis respectivamente (4 h)	Choi <i>et al.</i> (2007b)
Nerol	LC ₅₀ de 0,865; 0,926; 0,979 mg.ml ⁻¹ para machos, fêmeas e juvenis respectivamente (4 h)	Choi <i>et al.</i> (2007b)
Thymol	LC ₅₀ de 0,119; 0,110; 0,096 mg.ml ⁻¹ para machos, fêmeas e juvenis respectivamente (4 h)	Choi <i>et al.</i> (2007b)

Citral	LC ₅₀ de 0,187; 0,139; 0,110 mg.ml ⁻¹ para machos, fêmeas e juvenis respectivamente (4 h)	Choi <i>et al.</i> (2007b)
Citronellal	LC ₅₀ de 0,321; 0,298; 0,253 mg.ml ⁻¹ para machos, fêmeas e juvenis respectivamente (4 h)	Choi <i>et al.</i> (2007b)

Tabela 7. Compostos identificados com ação nematida sobre Juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita*.

Compostos com ação nematocida	Concentração	Referência
Estragole	185,9 µg.ml ⁻¹	Li et al.(2013)
Eugenol	66,6 µg.ml ⁻¹	Li et al.(2013)
Methyleugenol	89,4 µg.ml ⁻¹	Li et al.(2013)
(Z)-Ascaridole	32,79 µg.ml ⁻¹	Bai et al. (2011)
2,5-thiophenedicarboxaldehyde	LC ₅₀ de 1,20 mg.L ⁻¹ (1h) e 1,13 mg.L ⁻¹ (24 h)	Caboni et al. 2012a
2-pyridinecarboxaldeido	LC ₅₀ de 25 mg.L ⁻¹ (1h) e 3,6 mg.L ⁻¹ (24 h)	Caboni et al. 2012a
methyl isothiocianato	LC ⁵⁰ de 7,86 mg.L ⁻¹ (24 h)	Caboni et al. 2012a
2-thiophenecarboxaldehyde	LC ₅₀ de 105 mg.L ⁻¹ (1h) e 14,08 mg.L ⁻¹ (24 h)	Caboni et al. 2012a
indole-3-carbonitrile	LC ₅₀ de 68,9 mg.L ⁻¹ (24 h)	Caboni et al. 2012a
Furfural	LC ₅₀ de 11,40 mg.L ⁻¹ (1h) e 8,50 mg.L ⁻¹ (24 h)	Ntalli et al. (2010) e Caboni et al. 2012a
ácido p-coumaric	840 µg.ml ⁻¹ (48 h)	Aoudia et al. (2012)
ácido p-hydroxybenzoico	871 µg.ml ⁻¹ (48 h)	Aoudia et al. (2012)

Furfurol	41,2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (24 h)	Aoudia et al. (2012)
Furfurale	8,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (24 h)	Aoudia et al. (2012)
5-hydroxymethyl-furfurale	45,7 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (24 h)	Aoudia et al. (2012)
Ácido 3,4-dihydroxybenzoico	0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	Nguyen et al. (2013a)
Ácido 3,4,5-trihydroxy benzoico	0,25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	Nguyen et al. (2013b)

Tabela 8. Compostos identificados com ação nematida sobre Juvenis de segundo estágio (J₂) de Fitonematoides.

Compostos com ação nematocida	Concentração	Referências
Eugenol*	33 µg.ml ⁻¹	Sangwan <i>et al.</i> (1990)
Salicylaldehyde**	LC ₅₀ de 6,45; 6,28 e 6,06 µl.L ⁻¹ nos tempos de 24, 48 e 72 respectivamente	Danquah <i>et al.</i> (2011)
Carvacrol, Citronellol, Geraniol, Thymol, Carvone/Cineone, Carvone/Menthol***	0,5 µg.µl ⁻¹ (72 h)	Andrés <i>et al.</i> (2012)
Benzaldehyde, Salicilaldehyde, p-anisaldehyde e Cinnamaldehyde****	2,5 µg.ml ⁻¹	Calvet <i>et al.</i> (2001)
Borneol*****	0,176 mg.ml ⁻¹	Calvet <i>et al.</i> (2001)
Eugenol*****	64 µg.ml ⁻¹	Sangwan <i>et al.</i> (1990)

*Ação nematocida sobre J₂ de *Anguina tritici*; **Ação nematocida sobre J₂ de *Globodera pallida*; ***Ação nematocida sobre *Meloidogyne javanica*; ****Ação nematocida sobre *Pratylenchus brachyurus*; *****Ação nemática sobre *Tylenchulus semipenetrans*.

No cenário da redução de emissão de moléculas tóxicas ao ambiente e ao homem, outro aspecto a ser avaliado é o efeito dos extratos sobre mais de um microrganismo. Nesse sentido, trabalhos têm incluído a avaliação de mais de uma espécie de patógeno, o que é extremamente importante quando se trata de doenças complexas. Um exemplo da aplicação de extratos sobre mais de uma doença é o extrato de sementes de Nim atuando no complexo *Meloidogyne incognita-Fusarium* (Hadian *et al.*, 2011).

Sob esse aspecto, Dang *et al.* (2011) avaliaram extrato metanólico de sementes de *Annona squamosa* L. e observaram que o mesmo foi altamente eficaz contra dois nematoides fitoparasitas, *Bursaphelenchus xylophilus* e *Meloidogyne incognita* e na supressão de doenças

de plantas causadas por *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary e *Puccinia recondita* Erikss (1899).

Vale destacar que nem sempre o ideal é que haja ação sobre um grande número de organismos, levando em consideração que, dentre eles, grande parte é benéfica e desejável em áreas de produção agrícola. Por isso, o foco da maioria dos trabalhos tende a evoluir no sentido de desenvolver estudos mais aprofundados, levando em conta o efeito sobre organismos não alvo, o que é imprescindível à aplicação do controle de nematoides com uso de metabólitos secundários de plantas, incluindo ainda estudos de ação citotóxica e alelopática.

A ação de extratos vegetais e metabólitos secundários sobre mais de uma espécie de fitonematoide pode ser uma estratégia interessante, principalmente quando se trata de gêneros diferentes e de difícil controle. D'Addabbo *et al.* (2013), por exemplo, avaliaram o efeito nematotóxico do extrato aquoso de *Artemisia annua* e seus componentes ácido cafeico, ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico), artemisinina e do composto semi-sintético artesunato sobre *M. incognita*, *Globodera rostochiensis* e *Xiphinema index*, sendo que os extratos apresentaram efeito sobre a eclosão de J₂ de *M. incognita* e de *G. rostochiensis*. Artesunato afetou juvenis e artemisinina teve ação nematicida em mais de 50% dos juvenis de *G. rostochiensis*.

Já o composto Thiarubrine C, isolado de *Rudbeckia hirta*, teve a sua atividade nematicida testada *in vitro* sobre *M. incognita* e *Pratylenchus penetrans*. Houve elevada atividade nematicida *in vitro* a ambos os nematoides e redução da penetração de juvenis de *M. incognita* em raízes de tomateiro, quando previamente expostos à ação do extrato (Viala *et al.*, 1998).

Quanto à ação sobre espécies do mesmo gênero, Muhammad e Saeed (2011), avaliaram ação de extrato metanólico bruto, bem como subsequente fração do solvente de

Viola betonicifolia in vitro, incluindo ação nematicida, antioxidante, larvicida, fitotóxica e citotóxica. Constataram efeito dependente de dose tanto em *M. incognita* quanto em *M. javanica*, demonstrando mecanismos de ação associados à atividade nematicida comum às duas espécies.

Extratos apolares, como os de clorofórmio e hexânicos, também têm sido testados *in vitro* no controle de nematoides. O extrato de clorofórmio de *Dryopteris crassirhizoma* (Liu *et al.*, 2013a; Liu *et al.*, 2013b) e extrato hexânico de folhas e caules de *Cleome viscosa* (Williams *et al.*, 2003), por exemplo, apresentaram ação nematicida sobre *M. incognita*. No entanto, extratos dessa natureza são menos aplicáveis à agricultura em função da baixa solubilidade em água, o que limita a sua aplicação e efeito tóxico dos solventes aos nematoides.

Vale ressaltar que os compostos antimicrobianos, componentes do metabolismo secundário de plantas, são produzidos naturalmente e, normalmente, a quantidade e a composição química desses compostos é que determinam a efetividade no controle de patógenos. Assim, extratos de plantas com altos teores de metabólitos com conhecida ação antimicrobiana têm sido testados no controle de nematoides devido à sua elevada concentração e relação com mecanismos de defesa das plantas.

Oka *et al.* (2014), por exemplo, constataram atividade de *Ochradenus baccatus* sobre *M. javanica*, devido aos elevados teores de glicosinolatos. Vale destacar que nem sempre a resistência da planta pode ser associada à presença de metabólitos secundários com ação sobre nematoides e, na prática, os mecanismos de resistência são amplos e nem sempre associados à produção natural de compostos secundários.

Com relação ao uso de extratos de plantas e seus metabólitos no controle de fitonematoides, em especial os do gênero *Meloidogyne*, ainda há muito a se desenvolver, tanto nos processos de extração quanto ao uso e à proteção de compostos bioativos no solo e à

otimização de tecnologias baratas e eficazes na separação de compostos e/ou aplicação em grandes áreas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad P, Gouzy J, Aury JM, Castagnone-Sereno P, Danchin EGJ *et al.* (2008) Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology** 26: 909-91.

Abad P, Opperman CH (2009) The complete sequence of the genomes of *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla*. In: Perry RN, Moens M, Starr JL (eds) **Root-knot nematodes**. CABI Publishing, Wallingford, 488p.

Adámoli J, Macedo J, Azevedo LG, Madeira Neto JS (1986) Caracterização da região dos cerrados. In: Goedert, WJ. (ed.) **Solos dos cerrados: tecnologias e estratégias de manejo**. Planaltina: Embrapa-CPAC; São Paulo: Nobel. p.33- 74.

Aguiar LMS, Camargo AJA (2004) **Cerrado ecologia e caracterização**. Embrapa Informação Tecnológica. 246 p.

Amorim EPR, Andrade FWR, Moraes EMSM, Silva JC, Lima RS, Lemos EEP (2011) Atividade antibacteriana de óleos essenciais e extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Ralstonia Solanacearum* em mudas de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura** E:392-398.

Andrés MF, Gonzáles-Coloma A, Sanz J, Burillo J, Sainz (2012) Nematicidal activity of essential oils: a review. **Phytochem. Rev.** 11:371-390.

Antes VA, Comerlato AP, Schuelter AR, Carneiro, RMDG, Furlanetto C (2012) Native-plant hosts of *Meloidogyne* spp. from Western Paraná, Brasil. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 55(2):213-219.

Aoudia, H., Ntalli, N., Aissani, N., Yahiaoui-Zaidi, R., Caboni, P. Nematotoxic phenolic compounds from *Melia azedarach* against *Meloidogyne incognita*. **J. Agric. Food Chem.** 2012, 28 (60): 11675-11680.

Arruda WC, (2015) **ncRNA-Agents: Anotação de RNAs não-codificadores baseada em sistema multiagente**. Universidade de Brasília - Tese de doutorado (Doutorado em Ciências da Computação), Brasília, 139pp.

Astolfi Filho S, Silva CGN, Bigi MFMA (2014) Bioprospecção e biotecnologia. **Parc. Estrat.** 19(38):45-80.

Bai CQ, Liu ZL, Liu QZ (2011) Nematicidal constituents from the essential oil of *Chenopodium Ambrosioides* aerial parts. **E-Journal of Chemistry** 8(S1):S143-S148.

Bakhetia M, Urwin PE, Atkinson HJ (2007) QPCR analysis and RNAi define pharyngeal gland cell-expressed genes of (*Heterodera glycines*) required for initial interactions with the host. **Mol Plant-Microbe Interact** 20: 306-312.

Barbosa P, Lima AS, Vieira P, Dias LS, Tinoco MT, Barroso JG, Pedro LG, Figueiredo AC, Mota M (2010) Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Journal of Nematology** 42(1):8-16.

Barros AF, Oliveira RDL, Lima IM, Coutinho RR, Ferreira AO, Costa A (2014) Root-knot nematodes, a growing problem for conilon coffee in Espírito Santo state, Brazil. **Crop Protection** 55:74-79.

Bélair G (1992) Effects of cropping sequences on population densities of *Meloidogyne hapla* and carrot yield in organic soil. **Journal of Nematology** 24:450-456.

Bessa NGF, Borges JCM, Beserra FP, Carvalho RHA, Pereira MAB, Fagundes R, Campos SL, Ribeiro LU, Quirino MS, Chagas Junior AF, Alves A (2013) Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento Vale Verde - Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 15(4):692-707.

Bigaton D, Bacchi LMA, Formagio ASN, Gavassoni WL, Zanella CS (2013) Avaliação da atividade fungicida de extratos e óleos essenciais sobre ferrugem asiática da soja. **Revista Ciência Agronômica**. 44(4):757-763.

Blok VC, Phillips MS, Mcnicol JW, Fargette M (1997) Genetic variation in tropical *Meloidogyne* spp. as shown by RAPDs. **Fundamental and Applied Nematology** 20:127-133.

Borges-Osório MR, Robinson WM. (2013) *Genética Humana*. (Ed.) Artmed Editora, 784 pp.

Brenner SM, Johnson J, Bridgham S, Johnson M, Bridgham J et al. (2000) Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. **Nat Biotech** 18:630-634.

Brito JA, Stanley J, Mendes M, Cetintas R, Dickson D. (2007) Host status of selected cultivated plants to *Meloidogyne mayaguensis* in Florida. **Nematropica** 37:65-72.

Caboni P, Ntalli, GN, Aissani N, Cavoski I, Angioni A. (2012)a Nematicidal activity of (*E,E*)-2,4-decadienal and (*E*)-2-decenal from *Ailanthus altissima* against *Meloidogyne javanica*. **J. Agric. Food Chem.** 60: 1146-1151.

Caboni P, Sarais G, Aissani N, Tocco G, Sasanelli N, Liori B, Carta A, Angioni A. (2012b) Nematicidal activity of 2-thiophenecarbox-aldehyde and methylisothiocyanate from caper (*Capparis spinosa*) against *Meloidogyne incognita*. **Journal Agricultural Food Chemistry**. 60: 7345-7351.

Calderón-Urrea A, Vanholme B, Vangestel S, Kane SM, Bahaji A, Pha K, Garcia M, Snider A, Gheysen G (2016) Early development of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **BMC Dev Biol**.16(10):1-14.

Calvet JP, Camprubí A, Estaún V, Kábana RR (2001) Evaluation of natural chemical compounds against root-lesion and root-knot nematodes and side-effects on the infectivity of arbuscula mycorrhizal fungi. **European Journal of Plant Pathology** 107:601-605.

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

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

Carneiro RMDG, Carneiro RG, Abrantes IMO, Santos MSNA, Almeida MRA (1996) *Meloidogyne paranaensis* n.sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. **Journal of Nematology** 28:177-189.

Carneiro RMDG, Carneiro RG, Neves DIN, Almeida MRA (2003) Nova raça de *Meloidogyne javanica* detectada em *Arachis pintoii* no estado do Paraná. **Nematologia Brasileira** 27:219-221.

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

Carneiro RMDG, Santos MFA, Almeida MRA, Mota FC, Gomes ACMM, Tigano MS (2008) Diversity of *Meloidogyne arenaria* using morphological, cytological and molecular approaches. **Nematology** 10:819-83.

Castagnone-Sereno P, Wanlerberghe-Massuti F, Leroy F (1994) Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers. **Genome** 37:904-909.

Carvalho MCCG, Silva DCG (2010) Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural** 40(3):735-744.

Carvalho, RA. (2016) Avaliação do método de sequenciamento de nova geração no diagnóstico genético de neoplasia endócrina múltipla tipo 1. Dissertação, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 87pp.

Castagnone-Sereno P (2006) Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. **Heredity** 96:282-289.

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

Choi IH, Shin SC, Park IK (2007a) Nematicidal activity of onion (*Allium cepa*) oil and its components against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Nematology** 9(2):231-235.

Choi IH, Kim J, Shin SC, Park IK (2007b) Nematicidal activity of monoterpenoids against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Journal of Nematology** 15(1):35-40.

Contarato C, Tomaz MA, Alves FR, Sobreira FM, Jesus Junior WC, Rabello LKC, Ferrão MAG, Ferrão RG.(2014). Reaction of variedade coffee 'Vitória INCAPER 8142' of conillon to parasitism of *Meloidogyne exigua*. **IDESIA** 32(1):93-97.

Coolen WA, D'Herde CJ (1972) **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent, State Nematology and Entomology Research Station, 77p.

Cotton J, Lilley C, Jones L, Kikuchi T, Reid A, Thorpe P, Tsai IJ, Beasley H, Blok V, Cock PJA, Akker SEV, Holroyd N, Hunt M, Mantelin S, Naghra H, Pain A, Palomares-Rius JE, Zarowiecki MB, Jones JT, Urwin PE. (2014) The genome and life-stage specific transcriptomes of *Globodera pallida* elucidate key aspects of plant parasitism by a cyst nematode. **Genome Biology** 15(3):R43.

D'Addabbo, T. et al. (2013) Nematicidal potencial of *Artemisia annua* and its main metabolites. **European Journal of Plant Pathology** 137: 295-304.

Dang QL, Kim, WK, Nguyen CM, Choi YH, Choi GJ, Jang KS, Park MS, Lim CH, Luu NH, Kim JC (2011). Nematicidal and antifungal activities of Annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* against various plant pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 59: 11160-11167.

Danquat WB, Back MA, Grove IG, Haydock PPJ (2011) *In vitro* nematicidal activity of a garlic extract and salicylaldehyde on the potato cyst nematode, *Globodera pallida*. **Nematology** 13(7):869-885.

De Waele D, Elsen A, 2007. Challenges in tropical plant nematology. **Annual Review of Phytopathology** 45: 457-485.

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

Dubreuil G, Magliano M, Deleury E, Abad P, Rosso MN (2007) Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitism. **New Phytologist** 176:426-436.

Durigan G (2012) Cerrado: o *trade-off* entre a conservação e o desenvolvimento. **Parcerias Estratégicas** 15(31):243-251.

Eisenback JD, Hirschmann H, Sasser JN, Triantaphyllou AC (1981) A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) with a pictorial key. Raleigh, IMP/NCSU/USDA. 48pp.

Eisenback JD, Triantaphyllou HH (1991) Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In: **Manual of Agricultural Nematology**. Nickle WR (ed).pp 281 - 286.

Freire CR, Davide LC, Campos VP, Santos CD, Freire PW (2002) Cromossomos de três espécies brasileiras de *Meloidogyne*. **Ciência Agrotécnica** 26(5):900-903.

Freitas LG, Oliveira RDL, Ferraz S (2006) **Introdução à Nematologia**. 3ª ed. Viçosa: Editora, UFV, 83pp.

Fosu-Nyarko J, Tan JACH, Gill R, Agrez VG, RAO U, Jones GK (2016a) *De novo* analysis of the transcriptome of *Pratylenchus zeae* to identify transcripts for proteins required for

structural integrity sensation, locomotion and parasitism. **Molecular Plant Pathology** 17 (4):532-552.

Fosu-Nyarko J, Paul Nicol, Fareeha Naz, Reetinder Gill, Michael G. K. (2016b) Jones analysis of the transcriptome of the infective stage of the beet cyst nematode, *H. schachtii*. **Plos One** 11 (1): e0147511.

Giannakou IO (2011) Efficacy of formulated product containing *Quillaja saponaria* plant extracts for the control of root-knot nematodes. **Eur J Plant Pathology** 130:587-596.

Gong B, Bloszies S, Li X, Wei M, Yang F, Qinghua S, Wang X (2013) Efficacy of garlic straw application against root-knot nematodes on tomato. **Scientia Horticulturae** 161:49-57.

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

Hadian S, Rahnama K, Jamali S, Eskandari A (2011) Comparing Neen extract with chemical control on *Fusarium oxysporum* and *Meloidogyne incognita* complex of tomato. **Advances in Environmental Biology** 5(8):2052-2057.

Haegeman A.; Joseph, S.; Gheysen, G. (2011) Analysis of the transcriptome of the root lesion nematode *Pratylenchus coffeae* generated by 454 sequencing technology. **Molecular Biochem. Parasitol.** 178: 7-14.

Haegeman A, Matelin S, Jones JT, Gheysen G (2012) Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. **Gene** 492: 19-31.

Haegeman A.; Bauters L., Kyndt T., Rahman M.M., Gheysen, G (2013) Identification of candidate effector genes in the transcriptome of the rice root knot nematode *Meloidogyne graminicola*. **Molecular Plant Pathology** 14:379-390.

Haroon SA, Hassan BAA, Hamad FMI, Rady MM (2018) The efficiency of some natural alternatives in root-knot nematode control. **Advances in Plants & Agriculture Research** 8(4):355-362.

Hartman KM, Sasser JN. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. In: Barker KR, Carter CC, Sasser JN (eds.) **An advanced treatise on *Meloidogyne***. Raleigh, NC: North Carolina State University Graphics 2:69-77.

Huang G, Gao B, Maier T, Allen R, Davis EL, Baum TJ, Hussey RS (2003) A profile of putative parasitism genes expressed in the oesophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 16: 376-381.

Haseeb, A. & Butool, F. (1996). Evaluation of nematicidal properties of some members of the Family Solanaceae. *Comunicação Científica*. **Bioresource Technology** 57(1):95-97.

Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acidsequence similarities. **Biochem J.** 280: 309-316.

Huang SP, Pereira AC, Dristig MCG, Souza RM (1991) Ocorrência de *Meloidogyne javanica* e *M. arenaria* em árvores silvestres no Cerrado virgem do Brasil Central. **Fitopatologia Brasileira** 16: 37.

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

Huang G, Allen R, Davis EL, Baum TJ, Hussey RS (2006) Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. **PNAS** 39:14302-14306.

Hunt Dj, Handoo ZA (2009) Taxonomy, identification and principal species. In: Perry, RN and Moens, M. (eds). **Root-knot nematodes**. Wallingford, UK, CABI Publishing, p. 55-97.

IITA, 1981. Proceedings of the Third Research Planning Conference on Root-knot Nematodes, *Meloidogyne* spp. Ibadan, Nigeria: IITA.

Ioannou N (2000) Soil solarization as a substitute for methyl bromide fumigation in greenhouse tomato production in Cyprus. **Phytoparasitica** 28, 248-56.

Jammes F, Lecomte P, Almeida-Engler J, Bitton F, Martínmagniette ML, Renou JP, Abad P, Favery B (2005) Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. **The Plant Journal** 44: 447-458.

Jaubert S, Ledger TN, Laffaire JB, Piotte C, Abad P, Rosso MN (2002) Direct identification of stylet secreted proteins from root-knot nematodes by a proteomic approach. **Mol. Biochemistry Parasitology** 121:205-211.

Jaubert S, Milac AL, Petrescu AJ, Almeida-Engler J, Abad P, Rosso MN (2005) In planta secretion of a calreticulin by migratory and sedentary stages of root-knot nematode. **Molecular Plant-Microbe Interact.** 18: 1277-1284.

Jepson SB (1987) Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). CAB Internacional, Wallingford, UK, 265 p.

Jones JT, Furlanetto C, Kikuchi T (2005) Horizontal gene transfer from bacteria and fungi as a driving force in the evolution of plant parasitism in nematodes. **Nematology** 7:641-646.

Kaskavalci G, Civelek HS (2009) Effects of two plant extracts on the damage of *Meloidogyne incognita* in tomato plants. **Ekoloji** 18(72):16-22.

Kikuchi T, Shibuya H, Jones JT (2005) Molecular and biochemical characterization of an endo-beta-1,3-glucanase from the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* acquired by horizontal gene transfer from bacteria. **Biochemistry Journal** 389:117-125.

Kikuchi T, Cotton JA, Dalzell JJ, Hasegawa K, Kanzaki N et al. (2011) Genomic insights into the origin of parasitism in the emerging plant pathogen (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Plos Pathog** 7: e1002219.

Kikuchi T, Cock PJA, Helder J, Jones JT (2014). Characterisation of the transcriptome of *Aphelenchoides besseyi* and identification of a GHF 45 cellulase. **Nematology**, 16:99-107.

Kim J, Seo SM, Lee SG, Shin SC, Park IK (2008) Nematicidal activity of plant essential oils and components from coriander (*Coriandrum sativum*), oriental weetgum (*Liquidambar orientalis*), and valerian (*Valeriana wallichii*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Journal Agricultural Food Chemistry** 56: 7316–7320.

Klink CA, Machado RB (2005) A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade** 1:148. 2005.

Kumar M, Gantasala NP, Roychowdhury T, Thakur PK, Banakar P, Shukla RN, Jones MG, Rao U (2014) De novo transcriptome sequencing and analysis of the cereal cyst nematode *Heterodera avenae*. **Plos One** 2014 (9):e96311.

Leela NK, Khan RM, Reddy PP, Nidiry ESJ (1992) Nematicidal activity of essential oil of *Pelargonium graveolens* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Nematol. Medit.** 20:57-58.

Li HT, Zhao NN, Yang K, Zhi LL, Wang Q (2012) Chemical composition and toxicities of the essential oil derived from *Hyssopus cuspidatus* flowering aerial parts against *Sitophiulus zeamais* and *Heterodera avenae*. **Journal of Medicinal Plants Research** 7(7):343-348.

Li B, Zhuo K, Wu P, Cui R, Zhang LH, et al. (2013). A novel effector protein, MJ-NULG1a, targeted to giant cell nuclei plays a role in *Meloidogyne javanica* parasitism. **Molecular Plant Microbe Interact** 26: 55-66.

Li X, Yang D, Niu J, Zhao J, Jian H (2016) De novo analysis of the transcriptome of *Meloidogyne enterolobii* to uncover potential target genes for biological control. **International Journal of Molecular Sciences** 17:1442.

Liu J, Xie S, Feng J, Cai J (2013a) Effects of chloroform extract of *Dryopteris crassirhizoma* on the ultramicroscopic structures of *Meloidogyne incognita*. **The Scientific World Journal** 201:1-6.

Liu J, Xie S, Feng J, Cai J (2013b) Protective effect of *Dryopteris crassirhizoma* extracts in the control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal of Plant Diseases and Protection** 120 (1): 34-40.

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

Lima JEFW (2011) Situação e perspectivas sobre as águas do cerrado. **Ciência e Cultura** 63(3):27-29.

Lima-Medina IC, Bellé, VH, Casa-Coila A, Pereira AS, Gomes CB (2016) Reaction of potato cultivars to root-knot nematodes. **Nematropica** 46:00-00.

Lozano-Torres JL, Wilbers RH, Warmerdam S, Finkers-Tomczak A, Diaz-Granados A, van Schaik CC, Helder J, Bakker J, Goverse A, Schots A, Smant G (2014) Apoplastic venom allergen-like proteins of cyst nematodes modulate the activation of basal plant innate immunity by cell surface receptors. **Plos Pathog.** 10 (12):e1004569.

Lynd LR, Weimer PJ, Van Zyl WH, Pretorius IS (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology Molecular Biology Review** 66: 506 - 577.

Matos FJA Introdução à fitoquímica experimental. 2 ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141p.

Mattos JKA (1999) **Caracterização das comunidades de nematoides em oito sistemas de uso da terra nos cerrados do Brasil Central**. Universidade de Brasília -. Tese de Doutorado em Fitopatologia – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil. 113pp.

Mattos VS (2013) **Variabilidade genética e agressividade a Soja [*Glycine max* (L.) Merrill] de populações de *Meloidogyne* spp. do Cerrado e de áreas de cultivo**. Dissertação de Mestrado em Fitopatologia - Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil, 82pp.

Mattos VS, Furlanetto C, Silva JGP, Dos Santos DF, Almeida MRA, Correa VR, Moita AW, Castagnone-Sereno P, Carneiro RMDG (2016) *Meloidogyne* spp. populations from native

Cerrado and soybean cultivated áreas: genetic variability and agressivenss. **Nematology** 18:505-515.

Melillo MT, Leonetti P, Bongiovanni M, Castagnone-Sereno P, Bleve-Zacheo T (2006) Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomato–root-knot nematode interactions. **New Phytologist** 170:501-512.

Mendonça RC, Felfili JM, Walter BMT, Silva Junior MC, Rezende AV, Filgueiras TS, Nogueira PE, Fagg CW (2008) Flora vascular do Bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies.. In: Sano SM, Almeida SP, Ribeiro JF (eds.). **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília, Embrapa Cerrados, p. 422-442.

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

Meyer SLF, Zasada IA, Roberts DP, Vinyard BT, Lakshman JKL, Chitwood DJ, Carta LK (2006) *Plantago lanceolata* and *Plantago rugelli* extracts are toxic to *Meloidogyne incognita* but not to certain microbes. **Journal of Nematology** 38:333-338.

Moens M, Perry R, Starr J (2009) *Meloidogyne* species- a diverse group of novel and important plant parasites. In: Perry RN, Moens M, Starr JL (eds). Root-knot nematodes, 483p.

Moosavi MR (2012). Nematicidal effect of some herbal powders and their aqueous extracts against *Meloidogyne javanica*. **Nematropica** 42:48-56.

Muhammad N, Saeed M (2011) Biologica screening of *Viola betonicifolia* Smith whole plant. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology** 5(20):2323-2329.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403: 853-858.

Nguyen VP, Bellafiore S, Petitot AS, Haidar R, Bak A, Abed A, Gantet P, Mezallira I, de Almeida-Engler J, Fernandez D (2014) *Meloidogyne incognita*–rice (*Oryza sativa*) interaction: a new model system to study plant–root knot nematode interactions in monocotyledons. **Rice** 7:23.

Nguyen DMC, Seo DJ, Kim KY, Park RD, Kim DH, Han YS, Kim TH, Jung WJ (2013) Nematicidal activity of 3,4-dihydroxybenzoic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Meloidogyne incognita*. **Microbial Pathogenesis** 59(60):52-59.

Nicol P, Gill R, Fosu Nyarko J, Jones MGK. (2012) De novo analysis and functional classification of the transcriptome of the root lesion nematode, *Pratylenchus thornei*, after 454 GSFLX sequencing. **Int. J. Parasitol.** 42:225-37.

Ntalli NG, Menskissogiu-Spiroudi U, Giannakou, I. (2010) Nematicidal activity of powder and extract of *Melia azedarach* fruits against *Meloidogyne incognita*. **Annals of Applied Biology** 156:309-317.

Nygaard V, Hovig E (2009) Methods for quantitation of gene expression. **Front Biosci.** 14:552-569.

Oka Y, Shuker S, Tkachi N, Trabelcy B, Gerchman Y (2014) Nematicidal activity of *Ochradenus baccatus* against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Plant pathology** 63: 221-231.

Oliveira CMG, Goulart AMC, Monteiro AR, Ferraz LCCB (1995) Suscetibilidade e danos causados em ipê-roxo por *Meloidogyne javanica* e *M. arenaria*. **Nematologia Brasileira** 19:89-92.

Oliveira VB, Zuchetto M, Oliveira CF, Paula CS, Duarte AFS, Miguel MD, Miguel OG. (2016) Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Rev. Bras. Pl. Med.** .18(1):230-239.

Onkendi EM, Kariuki GM, Marais M, Moleleki LN. (2014) The threat of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Africa: a review. **Plant Pathology** 63:727-737.

Opperman CH, Bird DM, Williamson VM, Rokhsar DS, Burke M, Cohn J, Cromer J, Diener S, Gajan J, Graham D, Houfek TD, Liu Qingli, Mitros T, Schaff J, Schaffer R, Scholl E, Sosinski BR, Thomas VP, Windham E (2008) Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: A compact nematode genome for plant parasitism. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105: 14802-14807.

Paes VS, Soares LM, Murakami DM, Santos JM, Barbosa BFF, Neves SS (2012) Ocorrência de *Meloidogyne enterolobii* em muricizeiro (*Byrsonima cydoniifolia*). **Tropical Plant Pathology**. 37 (3):215-219.

Pandey R, Kalra A, Tandon S, Mehrotra N, Singh HN, Kumar S (2000) Essential Oils as Potent Sources of Nematicidal Compounds. **J. Phytopathology** 148:501-502.

Park IK, Park JY, Kim KH, Choi KS, Choi IH, Kim CS, Shin SC (2005) Nematicidal activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and cinnamon (*Cinnamomum verum*) oils against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Nematology** 7: 767–774.

Park IK, Kim J, Lee SG, Shin SC (2007) Nematicidal activity of plant essential oils and components from ajowan (*Trachyspermum ammi*), allspice (*Pimenta dioica*) and litsea (*Litsea cubeba*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Journal of Nematology** 39(3):275-279.

Passos GA (2014) Reaction of potato cultivars to *Meloidogyne hapla* and *M. morocciensis* **Journal of Nematology** 46(2):195.

Perry, RN, Moens M, Starr FJ, (eds)(2009) Root-knot nematodes. CAB International, Wallingford, UK. 488p.

- Petitoti AN, Dereeper A, Agbessi M, Silva C, Guy J, Ardisson D, Fernandez D (2016) Dual RNA-seq reveals *Meloidogyne graminicola* transcriptome and candidate effectors during the interaction with rice plants. **Molecular Plant Pathology** 17(6):860-874.
- Postnikova OA, Hult M, Shao J, Skantar A, Nemchinov LG (2015) Transcriptome analysis of resistant and susceptible alfalfa cultivars infected with root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **PLoS ONE** 10(2):e0118269.
- Ribeiro JF, Walter BMT (1998) Fitofisionomias do bioma cerrado. In: Cerrado: ambiente e flora. Sano SM, Almeida SP (eds) **EMBRAPA-CPAC**, Planaltina, DF. p.89-166.
- Rammah A, Hirschmann H (1990) Morphological comparison of three host races of *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology** 22(1):56-69.
- Roese AD, Oliveira RDL, Lanes FF (2004) Reação de cultivares de soja (*Glycine max* L. Merrill) a *Meloidogyne paranaensis*. **Nematologia Brasileira** 28:131-135.
- Roese AD, Oliveira RDL, Oliveira DS (2007) Variabilidade fisiológica em populações de *Meloidogyne paranaensis*. **Fitopatologia Brasileira** 32:040-043.
- Roese AD, Oliveira RDL (2004) Capacidade reprodutiva de *Meloidogyne paranaensis* em espécies de plantas daninhas. **Nematologia Brasileira** 28:137-141.
- Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén P. (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. **Science** 281 (5375):363-365.
- Rutter W, Hewezi T, Abubucker S, Maier TR, Huang G, Mitreva M, Hussey R. (2014) Mining novel effector proteins from the esophageal gland cells of *Meloidogyne incognita*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 27 (9):965-974.
- Sangwan NK, Verma BS, Verma KK, Dhindsa KS (1990) Nematicidal activity of some essential plant oils. **Pestic. Sci.** 28:331-335.

Santini L (2014) **Análise, via RNAseq, do transcriptoma do feijoeiro e identificação de genes expressos em resposta à infecção pelo nematoide das galhas.** Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 118pp.

Scholl EH, Thorne JL, McCarter JP, Bird DM (2003) Horizontally transferred genes in plant-parasitic nematodes: a high-throughput genomic approach. **Genome Biology** 4:R39.

Silva FAM, Assad ED, Steinke ET, Müller AG (2008a) Clima do bioma Cerrado. In: Albuquerque ACS, Da Silva AG, (Eds). Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. 1ª ed. Embrapa Informações Tecnológicas. Brasília. p 93-148.

Silva JGP (2012) **Ocorrência de *Meloidogyne* spp. em diferentes fitofisionomias do Cerrado e hospedabilidade de plantas nativas a *Meloidogyne javanica*.** Dissertação de mestrado (Mestrado em Fitopatologia). Universidade de Brasília, Brasília, 63pp.

Silva JGP, Furlanetto C, Almeida MRA, Rocha DB, Mattos VS, Correa VR, Carneiro RMDG (2013) Occurrence of *Meloidogyne* spp. in Cerrado vegetations and reaction of native plants to *Meloidogyne javanica*. **Journal of Phytopathology** 162: 449-455.

Silva RA, Silva ES, Antedomênico SR, Inomoto MM (2008b). Fauna of phytonematodes in the Atlantic Forest from Ribeira Valley, São Paulo State, Brazil. **Nematropica** 38:1-12.

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

Tan KC, Ipcho SVS, Trengove RD, Oliver RP, Solomon OS (2009) Assessing the impact of transcriptomics, proteomics and metabolomics on fungal phytopathology. **Molecular Plant Pathology** 10 (5):703-715.

Taylor AL, Sasser JN (1983) **Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (especies de *Meloidogyne*).** Proyecto Internacional de *Meloidogyne*. Universidad del Estado de Carolina del Norte, USA. 111p.

The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science** 282: 2012-2018.

Toledo LO, Anjos LHC, Couto WH, Correia JR, Pereira MG, Correia MEF (2009) Análise multivariada de atributos pedológicos e fitossociológicos aplicada na caracterização de ambiente de cerrado no norte de Minas Gerais. **Revista árvore** 33(5):957-968.

Trudgill DL, Blok VC (2001) Apomictic polyphagous root knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology** 39:53-77.

Tyler J. (1933) Reproduction without males in aseptic root cultures of the root-knot nematode. **Hilgardia** 7(10):373-88.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995) Serial Analysis of gene expression. **Science** 270:484-487.

Viala SS, Brodie BB, Rodriguez E, Gibson DM (1998) The Potential of thiarubrine C as a nematicidal agent against plant-parasitic nematodes. **Journal of Nematology** 30(2):192-200.

Wang, F.; Li, D, Wang, Z., Dong, A, Liu, L, Wang, B, Chen, Q, Liu, X (2014) Transcriptomic analysis of the rice white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi* (Nematoda: Aphelenchoididae). **Plos One** 9:e91591.

Williams LAD, Vasques E, Reid W, Porter R, Kraus W (2003) Biological activities of an extract from *Cleome viscosa* L. (Capparaceae). **Naturwissenschaften** 90:468-472.

Wiratno D, Taniwiryo D, Van den Berg H, Riksen JAG, Rietjens IMCM, Djiwanti SR, Kammenga JE, Murk AJ (2009) Nematicidal activity of plant extracts against the root-knot nematode. **The Open Natural Products Journal** 2:77-85.

Yang D, Chen C, Liu Q, Jian H (2017) Comparative analysis of pre- and post-parasitic transcriptomes and mining pioneer effectors of *Heterodera avenae*. **Cell & Bioscience** 7:11.

Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics** 10: 57-63.

Zouhar M, Douda O, Lhotsky D, Pavela R (2009) Effect of plant essential oils on mortality of the stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*). **Plant Protect. Sci.** 45: 66-73.

RESUMO

Dentre os biomas brasileiros, o Cerrado é o segundo em extensão e em diversidade de espécies vegetais e animais. A biodiversidade do Cerrado tem sido estudada no que tange a sua flora e fauna, carecendo de dados voltados ao nematoide das galhas radiculares. *Meloidogyne* spp. é nematoide endoparasita sedentário de plantas. A sua presença em solo de áreas com vegetação nativa de cerrado, sob preservação, é um forte indício de que a sua permanência ocorre devido ao parasitismo de plantas nativas. Esse trabalho objetivou estudar a hospedabilidade de plantas ocorrentes no bioma cerrado a *Meloidogyne* spp. Dessa forma, foram selecionadas trinta e cinco espécies vegetais deste bioma, incluindo gramíneas e arbóreas, para estudo da hospedabilidade frente a três isolados de *Meloidogyne* coletados em área nativa de cerrado sob preservação (*M. incognita*, *M. javanica* e *M. morocciensis*), além de uma espécie até então exótica ao cerrado (*M. paranaensis*). Foram avaliadas as variáveis índice de galhas e de massas de ovos, ovos + J₂ por grama de raiz e fator de reprodução, além da sintomatologia causada pelos nematoides nas raízes. Foram consideradas plantas hospedeiras, com média do Fator de Reprodução (FR) > 1,0: *Triplaris gardneriana* para *M. javanica*, *M. incognita* e *M. morocciensis*; *Andropogon bicornis* para *M. javanica* e *M. incognita* e *Copaifera langsdorfii* para *M. incognita*. Foram consideradas hospedeiras potenciais, com FR > 1,0 para pelo menos uma das repetições: *C. langsdorfii* para *M. morocciensis*; *Esenbeckia leiocarpa* para *M. javanica* e *Guibourtia hymenifolia* para *M. incognita*. As demais espécies vegetais foram consideradas não hospedeiras para as condições deste estudo. Observaram-se diferenças no FR dos nematoides para indivíduos de uma mesma espécie vegetal, indicando provável variabilidade genética das espécies vegetais estudadas.

Palavras-chave: Nematoides; Plantas nativas; Hospedabilidade.

ABSTRACT

Cerrado is the second biome in extension and in diversity of plant and animal species. Flora and fauna of Cerrado have been studied in detail, but lacking information on the root-knot nematodes. *Meloidogyne* spp. are sedentary endoparasitic nematodes of plants. Their presence in areas covered with native cerrado vegetation is a strong indication that their permanence occurs due to the parasitism on native plants. The aim of this work was to study the host reaction of cerrado plants to *Meloidogyne* spp. Thirty five plant species from the Cerrado biome, including grasses and tree species, were selected for inoculation with four *Meloidogyne* isolates, three of them previously collected in cerrado native plants in under preservation (*M. incognita*, *M. javanica* and *M. morocciensis*), and one exotic species for cerrado (*M. paranaensis*). Variables for evaluation included gall index and egg mass index, eggs + J₂ per gram of root and the reproductive factor (RF), as well as the symptoms caused by the nematodes on roots. The following plant species were considered as hosts with mean of the Reproduction Factor (RF)>1.0: *Triplaris gardneriana* for *M. javanica*, *M. incognita* and *M. morocciensis*; *Andropogon bicornis* for *M. javanica* and *M. incognita* and *Copaifera langsdorfii* for *M. incognita*; The following as Potential hosts by developing RF>1.0 for at least one of the replicates: *C. langsdorfii* for *M. morocciensis*; *Esenbeckia leiocarpa* for *M. javanica* and *Guibourtia hymenifolia* for *M. incognita*. The other plant species were considered non-hosts for the conditions of this study. Differences in the RF of nematodes were observed for individuals of the same plant species, indicating possibly genetic variability of the plant species assessed in this study.

Keywords: Root-knot nematodes; Native plants; Host suitability.

1 MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Origem, identificação e manutenção dos inóculos de *Meloidogyne* spp.

As populações de *Meloidogyne* spp. utilizadas neste estudo foram coletadas em áreas de cerrado sob preservação permanente em Brasília, Distrito Federal, segundo levantamento realizado por Silva *et al.* (2012). *Meloidogyne paranaensis*, foi obtida da coleção da Embrapa-Cenargen. *Meloidogyne morocciensis* foi coletada na fitofisionomia Campo Limpo do Parque Nacional de Brasília, *M. incognita* em Mata de Galeria e *M. javanica* em campo limpo da Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília. As espécies de *Meloidogyne* citadas acima foram confirmadas com base no fenótipo da isoenzima esterase, de acordo com metodologia proposta por Alonso e Alfenas (1998) como segue: *M. javanica* (EST-J3), *M. incognita* (EST-I1), *M. morocciensis* (EST-A3) e *M. paranaensis* (EST-P1). As populações das quatro espécies foram mantidas em tomateiro cv. Santa Clara para reprodução em casa de vegetação, Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília.

1.2 Obtenção de mudas de plantas ocorrentes no Cerrado

As mudas das espécies arbóreas foram cedidas pelo Viveiro II da empresa NOVACAP (Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil), com exceção de *Enterolobium gummiferum* (Mart.) J.F.Macbr. (Tamboril) em que as sementes foram coletadas em área de cerrado de uma única árvore. As gramíneas foram multiplicadas em vasos através do cultivo de perfilhos coletados em campo. Os perfilhos foram coletados diretamente no campo a partir de área com grande frequência das espécies de gramíneas avaliadas (Figura 2). Exsiccatas foram confeccionadas para cada espécie botânica utilizada nos ensaios e os materiais depositadas no Herbário da Universidade de Brasília, para a confirmação das espécies.

As plantas arbóreas inicialmente foram transplantadas de tubetes para sacos de polietileno de 24 X 33 X 0,010 cm contendo 2500 cm³ de substrato estéril, composto por solo + areia na proporção 1:1 e mantidas em casa de vegetação da Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília até desenvolvimento adequado para os ensaios (Figura 3). Já as gramíneas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 3 L com mesma quantidade da mistura de solo e areia, na mesma proporção, e mantidas nas mesmas condições (Figura 4).



Figura 2. Área de Cerrado selecionada onde realizou-se coleta de perfilhos de gramíneas.

Ao todo foram estudadas trinta e cinco espécies vegetais ocorrentes no bioma Cerrado (Tabela 9).

Tabela 9. Espécies botânicas ocorrentes no bioma Cerrado avaliadas quanto à hospedabilidade a *Meloidogyne* spp.

Nome Científico	Nome Comum	Família
<i>Albizia niopoides</i> (Benth.) Burkart	Angico branco	Fabaceae
<i>Anacardium humili</i> St. Hilaire	Cajuí	Anacardiaceae
<i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth.) Brenan	Angico preto	Fabaceae
<i>Astronium flaxinifolium</i> Schott	Gonçalo Alves	Anacardiaceae
<i>Andropogon bicornis</i> L.	Andropogon	Poaceae
<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess.	Landim	Calophyllaceae
<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	Copaíba	Fabaceae
<i>Cybistax antisyphilitica</i> Mart.) Mart.	Ipê verde	Bignoniaceae

<i>Dalbergia miscolobium</i> Benth.	Caviúna	Fabaceae
<i>Jacaranda mimosifolia</i> D. Don.	Jacarandá Mimoso	Bignoniaceae
<i>Echinolaena inflexa</i> (Poir.) Chase.	Capim flechinha	Poaceae
<i>Elionurus muticus</i> (Spreng.) Kuntze.	Capim cheiroso	Poaceae
<i>Enterolobium gummiferum</i> (Mart.) J.F.Macbr.	Tamboril	Fabaceae
<i>Eriochrysis filiformis</i> (Hack.) Filg.	-	Poaceae
<i>Eriotheca pubescens</i> Mart. & Zucc.	Paineira loira	Malvaceae
<i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.	Guarantã	Rutaceae
<i>Eugenia tomentosa</i> Camb.	Cabeludinha	Myrtaceae
<i>Guibourtia hymenifolia</i> (Moric.) J. Leonard	Copaibeira	Fabaceae
<i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. ex DC.) Mattos	Ipê roxo	Bignoniaceae
<i>Handroanthus caraíba</i> (Mart.) Mattos.	Ipê caraíba	Bignoniaceae
<i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.)	Ipê-tabaco	Bignoniaceae
<i>Handroanthus serratifolius</i> (Vahl) S.O.Grose	Ipê amarelo	Bignoniaceae
<i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> L.	Jatobá	Fabaceae
<i>Inga fagifolia</i> Benth.	Ingá mirim	Fabaceae
<i>Inga heterophylla</i> Willd.	Ingá colar	Fabaceae
<i>Kielmeyera coreaceae</i> Mart. & Zucc.	Pau santo	Calophyllaceae
<i>Kielmeyera speciosa</i> A.St.-Hil.	Pau santo	Calophyllaceae
<i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr. All.	Aroeira preta	Anacardiaceae
<i>Paspalum pilosum</i> Lam.	Paspalum	Poaceae
<i>Paspalum plicatulum</i> Michx.	Plicatulum	Poaceae
<i>Physocalymma scaberrima</i> Pohl	Pau-de-rosas	Litraceae
<i>Pseudobombax tomentosum</i> (Mart.) A.Robyns	Imbiruçu	Malvaceae
<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	Barbatimão	Fabaceae
<i>Terminalia tomentosum</i> L.	Piúna	Combretaceae
<i>Triplaris gardneriana</i> Wedd.	Pajeú	Polygonaceae

Na obtenção das mudas foi realizada mistura de solo e areia na proporção de 1:1 com transplante de mudas para sacos plásticos, no caso de plantas arbóreas, e vasos no caso de gramíneas, conforme figuras 3 e 4 a seguir.



Figura 3. Mistura para obtenção do substrato utilizado nos ensaios, composto por areia média e solo argiloso na proporção 1:1 (à esquerda) e mudas após transplante a partir de tubetes (à direita).



Figura 4. Perfilhos coletados em campo, cultivados em vasos e mantidos em casa de vegetação.

1.3 Avaliação de hospedabilidade de plantas nativas de Cerrado a *Meloidogyne* spp.

Foram executados dois ensaios em tempos diferentes (verão e inverno) para cada espécie vegetal, sendo os mesmos em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições, e as plantas inoculadas com cada espécie de nematoide foram mantidas em bancadas separadas para evitar contaminação (Figura 5). Foram inoculados 5.000 ovos + J₂ de cada espécie de *Meloidogyne* por espécie vegetal ou repetição. Utilizou-se como testemunha tomateiro cv. Santa Clara, planta com alta suscetibilidade a *Meloidogyne* spp.

Amostras do sistema radicular das mudas utilizadas nos ensaios foram extraídas e analisadas quanto à presença de galhas induzidas por *Meloidogyne* spp. Após a coleta de perfilhos de gramíneas em campo foi realizada coleta de solo e raízes em diferentes pontos, sendo em seguida verificada a presença ou não de J₂ no solo e de fêmeas ou J₂ nas raízes.



Figura 5. Distribuição das plantas em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em casa de vegetação.

1.4 Acompanhamento das condições experimentais

Realizou-se análise físico-química do substrato utilizado nos ensaios em casa de vegetação e análise biológica do solo das áreas de coleta de perfilhos de *A. bicornis*. A análise química dos substratos utilizados nos ensaios em casa de vegetação foi realizada pela empresa Solocria Laboratório Agropecuário LTDA, localizada em Goiânia - GO. A medição de temperatura da casa de vegetação foi realizada com auxílio de termômetro digital Icoterm (divisão de 0,1 °C) e a temperatura do solo obtida com termômetro de haste. As plantas foram regadas de acordo com a necessidade e adubadas com 15 gramas da formulação NPK 4-14-8 após duas semanas da inoculação com os nematoides. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação até a avaliação após quatro meses da inoculação.

1.5 Variáveis Avaliadas

1.5.1 Índice de massas de ovos (IMO)

Quatro meses após a inoculação, a parte aérea das plantas foi descartada e as raízes lavadas em água corrente e imersas em solução de fucsina ácida na concentração de 0,35% por sete minutos para coloração das massas de ovos, de acordo com metodologia proposta por Silva *et al.* (1988) (Figura 6). A contagem das massas de ovos foi realizada com auxílio de um microscópio estereoscópico (Dickson & Struble, 1965).



Figura 6. Coloração de raízes com fucsina ácida preparada de acordo com metodologia de Silva *et al.* (1988).

Para a determinação do IMO, utilizou-se a escala de Taylor & Sasser (1978) com notas variando de 0 a 5, em que: 0 = sem massas de ovos; 1 = presença de 1 a 2 massas de ovos; 2 = 3 a 10 massas de ovos; 3 = 11 a 30 massas de ovos; 4 = 31 a 100 massas de ovos e 5 = mais de 100 massas de ovos.

1.5.2 Índice de Galhas (IG)

Após quatro meses de inoculação houve contagem do número de galhas sob microscópio estereoscópico, em todo sistema radicular de cada planta/repetição sendo

utilizada escala de notas de 1 a 5, de acordo Taylor & Sasser (1978), em que: 0 = ausência de galhas; 1 = 1 a 2 galhas; 2 = 3 a 10 galhas; 3 = 11 a 30 galhas; 4 = 31 a 100 galhas e 5 = mais de 100 galhas.

1.5.3 Fator de Reprodução (FR)

O fator de reprodução (FR), para as diferentes espécies de plantas, foi determinado de acordo com Oostenbrink (1966). Para isso, foi utilizada a equação $FR = Pf/Pi$, onde Pf = população final e Pi = população inicial, de acordo com Oostenbrink (1966). A Pi consistiu do inóculo extraído de raízes de tomateiro, quantificado e calibrado para conter 5.000 ovos e juvenis por planta. Já a Pf foi quantificada somando-se a quantidade de J₂ no solo e de ovos e J₂ nas raízes.

A extração de ovos e J₂ das raízes avaliadas e de tomateiro para inóculo inicial, foi realizada de acordo com técnica adaptada de Hussey e Barker (1973) sendo as raízes cortadas em pedaços de cerca de 1 a 2 cm, trituradas com auxílio de liquidificador doméstico em solução de hipoclorito de sódio com 0,5 % de cloro ativo, na menor rotação por 30 s. O triturado foi vertido em peneiras sobrepostas de 42 e 500 mesh. O conteúdo da peneira de 500 mesh foi recolhido com auxílio de uma pisseta. Em seguida procedeu-se o clareamento da suspensão de acordo com a técnica de flutuação em centrífuga em solução de sacarose (Jenkins, 1964). Para isso a amostra foi centrifugada a 650 g por 5 min e o sobrenadante descartado. Após, adicionou-se solução de sacarose, na concentração de 454 g.L⁻¹, e centrifugou-se a amostra por 1 min a 650 g. O sobrenadante foi vertido em peneira de 500 mesh e a suspensão recolhida em béquer (máximo de 40 ml) com auxílio de uma pisseta.

Para determinação de J₂ no solo, alíquotas de 150 cm³ de solo foram homogeneizadas em cerca de 1 litro e meio a 2 litros de água em recipiente plástico, agitadas por 15 s e vertidas em peneiras sobrepostas de 42 e 400 mesh. O conteúdo da peneira de 400 mesh foi

recolhido com auxílio de uma pisseta e a amostra foi submetida a clareamento pela técnica de Jenkins (1964) seguindo os mesmos passos adotados para clareamento das amostras de raízes.

Após o processamento do solo e das raízes, o número de ovos e/ou J_2 foi determinado a partir de leituras em triplicata, utilizando-se câmara de contagem de Peter, com auxílio de microscópio óptico.

1.5.4 Número de Ovos e/ou J_2 por grama de Raiz (NOJ2GR)

O número de ovos + J_2 por grama de raiz (NOJ2GR) foi obtido pela razão do total de ovos + J_2 extraídos das raízes pela massa radicular.

1.6 Sintomatologia das raízes

Observou-se nas raízes a presença de rachaduras, necroses, tamanho, quantidade e distribuição de galhas e presença ou ausência de massas de ovos.

2 RESULTADOS

2.1 Análise biológica e física de solo e características físico-químicas do substrato

A análise biológica do solo da área de coleta de perfilhos de *Andropogon bicornis* demonstrou ausência de formas J₂ de *Meloidogyne* no solo e de massas de ovos nas raízes dos perfilhos coletados. A análise física do substrato utilizado nos ensaios apresentou textura franco-argilo-arenosa para os dois ensaios, sendo que no primeiro encontrou-se 26% de argila, 7% de silte e 67% de areia e no segundo 21% de argila, 5% de silte e 74% de areia. A textura mais arenosa é desejável para favorecer a infecção e multiplicação de *Meloidogyne* spp. (Rinaldi *et al.*, 2014).

Conforme pode ser visualizado, os atributos químicos dos substratos utilizados nos ensaios indicam baixa fertilidade (Tabela 10), o que pode ser desejável tendo em vista que a maior parte das plantas utilizadas nos ensaios se desenvolve em solos com baixa disponibilidade de nutrientes quando em áreas nativas.

Tabela 10. Caracterização química dos substratos utilizados nos ensaios em casa de vegetação.

Amostra	-----cmolc.dm ⁻³ -----					---mg.dm ⁻³ ---			g.dm ⁻³			
	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	K ⁺	P (Mehlich)	Zn ⁺	CTC (T)	V (%)	m (%)	MO	pH CaCl ₂
Subst. ¹	1,7	0,2	0	1,3	0,1	11,6	4,1	3,31	60,7	0	10	5,7
Subst. ²	1,7	0,2	0	1	0,1	7,7	5,2	2,97	66,3	0	8	6,1

¹Substrato utilizado no 1º ensaio em casa de vegetação; ²Substrato utilizado na repetição do ensaio em casa de vegetação. Em que: Ca²⁺ - Cálcio trocável; Al³⁺: Alumínio trocável; K⁺ - Potássio trocável; H +Al - Acidez potencial; P (mehlich - Fósforo extraído pelo método Mehlich; Zn²⁺: Zinco trocável; CTC (t)- Capacidade de Troca catiônica total; Mg²⁺ - Magnésio trocável; m (%) - Saturação por alumínio; pH CaCl₂ - pH em cloreto de cálcio; MO - Matéria orgânica.

2.2 Confirmação da identidade das espécies de *Meloidogyne*

As espécies de *Meloidogyne* utilizadas neste estudo apresentaram fenótipo para a isoenzima esterase como segue: *M. javanica* (EST-J3), *M. incognita* (EST-I1), *M. morocciensis* (EST-A3) e *M. paranaensis* (EST-P1).

2.3 Avaliação de hospedabilidade de plantas ocorrentes no bioma Cerrado

De acordo com a taxa reprodutiva dos nematoides, considerando os maiores valores médios encontrados (ensaio 1 ou 2) as hospedeiras foram classificadas em diferentes grupos como segue: a) Hospedeiras: aquelas que em interações compatíveis permitiram média do FR do nematoide superior a 1,0, formando muitas galhas, rachaduras e massas de ovos internas (imersas no tecido da raiz) ou externas (expostas na superfície das raízes); b) Hospedeiras potenciais: aquelas que permitiram um $FR > 1,0$ em pelo menos uma das repetições, mas com média de $FR < 1,0$, formando poucas galhas ou rachaduras e poucas massas de ovos; c) Não hospedeiras: aquelas que não permitiram a reprodução do nematoide, ou seja, com $FR = 0$, sem a indução de sintomas aparentes e ausência ou indução ocasional de massas de ovos e/ou galhas.

As espécies avaliadas que se comportaram como não hospedeiras foram: *Albizia niopoides*, *Anadenanthera macrocarpa*, *Anacardium humili*, *Astronium fraxinifolium*, *Cybistax antisiphilitica*, *Dalbergia miscolobium*, *Jacaranda mimosifolia*, *Echinolaena inflexa*, *Elionurus muticus*, *Eriochrysis filiformis*, *Eriotheca pubescens*, *Eugenia tomentosa*, *Calophyllum brasiliense*, *Hymenaea stilbocarpa*, *Inga fagifolia*, *Inga heterophylla*, *Kielmeyera coreaceae*, *Kielmeyera speciosa*, *Myracrodruon urundeuva*, *Paspalum plicatulum*, *Physocalymma scaberrima*, *Stryphnodendron adstringens*,

Handroanthus caraiba, *Handroanthus chrysotrichus*, *Handroanthus impetiginosus*, *Handroanthus serratifolius*, *Pseudobombax tomentosum* e *Terminalia tomentosum*.

Espécies vegetais que se comportaram como hospedeiras potenciais foram *Copaifera langsdorffii* para *M. morocciensis* (FR=1,15 e FR=3,20), *Esenbeckia leiocarpa* para *M. javanica* (FR=1,1) e *Guibourtia hymenifolia* para *M. incognita* (FR=2,26).

Andropogon bicornis reagiu como hospedeira de *M. javanica* e *M. incognita*; *Copaifera langsdorffii* como hospedeira de *M. incognita* e *Triplaris gardneriana* como hospedeira de *M. javanica*, *M. incognita* e *M. morocciensis*.

Para a maioria das espécies vegetais inoculadas, a média dos fatores de reprodução produzidos por *Meloidogyne* spp. foi baixa. Como exemplo tem-se *Triplaris gardneriana* inoculada com *M. javanica*, ensaio 1. As cinco repetições apresentaram FRs que variaram de 0,5 a 11,36, obtendo em média FR= 2,93. A gramínea *A. bicornis* também inoculada com *M. javanica* apresentou em média FR=7,21 e variação do FR de 0 a 35. Para *M. morocciensis* tem-se *Triplaris gardneriana* com FR variando de 0,50 a 2,65 e média do FR= 1,79. Para *M. incognita* tem-se *A. bicornis* com FR variando de 0 a 5,0 e média do FR = 1,58; *C. langsdorffii* com FR variando de 0 a 11,80 e média do FR de 3,15 e *Triplaris gardneriana* com FR variando de 0,20 a 7,77 e média do FR= 5,97.

Das espécies vegetais estudadas, *T. gardneriana* foi a única que, em interações compatíveis, permitiu a reprodução de *M. javanica*, *M. incognita* e *M. morocciensis* em taxas médias de FR>1,0. Em seguida vem *A. bicornis*, hospedeira de *M. javanica* e *M. incognita* e *C. langsdorffii* hospedeira de *M. incognita*. *Meloidogyne paranaensis*, espécie ainda não detectada em cerrado nativo, não apresentou taxa reprodutiva que demonstrasse aumento populacional ou mesmo manutenção da população nas plantas

inoculadas. *Meloidogyne incognita* foi a espécie de nematoide com maior número de plantas hospedeiras com média do FR>1,0 seguido por *M. javanica* e *M. morocciensis*.

Vale destacar que para o tomateiro, tanto no primeiro ensaio, no período de verão, quanto para o segundo ensaio, no período de inverno, houve multiplicação e manutenção da população de *Meloidogyne* spp. garantindo assim qualidade do inoculo utilizados nos testes.

Houve variação entre os ensaios no que tange à resposta das plantas a *Meloidogyne* spp. Os resultados obtidos no primeiro ensaio foram mais esclarecedores quanto à hospedabilidade das espécies vegetais desafiadas com *Meloidogyne* spp. No entanto, destacou-se o fato de a maioria das espécies vegetais avaliadas não apresentarem galhas características com desenvolvimento de massas de ovos muitas vezes imersas no tecido da planta o que resultou em índices de massas de ovos e de galhas no geral baixos (Tabela 11).

Tabela 11. Médias de Fator de Reprodução (FR), Índice de massas de ovos (IMO), Índice de galhas (IG) e Número de ovos e/ou J₂ por grama de raiz (NOJ2/GR), em espécies vegetais que se comportaram como hospedeiras, após quatro meses da inoculação com 5.000 ovos + J₂ de *Meloidogyne* spp.

Espécie	Verão				Inverno			
	IMO	IG	NOJ2/GR	FR	IMO	IG	NOJ2/GR	FR
<i>Meloidogyne javanica</i>								
<i>A. bicornis</i>	1,2	0	857,6	7,21	1,4	0	120,9	0,67
<i>C. langsdorfii</i>	1,8	1,4	73,45	0,14	0,6	0,6	2,14	0,06
<i>E. gummiferum</i>	0,6	0,4	3,48	0,07	0,6	0,6	24,18	0,13
<i>E. leiocarpa</i>	1	0,4	55,72	0,23	0,8	0,2	177,4	0,73
<i>G. hymenifolia</i>	0,2	0	13,11	0,01	0	0	0	0
<i>T. gardneriana</i>	2,6	2,2	156,4	2,93	0	0	0	0
<i>S. lycopersicum</i>	5	5	1740	5,02	5	5	988	4,3
<i>Meloidogyne morocciensis</i>								
<i>A. bicornis</i>	0,2	0	15,11	0,26	2	0	47,14	0,21
<i>C. langsdorffii</i>	0,6	0,2	0,87	0,26	0,6	0,6	0,88	0,004
<i>G. hymenifolia</i>	0,8	0	1,49	0,2	0	0	0	0
<i>H. caraiba</i>	0,8	1,4	6,74	0,11	1,8	2,4	3,8	0,06

<i>T. gardneriana</i>	3	1,8	159,7	1,79	0,8	1	4,84	0,05
<i>S. lycopersicum</i>	5	5	10677	33,59	5	5	7032	10,59
<i>Meloidogyne incognita</i>								
<i>A. bicornis</i>	1,6	0	543,4	1,58	2,8	0	95,59	0,42
<i>C. langsdorffii</i>	1,2	1,8	1772	3,15	0	0	18,05	0,05
<i>E. gummiferum</i>	0,8	0,2	14,82	0,1	0,6	0,2	2,93	0,02
<i>E. leiocarpa</i>	1,4	0,8	23,24	0,19	0,6	0	19,54	0,14
<i>G. hymenifolia</i>	1,4	1,6	291	0,64	0	0	0	0
<i>H. impetiginosus</i>	2,4	3,2	71,43	0,01	1	1,2	17,46	0,12
<i>H. serratifolius</i>	0,8	0,6	56	0,17	0,4	0,6	11,3	0,04
<i>P. tomentosum</i>	0,8	0	3,5	0,04	0,4	0	0,89	0,01
<i>T. gardneriana</i>	2,6	3,8	365,2	5,97	0	0	5,58	0,08
<i>S. lycopersicum</i>	5	5	24760	76,86	5	5	947,2	6,95

2.4 Sintomas e reação das plantas à infecção por *Meloidogyne* spp.

Os sintomas produzidos nas raízes variaram de acordo com a espécie vegetal inoculada. *Handroanthus* spp. e *Triplaris gardneriana* apresentaram galhas de tamanhos variados e bem visíveis, enquanto *Pseudobombax tomentosum* apresentou galhas pequenas e de difícil visualização. As demais espécies vegetais apresentaram raízes com galhas muito pequenas e pouco visíveis, enquanto *Andropogon bicornis* não apresentou formação de galhas em seu sistema radicular, apresentando massas de ovos internas às raízes.

Foram visualizadas massas de ovos nas raízes de todas as espécies vegetais que permitiram a reprodução dos nematoides, sendo que *Enterolobium gummiferum*, *Esenbeckia leiocarpa*, *Pseudobombax tomentosum* e *Triplaris gardneriana* apresentaram massas de ovos apenas em raízes laterais e não em raízes principais.

Guibourtia hymenifolia (Figura 7), após inoculação com *M. javanica* (Figura 7B), *M. incognita* (Figura 7C) e *M. morrocciensis* (Figura 7D) apresentou crescimento lento da parte aérea, tendo sido observadas necroses no sistema radicular, galhas pequenas em raízes laterais e no ápice das raízes, além de massas de ovos.

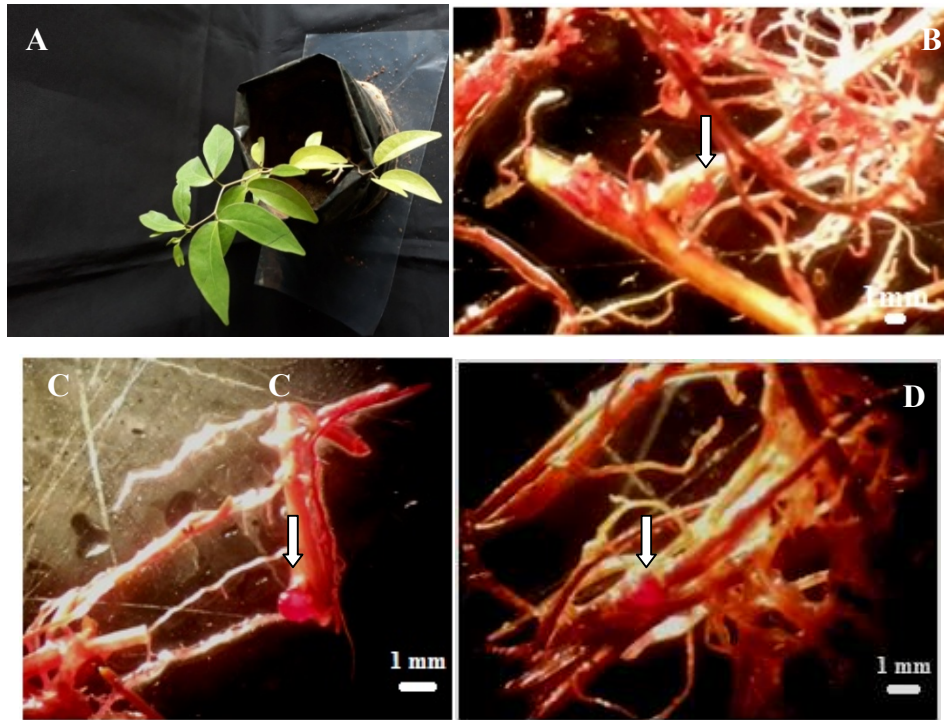


Figura 7. Muda de *Guibourtia hymenifolia* (A) e raízes infectadas por: *Meloidogyne javanica* (B), *M. incognita* (C) e *M. morocciensis* (D).

Copaifera langsdorffii (Figura 8), também apresentou desenvolvimento lento em casa de vegetação e sistema radicular com galhas pequenas e massas de ovos depositadas em rachaduras (Figuras 8 B-D).

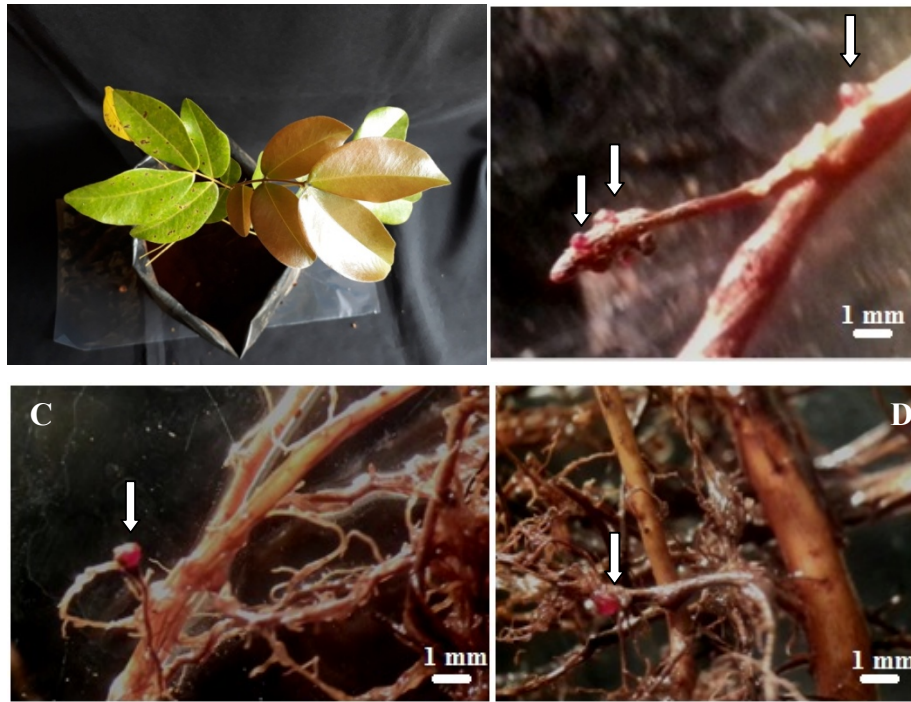


Figura 8. Muda de *Copaifera langsdorffii* (A) e raiz infectada por *Meloidogyne javanica* (B), *M. incognita* (C) e *M. morocciensis* (D). As setas indicam pontos de ocorrência de massas de ovos.

Pseudobombax tomentosum (Figura 9) apresentou sistema radicular com raiz principal bem desenvolvida e raízes secundárias pouco abundantes. Quando inoculada com *M. incognita* desenvolveu engrossamento dos tecidos infectados em raízes laterais, com produção de massas de ovos.

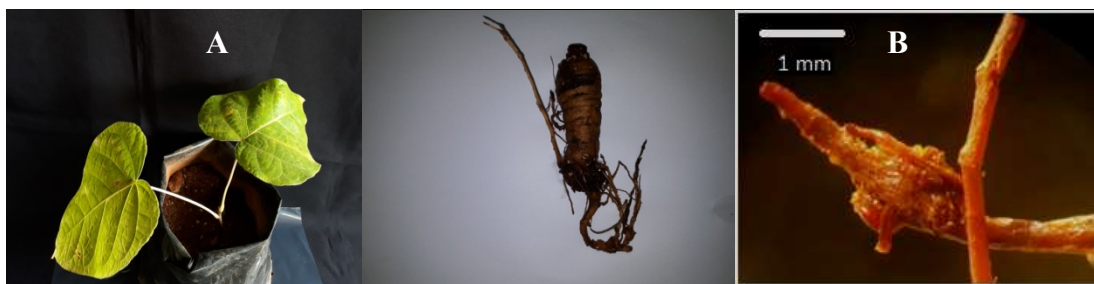


Figura 9. Muda de *Pseudobombax tomentosum*, sistema radicular com formação de tuberosidade e raiz infectada com *M. incognita* apresentando massa de ovos em raiz lateral.

Esenbeckia leiocarpa (Figura 10) apresentou sistema radicular com muitas raízes secundárias e engrossamentos ao longo de toda a raiz provocados pelo

parasitismo de *M. javanica* e *M. incognita* e produção de massas de ovos externas aos locais de infecção (Figura 10 B-C).

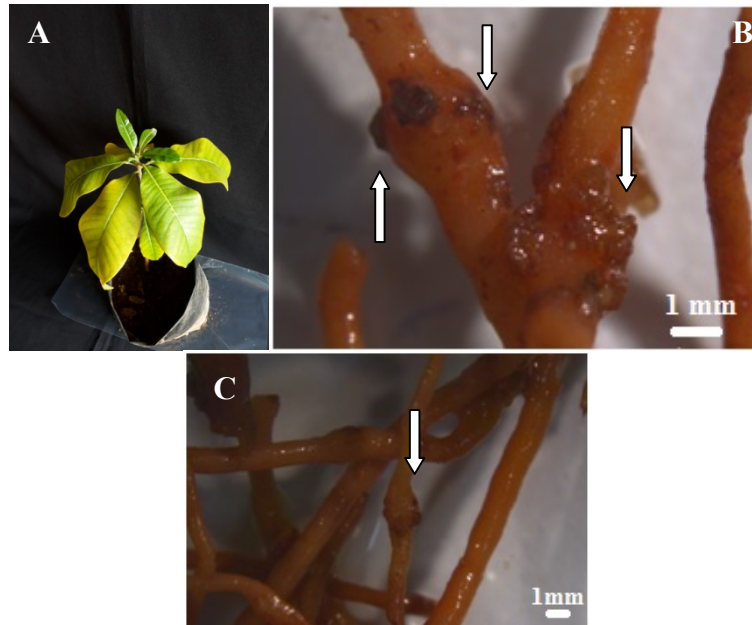


Figura 10. Muda de *Esenbeckia leiocarpa* (A) e sintomas em raízes causados por *Meloidogyne javanica* (B e C) (setas brancas indicam locais onde ocorrem galhas e/ou massas de ovos).

Enterolobium gummiferum (Figura 11), apresentou bom desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular bem desenvolvido. Infecções tanto por *M. javanica* quanto *M. incognita* induziram massas de ovos em rachaduras nas raízes.

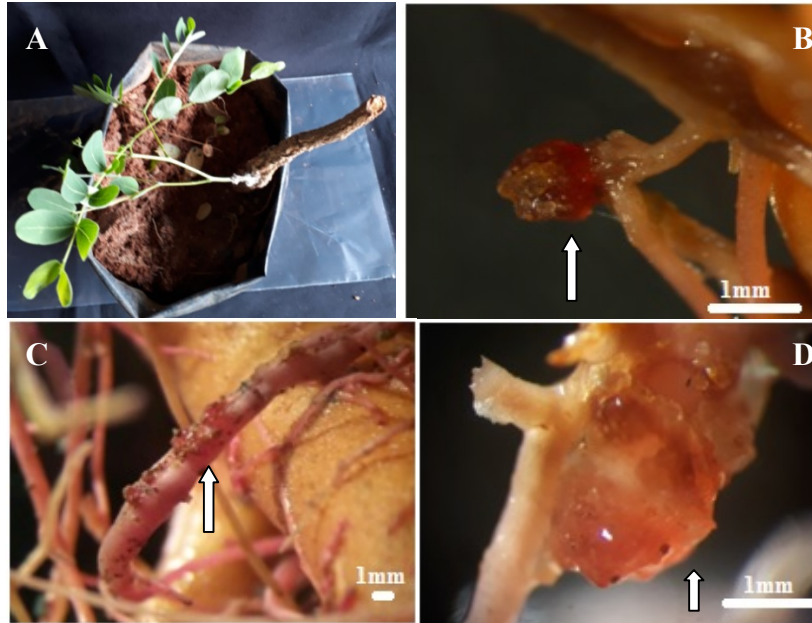


Figura 11. Mudas de *Enterolobium gummiferum* (A) e sintomatologia (indicada pelas setas) em raízes de infectadas por *Meloidogyne incognita* (B, C e D).

Andropogon bicornis (Figura 12) não apresentou formação de galhas em seu sistema radicular. No entanto, em interações compatíveis, houve formação massas de ovos bem visíveis.

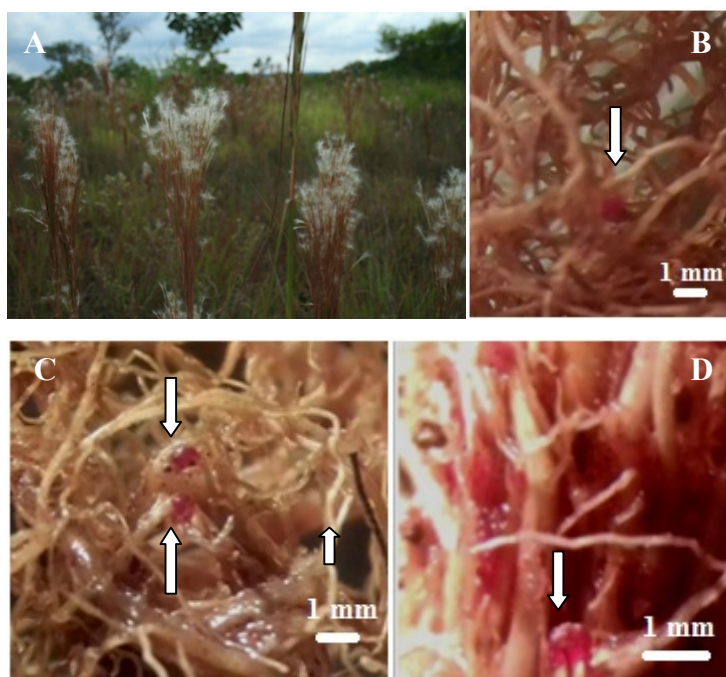


Figura 12. Plantas de *Andropogon bicornis* (A) e massas de ovos (indicadas pelas setas), coradas com fucsina ácida 0,35%, em raízes infectadas com *Meloidogyne morocciensis* (B), *M. incognita* (C) e *M. javanica* (D).

Handroanthus impetiginosus (Figura 13) apresentou bom desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular em casa de vegetação. Infecções por *M. incognita* induziram galhas de tamanhos variados por todo sistema radicular (13B), sendo algumas grandes e típicas da infecção pelo nematoide das galhas e presença de massas de ovos (13C).

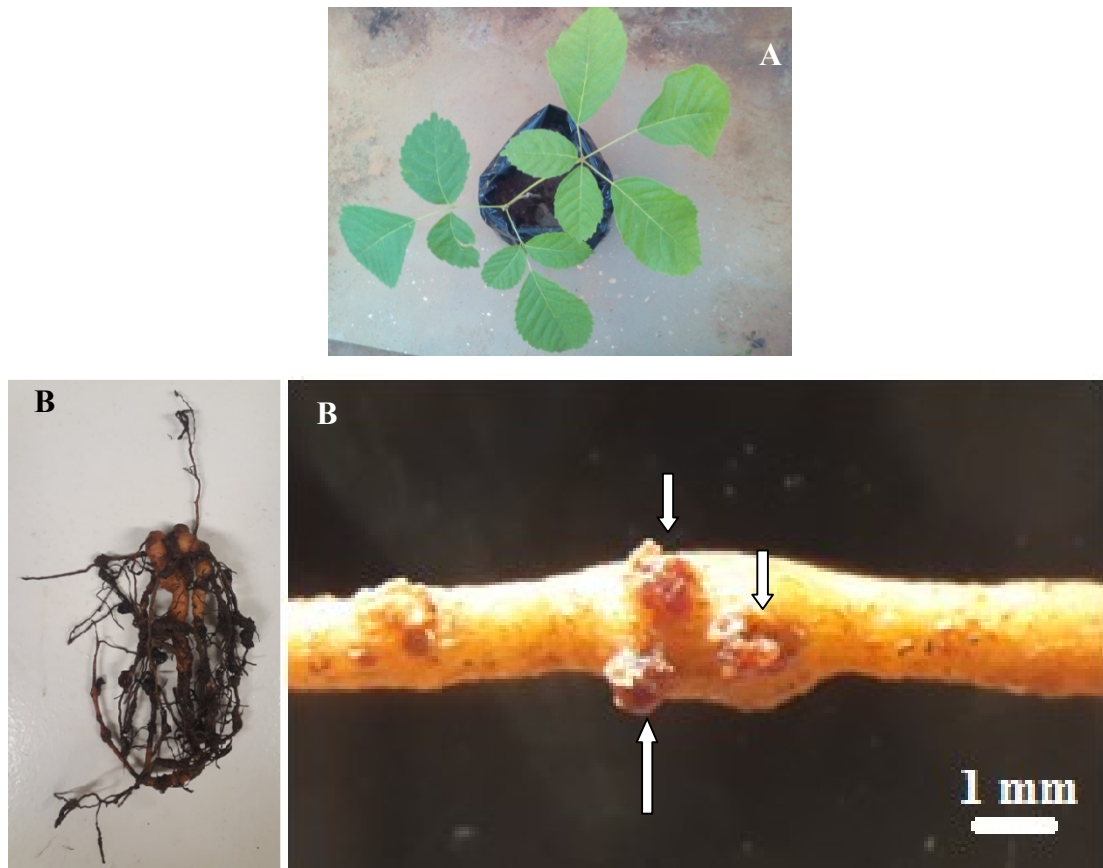


Figura 13. Muda de *Handroanthus impetiginosus*, raiz com galhas bem desenvolvidas e distribuídas (B), e massas de ovos (C) coradas com fucsina ácida (setas brancas indicam as massas de ovos).

Handroanthus serratifolius (Figura 14), apresentou engrossamento da raiz com produção de massas de ovos (Figura 14B) e rachaduras em tecidos de raízes mais velhas (Figura 14C).

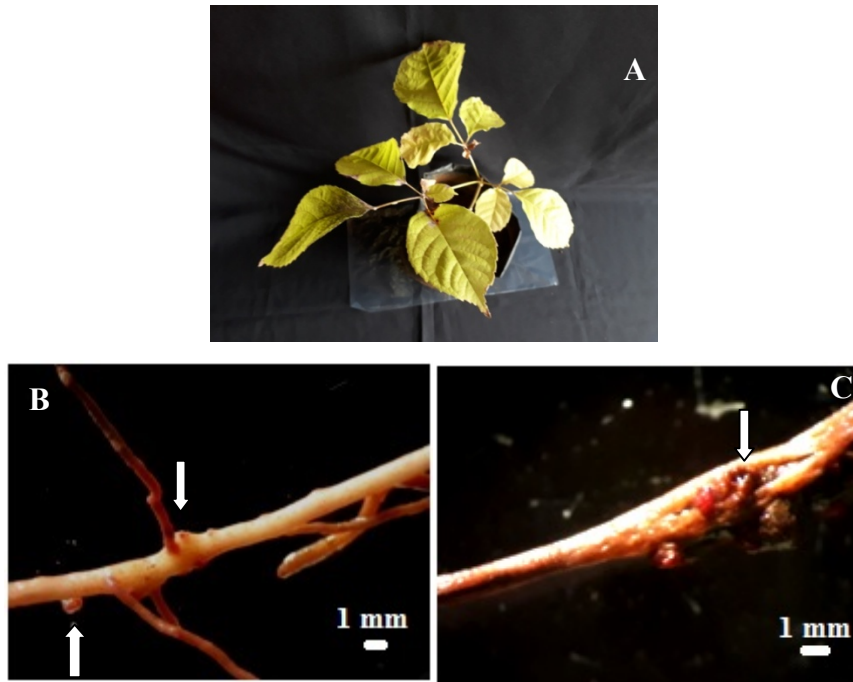


Figura 14. Muda de *Handroanthus serratifolius* (A), raiz infectada por *Meloidogyne incognita* apresentando massas de ovos (B) e rachadura em tecido (C). As setas brancas indicam os pontos com massas de ovos e/ou rachaduras.

Triplaris gardneriana (Figura 15) apresentou mudas com excelente desenvolvimento em casa de vegetação, tanto da parte aérea quanto do sistema radicular (Figuras 15B e 15C), tendo se destacado em relação às demais espécies. Quando infectada por *M. javanica*, *M. incognita* e *M. morocciensis* desenvolveu galhas de tamanhos variados e massas de ovos por todo o sistema radicular.

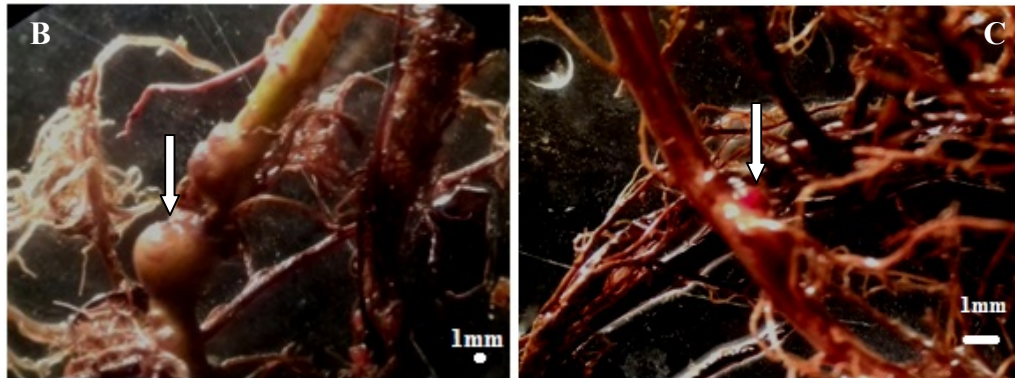


Figura 15. Muda de *Triplaris gardneriana* (A). Galha produzida por *Meloidogyne morocciensis* (B) e massa de ovos (C) produzida por *M. javanica* e corada com fucsina ácida 0,35% (setas brancas indicam assas de ovos e galhas).

Handroanthus caraiba (Figuras 16) apresentou infecção por *M. morocciensis*, com galhas e massas de ovos bem desenvolvidas e distribuídas por todo o sistema radicular, tanto na raiz principal quanto em raízes secundárias. Porém, o fator de reprodução do nematoide foi baixo.

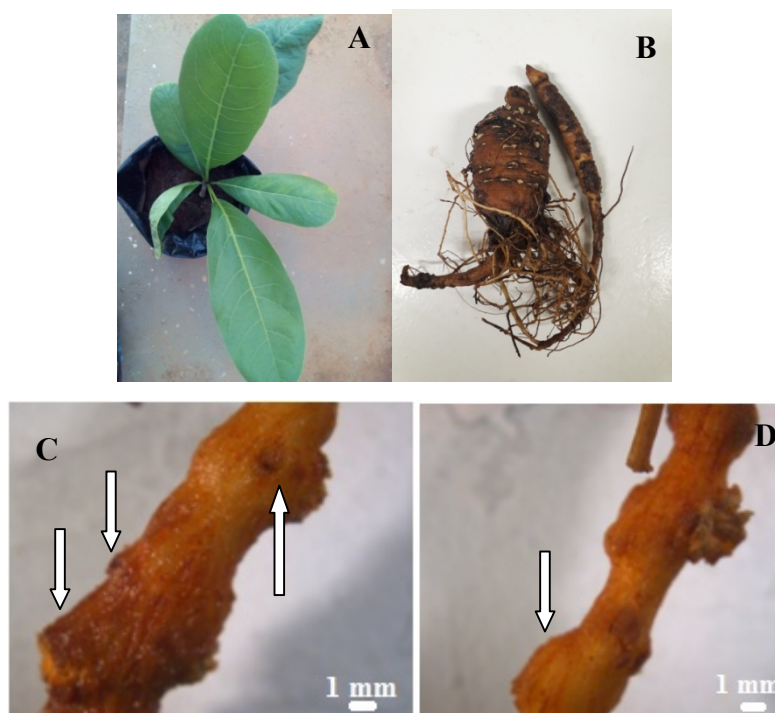


Figura 16. Muda de *Handroanthus cariba* (A), sistema radicular (B) e sintomatologia em raízes infectadas com *Meloidogyne morocciensis* (C e D) (setas indicam galhas e/ou massas de ovos).

3 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo revelaram novas hospedeiras para as espécies de *Meloidogyne* testadas. *Andropogon bicornis* L., espécie popularmente conhecida como capim rabo de burro, permitiu a reprodução de *M. incognita* e *M. javanica* em seu sistema radicular.

Meloidogyne incognita e *M. javanica* foram relatadas por Silva *et al.* (2013) em solos de diferentes fitofisionomias de cerrado, mas com predominância em Campo Limpo. A fitofisionomia Campo Limpo é constituída principalmente por vegetação herbáceo-subarbusciva, com predomínio de gramíneas, particularmente espécies pertencentes aos gêneros *Andropogon*, *Axonopus*, *Echinolaena*, *Paspalum* e *Trachypogon* (Silva & Nogueira, 1999; Munhoz & Felfili, 2007).

Como os nematoides do gênero *Meloidogyne* são endoparasitas sedentários, a sua sobrevivência está relacionada ao parasitismo e reprodução em plantas. Partindo-se do pressuposto que há predomínio de gramíneas na fitofisionomia Campo Limpo, é coerente relacionar a sobrevivência de *M. javanica* e *M. incognita* com o parasitismo de gramíneas presentes nesse tipo de fitofisionomia.

Das gramíneas avaliadas neste estudo, apenas *A. bicornis* permitiu a reprodução de *M. javanica* e *M. incognita*, sendo que as demais se comportaram como não hospedeiras. Este é o primeiro relato de *A. bicornis* como hospedeira de *M. javanica* e *M. incognita*, demonstrando que na fitofisionomia Campo Limpo, em vegetação nativa de cerrado, essa hospedeira contribui para a sobrevivência e multiplicação desses nematoides.

Andropogon bicornis é uma espécie recomendada para cultivo em áreas degradadas pela ação humana, objetivando a sua recomposição florística (Neri *et al.*,

2011). O conhecimento da hospedabilidade dessa espécie vegetal aos nematoides fitoparasitas, direcionará o cultivo da mesma para áreas onde não haja ocorrência natural desses nematoides ou para áreas em que esses nematoides ocorram, objetivando a sua preservação.

Café Filho & Huang (1988) relataram *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filipjev e Schuurmans Steekhoven 1934 em associação com *A. bicornis* no cerrado, não havendo mais relatos de outros nematoides associados a esta planta.

Triplaris gardneriana é uma espécie vegetal pertencente ao grupo das Angiospermas, classe Dicotiledônea, família Polygonaceae, podendo atingir até 20 m de altura e tronco de 30 a 50 cm de diâmetro. É uma planta nativa da América do Sul, comumente conhecida como pau-de-formiga ou Pajeú e adaptada a áreas alagadas, sendo indicada para reflorestamento de matas ciliares. No cerrado, ocorre principalmente nas fitofisionomias Cerradão e Mata de Galeria. Segundo Silva *et al.* (2013) *M. incognita* e *M. javanica* são espécies também encontradas em Mata ciliar, além de Campo Limpo e outros tipos de fitofisionomias. Esse estudo demonstrou que essa espécie é nova hospedeira de *M. javanica*, *M. incognita* e *M. morocciensis* no cerrado, permitindo a reprodução e a manutenção desses nematoides nas fitofisionomias onde ocorre. Na literatura, não há relato de outros nematoides associados a esta espécie vegetal.

Copaifera langsdorffii (Leguminosae, Caesalpinoideae) é uma espécie vegetal arbórea que atinge até 25 m de altura e tronco de 90 cm de diâmetro, sendo conhecida como copaiabeira ou pau-d'óleo. O tronco é utilizado para extração de madeira e óleo para fins medicinais, este último apresentando características antibióticas, anti-inflamatórias, antissépticas e cicatrizante. Vale ressaltar que essa espécie forma frutos

preferencialmente por polinização cruzada, sem autopolinização espontânea e sem apomixia, o que confere maior variabilidade genética (Freitas e Oliveira, 2002).

No Cerrado, *C. langsdorfii* ocorre principalmente em Matas de Galeria, podendo ser utilizada para fins de reflorestamento. Nesse estudo, *C. langsdorfii* demonstrou ter potencial para a manutenção e reprodução de populações de *M. incognita* no cerrado. *Meloidogyne incognita* relatada em solo de cerrado e de Mata de Galeria por Silva *et al.* (2013) o que suporta os dados deste trabalho quanto à hospedabilidade de *C. langsdorfii* à *M. incognita* no cerrado.

Os ipês *Handroanthus impetiginosus*, e *H. serratifolius* e *H. caraíba* foram classificados como não hospedeiras dos nematoides avaliados. Os dados obtidos por Silva *et al.* (2013), corroboram com os encontrados neste estudo onde *H. impetiginosus* não permitiu a reprodução de *M. javanica* em seu sistema radicular após inoculação artificial.

Apesar da reação negativa dos ipês avaliados a *M. javanica*, Mendes & Cardoso (1978) relataram *M. javanica* infectando *Tabebuia serratifolia* (sin. *Handroanthus serratifolius* - ipê amarelo). Posteriormente, Kunieda-Alonso *et al.* (1999) estudaram a virulência e agressividade de dois isolados de *M. javanica* a *H. serratifolius*, sendo um isolado obtido de mudas de ipê-amarelo e outro de diferentes hospedeiras. Os autores relataram que ambos isolados apresentaram a mesma taxa reprodutiva em ipê (FR=2,49).

Segundo Kunieda-Alonso *et al.* (1999), os sintomas produzidos em ipê-amarelo foram redução de crescimento das plantas inoculadas, indução de células gigantes no protoxilema e profloema, formação de massas de ovos internas e extensas necroses no córtex das raízes. Nesse estudo, não houve redução de crescimento das plantas inoculadas, tendo sido visualizadas poucas galhas e massas de ovos.

Infecção natural de *H. impetiginosus* e *H. serratifolius* por *M. incognita* foi relatada por Antes *et al.* (2012), em mudas obtidas de viveiro comercial no oeste paranaense. No entanto, esses mesmos autores relataram ausência de infecção quando a população natural de *M. incognita* foi inoculada artificialmente em mudas sadias dessas hospedeiras indicando, assim, possível variabilidade genética nos ipês em estudo.

Handroanthus impetiginosus também foi relatada como hospedeira de *M. arenaria* por Ferreira (1989). Essa mesma hospedeira foi alvo de estudo de Oliveira *et al.* (1995), os quais relataram os danos causados por *M. arenaria* e *M. javanica* sob diferentes densidades de inóculo. Plantas infectadas produziram galhas nas raízes, mas sem redução de crescimento e com taxa reprodutiva baixa para as diferentes densidades de inóculo avaliadas.

Segundo Oliveira *et al.* (1995), os maiores valores de FR obtidos foram FR=0,61 para *M. javanica* com 9.000 ovos/J₂ inoculados e FR=2,2 para *M. arenaria* com 3.000 ovos e/ou J₂ inoculados.

Os resultados negativos obtidos neste estudo para o parasitismo de *Meloidogyne* spp. em ipês pode ter ocorrido devido à variabilidade genética das plantas inoculadas e também devido à não virulência dos isolados de *Meloidogyne* deste estudo.

As espécies vegetais classificadas como hospedeiras potenciais de *M. javanica* como *Esenbeckia leiocarpa*, de *M. incognita* como *Guibourtia hymenifolia* e de *M. morocciensis* como *C. langsdorfii* necessitam ser alvo de novos estudos para a comprovação da sua hospedabilidade ou não a essas espécies de nematoides. Novas inoculações em mudas de diferentes origens e com diferentes isolados desses nematoides poderão auxiliar na elucidação dessa hipótese.

De fato, há grande variação de resultados na literatura quanto à infecção e reprodução de *Meloidogyne* spp. em plantas nativas. Isto se deve a fatores como

variabilidade genética das plantas inoculadas e virulência/agressividade dos isolados utilizados em cada estudo (Antes *et al.*, 2012), bem como a densidade do inóculo (Oliveira *et al.*, 1995) e sua origem (Kunieda-Alonso *et al.*, 1999).

Segundo Taylor & Sasser (1978), contrariando a especificidade atribuída a *Meloidogyne* spp., a patogenicidade expressa por *M. javanica* na interação com seus hospedeiros é independente da origem. No entanto, apesar de se tratar de espécie com elevada adaptabilidade, a origem do inóculo, bem como as condições experimentais, podem interferir nos resultados dos ensaios. Nesse estudo, foram inoculados isolados de *Meloidogyne* spp., com exceção de *M. paranaensis*, coletados em cerrado nativo sob preservação.

Fatores ambientais, como temperatura e umidade, são determinantes para o estabelecimento das relações parasitárias entre nematoide e planta, além das características físico-químicas do substrato utilizado nos ensaios em casa de vegetação, que também podem influenciar nos resultados dos ensaios e na sua reprodutibilidade. Considerando esses fatores, é provável que as diferenças encontradas na literatura sejam devido às condições experimentais diferentes, sendo necessários novos estudos.

Vale ressaltar que as plantas que dificultaram a reprodução dos nematoides, ou mesmo aquelas onde não foi detectado qualquer indício de multiplicação de *Meloidogyne* spp. não devem ser descartadas como possíveis hospedeiras, tendo em vista a variabilidade genética das espécies vegetais, todas de propagação seminífera, e da variabilidade dos nematoides.

Outro fator importante se refere aos baixos valores gerais de Número de ovos/J₂ por grama de raiz, de índice de galhas e de índice de massas de ovos encontrados, demonstrando mecanismos de resistência que dificultam a multiplicação de *Meloidogyne* spp. em condições naturais. Isso pode ser visualizado a partir da

comparação com os resultados obtidos em tomateiro que apresentaram condições de manutenção dos nematoides e sintomatologia típica tanto em condições de verão quanto de inverno.

Dessa forma, esse trabalho foi importante na detecção de novas hospedeiras de *Meloidogyne* spp em áreas de Cerrado, com destaque para *Triplaris gardneriana*, *Copaifera langsdorf* e *Andropogon bicornis* que apresentaram maiores fatores de reprodução pelo menos no período de verão sendo de grande contribuição para escolha e manejo de nematoides do gênero *Meloidogyne* em áreas de reflorestamento e recuperação.

4 CONCLUSÕES

Foram consideradas hospedeiras: *T. gardneriana* para *M. incognita*, *M. javanica* e *M. morocciensis*; *A. bicornis* para *M. javanica* e *M. incognita*; e *C. langsdorfii* para *M. incognita*.

Foram consideradas hospedeiras potenciais: *Esenbeckia leiocarpa* para *M. javanica*, *Guibourtia hymenifolia* para *M. incognita* e *Copaifera langsdorfii* para *M. morocciensis*. Os sintomas produzidos nas raízes pela inoculação de *Meloidogyne* spp. foram necroses, rachaduras, galhas, intumescimento e produção de massas de ovos internas e externas.

Detectou-se variabilidade genética intraespecífica e interespecífica nas espécies vegetais desafiadas com os diferentes isolados de *Meloidogyne*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad P, Gouzy J, Aury M-J et al., 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology** 26, 909-15.
- Aguiar LMS, Camargo AJA (2004) **Cerrado ecologia e caracterização**. Embrapa Informação Tecnológica. 246 p.
- Alonso SK, Alfenas AC (1998) Isoenzimas na taxonomia e na genética de fitonematoides. In: Alfenas AC (Ed) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins, fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**, Viçosa, UFV, 574 p.
- Antes VA, Comerlato AP, Schuelter AR, Carneiro, RMDG, Furlanetto C (2012) Native-plant hosts of *Meloidogyne* spp. from Western Paraná, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 55(2):213-219.
- Bonetti JIS, Ferraz S (1981) Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de café. **Fitopatologia Brasileira** 6:553.
- Campos HD, Silva JRC, Campos VP, Da Silva LHCP, Costa LSAS, Silva WJR (2011) Efeito da temperatura do solo na infectividade e reprodução de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines* em cultivares de soja. **Ciência e Agrotecnologia** 35(5):900-907.
- Cares JH, Huang SP (1991) Nematode fauna in natural and cultivated cerrados of Central Brazil. **Fitopatologia Brasileira** 16:199-209.
- Cares JE, Huang SP (2008) Comunidades de nematoides de solo sob diferentes sistemas na Amazônia e Cerrados brasileiros. In: Moreira FMS, Siqueira JO, Brussard L (eds.) Biodiversidade do solo em Ecossistemas Brasileiros. Universidade Federal de Lavras-MG. p. 409-444.

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

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

De Waele D, Elsen A, 2007. Challenges in tropical plant nematology. **Annual Review of Phytopathology** 45: 457–85.

Dickson DW, Struble FB (1965) A sieving-staining technique for extraction of egg mass of *Meloidogyne incognita* from soil. **Phytopathology** 55: 497.

Dickson DW, De Waele D (2005) Nematode parasites of peanut. In: Luc M.; Sikora RA, Bridge J. (eds). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. **CAB International, Wallingford, UK**, p. 393-436.

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

Duarte MC, Esteves GL, Semir J, Melhem TSA, Wanderley MDGL, Martins SE Jung-Mendaçolli SL, Shepherd GJ, Kirizawa M (2007) **Bombacaceae** 5:21-37.

Durigan G (2012) Cerrado: o trade-off entre a conservação e o desenvolvimento. **Parcerias Estratégicas** 15(31):243-251.

Freitas CV, Oliveira PE (2002) Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf.(Leguminosae, Caesalpinioideae). **Brazilian Journal of Botany** 25(3):311-321.

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

Huang SP, Pereira AC, Dristig MCG, Souza RM (1991) Ocorrência de *Meloidogyne javanica* e *M. arenaria* em árvores silvestres no Cerrado virgem do Brasil Central. **Fitopatologia Brasileira** 16: 37.

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

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

IITA (1981) Proceedings of the Third Research Planning Conference on Root-knot Nematodes, *Meloidogyne* spp. Ibadan, Nigeria: IITA.

Ioannou N (2000) Soil solarization as a substitute for methyl bromide fumigation in greenhouse tomato production in Cyprus. **Phytoparasitica** 28: 248–56.

Inomoto MM, Machado ACZ, Antedomênico SR (2007) Reação de *Brachiaria* spp. e *Panicum maximum* a *Pratylenchus brachyurus*. **Fitopatologia Brasileira** 32:341-344. 2007.

Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) (2015) TerraClass Cerrado traz dados inéditos sobre o bioma. São José dos Campos – SP. Disponível em: http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=4056. Consultado em 22/01/2019.

Jenkins WR (1964) A Rapid Centrifugal-flotation technique for extracting nematodes from soil. **Plant Disease Report** 48:692.

Kunieda-Alonso S, Santos JM, Alfenas AC, Ferraz, S (1999) **Revista Árvore** 23(4): 479-485.

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

Lima JEFW (2011) Situação e perspectivas sobre as águas do cerrado. **Ciência e Cultura** 63(3):27-29.

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

Mattos VS, Furlanetto C, Silva JGP, Dos Santos DF, Almeida MRA, Correa VR, Moita AW, Castagnone-Sereno P, Carneiro RMDG (2016) *Meloidogyne* spp. populations from native Cerrado and soybean cultivated áreas: genetic variability and agressivenss. **Nematology** 18:505-515.

Mendonça RC, Felfili JM, Walter BMT, Silva Junior MC, Rezende AV, Filgueiras TS, Nogueira PE, Fagg CW (2008) Flora vascular do Bioma Cerrado: Checklist com 12.356 espécies. Cerrado: ecologia e flora. Brasília: **Embrapa Cerrados** 2:423-1279.

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

Ministério do Meio Ambiente (MMA) (2015) Cerrado brasileiro tem 54,5% da vegetação preservada. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/meioambiente/2015/11/cerrado-brasileiro-tem-54-5-davegetacao-preservada>. Acessado em 22/12/2018.

Montoro GR (2008) Morfologia de Plântulas de Espécies Lenhosas do Cerrado. Dissertação de Mestrado - Botânica. Universidade de Brasília, Brasília-DF.

Moens M, Perry RN, Starr JL (2009) *Meloidogyne* species - a diverse group of novel and important plant parasites. In: Perry RN, Moens M, Starr JL (eds) Root-knot Nematodes. CAB International, Wallingford, UK, p. 1-17.

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

Muniz MFS (2007) **Variabilidade genética e biológica de *Meloidogyne exigua* e patogenicidade de *Meloidogyne* spp. em genótipos de cafeeiros.** Tese de Doutorado em Agronomia. Lavras, MG.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent, J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403: 853-858.

Oliveira CMG, Goulart AMC, Monteiro AR, Ferraz LCCB (1995) Suscetibilidade e danos causados em ipê-roxo por *Meloidogyne javanica* e *M. arenaria*. **Nematologia Brasileira** 19:89-92.

Onkendi EM, Kariuki GM, Marais M, Moleleki LN (2014) The threat of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Africa: a review. **Plant Pathology** 63:727-737.

Oostenbrink M (1966) Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mededelingen Landbouw** 66(4):1-46.

Paes VS, Soares LM, Murakami DM, Santos JM, Barbosa BFF, Neves SS (2012) Ocorrência de *Meloidogyne enterolobii* em muricizeiro (*Byrsonima cydoniifolia*). **Tropical Plant Pathology** 37 (3):215-219.

Ribeiro JF, Walter BMT (1998) Fitofisionomias do bioma cerrado. In: Cerrado: ambiente e flora. Sano SM, Almeida SP (eds). **EMBRAPA-CPAC**, Planaltina, DF. p.89-166.

Rinaldi LK, Nunes J, Montecelli TDN (2014) Efeito de texturas do solo sobre populações de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* em soja. **Cultivando o Saber** 7 (1):83 - 101.

Roese AD, Oliveira RDL, Oliveira DS (2007) Variabilidade fisiológica em populações de *Meloidogyne paranaensis*. **Fitopatologia Brasileira** 32:040-043.

Silva GS, Santo JM, Ferraz S (1988) Novo método de coloração de ootecas de *Meloidogyne* sp. In: Congresso Brasileiro de Nematologia, XII. Resumos. Dourados, MS.

Silva FAM, Assad ED, Steinke ET, Müller AG (2008) Clima do Bioma Cerrado. In: Albuquerque ACS, Da Silva AG, (eds) Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. 1ª ed. Embrapa Informações Tecnológicas. Brasília. p 93-148.

Silva JGP (2012) **Ocorrência de *Meloidogyne* spp. em diferentes fitofisionomias do Cerrado e hospedabilidade de plantas nativas a *Meloidogyne javanica***. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. 63p.

Silva JGP, Furlanetto C, Almeida MRA, Rocha DB, Mattos VS, Correa VR, Carneiro RMDG (2014) Occurrence of *Meloidogyne* spp. in Cerrado vegetations and reaction of native plants to *Meloidogyne javanica*. **Journal of Phytopathology** 162: 449-455.

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

Taylor AL, Sasser JN (1983) **Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (especies de *Meloidogyne*)**. Proyecto Internacional de *Meloidogyne*. Universidad del Estado de Carolina del Norte, USA. 111p.

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

WWF- Brasil (2017) **Biomás Brasileiros: Cerrado**. Disponível em: <
http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/questoes_ambientais/biomas/bioma_cerrado/
> Acesso em: 16 de agosto de 2017.

RESUMO

O nematoide das galhas radiculares *Meloidogyne paranaensis* é uma espécie considerada emergente em termos de importância econômica e, atualmente, tem ganhado destaque principalmente em lavouras cafeeiras onde pode causar danos significativos. No entanto, embora possa ser tão destrutivo quanto *M. incognita*, pouco se sabe a respeito do genoma funcional desse nematoide. O genoma de *M. paranaensis* ainda não está disponível, sendo encontradas poucas sequências em bancos de dados de domínio público. Com base no exposto, objetivou-se obter o sequenciamento e análise do transcritoma dos estádios ovos e J₂ de *M. paranaensis*, comparar a expressão diferencial nesses dois estádios e selecionar transcritos com potencial envolvimento nas relações nematoide-planta. Foram geradas quatro bibliotecas de cDNA, sendo uma biblioteca para ovo, uma para J₂ e uma replicata biológica de cada estágio. Foi realizada corrida em sequenciador Illumina Miseq. Após o sequenciamento, foram removidas sequências de baixa qualidade e dos adaptadores, realizada a normalização digital, a montagem das sequências e a anotação funcional. Ao todo foi detectado um total de 9.193 sequências diferencialmente expressas entre os estádios de ovo e J₂. As sequências geradas relativas às quatro bibliotecas foram comparadas com sequências do genoma de *M. incognita* (30% de homologia), *M. hapla* (0,2%) e *C. elegans* (0,001%). A classificação funcional de conjuntos de unigenes foi realizada por meio do programa Gene Ontology (GO) diferenciando-se os transcritos obtidos em três categorias funcionais: processos biológicos, função molecular e componentes celulares. Além disso, fez-se a anotação de algumas classes específicas de enzimas ativadas por carboidratos (CAZy) como proteases e transportadores. Quanto às classes catalíticas de proteases observou-se maior frequência de cisteínas, sendo que o maior número de enzimas com expressão diferencial em J₂ está relacionada ao metabolismo de purinas.

Palavras-chave: Transcritoma, RNAseq, Expressão diferencial, Proteases.

ABSTRACT

The root-knot nematode *M. paranaensis* is a species considered to be emerging in terms of economic importance and, currently, it has gained prominence mainly in coffee plantations where it can cause significant damages. However, although it may be as destructive as *M. incognita*, little is known about the functional genome of this nematode. The genome of *M. paranaensis* is not yet available, with few sequences found in public domain databases. Based on the above, we aimed to obtain the transcription and analysis the transcriptome of the eggs and J₂ stages of *M. paranaensis*, to compare the differential expression in these two stages and to select transcripts with potential involvement in the plant-nematode relationships. Four cDNA libraries were generated, one egg library, one for J₂ and one biological replicate of each stage. A run was performed on the Illumina Miseq sequencer. After sequencing, low-quality sequences and adapters were removed, digital normalization performed, sequence assembled, and functional annotation completed. In all, a total of 9.193 sequences differentially expressed between the egg and J₂ stages were detected. Sequences generated relative to the four libraries were compared to sequences from the genome of *M. incognita* (30% homology), *M. hapla* (0.2%) and *C. elegans* (0.001%). The functional classification of unigene clusters was performed by means of Gene Ontology (GO), differentiating the transcripts obtained in three functional categories: biological processes, molecular function and cellular components. In addition, a few specific classes of carbohydrate-activated enzymes (CAZy) were annotated as proteases and carriers. As for the catalytic classes of proteases, a higher frequency of cysteines was observed, and the greater number of enzymes with differential expression in J₂ is related to the metabolism of purines.

Key-words: Transcriptome; RNAseq; Diferencial expression; Proteases.

1 MATERIAL E MÉTODOS

Tomateiros foram semeados em vasos contendo 3 Kg de substrato estéril (solo + Plantmax e areia média lavada na proporção 1:1:1). Foram semeadas três sementes por vaso. Após a germinação foi mantida apenas uma planta por vaso. Os tomateiros foram adubados com 5 gramas de N-P-K (4-14-8) por planta/vaso a cada 30 dias e mantidos em casa de vegetação, com temperatura variando de 15 a 35 °C, com regas diárias.

1.1 Obtenção e manutenção de população de *Meloidogyne paranaensis*

A população de *M. paranaensis* utilizada neste estudo foi coletada em Londrina, PR. Tomateiros com 20 cm de altura e bom enraizamento foram inoculados com 5.000 ovos e/ou juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. paranaensis*. Os tomateiros inoculados foram mantidos em casa de vegetação por 60 a 90 dias até a extração dos nematoides. Durante esse período as plantas permaneceram em casa de vegetação com temperatura variando entre 18 e 43 °C.

1.2 Extração de ovos de *M. paranaensis*

Raízes de tomateiros foram retiradas dos vasos, lavadas e cortadas em pedaços menores (5 cm) antes da extração em liquidificador de acordo com metodologia de Bonetti & Ferraz (1981). Após a raiz ser cortada, os pedaços foram triturados em liquidificador por 30 segundos na menor rotação, em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 0,5% de cloro ativo. Após esse procedimento, a suspensão foi vertida em um conjunto de peneiras granulométricas (65 mesh, 230 mesh e 500 mesh). A

primeira peneira para a retenção de sujeira, a segunda para a retenção de J₂ e a terceira para a retenção de ovos de *M. paranaensis*. Os ovos retidos na peneira de 500 mesh foram transferidos para Tubo Falcon de 50 ml contendo 3 gramas de Caolim e a suspensão centrifugada entre 650 e 700 g por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi homogeneizado em solução de sacarose na concentração de 454 g.L⁻¹ e centrifugado em velocidade entre 650 e 700 g, sendo o sobrenadante vertido em peneira de 500 mesh e recolhido em béquer com água destilada. Os ovos obtidos foram transferidos para microtubos de 1,5 ml e congelados a -80 °C para posterior extração de RNA ou prontamente utilizados para eclosão de J₂, objetivando a extração de RNA total.

1.3 Obtenção de Juvenis de segundo estágio a partir de ovos

Ovos de *M. paranaensis*, extraídos conforme exposto no item 1.2, foram depositados em funil de Baermann contendo peneira plástica com papel toalha sobreposto, imersa em água (Baermann, 1917). O conjunto foi deixado em estufa bacteriológica a 28-30 °C sem regime de luz. A água destilada presente no funil foi recolhida e repostada diariamente. Os J₂ presentes eclodidos nas primeiras 24 h foram descartados e os eclodidos após 24 h recolhidos diariamente, depositados em microtubos de 1,5 ml e centrifugados em microcentrífuga a 10.000 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante retirado com auxílio de micropipeta e descartado.

O precipitado (J₂) foi homogeneizado em água estéril e centrifugado a 10.000 rpm por 1 minuto. Após a última centrifugação, a água estéril foi retirada até o limite da amostra (J₂). Os J₂ restantes foram congelados a -80 °C em ultrafreezer até a utilização visando extração de RNA total.

1.4 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído separadamente de amostras de ovos e formas infectantes (J₂) de *M. paranaensis*. O RNA foi extraído utilizando-se o Purelink RNA Mini Kit (Life technologies), seguindo protocolo do fabricante.

As amostras de J₂ e de ovos foram coletadas separadamente e congeladas ao final de cada extração. Os diferentes microtubos contendo J₂ foram reunidos em um único tubo, totalizando 500 microlitros de material biológico. O mesmo foi feito para as amostras de ovos. Todo material permaneceu em nitrogênio líquido e, concluída a extração, o RNA total extraído foi armazenado a -80 °C.

Após a extração do RNA total, fez-se o tratamento das amostras com Turbo DNase (Thermo Fisher), de acordo com recomendação do fabricante. A qualidade e a concentração dos RNAs extraídos foram analisadas em Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Missisauga, Canada).

1.5 Seleção de RNA mensageiro e sequenciamento

As amostras contendo RNA total de ovos e J₂ foram encaminhadas à empresa Genômica DF (Centro de Genômica de Alto Desempenho do Distrito Federal) com sede na Universidade Católica de Brasília, DF, para confecção de quatro bibliotecas de cDNA, sendo uma replicata biológica para cada estágio, ou seja, duas bibliotecas de cDNA de ovos e duas bibliotecas de cDNA de J₂.

As bibliotecas foram processadas em plataforma ILLUMINA MiSeq em uma única corrida. Utilizou-se o Kit de sequenciamento 600-cycle 2X300 pb.

1.6 Limpeza e filtragem das sequências

A qualidade das sequências foi avaliada usando-se a ferramenta FastQC (Patel e Jain, 2012). Os resultados das análises do FastQC foram visualizados em arquivos no formato HTML, contendo as estatísticas básicas das sequências, como número e tamanho dos reads gerados, distribuição de valores de qualidade para cada uma das 300 bases, conteúdo GC, índice de qualidade, distribuição do tamanho e níveis de duplicação das sequências, além de identificar sequências que estão super-representadas e conteúdo kmer.

Em todas as figuras, no eixo X, temos a posição em pb e, no eixo Y, o valor da qualidade na escala de Phred. A cor do fundo do gráfico reflete a qualidade das sequências. A cor verde possui os valores mais altos de qualidade, seguidos pela cor laranja indicando qualidade razoável e, em vermelho, sequências com qualidade ruim. Com os dados brutos corrigidos, as sequências ficaram prontas para análise.

Após a análise de qualidade fez-se a remoção dos adaptadores Illumina, utilizados para ancoragem dos primers de sequenciamento. Fez-se a remoção de sequências de baixa qualidade e adaptadores com o software Trimmomatic (Lohse *et al.*, 2012). Entre as opções disponíveis para a execução do Trimmomatic foram usadas SLIDINGWINDOW com a opção 4:20 para que as sequências das extremidades fossem cortadas toda vez que a média de qualidade fosse inferior a 20 (Phred Quality Score, $Q \geq 20$), em janelas (intervalos) de quatro bases.

Além disso, foi utilizada a opção MINLEN 50 para que as sequências fossem eliminadas se, após a filtragem, elas tivessem comprimento menor do que 50 pb. Os arquivos sem adaptadores e sem sequências de baixa qualidade foram reavaliados com o software FastQC para verificação da eficácia da filtragem.

1.7 Normalização digital e montagem das sequências

Com os arquivos contendo as sequências de alta qualidade e sem contaminantes, fez-se normalização digital utilizando o script `normalized-by-median.py` do pacote `khmer` (Brown et al., 2012). Esse script elimina sequências redundantes para reduzir o consumo de memória necessária para montagem das mesmas.

Após a normalização, o script `filter-abund.py`, também do `khmer`, foi usado para eliminar sequências que apareceram com abundância mediana (valor $C < 2,0$). Dessa forma foram eliminadas sequências com baixa cobertura, geralmente resultantes de erros de sequenciamento (Zhang et al., 2014). A eliminação de sequências redundantes, bem como de erros de sequenciamento, etapa fundamental para a redução de uso de memória, geralmente alta tendo em vista a montagem de milhões de sequências geradas em plataformas de alto desempenho.

Em seguida, a montagem das sequências dos transcritos foi feita *de novo* com o software Trinity, que utiliza três algoritmos diferentes: Inchworm, Chrysalis e Butterfly (Grabherr et al., 2013). Para a montagem das sequências foi definido um tamanho mínimo de 500 pb para os contigs.

Por fim, prováveis regiões codantes (CDS) foram identificadas nos contigs (transcritos montados) utilizando o TransDecoder (Grabherr et al., 2013), uma ferramenta incluída no software de montagem Trinity, e que identifica a ORF (Open Reading Frame) mais provável para cada contig. Dessa forma, o TransDecoder permite a localização de regiões CDS e UTRs (Untranslated region) dentro dos contigs.

Nesse software são gerados quatro arquivos diferentes, sendo que o arquivo `.cds` contém a sequência de nucleotídeos das ORFs selecionadas, o arquivo `.pep` contém a sequência de peptídeos obtidos a partir de tradução *in silico* das ORFs anotadas, os

arquivos .gff3 e .bed contém as posições das regiões CDS e UTRs anotadas dentro dos transcritos nos formatos GFF e BED, respectivamente.

1.8 Anotação funcional das sequências

Após a montagem e análise da qualidade das sequências, estas foram analisadas utilizando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990). O program BLAST possui vários algoritmos (blastn, blastp, blastx e tblastx).

Neste trabalho, utilizou-se o blastp para encontrar similaridades entre as sequências montadas de *M. paranaensis* presentes no banco de dados nr (non-redundant) do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para a execução do blastp, o número máximo de sequências alinhadas a serem mantidas para cada sequência de *M. paranaensis* (max_target_seqs) foi delimitado como 20 e o formato do arquivo de saída foi definido como outfmt 5, que gera arquivos no formato XML.

Entre os vários transcritos montados e anotados de *M. paranaensis* foi selecionado apenas um transcrito por gene para as análises de anotação funcional no Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005). O objetivo foi evitar que variações no número de transcritos alternativos pudessem alterar as proporções relativas das categorias funcionais dos diferentes genes do genoma. Além disso, as várias isoformas dificultam o mapeamento inequívoco das sequências nas análises de polimorfismos (SNPs e InDels).

A seleção de uma única isoforma para cada gene foi feita com base no melhor *Blast hit* (menor *e-value*, sendo que este parâmetro determina a menor probabilidade de haver um falso alinhamento entre as sequências), seguido pelo maior *BitScore*, maior percentual de identidade e maior comprimento de alinhamento, respectivamente.

Se após estes filtros ainda houvessem isoformas empatadas para um mesmo gene, o critério de seleção seria o tamanho da isoforma, selecionando a maior sequência. Após a finalização do BLAST, os arquivos gerados foram analisados pelo *software* Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005) que realiza análise e anotação funcional de genes e proteínas. Esse software utiliza os resultados do BLAST para seleção dos termos GO (*gene ontology*) mais prováveis para cada sequência analisada. Para a execução completa e obtenção dos resultados do Blast2GO são necessárias cinco fases: BLAST, mapeamento, anotação, análise estatística e visualização.

Como as sequências foram primeiramente analisadas pelo BLAST, os resultados dessa análise (arquivo XML) foram utilizados como dados de entrada no *software* Blast2GO. Na segunda etapa o *software* faz um mapeamento dos termos GO associados aos hits obtidos pela análise com BLAST para as sequências de interesse. A etapa de mapeamento gerou gráficos com a distribuição de frequência baseado nos bancos de dados onde as sequências melhores se alinharam com as análises do BLAST.

Na etapa de anotação o *software* seleciona os termos GO mais prováveis dentre o *pool* obtido pela etapa de mapeamento, identificando-os como sendo pertencentes às categorias funcionais mais verossímeis entre as sequências analisadas. Por fim, a etapa de visualização permitiu a obtenção e análise dos gráficos GO com os resultados finais de todas as etapas realizadas pelo Blast2GO, como por exemplo, os gráficos de função biológica, componentes celulares e processos biológicos e a quantidade de sequências que foi anotada em cada categoria funcional.

Também foi feita a anotação de algumas classes específicas de enzimas como CAZy (Yin *et al.*, 2012), seguindo os protocolos definidos pelo portal dbCAN v 6.0; proteases utilizando a base de dados MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>) e transportadores utilizando a base de dados TCDB (www.tcdb.org). O critério para

anotação dos dois últimos bancos de dados foi via *blastp* com um mínimo de $1e^{-05}$ de *e-value* e 35% de identidade.

1.9 Expressão diferencial

De posse dos resultados com menor redundância, os *reads* de cada biblioteca foram mapeados com a ferramenta “*align_and_estimate_abundance.pl*” (nativa do pacote Trinity) utilizando-se o programa Bowtie (versão 1.0.1) e RSEM (versão 1.2.19). Logo em seguida foi utilizada a ferramenta “*abundance_estimates_to_matrix.pl*” para computar as contagens dos *reads* e realizar a normalização dos dados via TMM (*Trimmed Mean of M values*) (Grabherr *et al.*, 2013).

Utilizou-se então o programa edgeR (versão 3.8.5), com um FDR < 0,05 (False Discovery Rate), para seleção dos transcritos diferencialmente expressos, os *heatmaps* com os padrões de expressão e os gráficos de log das contagens de *reads*. Por fim, fez-se análise de enriquecimento funcional de categorias GO entre os transcritos diferencialmente expressos em cada condição, comparando com todos os transcritos. Essa análise foi realizada através do Teste Exato de Fischer no pacote R GO_MWU (https://github.com/z0on/GO_MWU). Através desse teste é calculada a probabilidade do enriquecimento da categoria GO ter ocorrido ao acaso (valor de p).

O programa forneceu ainda a razão de falsa descoberta (FDR), uma probabilidade ajustada para contornar o problema das múltiplas comparações. Assim, foi possível identificar quais categorias GO estão significativamente mais (ou menos) enriquecidas entre os transcritos diferencialmente expressos nas amostras de ovos e juvenis.

1.10 Mapeamento dos transcritos de *Meloidogyne paranaensis* contra genoma de referência mais próximo.

Uma análise paralela foi feita mapeando transcritos contra sequências do genoma de *Meloidogyne incognita*, depositado nos bancos de dados *Wormbase* e NCBI, para melhor anotação dos dados. Com auxílio do programa BLAST, os resultados dessa análise (arquivo XML) foram utilizados como dados de entrada no software Blast2GO. Na segunda etapa, o *software* fez mapeamento dos termos GO associados aos *hits* obtidos pela análise com BLAST para as sequências de interesse. Obtiveram-se então as três ontologias gênicas (*geneontology.org*).

2 RESULTADOS

2.1 Qualidade do RNA total extraído

O material biológico obtido das amostras de ovos e J₂ de *M. paranaensis* gerou RNA total de bom rendimento e qualidade. A partir do RNA total obtido foram construídas duas bibliotecas de ovos, sendo a primeira denominada O1 com RIN = 8,1 (Figura 17) e a segunda, réplica biológica, denominada O2 com RIN = 8,4 (Figura 18) e duas bibliotecas de formas J₂, sendo a primeira denominada J2R1 com RIN=9,0 (Figura 19) e a segunda, réplica biológica de J2R2 com RIN=9,0 (Figura 20). Esses valores demonstram baixa degradação de RNA, estando os valores maiores que 8,0, o que é recomendado pelos protocolos para corrida de RNAseq em sequenciadores de alto rendimento.

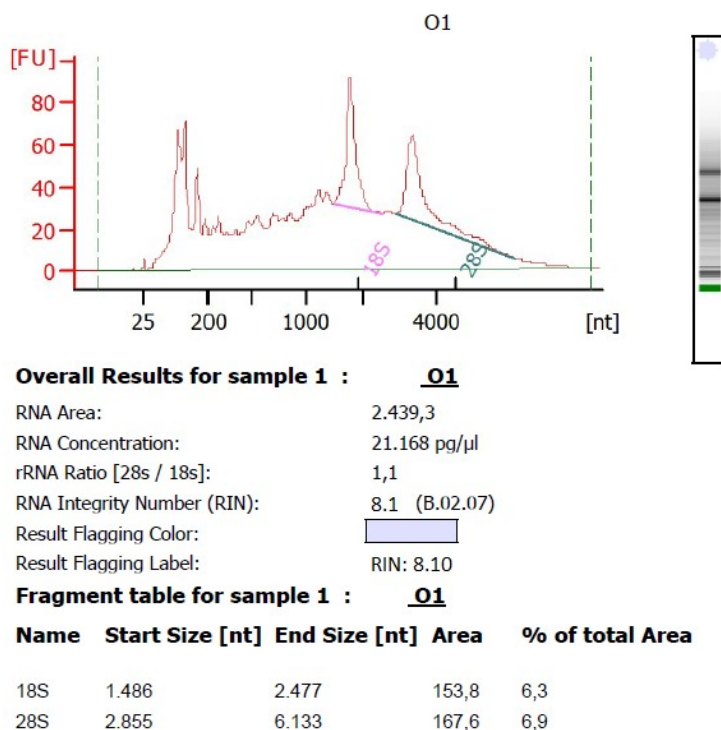


Figura 17. Análise de RNA total de ovos de *Meloidogyne paranaensis*, amostra O1, realizado em Agilent 2100 Bioanalyzer.

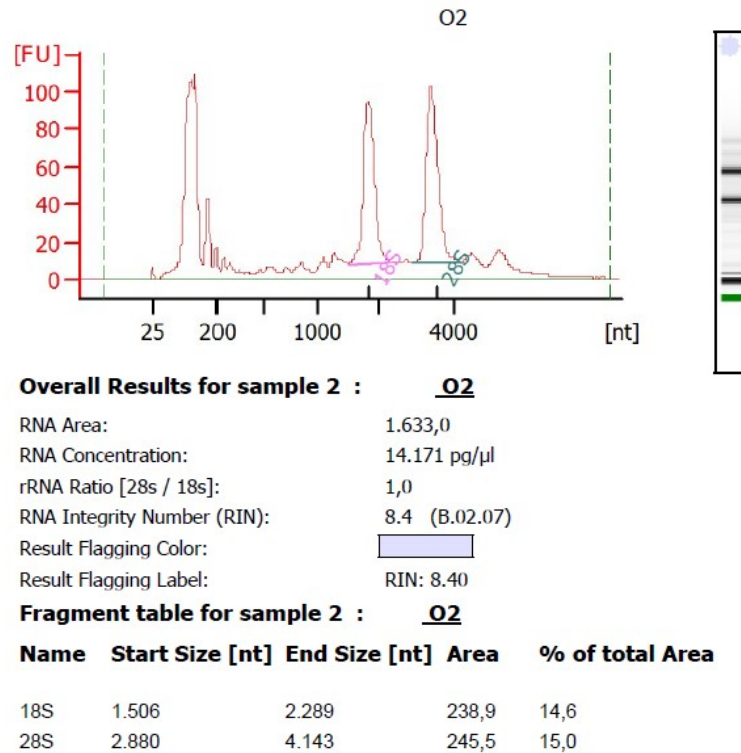


Figura 18. Análise de RNA total de ovos de *Meloidogyne paranaensis*, amostra O2, realizado em Agilent 2100 Bioanalyzer.

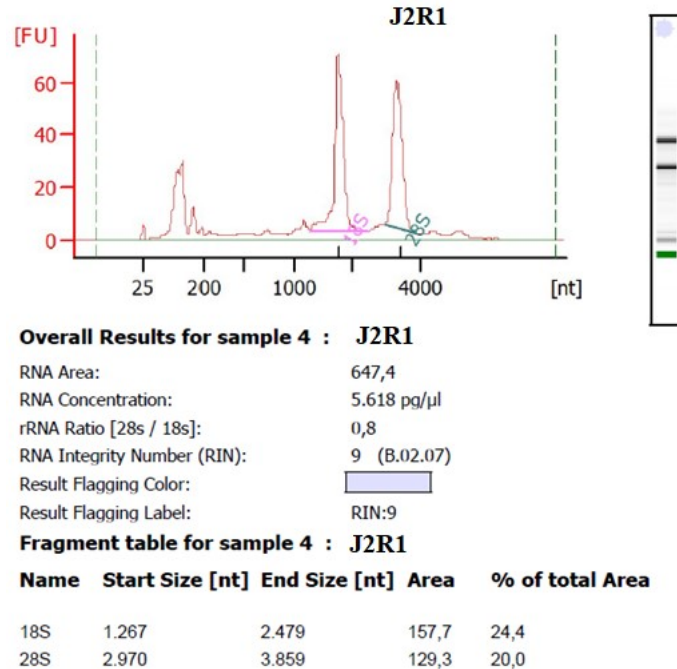


Figura 19. Análise de RNA total de Juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne paranaensis*, amostra J2R1, realizado em Agilent 2100 Bioanalyzer.

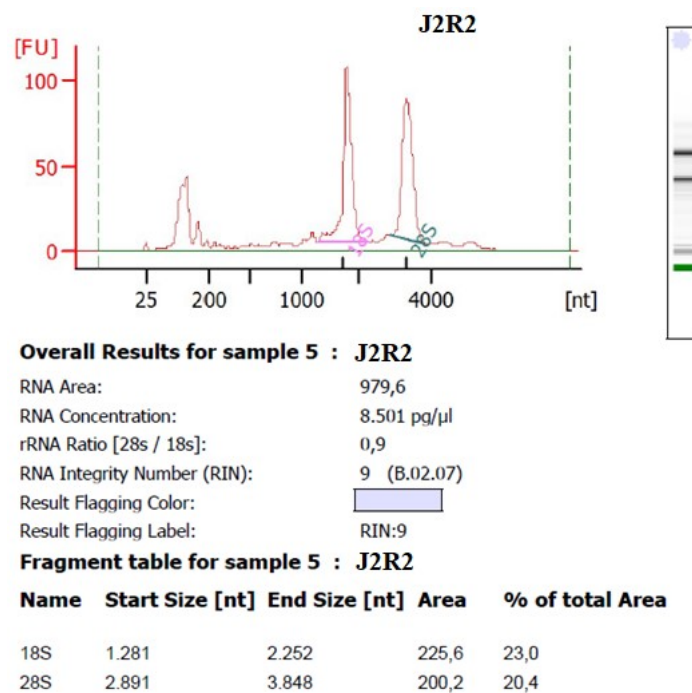


Figura 20. Análise de RNA total de Juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne paranaensis*, amostra J2R2, realizado em Agilent 2100 Bioanalyzer.

2.2 Sequenciamento em Plataforma Illumina *MiSeq* e Qualidade das sequências por base (*Per base Sequence quality*)

A qualidade das sequências, geradas em sequenciador Illumina *MiSeq*, foram analisadas pelo programa FASTQC, constatando-se que a maior parte das sequências apresentaram boa qualidade, com valores superiores ao valor mínimo exigido pela escala PHRED (20), ou seja, 1 erro a cada 100 bases.

Foram realizadas análises das sequências geradas a partir da extremidade 5' e das sequências geradas a partir da extremidade 3'. Os resultados de qualidade das sequências para a biblioteca J₂, extremidades 5' e 3', podem ser visualizados nas tabelas 21A e 22A, sem trimagem, e 21B e 22B, após a trimagem da mesma forma para a sua réplica biológica nas tabelas 23A e 24A, sem limpeza, e 23B e 24B, após a limpeza.

A qualidade das sequências da biblioteca O1, extremidades 5' e 3', pode ser visualizada nas Figuras 25A e 26A, sem limpeza, e 25B e 26B, após a limpeza. Da

mesma forma para a biblioteca O2 nas Figuras 27A e 28A, sem limpeza, e 27B e 28B, após a limpeza.

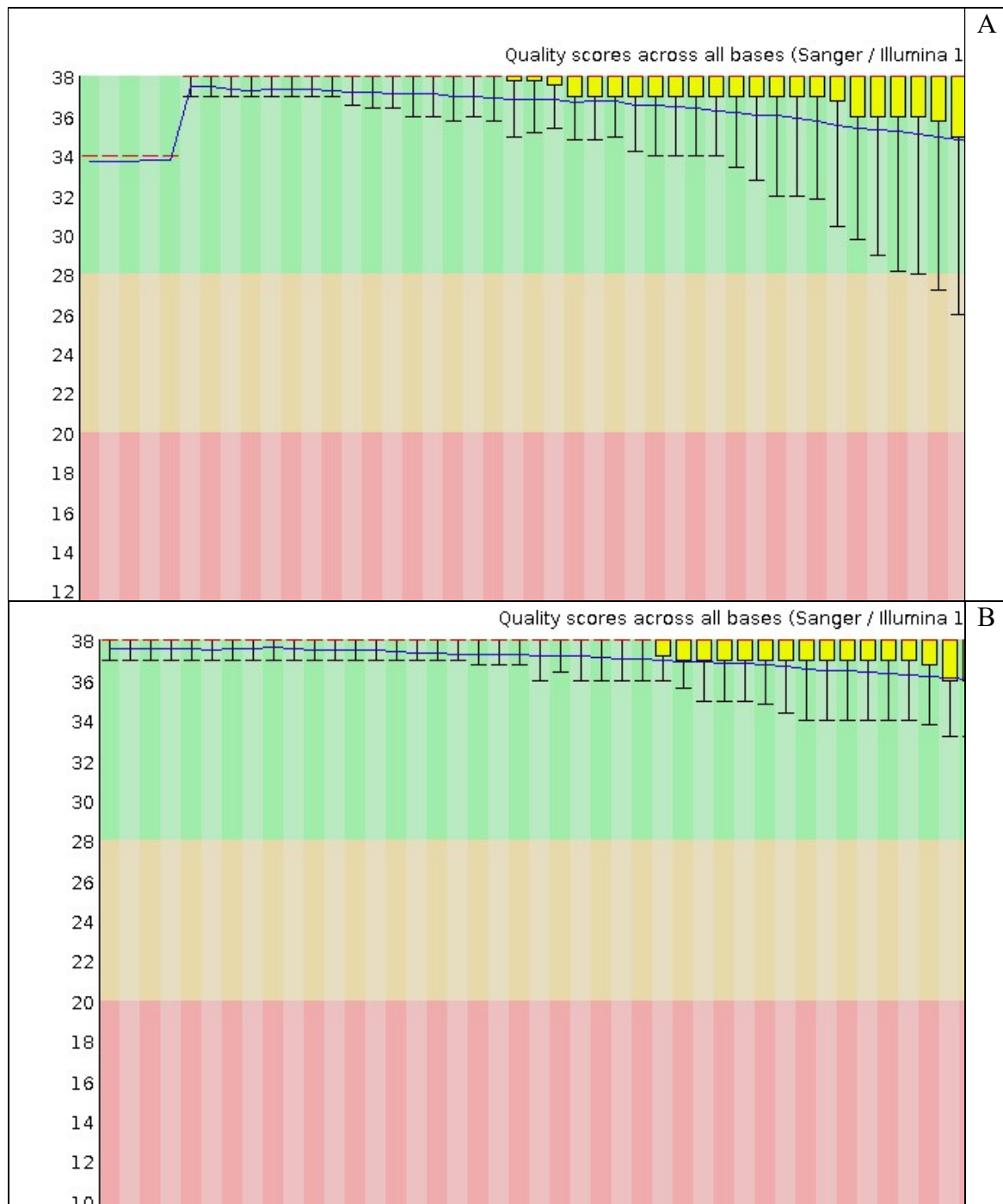


Figura 21. Análise de dados, segundo a escala Phred - *score* 20, da biblioteca J2R1 na extremidade 5' de *Meloidogyne paranaensis*. **A:** qualidade das sequências sem trimagem; **B:** qualidade das sequências após trimagem.

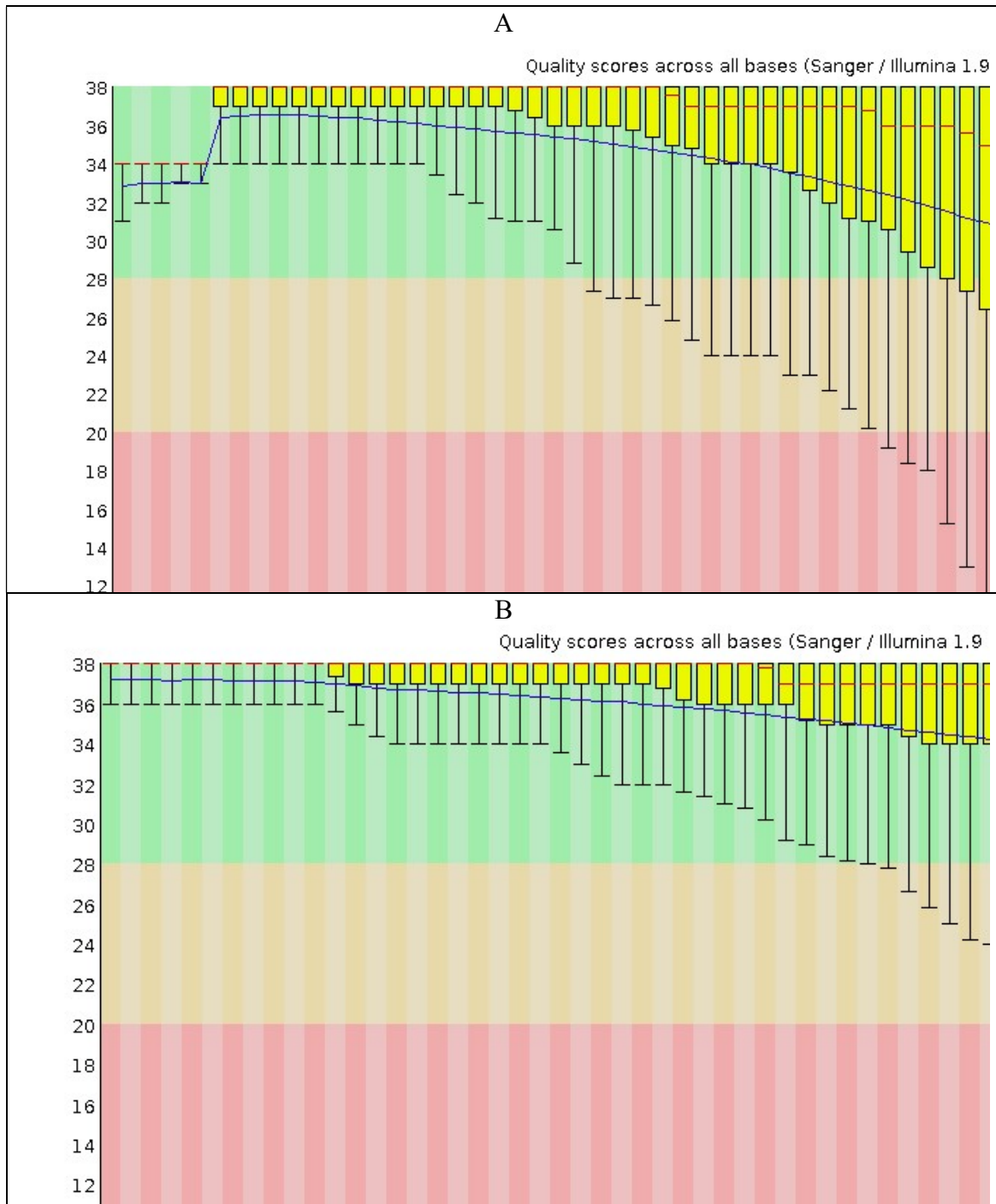


Figura 22. Análise de dados, segundo a escala Phred - score 20, da Biblioteca J2R1 na extremidade 3' de *Meloidogyne paranaensis*. **A:** qualidade das sequências sem trimagem; **B:** qualidade das sequências após trimagem.

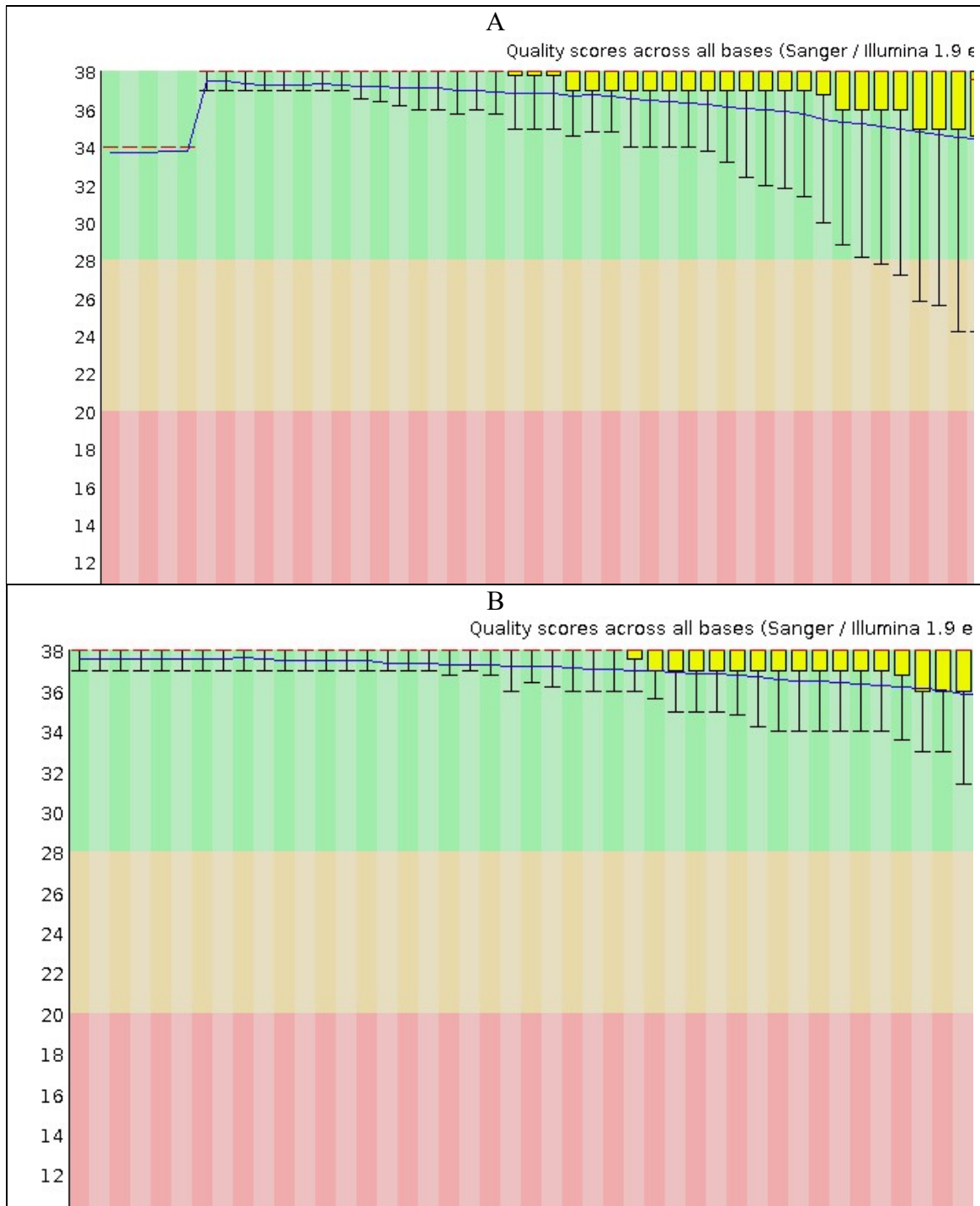


Figura 23. Análise de dados, segundo a escala Phred – score 20, da réplica biológica da biblioteca J2R2 na extremidade 5' de *Meloidogyne paranaensis*. **A:** qualidade das sequências sem trimagem; **B:** qualidade das sequências após trimagem.

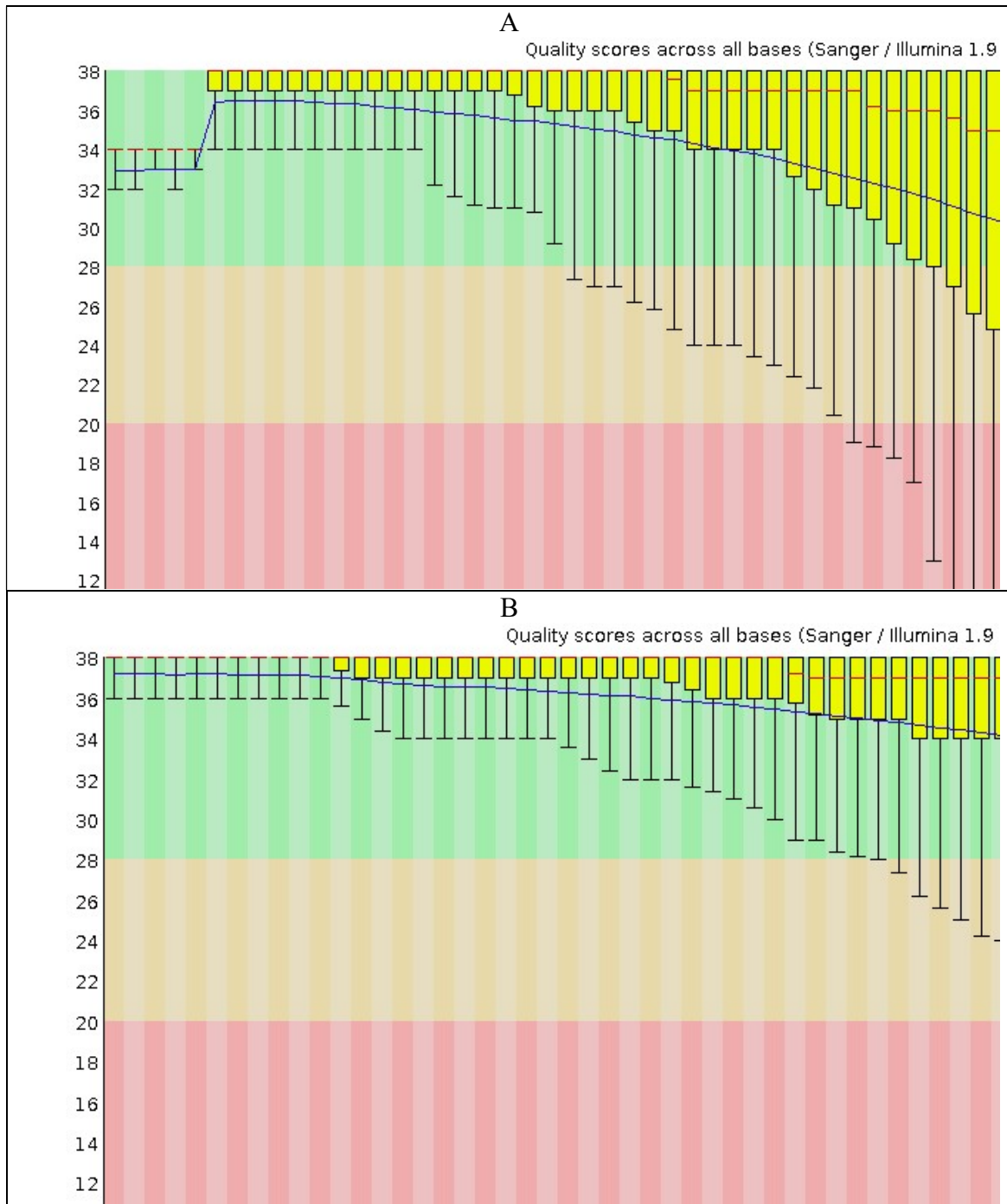


Figura 24. Análise de dados, segundo a escala de Phred - *score* 20, da réplica biológica da biblioteca J2R2 na extremidade 3' de *Meloidogyne paranaensis*. **A:** qualidade das sequências sem trimagem; **B:** qualidade das sequências após trimagem.

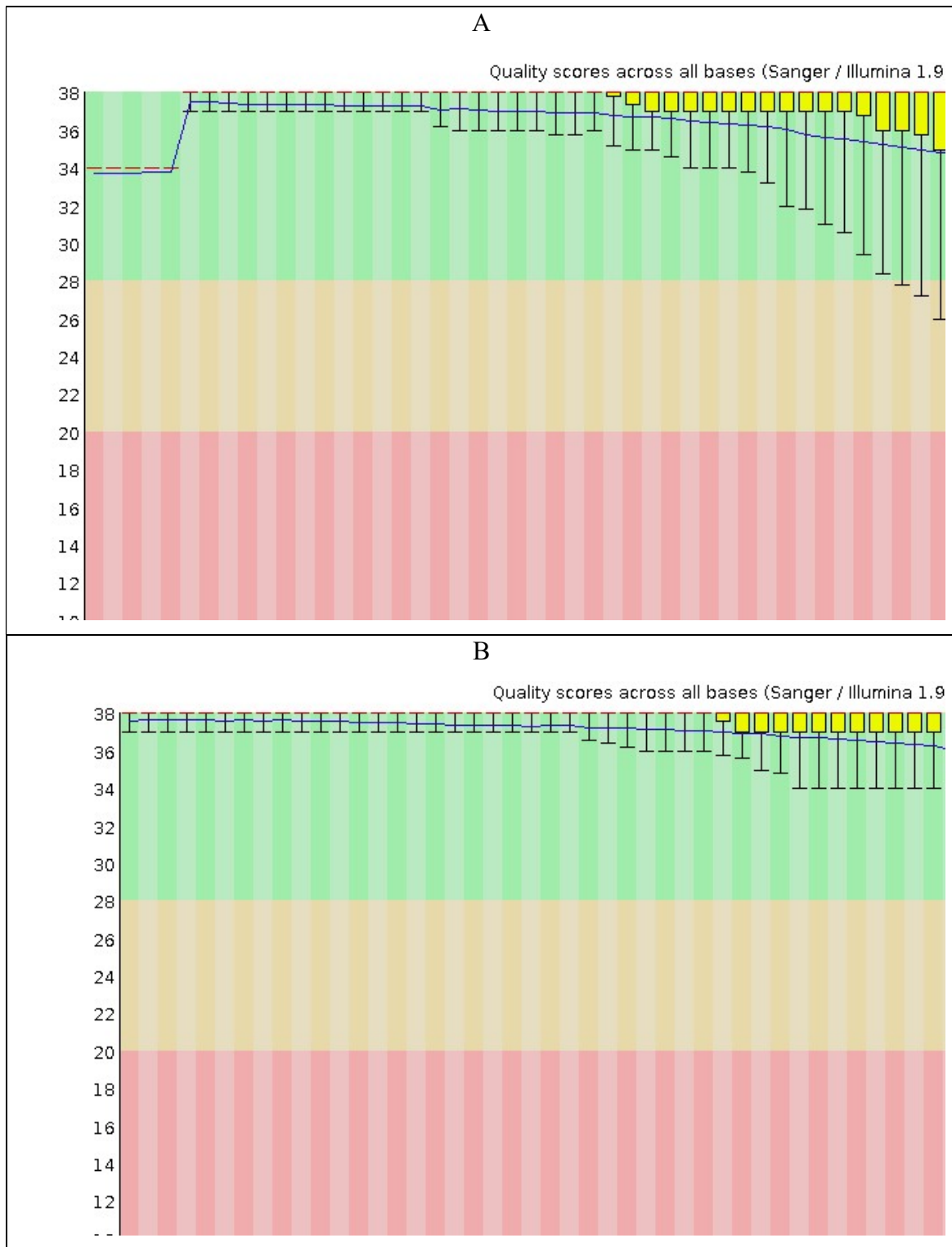


Figura 25. Análise de dados, segundo a escala de Phred – score 20, da biblioteca de ovos O1 na extremidade 5' *Meloidogyne paranaensis*. **A:** qualidade das sequências sem trimagem; **B:** qualidade das sequências após trimagem.

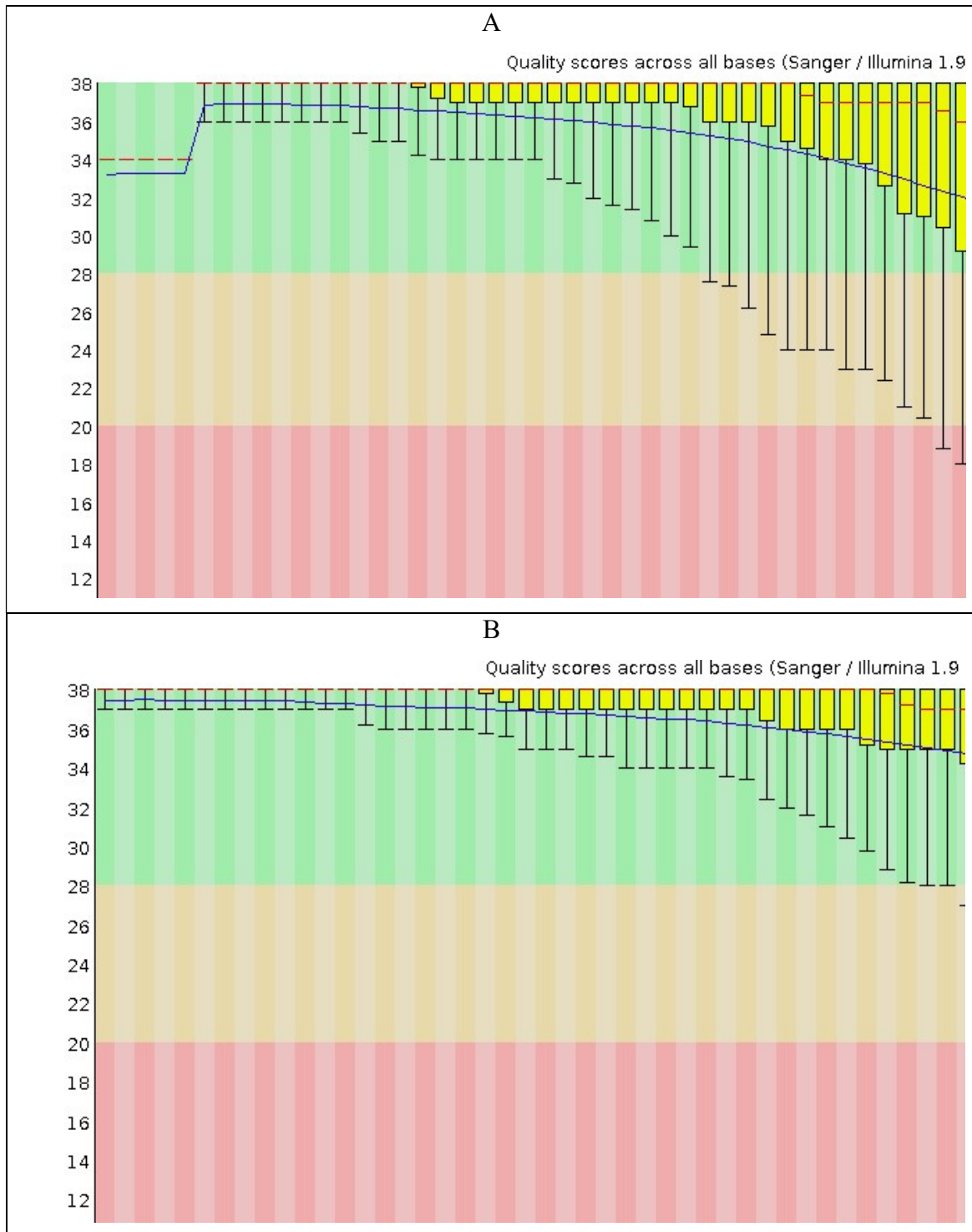


Figura 26. Análise de dados, segundo a escala Phred - *score 20*, da biblioteca de ovos O1 na extremidade 3' de *Meloidogyne paranaensis*. **A:** qualidade das sequências sem trimagem; **B:** qualidade das sequências após trimagem.

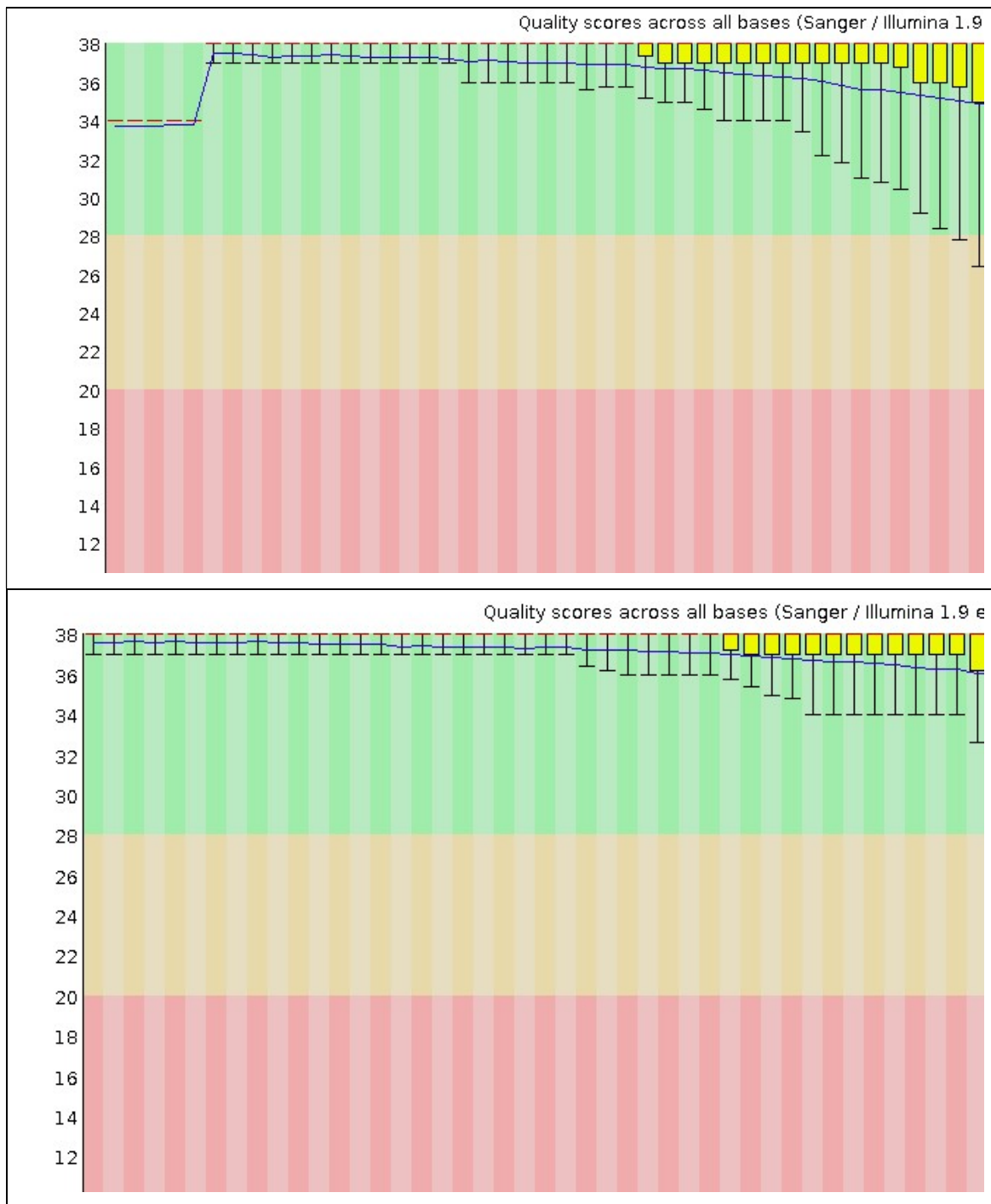


Figura 27. Análise de dados, segundo a escala Phred - score 20, da réplica biológica de ovos O2 na extremidade 3' de *Meloidogyne paranaensis*. **A:** qualidade das sequências sem trimagem; **B:** qualidade das sequências após trimagem.

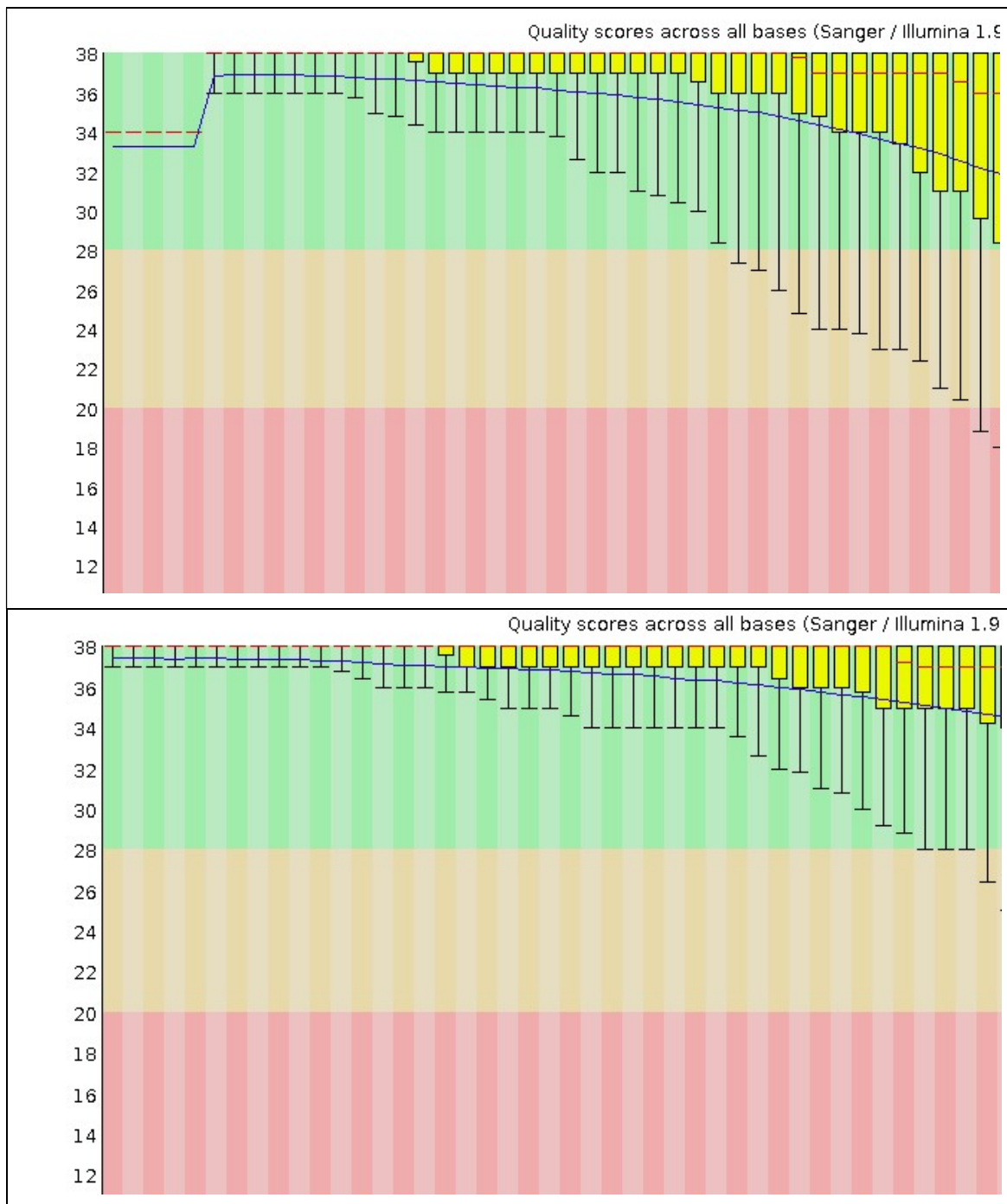


Figura 28. Análise de dados, segundo escala Phred - *score* 20, da réplica biológica de ovos O2 na extremidade 3' de *Meloidogyne paranaensis*. **A:** qualidade das sequências sem trimagem; **B:** qualidade das sequências após trimagem.

As bibliotecas construídas geraram sequências de 50 a 265 pb em ambas extremidades, 5' e 3', dos transcritos. Cada biblioteca de cada estágio do ciclo de vida de *M. paranaensis* está representada em tamanho, conteúdo de pares GC e número de

reads, de acordo com as Tabelas 12 e 13. Para analisar a expressão diferencial nas duas condições estudadas, considerou-se o FDR 0,05 e *log fold change* igual ou superior a 2,0.

Tabela 12. Número de *reads*, tamanho e conteúdo GC (%) das replicatas biológicas do estágio J₂ de *Meloidogyne paranaensis* (J2R1 e J2R2).

Replicata biológica J2R1 (pareados)	Sem trimagem	Com Trimagem
Total de Sequências	4340205	3924775
Tamanho das sequências (bases)	35-301	35-286
Conteúdo GC (%)	39	38
Réplica biológica J2R2 (pareados)	Sem trimagem	Com Trimagem
Total de Sequências	3802672	3392561
Tamanho das sequências (bases)	35-301	35-286
Conteúdo GC (%)	40	40

Tabela 13. Número de *reads*, tamanho e conteúdo GC (%) das replicatas biológicas do estágio ovo de *Meloidogyne paranaensis* (O1 e O2).

Replicata biológica O1 (pareados)	Sem trimagem	Com Trimagem
Total de Sequências	6925135	6264983
Tamanho das sequências	35-301	35-286
Conteúdo GC (%)	37	37
Replicata biológica O2 (pareados)	Sem trimagem	Com Trimagem
Total de Sequências	6342617	5739609
Tamanho das sequências	35-301	35-286
Conteúdo GC (%)	38	37

A análise da expressão diferencial foi realizada pelo Teste de Fisher e Teste Exato de Fisher, comparando-se os estádios ovo e J₂. O resultado é representado na Figura 29.

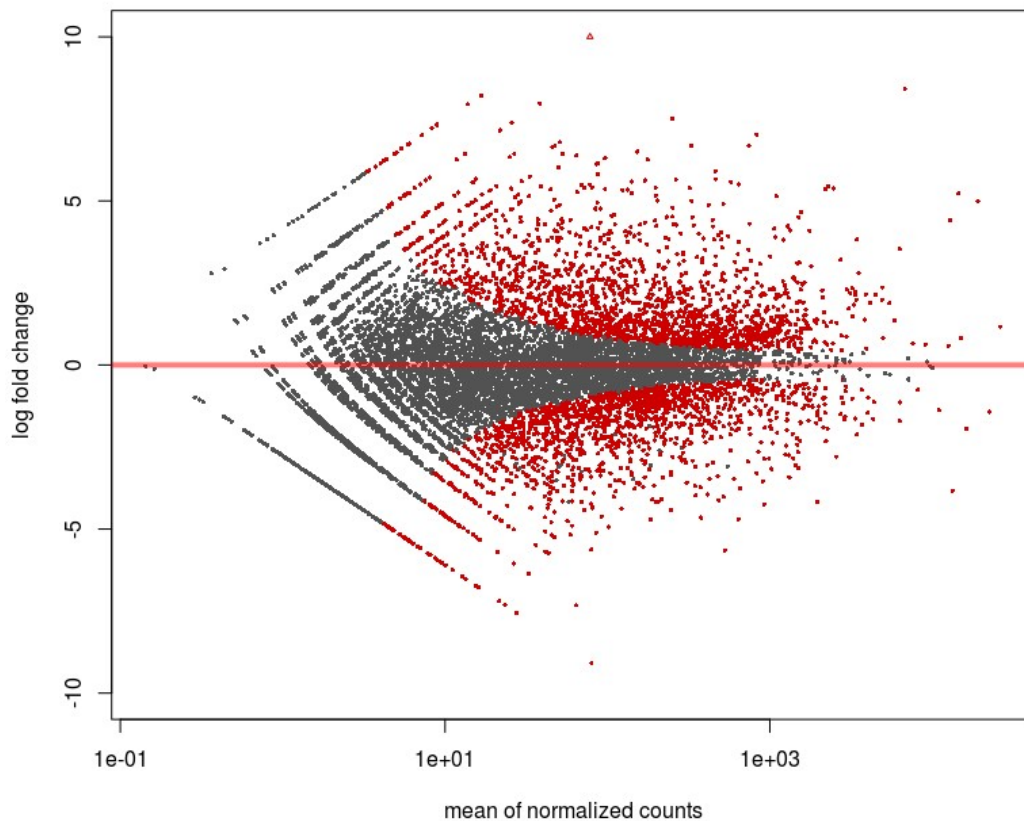


Figura 29. Transcritos diferencialmente expressos nas condições ovo e J_2 de *Meloidogyne paranaensis*. Os dados estão em escala logarítmica (base 2) considerando o *fold change* da expressão em função da média do nível de expressão das condições analisadas. Os pontos vermelhos, acima de zero, eixo y, representam transcritos superexpressos no estágio J_2 e reprimidos no estágio ovo. Ao contrário, pontos vermelhos abaixo de zero, eixo y, representam transcritos superexpressos no estágio ovo e reprimidos no estágio J_2 e os pontos em cinza os transcritos sem expressão diferencial entre os estádios de ovo e J_2 .

Dados da expressão diferencial das bibliotecas ovo e J_2 estão apresentados no *heatmap* gerado pelo programa edgeR, que apresenta o perfil da expressão gênica em forma gráfica (Figura 30). Um total de 9.193 sequências, ou seja, 6,65% do total foram diferencialmente expressas nas condições estudadas, sendo a maioria dos transcritos superexpressos na condição J_2 (Figura 30B). Das sequências superexpressas, 7.738 são da condição J_2 em relação à condição ovo, correspondendo a 84,17%, sendo que apenas 1.455 transcritos foram superexpressos na condição ovo em relação à condição J_2 , correspondendo a 15,83% (Figura 30B). Da mesma forma, as principais funções

celulares foram determinadas para cada condição (Figura 30C).

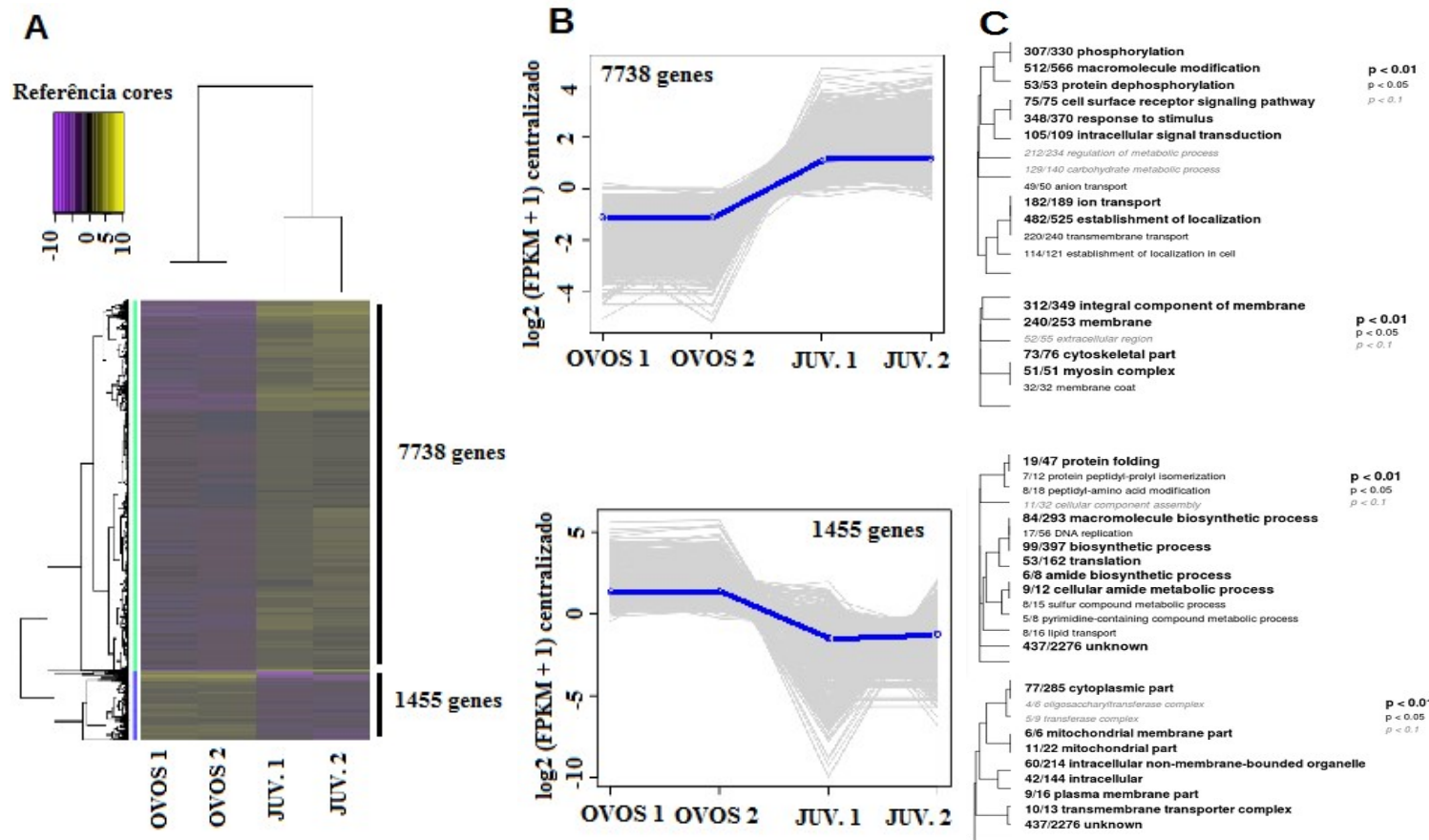


Figura 30. A. Heatmap dos padrões de expressão nas bibliotecas de ovo e J₂ de *Meloidogyne paranaensis* B. Cluster hierárquico dos genes de *M. paranaensis* diferencialmente expressos nas condições ovo e J₂. C. Análise filogenética das funções celulares dos genes diferencialmente expressos.

Pesquisa de homologia com as sequências consenso de *M. paranaensis* foi realizada com o programa BlastX com base em sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com *e-value* mínimo de 10^{-4} . Foi encontrada similaridade com sequências de nematoides de vida livre como *C. elegans*, *C. remanei* e *C. briggsae*, além de espécies parasitas do homem e de outros animais como *Brugia malayi* Brug, 1927 e *Necator americanus*, além de outros organismos (Figura 31).

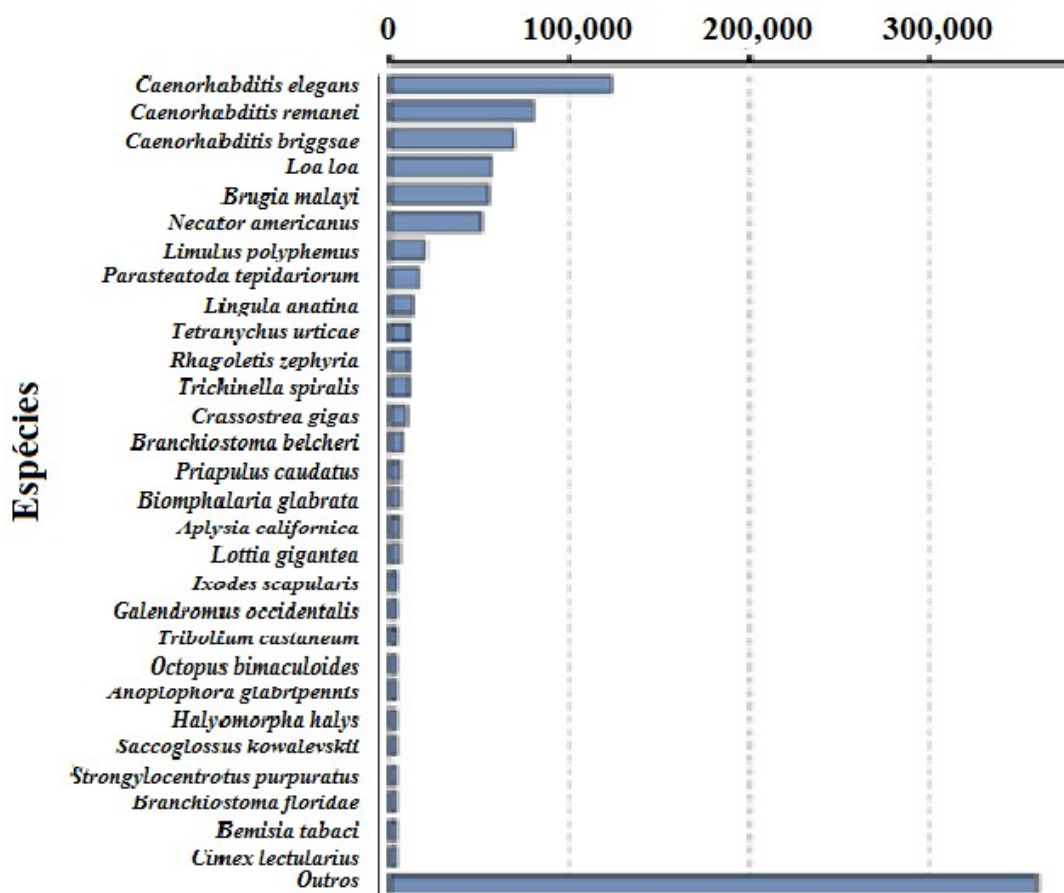


Figura 31. Distribuição de espécies com Blast Hits obtidos em pesquisa de homologia realizada com o programa BlastX, a partir das sequências de contigs e singletons do transcrito de ovos e J₂ de *Meloidogyne paranaensis*.

Tabela 14. Mapeamento de transcritos das replicatas biológicas de ovos (O1 e O2) e de juvenis J₂ (J2R1e J2R2) de *Meloidogyne paranaensis* contra genoma de *M. incognita*.

Reads	Transcritos	Map. ^a	% Map. ^b	AM ^c	% AM ^d	< 20
Replicata biológica de ovos (O1)						
Left	6264983	1816260	29%	198826	10,90%	10713
Rigth	6264983	1977514	31,60%	219946	11,10%	10720
Pares		1383546	12,40%	170917		
Replicata biológica de ovos (O2)						
Left	5739609	1688364	29,4%	187866	11,1%	11925
Rigth	5739609	1848366	32,2%	219946	11,3%	11933
Pares		1281220		161460	12,6%	32465
Replicata biológica de J₂ (J2R1)						
Left	3924775	712105	18,1 %	57922	8,1%	1907
Rigth	3924775	832155	21,2%	74391	8,9%	1907
Pares		401001		42072	5,5%	21963
Réplica biológica da de J₂ (J2R2)						
Left	3392561	648756	19,1%	61740	9,5 %	2386
Rigth	3392561	749972	22,1%	76047	10,1%	2388
Pares		401353		47974		

^aMapeados; ^bPercentagem de mapeados; ^cAlinhamentos múltiplos; ^dPercentagem de alinhamentos múltiplos

Tabela 15. Mapeamento de transcritos das replicatas biológicas de ovos (O1 e O2) e de J₂ (J2R1 e J2R2) de *Meloidogyne paranaensis* contra genoma de *C. elegans*.

Reads	Transcritos	Map. ^a	% Map. ^b	AM ^c	% AM ^d	< 20
Replicata biológica de ovos (O1)						
Left	6264983	216	0,00%	159	73,60%	2
Rigth	264983	390	0,00%	260	66,70%	2
pairs	67	65	0,00%	170917	97%	-
Replicata biológica de ovos (O2)						
Left	5739609	239	0%	181	75,70%	1
Rigth	5739609	454	0%	332	73,10%	1
pairs	—	77	0%	76	98,70%	-
Replicata biológica de J₂ (J2R1)						
Left	3924775	51	0,00%	28	54,9,6%	6
Rigth	3924775	217	0,00%	128	59,00%	5
pairs		2	0,00%	1	50%	-
Réplica biológica da de J₂ (J2R2)						
Left	3392561	77	0,00%	52	67,50%	3
Rigth	3392561	225	0,00%	140	62,2,0%	1
pairs		17	0,00%	16	94,10%	-

^aMapeados; ^bPercentagem de mapeados; ^cAlinhamentos múltiplos; ^dPercentagem de alinhamentos múltiplos

Tabela 16. Mapeamento de transcritos das replicatas biológicas de ovos (O1 e O2) e de J₂ (J2R1 e J2R2) de *Meloidogyne paranaensis* de *Meloidogyne paranaensis* contra genoma de *Meloidogyne hapla*.

Reads	Transcritos	Map. ^a	% Map. ^b	AM ^c	% Am ^d	< 20	Disc ^e
Replicata biológica de ovos (O1)							
Left	6264983	7071	0,10%	170	2,40%	0	
Rigth	6264983	13732	0,20%	332	2,40%	0	
pairs		1738	0,00%	38	2,20%	-	13
Replicata biológica de ovos (O2)							
Left	5739609	6254	0,10%	118	1,90%	0	-
Rigth	5739609	12481	0,20%	281	2,30%	0	
pairs		1450	0,20%	27	1,90%	-	22
Replicata biológica de J₂ (J2R1)							
Left	3924775	2362	0,10%	52	2,20%	0	-
Rigth	3924775	7913	0,20%	195	2,50%	0	
pairs	91	0	0,20%	8	8,80%	-	0
Réplica biológica da de J₂ (J2R2)							
Left	3392561	2011	0,10%	34	1,70%	0	-
Rigth	3392561	6475	0,20%	156	2,40%	0	
pairs	187	5	0,20%	5	2,70%	-	0

^aMapeados; ^bPercentagem de mapeados; ^cAlinhamentos múltiplos; ^dPercentagem de alinhamentos múltiplos; ^eDiscrepantes.

2.3 Anotação de transcritos

As sequências consenso (contigs e os singletons) foram analisadas pelo programa *Gene Ontology* (GO), tendo sido detectadas três categorias: componentes celulares (Figura 32), função molecular (Figura 33) e processos biológicos (Figura 34). Do total de transcritos analisados, 75.577 correspondem a componentes celulares. Destes, 46% estão relacionados a algum componente intracelular e 54% por transcritos relacionados a organelas (Figura 32).

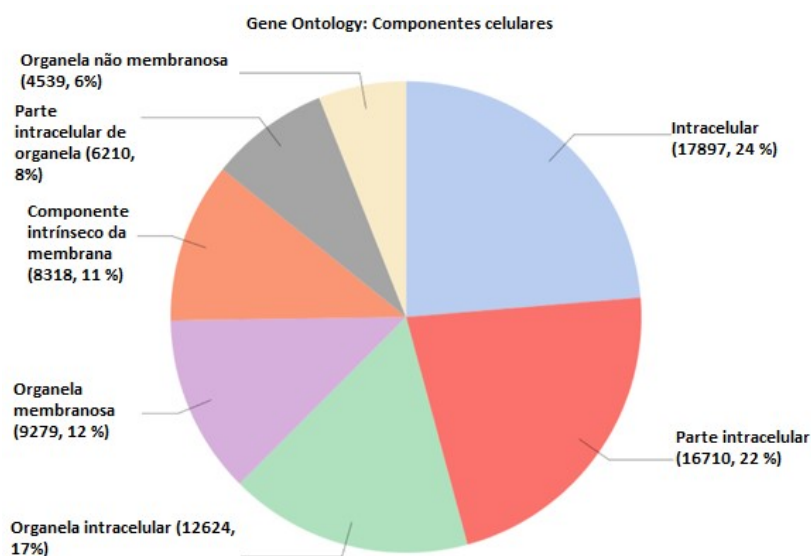


Figura 32. Classificação de transcritos de ovos e J₂ de *Meloidogyne paranaensis* segundo o programa *Gene Ontology* e suas respectivas percentagens dentro da categoria componente celular.

Para a categoria função molecular, a maior parte dos transcritos (15.933 ou 16%) está relacionada a compostos cíclicos orgânicos, seguido de compostos de ligação heterocíclicos (15.854 ou 16%) e compostos associados a íons com 12.926 ou 13% do total (Figura 33).

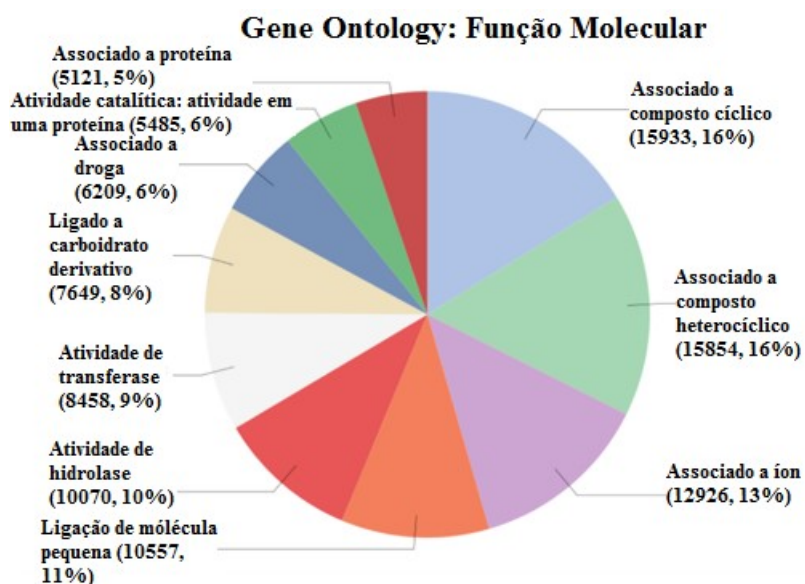


Figura 33. Classificação de transcritos de ovos e J₂ de *Meloidogyne paranaensis* segundo o programa Gene Ontology e suas respectivas percentagens dentro da categoria função molecular.

Para a categoria processos biológicos, 15% dos transcritos foram relacionados a processos metabólicos de substâncias orgânicas, seguidos por transcritos relacionados a processos metabólicos celulares (14%) e do metabolismo primário (14%), por transcritos com atuação no metabolismo de compostos nitrogenados (12%), entre outros (Figura 34).

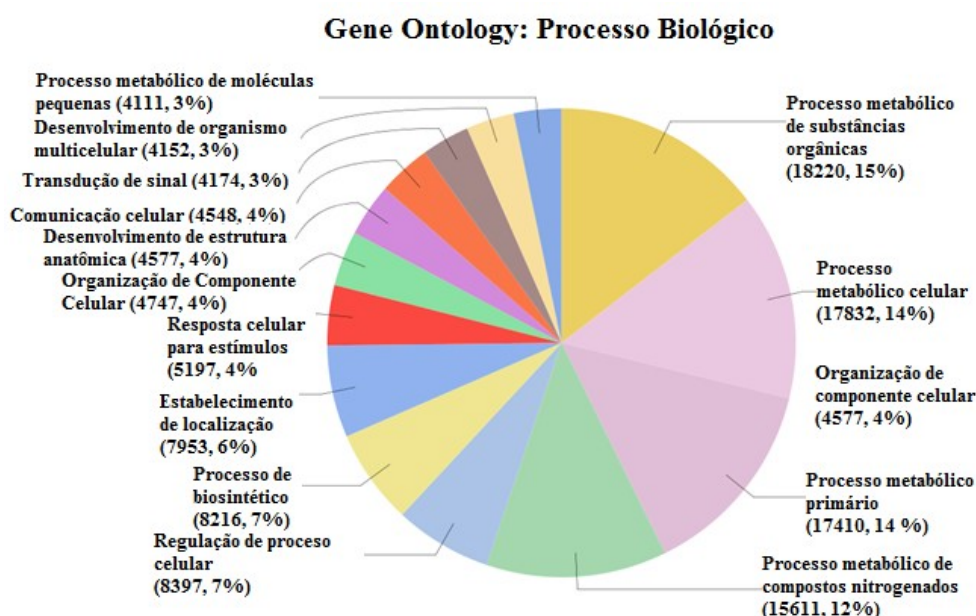


Figura 34. Classificação de transcritos de ovos e J₂ de *Meloidogyne paranaensis* segundo o programa Gene Ontology e suas respectivas percentagens dentro da ontologia processos biológicos.

Considerando as sequências consenso, 9.008 ou 6,5% apresentaram peptídeo sinal, enquanto que em 8.376 foram identificados domínios. Como exemplo cita-se o domínio transmembrana (TM), presente em 6,05% das sequências analisadas, equivalendo a 632 transcritos.

Foram detectadas 10 rotas metabólicas principais no estágio J₂ e 9 no estágio

ovo. Destas, cinco são comuns aos dois estádios: fosforilação oxidativa, glicólise, metabolismo de purinas, metabolismo de pirimidinas e metabolismo de glicerofosfolipídeos. Dessas rotas, a glicólise é mais ativa em J₂ (9%) que em ovos (5%) e fosforilação oxidativa é mais ativa em ovos (19%) que em J₂ (11%); metabolismo de purinas 22% em J₂ e 21% em ovos, metabolismo de pirimidinas 14% em J₂ e 18% em ovos e metabolismo de fosfolipídeos com 10% em J₂ e 5% em ovos (Figuras 35 e 36).

Rotas metabólicas de transcritos superexpressos e exclusivos para o estágio J₂ são metabolismo de carboidratos, glioxilato, piruvato, cisteína e metionina e inositol fosfato. Rotas metabólicas de transcritos superexpressos e exclusivos para ovos são degradação de ácidos graxos, metabolismo de glutatona, degradação de lisina e metabolismo de nucleotídeos (Figuras 37 e 38).

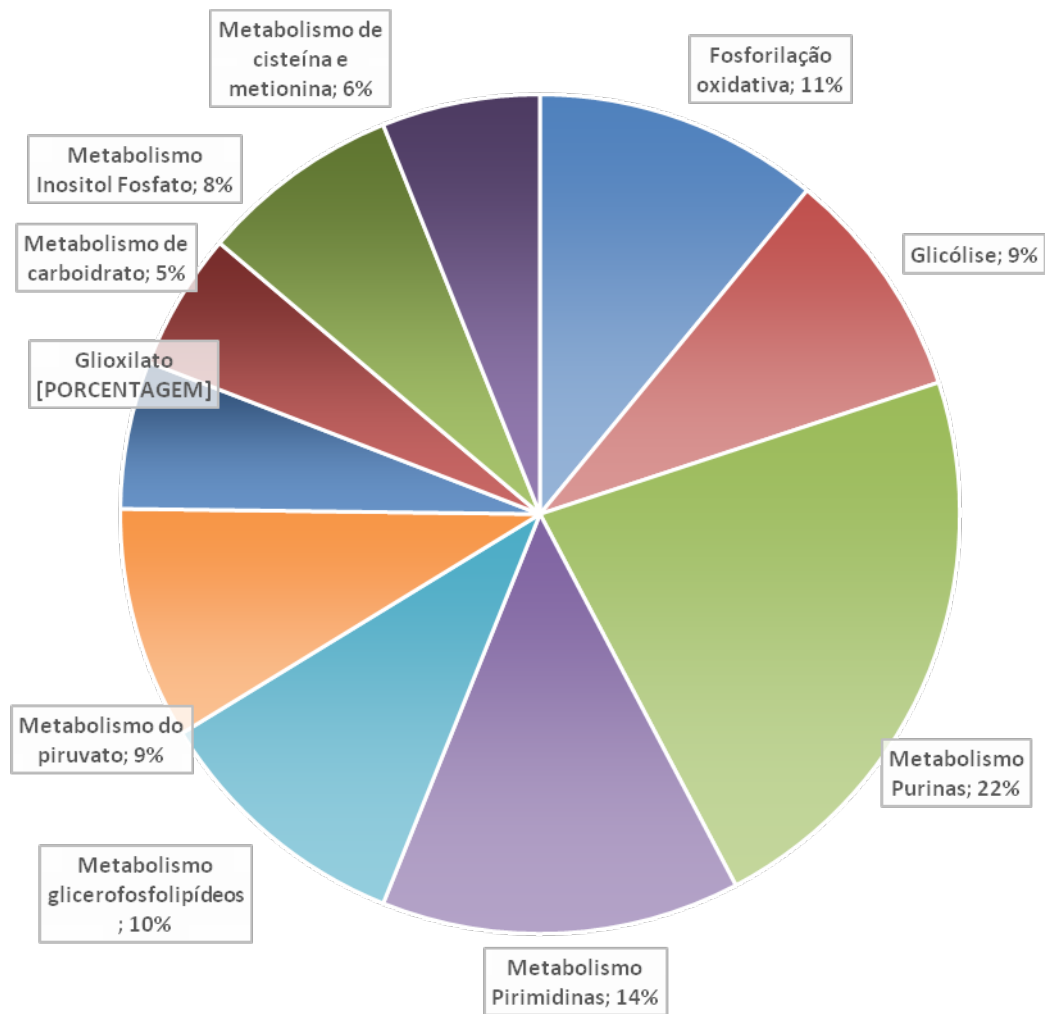


Figura 35. Rotas metabólicas de transcritos diferencialmente expressos em J₂ de *Meloidogyne paranaensis*. *Fold change* mínimo de 2,0 e máximo de 5,0.

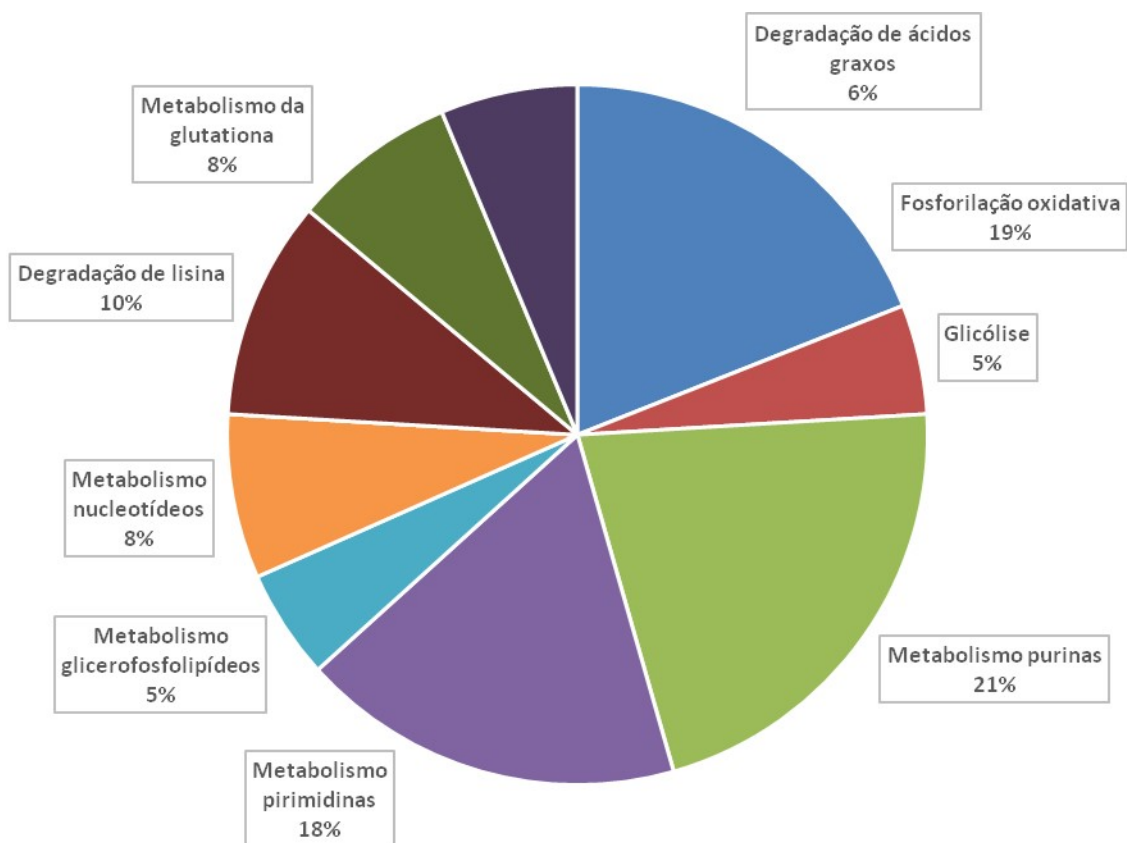


Figura 36. Rotas metabólicas de transcritos diferencialmente expressos em ovos de *Meloidogyne paranaensis*. *Fold change* mínimo de 2,0 e máximo de 5,0.

Diferentes classes de proteases, totalizando 1.036 transcritos, foram detectadas em ovos e J₂ de *M. paranaensis* e separadas de acordo com a classe catalítica como proteases aspárticas (215), cisteínicas (813), serínicas (3) e metalo (5) (Figura 37). Das 1.036 proteases sequenciadas no transcrito de *M. paranaensis*, 95 estavam superexpressas no estágio J₂ quando comparado ao estágio Ovo (Figura 38). Das proteases superexpressas, 82 eram cisteínicas, 8 aspárticas, 4 metalo e 1 serínica, com *fold change* mínimo de 2 e máximo de 5. Não foram encontradas proteases da classe treonínica.

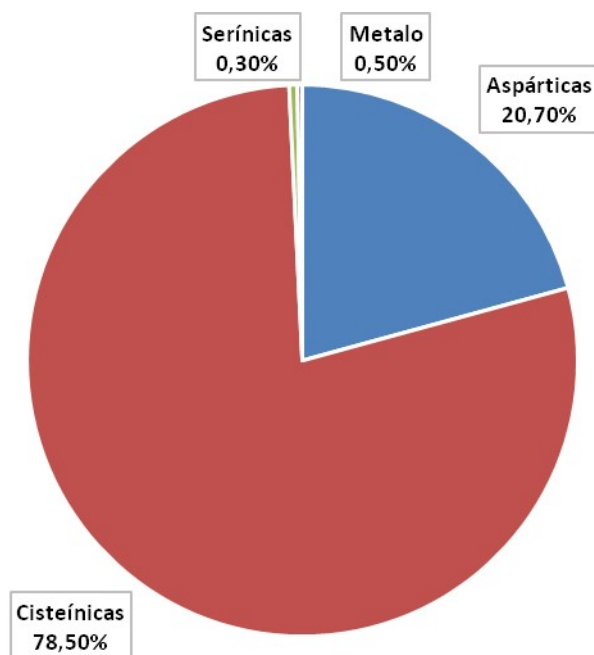


Figura 37. Classes de proteases detectadas no transcrito de *Meloidogyne paranaensis* e sua abundância.

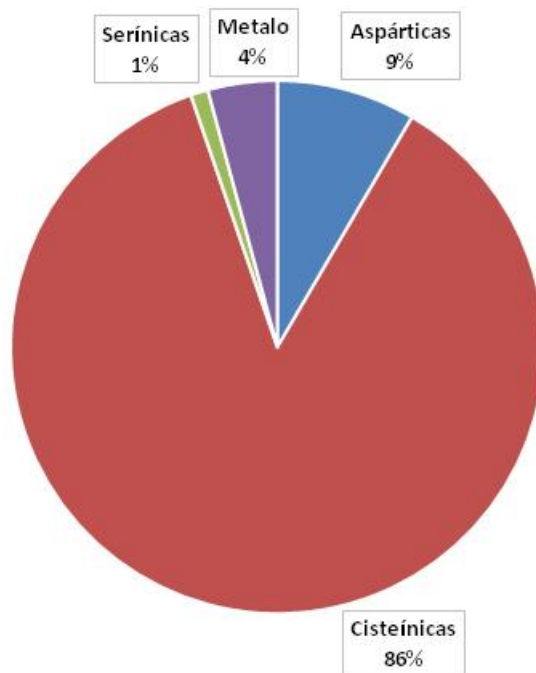


Figura 38. Proteases superexpressas no estágio J₂ de *Meloidogyne paranaensis* em comparação ao estágio ovo.

Com relação às enzimas ativas em carboidratos (CAZymes), foram detectadas quatro glicosídeo-hidrolases, sendo um transcrito relacionado à família GH45 e dois outros relacionados à família GH18, sendo ambas superexpressas em J₂ (fold change

superior a 2,0). Foram encontrados também dois transcritos identificados como CBM14 (carbohydrate-binding module - família 14). Esta família de enzimas pertence à classe funcional com módulo de ligação a carboidratos (CBM), sendo a família 14 específica para o carboidrato quitina. Ambos transcritos foram superexpressos em J₂ (fold change superior a 2,0). Três Glicoídeo-Transferases - família 1 (GT1) e onze Glicosídeo-Transferases – família 31 completam a lista das enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos. Dessas, uma GT1 e uma GT31 estavam superexpressas em J₂ (fold change superior a 2,0).

3 DISCUSSÃO

O número de enzimas encontradas a partir das rotas metabólicas superexpressas em J₂ e ovo demonstra que a partir do estágio de ovo há a ativação de rotas metabólicas de glicólise (Degradação de ácidos graxos e glicólise) o que provavelmente está associado à necessidade de geração de energia, ainda no ovo, para rompimento da casca do mesmo. O número de enzimas envolvidas na geração de energia é maior em J₂ que em ovo, devido provavelmente à necessidade de movimentação e infecção do estágio J₂.

Comparando-se ovos e J₂ observa-se um incremento de enzimas associadas à degradação da lisina, da fase ovo ao estágio J₂. Isso ocorre provavelmente devido a uma maior demanda energética do estágio J₂, sendo as rotas associadas à geração de ATP ativadas nesse estágio.

Foram identificadas quatro classes catalíticas de proteases em *M. paranaensis*, não tendo sido identificadas proteases treonínicas. Genomas de nematoides onde pequenas percentagens de proteases treonínicas foram detectadas são o de *M. incognita* (4%), *M. hapla* (3%) e de *C. elegans* (3%). As outras quatro classes catalíticas como proteases aspárticas, cisteínicas, metalo e serínicas, presentes em *M. paranaensis*, também foram relatadas nos genomas dos nematoides citados acima (Castagnone-Sereno *et al.* (2011).

Proteases, conhecidas também como hidrolases, são enzimas que têm como função a clivagem de peptídeos, liberando fragmentos de proteínas e contribuindo para a funcionalidade ou inativação das mesmas (Beynon e Bond, 1994). Em nematoides fitoparasitas, as proteases intestinais desempenham função de auxílio na digestão do alimento ingerido. Por outro lado, as proteases secretadas pelo nematoide no interior dos tecidos vegetais (apoplasto), auxilia na absorção do alimento pelos nematoides e na

ativação ou regulação da expressão gênica das plantas, atuando como moléculas efetoras do parasitismo (Vieira *et al.*, 2011). As proteases também podem estar envolvidas na reprodução e embriogênese de nematoides fitoparasitas (Hashmi *et al.*, 2002). Por isso, proteases de diferentes classes e seus inibidores têm sido alvo de estudos por diferentes autores.

Lilley *et al.* (1997) e Urwin *et al.*, (1997), caracterizaram três genes de proteinases serínicas (hgsp-I, hgsp-II e hgsp-III) de *H. glycines*, nematoide de cisto da soja, e dois genes (hgcp-I e hgcp-II) de proteinases cisteínicas, respectivamente. Fragoso *et al.* (2005) clonaram e caracterizaram uma proteinase serina e posteriormente uma Cathepsina D proteinase aspártica (Fragoso *et al.*, 2009), ambas isoladas do nematoide *M. incognita*. Neveu *et al.* (2003) clonaram e caracterizaram uma Cathepsina L de *M. incognita*. Os trabalhos envolvendo a clonagem e caracterização de genes, objetiva o controle do nematoide através da posterior expressão “*in planta*” de inibidores dessas proteases ou de RNAs interferentes.

A transgenia de plantas com inibidores de protease foi primeiramente testada por Urwin *et al.*, (1997) e Urwin *et al.* (1998). Em ambos os estudos, os autores confirmaram redução da fecundidade e do tamanho de fêmeas de *Heterodera schatii* A.Schmidt, (1871) e *M. incognita* em *Arabidopsis thaliana*, tendo utilizado o gene modificado Oc-IAD86 que codifica para a formação de uma cistatina, inibidor de proteinase cisteína, um inibidor de proteinase serina, CpTI (“cowpea trypsin inhibitor”).

Souza Júnior *et al.* (2013) testaram linhagens de fumo expressando dsRNA, individual e em conjunto, de uma protease aspártica (*Mi-asp-1*), uma serina (*Mi-ser-1*) e uma cisteína (*Mi-cpl-1*) do nematoide *M. incognita*. Os resultados indicam que não houve interferência na indução de galhas pelo nematoide, mas afetaram a formação de fêmeas jovens e maduras, o número de ovos formados (redução de 30%), sua

viabilidade e virulência dos J₂ oriundos dos ovos. A redução na virulência dos J₂ pode estar relacionada à redução de proteínas nos ovos durante a embriogênese, especialmente pela ação da cisteína codificada pelo gene *Mi-cpl-1*.

Como as quatro classes catalíticas de proteases (aspártica, serínicas, cisteínicas e metalo) foram encontradas no transcrito de *M. paranaensis*, com genes diferencialmente expressos especialmente em J₂, vislumbra-se para estudos futuros a caracterização e clonagem desses genes visando a transformação genética de plantas para o controle desse nematoide.

Dentre os transcritos putativos que codificam para enzimas ativadas por carboidratos, o maior número de transcritos encontrado em *M. paranaensis* foi relacionado à proteína Glicosil-transferase - Família 31. Esse grupo de proteínas foi relatado em *Caenorhabditis elegans*, particularmente a *Beta-1,3-galactosiltransferase* (associada ao gene *Sqv-2*) e *acrBeta-1,3-galactosiltransferase* que transfere galactose de UDP-galactose para substratos com um resíduo terminal de *beta-linked* galactose. O gene *sqv-2*, juntamente com o *sqv-6*, são necessários para a morfogênese vulvar e citocinese zigótica (Huang *et al.*, 2003). Segundo os mesmos autores, mutações acentuadas nos genes *sqv* (*squashed vulva*) resultam em letalidade do efeito materno, levando ao colapso das progênes, estando envolvidos nesse processo glicosídeo-aminoglicanos.

Transcritos identificados como CBM14 (*Carboidrato-Binding Module* Família 14) e GH18 (*Glicosídeo Hidrolase*- Família 18) codificam para a formação de quitinases. Quitinases têm como função geral a biodegradação de moléculas de quitina, através da catálise de ligações β -1,4 e liberação de resíduos de N-acetil-D-glucosamina. Quitina é um dos açúcares mais abundantes na natureza, estando presente no exoesqueleto de insetos, parede celular de fungos, nos vegetais, nos nematoides, etc.

Segundo Bird e Bird (1991), quitina já foi relatada como componente da casca do ovo de nematoides.

As CBMs são moléculas não catalíticas presentes como componentes modulares de enzimas ativadas por carboidratos (CAZy), promovendo a interação da enzima com o substrato (carboidrato) e aumentando a eficiência de reações catalíticas (Guillén *et al.*, 2010).

A Família 14 das CBMs apresenta sequências curtas de 70 resíduos de aminoácidos, presentes em diferentes organismos como eucariotos, procariotos e vírus. A Família 14 atua como módulo ligante a domínios catalíticos com atividade quitinolítica. Quitinases são enzimas que clivam ligações glicosídicas de moléculas de quitina (glicosídeo linear), prejudicando a sua funcionalidade. Outros membros da CBM14 atuam apenas como moléculas ligantes, como as lecitinas (Suetake *et al.*, 2000).

Há relatos na literatura da presença de quitina na casca do ovo de nematoides fitoparasitas como *M. Javanica* (McClure e Bird, 1976), *G. rostochiensis* (Clarke *et al.*, 1967), *Meloidogyne artiella* Franklin, 1961 (Veronico *et al.*, 2001) e uma variedade de espécies parasitas de animais como *Onchocerca* spp. (Brydon *et al.*, 1987), *Ascaris suum* (Dubinsky *et al.*, 1986) e *Haemonchus contortus* (Mansfield *et al.*, 1992). A utilização da técnica de RNA interferente por Fanelli *et al.* (2004) comprovou que a interrupção na expressão do gene quitina sintetase em *M. artiella* e *C. elegans* afetou o desenvolvimento de ovos em ambas espécies.

Por outro lado, Veronico *et al.* (2011) demonstraram que dois genes, quitina sintetases (UDP-quitina acetil glicosaminil transferases) tiveram participação na síntese do aparato alimentar em tecidos da faringe de *C. elegans*. Os autores revelaram que esses genes são fortemente expressos em períodos que precedem a troca de cutícula

nesse nematoide. Estudos anteriores já haviam demonstrado a presença de quitina no aparato alimentar do nematoide *Oesophagostomum dentatum* Rudolphi 1803, parasita do homem e de outros animais (suínos e ovinos) (Neuhaus *et al.*, 1997), na cutícula de *A. suum* (Hill *et al.*, 1991). Em *Acanthocheilonema viteae* Railliet 1915, nematoide que causa filariose em roedores, foi inferido que as quitinases expressas em tecido infectado pelo nematoide, podem desempenhar papel na ecdise (Wu *et al.*, 1996).

Glicosil hidrolases são enzimas presentes em eucariotos, protistas e vírus, as quais realizam a hidrólise de ligações glicosídicas entre carboidratos ou entre carboidratos e outras moléculas. As glicosil hidrolases estão separadas em mais de 100 famílias. A Família GH18 contempla quitinases e acetilglicosaminidases (Furhman *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 2001).

Fuhrman *et al.* (1992) relataram quitinases das famílias GH18 e CBM14 em *Brugia malayi* Brug, 1927, nematoide causador de filariose em humanos, como forma de degradação de moléculas de quitina na microfilária ou no mosquito vetor durante o desenvolvimento ou transmissão do parasita.

Wu *et al.* (2001) ao avaliar o gene associado a uma quitinase da família GH18, observou que a expressão se inicia nos J₂ e aumenta de forma acentuada no estágio infectante J₃ de *O. volvulus* Bickel, 1982. Os autores acrescentaram que a síntese dessa quitinase ocorre exclusivamente na glândula esofágica, sendo a mesma armazenada em grânulos discretos de secreção e a secreção ocorre através da desgranulação durante o processo pós-infeccioso. Um ortólogo do gene (Ov-chi-1) foi encontrado em *C. elegans* e, sendo correspondente a uma enzima altamente específica da fase infectante, pressupõe-se ser importante no processo pós-infectante do parasita.

Opperman *et al.* (2008) ao mapearem os genes de *M. hapla* também encontraram sequências com similaridade à proteína GH18.

Como os transcritos identificados em *M. paranaensis* correspondem às famílias GH18 e CBM14 de quitinases, é provável que os mesmos tenham função na ecdise do nematoide ou na formação do aparato alimentar do esôfago. No entanto, não está descartada a atuação na formação da casca dos ovos de *M. paranaensis*.

O transcriptoma de *M. paranaensis* revelou a presença de um transcrito com homologia para genes que codificam para a formação de enzimas glicosídeo-hidrolases - Família 45 (GH45). A Família 45 de enzimas glicosídeo-hidrolases pertencem a β -1,4-endoglucanases, também conhecidas como celulases, as quais promovem a hidrólise de celulose.

Diferentes genes codificadores de β -1,4-endoglucanases, pertencentes à classe das glicosídeo-hidrolases Família 5 (GHF5), foram relatados na literatura como secretados por diferentes fitonematoides como *G. rostochiensis* e *H. glycines* (Smant *et al.*, 1998), *M. incognita* (Rosso *et al.*, 1999), *P. penetrans* (Uehara *et al.*, 2001), *P. coffeae* e *D. africanus* (Kyndt *et al.*, 2008), *R. similis* (Haegeman *et al.*, 2008), *H. avenae* (Long *et al.*, 2012).

Segundo Mayer *et al.* (2011), as celulases de fitonematoides da Família GHF5 apresentam elevada similaridade com celulases bacterianas, havendo forte evidência de aquisição pelos nematoides por transferência horizontal. Os genes codificadores de β -1,4-endoglucanases, Família GHF5, são secretados em glândulas esofágicas de nematoides endoparasitas sedentários e também em glândulas esofágicas de nematoides endoparasitas migratórios (Kikuchi *et al.*, 2004).

Diferentemente das β -1,4-endoglucanases da Família GHF5, as β -1,4-endoglucanases da Família GHF45 foram relatadas em fungos, bactérias, protistas e em um pequeno número de animais. Kikuchi *et al.* (2004) relataram uma β -1,4-endoglucanase da Família GHF45 em células da glândula esofágica do fitonematoide *B.*

xylophilus, parasita do pinheiro. Um outro gene β -1,4-endoglucanase da Família GHF45 foi relatado por Kikuchi *et al.* (2014) em *A. besseyi*, nematoide parasita do arroz.

Os genes GHF45, relatados em nematoides parasitas da parte aérea como *B. xylophilus* e *A. besseyi* têm forte homologia com genes de fungos e não de bactérias como acontece com os genes GHF5. Em se tratando de nematoides que se alimentam alternativamente de fungos, os autores acima sugerem aquisição por transferência horizontal.

Celulases da Família GHF45 são ausentes nos nematoides endoparasitas sedentários e migratórios, nos quais prevalecem celulases da Família GHF5. No caso de *M. paranaensis*, foi detectado um transcrito codificador para uma β -1,4-endoglucanase da Família GHF45 e superexpresso em J₂.

Celulases são produzidas por fitonematoides para diferentes fins como auxílio à penetração, migração nos tecidos vegetais, auxílio na formação de células nutridoras e alimentação.

A produção de um gene β -1,4-endoglucanase da Família GHF45 por *M. paranaensis*, comum a nematoides parasitas da parte aérea, é diferente do esperado, já que o comum seria a presença de uma celulase da Família GHF5, relatada em diferentes nematoides endoparasitas sedentários. No entanto, *M. paranaensis* produz sintomas atípicos quando comparado com outras meloidoginoses. Em cafeeiro, por exemplo, há a produção de rachaduras nas raízes e necroses, mas não galhas. *B. xylophilus* e *A. besseyi* também produzem necroses em suas hospedeiras, sem a formação de galhas. No entanto, trabalhos de validação do transcrito de *M. paranaensis* devem ser realizados no sentido de se comprovar a expressão diferencial de genes de interesse, como o GHF45, e também a sua identidade com o nematoide *M. paranaensis*.

Quanto aos transportadores mais frequentes, a Família de Proteínas de Choque Térmico-70 formadora de cátions(Hsp70) inclui chaperonas moleculares que são encontradas, frequentemente, em associação com membranas. Um membro da Família, Hsc70, foi incorporado em bicamadas lipídicas artificiais e demonstrou-se mediar o fluxo de íons transmembrana estável. O fluxo seletivo de cátions ocorreu em eventos discretos, multinível e bem definidos, sendo sugerida formação de canal iônico de múltiplas condutâncias e a atividade do mesmo dependente de ATP (Arispe e DeMaio, 2000).

Essa proteína funciona na translocação transmembranar de polipeptídeos e não está claro se a formação do canal é fisiologicamente importante nas células. Na superfície da célula Hsp70 se liga a uma protease denominada granzima B e absorve a proteína. Essa captação resulta em apoptose em células tumorais e pode estar associada a canais específicos de cátions, podendo também promover a lise celular (Gross *et al.*, 2003).

Outro transportador que se destacou foi da Família *Ligand-gated Ion Channel* (LIC) que se constituem em receptores de neurotransmissores ionotrópicos com assinatura do ciclo de cisteína no domínio amino-terminal. Pode ser encontrado em vertebrados, invertebrados e procariontes (Sine e Engel, 2006; Bocquet *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2010). Em vertebrados são receptores altamente específicos a acetilcolina, serotonina, glicina, glutamato e ácido γ -aminobutírico (Witzemann *et al.*, 1990; Khiroug *et al.*, 2002).

Em estudo com *C. elegans*, Culetto *et al.* (2004) constataram que pelo menos quatro subunidades, dois tipos alfa (UNC-38 e UNC-63) e dois não-alfa (UNC-29 e LEV-1), podem contribuir para sensibilidade muscular de levamisol *anicotinic acetylcholine receptor* (nAChR) em nematoides (Culetto *et al.*, 2004).

Assim, nesse estudo foi possível caracterizar o transcrito de *M. paranaensis*, ainda não caracterizado até o momento bem como evidenciar expressão diferencial de genes nos estádios de ovo e J₂ e principais grupos de proteases associados ao respectivo transcrito. Dessa forma, constitui-se em grande contribuição para outros trabalhos futuros com o referido nematoide.

4 CONCLUSÕES

A maioria dos genes superexpressos ocorreu no estágio J₂. As rotas metabólicas mais importantes foram a glicólise e o metabolismo de carboidratos, o que pode estar associado à alta demanda energética do nematoide no estágio infectante. Maior homologia dos transcritos de *M. paranaenses* foi encontrada quando comparado com sequências do genoma de *M. incognita* (30%).

Com relação às enzimas ligadas a carboidratos destacam-se CBM14 e GH18 da família das quitinases, β -1,4-endoglucanases (celulases) da família GHF45, GT1 e GT31 com possível papel na morfogênese vulvar.

Foram identificadas proteases pertencentes a diferentes classes como aspárticas, serínicas, metalo e cisteínicas. As proteases cisteínicas foram as mais abundantes, seguidas das aspárticas, metalo e serínicas.

Transcritos de interesse deverão ser validados comprovando a sua expressão espacial e temporal no nematoide e a superexpressão em J₂ ou ovos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) The basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology** 215 (3):403-410.
- Arispe N, DeMaio A (2000) ATP and ADP modulate a cation channel formed by Hsc70 in acidic phospholipid membranes. **Journal of Biological Chemistry** 275: 30839-30843.
- Baermann G. (1917). Eine einfache Methode Zur Auffindung von Ankvlostomum (nematoden) Larven in Erdproben. **Tijdschr. Ned.-Indie** 57:131-137.
- Bocquet N, Carvalho LP, Cartaud J, Neyton J, Poupon CL, Taly A, Grutter T, Changeux JP, Corringer PJ (2007) A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic acetylcholine receptor family. **Nature** 445: 116-119.
- Bonetti JIS, Ferraz Sonetti JIS, FERRAZ S (1981) Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira** 6:553.
- Brown CT, Howe A, Zhang Q, Pyrkosz AB, Brom TH (2012) A Reference- free algorithm for computational normalization of shotgun sequencing data. arXiv: 1203.4802 [q-bio.GN].
- Campos VP, Vllain L (2005) Nematodes parasites of coffee and cocoa. In: Luc M, Sikora RA e Bridge J (eds). *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. **CAB Internacional**, Wallingford- UK, p. 529-579.
- Carneiro RMDG, Carneiro RG, Abrantes IMO, Santos MSNA, Almeida MRA (1996) *Meloidogyne paranaensis* n.sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. **Journal of Nematology** 28:177-189.

Castagnone-Sereno P, Deleury E, Danchin EG, Perfus-Barbeoch L, Abad P (2011) Data-mining of the *Meloidogyne incognita* degradome and comparative analysis of proteases in nematodes. **Genomics** 97: 29-36.

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

Conesa A, Götz S, Garcia-Gómez JM, Terol J (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics Applications Note** 21(18): 3674-3676.

Coolen WA, D'Herde CJ. (1972) **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue.** Ghent, State Nematology and Entomology Research Station, 77p.

Culetto E, Baylis HA, Richmond JE, Jones AK, Fleming JT, Squire MD, Lewis JA, Sattelle DB (2004) The *Caenorhabditis elegans* unc-63 gene encodes a levamisole-sensitive nicotinic acetylcholine receptor α subunit. **The Journal of Biological Chemistry** 279(41):42476-42483.

Fleming JT, Squire MD, Barnes TM, Tornoe C, Matsuda K, Ahnn J, Fire A, Sulston JE, Barnard EA, Sattelle DB, Lewis JA (1997) *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes *lev-1*, *unc-29*, and *unc-38* encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. **The Journal of Neuroscience** 17(15):5843-5857.

Fosu-Nyarko J, Tan JACH, Gill R, Agrez VG, RAO U, Jones GK (2016a) *De novo* analysis of the transcriptome of *Pratylenchus zae* to identify transcripts for proteins required for structural integrity sensation, locomotion and parasitism. **Molecular Plant Pathology** 17 (4):532-552.

Fosu-Nyarko J, Paul N, Fareeha N, Reetinder G, Michael GK (2016b) Jones Analysis of the transcriptome of the infective stage of the beet cyst nematode, *H. schachtii*. **Plos One** 11 (1): e0147511.

Fragoso RR, Batista JA, Neto OB, Grossi de Sá MF (2005) Isolation and characterization of a cDNA encoding a serine proteinase from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Experimental Parasitology** 110: 123-133.

Fragoso RR, Lourenço IT, Batista JA, Oliveira-Neto OB, Silva MC et al. (2009) *Meloidogyne incognita*: molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a cathepsin D-like aspartic proteinase. **Experimental Parasitology** 121: 115-123.

Guillén D, Sánchez S & Rodríguez-Sanoja R (2010) Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. **Applied Microbiology and Biotechnology** 85, 1241–1249.

Grabherr MG, Hass BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A (2013) Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. **Nat. Biotechnol** 29(7):644-652.

Haegeman A, Joseph S, Gheysen G. (2011) Analysis of the transcriptome of the root lesion nematode *Pratylenchus coffeae* generated by 454 sequencing technology. **Molecular Biochem. Parasitol.** 178: 7-14.

Hwang HY, Olson SK, Brown JR, Esko JD, Horvitz HR (2003) The *Caenorhabditis elegans* genes *sqv-2* and *sqv-6*, which are required for vulval morphogenesis, encode glycosaminoglycan galactosyltransferase ii and xylosyltransferase. **The Journal of Biological Chemistry** 278(14):11735-11738.

Kikuchi *et al.* (2004) A family of glycosyl hydrolase family 45 cellulases from the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. **FEBS Letters** 572: 201-205.

Kikuchi T, Cock PJA, Jones HJT (2014) Characterisation of the transcriptome of *Aphelenchoides besseyi* and identification of a GHF 45 cellulase. **Nematology** 16(1):99-107.

Khiroug SS, Harkness PC, Lamb PW, Sudeweeks SN, Khiroug L, Millar NS, Yakel JL (2002) Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. **J. Physiol.** 540: 425-434.

Kumar M, Gantasala NP, Roychowdhury T, Thakur PK, Banakar P, Shukla RN, Jones MG, Rao U (2014) De novo transcriptome sequencing and analysis of the cereal cyst nematode *Heterodera avenae*. **Plos One** (9):e96311.

Lilley CJ, Urwin PE, Atkinson HJ, Mcpherson MJ (1997). Characterization of cDNAs encoding serine proteinases from the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. **Molecular Biochemistry Parasitology** 89: 195-207.

Lohse M, Bolger AM, Nagel A, Fernie AR, Lunn JE, Stitt M, Usadel B (2012) RobiNA: a user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. **Nucleic Acids Res.** 40(1):622-627.

Nicol P, Gill R, Fosu Nyarko J, Jones MGK (2012) De novo analysis and functional classification of the transcriptome of the root lesion nematode, *Pratylenchus thornei*, after 454 GSFLX sequencing. **Int. J. Parasitol.** 42:225-37.

Moens M, Perry R, Starr J (2009) *Meloidogyne* species- a diverse group of novel and important plant parasites. In: Perry RN, Moens M, Starr JL (eds.) Root-knot nematodes, 483p.

Neveu C, Abad P, Castagnone-Sereno P (2003) Molecular cloning and characterization of an intestinal cathepsin L protease from the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 63: 159-165.

Opperman CH, Bird DM, Williamson VM, Rokhsar DS, Burke M, et al. (2008) Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: a compact nematode genome for plant parasitism. **Proc Natl Acad Sci USA** 105: 14802-14807.

Patel RK, Jain M (2012) NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next

generation sequencing data. **PLOS One** 7(2): e30619.

Roese AD, Oliveira RDL, Lanes FF (2004) Reação de cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) a *Meloidogyne paranaensis*. **Nematologia Brasileira** 28:131-135.

Sine SM, Engel AG (2006). Recent advances in cys-loop receptor structure and function. **Nature** 440: 448-455.

Suetake T, Tsuda S, Kawabata S-I, Miura K, Iwanaga S, Hikichi K, Nitta K, Kawano K (2000) Chitin-binding proteins in invertebrates and plants comprise a common chitin-binding structural motif. **Journal of Biological Chemistry** 275: 17929–17932.

Thompson AJ, Lester HA, Lummis SC (2010). The structural basis of function in cys-loop receptors. **Quarterly Reviews of Biophysics**. 43: 449-499.

Urwin PE, Lilley CJ, Mcpherson MJ, Atkinson HJ (1997) Characterization of two cDNAs encoding cysteine proteinases from the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. **Parasitology** 114: 605-613.

Vieira P, Danchin EG, Neveu C, Crozat C, Jaubert S et al. (2011) The plant apoplast is an important recipient compartment for nematode secreted proteins. **Journal of Experimental Botany** 62: 1241-1253.

Witzemann V, Stein E, Barg B, Konno T, Koenen M, Kues W, Criado M, Hofmann M, Sakmann B (1990). Primary structure and functional expression of the α -, β -, γ -, δ - and ϵ -subunits of the acetylcholine receptor from rat muscle. **European Journal of Biochemistry** 194: 437-448.

Wu Y, Adam R, Williams SA, Bianco AE (1996) Chitinase genes expressed by infective larvae of the filarial nematodes, *Acanthocheilonema viteae* and *Onchocerca volvulus*. **Molecular and Biochemical Parasitology** 75:207-219.

Wu Y, Egerton G, Underwood AP, Sakuda S, Bianco AE (2001) Expression and Secretion of a larval-specific chitinase (Family 18 Glycosyl Hydrolase) by the Infective

stages of the parasitic nematode, *Onchocerca volvulus*. **The Journal of Biological Chemistry** 276(45):42557-42564.

Yin Y, Mao X, Yang JC, Chen X, Mao F, Xu Y (2012) dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. **Nucleic Acids Res.** 40: W445-51.

Zhang Q, Pell J, Canino-Koning R, Howe AC, Brown CT (2014) These are not the k-mers you are looking for: efficient online k-mer counting using a probabilistic data structure. **arXiv:1309.2975v4** [q-bio.GN].

Zheng J, Peng D, Chen L, Liu H, Chen F, Xu M, Shouyong J, Ruan L, Sun M (2016) The *Ditylenchus destructor* genome provides new insights into the evolution of plant parasitic nematodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 283:20160942.

RESUMO

Um dos grandes desafios da agricultura mundial é o controle de doenças de plantas. Dentre os agentes fitopatogênicos, os nematoides estão entre os principais responsáveis por perdas econômicas na agricultura, tanto em termos quantitativos quanto qualitativos. Das espécies de nematoides que parasitam plantas superiores, sendo os do gênero *Meloidogyne* os principais causadores de dano econômico. O controle químico, uma das possibilidades de manejo, além de pouco eficiente na maioria das vezes, causa grande impacto na agricultura mundial, tanto sob o aspecto ambiental quanto em termos de contaminação dos alimentos produzidos, sendo necessária a descoberta de novas moléculas. Dessa forma, a busca por alternativas de controle a nematoides fitoparasitas é constante. Extratos de plantas têm sido testados com sucesso no controle de nematoides *in vitro*. Considerando o potencial da flora ocorrente no bioma Cerrado, a sua exploração para essa finalidade ainda é incipiente. Este estudo objetiva a prospecção de extratos vegetais de ação nematicida em plantas ocorrentes no cerrado do Distrito Federal. Foram testados extratos aquosos e etanólicos cedidos pelo Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos da Universidade de Brasília, UnB. Os testes iniciais *in vitro* foram realizados com o estágio J₂ de população de *Meloidogyne incognita* oriunda de Londrina, PR. Para isso formas J₂ foram imersas nos extratos a 1500 ppm de concentração por 48 hs e avaliados quanto ao potencial nematicida. Ao todo foram avaliados vinte e três extratos vegetais etanólicos e nove aquosos. Desses, apenas um extrato etanólico, com mortalidade sobre *M. incognita* acima de 80 %, foi selecionado. Por se tratar do extrato de um fruto, foi verificada a parte responsável pela ação nematicida. Detectou-se que o mesocarpo é a parte do fruto com maior ação nematicida. O extrato selecionado foi particionado em três frações (hidrometanólica, acetato de etila e hexânica) por técnicas de cromatografia e o seu efeito testado contra *Meloidogyne* spp. A partição em que se observou atividade nematicida foi a acetato de etila com atividade sobre 100 % dos J₂. A referida partição foi testada em doses menores para determinação da LC₅₀. As partições foram submetidas à cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para caracterização. Não foi possível a identificação dos compostos com ação nematicida presentes no extrato, no entanto acredita-se tratar de um composto fenólico.

Palavras-chave: Controle, Fitonematoides, Metabólitos secundários, Cerrado.

ABSTRACT

One of the great challenges of world agriculture is the control of plant diseases. Among the phytopathogenic agents, nematodes are among the major responsible for economic losses in agriculture, both quantitatively and qualitatively. Of the nematode species parasitizing higher plants, *Meloidogyne* spp. is one of the main causes of economic losses. Chemical control, one of the possibilities of management, besides being inefficient in most cases, has a great impact on world agriculture, both in the environmental aspect and in terms of contamination of the produced foods, being necessary the discovery of new molecules. Thus, the search for control alternatives to phytopathogenic nematodes is constant. Plant extracts have been successfully tested for nematode control *in vitro*. Considering the potential of the flora occurring in the Cerrado biome, its exploitation for this purpose is still incipient. This study aims to prospect for nematicidal plant extracts from plants in the cerrado of the Brazilian Federal District. Aqueous and ethanolic extracts were tested by the Laboratory of Quality Control of Medicines of the University of Brasília, UnB. The initial *in vitro* tests were performed with the J₂ stage of a *Meloidogyne incognita* population from Londrina, PR. For this, J₂ forms were immersed in extracts at 1,500 ppm of concentration for 48 hours and evaluated for nematicidal potential. In all, twenty-three ethanolic plant extracts and nine aqueous extracts were tested. Of these, only one ethanolic extract, with mortality on *M. incognita* above 80%, was selected. Since it was the extract of a fruit, the part responsible for the nematicidal action was verified. It was detected that the mesocarp is the part of the fruit with greater nematicidal action. The selected extract was partitioned into three fractions (hidrometanolic, ethyl acetate and hexanic) by chromatographic techniques and its effect tested against *M. incognita*. The partition in which nematicidal activity was observed was ethyl acetate with activity on 100% of J₂. This partition was tested in smaller doses (0, 250, 500, 750, 1,000, 1,250 and 1,500 ppm) for determination of LC₅₀. The partitions were subjected to high performance liquid chromatography (HPLC) for characterization. It was not possible to identify the compounds with nematicidal action present in the extract, however it is believed to be a phenolic compound.

Key words: Control, Phytonematodes, Secondary metabolites, Cerrado.

1 MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Prospecção de extratos vegetais de ação nematicida

A população de *M. incognita* utilizada nos experimentos é oriunda de Londrina, PR, e foi multiplicada em casa de vegetação na cultivar de tomateiro Santa Clara. Formas J₂ de *M. incognita* foram obtidas pela eclosão de juvenis em água a 28 °C, de acordo com metodologia descrita por Caboni *et al.* (2012) sendo utilizados nos testes apenas os nematoides eclodidos em no máximo 48 horas.

Foram avaliados trinta e dois extratos vegetais obtidos de diferentes órgãos de dezesseis espécies vegetais ocorrentes no bioma Cerrado (Tabela 17).

Tabela 17. Lista das espécies e extratos testados quanto à atividade nematicida.

Nome Científico	Família	Extrato	Parte da Planta
<i>Acrocomia aculeata</i>	Arecaceae	Etanólico	Casca do fruto
<i>Acrocomia aculeata</i>	Arecaceae	Etanólico	Fruto (polpa)
<i>Anchietea salutaris</i>	Violaceae	Aquoso	Folha
<i>Bauhinia rufa</i>	Fabaceae	Aquoso	Folha
<i>Bauhini rufa</i>	Fabaceae	Etanólico	Folha
<i>Cariocar brasiliensis</i>	Caryocaraceae	Etanólico	Semente
<i>Cariocar brasiliensis</i>	Caryocaraceae	Etanólico	Polpa fresca
<i>Cariocar brasiliensis</i>	Caryocaraceae	Etanólico	Casca fruto
<i>Dimorphandra mollis</i>	Fabaceae	Aquoso	Folha
<i>Erythroxylum daphinities</i>	Erythroxylaceae	Etanólico	flores
<i>Erythroxylum daphinities</i>	Erythroxylaceae	Etanólico	Galhos
<i>Erythroxylum daphinities</i>	Erythroxylaceae	Aquoso	Folha
<i>Erythroxylum subrotundum</i>	Erythroxylaceae	Aquoso	Folha
<i>Erythroxylum suberosum</i>	Erythroxylaceae	Aquoso	Folha

<i>Erythroxylum suberosum</i>	Erythroxylaceae	Etanólico	Folha
<i>Eugenia dysenterica</i>	Myrtaceae	Aquoso	Folha
<i>Genipa americana</i>	Rubiaceae	Etanólico	Fruto maduro
<i>Genipa americana</i>	Rubiaceae	Etanólico	Folha
<i>Genipa americana</i>	Rubiaceae	Etanólico	Fruto verde
<i>Hancornia speciosa</i>	Apocynaceae	Etanólico	Folha
<i>Pouteria gardnerii</i>	Sapotaceae	Etanólico	folha
<i>Pouteria ramiflora</i>	Sapotaceae	Aquoso	folha
<i>Pouteria ramiflora</i>	Sapotaceae	Etanólico	folha
<i>Pouteria ramiflora</i>	Sapotaceae	Etanólico	Caule
<i>Pouteria torta</i>	Sapotaceae	Etanólico	folha
<i>Pouteria torta</i>	Sapotaceae	Etanólico	Fruto (polpa)
<i>Sapindus saponaria</i>	Sapindaceae	Etanólico	Fruto
<i>Sapindus saponaria</i>	Sapindaceae	Etanólico	Epicarpo
<i>Striphynodendron adstringens</i>	Fabaceae	Etanólico	folha
<i>Striphynodendron adstringens</i>	Fabaceae	Etanólico	Casca do caule
<i>Striphynodendron adstringens</i>	Fabaceae	Aquoso	Casca caule
<i>Striphynodendron adstringens</i>	Fabaceae	Etanólico	caule

1.2 Preparo dos extratos

Os extratos aquosos foram preparados com secagem do material botânico em estufa de circulação de ar a 40 °C, com exceção dos frutos carnosos, em que o material foi inicialmente liofilizado, seguido de pulverização em moinho de facas. Verteu-se água destilada sobre o material vegetal na temperatura de 70 °C. Com o arrefecimento (temperatura em torno de 50 °C), a solução extrativa foi filtrada, congelada e liofilizada em liofilizador modelo Advantage Plus XL-70, SP Scientific (Figura 39). Os extratos brutos aquosos foram conservados sob temperatura de cerca de – 20 °C até seu uso nos ensaios biológicos (Rodrigues, 2015).

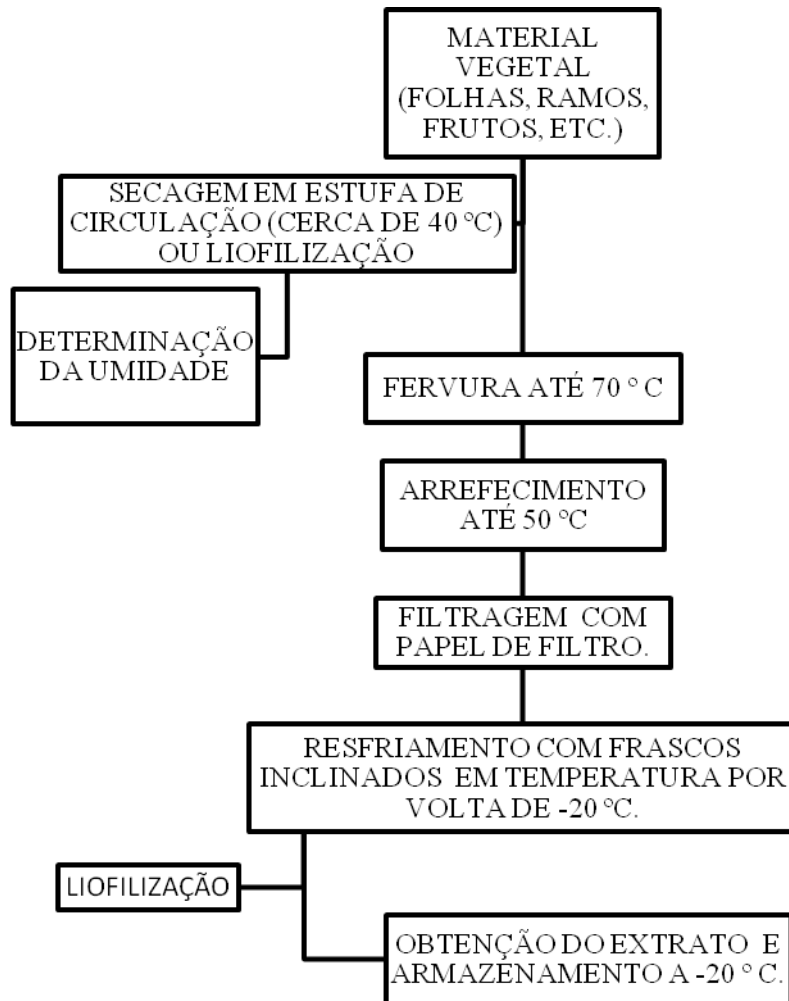


Figura 39. Processos envolvidos na extração do extrato vegetal aquoso.

Já os extratos etanólicos foram preparados de acordo com os passos apresentados na Figura 40. Inicialmente pulverizou-se o material vegetal por extração a frio (maceração passiva). Nesse processo, as amostras foram embebidas em etanol em quantidade suficiente para cobrir todo o material e mantidas nessas condições, em percolador, à temperatura ambiente, por até sete dias. Decorrido esse tempo, o extrato foi filtrado e o processo repetido duas vezes após cada filtração. Os extratos foram concentrados, sendo as soluções extrativas submetidas à eliminação da maior parte do solvente, sob vácuo, em rotoevaporador, modelo Hei-VAP Advantage, ML, G1, 115v - Heidolph, com temperatura de até 40 °C. Em seguida as amostras de extratos foram

retiradas do rotoevaporador e secas em banho-maria a 70 °C até a retirada completa do solvente (Rodrigues, 2015).

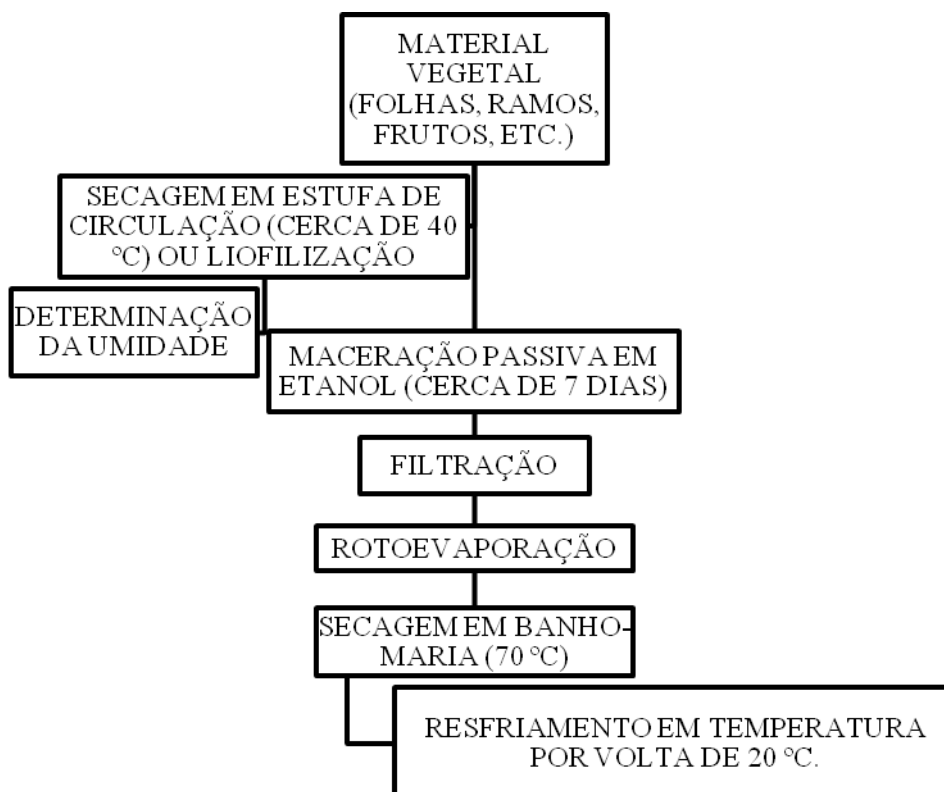


Figura 40. Processos envolvidos no preparo de extratos etanólicos.

1.3 Testes *in vitro*

Os extratos foram avaliados em placa de Elisa quanto ao efeito nematicida sobre formas J₂ de *M. incognita*. Para isso foram feitas 10 repetições por extrato, sendo que cada repetição consistiu da aplicação do extrato em uma cavidade da placa de Elisa com dez J₂. O volume total em cada cavidade foi de 200 µl sendo que inicialmente foram aplicados 100 µl de água destilada esterilizada para onde foram transferidos todos os J₂ em todas as repetições. Em seguida foram adicionados 100 µl da parte solúvel do extrato na concentração de 3000 ppm com o respectivo solvente na concentração

desejada (400 ppm (p/v) de Tween 80 para extrato aquoso e 1,9 % de DMSO (v/v) para extrato etanólico). As concentrações finais em cada repetição foram de 1.500 ppm de cada extrato com 200 ppm (p/v) de Tween 80 para extrato aquoso e 0,95 % (v/v) de Dimetilsulfóxido (DMSO) para extrato etanólico.

A avaliação do ensaio *in vitro* foi realizada após 24 h e 48 h da imersão de J₂ nos extratos a 1.500 ppm (p/v) de concentração. Após 48 hs, cada extrato foi diluído a 750 ppm (p/v) e os nematoides avaliados nas 24 h subsequentes. Após a leitura a 750 ppm (p/v) de concentração adicionou-se uma gota de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M conforme metodologia adotada por Caboni *et al.* (2012). Foram considerados mortos os nematoides curvos e deformados e vivos aqueles que se encontravam retorcidos após a aplicação desse reagente. Selecionou-se apenas o extrato com 80 - 100 % de mortalidade em formas J₂.

Nos ensaios para determinação das partes do fruto que apresentaram atividade (pericarpo, mesocarpo, endocarpo, semente e epicarpo) houve avaliação nos tempos de 24, 48 e 72 h sendo que não foi realizada diluição do extrato e a determinação dos nematoides vivos e mortos foi realizada adição de uma gota de hidróxido de sódio (NaOH) conforme metodologia adotada por Caboni *et al.* (2012).

1.4 Determinação do pH

O pH dos extratos foi mensurado para verificação de possível interferência do pH nos resultados. Para isso foram feitas leituras em diferentes concentrações dos extratos com auxílio do pHmetro modelo Digimed DM-22.

1.5 Obtenção das partições do extrato selecionado com ação nematocida

Uma alíquota do extrato etanólico bruto com ação nematocida foi solubilizada em uma mistura metanol/água (7:3) e submetida à partição por polaridade, fornecendo as frações hexânica, acetato de etila e hidrometanólica. A fração hexânica foi obtida pela adição de hexano à mistura metanol/ água e a separação por polaridade em funil de separação. A fração acetato de etila foi obtida da fração hexânica pela adição do solvente acetato de etila e separação das duas fases também em funil.

Tanto a fração hexânica quanto a acetato de etila foram secas em banho-maria na temperatura de 70 °C, sendo inicialmente utilizado o sulfato de sódio anidro para retirar água em mistura e o rotoevaporador para reduzir o volume da solução. A partição hidrometanólica foi obtida reduzindo-se o volume inicialmente em rotoevaporador, para retirada do excesso de metanol/água, sendo em seguida liofilizada.

1.6 Determinação da parte do fruto com ação nematocida

Após confirmação da atividade *in vitro*, extratos etanólicos brutos foram obtidos das diferentes partes que compõem o fruto objeto deste estudo. Para essa determinação foram coletados frutos frescos, no mesmo dia, logo após queda natural, os mesmos foram congelados a -20 °C e mantidos nessa condição. As partes dos frutos foram devidamente separadas e liofilizada para retirada da umidade e trituradas de forma que se tornasse um pó. Após, foi determinada a umidade das amostras com auxílio de um analisador de umidade por infravermelho (modelo IV2000 versão: 4.2,1- Gehaka). Esse procedimento foi realizado três vezes para cada amostra utilizando 1mg por determinação resultando em umidade em torno de 5% para todas as partes dos frutos.

O pó obtido após trituração foi utilizado para a produção dos extratos aquosos e etanólicos conforme metodologia apresentada nas figuras 39 e 40. Foram obtidos para esses estudos, os extratos do pericarpo (fruto inteiro), epicarpo (casca), mesocarpo

(polpa), endocarpo (cobertura da semente) e das sementes (Figura 41). A ação de cada extrato foi testada em formas J_2 de *M. incognita* conforme o item 1.3 supramencionado.

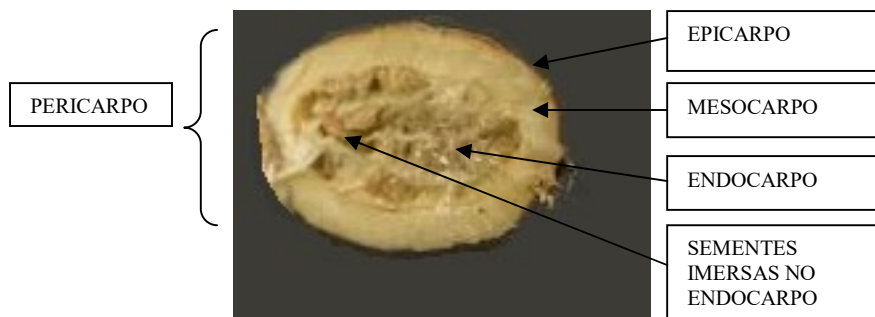


Figura 41. Ilustração da composição de um fruto de jenipapo.

1.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).

A partir da literatura e dos indícios de que, para o fruto em estudo, os compostos com ação nematicida são compostos fenólicos, foi feita caracterização do perfil cromatográfico a partir de CLAE-DAD de todas as partes do fruto e tentativa de identificação dos compostos com possível ação nematicida.

As amostras foram inicialmente pesadas em frascos separados e em seguida diluídas em metanol. Cada amostra foi avaliada nas concentrações de 1 mg.ml^{-1} e 10 mg.ml^{-1} e as mesmas foram constituídas dos extratos etanólicos referentes às diferentes partes do fruto (endocarpo, mesocarpo, sementes, epicarpo e pericarpo). Após diluição as amostras foram filtradas com filtro para seringa com membrana de $0,45 \mu\text{m}$ de abertura.

As CLAE-DAD foram realizadas em equipamento (Hitachi) com coluna (LiChroCART 150-4,6 Purospher STAR RP-18e -5 μm) e pré-coluna (LichroCART 4-4,6 Purospher STAR RP 18e - 5 μm) mantidas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ com fluxo de $0,6 \text{ ml por minuto}$ e tempo de análise de 55 minutos. Os eluentes utilizados foram ácido fosfórico a 1% de

concentração (Tédia), na bomba A e acetonitrila (Tédia) na bomba B. O intervalo de análise foi de 230 a 400 nm e os dados extraídos em 280 e 354 nm, sendo o sistema de eluição por gradiente conforme Tabela 18.

Tabela 18. Gradiente de eluição para a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Diodos CLAE - DAD na detecção de compostos fenólicos.

Tempo em minutos	% de solução de ácido fosfórico a 1 %	% Acetonitrila
0-40	90	10
40-50	70	30
50-51	50	50
51-55	90	10
55	90	10

2 RESULTADOS

3.1 Efeito de extratos vegetais sobre J₂ de *M. incognita*

Dos trinta e dois extratos avaliados apenas um apresentou ação nematicida acima de 80% sobre formas J₂ de *M. incognita*, sendo o extrato mais promissor o obtido a partir de extração etanólica do fruto maduro de Jenipapo (*Genipa americana* L.). Os nematoides mortos apresentaram presença de vacúolos na parte interna (Figuras 42B) e descolamento da cutícula do nematoide (Figuras 42 A e C).

Quanto às partições, a acetato de etila manteve a ação nematicida nos testes iniciais resultando em 100% de mortalidade de J₂ de *M. incognita*. As partições hidrometanólica e hexânica não apresentaram qualquer indício de atividade nematicida.



Figura 42. Micrografias de microscopia óptica de formas J₂ de *Meloidogyne incognita*, submetidas aos seguintes tratamentos por 48 horas: A e B - água com extrato de *Genipa americana* a 1.500 ppm; C - água com DMSO a 0.95% (v/v) e extrato de *Genipa americana* na concentração de 1.500 ppm; D - água; E e F - água com DMSO na concentração de 0,95 % (v/v).

3.2 Ação nematicida das partes do fruto selecionado

Após constatada a atividade, houve coleta de frutos maduros, identificados a partir da queda natural após a maturação. Todos os frutos foram coletados no mesmo dia e de uma única árvore. Quanto às partes, apenas no mesocarpo encontrou-se atividade, demonstrando que nela se concentram a (s) molécula (s) com ação nematicida sobre *M. incognita*. Como controle positivo para comparação com o extrato utilizado foi utilizada a partição acetato de etila obtida por fracionamento e como controle negativo água com DMSO na concentração de 0.95%. Vale destacar que todos os extratos etanólicos das partes do fruto e das partições acetato de etila apresentaram pH entre 3,5 e 4,0 e umidade entre 4,5 a 5%.

3.3 Ação nematicida sobre espécies de *Meloidogyne* spp.

O extrato com ação nematicida sobre J₂ de *M. incognita* advindo de lavouras de soja foi testado também para população de *M. javanica*, *M. incognita* e *M. morocciensis* coletada em área de cerrado sob preservação permanente e contra *M. paranaensis*. Como testemunha negativa utilizou-se água com DMSO na concentração de 0,95 %. Observou-se mortalidade acima de 80% a partir de 48 hs para o mesocarpo do fruto e o pericarpo. Os resultados para cada espécie de nematoide são apresentados nas Figuras 43, 44, 45 e 46 a seguir.

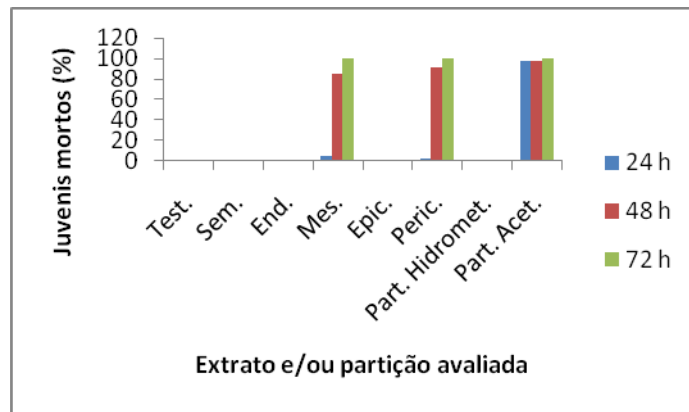


Figura 43. Percentagem de J₂ de *Meloidogyne javanica* de cerrado mortos após 24, 48 e 72 hs de exposição ao tratamento em que: Test.: tratamento testemunha com água mais DMSO na concentração de 0,95% (v/v); Sem., End., Mes., Epic. e Peric. são correspondentes aos extratos da semente, do endocarpo, do mesocarpo, do epicarpo e pericarpo do fruto maduro de jenipapo respectivamente, na concentração de 1.500 ppm (p/v) do extrato e 0,95% de DMSO (v/v); Part. Hidromet.: Partição hidrometanólica do fruto de jenipapo na concentração de 1.500 ppm (p/v) da partição e 0,95% de DMSO (v/v).; Part. Acet.: Partição Acetato de etila do fruto de jenipapo na concentração de 1.500 ppm (p/v) da partição e 0,95% de DMSO (v/v).

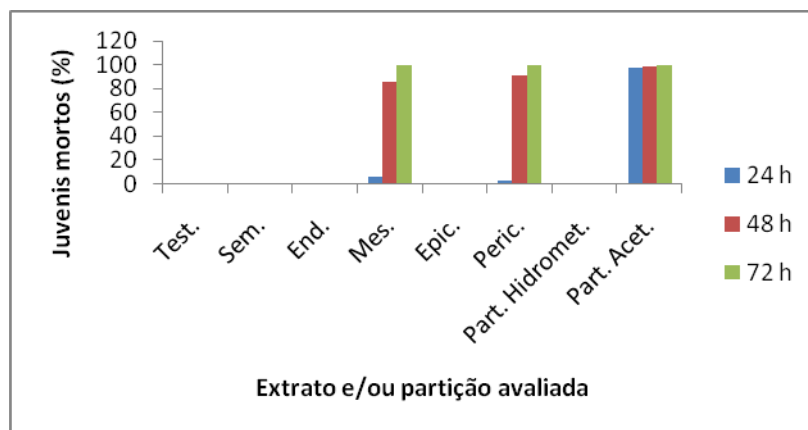


Figura 44. Percentagem de J₂ de *Meloidogyne incognita* de cerrado mortos após 24, 48 e 72 hs de exposição ao tratamento em que: Test.: tratamento testemunha com água mais DMSO na concentração de 0,95% (v/v); Sem., End., Mes., Epic. e Peric. são correspondentes aos extratos da semente, do endocarpo, do mesocarpo, do epicarpo e pericarpo do fruto maduro de jenipapo respectivamente, na concentração de 1.500 ppm (p/v) do extrato e 0,95% de DMSO (v/v); Part. Hidromet.: Partição hidrometanólica do fruto de jenipapo na concentração de 1.500 ppm (p/v) da partição e 0,95% de DMSO (v/v).; Part. Acet.: Partição Acetato de etila do fruto de jenipapo na concentração de 1500 ppm (p/v) da partição e 0,95% de DMSO (v/v).

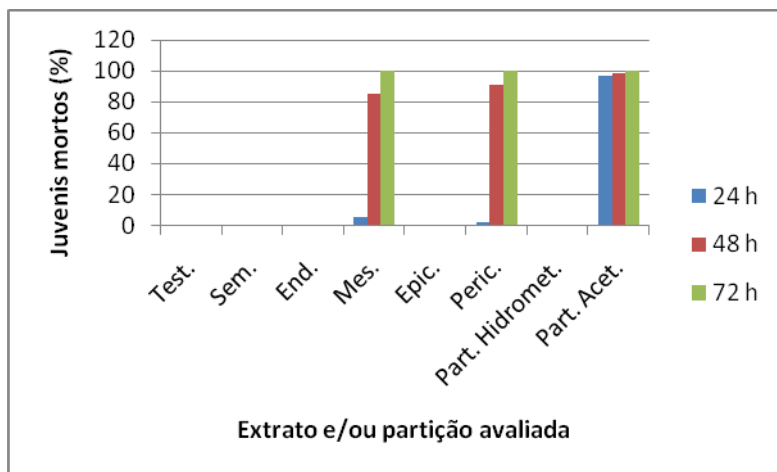


Figura 45. Percentagem de J_2 de *M. morocciensis* de cerrado mortos após 24, 48 e 72 hs de exposição ao tratamento em que: Test.: tratamento testemunha com água mais DMSO na concentração de 0,95% (v/v); Sem., End., Mes., Epic. e Peric. são correspondentes aos extratos da semente, do endocarpo, do mesocarpo, do epicarpo e pericarpo do fruto maduro de jenipapo respectivamente, na concentração de 1.500 ppm (p/v) do extrato e 0,95% de DMSO (v/v); Part. Hidromet.: Partição hidrometanólica do fruto de jenipapo na concentração de 1.500 ppm (p/v) da partição e 0,95% de DMSO (v/v).; Part. Acet.: Partição Acetato de etila do fruto de jenipapo na concentração de 1.500 ppm (p/v) da partição e 0,95% de DMSO (v/v).

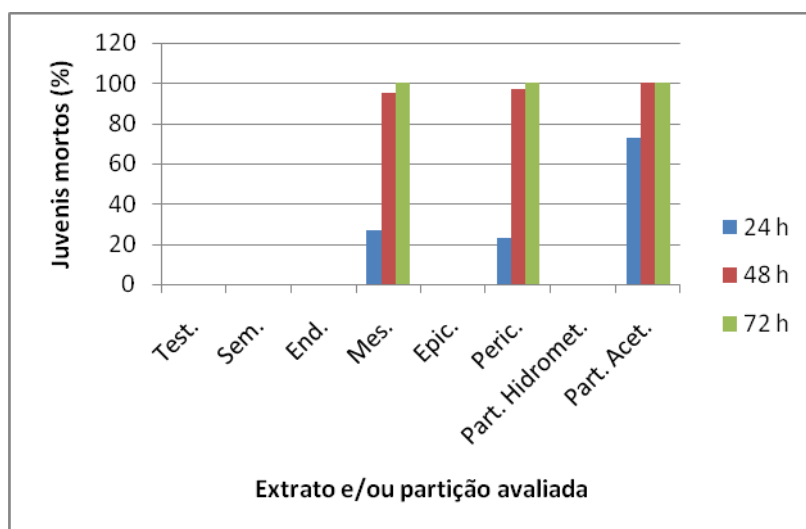


Figura 46. Percentagem de J_2 de *M. paranaensis* de cerrado mortos após 24, 48 e 72 hs de exposição ao tratamento em que: Test.: tratamento testemunha com água mais DMSO na concentração de 0,95% (v/v); Sem., End., Mes., Epic. e Peric. são correspondentes aos extratos da semente, do endocarpo, do mesocarpo, do epicarpo e pericarpo do fruto maduro de jenipapo respectivamente, na concentração de 1.500 ppm (p/v) do extrato e 0,95% de DMSO (v/v); Part. Hidromet.: Partição hidrometanólica do fruto de jenipapo na concentração de 1.500 ppm (p/v) da partição e 0,95% de DMSO (v/v).; Part. Acet.: Partição Acetato de etila do fruto de jenipapo na concentração de 1.500 ppm (p/v) da partição e 0,95% de DMSO (v/v).

3.4 Determinação da Concentração Letal para mortalidade de 50% (LC₅₀)

A concentração letal efetiva sobre 50% dos juvenis de segundo estágio (LC₅₀) após 48 horas de exposição foi de 746,67 ppm (Limite de 95%) para o extrato etanólico do mesocarpo e de 767,07 ppm para o pericarpo do fruto. A determinação foi realizada de acordo análise probit (Finney, 1947).

3.5 Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD por parte do fruto avaliada

Os cromatogramas foram obtidos tanto dos extratos etanólicos do mesocarpo e do pericarpo quanto de suas partições acetato de etila e hidrometanólica. A quantidade de material obtida na fração hexânica foi pequena e foi testada na concentração de 1 mg.ml⁻¹ não sendo encontrado nenhum pico nos cromatogramas do mesocarpo e pericarpo. Todos os picos foram obtidos a 280 nm.

Para o extrato etanólico do pericarpo foram obtidos três picos (Figura 47) com tempos de retenção de 6,89; 11,19 e 48,79 min com espectro de absorção com alta pureza (Figura 48). O composto mais próximo para os três picos encontrados e que possui maior similaridade com relação ao espectro de absorção foi o ácido gálico (Figura 49).

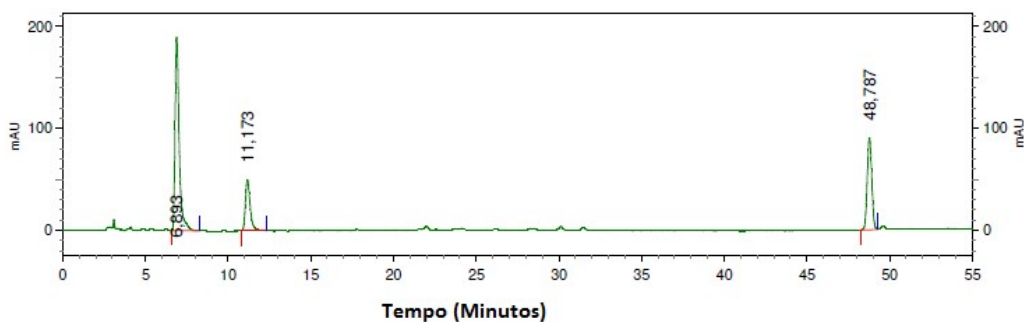


Figura 47. Cromatograma por CLAE-DAD a 280 nm do extrato etanólico do pericarpo de *Genipa americana* (10 mg.ml⁻¹).

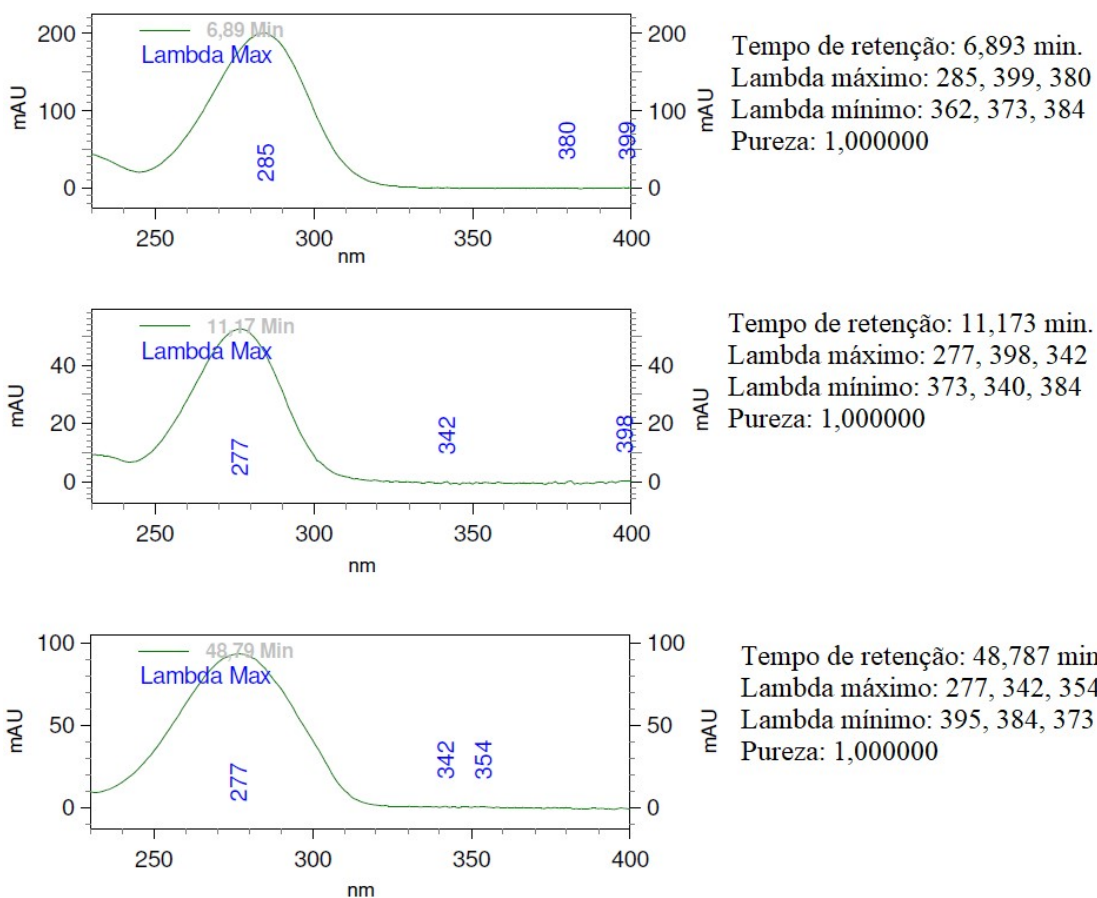


Figura 48. Espectro de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para o extrato etanólico do pericarpo do fruto de *Genipa americana*.

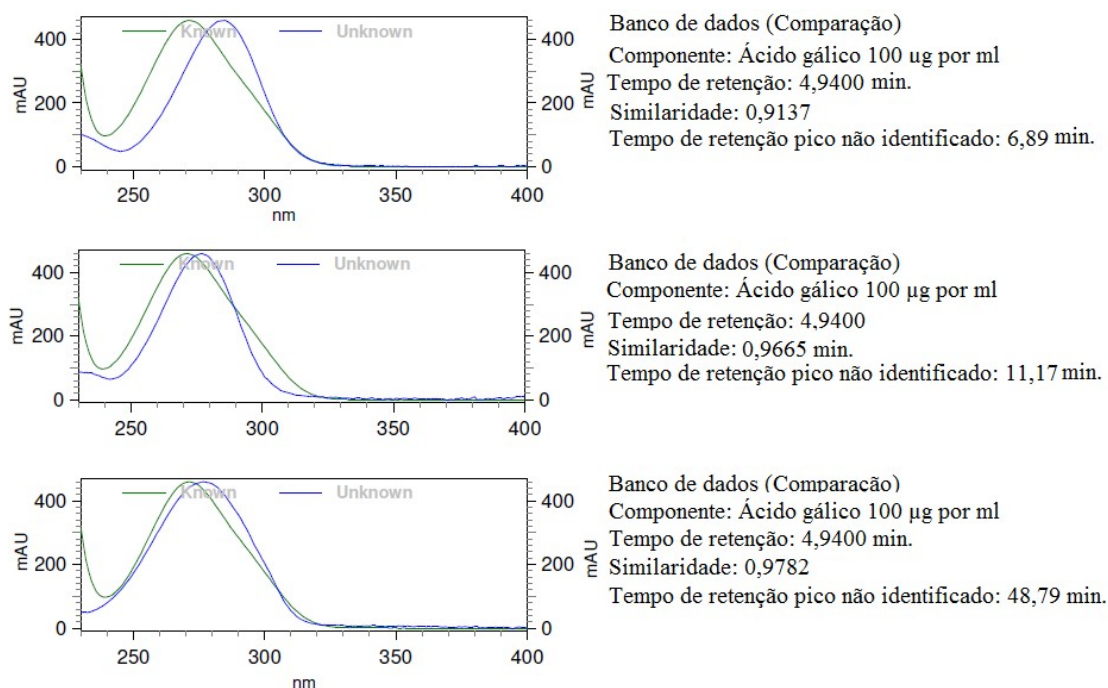


Figura 49. Espectros de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para o extrato etanólico do pericarpo do fruto de *Genipa americana* (em verde) comparativamente ao composto com maior similaridade encontrado em banco de dados do do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos da Universidade de Brasília (em azul).

Os mesmos três picos encontrados no extrato etanólico do pericarpo são encontrados na partição acetato de etila (Figura 50) com os tempos de retenção muito próximos aos encontrados para o extrato mesmo espectro de absorção (Figura 51) e maior similaridade com ácido gálico (Figura 52).

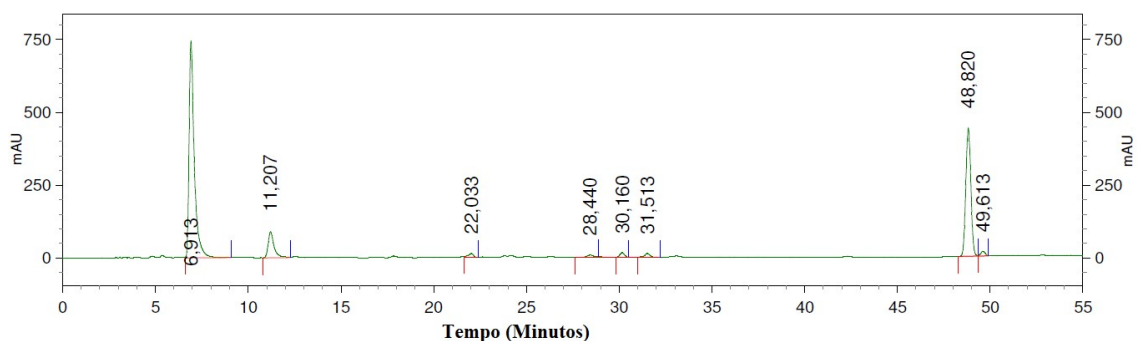
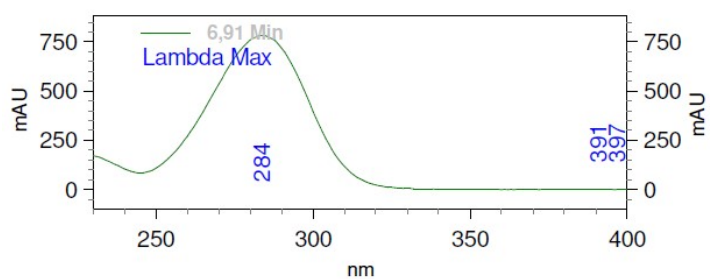
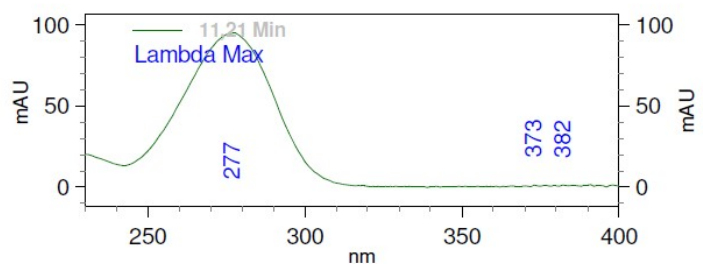


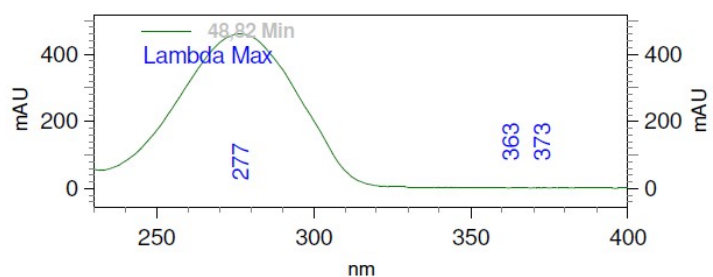
Figura 50. Cromatograma por CLAE-DAD a 280 nm da partição acetato de etila do pericarpo de *Genipa americana* (10 mg.ml⁻¹).



Tempo de retenção: 6,913 min.
 Lambda máximo: 284, 391, 397
 Lambda mínimo: 372, 362, 375
 Pureza: 1,000000



Tempo de retenção: 11,207 min.
 Lambda máximo: 277, 373, 382
 Lambda mínimo: 357, 334, 343
 Pureza: 0,967088



Tempo de retenção: 48,820 min.
 Lambda máximo: 277, 363, 373
 Lambda mínimo: 388, 372, 362
 Pureza: 1,000000

Figura 51. Espectro de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para a partição acetato de etila do pericarpo do fruto de *Genipa americana*.

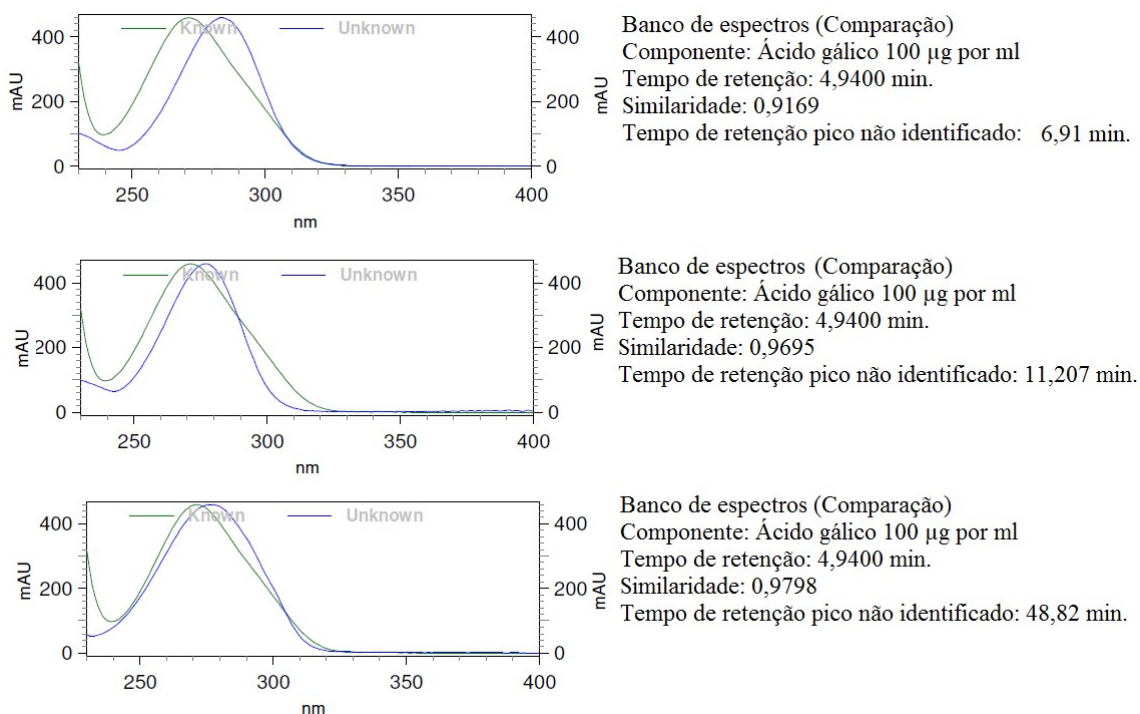


Figura 52. Espectros de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para partição acetato de etila do pericarpo do fruto de *Genipa americana* (em verde) comparativamente ao composto com maior similaridade encontrado em banco de dados do do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos da Universidade de Brasília (em azul).

Quanto à partição hidrometanólica do pericarpo, apenas os dois primeiros picos encontrados puderam ser encontrados (Figura 53) com tempos de retenção próximos aos encontrados para o extrato etanólico do pericarpo, mesmos espectros de absorção e alta similaridade com ácido gálico (Figura 55). O terceiro pico, com maior tempo de retenção não pode ser detectado.

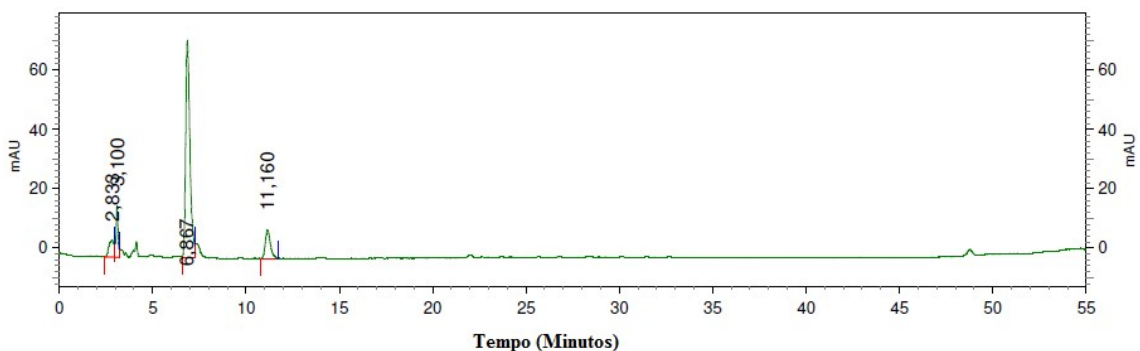


Figura 53. Cromatograma por CLAE-DAD a 280 nm da partição hidrometanólica do pericarpo de *Genipa americana* ($10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

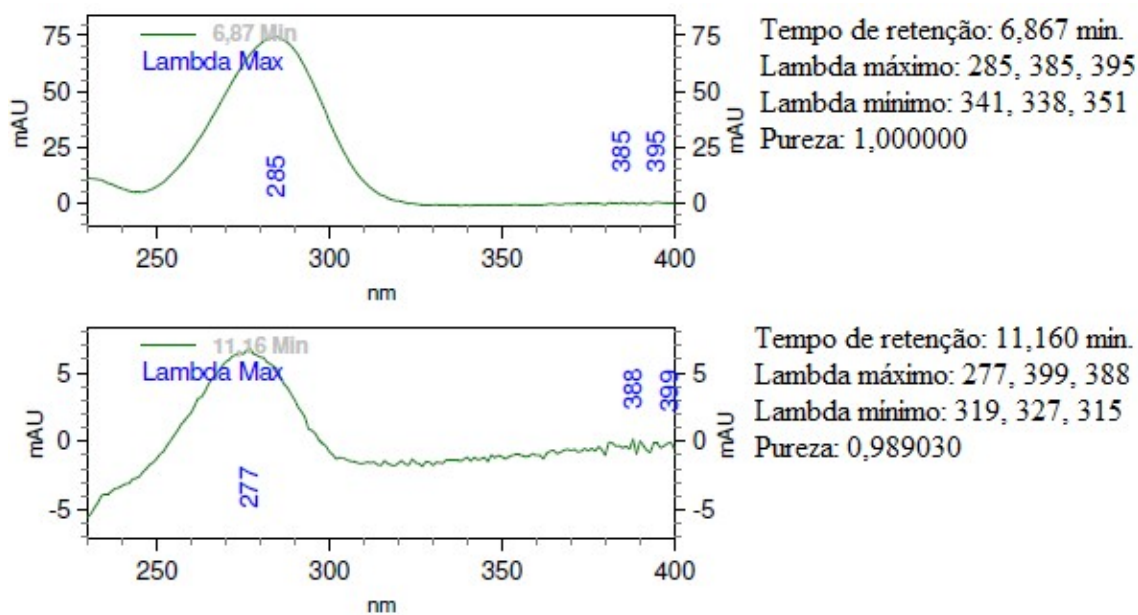


Figura 54. Espectro de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para partição hidrometanólica do pericarpo do fruto de *Genipa americana*.

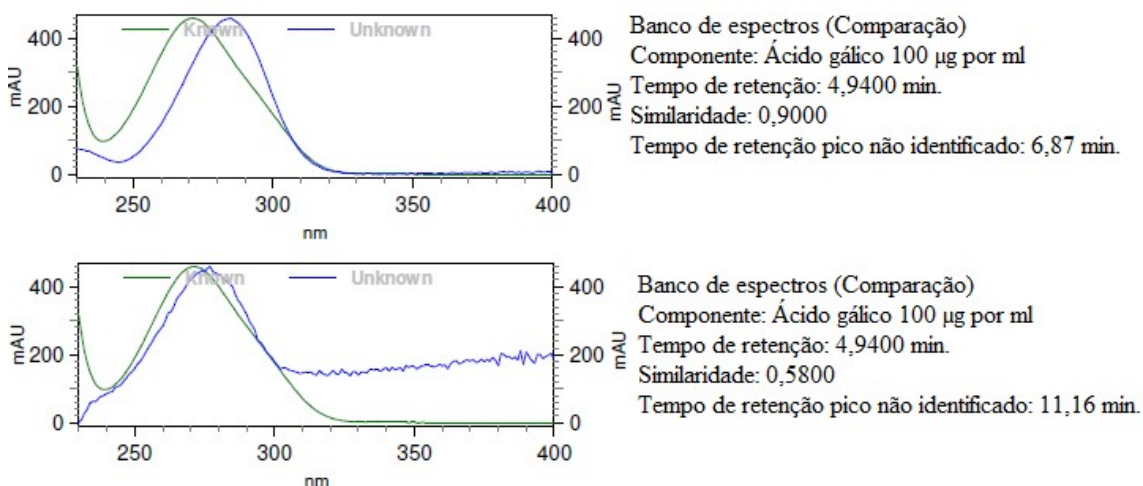


Figura 55. Espectros de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para partição hidrometanólica do pericarpo do fruto de *Genipa americana* (em verde) comparativamente ao composto com maior similaridade encontrado em banco de dados do do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos da Universidade de Brasília (em azul).

O extrato etanólico do mesocarpo de *G. americana* também apresentou os mesmos três picos encontrados no pericarpo do fruto conforme pode ser visualizado no respectivo cromatograma (Figura 56), praticamente os mesmos tempos de retenção, os

mesmos espectros de absorção (Figura 57) e alta similaridade com espectro de absorção do ácido gálico (Figura 58).

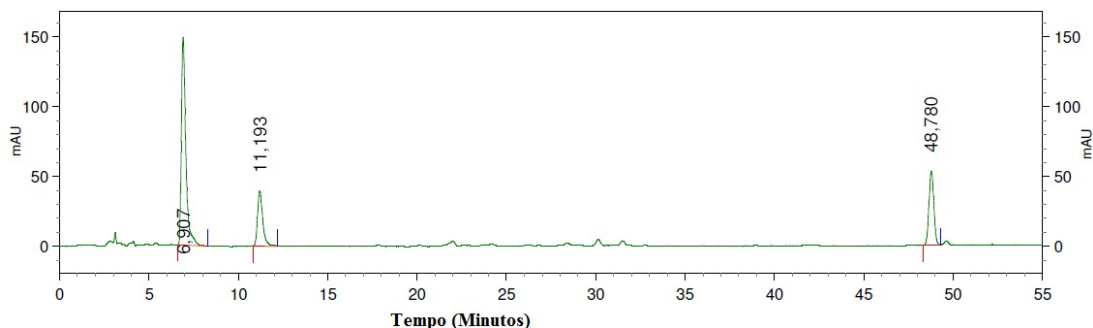


Figura 56. Cromatograma por CLAE-DAD a 280 nm do extrato etanólico do mesocarpo de *Genipa americana* (10 mg.ml⁻¹).

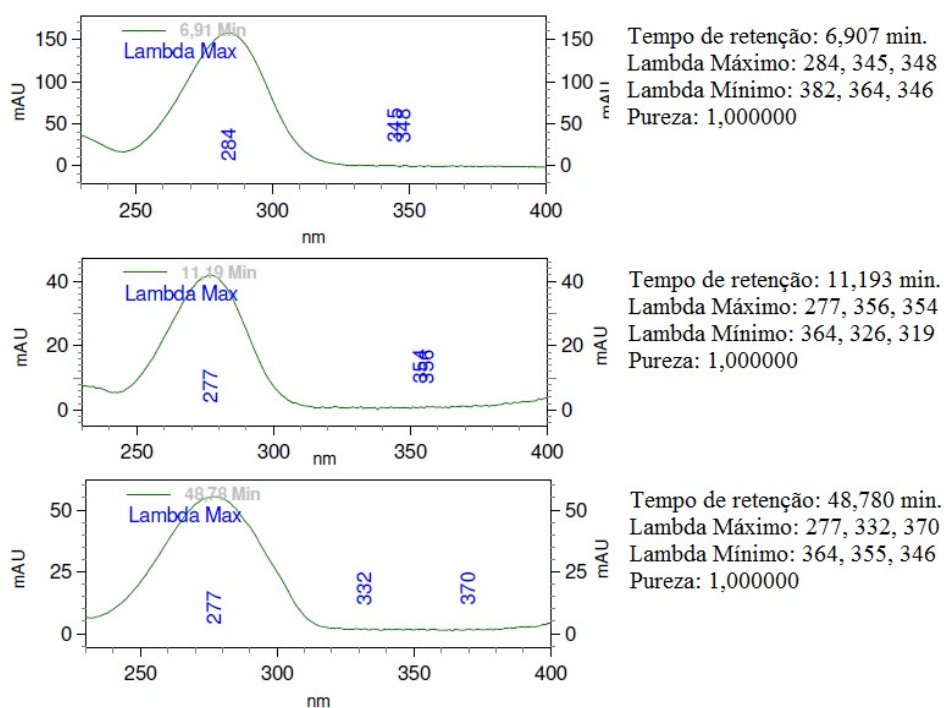


Figura 57. Espectro de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para o extrato etanólico do mesocarpo do fruto de *Genipa americana*.

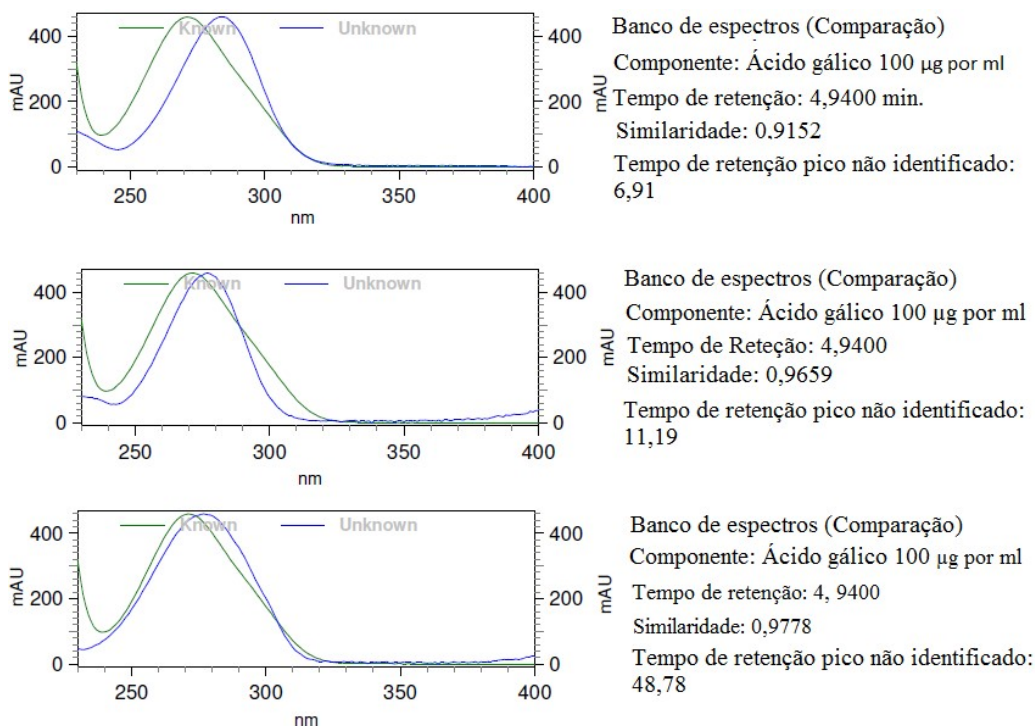


Figura 58. Espectros de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para o extrato etanólico do mesocarpo do fruto de *Genipa americana* (em verde) comparativamente ao composto com maior similaridade encontrado em banco de dados do do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos da Universidade de Brasília (em azul).

Na partição acetato de etila do extrato etanólico do fruto de *G. americana*, os mesmos três picos sobresaem no cromatograma (Figura 59), os tempos de retenção são próximos, os espectros de absorção são os mesmos (Figura 60), além da alta similaridade dos espectros com o ácido gálico (Figura 61).

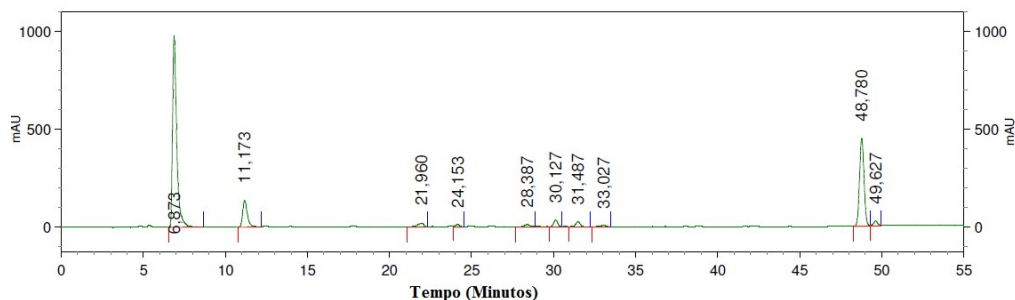


Figura 59. Cromatograma por CLAE-DAD a 280 nm da partição acetato de etila de *Genipa americana* (10 mg.ml⁻¹).

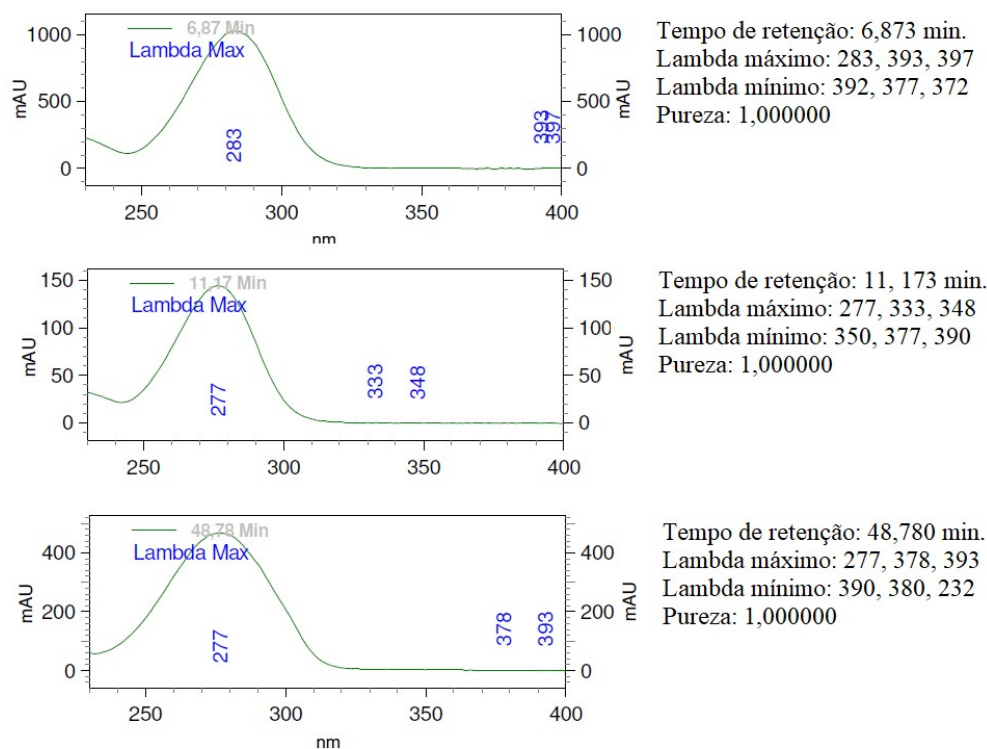


Figura 60. Espectro de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para a partição acetato de etila do mesocarpo do fruto de *Genipa americana*.

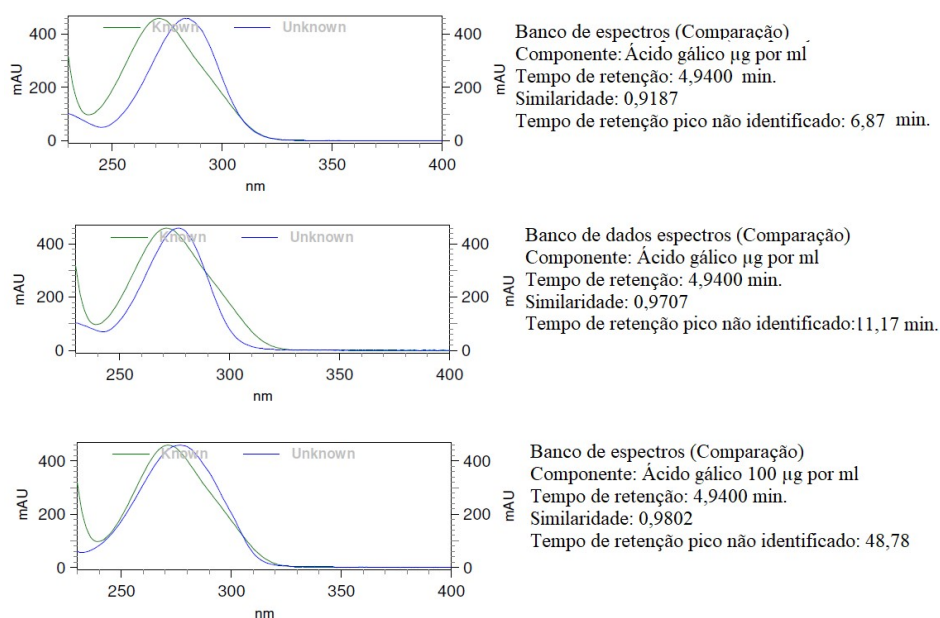


Figura 61. Espectros de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para partição acetato de etila do mesocarpo do fruto de *Genipa americana* (em verde) comparativamente ao composto com maior similaridade encontrado em banco de dados do do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos da Universidade de Brasília (em azul).

Por fim, na partição hidrometanólica do extrato etanólico do fruto de *G. americana*, os mesmos três picos sobresaem no cromatograma (Figura 62), os tempos de retenção são próximos e os espectros de absorção são os mesmos (Figura 63), além da maior similaridade dos espectros com o ácido gálico (Figura 64).

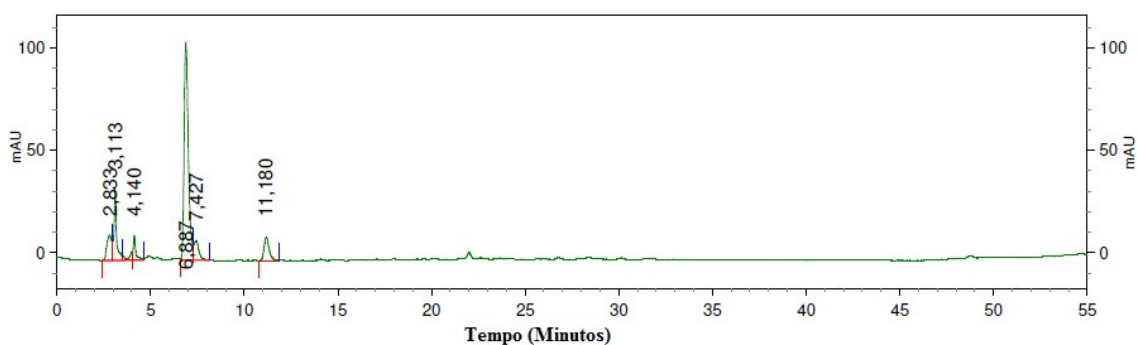


Figura 62. Cromatograma por CLAE-DAD a 280 nm da partição hidrometanólica do mesocarpo de *Genipa americana* ($10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

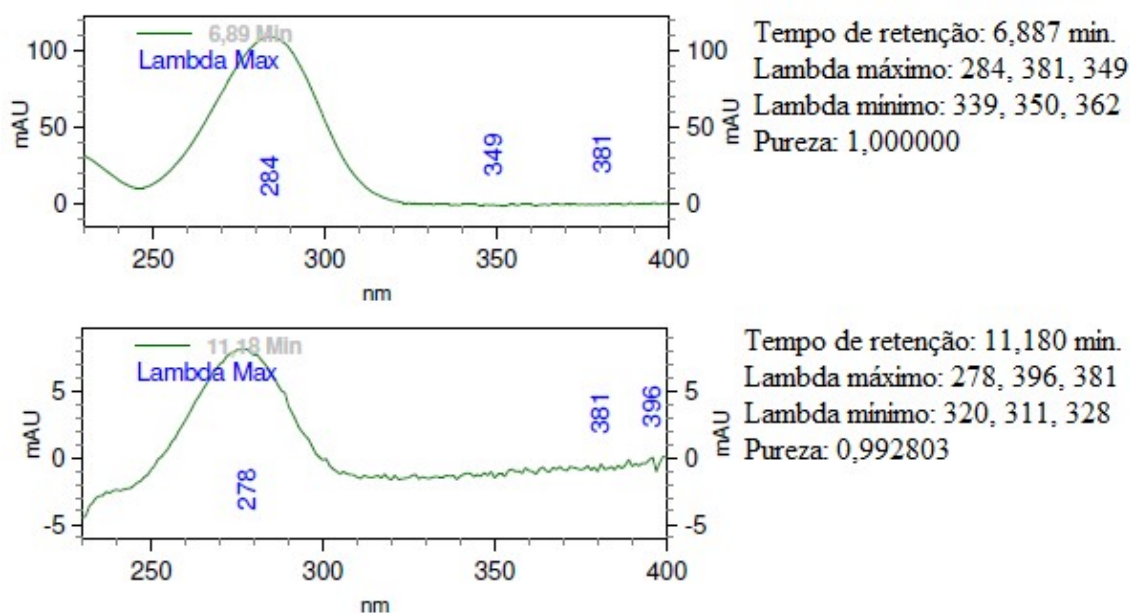


Figura 63. Espectro de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para partição aquosa do mesocarpo do fruto de *Genipa americana*.

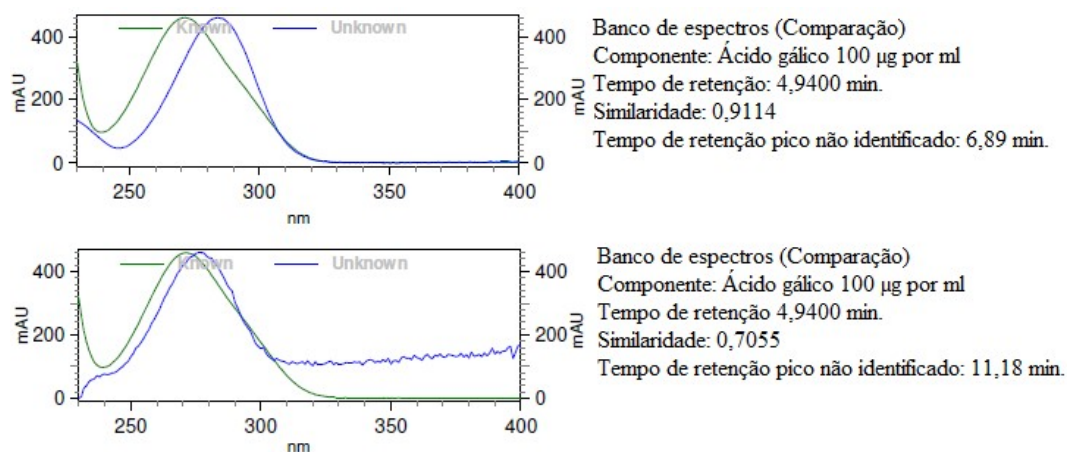


Figura 64. Espectros de absorção Uv/VIS referente aos picos encontrados a partir de CLAE-DAD para partição hidrometanólica do fruto de *Genipa americana* (em verde) comparativamente ao composto com maior similaridade encontrado em banco de dados do do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos da Universidade de Brasília (em azul).

4 DISCUSSÃO

A fitoquímica de *Genipa americana* tem sido estudada a partir de extratos de folhas (Silva *et al.*, 2018), frutos não maduros (Neves *et al.*, 2018) e frutos maduros (Barbosa, 2008) com identificação de uma série de compostos, principalmente iridoides como genipina e geniposídio por exemplo (Náthia-Neves *et al.*, 2018). Nesse estudo, comprovou-se pela primeira vez ação nematicida de extrato de fruto maduro de *G. americana* sobre nematoides fitoparasitas (*Meloidoyne* spp.). No entanto, ação anti-helmíntica havia sido relatada para *Haemonchus contortus* em ovinos (Krychak-Furtado, 2006; Oliveira, 2013;).

A ação nematicida foi detectada apenas para extrato etanólico de pericarpo e de mesocarpo de frutos maduros de jenipapo, mas sem identificação do composto bioativo. Bentes e Mecadante (2014) identificaram 18 compostos, entre iridoides e ácidos fenólicos, em fruto de *G. americana*, sendo que ácido cafeoilgeniposídico, ácido p-coumaroilgeniposídico e feruloil gardosideo a partir de extrato etanólico de fruto maduro por HPLC-DAD-MS. Em frutos não maduros, foram identificados a maior parte a maior concentração de compostos fenólicos e iridoides. A ação dos compostos acima citados ainda não foi testada contra nematoides fitoparasitas e podem ser alvo de estudos posteriores.

A ação nematicida, obtida para extrato etanólico de pericarpo e mesocarpo do fruto maduro, nesse estudo, foi mantida após pré-fracionamento apenas na partição onde se utilizou acetato de etila. Esse solvente seleciona metabólitos secundários e/ou compostos com polaridade intermediária, como é o caso de muitos compostos fenólicos.

Dentre esses compostos há um grande número de ácidos, que inclusive podem ter sido responsáveis por pH ligeiramente ácido, com pH dos extratos, tanto do pericarpo quanto do mesocarpo na concentração de 1.500 ppm em torno de 4, indicando

possível presença ácidos fenólicos que podem ser os responsáveis pela ação nematicida. Esses compostos geralmente são estáveis em pH mais ácido e podem oxidar em faixas de pH mais básicas. É o caso por exemplo do ácido 5-o-cafeioiquínico que é um dos ácidos clorogênicos encontrado em erva mate que ao ser submetido a operações que exponham o produto a altas temperaturas em atmosfera inerte (vapor) e oxidativa podem resultar em transesterificação e oxidação irreversível do ácido (Benincá, 2009).

Foram detectados três picos de compostos fenólicos na partição acetato de etila de pericarpo e mesocarpo de fruto maduro de *G. americana* por HPLC.

Diversas substâncias já foram identificadas em *G. americana* como manitol, taninos, metil-éters, hidantoína e ácidos tânicos (Revilla, 20010), além de vários iridoides glicosídicos como a genipina (Jensen, 1973) e o ácido geniposídico em frutos, folhas e caules (Guarnaccia *et al.*, 1972; Uesato *et al.*, 1986), o geniposídeo (Jensen, 1983), o gardenosídeo nos frutos e no caule (Jensen, 1983; Uesato *et al.*, 1986) e a genipina-genitiobiosídeo (Endo e Taguchi, 1973). Ainda há compostos terpênicos como genipacetal, genipamida e genipaol (Ono *et al.*, 2007).

Nas folhas, Silva *et al.* (2018) identificaram treze compostos: coniferina, asstasioside D, ácido geniposídico, tarenosídeo, ácido logânico, ácido clorogênico, kaempferol-3-o-hexoside-deoxyhexoside-7-o-deoxyhexoside, isorhamnetin-3-o-hexoside-deoxyhexoside-7-o-deoxyhexoside, quercitin-3-o-hexoside-deoxyhexoside, ácido 1,3-di-o-cafeoilquínico, teneoside a, kaempferol-3-o-hexoside-deoxyhexoside, isorhamnetin-3-o-hexoside-deoxyhexoside.

A ação anti-helmíntica de *G. americana* sobre nematoides parasitas de animais é um forte indício da presença de um composto com ação nematicida em frutos maduros e um suporte à ação nematicida sobre *Meloidogyne* spp. A ação nematicida sobre

fitonematoides, de extrato de *G. americana*, abre perspectiva para a descoberta de um novo composto com potencial para utilização em agricultura.

O estado fenológico do fruto foi capaz de interferir no resultado, sendo que nos frutos maduros observou-se atividade, enquanto não se constatou efeito algum nos extrato etanólico do fruto verde. Além disso, constatou-se que a atividade é devida a componentes do fruto presentes no mesocarpo e de polaridade intermediária. Isso pode ser constatado pela maior atividade da partição acetato de etila que foi a única capaz de preservar a ação nematicida.

Constatou-se que a maior concentração de compostos fenólicos ocorreu no fruto verde entre os estados fenológicos de maturação e no endocarpo comparativamente ao mesocarpo. Os únicos compostos encontrados no mesocarpo de fruto maduro foram o ácido cafeoilgeniposídico, ácido p-coumaroilgeniposídico e feruloil gardosideo em concentrações próximas às encontradas no endocarpo. Além desses compostos detectaram um pico não identificado em concentrações próximas no endocarpo e mesocarpo do fruto maduro. Esse composto foi o único não identificado no fruto verde.

Embora nesse estudo não tenham sido identificados os compostos, observou-se ausência de atividade nematicida do extrato do fruto verde onde há predominância da maior parte dos compostos fenólicos e iridoides conforme resultados encontrados por Bentes e Mercadante (2014) o que pode ser um indício de que a atividade possa ser proveniente de um dos três compostos identificados por esses autores ou do pico não identificado pelos mesmos.

De acordo com as Figuras 50, 53 e 56, 59, 62 e 65 constata-se que os três picos de compostos fenólicos encontrados ocorrem na partição acetato de etila e um deles no tempo de retenção aproximadamente de 48,79 min não ocorre na partição hidrometanólica tanto para o pericarpo quanto para o mesocarpo. Dessa forma, esse pode ser

o pico a ser identificado com ação nematicida tendo em vista que ao ser feito o particionamento do extrato etanólico e realizados testes *in vitro* a partição hidrometanólica não apresentou indícios de ação nematicida sendo mantida apenas para a partição acetato de etila.

Um outro composto identificado no fruto por Barbosa (2008) com extração hexânica pela primeira vez foi o ácido cinâmico, composto que pode ter ação nematicida conforme Kong *et al.* (2007) com LC_{50} de $0,750 \text{ mg.ml}^{-1}$ sobre *Bursaphelenchus xylophylus*. No entanto, descarta-se a possibilidade de esse ser o composto com ação nematicida já que a extração realizada nesse estudo foi com extrato etanólico e a partição hexânica de tal extrato não apresentou qualquer indício de ação sobre J_2 de *Meloidogyne* spp.

Nas folhas Silva *et al.* (2018) identificaram treze compostos: coniferina, asstasioside D, ácido geniposídico, tarenosídeo, ácido logânico, ácido clorogênico, kaempferol-3-o-hexoside-deoxyhexoside-7-o-deoxyhexoside, isorhamnetin-3-o-hexoside-deoxyhexoside-7-o-deoxyhexoside, quercitin-3-o-hexoside-deoxyhexoside, ácido 1,3-di-o-cafeoilquínico, teneoside A, kaempferol-3-o-hexoside-deoxyhexoside, isorhamnetin-3-o-hexoside-deoxyhexoside.

Embora trabalhos demonstrem atividade antihelmíntica de extratos hidroalcoólicos de *Genipa americana*, não há estudos anteriores que demonstrem ação nematicida sobre fitonematoides a partir de extratos dessa planta, sendo os resultados encontrados uma perspectiva pela busca de novos compostos com potencial utilização na agricultura.

Quanto ao ácido gálico, composto com maior similaridade para todos os picos encontrados, Nguyen *et al.* (2013) relataram atividade nematicida desse ácido fenólico quando extraído a partir de *Terminalia nigrovenulosa* Bark. Além desse composto

vários outros compostos fenólicos, principalmente ácidos, são relatados como de atividade nematicida conforme Tabelas 6, 7 e 8 supramencionadas no capítulo I desta tese.

Vale destacar que pouco se sabe sobre a atividade de compostos fenólicos e iridoides produzidos por *G. americana* sobre fitonematoides e que, embora seja composto com maior similaridade a partir de banco de dados utilizado, dificilmente o composto com ação nematicida é o ácido gálico, sendo necessários estudos mais aprofundados, inclusive com espectrometria de massa, com acompanhamento de novos experimentos para identificação correta do (s) composto (s) do fruto de jenipapo com ação nematicida sobre *Meloidogyne* spp.

Por fim, ressalta-se a importância desse estudo, sendo o primeiro relato de ação nematicida de *Genipa americana* sobre nematoides do gênero *Meloidogyne*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barbosa DA. (2008) Avaliação **fitoquímica e farmacológica de *Genipa americana* L. (Rubiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 115 pp.

Benincá C (2009) Estabilidade do ácido 5-o-cafeoilquínico: Relação entre a cinética química e o processamento de erva-mate. Dissertação de mestrado (Pós-graduação em Tecnologia de alimentos). Universidade Federal do Paraná, 68pp.

Bentes AS, Mercadante AZ (2014) Influence of the stage of ripeness on the composition of iridoids and phenolic compounds in Genipap (*Genipa americana* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 62: 10800-10808.

Caboni P., Ntalli GN, Aissani N, Cavoski I, Angioni A (2012) Nematicidal activity of (E,E)-2,4-decadienal and (E)-2-decenal from *Ailanthus altissima* against *Meloidogyne javanica*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 60: 1146-1151.

Endo T, Taguchi H (1973) Constituents of *Gardenia jasminoides* geniposide and genipin-gentiobioside. **Chemical Pharmaceutical Bulletin** 21:2684-2688.

Erbano M. **Morfoanatomia de folha e caule das espécies *Centrolobium tomentosum* Guillemín ex Benth. (Fabaceae), *Genipa americana* L. e *Randia armata* (Sw) DC. (Rubiaceae)**. (2010) Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 81pp.

Finney DJ (1947) Probit Analysis: A statistical treatment of the sigmoid response curve, Cambridge: Cambridge University Press. 256 p.

Guarnaccia R, Madyastha KM, Tegtmeyer E, Coscia CJ (1972) Geniposidic acid, an iridoid glucoside from *Genipa americana*. **Tetrahedron Letters** 50: 5125-5127.

Jensen SR (1983) Iridoids in *Rothmannia globosa*. **Phytochemistry** 22(8):1761-1765.

Kong JO, Lee SM, Moon YS, Lee SG, Ahn YJ (2007) Nematicidal Activity of *Cassia* and cinnamon oil compounds and related compounds toward *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). **Journal of Nematology** 39(1):31-36.

Kruchar-Furtado S. (2006). **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vivo***. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 147pp.

Náthia-Neves G, Nogueira GC, Vardanega R, Meireles MAA (2018) Identification and quantification of genipin and geniposide from *Genipa americana* L. by HPLC-DAD usin a fused-core column. **Food Science and Technology** 38(1):116-122.

Nguyen DMC, Seo DJ, Nugyen VN, Kim KY, Park RD, Jung WJ (2013) Nematicidal activity of gallic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* Bark against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Nematology** 15:507-518.

Oliveira LDR. (2013) **Plantas medicinais como alternativa para o controle de *Haemonchus contortus* em ovinos: testes *in vitro* e *in vivo*** (2013) Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) Universidade de Brasília, Brasília, 73pp.

Ono M, Ishimatsu N, Masuoka C, Yoshimitsu H, Tsuchihashi R, Okawa M, kinjo J, Ikeda T, Nohara T (2007) Three new monoterpenoids from the fruit of *Genipa americana*. **Chemistry Pharmacology** 55(4): 632-634.

Revilla J. (2001) Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis. 2. ed. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnologia. 405 p.

Rodrigues PM. (2015) **Estudo químico de Folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (Sapotaceae): Biomonitoramento por inibição da alfa-amilase**. 125p. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília. 2015.

Silva LMP (2017) **Constituintes químicos, perfil térmico e atividade anti-helmintica de *Genipa americana* Linnaeus.** 142p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Rio Grande do Norte, Natal. 142 pp.

Uesato S, Ueda S, Kobayashi K, Miyauchi M, Itoh H, Inouye H. (1986) Intermediacy of 8-epiiridodial in the biosynthesis of iridoide glucosides by *Gardenia jasminoides* cell cultures. **Phytochemistry** 25(10):2309-2314.