



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE, TECNOLOGIA E
SOCIEDADE

ALCILEIDE VIEIRA BARRETO

**IDENTIFICAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE
Rotylenchulus reniformis EM ÁREAS DE CULTIVOS DE
MELOEIRO (*Cucumis melo* L.)**

MOSSORÓ - RN

MAIO - 2018

ALCILEIDE VIEIRA BARRETO

**IDENTIFICAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Rotylenchulus reniformis* EM
ÁREAS DE CULTIVOS DE MELOEIRO (*Cucumis melo* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ambiente, Tecnologia e Sociedade à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA.

Linha de Pesquisa: Tecnologias Sustentáveis e Recursos Naturais do Semi-Árido.

Orientadora: Prof^ª.D.Sc. Ioná Santos Araújo
Holanda

Co-Orientador: Prof^º.D.Sc. Glauber Henrique
de Sousa Nunes

MOSSORÓ - RN

MAIO - 2018

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998 . O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos

B223i Barreto, Alcileide.

IDENTIFICAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE
Rotylenchulus reniformis EM ÁREAS DE CULTIVOS DE
MELOEIRO (Cucumis melo L.) / Alcileide Barreto.
2018.

56 f. : il.

Orientadora: Ioná Santos Araújo Holanda.

Coorientador: Glauber Henrique de Sousa Nunes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ambiente, Tecnologia e Sociedade, 2018.

1. Nematóide. 2. RAPD. 3. Variabilidade
genética. I. Holanda , Ioná , orient. II. Nunes,
Glauber, co-orient. III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

ALCILEIDE VIEIRA BARRETO

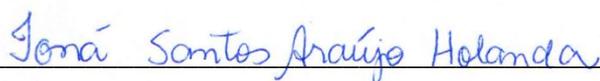
**IDENTIFICAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Rotylenchulus reniformis* EM
ÁREAS DE CULTIVOS DE MELOEIRO (*Cucumis melo* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ambiente, Tecnologia e Sociedade à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA.

Linha de Pesquisa: Tecnologias Sustentáveis e Recursos Naturais do Semi-Árido.

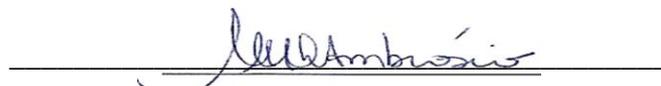
Aprovado em: 05/02/ 2018

BANCA EXAMINADORA



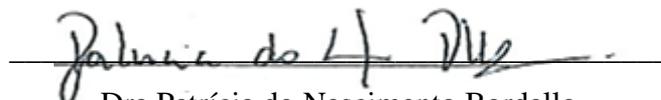
Prof^a D. Sc. Ioná Santos Araújo Holanda (UFERSA)

Orientadora



Prof^a D. Sc. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio (UFERSA)

Membro Examinador



Dra Patrícia do Nascimento Bordallo

Membro Externo

Dedico a todas da minha família, em especial minha mãe, Maria Aurivaneide Vieira, por todo seu amor e afeição por estar sempre ao meu lado.

Ao meu querido pai José da Paz Barreto (*in memoriam*)

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por todas as oportunidades que me fez aprender e crescer ao longo dessa caminhada.

A minha mãe, tia Vaininha, tia Cineide, tia Aurineide e todos da minha família.

A minha orientadora Prof^a D. Sc. Ioná Santos Araújo Holanda (UFERSA) por todos os ensinamentos, disponibilidade, dedicação e profissionalismo.

Ao meu Co-Orientador: Prof^o.D.Sc. Glauber Henrique de Sousa Nunes por toda ajuda, apoio e incentivo.

Agradeço a banca, Prof^a D. Sc. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio (UFERSA) e Dra Patrícia do Nascimento Bordallo, por todas as contribuições.

A professora Prof^a D. Sc. Selma Rogéria de Carvalho Nascimento (UFERSA) pelo uso do laboratório e consentimento quanto ao uso dos equipamentos.

A todos do laboratório da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) por toda apoio no tocante às análises experimentais.

A todos do grupo de Estudos em Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas (GERMEV).

A minha amiga Anânkia por toda a contribuição e ensinamentos.

Aos colaboradores Maria Cedroni e Thomas Cedroni pelas correções do Inglês.

A todos os colegas do laboratório de Biotecnologia pelos ensinamentos.

Aos alunos do Iniciação Científica por todo o aporte na condução do experimento.

A todos os amigos pelo carinho e amizade, Cleide, Daniele, Francisca, Sineide e Stefani.

A Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), ao Coordenador do Programa de Pós-graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade: Francisco Marlon Carneiro Feijó e, a todos os professores que compõe o Programa de Pós-Graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade, pela contribuição na minha formação profissional.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo.

Muito obrigada!

IDENTIFICAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Rotylenchulus reniformis* EM ÁREAS DE CULTIVOS DE MELOEIRO (*Cucumis melo* L.)

RESUMO

Este trabalho objetivou identificar através de análises microscópicas e moleculares a presença do nematoide *Rotylenchulus reniformis* em diferentes áreas produtoras de melão e verificar a diversidade genética. Foram coletadas 30 amostras de solos em diferentes áreas de cada fazenda, são elas: cinco do estado do Rio Grande do Norte (Dinamarca, Brazil Melon, CY Matsumoto, Itaueira e Agrícola Famosa) e uma do Ceará (Mata Fresca). Onde, as amostras foram levadas para casa de vegetação e semeadas com a cultivar de melão Vedrantais. Após 35 dias da semeadura, as plantas foram coletadas e suas raízes submetidas ao processo de coloração para identificação microscópica de *R. reniformis*. O DNA das raízes do meloeiro foi extraído visando as análises moleculares com os *primers* universais para nematoides e genes específicos para *R. reniformis*. Para o estudo da diversidade genética, *R. reniformis* foi isolado de suspensões de amostras do solo em microscópio óptico. Em seguida o DNA dos mesmos foi extraído através do kit de extração NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel)[®]. As análises do DNA foram realizadas a partir da triagem de 20 iniciadores RAPD. Os dados gerados foram analisados pelo programa Genes. Das 22 amostras de raízes avaliadas microscopicamente, apenas três revelaram a presença de fêmeas de *R. reniformis*. No que tange as análises moleculares com o *primer* universal, 15 áreas pertencentes a cinco fazendas foram positivas para a presença do DNA de nematoides. Já as análises com *primers* genes específicos revelaram que seis áreas, restritas a duas fazendas (Itaueira e Mata Fresca), foram confirmadas com a presença de *R. reniformis*. Apenas nove dos 20 iniciadores RAPD foram selecionados para a análise de diversidade, os quais geraram 67 bandas polimórficas (95,71 %) e três monomórficas (4,29%), evidenciando assim um alto polimorfismo, perfazendo uma média de 7,4 bandas polimórficas por iniciador. O iniciador com maior número de bandas polimórficas foi o OPAA-04 com 11 bandas enquanto o OPA-03 foi o iniciador que apresentou o menor número (5). Um dendrograma foi construído pelo método hierárquico UPGMA. Utilizando um ponto de corte de 0,55, verificou-se dois grupos. O primeiro formado pelas fazendas Iraueira e Mata Fresca e o segundo grupo pelas demais fazendas. As estimativas de correlação cofenética, estresse e distorção indicaram que o agrupamento foi eficiente e com pequena perda de informação. Já para o dendrograma obtido a partir de 51 amostras de *R. reniformis*, observou-se a formação de seis grupos. O maior grupo formado foi o V, contemplando 34 amostras, aproximadamente 66,7%. A correlação cofenética foi estimada em 0,77%. Verificou-se que o estudo não indicou nenhuma associação entre as magnitudes das dissimilaridades e a origem das amostras. Verificou-se que o maior (0,92) e o menor (0,27) valor de similaridade encontrado foi entre amostras pertencentes à Fazenda Itaueira. O estudo indica que há variabilidade entre as amostras com um coeficiente médio de dissimilaridade de 0,63 e um coeficiente de variação 14,88%. Este é o primeiro estudo da variabilidade genética com marcadores moleculares realizado com amostras oriundas de campos de produção da principal região exportadora de melão no Brasil.

Palavras-Chave: Nematóide, RAPD, Variabilidade genética.

IDENTIFICATION AND GENETIC DIVERSITY OF *Rotylenchulus reniformis* IN AREAS OF MELON CROPS (*Cucumis melo* L.)

ABSTRACT

This research aimed to identify through microscopic and molecular analyzes the presence of the nematode *Rotylenchulus reniformis* in different melon producing areas and verify the genetic diversity. Soil samples were collected from five farms in the state of Rio Grande do Norte (Dinamarca, Brazil Melon, CY Matsumoto, Itauera and Agrícola Famosa) and one from Ceará (Mata Fresca). Thirty soil samples were collected in different areas of each farm, which were taken to greenhouse and sown with Vedrantais melon. After 35 days of sowing, the plants were collected, and their roots submitted to the staining process for microscopic identification of *R. reniformis*. The DNA of the roots of the melon was extracted aiming the molecular analyzes with the universal primers for nematodes and genes specific for *R. reniformis*. For the genetic diversity study, *R. reniformis* was isolated from suspensions of soil samples under an optical microscope. Then the DNA from them was extracted through the NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel) ® extraction kit. DNA analyzes were performed from the screening of 20 RAPD primers. The data generated were analyzed by the Genes program. Of the 22 root samples evaluated microscopically, only three showed the presence of *R. reniformis* females. Regarding the molecular analyzes with the universal primer, 15 areas belonging to five farms were positive for the presence of nematode DNA. The analyzes with specific genes primers revealed that six areas, restricted to two farms (Itauera and Mata Fresca), were confirmed with the presence of *R. reniformis*. Only nine of the 20 RAPD primers were selected for diversity analysis, which generated 67 polymorphic bands (95.71%) and three polymorphic bands (4.29%), thus evidencing a high polymorphism, with an average of 7.4 bands polymorphic by primer. The primer with the highest number of polymorphic bands was OPAA-04 with 11 bands whereas OPA-03 was the primer with the lowest number (5). A dendrogram was constructed using the UPGMA hierarchical method. Using a cutoff of 0.55, two groups were found. The first one, was formed by the farms Itauera and Mata Fresca and the second group by the other farms. The estimates of cophenetic correlation, stress and distortion indicated that the grouping was efficient and with little loss of information. For the dendrogram obtained from 51 *R. reniformis* samples, the formation of six groups was observed. The largest group formed was V, contemplating 34 samples, approximately 66.7%. The cophenetic correlation was estimated at 0.77%. It was found that the study did not indicate any association between the magnitudes of dissimilarities and the origin of the samples. It was verified that the largest (0.92) and the lowest (0.27) value of similarity was found among samples belonging to Fazenda Itauera. The study indicates that there is variability between samples with a mean dissimilarity coefficient of 0.63 and a coefficient of variation of 14.88%. This is the first genetic variability study with molecular markers performed with samples from the production fields of the main melon exporting region in Brazil.

Key words: Nematode, RAPD, Genetic variability.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fragmentos de raízes com nematoides A, B, C e D, coletados da fazenda Itaueira, coloridos pelo método de Byrd, 1983, em suas respectivas áreas de coleta..... 35
- Figura 2 - Amostras de fragmentos de DNA extraídos de raízes de *Cucumis melo* L. amplificados com *primers* universal de nematoides D2A e D3B. Amostras das Fazendas DINAMARCA (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11), BRAZIL MELON (12,13,14,15), MATA FRESCA (17,18,19,20,21), ITAUEIRA.....37
- Figura 3 - Amostras de fragmentos de DNA extraídos de raízes de *Cucumis melo* L. amplificados com *primers* específicos da espécie *R. reniformis*. D2A e R2A. Fazendas ITA (22, 23, 24 e 25). M - Marcador de peso molecular..... 39
- Figura 4 - Padrão eletroforético de 32 genótipos de *Rotylenchulus reniformis* obtido pelo marcador molecular *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) com o *primer* OPAA-17.41
- Figura 5 - Dendrograma baseado no método da média aritmética não ponderada (UPGMA), obtido a partir da matriz do complemento do índice de coincidência simples de seis fazendas em que foram coletadas amostras de solo para avaliar a presença de *R. reniforme*. Mossoró. 42
- Figura 6 - Dendrograma baseado no método da média aritmética não ponderada (UPGMA), obtido a partir da matriz do complemento de Jaccard de 51 amostras de nematoides. (Correlação cofenética = 0,77**; Estresse = 1,2%, Distorção = 11,12%). Ponto de Corte = 0,64..... 43
- Figura 7 - Distribuição de frequência da dissimilaridade (complemento de Jaccard) obtida a partir de RAPD de 51 amostras de nematoides coletadas em fazendas produtoras de meloeiro.44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Fazendas e suas respectivas áreas de coletas, estados e localizações	26
Quadro 2 - Identificação e localização dos 51 genótipos de <i>Rotylenchulus reniformis</i> coletados em solos provenientes das fazendas Itaueira e Mata Fresca, nos municípios de Ipanguaçu-RN e Aracati-CE.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos <i>primers</i> universais (1,2) e <i>primers</i> genes específicos (3,4,5) do <i>Rotylenchulus reniformis</i>	29
Tabela 2 - Iniciadores <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (RAPD) selecionados para amplificação do DNA dos de fitonematoides <i>Rotylenchulus reniformis</i> . Mossoró/RN, 2017.	32
Tabela 3 - Análises microscópicas da raiz e presença de fêmeas adultas de <i>R. reniformis</i> feitas em amostras de solo e raízes oriundas de fazendas produtoras de melão.	36
Tabela 4 - Número de amostras analisadas com <i>primers</i> universais e específico para <i>R. reniformis</i> em amostras de seis fazendas produtoras de meloeiro.....	37
Tabela 5 - Triagem dos 20 <i>primers</i> RAPD.....	40
Tabela 6 - Número total de fragmentos (NTF), número total de fragmentos polimórficos (NFP) e percentagem de polimorfismo (%) de nove iniciadores <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (RAPD) selecionados para amplificação de genótipos de fitonematoides <i>R. reniformis</i> c	40

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

BNB	Banco do Nordeste Brasileiro
CIA	Clorofórmio-álcool isoamílico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HCl	Ácido Clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
KCl	Cloreto de potássio
MDIC	Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NFP	Número total de fragmentos polimórficos
NTF	Número total de fragmentos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNA ou ARN	Ácido ribonucleico
rpm ou RPM	Rotações por minuto
SECEX	Secretaria de Comércio Exterior

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 A CULTURA DO MELÃO	18
2.2 IMPORTÂNCIA ECONOMICA DO MELÃO	19
2.3 FITONEMATOIDES QUE AFETAM A CULTURA DO MELÃO	20
2.4 <i>Rotylenchulus reniformis</i>	21
2.5 MARCADORES GENES ESPECÍFICOS UTILIZADOS NA DETECÇÃO DE FITOPATÓGENOS	22
2.6 CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA POR MARCADORES RAPD	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 GERAL	25
3.2 ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO	26
4.2 AMOSTRAGEM DO SOLO	26
4.3 CULTIVO DAS SEMENTES DE MELÃO	27
4.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA DAS RAÍZES	27
4.5 EXTRAÇÃO DO DNA DOS NEMATOIDES A PARTIR DAS RAÍZES DO MELOEIRO	28
4.6 ANÁLISE MOLECULAR A PARTIR DE <i>PRIMERS</i> UNIVERSAIS E GENES ESPECÍFICOS	29
4.7 EXTRAÇÃO DOS NEMATOIDES DO SOLO	30
4.8 ANÁLISES MICROSCÓPICAS DAS FÊMEAS ADULTAS DE <i>Rotylenchulus reniformis</i>	30

4.9 EXTRAÇÕES DO DNA DE ROTYLENCHULUS RENIFORMIS ISOLADOS DE SOLO E CONFIRMAÇÃO VIA PCR COM <i>PRIMERS</i> GENES ESPECÍFICOS	31
4.10 DIVERSIDADE GENÉTICA.....	31
4.11 LEITURA DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA DA DIVERSIDADE GENÉTICA	32
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
6.1 ANÁLISE MICROSCÓPICA E ISOLAMENTO de <i>R. reniformis</i>	34
6.2 CONFIRMAÇÃO MOLECULAR	36
6.3 DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Rotylenchulus reniformis</i> ISOLADOS	40
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO GERAL

A produção brasileira de melão (*Cucumis melo* L.) concentra-se na região Nordeste que é o maior centro produtor de frutas do país, correspondendo a mais de 95% da produção nacional e 87,3% da área cultivada. Os maiores produtores são os estados do Ceará e o Rio Grande do Norte, estados que correspondem com mais de 90% do melão brasileiro nos últimos 24 anos. (IBGE, 2016).

Não obstante, a cultura do melão assim como outras culturas de importância econômica ao longo do seu desenvolvimento e produção sofre influência de fatores como a temperatura que favorecem o surgimento de doenças. Algumas doenças são provocadas por uma grande diversidade de agentes patogênicos como bactérias, fungos, nematoides e vírus, que podem causar a redução da produtividade e interferir na qualidade dos frutos (MOURA, 2012).

A exploração comercial do meloeiro é praticada de modo contínuo, geralmente sem rotação de culturas, e isso cria um ambiente favorável para o desenvolvimento de microrganismos tal como os nematoides (GAZAWAY; MCLEAN, 2003).

Um levantamento nematológico na cultura do meloeiro realizado em 2006 em municípios do estado do Rio Grande do Norte e Ceará apontou nematoides pertencentes ao gênero *Rotylenchulus* em 53% dessas áreas superando o *Meloydogyne*, demonstrando o potencial de disseminação que nematoides desse gênero provocam na cultura do melão (TORRES et al., 2007). Embora nenhum outro levantamento nematológico mais recente tenha sido feito, sabe-se que nematoides do gênero *Rotylenchulus* continuam sendo encontrados na cultura do melão dessas regiões.

Dentre as espécies do gênero *Rotylenchulus*, *Rotylenchulus reniformis* merece destaque, pois é a espécie mais importante deste gênero, considerada como uma das principais pragas do algodão e outras culturas nos Estados Unidos. (ROBINSON et al., 1997). Ainda, segundo Robinson, a perda anual estimada para a colheita de algodão dos EUA é de 130 milhões de dólares.

O primeiro relato do *R. reniformis* em meloeiro no Brasil, realizado por Moura et al. (2002), destacaram os principais sintomas gerais vistos em plantações comerciais de melão tais como: falhas de germinação, plantas com amarelecimento discreto, forte nanismo e frutos com dimensões e características gerais inferiores.

A biotecnologia tem contribuído para o conhecimento genômico de microrganismos mediante a utilização de marcadores moleculares. Estes marcadores permitem identificar corretamente a espécie estudada, tal como os marcadores genes específicos, além de avaliar sua

variabilidade genética como os marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). A variabilidade genética pode estar associada à diferenças nas características fisiológicas do microrganismo, podendo assim, causar danos distintos nas culturas a ele susceptíveis (CENIS et al., 2003).

A identificação dos nematoides ainda hoje é majoritariamente realizada a nível morfológico por taxonomistas (CORDEIRO et al., 2008a). Além de estudos com uso de microscópio (ótico ou eletrônico) que se baseiam na morfologia dos nematoides, pode-se também utilizar outras técnicas, por exemplo, eletroforese de isoenzimas e métodos moleculares (GOULART, 2010). Esta última forma de análise tem sido aplicada com sucesso para a identificação de espécies (CORDEIRO et al., 2008a; SIQUEIRA et al., 2009; SAYLER et al., 2012) porque são utilizados marcadores genes específicos que dão maior confiabilidade aos estudos por se basearem em regiões específicas do DNA da espécie e por não sofrerem influência ambiental (HERRERA-VÁSQUEZ et al., 2007). Com o diagnóstico a nível molecular, é possível identificar de forma específica, o *R. reniformis* em amostras de solo, o que se torna relevante no auxílio do diagnóstico e manejo em áreas infestadas (CORDEIRO et al., 2008a).

Dentro deste contexto, o uso de cultivares resistentes PAV de melão a doenças é um importante alternativa para o manejo de áreas infestadas. Existem poucos relatos sobre a reação de genótipos de meloeiro ao nematoide *R. reniformis*. Desta forma, a recomendação de cultivares comerciais para plantio em áreas com infestação, sem o referido conhecimento, representa sério risco a produção.

Considerando a importância da cultura do melão para o estado do Rio Grande do Norte e Ceará que vem sofrendo interferências patogênicas causadas pelo nematoide *R. reniformis*, se faz necessário realizar estudos que identifiquem a presença precoce de tal patógeno, de modo que possam incentivar a busca de estratégias de manejo que venham a ser úteis para minimizar os danos que são ocasionados à cultura. Desse modo, esse trabalho tem por objetivo identificar o fitonematoide *R. reniformis* através de análises microscópicas e moleculares em solos de plantações comerciais de meloeiro cultivados no Estado do Rio Grande do Norte e Ceará e caracterizar a diversidade genética dos mesmos

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A CULTURA DO MELÃO

O melão (*Cucumis melo* L.) pertence à família das Cucurbitáceas, que inclui vários outros vegetais de importância econômica, tais como pepino, melancia, abóbora e cabaças. *C. melo* é a espécie mais variável do gênero *Cucumis*, com grande diversidade da forma e tamanho do fruto. (PITRAT, 2008).

O meloeiro é uma planta herbácea e rasteira, com frutos de formato variável (redondo, oval ou alongado), com 20 a 25 cm de diâmetro, casca lisa, enrugada ou rendilhada, pesando de um a quatro quilos em média, dependendo do tipo e da cultivar. A sua polpa também varia segundo o tipo, sendo observado coloração branca, amarelada, esverdeada, laranja e salmão. O fruto é constituído de 90% de água e contém vitamina A, C e E, além de sais minerais. (MOREIRA et al., 2009).

Alta temperatura, alta luminosidade e baixa umidade relativa constituem a combinação adequada de fatores climáticos para o estabelecimento da cultura e obtenção de alta produtividade com frutos de qualidade superior (SILVA et al., 2014).

A produção de melão teve início no Rio Grande do Norte com a criação do Pólo de Desenvolvimento Integrado Assú-Mossoró que foi implantado pelo Banco do Nordeste Brasileiro (BNB) no final dos anos 1980, a partir da junção das duas diferentes zonas, Assú e Mossoró. Essas zonas que compõem o referido pólo de produção de frutas irrigadas do Rio Grande do Norte, situado no semiárido do estado, onde o cultivo de melão irrigado se desenvolveu a partir do início da década de oitenta (HESPANHOL, 2015).

Os municípios de Mossoró e Baraúna, localizados no Rio Grande do Norte, são os maiores produtores de melão do país, embora nos últimos anos tenha havido significativa expansão do cultivo de melão no Estado do Ceará, alçado ao primeiro lugar na exportação dessa fruta nos anos de 2013 e 2014, deixando o Rio Grande do Norte na segunda posição, de acordo com os dados da Secretaria de Comércio Exterior (SECEX) do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC) citado por Hespanhol (2015).

No Agropolo Mossoró-Assú, são produzidos vários híbridos dos diversos tipos de melão dos grupos *inodorus* e *cantaloupensis*. Dentre os híbridos existentes, aqueles pertencentes à variedade botânica *Inodorus* Naud. são os mais cultivados. O maior destaque é o tipo amarelo em razão da maior conservação pós-colheita, condições mais simples de manejo e transporte (SALES JÚNIOR et al., 2006).

A cultura do melão tem promovido diversificação das atividades agrícolas, desempenhando um papel socioeconômico de grande importância nas regiões produtoras, contribuindo de forma significativa para a mudança do quadro social daqueles que têm na agricultura sua forma de sustento (SILVA et al., 2014).

O melão atinge maturação entre 60 a 90 dias após a semeadura, dependendo da região. Segundo Silva et al. (2000), por se tratar de planta de ciclo curto proporciona colheitas dos 55 aos 75 dias, geralmente em intervalos de três a cinco dias, atingindo em média três a cinco colheitas, concentrando-se a produção nas duas primeiras.

2.2 IMPORTÂNCIA ECONOMICA DO MELÃO

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma hortaliça de grande importância econômica sendo cultivada em 101 países, tendo ocupado uma área em 2013 de aproximadamente 1,19 milhões de hectares e uma produção de 29,46 milhões de toneladas. A China é o maior produtor com 48,9%, seguida pela Turquia com 5,8%, pelo Irã com 5,1% e pelo Egito com 3,5% (FAOSTAT Data, 2015). Em 2013, o Brasil foi o 12º maior produtor mundial com aproximadamente 565,9 mil toneladas em uma área colhida de 22,1 mil hectares, configurando uma produtividade média de 25,7 mil toneladas por hectare (SIDRA/IBGE, 2015), sendo os estados do Ceará e do Rio Grande do Norte os líderes com mais de 90% da produção do melão brasileiro.

Devido à qualidade do melão produzido no estado do Rio Grande do Norte, a demanda dos mercados foi crescendo fazendo com que as áreas cultivadas fossem se expandindo ano após ano. O produtor foi ganhando espaço no mercado interno, e em seguida, no mercado externo, fazendo com que os produtores se adequassem as exigências requeridas por esse mercado. (BRAGA SOBRINHO, et al., 2009). Considerando esse potencial e a crescente valorização dos requisitos de qualidade pelos mercados consumidores de frutas, especialmente o internacional, a cultura do melão foi inserida no rol das frutas contempladas pelo Sistema de Produção Integrada (PI), que gera alimentos e outros produtos agrícolas de qualidade pela utilização de recursos naturais e de tecnologias adequadas, o que minimiza o uso de insumos e contaminantes, preserva o meio ambiente, a saúde dos trabalhadores e consumidores e assegura uma produção sustentável (FREITAS; ANDRADE; BRAGA, 2009).

O melão é uma cultura de grande importância socioeconômica para o Nordeste Brasileiro, gerando nessa cadeia produtiva em torno de 28 mil empregos diretos e 94 mil empregos indiretos, principalmente nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará (ANDRADE; FREITAS; SOBRINHO, 2009).

Nos principais agro-pólos acima citados ocorre o desenvolvimento socioeconômico através da geração de emprego e renda para milhares de pessoas. Com isso, a preocupação dos produtores em produzir melões em qualidade e quantidade para atender o mercado interno e externo. Segundo Crisóstomo et al. (2008), o agronegócio do melão brasileiro é um exemplo típico de evolução rápida para a inserção no mercado global, tendo a participação de grandes, médios e pequenos produtores.

2.3 FITONEMATOIDES QUE AFETAM A CULTURA DO MELÃO

Com a expansão das áreas cultivadas de melão, o surgimento de pragas e doenças que acometem a cultura é uma realidade. No caso dos nematoides, algumas espécies apresentam alta capacidade de reprodução e podem, ao longo do tempo, causar declínio da planta e redução na vida útil (ARIEIRA, 2008).

Os nematoides fitoparasitas são vermes microscópicos que habitam o solo e atacam as plantas (geralmente raízes), causando sérios danos às culturas agrícolas e acarretando sérios prejuízos econômicos ao produtor rural (GOULART, 2010).

Os nematoides mais importantes devido aos danos causados a cultura do melão são: *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Radopholus*, *Rotylenchulus*, *Nacobbus* e *Tylenchulus*. Esses parasitas têm um estilete bucal que, além de retirar substâncias nutritivas das plantas, viabilizam a injeção de substâncias tóxicas no interior da célula vegetal (ROSSETO; SANTIAGO, 2016).

Os sintomas ocasionados pelos fitonematoides geralmente começam a ser percebidos na parte aérea da planta, que passa a ter dificuldade para retirar água e nutrientes do solo. Normalmente, os ataques ocorrem em reboleiras, onde as plantas apresentam menor crescimento e amarelecimento das folhas. Os fatores que mais influenciam a ação dos nematoides são: solo, clima, região e tipo do manejo (ROSSETO; SANTIAGO, 2016).

As perdas anuais causadas por *Meloidogynes* pp. às culturas do algodão, café e cana-de-açúcar são da ordem de US\$ 4,1 bilhões, US\$ 2,6 bilhões e US\$ 16,5 bilhões, respectivamente. Nos Estados Unidos, as perdas devido a injúrias causadas pelos nematoides são aproximadamente \$ 40.8 milhões por ano (NUGENT; DUKES, 1997). No Brasil foi relatado por Pereira et al. (2008), perdas causadas pelo nematoide das galhas *M. mayaguensis* em cultivos de goiaba, em cinco estados (RN, CE, RJ, PE e BA), com um valor estimado em 112,7 milhões de reais, aos quais se acrescentam o desemprego de 3.703 trabalhadores rurais em

tempo integral devido ao declínio e morte dos pomares. Em, propriedades produtoras de melão, nos municípios de Mossoró e Açu, localizada na região oeste do estado do Rio Grande do Norte, foi relatado por Moura et al. (2002), áreas com redução crescente em produtividade em virtude de nematoides dos gêneros *Meloidogyne* e *Rotylenchulus*.

Várias espécies de fitonematoides têm sido encontradas associadas à cultura do melão, causando reduções de rendimento, a exemplo de *Meloidogyne incognita*, *Rotylenchulus reniformis* (LINFORD; OLIVEIRA, 1940) (MOURA et al., 2002) e *Pratylenchus brachyurus* (TORRES et al., 2004). Estas três espécies de fitonematoides estão entre as dez de maior importância mundial (JONES et al., 2013), com capacidade de parasitar também a cultura da soja, sendo um desafio manter suas populações abaixo do nível de dano nos sistemas de produção vigentes no Brasil (ASMUS; GALBIERI, 2016).

No Brasil, áreas exploradas com meloeiro também apresentam problemas fitonematológicos como fatores limitantes à produção conforme citam Lima et al. (1995) em relação a *Meloidogyne* spp. no município de Assú-RN; Moura et al. (2002), nos municípios de Mossoró e Assú e, Torres et al. (2007), em relação ao *R. reniformis* nos estados do Rio G. do Norte e Ceará. No que se refere aos danos, e conseqüentemente, perdas de produção por esses parasitas, a porcentagem é mais elevada em condições de climas tropicais e subtropicais (14,6%) do que em regiões de climas temperados (8,8%) (NICOL et al., 2011).

2.4 *Rotylenchulus reniformis*

O nematoide reniforme do gênero *Rotylenchulus* compreende 11 espécies válidas, sendo caracterizados como semi-endo parasitos de inúmeras espécies de plantas e encontram-se distribuídos principalmente em regiões tropicais e subtropicais (PALOMARES-RIUS et al., 2017).

A espécie *R. reniformis* é a mais importante do gênero, considerada como a principal praga do algodão e outras culturas nos Estados Unidos e em vários outros países (ROBINSON et al., 1997). Nos Estados Unidos são os nematoides de galhas (*M. incognita*) e o reniforme (*R. reniformis*) os economicamente mais importantes parasitos de plantas infestantes no algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). Este último, na cultura do algodoeiro, usualmente causa perdas de 10 a 25 %, podendo chegar a 50% em condições de déficit hídrico (KIRKPATRICK E ROBBINS, 2000). O nematoide *R. reniformis* causou perdas de 10,7% a produção de algodão nas principais regiões produtoras dos EUA (BLASINGAME, 2000).

O ciclo de vida do *R. reniformis* varia com a espécie vegetal e temperatura do solo havendo relato de que a duração pode ser menor que três semanas ou maior que dois anos se a planta hospedeira não estiver presente e o solo permanecer seco (ROBINSON et al., 1997). Em geral, nematoides apresentam ciclo de vida mais curto em clima tropical, resultando em crescimento populacional rápido, quando comparado a condições de clima temperado (LUC et al., 2005). As infecções causadas pelo *R. reniformis* começam quando a fêmea penetra no córtex da raiz por meio das células de alimentação dos nematoides especializadas que são reguladas por genes de parasitismo expressos dentro das glândulas esofágicas e entregues na célula de alimentação através do estilete (DAVIS et al., 2004).

R. reniformis é uma praga agrícola que apresenta impacto econômico nas zonas temperadas quentes, tropicais e subtropicais do Brasil e de outros países. Atualmente, a resistência genética não está disponível em variedades comerciais de melão.

2.5 MARCADORES GENES ESPECÍFICOS UTILIZADOS NA DETECÇÃO DE FITOPATÓGENOS

Técnicas moleculares desenvolvidas a partir de 1960 permitiram realizar a detecção e identificação de vírus, bactérias, nematoides e fungos patogênicos em plantas cultivadas (ARRIEL et al., 2009). Porém, foi no final da década de 80, com o surgimento da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) que consiste em replicação de segmentos específicos do DNA genômico *in vitro*, tornou-se possível analisar com mais precisão o DNA dos indivíduos, e desse modo, determinar pontos de interesse no cromossomo dos mesmos. Tais técnicas permitem um estudo mais complexo de características de importância ligadas aos fatores genéticos, por analisar regiões específicas ou não do genoma.

A aplicação de marcadores moleculares utilizando *primers* genes específicos, é uma importante ferramenta no estudo de indivíduos de diferentes espécies, pois, a versatilidade e sensibilidade da PCR proporcionam diversas alternativas ao uso de marcadores moleculares e a possibilidade de se comparar região do DNA genômico das sequências conservadas nos indivíduos. (ARRIEL et al., 2009).

Estudos realizados por Cordeiro et al. (2008a), diagnosticaram por meio de análises moleculares a presença do nematoide *R. reniformis* em amostras de solos infestados. Esta pesquisa representou o primeiro relato para um diagnóstico molecular de *R. reniformis* no Brasil. Moura (2012), através de análises moleculares, utilizando *primers* genes específicos, detectou

a presença do Vírus da Mancha Necrótica do Melão em raízes de meloeiro, cultivadas em solos coletados em diferentes áreas produtoras do Estado do Rio Grande do Norte e Ceará.

A identificação a nível molecular tem o potencial de identificar a presença do nematoide em diversas amostras, facilitando a diagnose, diferenciação de outras espécies e controle. (CORDEIRO et al., 2008b). Ainda segundo CORDEIRO et al. (2008b), o especialista libera-se em parte da rotina de identificação de espécies já caracterizadas e pode dedicar-se a trabalhos mais específicos, como identificação de novas espécies.

2.6 CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA POR MARCADORES RAPD

Os marcadores moleculares são sequências de DNA, expressas ou não, que podem distinguir indivíduos geneticamente diferentes. Esta tecnologia tem grande aplicação em várias áreas por possibilitarem rapidez nas análises, não sofrerem influência do ambiente e permitem ampla cobertura do genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A análise genética com marcadores RAPD é uma técnica que permite verificar a baixo custo a existência de polimorfismo e detectar diferenças genéticas entre e dentro das espécies (AREIAS et al., 2006). A técnica é basicamente uma variação do protocolo de PCR, porém usa-se apenas um único *primer* de sequência arbitrária ao invés de um par de *primers* (FERREIRA; GRATTAPLAGIA, 1995). Sendo de sequências arbitrárias, esses *primers* permitem a geração de perfis diferentes em cada indivíduo. A avaliação desses perfis indica o grau de polimorfismos, ou seja, o grau de diversidade genética, entre as amostras (REIS, 2002).

Os marcadores genéticos RAPD (WILLIAMS et al., 1990) têm sido utilizados nos estudos de diversidade genética, possibilitando a diferenciação entre gêneros e espécies de microrganismos. Ricardo et al. (2001), caracterizou molecularmente diferentes raças do nematoide-de-cisto-da-soja, e Teixeira et al. (2004), estudou a diversidade genética de dez isolados de fungos obtidos de sementes de milho, com isso, reforçam a eficiência da técnica RAPD para estas finalidades.

Dentre os marcadores moleculares, as técnicas baseadas no DNA, introduzidas nas últimas décadas são capazes de identificar polimorfismos nas sequências desta molécula. Suas principais vantagens são a exclusão das influências ambientais, podendo ser realizadas em qualquer estágio de crescimento, podendo utilizar qualquer parte do organismo, sendo necessária uma pequena quantidade de material biológico. Marcadores moleculares têm sido utilizados com eficiência para acessar a variabilidade genética de *R. reniformis* (ARIAS et al., 2009).

Dessa forma, os marcadores moleculares são ferramentas poderosas na geração de informações úteis que complementam informações ecológicas, morfológicas, agronômicas dos recursos genéticos, contribuindo para aumentar a eficiência de diversos processos em diferentes áreas da pesquisa (FALERO, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Identificação da presença e caracterização da diversidade genética do fitonematoide *Rotylenchulus reniformis* em áreas de cultivos comerciais do meloeiro (*Cucumis melo* L.) nos estados do Rio Grande do Norte e do Ceará.

3.2 ESPECÍFICOS

- Identificar microscopicamente o nematoide *R. reniformis*.
- Identificar molecularmente *R. reniformis* em amostras de raízes de melão através de *primers* genes específicos.
- Caracterizar a diversidade genética do *R. reniformis* em áreas produtoras de melão dos estados do Rio Grande do Norte e Ceará, por meio dos marcadores RAPD.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido na casa de vegetação e nos laboratórios de Biotecnologia Vegetal, Microbiologia e Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, localizado no município de Mossoró-RN, e no laboratório de Nematologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, localizado em Recife-PE.

4.2 AMOSTRAGEM DO SOLO

As coletas de solo foram realizadas em seis fazendas de cultivos comerciais de melão, onde em cada uma foram coletadas 30 amostras de solo de 22 diferentes áreas entre elas. Na fazenda Dinamarca, foram coletados em cinco diferentes áreas; na fazenda *Brazil Melon*, cinco áreas; Mata Fresca, duas áreas; CY Matsumoto, apenas uma área; Itauera, seis áreas e na fazenda Agrícola Famosa, três áreas. Sendo cinco fazendas localizadas no estado do Rio Grande do Norte e uma no Ceará (Quadro. 1).

Quadro 1- Fazendas e suas respectivas áreas de coletas, estados e localizações

FAZENDA	ÁREA	ESTADO	LOCALIZAÇÃO
Dinamarca	23	RN	S 04° 53' 40.2" W 037° 23' 49.2"
	94	RN	S 04° 54' 30.6" W 037° 22' 27.9"
	95	RN	S 04° 55' 02.6" W 037° 24' 10,4"
	118	RN	S 04° 55' 02.6" W 037° 24' 10,4"
	162	RN	-
Brazil Melon	29	RN	S 04° 54' 30.8" W 37° 22' 27.8"
	30	RN	S 04° 54' 39,0" W 37° 22' 23,3"
	132	RN	-
	118	RN	S 04° 56' 02.7" W 037° 27' 41.9"
Mata Fresca	119	RN	-
	0702	CE	S 04°52' 32.7" W 037° 30' 16.8"
CY Matsumoto	2301	CE	S 05°12' 05.4" W 037° 19' 32.1"
	AE	RN	S 5°04' 30.16" W 37° 42' 40.85"
Itauera	BI	RN	S 05° 28' 18,7" W 036° 51' 59,6"
	P1B1A	RN	S 05° 27. 85.2" W 036° 51.945"
	P1B1B	RN	S 05° 28. 402" W 036° 52. 023"
	P2B1A	RN	S 05° 28. 522" W 036° 51. 976"
	P2B1B	RN	S 05° 38. 717" W 036° 51. 961"

	P1B2	RN	S 05° 29. 099'' W 036° 52. 104''
Agrícola Famosa	L9	RN	S 04° 50' 33.6'' W 037° 20' 34.5''
	L10	RN	S 04° 50' 37.1'' W 037° 20' 42.3''
	L11	RN	S 04° 50' 36.1'' W 37° 20' 44.7''

Fonte: Dados do estudo, 2018.

A coleta do solo foi realizada de acordo com as recomendações do Documento da Embrapa (GOULART, 2010). O solo coletado foi proveniente da camada de 15 a 20 cm de profundidade, pois, os nematoides são encontrados majoritariamente nessa faixa (NORTON; NIBLACK, 1991). As áreas de coleta das amostras no Rio Grande do Norte, foram as seguintes coordenadas geográficas: de latitude Sul e de latitude Oeste. Após a coleta, as amostras dos solos foram conduzidas para casa de vegetação onde foi semeado nesse solo e posteriormente, utilizados no processo de extração de DNA das raízes.

4.3 CULTIVO DAS SEMENTES DE MELÃO

As sementes de melão tipo *Cantaloup Charen* (cultivar Védrañtais) foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 5,0% (v/v). Posteriormente, estas sementes foram germinadas em placas de Petri com papel filtro umedecido com água destilada e colocados em estufa por 24hs a 37 °C. Esse procedimento permite maior uniformização da germinação (NUNES, 2014). Quando as plântulas emitiram a radícula, elas foram transplantadas para vasos contendo os solos previamente coletados das fazendas produtoras de melão.

As sementes foram cultivadas em copo descartável de 500 ml (uma semente por copo) com 10 repetições por amostras, no qual continham solos coletados das diferentes áreas de cada fazenda. Algumas plantas morreram, dessa forma, as amostras analisadas tiveram valores diferentes. Trinta e cinco dias após a semeadura, as plantas foram removidas cuidadosamente para não danificar os sistemas radiculares e realizadas análises seguintes.

4.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA DAS RAÍZES

Depois de colhidas as raízes das plantas, uma raiz de cada área de coleta foi escolhida ao acaso para uma visualização prévia da presença ou ausência de *R. reniformis*. As raízes foram avaliadas microscopicamente seguindo o método de Byrd et al. (1983), que consiste na coloração de nematoides em tecido radicular. Inicialmente, foi realizada uma lavagem prévia das raízes em água corrente para a retirada do solo aderido às mesmas. Após a lavagem, as

raízes foram imersas em uma solução de 1,5% de NaClO, por quatro minutos, sendo posteriormente drenadas e imersas em água corrente para retirar todo o hipoclorito de sódio e depois permaneceram embebidos em água por quinze minutos. Essa água foi descartada e adicionada 50 mL água corrente. Em seguida, foi adicionada uma gota do corante fucsina ácida em cerca de 30 mL de água e levou-se o material à fervura. Após a fervura, por aproximadamente 30 segundos, os fragmentos radiculares foram drenados, deixando-se esfriar e posteriormente lavados em água corrente para retirar o excesso de corante.

Os fragmentos das raízes de cada planta foram colocados em lâminas em seguida, realizada as análises microscópicas em microscópio óptico (Opton CX 75) na resolução 40x e registradas as imagens.

4.5 EXTRAÇÃO DO DNA DOS NEMATOIDES A PARTIR DAS RAÍZES DO MELOEIRO

Para a extração do DNA dos nematoides a partir das raízes, foi utilizado o protocolo de Doyle & Doyle (1987) com modificações. As raízes foram maceradas em nitrogênio líquido e posteriormente foi adicionado 700 µl do tampão de lise que continha (1M TRIS-HCl, 5M NaCl, 0,5M EDTA, CTAB 7%, β- Mercaptoetanol, PVP) em tubos de 1,5 mL e colocados em banho maria a 65°C durante 1 hora. Após esse período, deixou-se atingir a temperatura ambiente e em seguida foram realizadas as lavagens com CIA (clorofórmio-álcool isoamílico) e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a temperatura de 2°C.

As amostras foram retiradas cuidadosamente da centrífuga e a fase aquosa foi transferida para um novo micro tubo, evitando-se pegar contaminantes da fase inferior. No novo micro tubo, realizou-se a segunda lavagem com 700 µl de CIA e posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos a temperatura de 2°C.

Ao retirar da centrífuga, a fase superior foi transferida para um novo micro tubo, onde foi adicionado 2/3 de volume de isopropanol gelado e posteriormente colocadas em freezer por duas horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos a 10 °C e o isopropanol descartado em seguida. Posteriormente, o pellet foi lavado no próprio micro tubo em 1000 µl de álcool etílico 90% gelado.

As amostras foram homogeneizadas vertendo-se trinta vezes e, em seguida, realizou-se uma centrifugação a 10.000 rpm durante 5 minutos a 10°C. Posteriormente, o etanol foi descartado cuidadosamente e os micro tubos contendo os pellets foram colocados para secar na capela de exaustão por 30 minutos. Após esse período, adicionou-se nos micro tubos contendo os pellets 45 µl de água ultrapura e 5µl de RNA se e incubados em banho maria a 37° C por 30

minutos, finalizando assim o processo de extração. Por fim, os micros tubos contendo amostras de DNA extraídos de raízes foram armazenados em freezer, a -20°C. Após a extração do DNA, 2µl de cada amostra foi submetida à quantificação em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo e fotodocumentado sob luz ultravioleta.

4.6 ANÁLISE MOLECULAR A PARTIR DE *PRIMERS* UNIVERSAIS E GENES ESPECÍFICOS

Sequências de *primers* universais e específicos para *R. reniformis*, foram utilizados nas análises (Tabela 1) dos DNAs dos nematoides isolados a partir das raízes de meloeiro.

Tabela 1 - Sequência dos *primers* universais (1,2) e *primers* genes específicos (3,4,5) do *Rotylenchulus reniformis*.

CÓDIGO DO <i>PRIMERS</i>	SEQÜÊNCIA (5'— 3')	TAMANHO DOS FRAGMENTOS ESPERADOS (PB)
D3B (r) ¹	TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA	600-800
D2A (f) ²	ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG	600-800
R_renif_R1A (r) ³	GAA AAG GCC TAC CCA ATG TG	142
R_renif_R1B (r) ⁴	CAC AGA CRC CCR AGC AGC CA	179
R_renif_R2A (r) ⁵	CCC GAT ACC ATT TCC ATA CAA G	320

Fonte: Nunn (1992).

As condições de reação seguiram um volume total de 50 µl, contendo 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50mM KCl, 2,0 mM MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada um dos *primers* universais e genes específicos, 1 U de Taq DNA polimerase e aproximadamente 10 ng de DNA. As amplificações foram efetuadas em termociclador (PTC-100TMProgrammable Thermal Controller), programadas para 30 ciclos de: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1,5 minutos a 72°C. Antes dos 30 ciclos, foi realizada uma etapa de desnaturação do DNA por 4 minutos a 94° C e após os 30 ciclos foi realizada uma etapa de extensão final de 10 minutos a 72°C. Após a amplificação, os fragmentos foram analisados em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídeo e fotografados sob luz ultravioleta.

Na reação com os *primers* universais, para a detecção de nematoides, utilizou-se o par de *primers* D2A_(f)-D3B_(r) e para *R. reniformis*, D2A_(f)-R_renif_R2A_(r).

4.7 EXTRAÇÃO DOS NEMATOIDES DO SOLO

Para a extração de nematoides do solo foi utilizado o método da flotação centrífuga de Jenkins (1964). Logo, foi utilizada toda a amostra de solo do copo onde foram cultivadas as sementes de melão. O solo de cada área, separadamente, foi colocado em um Becker de plástico de 1000 ml, posteriormente foi adicionada água suficiente para completar o volume de 600 ml.

A mistura foi suspensa vigorosamente com auxílio de um agitador por vinte segundos e foi decantada por 60 segundos. O sobrenadante foi vertido através de uma peneira de 40 meshes, colocada sobre outra de 325. Os resíduos e detritos do solo e de plantas ficaram retidos na primeira peneira e os nematoides e elementos de pequenas dimensões, na segunda. Em seguida, com o auxílio de um fino jato de água os nematoides foram transferidos para um Becker de 150 ml. A suspensão foi colocada em tubo de 50 ml de uma centrífuga horizontal, equilibrando-se o sistema de tubos com água.

A centrifugação foi feita por 5 minutos, a 1400 (RPM). Em seguida, foram retirados os tubos e descartados cuidadosamente o sobrenadante. A borda do tubo falcon foi limpa para manter a amostra com menos impurezas e foi acrescentado aproximadamente 30 ml de uma solução de sacarose a 1 M sobre o “pellet”. Esta solução foi preparada pela dissolução de 484,5 g de sacarose em 1 litro de água. A gravidade específica dessa solução é de 1,14 segundos. O pellet foi resuspenso com um bastão de vidro e novamente foi equilibrado o sistema de tubos. Foi centrifugado por 1 minuto a uma velocidade de 1400 RPM.

Devido à densidade da solução e a gravidade específica dos nematoides vermiformes do solo (1,04 e 1,09), eles ficaram flutuando na solução enquanto os detritos e as partículas de solo se depositaram no fundo do tubo. O sobrenadante foi vertido cuidadosamente através de uma peneira de 400 meshes. Os nematoides foram lavados, ainda na peneira, com um fino jato de água e transferidos para um Becker de 50 ml.

4.8 ANÁLISES MICROSCÓPICAS DAS FÊMEAS ADULTAS DE *Rotylenchulus reniformis*

Após a extração dos nematoides do solo, foram realizadas as análises microscópicas. As suspensões foram colocadas individualmente em placa de Petri e analisadas inicialmente na lupa. Após serem identificadas, as fêmeas adultas foram pipetadas e colocadas em lâminas para serem visualizadas e analisadas em microscópio óptico (Olympus CX 31) na resolução 40x e fotografadas, através de fotografias. A etapa de isolamento do nematoide para identificação molecular, foi baseada no manual de Harris et al. (2001).

A característica observada para a identificação foi o formato reniforme do corpo das fêmeas adultas. Após a visualização em microscópio óptico, as mesmas foram pipetadas em 10 µl de água ultrapura e inseridas em micro tubo Eppendorf de 1,5µl e armazenadas em freezer para posterior da extração do DNA.

4.9 EXTRAÇÕES DO DNA DE *Rotylenchulus reniformis* ISOLADOS DE SOLO E CONFIRMAÇÃO VIA PCR COM *PRIMERS* GENES ESPECÍFICOS

A etapa da extração do DNA das fêmeas adultas de *R. reniformis* isoladas individualmente da suspensão de cada amostra foi feita utilizando o kit de extração de DNA *NucleoSpinTissue* (*Macherey-Nagel*), seguindo as instruções do fabricante.

Após a extração de DNA, foram realizadas as análises de PCR com todas as amostras de DNA extraídas, utilizando-se *primers* genes específicos para *R. reniformis* (Tabela 1), visando confirmar a eficiência da seleção das fêmeas adultas isoladas da suspensão, onde todas as bandas tiveram o padrão esperando, confirmando assim, que todas as amostras de fêmeas adultas eram da espécie *R. reniformis*.

As condições de reação seguiram com um volume de 50 µL, contendo 10 mM Tris-HCl (pH=8,3), 50 mM KCl, 2,0 mM MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada um dos *primers*, D2A_(f) e R_renif_R2A_(r), 0,1 U de Taq DNA polimerase (SINAPSE) e aproximadamente 10 ng de DNA.

As amplificações foram realizadas em termociclador (PTC-100TM *Programmable Thermal Controller*) de acordo com o seguinte programa: 94°C por 4 minutos; 30 ciclos de 94°C a 1 minuto, 55° C a 1 minuto, 72° C por 1,5 e 72°C durante 10 minutos. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose a 2,0%, corado com brometo de etídeo e fotografados sob luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos foi determinado comparando com o marcador λ DNA/Hind III de 125 pb (*Introvén*).

4.10 DIVERSIDADE GENÉTICA

Para a análise com os marcadores RAPD foram realizados testes preliminares de amplificação com 20 iniciadores, e destes, 9 foram selecionados, conforme a tabela 2, utilizando-se de 2 genótipos. A partir dos resultados obtidos foram preparadas as reações de PCR, utilizando-se *primers* que apresentaram polimorfismo para um volume final de 25 µL. As

reações de amplificação compreenderam um volume final de 25 µL compostas por 2,5 µL de tampão de reação 10X (20 mM Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM de KCl e 3,2 mM MgCl₂µL de MgCl₂), 1,2 µL de dNTPs (0,25mM), 4 µL de DNA (10ng/µL), 2 µL de cada iniciador (0,2 µM), 0,2 µL de *Taq DNA Polymerase* (5U/µL) e água ultrapura (12,1 µL) para completar o volume de reação.

A programação utilizada no termociclador para a PCR foi de 1 minutos a 96°C para desnaturação inicial, seguindo-se de 40 ciclos de desnaturação (92°C por 1 minuto), anelamento de 40°C por 1 minuto, extensão por 2 minutos a 72°C e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos da amplificação (bandas) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, corado com brometo de etídeo (10 mg/ml) a 135 volts por aproximadamente duas horas. Posteriormente, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta e analisado quanto sua integridade.

Tabela 2 - Iniciadores *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) selecionados para amplificação do DNA dos de fitonematoides *Rotylenchulus reniformis*. Mossoró/RN, 2017.

Nº	NOME DO INICIADOR	SEQUÊNCIA
1	OPA-02	TGCCGAGCTG
2	OPA-03	AGTCAGCCAC
3	OPA-05	AGGGGTCTTG
4	OPA-10	GTGATCGCAG
5	OPA-16	AGCCAGGCGAA
6	OPAA-04	AGGACTGCTC
7	OPAA-17	CTACGCTCAC
8	OPD-02	GGACCCAACC
9	OPD-05	TGAGCGGACA

Fonte: Dados do estudo, 2018.

4.11 LEITURA DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA DA DIVERSIDADE GENÉTICA

Os dados moleculares foram obtidos a partir dos produtos de amplificação analisados pela avaliação visual das bandas mais consistentes dos genótipos analisados. Uma matriz composta por dados binários foi elaborada a partir da visualização dos géis de agarose, em que o número 1 correspondia à presença do fragmento, o zero à ausência, e o número 2 aos dados perdidos em função da não amplificação de fragmentos em um genótipo para determinado iniciador.

Para interpretação das análises moleculares, foi utilizado o complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard, gerando uma estimativa de dissimilaridade genética entre os genótipos. O coeficiente de Jaccard é definido pela seguinte fórmula:

$$S_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

Em que:

S_{ij} : é a similaridade genética entre o par de cultivares i e j.

a: é a presença da banda em ambas as populações (número de contagens de concordância do tipo 1-1),

b: presença da banda no genótipo i e ausência em j (número de discordância do tipo 1 0),

c: ausência da banda em i e presença em j (número de contagens de discordância do tipo 0 1).

As similaridades resultantes deste coeficiente foram transformadas em medidas de distância genética pela seguinte expressão: $dg_{ij} = 1 - s_{ij}$. O coeficiente de Jaccard foi escolhido por considerar a ausência de fragmentos como sinônimos de similaridade genética (CRUZ; CARNEIRO, 2003).

Utilizou-se o complemento do índice de coincidência simples para estimar a dissimilaridade entre as áreas de coleta.

Para a construção do dendrograma foi utilizado o método hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*) a partir da matriz de dissimilaridade gerada pelo coeficiente de Jaccard (CRUZ ; REGAZZI; CARNEIRO, 2004).

O critério utilizado para o ponto de corte no dendrograma foi a metodologia utilizada por Mojena (1977).

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 ANÁLISE MICROSCÓPICA E ISOLAMENTO de *R. reniformis*

A identificação e a localização dos nematoides registrados nas análises estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2 - Identificação e localização dos 51 genótipos de *Rotylenchulus reniformis* coletados em solos provenientes das Fazendas Itaueira e Mata Fresca, nos municípios de Ipanguaçu-RN e Aracati-CE.

Nº	GENÓTIPOS	LOCAL DE COLETA	NÚMEROS	GENÓTIPOS	LOCAL DE COLETA
1	6 IT	Ipanguaçu-RN	28	1 IT	Ipanguaçu-RN
2	7 IT	Ipanguaçu-RN	29	2 IT	Ipanguaçu-RN
3	8 IT	Ipanguaçu-RN	30	3 IT	Ipanguaçu-RN
4	9 IT	Ipanguaçu-RN	31	4 IT	Ipanguaçu-RN
5	10 IT	Ipanguaçu-RN	32	5 IT	Ipanguaçu-RN
6	28 IT	Ipanguaçu-RN	33	DA IT	Ipanguaçu-RN
7	29 IT	Ipanguaçu-RN	34	40 IT	Ipanguaçu-RN
8	30 IT	Ipanguaçu-RN	35	41 IT	Ipanguaçu-RN
9	31 IT	Ipanguaçu-RN	36	42 IT	Ipanguaçu-RN
10	11 IT	Ipanguaçu-RN	37	43 IT	Ipanguaçu-RN
11	12 IT	Ipanguaçu-RN	38	44 IT	Ipanguaçu-RN
12	13 IT	Ipanguaçu-RN	39	46 IT	Ipanguaçu-RN
13	14 IT	Ipanguaçu-RN	40	47 IT	Ipanguaçu-RN
14	15 IT	Ipanguaçu-RN	41	FV IT	Ipanguaçu-RN
15	33 IT	Ipanguaçu-RN	42	FA IT	Ipanguaçu-RN
16	34 IT	Ipanguaçu-RN	43	2C IT	Ipanguaçu-RN
17	35 IT	Ipanguaçu-RN	44	21 IT	Ipanguaçu-RN
18	36 IT	Ipanguaçu-RN	45	22 IT	Ipanguaçu-RN
19	37 IT	Ipanguaçu-RN	46	23 IT	Ipanguaçu-RN
20	1B IT	Ipanguaçu-RN	47	24 IT	Ipanguaçu-RN
21	16 IT	Ipanguaçu-RN	48	25 IT	Ipanguaçu-RN
22	17 IT	Ipanguaçu-RN	49	26 MF	Aracati-CE

23	18 IT	Ipanguaçu-RN	50	27 MF	Aracati-CE
24	19 IT	Ipanguaçu-RN	51	4D MF	Aracati-CE
25	20 IT	Ipanguaçu-RN			
26	38 IT	Ipanguaçu-RN			
27	39 IT	Ipanguaçu-RN			

Fonte: Dados do estudo, 2018.

Na análise microscópica da raiz (coloração de raízes), somente foram detectados nematoides *R. reniformis* em três áreas da Fazenda Itaueira. (Figura 1). Na análise da suspensão, foram encontrados sete resultados positivos para fêmeas adultas de *R. reniformis* em amostras de cinco áreas da fazenda Itaueira e uma amostras de uma área da Fazenda Mata Fresca e uma amostra da Fazenda CY Matsumoto. (Tabela 3).

Figura 1 - Fragmentos de raízes com nematoides A, B, C e D, coletados da fazenda Itaueira, coloridos pelo método de Byrd, 1983, em suas respectivas áreas de coleta.



Fonte: Acervo do estudo, 2018.

Tabela 3 - Análises microscópicas da raiz e presença de fêmeas adultas de *R. reniformis* feitas em amostras de solo e raízes oriundas de fazendas produtoras de melão.

FAZENDAS	INCIDÊNCIA DE <i>R. Reniformis</i> NA RAIZ (COLORAÇÃO DE RAÍZES)	INCIDÊNCIA DE FÊMEAS ADULTAS DE <i>R. Reniformis</i> (SUSPENSÃO)
DINAMARCA	-	-
BRAZIL MELON	-	-
MATA FRESCA	-	+ (1)
CY MATSUMOTO	-	+ (1)
ITAUEIRA	+ (3) *	+ (5)
AGRÍCOLA FAMOSA	-	-

*Valores entre parêntesis corresponde a o número de áreas com resultado positivo.

Fonte: Dados do estudo, 2018.

Moura et al. (2002), foram os primeiros autores a relatarem a presença de do referido patógeno em meloeiro no Rio Grande do Norte. Na oportunidade, estimaram uma elevada densidade, 15.000 espécimes (machos, fêmeas adultas imaturas e juvenis) por 100 centímetro cúbico de solo. Posteriormente, Torres et al. (2007) realizaram um levantamento nematológico em meloeiro em municípios do Estado do Rio Grande do Norte e Ceará, observando que 53% das áreas amostradas estavam infestadas por nematoides do gênero *Rotylenchulus*, superando o gênero *Meloidogyne*. Esse fato demonstrou o potencial de limitação que o nematoide reniforme representa ao cultivo do meloeiro.

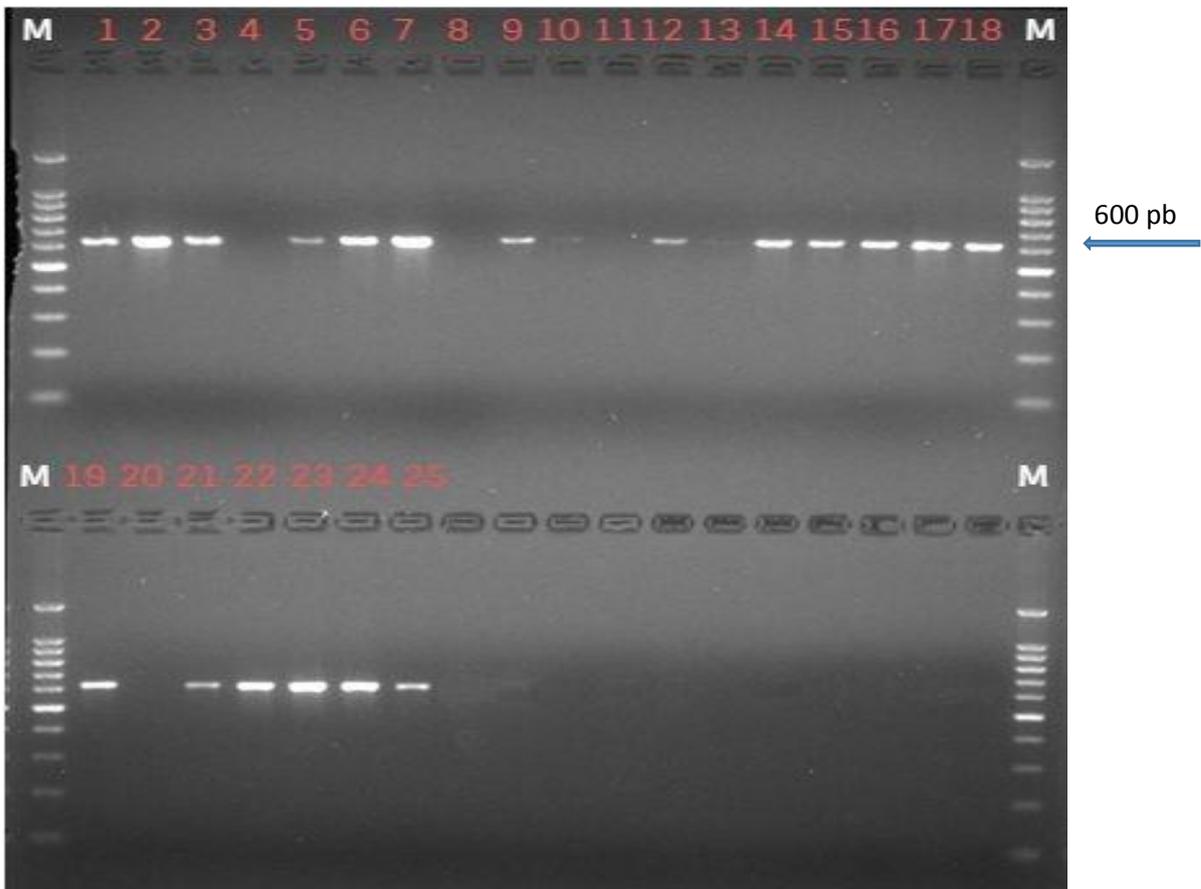
Quando comparado aos resultados do levantamento feito por Torres et al. (2007), verificou-se no presente trabalho uma pequena frequência do nematoide reniforme nas principais áreas produtoras de meloeiro. A Fazenda Itauera, com maior frequência de amostras com o nematoide em discussão, situada no município de Ipanguaçu, não foi contemplada no estudo de Torres et al. (2007). Não há relatos de novos levantamentos realizados recentemente, sendo, portanto, necessárias novas investigações, inclusive com medição da densidade populacional nas amostras.

6.2 CONFIRMAÇÃO MOLECULAR

Das 220 plantas cultivadas (22 áreas x 10 repetições), 48 morreram. Do total de 172 amostras restantes de raízes, apenas 42 (24,41%) foram positivas para a presença de nematoides quando analisadas com *primer* universal (Figura 2). As fazendas que apresentaram maior porcentagem de amostras com nematoides, em ordem decrescente, foram: Itauera (8,72%),

Brasil Melon (BM) (8,14%), Dinamarca (6,97%) e Mata Fresca (0,6%). Das referidas fazendas, apenas a Itaueira apresentou nematoides em todas as amostras avaliadas (Tabela 4).

Figura 2 - Amostras de fragmentos de DNA extraídos de raízes de *Cucumis melo* L. amplificados com *primers* universal de nematoides D2A e D3B. Amostras das Fazendas DINAMARCA (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11), BRAZIL MELON (12,13,14,15), MATA FRESCA (17,18,19,20,21), ITAUEIRA.



Fonte: Dados do estudo, 2018.

Tabela 4 - Número de amostras analisadas com *primers* universais e específico para *R. reniformis* em amostras de seis fazendas produtoras de meloeiro.

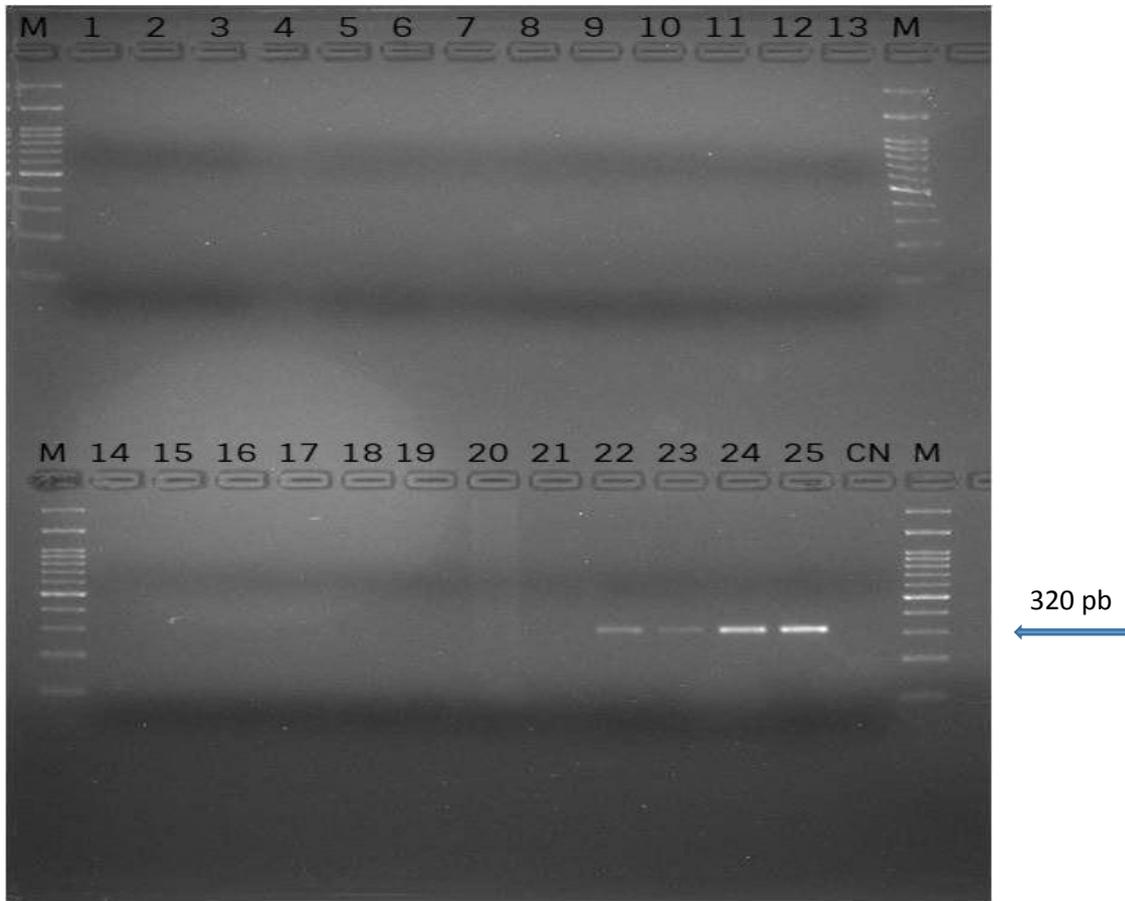
FAZENDAS	ÁREA DE COLETA S DOS SOLOS	QTD. DE AMOSTRAS ANALISADAS COM <i>PRIMER</i> UNIVERSAL	AMOSTRAS POSITIVAS PARA NEMATOIDES	QTD. DE AMOSTRAS ANALISADAS COM <i>PRIMER</i> ESPECÍFICO	AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>R. Reniformis</i>
DINAMARCA	23	4	3	3	0
	94	10	0	0	0

	95	10	5	5	0
	118	4	3	3	0
	162	3	1	1	0
BRAZIL	29	9	0	0	0
MELON	30	5	4	0	0
	132	10	1	0	0
	118	5	4	0	0
	119	5	5	0	0
MATA	0702	5	1	1	1
FRESCA	2301	9	0	0	0
CY	AE	10	0	0	0
MATSUMOT					
O					
ITAUEIRA	BI	4	4	4	4
	P1B1A	11	6	6	1
	P1B1B	5	1	1	1
	P2B1A	11	1	1	0
	P2B1B	11	2	2	1
	P1P2	11	1	1	1
AGRÍCOLA	L9	10	0	0	0
FAMOSA	L10	10	0	0	0
	L11	10	0	0	0
Total	22	172	42	28	9

Fonte: Dados do estudo, 2018.

Com relação à análise para a detecção de *R. reniforme* com *primer* específicos, foi detectado a presença do referido patógeno nas fazendas Itaqueira e Mata Fresca. Das seis diferentes áreas analisadas na Fazenda Itaqueira, em somente uma não foi detectada a presença de *R. reniformis*. Para a fazenda Mata Fresca, em um total de duas áreas avaliadas, apenas uma confirmou a presença apresentou do patógeno. Esses resultados indicam que dentre as fazendas contempladas na amostragem, a mais positiva para *R. reniformis* foi a Fazenda Itaqueira.

Figura 3 - Amostras de fragmentos de DNA extraídos de raízes de *Cucumis melo* L. amplificados com *primers* específicos da espécie *R. reniformis*. D2A e R2A. Fazendas ITA (22, 23, 24 e 25). M - Marcador de peso molecular.



Fonte: Dados do estudo, 2018.

Para uma confirmação mais precisa desse resultado, vários autores indicam que seja feito um sequenciamento das bandas amplificadas para alinhamento utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (KONSTANTINOVA et al., 2002; ROTONDO et al., 2012; PEEVER et al., 2004), sendo essa etapa, objeto de estudo posterior a esse trabalho. Porém, a amplificação em tamanho esperado, 320 pares de base, já é em si, um forte indício de confirmação de presença da espécie, que serve para complementar os dados morfológicos, apresentando as vantagens de ser um método mais rápido, específico e confiável (PAVÓN et al., 2010).

Esta é a primeira confirmação molecular da presença de *R. reniformis* nas regiões de plantios de meloeiro nos estados do RN e do CE.

6.3 DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Rotylenchulus reniformis* ISOLADOS

A partir da triagem dos 20 iniciadores RAPD (tabela 4), foram selecionados nove, os quais geraram 67 bandas polimórficas (95,71 %) e três monomórficas (4,29%), evidenciando assim um alto polimorfismo, perfazendo uma média de 7,4 bandas polimórficas por *primer* (Tabela 5). O *primer* com maior número de bandas polimórficas foi o OPAA-04 com 11 bandas, enquanto o OPA-03 foi o *primer* que apresentou o menor número (5) (Figura 4).

Tabela 5 - Triagem dos 20 *primers* RAPD.

Nº	PRIMERS	SEQUÊNCIA
1	OPA-02	TGCCGAGCTG
2	OPA-03	AGTCAGCCAC
3	OPA-04	AATCGGGCTG
4	OPA-05	AGGGGTCTTG
5	OPA-10	GTGATCGCAG
6	OPA-13	CAGCACCCAC
7	OPA-16	AGCCAGCGAA
8	OPAA-04	AGGACTGCTC
9	OPAA-17	GAGCCCGACT
10	OPD-02	GGACCCAACC
11	OPD-05	TGAGCGGACA
12	OPH-04	GGAAGTCGCC
13	OPH-06	ACGCATCGCA
14	OPH-08	GAAACACCCC
15	OPH-09	TGTAGCTGGG
15	OPH-11	CTTCCGCGAGT
17	OPH-14	ACCAGGTTGG
18	OPH-15	AATGGCGCAG
19	OPH-16	TCTCAGCTGG
20	OPO-10	TCAGAGCGCC

Fonte: Dados do estudo, 2018.

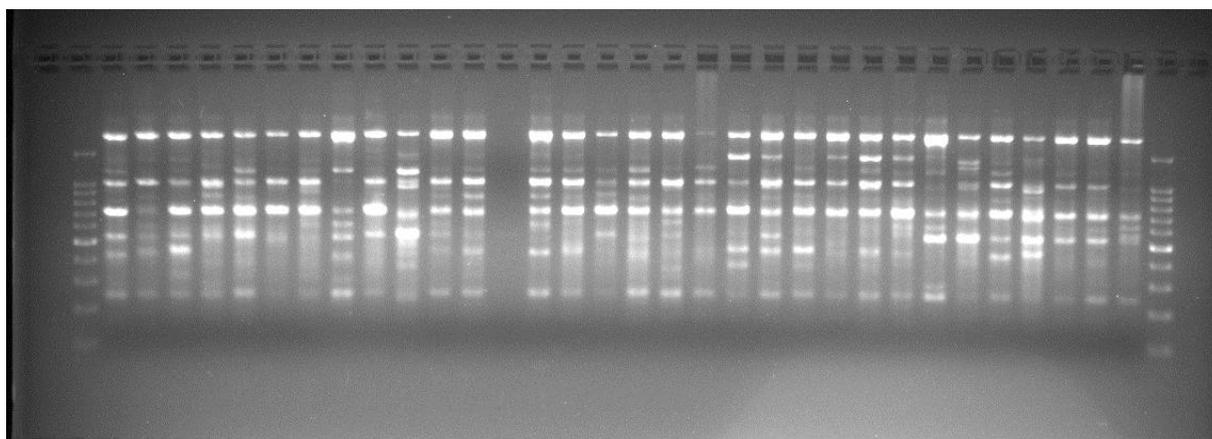
Tabela 6 - Número total de fragmentos (NTF), número total de fragmentos polimórficos (NFP) e percentagem de polimorfismo (%) de nove iniciadores *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) selecionados para amplificação de genótipos de fitonematoides *R. reniformis* c

NOME DO INICIADOR	NTF	NFP	POLIMORFISMO (%)
OPA-02	6	6	100,00
OPA-03	5	5	100,00
OPA-05	6	6	100,00
OPA-10	10	10	100,00
OPA-16	11	10	90,10
OPAA-04	11	11	100,00

OPAA-17	9	8	88,89
OPD-02	6	5	83,33
OPD-05	6	6	100,00
Total	70	67	(-)
Média	7,78	7,40	95,81

Fonte: Dados do estudo, 2018.

Figura 4 - Padrão eletroforético de 32 genótipos de *Rotylenchulus reniformis* obtido pelo marcador molecular *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) com o *primer* OPAA-17.

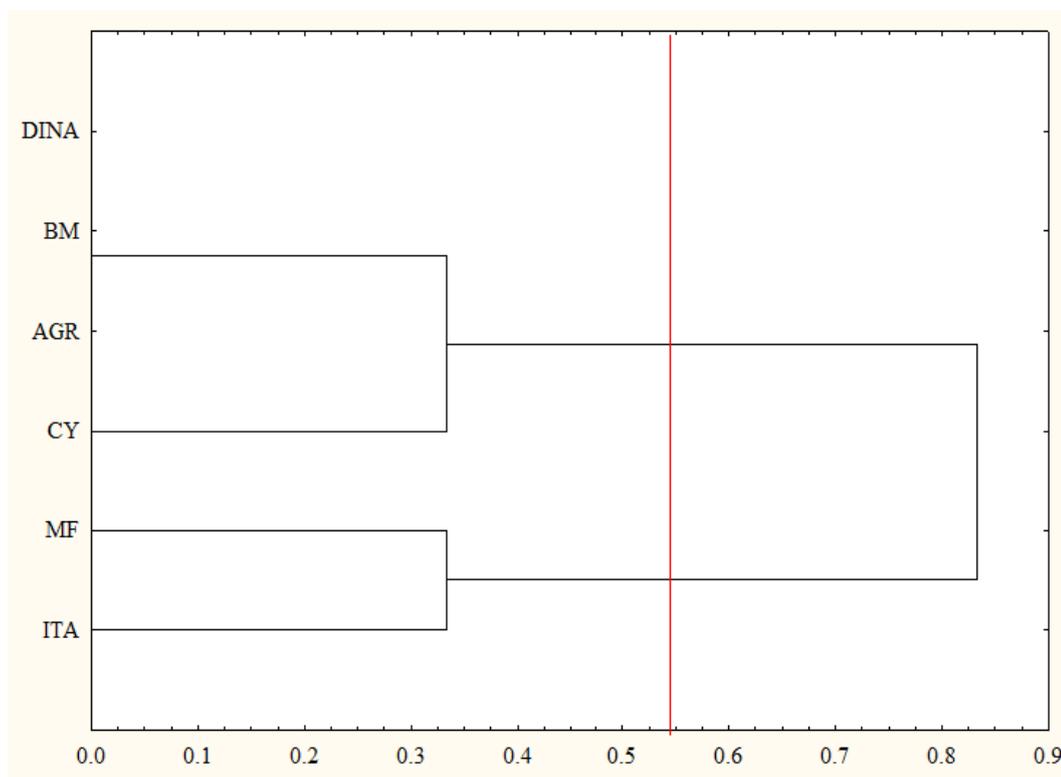


Fonte: Acervo do estudo, 2018.

Estas observações permitiram confirmar a eficiência de marcadores RAPD aplicados ao estudo da genética de nematoides, como tem sido relatado por outros autores em outros patógenos como fungos (TEIXEIRA et al., 2004; SENEVIRATNE et al., 2009), bactérias e outras espécies de nematoides como *Heterodera crucifera* e *Heterodera schachtii* (CASWELL-CHEN et al., 1992) e *Meloidogyne* spp. (CENIS et al., 1993). Outros marcadores também têm sido utilizados com êxito em estudos de diversidade e caracterização molecular em espécies do gênero *Rotylenchulus*, como o DNA ribossômico nuclear (ITS) (TILAHUN et al., 2008; VAN DER BERG et al., 2015; PALOMARES-RIUS et al., 2017) e microssatélite (ARIAS et al., 2009).

A partir do método agrupamento hierárquico UPGMA foi construído um dendrograma para agrupar as fazendas das quais foram oriundas as amostras. Utilizando o critério de Mojena (1977), para ponto de corte, verificou-se dois grupos. O primeiro formado pelas fazendas Itaeira e Mata Fresca; e o segundo grupo pelas demais fazendas (Figura 5). As estimativas da correlação cofenética, estresse e distorção indicam que o agrupamento foi eficiente e com pequena perda de informação.

Figura 5 - Dendrograma baseado no método da média aritmética não ponderada (UPGMA), obtido a partir da matriz do complemento do índice de coincidência simples de seis fazendas em que foram coletadas amostras de solo para avaliar a presença de *R. reniforme*. Mossoró.



Fonte: MOJENA, 1977.

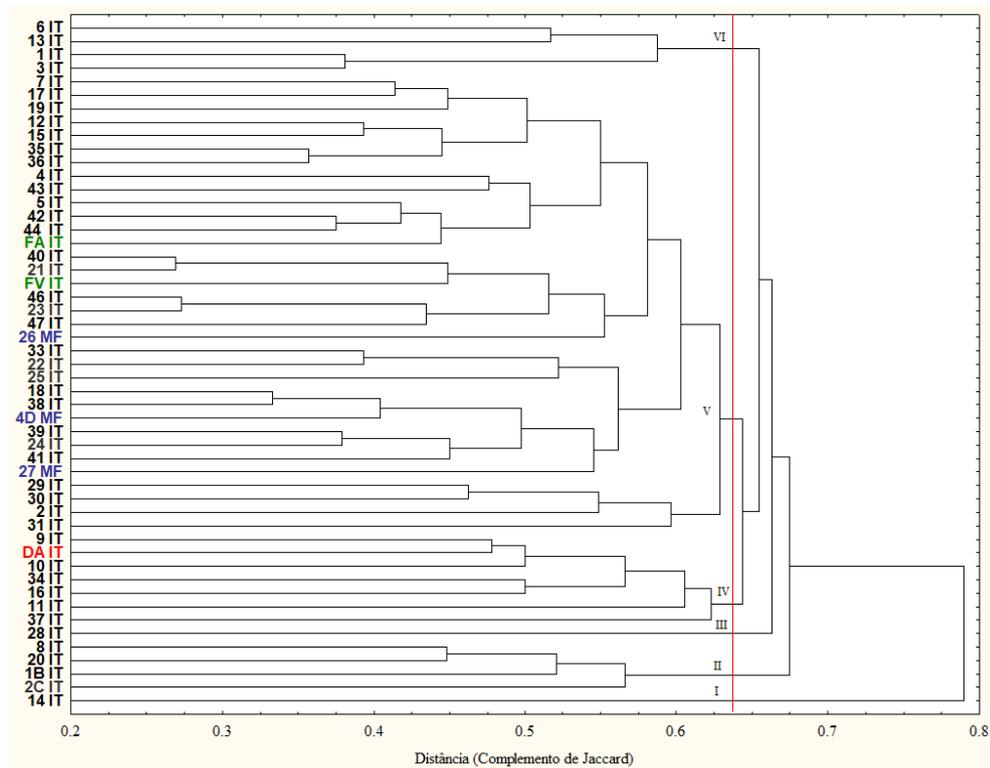
A Figura 6 mostra o dendrograma obtido a partir da análise do DNA de 51 amostras de *R. reniforme* coletadas nos municípios de Ipanguaçu-RN e Aracati-CE.

A correlação cofenética foi estimada em 0,77*, valor que evidencia a elevada confiabilidade entre a matriz de distâncias original e a matriz gerada pelo agrupamento UPGMA (SOKAL; ROLPH, 1962). A magnitude da distorção indica a eficiência do agrupamento obtido pelo método UPGMA que também indica boa eficiência na técnica de agrupamento (Figura 3).

Utilizando o critério de Mojena (1977) como ponte de corte, observou-se a formação de seis grupos de amostras de nematoides conforme o agrupamento feito pelo método UPGMA (Figura 4). O primeiro foi composto pela amostra 14 IT, o segundo grupo foi constituído pelas amostras 8 IT, 20 IT, 1B IT e 2C IT. O terceiro grupo foi formado apenas pela amostra 28 IT. O quarto grupo foi composto por sete amostras (9 IT, DA IT, 10 IT, 34 IT, 16 IT, 11 IT e 37 IT). O quinto grupo foi o maior, contemplando 34 amostras, aproximadamente 66,7%. No

referido grupo, três amostras foram provenientes da região de Aracati-CE, enquanto os demais pertencem à região de Ipanguaçu-RN. Por fim, o sexto grupo foi formado pelos acessos 6 IT, 13 IT, 1 IT e 3 IT.

Figura 6 - Dendrograma baseado no método da média aritmética não ponderada (UPGMA), obtido a partir da matriz do complemento de Jaccard de 51 amostras de nematoides. (Correlação cofenética = 0,77**; Estresse = 1,2%, Distorção = 11,12%). Ponto de Corte = 0,64



Fonte: MOJENA, 1977.

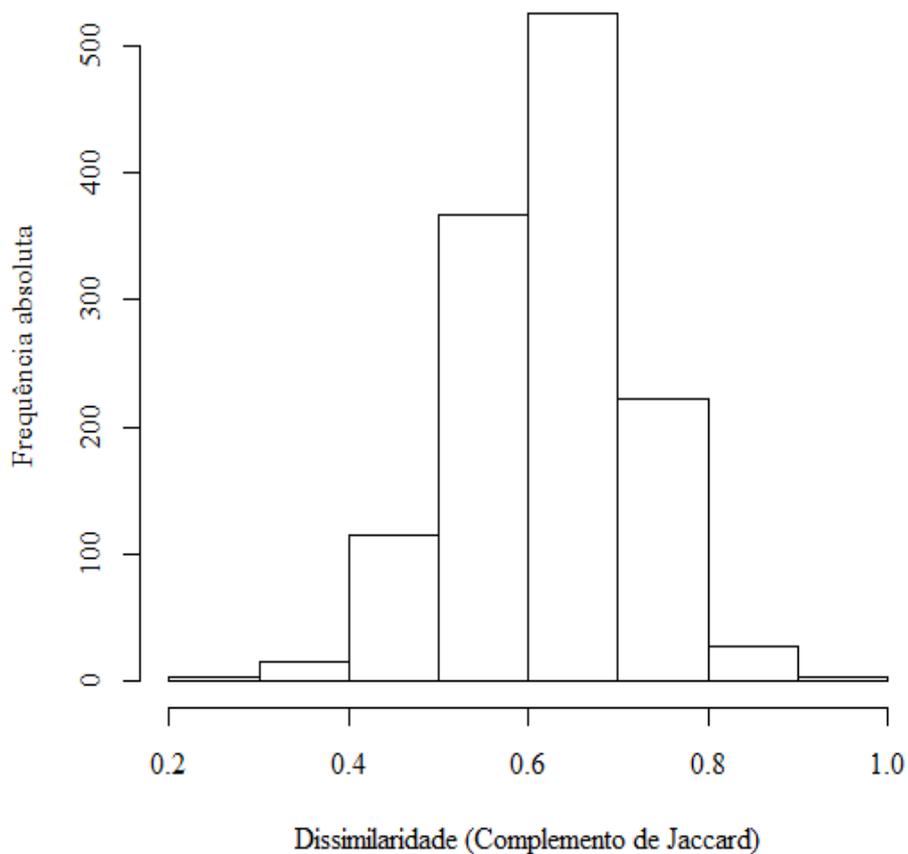
Verificou-se que o estudo não indicou nenhuma associação entre as magnitudes das dissimilaridades e a origem das amostras. Esse fato é notório ao observar a grande variação observada nas amostras da Fazenda Itauera (IT) e a conseqüente distribuição das amostras provenientes da referida Fazenda nos grupos formados pelo agrupamento UPGMA. Analisando os valores de dissimilaridade (complemento de Jaccard) (Dados não apresentados), verifica-se que o maior valor encontrado foi entre as amostras 11 IT e 14 IT (0,92), enquanto o menor valor de similaridade foi entre as amostras 40 IT e 21 IT (0,27), todos da fazenda Itauera (IT). As amostras da referida fazenda foram alocadas no maior grupo.

O estudo indica que há variabilidade entre as amostras com um coeficiente médio de dissimilaridade de 0,63 e um coeficiente de variação 14,88%. A distribuição das distâncias

segue um padrão próximo da curva normal com a maior frequência (58%) de distâncias acima da média (Figura 4).

São poucos os trabalhos que relatam as estimativas de dissimilaridade com *R. reniformi*. Utilizando 156 marcadores microssatélites, Arias et al. (2009) observaram menores distâncias genéticas em populações de *R. reniformis* provenientes de seis estados norte-americanos (0,06 a 0,4). Utilizando marcadores ITS1 e 18S, Tilahun et al. (2008) observaram elevada similaridade (>0,86) para isolados provenientes de áreas produtoras de algodão dos Estados Unidos. As diferenças na diversidade entre este trabalho e aqueles realizados com amostras americanas são devidas às populações, marcadores utilizados, bem como na metodologia estatística e não significa, necessariamente, que há maior variabilidade na população brasileira.

Figura 7 - Distribuição de frequência da dissimilaridade (complemento de Jaccard) obtida a partir de RAPD de 51 amostras de nematoides coletadas em fazendas produtoras de meloeiro.



Fonte: Dados do estudo, 2018.

O conhecimento da variabilidade fitopatogênica é uma informação fundamental para o desenvolvimento de um plano de práticas para o controle efetivo de patógenos de plantas e o desenvolvimento de cultivares resistentes por um longo período de tempo, uma vez que uma elevada variação na população do patógeno não é favorável dentro do contexto do controle ou manejo do patógeno por métodos disponíveis. Sabe-se que quanto maior a variação no patógeno mais difícil pode ser o seu controle.

Outro aspecto relevante, está relacionado à densidade populacional do nematoide reniforme, isso porque densidades elevadas podem comprometer as áreas produtivas. Torres et al. (2006) observaram que as densidades populacionais de *R. reniforme* tendem a decrescer após noventa dias de armazenamento no solo, no entanto, após 180 dias de armazenamento e subsequente cultivo do meloeiro no solo armazenado, a população do patógeno era equivalente a 83,41% da população de nematoides presentes no solo quando da coleta no campo. Este fato é importante uma vez que no Rio Grande do Norte há intermitência entre cultivos de meloeiro e abandono das áreas nos meses chuvosos, sendo estas ocupadas por ervas daninhas. De acordo com o resultado obtido, o período de pousio ao qual as áreas exploradas são submetidas na entressafra não é efetivo no combate deste patógeno. Neste trabalho, não se realizou a estimativa da densidade populacional nas amostras.

O controle de *R. reniformis* pode ser realizado com o uso de cultivares resistentes, mas poucos esforços foram feitos para tentar identificar fontes de resistência ao referido patógeno (BARRETO et al., 2008; TORRES et al., 2005), e até o presente momento, não foram identificadas fontes de resistência no germoplasma do meloeiro. Uma fonte potencialmente resistente pode ser obtida na espécie silvestre *Cucumis metuliferus*. Esta espécie é resistente à *Meloidogyne* sp., mas não há informação sobre a sua resistência ao nematoide reniforme (GRANBERRY; NORTON, 1980). Como o cruzamento dessa espécie é muito difícil de obter descendência, pode-se utilizar como porta enxerto.

Do ponto de vista do melhoramento genético, quanto maior a variação no patógeno menor é a vida útil de um cultivar (HOSOYA et al., 2000). Assim sendo, pode-se inferir que a fazenda Itaeira é a mais problemática para o manejo do referido patógeno em razão da alta frequência de áreas infestadas e do alto grau de variação observada entre os nematoides.

Não obstante, ressalta-se que a variação observada no presente trabalho não necessariamente estará relacionada com a agressividade nas amostras, uma vez que os *primers* utilizados para a caracterização da diversidade, são aleatórios e não possuem associação com genes de virulência na espécie *R. reniforme*. Todavia, este é o primeiro estudo da variabilidade

genética com marcadores moleculares realizado com amostras oriundas de campos de produção da principal região exportadora de melão no Brasil.

Novos estudos devem ser realizados contemplando mais amostras de outras propriedades do setor produtivo e com o uso de outros tipos de marcadores para se obter maiores informações sobre a variabilidade genética de *R. reniformes* em campos produtores de meloeiro. Além disso, é importante investigar se há associação entre a variabilidade e o nível de virulência dos isolados coletados em meloeiro.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os *primers* universais D2A e D3B confirmaram a presença de DNA de nematoides amplificáveis nas amostras de raízes analisadas, enquanto que o D2A e R2A amplificou somente o DNA de *R. reniformis*;

O marcador molecular RAPD detectou alto grau de polimorfismo nos genótipos avaliados, confirmando assim a eficiência desses marcadores aplicados ao estudo da genética de nematoides;

Praticamente todas as amostras com nematoides, e, ou, *R. reniformis* estavam concentradas em apenas duas fazendas, Itaueira e Mata Fresca;

O estudo indica que há variabilidade genética entre as amostras analisadas.

REFERÊNCIAS

AREIAS, R. G. et al.; Similaridade genética de variedades crioulas de arroz, em função da morfologia, marcadores RAPD e acúmulos de proteínas em nos grãos. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 1, p. 19-28, 2006. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/0D/brag/v65n1/29034.pdf>>. Acesso em 20 de jan. de 2018.

ARIAS, R. S. et al.; Microsatellites reveal genetic diversity in *Rotylenchulus reniformis* populations. **Nematologists**, Stoneville, USA, v. 4, n. 2, p. 145-156, 2009. Disponível em <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22661788>. Acesso em 15 de ago. de 2016.

ARIEIRA, Claudia R. D. et al. Nematoides causadores de doenças em frutíferas. **Agro@ambiente on-line**, Boa vista, v. 2, n. 1, 2008. Disponível em: <revista.ufrr.br/agroambiente/article/view/230>. Acesso em 13 de mai. de 2016.

ARRIEL, N. H. C. et al.; Outras aplicações dos marcadores moleculares. In: BORÉM, A; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Segunda edição. Minas Gerais: UFV, Cap. 6, p. 209-274, 2009.

ASMUS; GALBIERI.; Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos serrados brasileiros: Biologia e medidas de controle. In: **Principais espécies de nematoide do algodoeiro no Brasil**. Boletim n. 3. Cuiabá-MT: IMAmt, Cap.1, p. 11-36, 2016. Disponível em <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1049126/1/NematoideP.11.pdf>>. Acesso em 10 de jul. de 2016.

BARRETO, A. V., et al.; Reação de Cultivares de meloeiro ao Nematode Reniforme. **Nematologia Brasileira**. Piracicaba-SP. v.32, n. 3, p. 231-235, 2008.

BLASINGAME, D.; **Annual percentages of beltwide yield losses to nematodes in cotton**. Beltwide Cotton Nematode Survey and Education Committee, p.1, 2000.

BRAGA S. R., et al.; Produção integrada de melão. In: **Produção integrada no Brasil**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Cap. 24, p. 727-759, 2009. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Produ%C3%A7%C3%A3o%20Integrada/PI_Brasil.pdf>. Acesso em 17 de jan. de 2017.

BYRD, D. W; T.; KIRKPATRICK; BARKER, K. R.; An improved technique for clearing and staining tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology**, [S.l], v.15, n.1, p.142-143, 1983. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2618249/>>. Acesso em de 25 abr. de 2016.

CASWELL-CHEN et al.; Random Amplified Polymorphic DNA Analysis of *Heterodera crucifera* and *H. schachtii* Population. Davis-CA. **Journal of nematology**. v. 24, n. 3, p. 343-351, 1992.

CENIS, J. L. Identification of Four Major Meloidogyne spp. By Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR). **Phytopathology**. Madrid, Spain. v.83, n.1, p.76-80, 1993. Disponível em: <https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1993Articles/Phyto83n01_76.PDF>. Acesso em de 17 de jan. de 2018

CORDEIRO, M. C. R. et al.; Diagnóstico molecular para o nematoide *Rotylenchulus reniformis*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Planaltina, DF, n. 214, 2008. Disponível em <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/571879/1/bolpd214.pdf>>. Acesso em 15 de nov. de 2015.

CORDEIRO, M. C. R. et al.; Identificação molecular de nematoides de galhas, *Meloidogyne* spp. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Planaltina, DF, n. 219, set. 2008. Disponível em <www.cpac.embrapa.br/download/1471/t>. Acesso em de 15 nov. de 2015.

CRISÓSTOMO, J. R. et al.; A cadeia produtiva do melão no Brasil. In: **Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, v. 1, p. 579-591, 2008. Disponível em <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/124265>>. Acesso em 27 de jan. de 2017.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S.; **Modelos Biométricos Aplicados ao melhoramento Genético**. Viçosa: UFV, v. 2, 2003. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000097&pid=S0100-204X200500080000400007&lng=en>. Acesso em 27 de jan. de 2018.

CRUZ, C. D.; GENES - A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/asagr/v35n3/v35n3a01>>. Acesso em 27 de jan. de 2018.

CRUZ, C. D.; REGAZZI A. J. CARNEIRO, P. C. S.; **Modelos Biométricos Aplicados ao melhoramento Genético**. v.1, 3. ed., 2004. Viçosa: UFV. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000100&pid=S0006-8705201000040000800006&lng=en>. Acesso em 27 de jan. de 2018.

DAVIS, E. L., HUSSEY, R. S., BAUM T. J.; Getting to the roots of parasitism by nematodes. **Trends in Parasitology**, [S.l.], v. 20, n. 3, p. 134-141, 2004. Disponível em <[http://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922\(04\)00019-4](http://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922(04)00019-4)>. Acesso em 11 de jan. de 2017.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. **A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue**. *Phytochem.* 1987.

FALERO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 99, 2007. Disponível em <[http://www.cpac.embrapa.br/publicacoes/search_pbl/1?q=Marcador molecular](http://www.cpac.embrapa.br/publicacoes/search_pbl/1?q=Marcador+molecular)>. Acesso em 23 de jun. de 2016.

FAO. **Faostat**. Food Agriculture Organization Statistical database. 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em 23 de jun. de 2016.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D.; **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA- CENARGEM, p. 220,1998.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D.; **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em Análise Genética**. Embrapa, Cenargem, Brasília, DF. p. 220. 1995. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000111&pid=S0100-2945200200010000500010&lng=en>. Acesso em 11 de jan. de 2018.

FREITAS, J. de A. D de; ANDRADE, A. P. S; BRAGA S. R.; Produção integrada de melão nos Polos Mossoró-Açu e Baixo Jaguaribe: diagnóstico das conformidades e não conformidades com os requisitos do sistema. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, Embrapa Agroindústria Tropical. Documento 122. p. 27, 2009. Disponível em <http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/download/index.php?pub/Doc_122.pdf>. Acesso em 27 de abr.de 2016.

GAZAWAY W. S.; MCLEAN K. S.; A Survey of Plant-Parasitic Nematodes Associated with Cotton in Alabama. **The Journal of Cotton Science**, Auburn, USA. v. 7, p. 1-7, 2003. Disponível em <<https://www.cotton.org/journal/2003-07/1/upload/jcs07-001.pdf>>. Acesso em 10 de jan. de 2017.

GOULART, A. M. C.; Análise nematológica: importância e princípios gerais. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, **Documentos n. 299**, 2010. Disponível em <www.cpac.embrapa.br/download/1910/t>. Acesso em 25 de abr. de 2016.

GRANBERRY, D. M., NORTON, J. D.; Response of progeny from interspecific cross of *Cucumis melo* x *C. metuliferus* to *Meloidogyne incognita acrita*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 105, n. 2, p. 180-183, 1980.

HARRIS, T. H., SZALANSKI A. L., POWERS T. O.; **Molecular Identification of Nematodes Manual**. 406PlantScience Building, Department of Plant Pathology, University of Nebraska, Nebraska, USA, p.1-23, 2001. Disponível em <<https://nematode.unl.edu/nemaid.pdf>>. Acesso em 06 de fev. de 2017.

HERRERA-VÁSQUEZ, J. A. et al.; Molecular variability of different isolates of *Olpidium bornovanus*. In: XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. **Anais** Sorrento: Italy, p. 275, 2007.

HESPANHOL, A. N.; A fruticultura irrigada no pólo de desenvolvimento integrado Assu-Mossoró - Estado do Rio grande do Norte – Brasil. In: Jornadas Interdisciplinarias de Estudios Agrarios y Agroindustriales Argentinos y Latino americanos, IX., 2015, Buenos Aires. **Anais...**, Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, 2015. Disponível em <<http://www2.fct.unesp.br/nivaldo/Publica%E7%F5es-nivaldo/2015/POLO%20DE%20FRUTICULTURA%20-%20RN.pdf>>. Acesso em 27 de jan. de 2017.

HOSOYA K. et al.; Impact of resistant melon cultivars on *Sphaerotheca fuliginea*. **Plant Breeding**, Berlin, n. 119, p.286-288, 2000. Disponível em <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1439-0523.2000.00489.x>>. Acesso em 27 de jan. 2018.

IMA, R. D. et al.; Doenças causadas por nematoides em cucurbitáceas. **Informe agropecuário**. Embrapa Meio Ambiente (CNPMA), v.17, n.182, p.57-59, 1995. Disponível em <<http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=14581&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22CASTRO,%20J.%20M.%20da%20C.%22&qFacets=autoria:%22CASTRO,%20J.%20M.%20da%20C.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=>>> Acesso em 18 de ago. de 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA; **Produção Agrícola Municipal**. 2016. Disponível em <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612#resultado>>. Acesso em 10 de jan. de 2018.

JENKINS, W. R.; A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant disease report**, New Jersey, v. 48, n.9, p. 692, 1964. Disponível em <<http://garfield.library.upenn.edu/classics1980/A1980KJ72900001.pdf>>. Acesso em: 02 nov. 2015.

JONES, J. T. et al.; Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**. Melle, Belgium. v. 14, n.9, p. 946-961, 2013. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mpp.12057/epdf>> Acesso em 17 de jan. de 2018

KIRKPATRICK, T. L.; ROBBINS, R.T.; **Nematodes of cotton in Arkansas**. University of Arkansas, division of agriculture, cooperative extension service. Arkansas, p. 4, 2000. Acesso em 25 de abr. de 2016.

KONSTANTINOVA P. et al.; Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. In carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. **Mycological Research**. v. 106, n. 1, p. 23-33, 2002. Disponível em <<https://doi.org/10.1017/S0953756201005160>>. Acesso em 17 de jan. de 2018.

LUC, M.; BRIDGE, J.; SIKORA, R. A.; Reflections on nematology in subtropical and tropical agriculture. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Second edition. CABI: Wallingford. Cap 1, p. 1-10., 2005. Disponível em <<file:///C:/Users/windows/Downloads/Chapter1inTropicalandSubtropicalbook.pdf>>. Acesso em 17 de jan. de 2018.

MOJENA, R.; Hierarchical grouping method and stopping rules: an evaluation. **Computer Journal**, v. 20, p. 359-363, 1977. Disponível em <<https://academic.oup.com/comjnl/article/20/4/359/393930>> Acesso em 17 de jan. de 2018.

MOREIRA, S.R. et al.; **Melão (*Cucumis melo* L.)**. 2009. Artigo em hipertexto. Disponível em <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_3/melao/index.htm>. Acesso em 29 de jan. de 2017.

MOURA R. M.; PREDOSA E. M. R.; GUIMARÃES L. M. P.; Nematoses de alta importância econômica da cultura do melão no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Mossoró, RN, v. 27, n. 2, p. 225, 2002. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/fb/v27n2/9152.pdf>>. Acesso em 02 de nov. de 2015.

MOURA, M. C. F.; **Identificação microscópica e molecular de *olpidium bornovanuse* detecção do vírus da mancha necrótica do melão em meloeiro nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará**. 2012. 72f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, 2012. Disponível em <<http://www2.ufersa.edu.br/portal/view/uploads/setores/82/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20MARIA%20DA%20CONCEI%C3%87%C3%83O%20FREITAS%20MOURA.pdf>>. Acesso em 25 de abr. de 2016.

NICOL, J. M. et al.; Genomics and molecular genetics of Plant-Nematode Interactions. In: **Current nematode threats to world agriculture**. Cap. 2, p. 21-26, Media B.V, 2011. Disponível em <<file:///C:/Users/windows/Downloads/9789400704336-c2.pdf>>. Acesso em 15 de jan. de 2018.

NORTON, D. C., and T. L. NIBLACK.; **Biology and ecology of nematodes**. p. 47- 72. In: Nickle, W. R. Manual of Agricultural Nematology. Marcel Dekker, Inc., New York, NY. p. 1035, 1991.

NUGENT P. E.; DUKES P. D.; Root-noot nematode Resistance in *Cucumis* species. **Hort Science**, Charleston, v. 32, n. 5, p. 880-881, 1997. Disponível em <<http://hortsci.ashspublications.org/content/32/5/880.full.pdf+html>> Acesso em 28 de jan. de 2017.

NUNES, E. W. L. P.; **Caracterização de germoplasma, herança e identificação de marcadores snp associados à resistência a *Podosphaera xanthii* em meloeiro.** 2014. 124f. Tese. (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, 2014. Disponível em <<https://ppgfito.ufersa.edu.br/wp-content/uploads/sites/45/2015/02/Tese-2014-ELAINE-WELK-LOPES-PEREIRA-NUNES.pdf>>. Acesso em 05 de fev. de 2017.

NUNN, G. B.; **Nematode molecular evolution: an investigation of evolutionary patterns among nematodes based upon DNA sequences.** 1992. Ph.D. Thesis, University of Nottingham, Nottingham, UK.: Disponível em <<http://ethos.bl.uk/OrderDetails.do?uin=uk.bl.ethos.334855>>. Acesso em 28 de jan. de 2017.

PALOMARES-RIUS et al.; Prevalence and molecular diversity of reniform nematodes of the genus *Rotylenchulus* (Nematoda: Rotylenchulinae) in the Mediterranean Basin. **European Journal of Plant Pathology** Córdoba, Spain. v. 150, n. 2, p. 439-455, 2017. Disponível em <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-017-1292-8>>. Acesso em 21 de jan. de 2018.

PALOMARES-RIUS. J. E. et al.; Prevalence and molecular diversity of reniform nematodes of the genus *Rotylenchulus* (Nematoda: Rotylenchulinae) in the Mediterranean Basin. **European Journal of Plant Pathology**. v.150, n. 2, p.439-455, 2017. Disponível em <<https://doi.org/10.1007/s10658-017-1292-8>>. Acesso em 21 de jan. de 2018.

PAVÓN, Miguel Ángel et al.; PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a 1. **Food Control**, [s.l.], v. 21, n. 12, p.1745-1756, 2010. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.08.004.

PEEVER, T.L. et al.; Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. **Mycologia**, Lawrence, v. 1, n. 96, p.119-134, 2004.

PEREIRA F. et al.; Estimativa do Impacto Econômico e Social Direto de *Meloidogyne mayaguensis* na Cultura da Goiaba no Brasil. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba (SP), Brasil, v. 33, n. 2, p.176-181, out. 2008. Disponível em <<http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/ol%20332/176-181%20co.pdf>>. Acesso em 13 de mai. de 2016.

PITRAT, M.; Melon (*Cucumis melo* L.). In: Prohens J, Nuez F (eds) Handbook of crop breeding Vol I: vegetables. **Springer**, New York, p. 283–315, 2008. Acesso em 05 de fev. de 2017.

REIS, F. B., Jr. et al. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. 1 ed. Planaltina, DF: Embrapa-Cerrados, (Embrapa-Cerrados.Documentos, 51), p. 33, 2002.

RICARDO, V. A.; Caracterização molecular de populações do nematoide-de-cisto-da-soja com diferentes índices de parasitismo na cultivar Hartwig. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Londrina-PR. v.36, n. 2, p.331-337, 2001. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v36n2/a17v36n2.pdf>> Acesso em 09 de jan. de 2018.

ROBINSON, A. F. et al.; Review: *Rotylenchulus* Species: Identification, Distribution, Host Ranges, and Crop Plant Resistance. **Nematropica**. USA. v. 27, n.2, p. 127-180, 1997. Disponível em < <http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/64190/61858>>. Acesso em 19 de jan. de 2016.

ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A. D.; Ageitec – Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_54_711200516718.html#>. Acesso em 05 de set. de 2016.

ROTONDO, F. et al.; Comparison of *Alternaria* spp. Collected in Italy from Apple with *A. mali* and Other AM-Toxin Producing Strains. **Phytopathology**, [s.l.], v. 102, n. 12, p.1130-1142, 2012. Scientific Societies. DOI: 10.1094/phyto-04-12-0076-r.

SALES JÚNIOR, R. et al.; Aspectos qualitativos do melão exportado pelo Porto de Natal-RN. **Ciência Rural**, Mossoró, v. 18, n. 3, p. 200-203, jan./fev. 2006. Disponível em <<http://www.redalyc.org/pdf/2371/237121513011.pdf>>. Acesso em 19 de jan. de 2016.

SAYLER, R. J. et al.; Conventional PCR detection and Real-time PCR quantification of Reniform Nematodes. **Plant Disease**, Fayetteville, USA, v. 96, p. 1757-1762, 2012. Disponível em <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS-12-11-1033-RE>>. Acesso em 15 de nov. de 2016.

SENEVIRATNE et al.; Developing beneficial microbial biofilms on roots of non-legumes: a novel biofertilizing technique. In: Khan, M.S. Zaidi, A. and Musarrat, J. (eds) **Microbial Strategies for Crop Improvement**. Springer, Heidelberg, Germany, p. 51 – 62. 2009.

SILVA, H. R. et al.; **Cultivo do meloeiro para o norte de Minas Gerais**. Brasília: Embrapa Hortaliças, Circular técnica, 20, p. 23, 2000. Disponível em: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=626184&biblioteca=vazio&bu>

sca=autoria:%22MAENO,%20P.%22&qFacets=autoria:%22MAENO,%20P.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>. Acesso em 17 de jan. de 2017.

SILVA, M. C. et al.; Características produtivas e qualitativas de melão rendilhado adubado com nitrogênio e potássio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 6, p. 581-587, 2014. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662014000600003&lng=en&nrm=iso>. Acesso em de 29 jan. de 2017.

SIQUEIRA, K. M. S. et al.; Detecção de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira e mamoeiro no estado de Goiás, usando marcadores moleculares. **Tropical Plant Pathology**, Brasília -DF, v. 34, n. 4, p. 256-260, 2009. Disponível em <http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/12390/1/ARTIGO_Detec%C3%A7%C3%A3oMeloidogyneMayaguensisGoiabeira.pdf>. Acesso em 15 de ago. de 2016.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J.; The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxonomy**, v. 11, n. 1, p. 30-40, 1962.

TEIXEIRA, H. et al.; Marcadores RAPD na Análise da Diversidade Genética de Isolados de *Acremonium strictum**. **Fitopatologia Brasileira**. Lavras, MG. v. 29, n.6, p. 651-655, 2004. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/fb/v29n6/a09v29n6.pdf>>. Acesso em de jan. de 2018.

TILAHUN et al. Nuclear ribosomal DNA diversity of cotton pest (*Rotylenchulus reniformis*) in the United States. **African Journal of Biotechnology**. v. 7, n. 18, p. 3217-3224. Sep. 2008. Disponível em <<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59261>> Acesso em: jan 2018.

TORRES, et al. Response Cucurbit Species to *Rotylenchulus reniformis*. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília. v. 30, n. 1, p. 85-87, 2005. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582005000100016Acesso>. Acesso em 13 de jul. de 2017.

TORRES, et al.; *Pratylenchus brachyurus* em *Cucumis melo* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília. v. 29, n. 6, p. 668-669, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582004000600013>. Acesso em 17 de jun. de 2017.

TORRES, et al.; Sobrevivência de *Rotylenchulus reniformis* em solo naturalmente infestado submetido a diferentes períodos de Armazenamento. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília. v. 31, n. 2, p. 203-206, 2006. Acesso em

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582006000200015>.

Acesso em 13 de jul. de 2017.

TORRES, G. R. C. et al.; Levantamento de fitonematoides associados ao cultivo do meloeiro no Rio Grande do Norte e Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA. Goiânia. **Anais...** Goiânia: UFG, p. 128, 2007. Disponível em <https://www.researchgate.net/publication/309908083_Fitonematoides_Associados_a_Solos_Cultivados_com_Meloeiro_no_Rio_Grande_do_Norte_e_Ceara_Diagnostico_e_Sintese_da_Evolucao_de_um_Risco_a_Atividade>. Acesso em 02 de nov. de 2015.

VAN DEN BERG E. et al.; Morphological and molecular characterization of one new and several known species of the reniform nematode, *Rotylenchulus* Linford & Oliveira, 1940 (Hoplolaimidae: Rotylenchulinae), and a phylogeny of the genus. **Nematology**, Leiden, Holanda, v. 18, p. 67-107, 2015. Disponível em <http://www.russjnematology.com/subbotin/Reprint/Van_Den_Berg_2015.pdf>. Acesso em 02 de nov. de 2016.

WILLIAMS J. G. DNA Polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. v. 18, n.22, p. 6531-6535. 1990. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1979162>>. Acesso em 09 de jan. de 2018.