



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

**DIVERSIDADE DE *Meloidogyne incognita* E ESPÉCIES CORRELATAS
COMO SUGEREM ABORDAGENS BIOLÓGICAS, CITOLÓGICAS,
MORFOLÓGICAS E MOLECULARES**

MARCILENE FERNANDES ALMEIDA DOS SANTOS

BRASÍLIA

2011

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

**Diversidade de *Meloidogyne incognita* e espécies correlatas como sugerem
abordagens morfológicas, biológicas, citológicas e moleculares**

Marcilene Fernandes Almeida dos Santos
Orientador: Dr. Cleber Furlanetto
Co-orientadora: Dra. Regina M.D.G. Carneiro

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Fitopatologia, do
Departamento de Fitopatologia da
Universidade de Brasília, como requisito
para obtenção do título de Mestre em
Fitopatologia.**

BRASÍLIA
2011

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

Comissão examinadora:

Prof. Cleber Furlanetto, Universidade de Brasília-UnB (Orientador/Presidente)

Instituto de Ciências Biológicas/ Departamento de Fitopatologia

Brasília, DF

Prof. Juvenil Enrique Cares, Universidade de Brasília – UnB (Examinador interno)

Instituto de Ciências Biológicas/ Departamento de Fitopatologia

Brasília, DF

Dr. Jadir Borges Pinheiro, Embrapa Hortaliças – CNPH (Examinador externo)

Embrapa Hortaliças – CNPH

Brasília, DF

DEDICATÓRIA

A Deus,

Que sempre me deu força, determinação e a perseverança para prosseguir com meus trabalhos e ideais de maneira cada vez melhor.

Aos meus pais,

Maria Suéleci e Gilberto que me deram apoio, ensinamentos, confiança e principalmente amor para que eu pudesse realizar feitos como este.

Ao meu irmão,

Marcelo, sua amizade e carinho são muito importantes pra mim. Obrigado por tudo.

Ao meu amado,

Guilherme, uma estrela guia em minha vida. Te amo muito!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, especialmente, aos meus orientadores, pelo inestimável apoio prestado durante a realização deste trabalho e, principalmente, pela oportunidade de muito aprender com a experiência e conhecimento científico que lhes pertence.

À Dra. Regina Carneiro, exemplo de dedicação e competência, pela orientação, incentivo, conhecimentos transmitidos e apoio constante na realização deste trabalho. Em especial, agradeço imensamente por ter acreditado em mim e me proporcionado todo o crescimento profissional adquirido até hoje. Muito obrigado!

Ao Dr. e professor Cleber Furlanetto, pela orientação, apoio, acolhimento na Universidade de Brasília e ensinamentos proporcionados na área de Nematologia e Biologia Molecular.

Ao Dr. Phillipe Castagnone-Sereno e a Dra. Myrian Tigano pela orientação e apoio na área de Biologia Molecular.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Juvenil Enrique Cares e Dr. Jadir Borges Pinheiro pela predisposição em analisar este trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia da Universidade de Brasília, pelos ensinamentos em Fitopatologia, e ao Ribamar pelo suporte administrativo.

Ao Dr. Valdir Correia pela predisposição em me auxiliar na reta final da dissertação.

Aos amigos do laboratório, Mariana, Vanessa, Joelma, Edriana, Marina, Andréa, Fábio, Esdras, Andressa, Rita, Irene e Daniela, agradeço muito a essas pessoas maravilhosas que conviveram comigo no dia a dia, tornando-o sempre melhor. Em especial pela amizade e carinho de todos vocês. Às minhas amigas, que jamais poderia deixar de ressaltar a importância de vocês que fizeram e continuam fazendo parte da minha vida: Aline Paula, Ana Paula Dantas, Ana Paula Lopes, Fabiane, Janaína, Natália e Joseane. Por fim agradeço

a todos vocês, sei que vão saber que estão em um lugar especial no meu coração e nas minhas mais doces lembranças.

As minhas queridas e eternas amigas, Fátima Muniz, um anjo da guarda sempre presente apesar da distância e a Ana Cristina, minha pipoquinha preferida, pelos ensinamentos, carinho, afago e amizade de sempre.

Aos meus companheiros de turma que compartilharam comigo alegrias e dificuldades.

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

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por ter me proporcionado à realização desse trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho. O meu singelo Obrigado a todos vocês!

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	03
1. INTRODUÇÃO	05
2. OBJETIVOS.....	08
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	09
3.1 Classificação do gênero.....	09
3.2 Ciclo de vida.....	09
3.3 Métodos de identificação de <i>Meloidogyne</i> spp.....	11
3.3.1 Identificação morfológica e morfométrica.....	14
3.3.2 Identificação bioquímica e molecular.....	20
3.3.3 Raças fisiológicas	24
3.3.4 Citogenética	26
3.4 Diversidade genética de <i>Meloidogyne</i> spp.	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Identificação e purificação bioquímica das espécies de <i>Meloidogyne</i>	32
4.2 Populações de nematóides	33
4.3 Raças fisiológicas.....	33
4.4 Extrações de fêmeas, machos e juvenis de segundo estágio (J2) para estudos morfológicos.....	36
4.5 Extração de ovos para estudos moleculares	36
4.6 Extração, purificação e precipitação de DNA	37

4.7 Citogenética	39
4.8 Identificação morfológica e morfométrica.....	39
4.9 Identificação molecular: marcador SCAR.....	41
4.10 Análise de marcadores RAPD e ISSR.....	42
4.11 Análise filogenética.....	44
5. RESULTADOS	45
5.1 Análise bioquímica: esterase e malato-desidrogenase.....	45
5.2 Análises morfológica e morfométrica.....	47
5.3 Raças fisiológicas.....	53
5.4 Citogenética.....	53
5.5 Análise molecular: Marcadores SCAR.....	55
5.6 Diversidade genética de isolados de <i>Meloidogyne</i> spp. por marcadores moleculares RAPD e ISSR	57
6. DISCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÕES.....	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Fenótipos de esterase de populações de *Meloidogyne incognita* (A) I1, (B) I2, (C) *Meloidogyne* sp. 1 (S2) e (D) *Meloidogyne* sp. 2 (S2a); *M. javanica* (J3) foi usado como referência.....46
- Figura 2:** Fenótipos de malato-desidrogenase detectados em *M. incognita*, *Meloidogyne* sp. 1 e *M. hispanica* (A) N1 e (B) *Meloidogyne* sp.2 (N3). *M. hapla* (H1) foi usado como referência.....46
- Figura 3:** Microscopia de Luz (ML) do padrão perineal de fêmeas de isolados de *M. incognita* e *Meloidogyne* spp. (A) I1N1 (isolado 1), (B) I2N1 (isolado 4), (C) S2N1 (isolado 11), (D) S2N1 (isolado 10), (E) S2aN3 (isolado 13) e (F) S2aN3 (isolado 14).....48
- Figura 4:** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos estiletos de fêmeas de diferentes isolados de *M. incognita* e *Meloidogyne* spp. (A) I1N1 (isolado 1), (B) I2N1 (isolado 4), (C) S2N1 (isolado 10), (D) S2N1 (isolado 11), (E) S2N1 (isolado 9) e (F) S2aN3 (isolado 14).....49
- Figura 5:** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da região anterior dos machos de diferentes isolados de *M. incognita* e *Meloidogyne* spp. (A) I1N1, isolado 1, (B) I2N1, isolado 4, (C) S2N1, isolado 11, (D) S2N1, isolado 10, (E) S2N1, isolado 9 e (F) S2N3, isolado 14.....51
- Figura 6:** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) (A) estilete de machos de *Meloidogyne* sp. 2 S2aN3 (isolado 14), (B) Região posterior (cauda) de *M. incognita* S2N1

(isolado 11) e (C) Região anterior do segundo estágio juvenil (J2) de *M. incognita* S2N1 (isolado 11).....52

Figura 7: Amplificação específica usando os pares de primers em isolados de *M. incognita* (1-12), *Meloidogyne* sp. 2 (13 e 14), *M. hispanica* (15, 16 e 17) e *M. javanica* (18). (A) incB06F/R (Ziljstra *et al.*, 2000), (B) incK14F/R (Randig *et al.*, 2002) e (C) miF/R (Meng *et al.*, 2004).....56

Figura 8: Árvore filogenética de dados em conjunto de dois marcadores moleculares (ISSR e RAPD) de *Meloidogyne* spp. Números em negrito no final de cada ramo representam os códigos dos isolados (Tabela 1). Números próximos aos nós indicam as probabilidades de similaridade. Os pontos vermelhos indicam os dois grupos monofiléticos. Colunas a direita indicam os fenótipos isoenzimáticos e de SCAR dos isolados. Os fenótipos de SCAR (1), (2) e (3) correspondem ao uso dos pares de primers miF/R, incB06F/R e incK14F/R, respectivamente.....58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Isolados de <i>Meloidogyne</i> spp., origem geográfica e hospedeira.....	35
Tabela 2: Características de marcadores SCAR espécie-específicos para <i>M. incognita</i> : incK14F/R (Randig <i>et al.</i> , 2002), incB06F/R (Ziljstra <i>et al.</i> , 2000) e mi F/R (Meng <i>et al.</i> ,2004).....	42
Tabela 3: Primers RAPD utilizados em reações de PCR para o estudo da variabilidade genética de populações de <i>Meloidogyne</i> spp.....	43-44
Tabela 4: Primers ISSR utilizados em reações de PCR para o estudo da variabilidade genética de populações de <i>Meloidogyne</i> spp.	44
Tabela 5: Características de isolados de <i>Meloidogyne</i> spp. quanto a origem, hospedeira, fenótipo enzimático e número de cromossomos.....	54-55

RESUMO

Diversidade de *Meloidogyne incognita* e espécies correlatas como sugerem abordagens biológicas, citológicas, morfológicas e moleculares

Meloidogyne incognita é uma das espécies de nematoide das galhas mais polífagas que ocorrem no Brasil e no mundo. Oito representantes de *M. incognita* incluindo os dois fenótipos enzimáticos (esterase e malato desidrogenase: I1N1, I2N1) e quatro isolados de espécie cripta (*Meloidogyne* sp.1 - S2N1), representando um tipo citológico ($3n = 40-46$) e quatro raças fisiológicas foram estudados. *Meloidogyne hispanica* (H3N1, $2n = 32-36$) e dois isolados atípicos de *Meloidogyne* sp. 2 (S2N3, $3n = 40-44$) foram incluídas neste estudo. Todos os isolados foram testados com três marcadores moleculares espécie-específico do tipo SCAR, desenvolvidos para *M. incognita*. Os pares de primers B06F/R, miF/R e incK14F/R amplificaram três fragmentos espécie-específico de 1,200 bp, 955 bp e 399 bp, respectivamente, para os oito isolados de *M. incognita* e quatro de *Meloidogyne* sp. 1, não ocorrendo para os isolados pertencentes a *M. hispanica* e *Meloidogyne* sp. 2. A variabilidade genética de todos os isolados de *Meloidogyne* spp. usados neste estudo foi avaliada por meio dos marcadores RAPD e ISSR. Análises filogenéticas das matrizes resultantes usando (UPGMA, Maximum Parsimony e Bayesian inference) produziram árvores com a mesma topologia geral na relação entre as espécies. Dois grupos monofiléticos foram observados: grupo I, consistindo de isolados de *M. hispanica* e *Meloidogyne* sp.2 atípicos e grupo II agrupando-se todos os isolados de *M. incognita* e *Meloidogyne* sp.1 (S2N1). Considerando abordagens morfométricas, morfológicas e moleculares, foi possível concluir que os três fenótipos enzimáticos (I1N1, I2N2 e S2N1) caracterizam a espécie *M. incognita*. Nenhuma correlação foi detectada entre os fenótipos

isoenzimáticos, as raças dos isolados e a topologia da árvore. Morfologicamente, os isolados de (S2aN3) diferem de *M. incognita* e *M. spanica* pelas características do estilete das fêmeas. Os resultados deste estudo sugerem que os dois isolados com fenótipo S2aN3 pertencem à espécie ainda não identificada, mas geneticamente relacionada à *M. spanica*.

Palavras-chave: Identificação bioquímica e molecular, marcadores ISSR e RAPD, nematoides das galhas, variabilidade genética.

ABSTRACT

Diversity of *Meloidogyne incognita* and related species as inferred from biological, cytological, morphological and molecular data

Meloidogyne incognita is one of the most polyphagous species of root-knot nematode occurring in Brazil and worldwide. Eight *M. incognita* representing two enzymatic phenotypes (esterase and malate deshydrogenase: I1N1, I2N1) and four cryptic isolates of *Meloidogyne* sp.1 (S2N1), representing one cytological type (3n=40-46), and four host races were studied. *Meloidogyne hispanica* (H3N1, 2n=32-36) and two isolates of an atypical *Meloidogyne* sp.2 (S2N3, 3n= 40-44) were included in this study. All isolates were tested with three species-specific molecular markers, i.e., SCARs, developed for *M. incognita*. The pairs of primers B06F/R, miF/R and incK14F/R amplified three species-specific fragments of 1,200 bp, 955 bp and 399 bp, respectively, and were observed for the eight isolates of *M. incognita* and four of *Meloidogyne* sp.1, and not for those belonging to either *M. hispanica* or *Meloidogyne* sp.2. Overall genetic variability of *Meloidogyne* isolates in this study was evaluated using RAPD and ISSR markers. Phylogenetic analyses of the resulting matrices using UPGMA, Maximum Parsimony and Bayesian inference produced trees with the same general topology with respect the relationships among species. Two strongly supported monophyletic clades were observed: clade I, consisting of *M. hispanica* isolates and the atypical *Meloidogyne* sp.2, and clade II, clustering together all *M. incognita* isolates and *Meloidogyne* sp.1 (S2N1). Considering morphometrical, morphological and molecular approaches, it was possible to conclude that the three enzymatic phenotypes (I1N1, I2N2 and S2N1) characterized *M. incognita*. No strict correlation could be detected between either, the isoenzymatic phenotypes or the races of

the isolates, and the tree topology. Morphologically, the S2N3 isolates differ from *M. incognita* and *M. hispanica* by female stylet features. The results of this study suggested that the two isolates with phenotypes S2aN3 belong to unidentified species closely related to *M. hispanica*.

Key-words: biochemical and molecular identification, ISSR, RAPD, root –knot nematodes, variability.

1. INTRODUÇÃO

Os nematoides fitopatogênicos são de grande importância para a agricultura mundial em função das perdas significativas que causam em culturas de importância econômica. Além disso, a adoção de medidas de controle eleva os custos de produção reduzindo o lucro dos produtores (Karssen & Moens, 2006). Os nematoides formadores de galhas pertencentes ao gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1887, constituem o grupo de fitoparasitas mais importantes no mundo, com mais de 90 espécies descritas (Karssen & Moens, 2006) e mais de 2000 plantas hospedeiras, representando ameaça à produção agrícola mundial (Perry *et al.*, 2009).

Meloidogyne incognita (Kofoid & White, 1919), Chitwood, 1949, é considerada umas das principais espécies de importância econômica, sendo responsável por aproximadamente 95% dos prejuízos causados à agricultura mundial (Moura, 1996). É uma espécie polífaga comumente encontradas em regiões tropicais e temperadas, onde está restrita a sistemas agrícolas protegidos (Karssen & Moens, 2006).

A variabilidade genética de *M. incognita* pode ser observada pela existência de quatro raças fisiológicas (Hartman & Sasser, 1985), dois fenótipos para a isoenzima esterase (EST), denominados I1 e I2, e um fenótipo para malato-desidrogenase (MDH), denominado N1 (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Carneiro *et al.*, 1996a, 2000, 2004; Castro *et al.*, 2003, Cofcewicz *et al.*, 2004, Lima Medina *et al.*, 2006). Embora seja considerada como uma espécie pouco variável citologicamente e molecularmente (Triantaphyllou, 1985a; Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997; Semblat *et al.*, 1998), alguns variantes isoenzimáticos (S1N1 ou S2N1) foram descritos e classificados

como espécie atípica ou críptica (Castro *et al.*, 2003; Cofcewicz *et al.*, 2004; Carneiro *et al.*, 2005b; Lima Medina *et al.*, 2006).

A caracterização morfológica detalhada de algumas populações de *M. incognita*, incluindo as pertencentes às quatro raças e às duas formas citológicas existentes, demonstrou que todas as populações já estudadas são morfológicamente similares e constituem a mesma unidade taxonômica (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Por outro lado, isolados atípicos ainda não identificados em nível de espécie foram consideradas espécies crípticas por apresentarem características morfológicas e agrupamentos em estudos moleculares próximos a *M. incognita* (Castro *et al.*, 2003; Cofcewicz *et al.*, 2004; 2005; Carneiro *et al.*, 2005b; Lima Medina *et al.*, 2006).

Citologicamente, a maioria das populações de *M. incognita* tem $3n=40-46$ cromossomos e são consideradas triplóides (Triantaphyllou, 1985a; Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Embora se reproduzam por partenogênese mitótica, populações de *M. incognita* apresentam como características comuns uma rápida colonização e adaptação em ambientes desfavoráveis e isso, possivelmente, lhes conferem vantagens em termos de parasitismo e capacidade de causar danos em plantas, razão pela qual é considerado um dos mais destrutivos patógenos no mundo (Trudgill & Blok, 2001).

Com base em análises de PCR-RAPD, tem-se demonstrado baixa variabilidade intraespecífica em populações de *M. incognita*, sendo os resultados congruentes com os fenótipos isoenzimáticos (Randig *et al.*, 2002), ou seja, os fenótipos I1N1 e I2N1 se agrupam com 100% de bootstrap (Randig *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2004), concordando com resultados anteriores de análises moleculares (Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997; Semblat *et al.*, 1998).

Recentemente, três marcadores espécie-específicos do tipo SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) foram desenvolvidos para identificar *M. incognita* (incB06F/R, incK14F/R, miF/R). Porém, poucos isolados dessa espécie foram testados (Ziljstra *et al.*, 2000; Randig *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2004).

Nunca foi realizado um estudo completo sobre a variabilidade de *M. incognita* utilizando todas as ferramentas (morfologia e morfometria, caracterização enzimática, citológica, fisiológica e molecular) em conjunto, sendo que todos os estudos anteriores integraram uma ou duas técnicas e foram feitos com poucos isolados.

Considerando que *M. incognita* e algumas populações atípicas de *Meloidogyne* spp. apresentaram características morfológicas semelhantes e perfis enzimáticos diferentes, quatro raças fisiológicas em que os estudos de variabilidade genética consideraram pouco essas características, acredita-se que haja grande variabilidade intraespecífica em níveis molecular e morfológico, em populações de *M. incognita* e espécies correlatas, provenientes de várias culturas e regiões geográficas, justificando-se assim, a realização deste estudo.

2. OBJETIVOS

No presente trabalho objetivou estudar a diversidade genética e a correlação entre oito isolados de *Meloidogyne incognita*, seis populações atípicas de *Meloidogyne* spp. e de três *M. hispanica*, provenientes de diferentes culturas e regiões geográficas, com base em caracteres bioquímicos, citológicos, morfológicos/morfométricos, biológicos e moleculares. Objetivou-se também, a validação de três marcadores do tipo SCAR, previamente descritos para a identificação de *M. incognita*, para mais isolados dessa espécie pertencentes a diferentes raças e diferentes perfis de enzima.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Classificação do gênero *Meloidogyne*

As espécies do gênero *Meloidogyne*, constituem uma pequena parte do Filo Nematoda (Maggenti, 1981) e estão incluídas dentro da classe Chromadorea, Ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Infraordem Tylenchomorpha, Superfamília Tylenchoidea e família Meloidogynidae (De Ley & Blaxter, 2002; Karssen & Moens, 2006).

3.2 Ciclo de vida

O ciclo de vida de *Meloidogyne* inicia-se com a fêmea depositando seus ovos em um único local da raiz, formando uma massa de ovos envolta em uma matriz gelatinosa. Cada massa de ovos contém em média 400 a 500 ovos e pode formar-se em meio ao parênquima cortical (internas) ou sobre a superfície das raízes (externas). O desenvolvimento embrionário resulta no juvenil de primeiro estágio (J1) que passa por uma ecdise ainda no ovo, dando origem ao juvenil de segundo estágio (J2). As formas pré-parasíticas (J2) eclodem dos ovos por força mecânica de seu estilete e também pela ação enzimática de quitinases, produzidas nas glândulas esofagianas e liberada via estilete (Abad *et al.*, 2009). Quando liberadas dos ovos, as formas J2 pré-infectivas migram pelo solo em direção às raízes de plantas hospedeiras, guiadas por exsudatos radiculares liberados pelas raízes. Uma vez na superfície das raízes, os J2 munidos de um arsenal enzimático composto principalmente por enzimas degradadoras de parede celular, penetram nas raízes migrando intercelularmente em direção

ao cilindro vascular, aonde estabelecem o seu sítio de alimentação com a formação de células gigantes (Taylor & Sasser, 1983).

No sítio de alimentação, o nematoide passa pela segunda ($J2 > J3$), terceira ($J3 > J4$) e quarta ($J4 > \text{fêmea jovem}$) ecdises (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Quando a fêmea jovem é formada, inicia-se a fase sedentária do nematoide, a qual durará até o final de seu ciclo de vida com o amadurecimento da fêmea, formação e liberação de ovos. As células adjacentes às células gigantes sofrem distúrbio hormonal (hiperauxina), levando à hiperplasia e hipertrofia das mesmas, dando origem às galhas, principal sintoma causado por nematoides desse gênero em plantas (Moens *et al.*, 2009). Durante esse desenvolvimento pós-embriônico, o sistema reprodutivo desenvolve-se e crescem as gônadas (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

A mudança de forma nos machos (piriforme para adulto vermiforme) ocorre durante o quarto estágio juvenil ($J4$). Nesse período, o $J4$ passa por uma metamorfose na qual o corpo se alonga, assumindo o macho uma forma vermiforme. O $J4$ envolvido pelas cutículas do segundo e terceiro estádios e, após a última ecdise, o macho emerge inteiramente desenvolvido. Os machos adultos não se alimentam, saem da raiz e movem-se livremente no solo. Não há acasalamento, nas espécies partenogênicas permanecendo os machos no solo até a morte (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

A duração do ciclo de vida do nematoide das galhas é fortemente afetada pela temperatura, umidade e planta hospedeira. Para *M. incognita* em tomateiro com temperatura próxima de 29 °C, as primeiras fêmeas aparecem com 13-15 dias após a penetração em raízes, e as primeiras massas de ovos com 19-21 dias (Moens *et al.*, 2009). No geral, as fêmeas produzem ovos por três semanas, depois cessam a produção, podendo

viver um pouco mais. Os machos vivem semanas e os J2 podem viver de poucos dias a meses (Taylor & Sasser, 1983).

Em condições normais, para *Meloidogyne* a quase totalidade dos adultos formados são fêmeas. Porém, em condições ambientais desfavoráveis, com elevada população de nematoides na raiz ou resistência da planta hospedeira, os juvenis que se desenvolveriam em fêmeas, tornam-se machos, pois seu primórdio sexual se desenvolve em testículos em vez de ovários. Tal fenômeno é conhecido por reversão sexual e é um dos mecanismos de sobrevivência desses nematoides, pois menos ovos serão produzidos e o parasitismo sobre a planta infectada será mais brando, garantindo a sobrevivência das poucas fêmeas formadas (Freitas *et al.*, 2006).

3.3 Métodos de identificação de *Meloidogyne* spp.

A identificação precisa das espécies de *Meloidogyne* é difícil e, às vezes, baseada em caracteres subjetivos. Além disso, a diagnose é bastante dificultada pelo elevado número de espécies descritas, muitas vezes com diagnoses duvidosas, presença de espécies crípticas e pela existência de variabilidade intraespecífica. Além do mais, existe o problema do conceito de espécie para organismos predominantemente partenogênicos (Trudgill, 1991; Roberts, 1995; Hunt & Handoo, 2009).

Dentre os métodos empregados na diagnose de *Meloidogyne* spp., destacam-se a configuração perineal de fêmeas, a morfologia da região anterior e do estilete de machos, fêmeas e juvenis de segundo estágio (J2), características citogenéticas e sobretudo identificação bioquímica e molecular (Eisenback & Hunt, 2009).

A configuração da região perineal de fêmeas maduras foi a abordagem morfológica mais utilizada na identificação de espécies de *Meloidogyne*, pelo fato dessa região conter

várias estrias formando desenhos, às vezes característicos da espécie. Porém, os padrões perineais quando usados isoladamente na identificação de espécies são subjetivos e pouco precisos, sendo úteis como métodos complementares a serem utilizados juntamente com a caracterização enzimática e/ou molecular (Carneiro *et al.*, 2004, Carneiro & Cofcewicz, 2008).

A identificação de raças fisiológicas em espécies do gênero *Meloidogyne* é realizada pelo teste de hospedeiros diferenciadores estabelecidos na Carolina do Norte (Hartman & Sasser, 1985) e as variações intraespecífica que podem ser encontradas em populações de campo são freqüentes. Raças fisiológicas já foram relatadas em importantes espécies como *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885), Chitwood, 1949, (Carneiro *et al.*, 2003), *M. incognita* e *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889), Chitwood, 1949, (Hartman & Sasser, 1985), *Meloidogyne hapla* (Chitwood, 1949) (Wofford *et al.*, 1989), *Meloidogyne exigua* (Goeldi, 1887) (Silva, 2005, Muniz *et al.*, 2008) e *Meloidogyne chitwoodi* Golden, O' Bannon, (Santo & Finley, 1980) (Mojtahedi *et al.*, 1988).

Estudos biológicos sugerem que a variabilidade genética existente no nematoide das galhas pode estar relacionada ao modo de reprodução, que varia de anfimixia à partenogênese facultativa ou obrigatória; ao grau de ploidia, que vai desde haplóide até vários níveis de poliploidia; além de variações no número de cromossomos somáticos, que variam de 7 a 58 (Chitwood & Perry, 2009).

Estudos bioquímicos, envolvendo proteínas solúveis, foram realizados nos últimos 30 anos, e têm se destacado como uma das técnicas mais confiáveis na identificação de *Meloidogyne* spp. por serem as esterases espécie-específicas e malato desidrogenases auxiliares, sendo assim possível a identificação de cerca de 40 espécies diferentes (Blok & Powers, 2009).

Embora a caracterização das principais espécies de *Meloidogyne* tenha sido alcançada por meio de isoenzimas, essa técnica não pode distinguir facilmente raças de uma mesma espécie (Janati *et al.*, 1982) e que apesar de ser um método usual na identificação de espécies de *Meloidogyne* (Esbenshade & Triantaphyllou, 1990), em geral, é muito trabalhosa e é empregada unicamente para fêmeas, não permitindo a utilização de outros estádios de desenvolvimento do nematoide (Salgado *et al.*, 2011). Para fins agronômicos, o ideal seria dispor de um método de detecção rápido e aplicável a qualquer estágio de desenvolvimento.

O advento da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) fez progredir de maneira considerável os métodos de análise de DNA e levou à descrição de outras classes de marcadores moleculares, que associadas às técnicas de clonagem e sequenciamento de DNA, têm possibilitado um rápido acúmulo de informações sobre a estrutura de genomas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é baseada na técnica de PCR, e é utilizada atualmente para os estudos genéticos e para a diferenciação de muitas espécies de *Meloidogyne*, a partir de perfis de bandas geradas com o auxílio de primers de sequências aleatórias (Cenis, 1993; Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997; Randig *et al.*, 2002). A técnica de PCR-ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) é metodologicamente similar ao RAPD e foi desenvolvida para estudar a diversidade genética em populações naturais, fornecendo resultados semelhantes. Os primers utilizados têm alta temperatura de anelamento e já foram usados no estudo de estruturas de populações de várias plantas e espécies animais, podendo fornecer resultados

complementares ao RAPD, tendo sido testados em populações de nematoides de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935), Thorne & Allen, 1944, (Lax *et al.*, 2007).

Uma abordagem mais recente é a conversão dos marcadores RAPD em SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), termo cunhado por Paran & Michelmore (1993) para definir marcadores RAPD cuja sequência interna tenha sido determinada, permitindo compor primers mais longos, ricos em guanina e citosina e de sequência específica. Os marcadores SCAR podem ser utilizados como pontos de referência física no genoma, servindo para mapeamento, ou como marcadores genéticos, quando estão associados a algum genótipo de interesse (Mienie *et al.*, 2002; Noir *et al.*, 2003).

Com relação ao nematoide das galhas os marcadores SCAR já foram desenvolvidos para separar *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (Zijlstra, 2000), entre outras. Marcadores SCAR espécie-específicos foram também desenvolvidos para as três principais espécies de *Meloidogyne* parasitas de cafeeiro no Brasil: *M. incognita*, *M. exigua* e *Meloidogyne paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes, (Santos & Almeida, 1996) (Randig *et al.*, 2002). Mais recentemente, para *Meloidogyne enterolobii* (Yang & Eisenback, 1983), o nematoide de galhas da goiabeira (Tigano *et al.*, 2010).

3.3.1 Identificação morfológica e morfométrica

Segundo Eisenback & Hunt (2009) a morfologia é, até o presente, a base da taxonomia e da classificação de *Meloidogyne* spp. Os microscópios eletrônicos de varredura e transmissão mudaram grandemente os conceitos da morfologia dos nematoides, pois revelaram detalhes das superfícies externas e das estruturas internas com clareza. Ao se usar a morfologia na taxonomia, é muito importante que se conheça a amplitude de variabilidades de um caráter em particular sob condições diferentes. Os caracteres

morfométricos e morfológicos tendem a variar sob a influência de condições geográficas e ecológicas que resultam em ecótipos e populações hospedeiro-específicas. Tais populações são, algumas vezes, descritas como espécies novas, embora as diferenças entre elas sejam variações intra-específicas (Hunt & Handoo, 2009).

Por causa da similaridade morfológica e morfométrica entre as espécies de *Meloidogyne*, o mais apropriado é ponderar uma combinação de caracteres diferenciais de fêmeas, machos e juvenis de segundo estágio (Carneiro & Cofcewicz, 2008). Porém, na diferenciação de *Meloidogyne* spp., os caracteres morfológicos têm sido mais utilizados do que os morfométricos, uma vez que esses podem ser mais afetados pelas condições ambientais (Hunt & Handoo, 2009).

Estudos ao Microscópio Ótico (MO) e Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), envolvendo a região anterior e estiletos de machos, fêmeas e J2 e a região perineal de fêmeas maduras, fornecem subsídios necessários à caracterização intra e interespecífica de *Meloidogyne* spp. (Eisenback & Hunt, 2009).

De modo geral, as fêmeas adultas sedentárias do gênero *Meloidogyne* apresentam coloração esbranquiçada, corpo piriforme e comprimento médio entre 0,44-1,30 mm e largura de 0,325-0,700 mm (Eisenback, 1985a). Em muitas espécies, as fêmeas têm corpo simétrico com pescoço e região perineal (vulva-ânus) em linha reta. Em algumas espécies, o pescoço pode projetar-se formando um ângulo que varia de 15-90°C (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

O estomatoestilete de fêmeas de *Meloidogyne* consiste de um cone, que em muitas espécies é pouco curvado dorsalmente, a haste reta e três bulbos basais de altura, largura e disposições variáveis (Hunt & Handoo, 2009). Em muitos casos, a morfologia do estilete ao MEV pode ser espécie-específica (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

O orifício da glândula esofagiana dorsal (DEGO) está localizado posteriormente aos bulbos basais do estilete (Karssen & Moens, 2006). A distância do DEGO tem uma ampla variação entre as espécies (2-10 μm) e pode ser importante na identificação destas espécies (Jepson, 1987). O poro excretor está sempre localizado anteriormente ao bulbo mediano, mas esta posição varia muito dentro e entre as espécies, não sendo um bom parâmetro para diagnóstico (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

As fêmeas são didélficas e as duas gônadas são longas e ocupam a maior parte do corpo. Cada gônada é composta de um ovário com zona germinativa e zona de crescimento, um oviduto, espermateca globular e útero longo. O número de células no oviduto é constante para todas as espécies (8 células), enquanto que as células da espermateca diferem entre as espécies e podem ser usadas como caráter diagnóstico (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Seis glândulas retais secretam material gelatinoso em que os ovos não retidos no corpo são depositados (Hunt & Handoo, 2009).

A configuração da região perineal de fêmeas maduras de *Meloidogyne* spp. era uma das principais técnicas utilizadas na identificação do gênero (Ferraz & Monteiro, 1995). Porém, a utilização dessa técnica na identificação de espécies do gênero *Meloidogyne* tem sido muito criticada, devido à ocorrência de variações nas configurações perineais mesmo em populações oriundas de uma mesma massa de ovos (Moura, 1996). Por exemplo, *M. paranaensis* foi identificada incorretamente como *M. incognita* por 22 anos no Brasil (Carneiro *et al.*, 1996a) e, também por muitos anos na Guatemala (Carneiro *et al.*, 2004). Reciprocamente, o padrão perineal pode ser usado como uma ferramenta complementar na identificação enzimática e na caracterização morfológica e molecular (Carneiro *et al.*, 2004). Segundo, Eisenback *et al.* (1994), os padrões perineais de *Meloidogyne konaensis*

Eisenback, (Bernard & Schmitt, 1995), *M. incognita* e *M. arenaria* são similares, demonstrando a dificuldade de utilização dessa técnica.

Características morfológicas dos machos, segundo Carneiro *et al.*, (2004), são essenciais no diagnóstico de algumas espécies, tais como *M. paranaensis*, *M. konaensis* e *M. incognita*. Com o uso dessa ferramenta foi possível confirmar que populações do cafeeiro da Guatemala eram *M. paranaensis*. Os machos vermiformes, não sedentários são muito variáveis no comprimento do corpo de 700 a 2.000 μm e isso se deve à variação nas condições ambientais durante o seu desenvolvimento (Eisenback, 1985a). Características morfométricas tais como, comprimento do corpo, do esôfago, da cauda e largura do corpo possui pouco valor taxonômico (Eisenback & Triantaphyllou, 1991), porém, a região anterior e morfologia do estilete dos machos são fontes de caracteres morfológicos importantes (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

A cápsula cefálica dos machos inclui um disco labial redondo cercado por lábios laterais e medianos. Em algumas espécies, os lábios laterais são reduzidos ou ausentes (Karssen & Moens, 2006). Em *Meloidogyne* há quatro órgãos sensoriais terminais nos lábios medianos (sensilas cefálicas) e seis outros ao redor do estoma (sensilas labiais). O tamanho, a altura e a forma da região cefálica, a forma e a proporção do disco labial e lábios, a expressão labial e sensilas cefálicas, a presença e/ou ausência de anelações na cápsula cefálica podem ser usadas para distinguir espécies e populações de *Meloidogyne* (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

O comprimento do estilete dos machos tem uma ampla variação dentro do gênero (13-30 μm); embora muitas espécies tenham em média 18-24 μm , isso representa uma característica diferencial entre as espécies. Tamanho e forma do cone do estilete, da haste e dos bulbos são excelentes caracteres na identificação dos machos. O DEGO varia de 2 -13

μ e às vezes pode ser uma característica importante na identificação dos machos (Hunt & Handoo, 2009).

A posição do poro excretor dos machos exibe uma ampla variação intraespecífica e tem valor limitado como característica diferencial. O hemizonídeo está localizado anteriormente ao poro excretor e pode auxiliar na taxonomia apenas de algumas espécies na qual o poro excretor esteja localizado posteriormente (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Os machos geralmente apresentam um longo testículo. Em muitas espécies o campo lateral tem quatro incisuras. A cauda é muito pequena, abruptamente arredondada e sem bursa. Pequenos fasmídeos estão posicionados próximos à cloaca. Os espículos são longos, variando de 20-40 μm (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Os J2 infectivos são vermiformes, anelados com tamanho que varia de 250-600 μm (Karssen & Moens, 2006). Várias espécies se sobrepõem quanto ao comprimento do corpo, portanto essa característica é inadequada na identificação de espécies. Devido ao tamanho pequeno dos J2, é difícil discernir a morfologia da região cefálica. Os J2 têm características similares aos machos, as quais somente podem ser visualizadas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). Em geral, a morfologia da região labial é totalmente similar entre as espécies. Algumas espécies, entretanto, diferem na forma do disco labial, dos lábios medianos e laterais, nas papilas cefálicas e na ocorrência de anelações na região labial (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Os J2 têm um estilete delicado que mede em média 8-18 μm de comprimento (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). A distância do DEGO varia de 2-8 μm , assim como a posição do hemizonídeo posterior ao poro excretor, são caracteres que também auxiliam na identificação das espécies (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Nos J2s, uma das fontes de caracteres mais utilizadas tem sido a morfometria e a morfologia da cauda (Jepson, 1987).

Segundo essa autora, algumas espécies são claramente diferenciadas pelo comprimento da cauda que varia de 15-100µm. Diferenças no comprimento da cauda e/ou no comprimento da parte hialina da cauda são o suficiente para distinguir espécies dentro dos grupos formados por Jepson (1987).

Meloidogyne incognita é uma das principais espécies do gênero, cujas fêmeas apresentam estilete de 15-16 µm de comprimento com bulbos basais arredondados. O cone do estilete é nitidamente pontiagudo, curvado dorsalmente ao meio e a haste se alarga ligeiramente na base. Os bulbos basais são alongados e indentados. Em algumas populações as indentações são mais pronunciadas, de tal forma que cada bulbo quase aparenta dois. A configuração perineal das fêmeas de *M. incognita* apresenta um arco dorsal alto, estrias usualmente onduladas, campo lateral ausente ou fracamente demarcado com estrias bifurcadas (Hunt & Handoo, 2009). A abertura do DEGO ocorre próxima à base dos bulbos e se distância de 2-4 µm (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Segundo Eisenback & Triantaphyllou (1991), os machos de *M. incognita* apresentam formato da região labial muito distinto, com um elevado disco labial grande e arredondado, disposto sobre os lábios medianos, podendo ser centralmente côncavo. Em algumas populações, o disco labial não é muito redondo e elevado, sendo mais contínuo com os lábios medianos. Os lábios laterais são geralmente ausentes, embora em algumas populações sejam bem desenvolvidos. A região labial é usualmente subdividida por anéis incompletos, que variam dentro das populações. O estilete apresenta 23-26 µm de comprimento, os bulbos podem variar em tamanho e forma entre as diferentes populações, de pequeno a redondo, para largo e alongado e o DEGO varia de 2-4 µm (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Os juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* têm comprimento do corpo de 350-450 µm, cauda de 43-65 µm e ponta terminal hialina de 6-14 µm. Os estiletos medem 10-12 µm, bulbos basais arredondados e o DEGO é relativamente curto, medindo de 2-3 µm (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

3.3.2 Identificação bioquímica e molecular

A primeira demonstração de que enzimas são específicas e que poderiam ser empregadas na identificação de espécies de *Meloidogyne* foi realizada por Dickson *et al.* (1971), seguido por Hussey *et al.* (1972), com base nos padrões das enzimas esterase, malato desidrogenase e α -glicerofosfato desidrogenase. Subsequentemente, Dalmaso & Berge (1978) identificaram *Meloidogyne* spp. a partir da extração de proteínas de fêmeas individuais e separação das mesmas em corrida eletroforética com gel ultrafino.

Dentre as isoenzimas estudadas, as esterases (EST) são as mais utilizadas na identificação de espécies de *Meloidogyne*, com mais de 40 fenótipos descritos (Blok & Powers, 2009). Outras enzimas como malato-desidrogenase (MDH), superóxido dismutase (SOD) e glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) são com frequência incluídas em estudos para confirmação de espécies previamente identificadas (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985).

A técnica eletroforese de isoenzimas consiste na avaliação da migração relativa (M_r) das enzimas. A mobilidade das enzimas em gel de acrilamida sob corrente elétrica varia de acordo com suas cargas elétricas e pesos moleculares, levando à visualização de bandas em diferentes posições no gel, as quais são específicas para a maior parte das espécies de *Meloidogyne*. As principais vantagens dessa técnica são: o reconhecimento de

Meloidogyne spp., mesmo em mistura, identificação de populações atípicas, eficiência, confiabilidade e rapidez (Carneiro *et al.*, 2000, Blok & Powers, 2009).

Um dos trabalhos mais relevantes do uso de fenótipos isoenzimáticos para diferenciar *Meloidogyne* spp. foi publicado por Esbenshade & Triantaphyllou (1985), que relataram padrões de esterase para 16 espécies de *Meloidogyne*, dentre elas, fenótipos para *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. hapla*. Mais de 300 populações originárias de vários países e continentes foram estudadas, confirmando serem as esterases as enzimas mais precisas na identificação das espécies e as malato-desidrogenases como critério auxiliar na diferenciação de espécies cujas esterases são idênticas, como é o caso de *Meloidogyne naasi* (Franklin, 1965) e *M. exigua* (Esbenshade & Triantaphyllou, 1990).

Estudos adicionais envolvendo fenótipos enzimáticos, especialmente os de esterase e malato desidrogenase, foram relatados por Carneiro *et al.* (1996b) em estudo de 90 populações brasileiras de *Meloidogyne* spp. Por este procedimento, foi possível identificar *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. exigua*, *M. hapla* e *M. graminicola* Golden & Birchfield, 1965. Em outro estudo, Carneiro *et al.* (2000) utilizaram quatro enzimas distintas (esterase, malato desidrogenase, superóxido dismutase e glutamato oxaloacetato transaminase) na caracterização de mais de 100 populações originárias de diferentes estados do Brasil e países das Américas. Foi possível determinar 34 fenótipos enzimáticos para diferentes espécies de *Meloidogyne*, incluindo 18 fenótipos de esterase, 6 de malato desidrogenase, 5 de superóxido dismutase e 5 de glutamato oxaloacetato transaminase. As espécies identificadas foram *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *Meloidogyne coffeicola* (Lordello & Zamith, 1960), *M. paranaensis*, *M. konaensis*, *M. exigua* e *M. enterolobii*.

Em estudo realizado por Carneiro *et al.* (2004) com populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de cafezais de diferentes regiões do Brasil, América Central e Havai, procedeu-se a identificação das populações com base nos fenótipos de esterase (EST), tendo sido identificados: *M. incognita* (EST I1, I2), *M. paranaensis* (EST P1, P2), *M. arenaria*, (EST A2), *M. arabicida* López & Salazar, 1989, (EST AR2), *M. exigua* (EST E1), *M. enterolobii*, (EST M2) e duas populações desconhecidas, (EST Sa2, Sa4), posteriormente descritas como *Meloidogyne izalcoensis* (Carneiro, Almeida, Gomes & Hernandez, 2005) (Carneiro *et al.*, 2005a).

Até o presente, não existem padrões enzimáticos para todas as espécies descritas do gênero *Meloidogyne*. Infelizmente, esses marcadores isoenzimáticos não podem ser utilizados nos estudos de variabilidade intraespecífica, que requerem níveis razoáveis de variabilidade (Arias *et al.*, 2001). A variabilidade intraespecífica a nível enzimático é geralmente muito baixa, por serem as enzimas produzidas por meio da expressão de genes altamente conservados e representarem apenas uma fração muito pequena do genoma funcional, enquanto que as regiões não codantes são mais abundantes e submetidas a extensas mudanças evolutivas (McLain *et al.*, 1987).

Assim sendo, estudos baseados em análise de DNA aumentaram a partir de 1985 e, recentemente, foram desenvolvidos conjuntos de “primers” espécie-específicos que possibilitam a identificação rápida de algumas espécies do gênero *Meloidogyne* (Zijlstra, 2000; Randig *et al.*, 2002). A abordagem atual é a conversão dos marcadores de RAPD em SCAR, termo cunhado por Paran & Michelmore (1993) para definir marcadores RAPD cuja sequência interna tenha sido determinada, permitindo compor primers mais longos, ricos em GC e de sequência específica.

SCAR-PCR é muito sensível e possibilita a detecção de espécies presentes em mistura de populações em proporções iguais ou inferiores a 1% (Fourie *et al.*, 2001, Randig *et al.*, 2004). Dentre outras vantagens, inclui a utilização de pontos de referência física no genoma, servindo para mapeamento, ou como marcadores genéticos espécie-específicos, quando estão associados a algum genótipo/fenótipo de interesse (Mienie *et al.*, 2002; Noir *et al.*, 2003).

Nos nematoides das galhas, marcadores SCAR já foram desenvolvidos para identificar três espécies, *M. chitwoodi* e *Meloidogyne fallax* (Karssen, 1996), ambos quarentenários, e *M. hapla* (Zijlstra *et al.*, 2000); ou ainda, para separar outras três espécies: *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, presentes principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Zijlstra *et al.*, 2000; Meng *et al.*, 2004).

Randig *et al.* (2002) estabeleceram marcadores SCAR-PCR para as três principais espécies de nematoides das galhas do cafeeiro ocorrentes no Brasil: *M. incognita*, *M. paranaensis* e *M. exigua*. Há alguns exemplos da utilização de vários primers-SCAR em conjunto em reação multiplex (Zijlstra, 2000; Randig *et al.*, 2004). Essa técnica além de identificar as espécies, avalia o potencial de detecção de misturas de espécies em amostras, possibilitando o diagnóstico rápido destas espécies através do tamanho de banda obtido (Randig *et al.*, 2002). Entretanto, ainda poucas espécies, cerca de 10, podem ser identificadas por marcadores moleculares do tipo SCAR (Blok & Powers, 2009).

3.3.3 Raças fisiológicas

O termo raça para o gênero *Meloidogyne* não tem a mesma conotação de raça fisiológica utilizada em fitopatologia. Por definição raças são biótipos distinguidos por sua preferência de hospedeiro dentro de um grupo taxonômico. Nesse caso, os hospedeiros são cultivares de uma espécie de planta, diferentemente da usual separação de raças de *Meloidogyne* spp. que envolve plantas de diferentes espécies (Moura, 1996).

As espécies de *Meloidogyne* apresentam preferências alimentares diferentes, porém, quando estas diferenças ocorrem dentro de uma mesma espécie, estas passam a ser denominadas como raças fisiológicas (Lordello, 1992; Freitas *et al.*, 2006). As raças de uma mesma espécie de *Meloidogyne* não podem ser diferenciadas morfologicamente (Freitas *et al.*, 2006).

Em *Meloidogyne* spp., as raças parasitárias são diferenciadas através de reações positivas e negativas, verificadas em plantas de espécies diferentes, tomate (*Solanum lycopersicum* ‘Rutgers’), fumo (*Nicotiana tabacum* ‘NC 95’), algodão (*Gossypium hirsutum* ‘Deltapine 61’), pimentão (*Capsicum annuum* ‘Early California Wonder’), melancia (*Citrullus vulgaris* ‘Charleston Gray’) e amendoim (*Arachis hypogaea* ‘Florunner’) baseado no teste de hospedeiros diferenciadores da Universidade Estadual da Carolina do Norte (Hartman & Sasser, 1985). Não tem sido possível diferenciar raças parasitárias de *Meloidogyne* por outros métodos, a não ser através de reações diferenciadoras em plantas (Moura, 1996).

Raças fisiológicas já foram relatadas em importantes espécies como *M. javanica* (Rammah & Hirschmann, 1990; Carneiro *et al.*, 2003), *M. incognita* e *M. arenaria*

(Hartman & Sasser, 1985), *M. hapla* (Wofford *et al.*, 1989), *M. exigua* (Silva, 2005) e *M. chitwoodi* (Mojtahedi *et al.*, 1988).

Meloidogyne arenaria, *M. hapla*, *M. incognita* e *M. javanica* se sobrepõem em círculo de hospedeiros, todas infectam várias hortaliças em comum, incluindo tomate, muitas vezes considerado hospedeiro universal de *Meloidogyne* spp. (Santos, 2008). *Meloidogyne hapla* se reproduz pouco ou quase nada sobre gramíneas e grãos. Destas quatro espécies, somente algumas populações (raças 2 e 4) de *M. incognita* parasitam algodão. Amendoim é um bom hospedeiro para populações de *M. arenaria* raça 1 e *M. hapla*, mas não para *M. incognita*. A maioria das populações de *M. javanica* nos Estados Unidos não se reproduz bem em amendoim, mas populações da Índia e do Norte da África, em geral, se reproduzem bem nesse hospedeiro. Até o momento já foram relatadas na literatura quatro raças de *M. javanica*: raça 1 que parasita fumo, melancia e tomate, raça 2 que parasita essas plantas além do pimentão, raça 3 que parasita as mesmas plantas que a raça 1 mais o amendoim (Rammah & Hirschmann, 1990), e por fim a raça 4 que infecta fumo, melancia, tomate, pimentão e amendoim e o algodão se apresenta imune (Carneiro *et al.*, 2003). Já *M. arenaria* tem duas raças diferenciadas pela reação em hospedeiros, raça 1 cujas populações reproduzem em amendoim e raça 2 cujas populações não reproduzem em amendoim (Jepson, 1987).

Carneiro & Almeida (2000) e Muniz *et al.* (2008) propuseram a separação de ‘raças fisiológicas’ de *M. exigua* com base na capacidade de reprodução de diversas populações em plantas de quatro espécies botânicas. A raça 1 é constituída por indivíduos que infectam o pimentão e o cafeeiro, mas não conseguem infectar o tomateiro. Indivíduos da raça 2 infectam o tomateiro, o pimentão e o cafeeiro, e a raça 3 não infecta o tomateiro, o pimentão e nem o cafeeiro, mas parasitam a seringueira.

Meloidogyne incognita possui quatro raças distintas (Hartmam & Sasser, 1985). A raça 1 deste nematoide não se reproduz em fumo, algodão e amendoim; a raça 2 não se reproduz em algodão e amendoim, a raça 3 não se reproduz em fumo e amendoim e a raça 4 só não se reproduz em amendoim (Taylor & Sasser, 1978; Lordello, 1992; Lordello & Lordello, 1996; Freitas *et al.*, 2006).

O conhecimento das raças é de suma importância para caracterização de resistência para programas de melhoramento genético (Fassuliotis, 1985). Segundo Lordello & Lordello (1996), a identificação de raças em *Meloidogyne* spp. é essencial para o manejo em áreas infestadas, principalmente na recomendação de sistemas de rotação de culturas. A identificação de raças permite também conhecer a distribuição das mesmas e a importância de cada raça para a agricultura local, bem como fornecer populações para a avaliação de genótipos e progênies em programas de melhoramento.

3.3.4 Citogenética

Os nematoides das galhas têm sofrido uma extensiva evolução citogenética revelada pela presença de um grupo variável de formas reprodutivas e citológicas (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Algumas espécies se reproduzem obrigatoriamente por anfimixia (fertilização cruzada), ou seja, necessita da presença de machos e fêmeas. Porém, a maior parte das espécies de *Meloidogyne* se reproduz principalmente por partenogênese, não requerendo ou requerendo esporadicamente a presença de machos (Chitwood & Perry, 2009).

Dentro do grupo partenogenético, muitas espécies se reproduzem por partenogênese mitótica obrigatória, cuja maturação dos oocistos consiste de uma simples divisão. O restante das espécies partenogenéticas apresenta partenogênese facultativa, ou seja, podem

se reproduzir por partenogênese meiótica, quando os machos são ausentes e as fêmeas permanecem não inseminadas, ou por anfimixia, quando os machos são presentes e as fêmeas tornam-se inseminadas (Chitwood & Perry, 2009).

Nos fitonematoides, a anfimixia e a partenogênese podem ocorrer em espécies de um mesmo gênero, sendo que em algumas espécies encontram-se populações com os dois tipos de reprodução. Para os nematoides das galhas, a partenogênese mitótica é sempre obrigatória, considerando que a partenogênese meiótica é facultativa (Eisenback & Triantaphyllou, 1991), sendo que ambas podem ocorrer em uma mesma espécie (Tihohod, 1993), como por exemplo, *M. hapla* que inclui população partenogenética facultativa e obrigatória (Triantaphyllou, 1985a).

A variação na forma citológica encontrada nos nematoides do gênero *Meloidogyne* está associada ao polimorfismo numérico de cromossomos (Triantaphyllou, 1985a). Na anfimixia obrigatória e partenogênese facultativa (meiótica), as espécies são diplóides, muitas delas com cromossomos haplóides, $N=18$. A variação tem sido observada em algumas espécies. *Meloidogyne hapla*, caso mais extremo, inclui populações com $N=13-17$ e também populações tetraplóides com $N=28-34$ cromossomos. *Meloidogyne spartinae* (Rau & Fassuliotis, 1965), Whitehead, 1968, e *M. kikuyensis* (De Grisse, 1961) se diferenciam dos demais nematoides das galhas por apresentar somente sete cromossomos haplóides. As espécies partenogenéticas obrigatórias (mitóticas) demonstram uma ampla variação no número de cromossomos devido à poliploidia, uma aneuploidia. A forma aneuplóide/diplóide tem número de cromossomos somáticos de 30-40, a forma triplóide tem 50-56 cromossomos e a forma hipotriplóide tem número de cromossomos somáticos intermediários (Chitwood & Perry, 2009).

Meloidogyne incognita se reproduz exclusivamente por partenogênese mitótica ocorrendo duas formas citológicas (Triantaphyllou, 1985a). A forma triplóide, $3N= 40-46$ cromossomos, é a mais comum e está mundialmente distribuída e a forma diplóide $2N = 32-36$, menos comum. Esse é o caso de *M. hispanica* Rammah & Hirschmann, 1990 que é muito próxima morfológicamente a *M. incognita* e tem esse número de cromossomos. Todas as populações de *M. incognita* têm uma característica citológica na maturação dos oócitos que distingue facilmente das outras espécies de *Meloidogyne*. Como os oócitos atravessam a espermateca, eles permanecem em prófase até que cheguem à porção posterior do útero. Lá eles procedem rapidamente para a metáfase. Os cromossomos estão agrupados durante todo o prolongamento da prófase e não podem ser contados facilmente como cromossomos individuais. Os cromossomos de todas as espécies dos nematoides das galhas avançam para a metáfase quando passam da espermateca para o útero. Eles são discretos, espalhados em uma área grande e podem ser contados em unidades individuais (Chitwood & Perry, 2009).

No Brasil, existem poucos trabalhos em citogenética. Freire *et al.*, (2002), descreveram a quantidade de cromossomos de algumas populações brasileiras de *M. exigua*, *M. javanica* e *M. paranaensis*. Portanto, os estudos citogenéticos em populações brasileiras de *Meloidogyne* podem contribuir para fornecer dados sobre o potencial da variabilidade genética desse grupo de organismos (Freire *et al.*, 2002).

3.4. Diversidade genética de *Meloidogyne* spp.

A utilização da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem trazido significativos avanços na implantação de novos marcadores moleculares que associados às técnicas de clonagem e sequenciamento de DNA, têm possibilitado rápido acúmulo de informações sobre a estrutura de genomas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O desenvolvimento de técnicas moleculares abriu novas perspectivas quanto aos estudos de variabilidade intraespecífica dos nematoides de galhas do gênero *Meloidogyne*. Assim, estudos foram realizados a partir da análise de marcadores do tipo RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) com resultados significativos para a genética de populações (Curran *et al.*, 1986; Castagnone-Sereno *et al.*, 1991; Lax *et al.*, 2007).

A técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é baseada na técnica de PCR, e é utilizada atualmente em estudos genéticos e na diferenciação de espécies de *Meloidogyne*, a partir de perfis gerados com o auxílio de *primers* aleatórios (Cenis, 1993; Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997; Randig *et al.*, 2002).

A técnica RAPD, além de utilizar pequenas quantidades de material genético (de 6 a 30 ng de material genômico), não necessita do conhecimento prévio do genoma a ser estudado (Williams *et al.*, 1990). A principal limitação dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informação genética por loco. Apenas um alelo é detectado, enquanto que as demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como um alelo nulo. Os marcadores RAPD, portanto, comportam-se como marcadores dominantes e os dados têm natureza binária (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O primeiro estudo sobre diversidade de populações brasileiras de *Meloidogyne* spp. foi realizado por Randig *et al.* (2002) onde foram estudadas, através de PCR-RAPD, 18 populações de *Meloidogyne* spp., provenientes de diferentes regiões do Brasil. Nesse estudo, pode-se observar que as espécies de *Meloidogyne* se diferenciaram em grupos, de acordo com os perfis enzimáticos descritos para cada espécie. Esse estudo mostrou um alto

grau de variabilidade intra-específica em populações de *M. exigua*, *M. hapla* e *M. arenaria*, que apresentaram: 67,5%, 67,5% e 69,8% de fragmentos polimórficos. Diferentemente, populações de *M. incognita* e *M. javanica* apresentaram baixa variabilidade intra-específica, 30% e 19% respectivamente.

Meloidogyne javanica tem sido reportada como uma espécie que apresenta baixa variabilidade intraespecífica (Castgnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997). Estudos recentes realizados por Cofcewicz *et al.* (2004) com sete populações provenientes de bananeiras de diferentes regiões do Brasil revelaram uma variabilidade intra-específica de cerca de 29,1%, que é ainda considerada baixa. Entretanto, estudos realizados por Carneiro *et al.* (1998), com quatro populações brasileiras de *M. javanica*, mostraram variabilidades morfológica, enzimática, fisiológica e genética. A presença de quatro raças fisiológicas detectadas em *M. javanica* é outro exemplo da variabilidade intra-específica observada nessa espécie (Carneiro *et al.*, 2003).

Carneiro *et al.* (2004) avaliaram 18 populações de *Meloidogyne* spp. do cafeeiro provenientes do Brasil, América Central e Havaí. Utilizando-se de marcadores RAPD, os autores detectaram baixos níveis de polimorfismo intra-específico em *M. exigua* (8,6%), *M. incognita* (11,2%) e *M. paranaensis* (20,3%). Entretanto, Randig *et al.* (2002) estudando duas populações de *M. exigua* do café e seringueira mostraram uma variabilidade genética da ordem de 67,5 %, considerada alta para nematoides de uma mesma espécie.

Estudos realizados por Muniz *et al.* (2008) com 16 populações de *M. exigua*, revelaram polimorfismo intra-específico elevado (24,6 – 57,8 %) para essa espécie. Entretanto, todas as populações agruparam-se com 100% bootstrap apesar da grande variabilidade intra-específica encontrada. Diferentemente de *M. exigua*, a grande

variabilidade encontrada em populações de *M. arenaria* revelou a presença de espécies distintas dentro da mesma espécie como é o caso de *M. morocciensis* Rammah & Hirschmann, 1990 anteriormente identificada como *M. arenaria* (EST A3) (Carneiro *et al.*, 2008ab).

Estudos sobre a variabilidade genética de *M. incognita* com a utilização de marcadores moleculares têm demonstrado que a espécie possui baixa variabilidade genética e os resultados têm sido congruentes com os fenótipos isoenzimáticos descritos para a espécie. Embora poucas populações tenham sido estudadas, os fenótipos I1N1 e I2NI de *M. incognita* se agruparam com 100% de similaridade (Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997; Randig *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2004; Cofcewicz *et al.*, 2005).

As espécies partenogênicas possuem geralmente baixa variabilidade genética. A partenogênese permite uma rápida reprodução, pois não há necessidade do encontro do macho com a fêmea como em espécies anfimíticas. Todavia, espécies de *Meloidogyne* caracterizadas por reprodução partenogênica como *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. incognita* possuem uma variação genética que permite uma rápida adaptação a ambientes desfavoráveis, como por exemplo, quando em solo cultivado com plantas hospedeiras resistentes (Trudgill & Blok, 2001).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Identificação e purificação bioquímica das espécies de *Meloidogyne*

A caracterização isoenzimática foi realizada com as enzimas esterase (EST) e malato-desidrogenase (MDH), usando eletroforese em gel de poliacrilamida de acordo com a metodologia descrita por Carneiro & Almeida (2001).

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

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

Os padrões de bandas no gel de poliacrilamida foram obtidos com as soluções reveladoras específicas para a isoenzima esterase (alfa-naftil-acetato, fast blue RR salt e tampão fosfato de sódio) e malato desidrogenase (NBT, NAD⁺, L-ácido málico, PMS e tampão Tris) preparadas imediatamente antes do seu uso. Após incubação no escuro, a 37

°C, por aproximadamente 20-60 minutos, os géis foram lavados em água corrente e fixados em solução composta de água destilada, álcool metílico e ácido acético na proporção (5:5:1) (v/v) por 30 minutos. Em seguida os géis foram secos entre folhas de papel celofane.

4.2 Populações de *Meloidogyne*

Oito populações de *M. incognita* provenientes de diferentes culturas e regiões geográficas do Brasil e três de *M. hispanica* foram estudadas (Tabela 1). Seis populações de *Meloidogyne* sp. foram incluídas na análise por apresentarem regiões perineais de *M. incognita* (Castro *et al.*, 2003) e se agruparem em estudos moleculares com essa espécie Cofcewicz *et al.* (2004). *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 foi empregado como outgroup para as análises filogenéticas. As populações foram multiplicadas em tomateiro (Grupo Santa Cruz cv. ‘Santa Clara’) em casa de vegetação com controle de temperatura e umidade.

4.3 Raças fisiológicas

Para a identificação das raças fisiológicas das populações de *M. incognita* e *Meloidogyne* spp., foi feito o teste proposto pela Universidade da Carolina do Norte com plantas hospedeiras-diferenciadoras de diferentes famílias botânicas: algodão cv. Deltapine 61, fumo cv. NC 95, pimentão cv. Early California Wonder, melancia cv. Charleston Gray, amendoim cv. Florunner e tomate cv. Rutgers (Hartman & Sasser, 1985).

Plântulas de cada espécie de hospedeira foram transplantadas para vasos de 5L de capacidade, contendo uma mistura de solo e areia na proporção 2:1, autoclavados a 120° C.

A suspensão de ovos de cada população de *Meloidogyne* spp. foi obtida conforme a metodologia de Boneti & Ferraz (1981). Assim, raízes foram lavadas cuidadosamente em água corrente para retirar partículas de solo aderidas, picadas em pedaços de aproximadamente 1 a 2 cm e trituradas em liquidificador com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,5% por 20 segundos. A suspensão de ovos e raízes foi vertida em uma peneira de 0,074 mm de abertura (200 mesh), acoplada a outra de 0,025 mm (500 mesh), ficando os ovos retidos nesta última. A quantificação dos ovos foi feita em câmara de Peters, e a suspensão calibrada para 1.000 ovos/mL em microscópio de luz.

Cada planta foi inoculada com 5.000 ovos de nematoides da população a ser testada e, para cada espécie vegetal diferenciadora foram utilizadas 6 repetições distribuídas ao acaso. Sessenta dias após a inoculação, as raízes das diferentes espécies foram coloridas com Floxina B a 0.0015% (15 mg/ litro de água), durante 15-20 minutos, e o número de galhas e massas de ovos por sistema radicular foram avaliados para a determinação da reação das plantas diferenciadoras, conforme escala proposta por Taylor & Sasser (1978).

Considerou-se como hospedeiras susceptíveis, as plantas que apresentaram índice maior do que 2 (11-100 galhas ou massas de ovos), e resistentes aquelas que apresentaram índice ≤ 2 (0-10 número de galhas ou massa de ovos) (Taylor & Sasser, 1978).

Tabela 1: Isolados de *Meloidogyne* spp., origem geográfica e hospedeira.

Espécie/Isolado Código	Origem	Hospedeira
<i>M. incognita</i>		
1	Avilândia, SP, Brasil	<i>Coffea arabica</i> L.
2	Londrina, PR, Brasil	<i>Coffea arabica</i>
3	Londrina, PR, Brasil	<i>Coffea arabica</i>
4	Londrina, PR, Brasil	<i>Coffea arabica</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> L.
5	Jacuípe, PE, Brasil	<i>Curcubita pepo</i> L.
6	Santa Cruz, RS, Brasil	<i>Nicotiana tabacum</i> L.
7	Brasília, DF, Brasil	<i>Solanum lycopersicum</i> Mill
8	Ijuí, RS, Brasil	<i>Solanum lycopersicum</i>
<i>Meloidogyne</i> sp.1.		
9	Dindorama, GO, Brasil	<i>Glycine max</i> (L.) Merr
10	Pelotas, RS, Brasil	<i>Ficus carica</i> L.
11	Garça, SP, Brasil	<i>Coffea arabica</i>
12	Cajati, SP, Brasil	<i>Musa</i> sp.
<i>Meloidogyne</i> sp.2		
13	Martinica	<i>Musa</i> sp.
14	Martinica	<i>Saccharum officinarum</i> L.
<i>M. hispanica</i>		
15	Jacuípe, PE, Brasil	<i>Curcubita pepo</i>
16	Tabuleiros Costeiros, PE, Brasil	<i>Saccharum officinarum</i>
17	Sevilha, Espanha	<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch
<i>M. javanica</i>		
18	Petrolina, PE, Brasil	<i>Solanum lycopersicum</i> L.

4.4 Extrações de fêmeas, machos e juvenis de segundo estágio (J2) para estudos morfológicos

Para a extração de fêmeas, raízes infectadas foram lavadas e tratadas com mistura contendo pectinase e água na proporção 1:3 (v/v) com agitação constante por 12-14 horas. As raízes foram então lavadas e trituradas em liquidificador adaptado (lâminas recobertas com parafilme) por 10 pulsos. As fêmeas extraídas foram recuperadas em água destilada e, em seguida transferidas para recipiente apropriado com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Carneiro *et al.*, 1999). Os machos foram extraídos a partir de raízes infestadas inseridas em béquer com água sob oxigenação com uma bomba de aquário por um período de 5 a 15 dias (Carneiro *et al.*, 1998; Carneiro *et al.*, 2004). A coleta dos machos foi feita duas vezes por semana.

Os juvenis de segundo estágio (J2) foram obtidos a partir de massas de ovos coletadas individualmente de raízes infestadas, e posteriormente colocadas em funil de Baermann modificado para eclosão dos juvenis, segundo a metodologia descrita por Whitehead & Hemming (1965).

4.5 Extração de ovos para estudos moleculares

A extração de ovos foi realizada três meses após a inoculação dos tomateiros de acordo com o método descrito por Carneiro *et al.* (2004). Raízes de tomateiro foram lavadas cuidadosamente, cortadas e trituradas em liquidificador com hipoclorito de sódio (NaOCl) 1,25% por 1 minuto a baixa rotação. Em seguida, passadas por conjunto de peneiras sobrepostas (20-100-500 mesh). Os resíduos das raízes e os ovos coletados na peneira de 500 mesh foram lavados com água corrente. Adicionou-se caulim à suspensão e

após a centrifugação a 2.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi eliminado. O volume dos tubos foi completado com solução de sacarose 30% a 4 °C e centrifugado na mesma velocidade por 2 minutos. O sobrenadante foi recuperado em peneira de 500 mesh e lavado com água destilada. Os ovos foram colocados em tubos de 15 mL, completando-se o volume com água estéril e centrifugados por 3 minutos a 2.000 rpm. O sobrenadante foi vertido cuidadosamente, sendo os ovos pipetados e transferidos para tubos “eppendorf” de 1,5 mL. Após uma centrifugação a 10.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi eliminado e os ovos armazenados a – 80 °C, para serem submetidos à extração de DNA.

4.6 Extração, purificação e precipitação de DNA

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

Os ovos previamente extraídos e armazenados a -80°C foram macerados em nitrogênio líquido. O material foi recuperado em tubos “eppendorf” de 2 mL, ao qual foi adicionado 500 µl de tampão NIB (0,1 M NaCl; 30 mM Tris pH 8; 10 mM EDTA; 0,7 mM β-mercaptoetanol; 5 mM Triton - NPHO). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas duas vezes a 14.000 rpm por 2 minutos e eliminado o sobrenadante. Em seguida, foram acrescentados 800 µl de tampão de homogeneização (0,1 M NaCl; 0,2 M sacarose; 10 mM EDTA) e 200 µl do tampão de lise (0,125 M EDTA; 0,5 M Tris pH 9,2; 2,3 % SDS). Após a homogeneização, as amostras foram incubadas a 55°C por 30 minutos, seguido de 10 minutos à temperatura ambiente.

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

Para precipitação do DNA, 1:1 (v/v) de etanol 100% foi adicionado ao sobrenadante, efetuando-se a homogeneização e observando-se a formação do 'pellet'. O DNA foi recuperado com auxílio de uma pipeta Pasteur esterilizada de ponta fechada, e em seguida lavado com etanol 70%, seco à temperatura ambiente, recuperado em 20 µl de água esterilizada (Milli-Q) e armazenado a -20° C. Aplicou-se também o método adicional quando o DNA apresentava-se fragmentado. Para isso, a precipitação foi efetuada a -80 °C durante 30 minutos. Em seguida efetuou-se uma centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se etanol a 70%. Após centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos, eliminou-se o etanol. O precipitado foi seco à temperatura ambiente, recuperado em 10-20 µl de água esterilizada (Milli-Q) e armazenado a -20 °C. A concentração de DNA foi estimada em gel de agarose a 1% pela comparação do DNA total com diferentes concentrações de DNA *lambda* e as amostras foram armazenadas a -20 °C.

4.7 Citogenética

Os estudos citogenéticos foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Triantaphyllou (1985b), com algumas modificações.

Após a extração de fêmeas, iniciou-se o processo de preparação do esfregaço em que cada fêmea foi transferida para lâminas individualizadas que continham uma gota de água. Em seguida, com o auxílio de uma pinça cada fêmea foi segura e com um bisturi se fez um corte na parte anterior e arrastou-se por cerca de 0,5 a 1 cm. Antes da secagem das amostras, o esfregaço foi hidrolisado com duas gotas de HCl 1M por cinco minutos, e posteriormente fixado com 4-5 gotas de solução de álcool absoluto e ácido acético glacial na proporção 3:1 (v/v) por 60 minutos. Após esse procedimento, retirou-se o excesso do fixador e aplicaram-se duas gotas do corante orceína (2,2 g de orceína/100 mL de ácido propiônico absoluto), mantendo-se a lâmina no interior de uma placa de Petri tampada na posição vertical sobre uma folha de papel absorvente para drenar o excesso de corante. Em seguida, uma lamínula de 24x32 mm foi colocada sobre os esfregaços e o excesso da solução absorvido com o papel. A contagem dos cromossomos foi efetuada entre 12 e 24 hs após o preparo das amostras.

4.8 Identificação morfológica e morfométrica

As preparações para microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas em cerca de 100 espécimes de fêmeas, machos e cerca de 10.000 J2 segundo a metodologia descrita por Eisenback (1985c). Os espécimes foram fixadas a 4 °C em glutaraldeído 2% diluído em tampão de cacodilato de sódio 1 M e pH 7,4 por 24h. Posteriormente foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (2%) durante 2h. Após esse período, os espécimes foram desidratados em acetona nas diluições (30, 50, 70, 80, 90 e 100%) com intervalos de

15 minutos. Logo após, os nematoides foram submetidos ao ponto crítico para a completa sublimação da acetona. Os espécimes foram preparados em porta-amostras revestidos por fita dupla-face e montados com apoio de um fio de cabelo disposto previamente nos porta amostras. Após a metalização com 35 nm de ouro, foram feitas observações ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM-962. As características observadas foram: região anterior (macho, fêmea e J2), cauda (J2 e macho), campo lateral e estiletos excisados (macho e fêmea), de acordo com Eisenback (1985b). Para a excisão dos estiletos de fêmeas e machos seguiu-se a metodologia descrita por Eisenback (1985c), pela qual os espécimes coletados foram inseridos em lamínulas contendo ácido láctico 45%. Posteriormente, foi feito um corte posterior ao bulbo mediano com auxílio de um estilete e logo em seguida, sob microscópio invertido e auxílio de um alfinete entomológico 00, foram realizadas várias pulsões até a excisão do estilete. Após esse processo, o excesso de ácido láctico foi removido com formol 2%. Foi inserida uma seta de papel para localização do estilete a ser visualizado ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). Posteriormente, os estiletos excisados de machos e fêmeas foram montados nos stubs, metalizados com 35 nm de ouro e examinados ao MEV Zeiss DSM-962.

As observações morfométricas e morfológicas foram realizadas também em microscopia óptica em 30 espécimes de cada estágio/população. Para os machos e juvenis de segundo estágio foram efetuadas montagens semi-permanentes empregando-se formalina 2% e para as fêmeas utilizou-se o método de fixação para MEV descrito anteriormente. A configuração da região perineal foi realizada a partir de fêmeas jovens vivas cortadas em ácido láctico 45% e montadas em glicerina conforme o método descrito por Taylor & Netscher (1974). Os aspectos morfométricos examinados foram: comprimento e largura do corpo, comprimento do estilete (J2, machos e fêmeas); altura e

largura dos bulbos do estilete (fêmeas e machos), distância entre o orifício da glândula dorsal e a base do estilete (DEGO) (fêmeas, machos e J2); da extremidade da região anterior até o poro excretor (fêmeas e machos) comprimento da cauda (machos e J2); comprimento da parte hialina da cauda (J2).

4.9 Identificação molecular: marcador SCAR

Os isolados de *M. incognita*, *M. hispanica* e *Meloidogyne* sp. foram testados com três pares de primers espécie-específicos do tipo SCAR descritos para a identificação de *M. incognita* (Tabela 2): incK14F/R (Randig *et al.*, 2002), incB06F/R (Ziljstra *et al.*, 2000) e miF/R (Meng *et al.*, 2004). As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µl, contendo 6 ng de DNA total, 10 µM de cada primer, 5 mM de dNTPs (Invitrogen), 1X de tampão + MgCl₂ (Phoneutria Biotecnologia e Serviços-pht), 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase (pht) e 14,25 µl de água Milli-Q. Para as amplificações foi utilizado um termociclador PTC-100 (MJ Research) programado de acordo com as condições descritas para cada conjunto de primers: incK14F/R (Randig *et al.*, 2002): desnaturação inicial do DNA por 5 min a 94 °C, 30 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 45 seg. a 64 °C, 1min. a 70 °C e extensão final de 8 min. a 70 °C. Para os primers incB06F/R (Ziljstra *et al.*, 2000): 2 min. a 94 °C, 35 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 30 seg. a 54 °C, 1min. a 72 °C e extensão final de 8 min. a 70 °C. As condições para os primers miF/R (Meng *et al.*, 2004): 4 min. a 94 °C, 35 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 30 seg. a 62 °C, 30 seg. a 72 °C, e extensão final de 10 min a 70 °C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizados sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio a 0,3 µg/mL.

Tabela 2: Características de marcadores SCAR espécie-específicos para *Meloidogyne incognita*: incK14F/R (Randig *et al.*, 2002), incB06F/R (Ziljstra *et al.*, 2000) e miF/R (Meng *et al.*, 2004).

Primer SCAR	Seqüência (5'→3')	Fragmento amplificado (pb)
inc-K14F	GGGATGTGTAAATGCTCCTG	399
inc-K14R	CCCGCTACACCCTCAACTTC	
inc-B06F	CTCTGCCCAATGAGCTGTCC	1200
inc-B06R	CTCTGCCCTCACATTAAG	
mi-F	GTG AGG ATT CAG CTC CCC AG	955
mi-R	ACG AGG AAC ATA CTTCTC CGT CC	

4.10 Análise com os marcadores RAPD e ISSR

As reações de PCR-RAPD foram realizadas em volume final de 25 µl contendo: 2 µl de DNA total [3 ng/µl]; 1 µl de cada primer [10µM]; 4,0 µl de dNTP [1,25 mM]; 2,5 µl tampão 10X pht com MgCl₂; 0,25 µl da enzima Taq DNA polimerase (5 U/ µl) e 14,25 µl de água Milli-Q. Foram utilizados na análise um total de 35 primers (Tabela 3). As amplificações foram realizadas em termociclador (PTC-100, MJ Research) programado com as condições descritas por Randig *et al.* (2002): 1 min. a 94°C, 40 ciclos de 20 seg. a 94°C, 30 seg. a 36°C e 2 min. a 70°C e uma elongação final de 10 min. a 70°C.

Para as análises de PCR-ISSR, 9 primers foram testados (Tabela 4) e as reações realizadas em um volume final de 13 µl, contendo: 3 µl de DNA total [3 ng/µl], 1,3 µl de tampão 10X com MgCl₂, 0,5 µl do primer [10 µM], 2,0 µl dNTP [1,25 mM], 0,2 µl da enzima Taq DNA polimerase (5 U/µl). O termociclador foi programado segundo as

condições descritas por Lax *et al.* (2007): 2 min. a 94 °C, 40 ciclos de 45 seg. a 94°C, 45 seg. de 48°C, 2 min. a 72°C, e elongação final de 5 min. a 70°C.

Os fragmentos amplificados dos dois marcadores foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5X (90 mM Tris-básico, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,3), à uma corrente constante de 120 mA, corado com brometo de etídio (0,2 µg/mL) e visualizados sob luz UV.

Tabela 3: Primers RAPD utilizados em reações de PCR para o estudo da variabilidade genética de populações de *Meloidogyne* spp.

Número	Primer RAPD	Seqüência (5' → 3')
1	A04	AATCGGGCTG
2	A13	CAGCACCCAC
3	A14	TCTGTGCTGG
4	A18	AGGTGACCG T
5	AB09	GGG CGA CTA C
6	AB10	TTCCCTCCCA
7	AB11	GTGCGCAATG
8	AB12	CCTGTACCGA
9	AB17	TCGCATCCAG
10	B06	GTG GCT TGG A
11	B18	CCACAGCAGT
12	B20	GGACCCTTAC
13	C07	GTC CCG ACG A
14	C09	CTC ACC GTC C
15	C16	CAC ACT CCA G
16	C18	TGA GTG GGT G
17	D05	TGA GCG GAC A
18	D08	GTGTGCCCCA
19	G02	GGC ACT GAG G
20	G05	CTG AGA CGG A
21	G06	GTG CCT AAC C
22	G13	CTC TCC GCC A
23	J10	AAG CCC GAG G

24	J19	GGA CAC CAC T
25	K04	CCG CCC AAA C
26	K06	CAC CTT TCC C
27	K07	AGC GAG CAA G
28	K16	GAG CGT CGA A
29	K20	GTG TCG CGA G
30	L08	AGC AGG TGG A
31	M20	AGG TCT TGG G
32	R05	GAC CTA GTG G
33	R07	ACT GGC CTG A
34	R08	CCC GTT GCC T
35	R12	ACAGGTGCGT

Tabela 4: Primers ISSR utilizados em reações de PCR para o estudo da variabilidade genética de populações de *Meloidogyne* spp.

Número	Primer ISSR	Primer ISSR
1	ISSR 01	(GA) ₈ C
2	ISSR 02	(CA) ₈ G
3	ISSR 03	(AC) ₈ G
4	ISSR 06	(CCA) ₅
5	ISSR 05	(GA) ₇ CA
6	ISSR 08	(CT) ₈ GG
7	ISSR 09	(CA) ₇ CTCTT
8	ISSR 11	(AG) ₈ Y
9	ISSR 19	(GACA) ₄

4.11 Análise filogenética

Os fragmentos de DNA revelados com o uso de marcadores RAPD e ISSR foram registrados como presentes (1) ou ausentes (0), sendo posteriormente convertidos em uma matriz binária. Três métodos filogenéticos foram usados: ‘UPGMA, Maximum Parsimony e Bayesian Inference’ sendo realizados com dados isolados de RAPD e ISSR, e dados

conjuntos de ambos os marcadores. As análises de UPGMA e Maximum Parsimony foram realizadas utilizando o programa PAUP* v 4.0 (Swofford, 2002). Para as análises, 1000 repetições de bootstrap foram realizadas para testar a significância das árvores (Felsenstein, 1985). A análise filogenética de Bayesian foi conduzida com MrBayes v3.1 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) usando um modelo binário de F81-like, com um total de um milhão de repetições.

5. RESULTADOS

5.1 Análise bioquímica: esterase e malato-desidrogenase

Foram observados dois fenótipos para a atividade da enzima esterase (EST) em oito isolados de *M. incognita* de diferentes culturas e regiões geográficas do Brasil (Fig. 1). O fenótipo I1 (Rm: 1.0) foi detectado nos isolados 1, 2 e 3 (Fig. 1A), enquanto o fenótipo I2, (Rm: 1,1 e 1,2) foi detectado nos isolados de 4-8 (Fig. 1B). O fenótipo EST S2 (Rm: 0,9 e 1,0), foi detectado em quatro populações (9-12), originalmente consideradas como *Meloidogyne* sp.1 (Fig. 1C). O fenótipo S2a (Rm: 1,1, 0,9) foi detectado em dois isolados de *Meloidogyne* sp.2 (13, 14) ambos originários da Martinica (Fig. 1D) e o fenótipo H3 (Rm:1,1, 0,9, 0,8), típico de *M. hispanica*, foi reconhecido nos três isolados da espécie (Fig. 1E).

Foram observados dois fenótipos distintos da enzima malato-desidrogenase (MDH). O fenótipo N1 (Rm: 1.0) foi detectado em todas as populações de *M. incognita* (1-8), *Meloidogyne* sp.1 (9-12) e *M. hispanica* (15-17) (Fig. 2A). O fenótipo N3 (Rm: 1,0, 1,1, 1,2) foi detectado nos dois isolados da Martinica (13-14) (Fig. 2B). Analisando em conjunto as enzimas EST e MDH, foram detectados cinco fenótipos: I1N1, I2N1, S2N1, S2aN3 e H3N1 (Fig. 1 e 2).

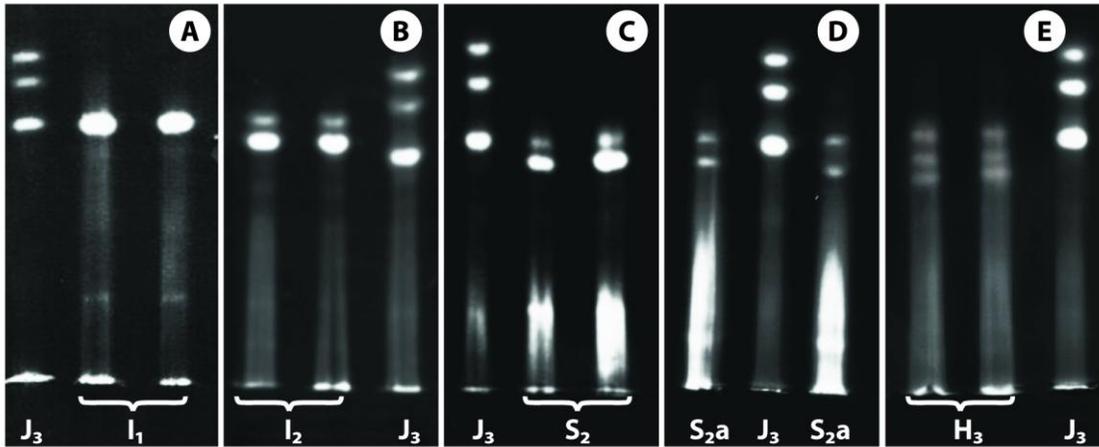


Figura 1: Fenótipos de esterase de populações de *Meloidogyne incognita* (A) I1, (B) I2, (C) *Meloidogyne* sp.1 (S2), (D) *Meloidogyne* sp.2 (S2a) e E) *M. hispanica* (H3). *M. javanica* (J3) foi usado como referência.

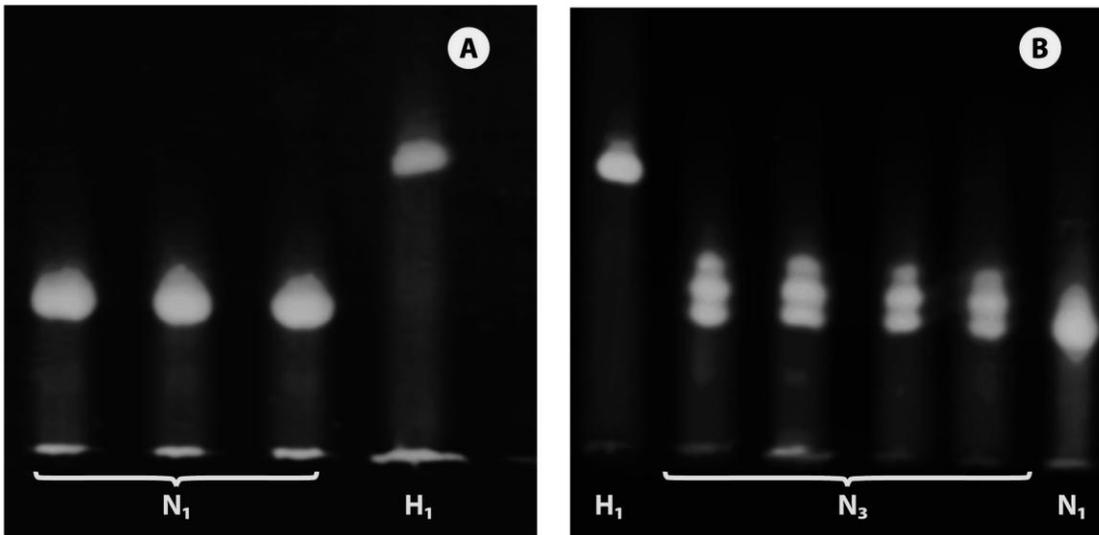


Figura 2: Fenótipos de malato-desidrogenase detectados em *M. incognita*, *Meloidogyne* sp. 1 e *M. hispanica* (A) N1 e (B) *Meloidogyne* sp.2 (N3). *M. hapla* (H1) foi usado como referência.

5.2 Análises morfológica e morfométrica

Fêmeas

Os isolados de 1-12 (I1N1, I2N1 e S2N1) apresentaram o padrão perineal característico de *M. incognita*, com algumas variações (Fig. 3). Arco dorsal alto e trapezoidal com estrias onduladas pouco espaçadas, algumas vezes em ziguezague; campo lateral com linhas laterais distintamente suaves a onduladas, marcadas por estrias quebradas ou bifurcadas I1N1 (Fig. 3A), I2N1 (Fig. 3B) e S2N1 (Fig. 3C-D). Para os isolados 13-14, (S2aN3) o padrão perineal foi mais ovóide, arco dorsal achatado para elevado, às vezes trapezoidal, estrias onduladas amplamente espaçadas (Fig. 3E-F). Campo lateral raramente presente com estrias quebradas em ambos os lados. Ponta da cauda bem definida, com poucas estrias. Região perivulval não estriada, com poucas estrias perto das bordas laterais da vulva. Os padrões perineais de *M. hispanica* foram semelhantes à descrição da espécie (Hirschmann, 1986).

O comprimento dos estiletos das fêmeas foi semelhante entre os diferentes isolados 1-12 (I1N1) (Fig. 4A), I2N1 (Fig. 4B) e (S2N1) (Figs. 4C-E) de *M. incognita* e *Meloidogyne* sp.1 (14,0-19,0 μ m), como também a distância do orifício da glândula esofágica dorsal (DEGO) à base do estilete (3-5 μ m). Essas populações apresentaram as mesmas formas de estiletos (Figs. 4 A-E), sendo que foi observado cone nitidamente pontiagudo e distintamente curvado próximo ao meio; a haste foi levemente mais larga na base. Os bulbos do estilete foram alongados e às vezes indentados. Todos os outros caracteres morfológicos das fêmeas foram similares à descrição feita por Eisenback & Triantaphyllou (1991) para variantes da espécie *M. incognita*.

O estilete de *M. hispanica* (13,6-14,6 μ m) apresentou um cone levemente curvado dorsalmente como na descrição da espécie (Hirschmann, 1986). A distância do DEGO à

base do estilete foi de 2,8-4,0 μm . Os isolados 13 e 14 (S2aN3) (Fig. 4F) apresentaram estiletes robustos de (15,0-16,0 μm), ponta do cone reta, afilada na extremidade, haste cilíndrica, mais estreita próximo à junção com o cone e se alargando junto aos bulbos do estilete; bulbos do estilete em forma de pêra, posteriormente inclinados e sem indentações (Fig.4 F). A 'DEGO' até a base do bulbo do estilete foi de 4,0-4,5 μm .

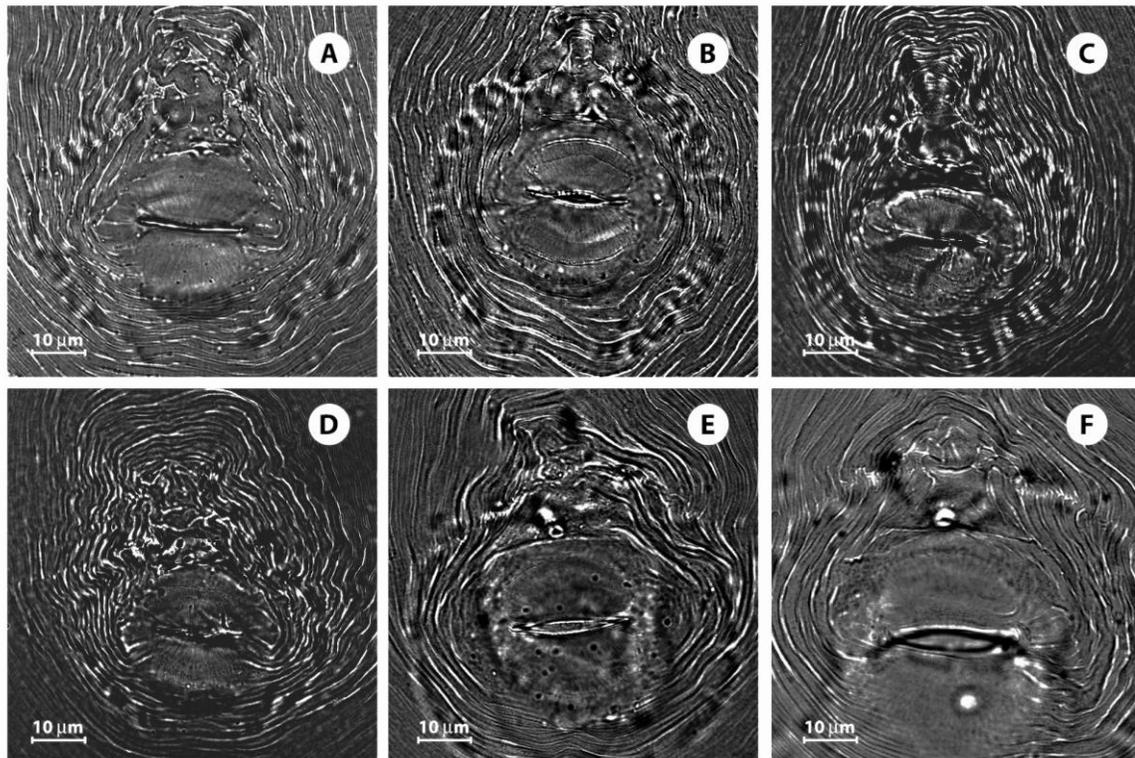


Figura 3: Microscopia de Luz (ML) do padrão perineal de fêmeas de isolados de *M. incognita* e *Meloidogyne* spp. (A) I1N1 (isolado 1), (B) I2N1 (isolado 4), (C) S2N1 (isolado 11), (D) S2N1 (isolado 10), (E) S2aN3 (isolado 13) e (F) S2aN3 (isolado 14).

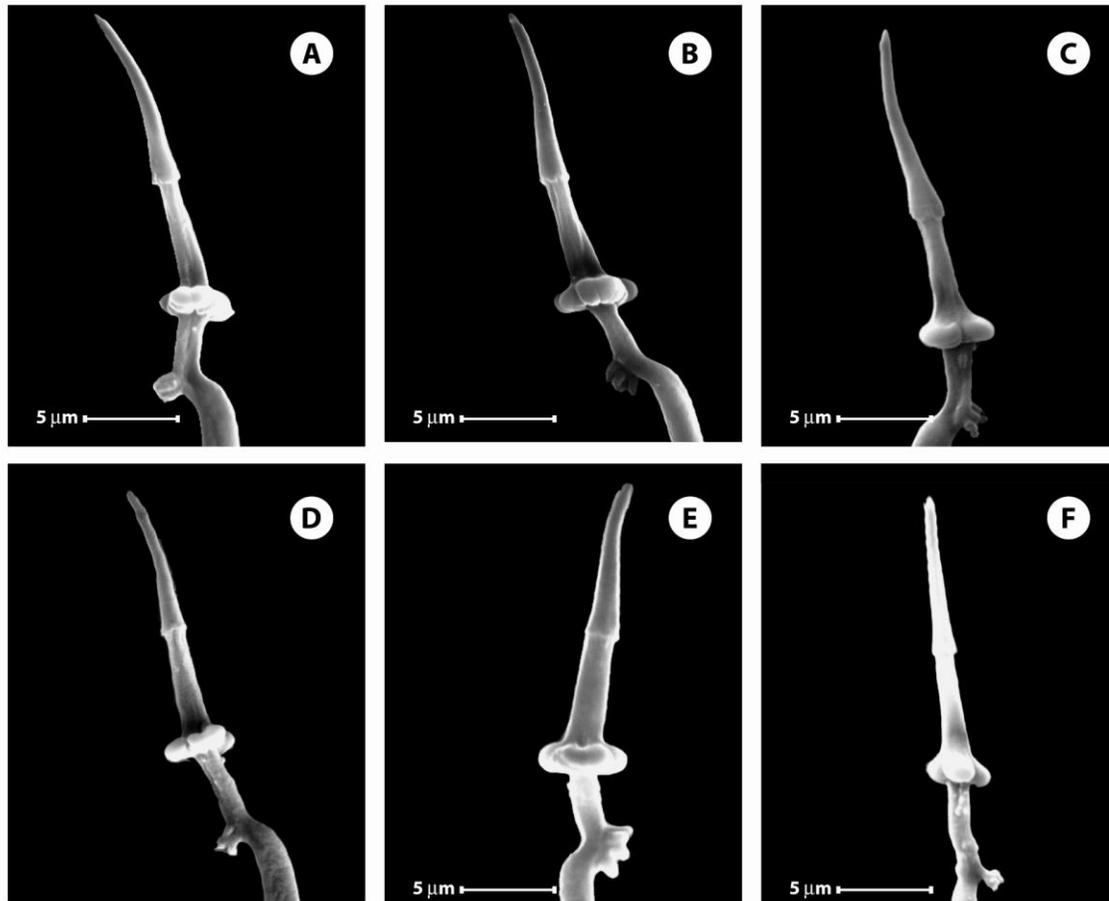


Figura 4: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos estiletos de fêmeas de diferentes isolados de *M. incognita* e *Meloidogyne* spp. (A) I1N1 (isolado 1), (B) I2N1 (isolado 4), (C) S2N1 (isolado 10), (D) S2N1 (isolado 11), (E) S2N1 (isolado 9) e (F) S2aN3 (isolado 14).

Machos

Os machos apresentaram corpo robusto, afilado anteriormente e arredondado na região posterior, com campo lateral composto por quatro incisuras (Fig. 6B). A forma da região anterior dos machos de *M. incognita* foi importante no diagnóstico utilizado na identificação dos isolados de 1-8 (I1N1, I2N1): o disco labial grande e arredondado,

distintamente elevado sobre os lábios mediano e às vezes centralmente côncavo e marcado por um número de anelações incompletas que variou de 3 - 6 entre os isolados (Figs. 5 A-B). Nos demais isolados de 9-12 (S2N1) (Fig. 5C-D-E) e 13-14 (S2aN3) (Fig. 5F) o disco labial foi grande e arredondado, fundido com os lábios medianos. Lábios laterais ausentes. A região anterior foi geralmente elevada e algumas vezes subdividida por anelações incompletas (Figs. 5 C, D, E, F), semelhante a *M. hispanica* (Hirschmann, 1986).

O estilete dos machos foi longo e variou em comprimento de 24-25 μm em *M. incognita* (1-8, I1N1, I2N1), 20-25 μm em *Meloidogyne* sp.1 (9-12, S2N1), 18-22 μm em *Meloidogyne* sp.2 (13-14, S2aN3) e 22-24 μm em *M. hispanica* (15-17, H3N1). As formas do estilete foram semelhantes para os isolados de 1-12 (I1N1, I2N1, S2N1) estudados: a ponta foi reta e mais larga do que a porção mediana do cone. A haste foi geralmente cilíndrica e freqüentemente estreita perto dos bulbos. Os bulbos foram anteriormente indentados e amplamente alongados para arredondados. A distância do DEGO à base dos bulbos do estilete foi relativamente curta (1,5-3,5 μm). Todos os outros caracteres dos machos foram similares ao da descrição feita por Eisenback & Triantaphyllou (1991) para todas as populações de *M. incognita* e os quatro isolados de *Meloidogyne* sp.1 (9-12, S2N1).

O estilete dos isolados 13-14 de *Meloidogyne* sp.2 (S2aN3) foi diferente do formato de *M. hispanica* e *M. incognita*: cone reto pontiagudo, gradualmente aumentando de diâmetro na região posterior, haste cilíndrica, bulbos arredondados e levemente inclinados posteriormente (Fig. 6A). A distância do DEGO à base dos bulbos do estilete foi de 2,0-4,5 μm nos isolados de *Meloidogyne* sp.2 e 1,5-3,5 μm em *M. hispanica*.

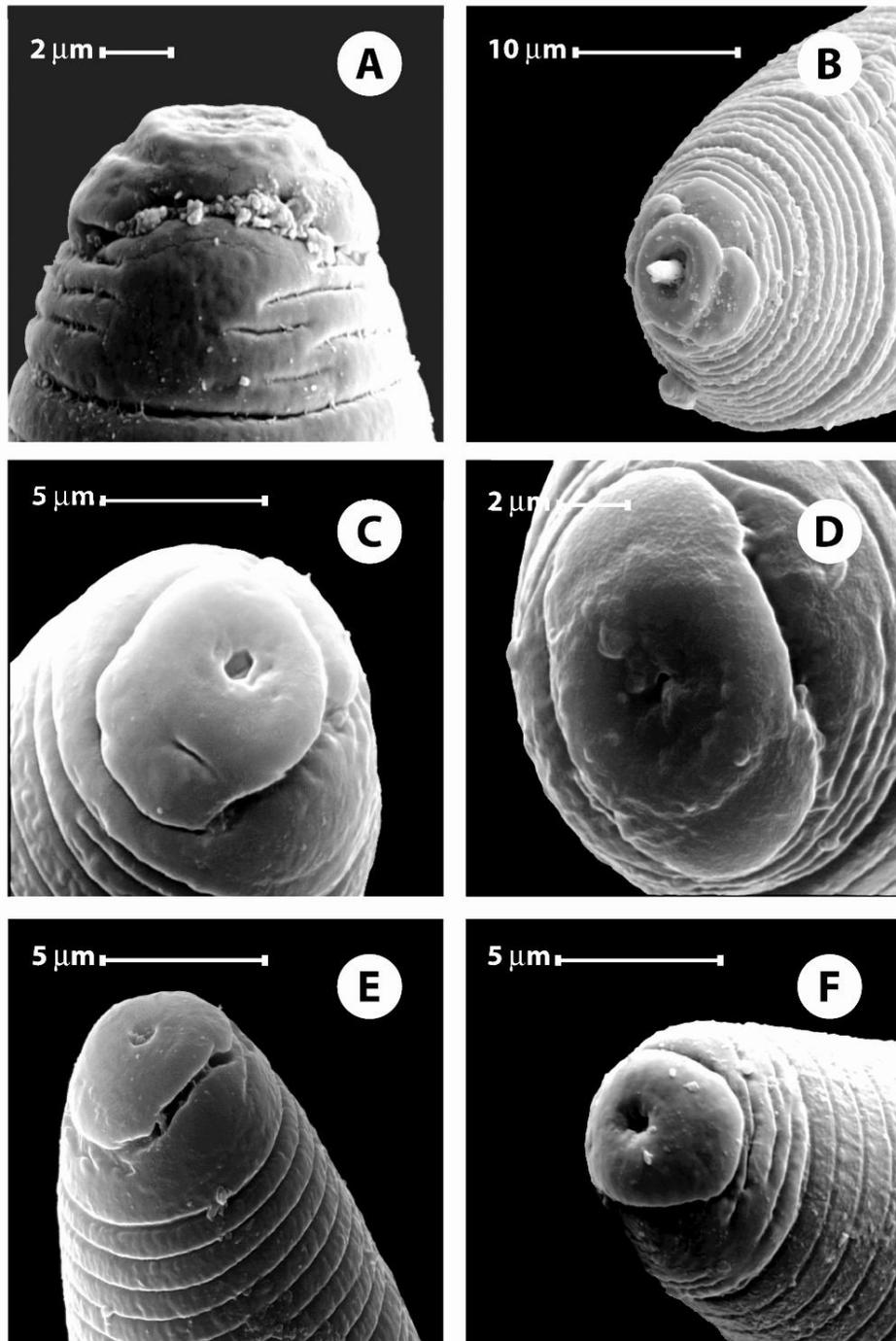


Figura 5: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da região anterior dos machos de diferentes isolados de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne* spp. (A) I1N1, isolado 1, (B)

I2N1, isolado 4, (C) S2N1, isolado 11, (D) S2N1, isolado 10, (E) S2N1, isolado 9 e (F) S2aN3, isolado 14.

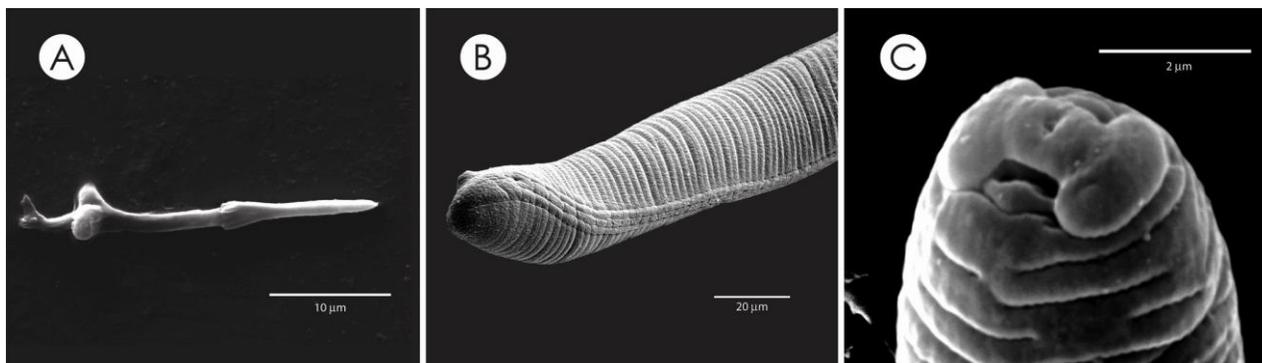


Figura 6: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) (A) estilete de machos de *Meloidogyne* sp.2 (S2aN3, isolado 14), (B) Região posterior (cauda) de *Meloidogyne* sp.1 (S2N1, isolado 11), (C) Região anterior do juvenil de segundo estágio (J2) de *M. incognita* S2N1 (isolado 11).

Juvenis de segundo estágio (J2)

Todos os isolados 1-12 (I1N1, I2N1 e S2N1) apresentaram o comprimento total do corpo, comprimento da cauda e parte hialina da cauda na faixa descrita para *M. incognita* e *M. hispanica*: 346-463 µm, 42-63 µm, 6-11 µm, respectivamente. Somente os isolados 13 e 14 (S2aN3) apresentaram parte hialina da cauda mais longa: 14.0-17.0 µm. O comprimento do estilete e o DEGO de todas as populações se apresentaram em conformidade com as medidas descritas para *M. incognita* e *M. hispanica*: 10,0-14,0 µm, 2,0-3,5 µm, respectivamente.

A cauda longa foi semelhante para todos os isolados (1-17), com terminação estreita cônica que pode ter anelações distintas. A ponta da cauda apresentou-se arredondada a pontiaguda. A parte hialina da cauda foi bem distinta. Ao MEV, o disco labial e lábios

medianos foram ovóides e o disco labial se apresentou arredondado e elevado sobre os lábios medianos. Os lábios laterais observados foram arredondados para triangular e as vezes pareceram fundir-se com a região anterior. Normalmente a região anterior foi marcada com várias anelações incompletas (2-7) nos isolados de 1-12 (I1N1, I2N1 e S2N1) (Fig. 6C). Todos os outros caracteres de J2 foram semelhantes à descrição feita por Eisenback & Triantaphyllou (1991) para *M. incognita*. Para os isolados de *Meloidogyne* sp.2 (13, 14, S2aN3), a região da cabeça foi lisa, ocasionalmente com 1-2 anéis curtos.

5.3 Raças fisiológicas

Oito isolados de *M. incognita* (1-8) e quatro de *Meloidogyne* sp.1 (isolados 9-12) reproduziram em tomate 'Rutgers', melancia 'Charleston Gray' e pimentão 'Califórnia Wonder', mas divergiram quanto à hospedabilidade em fumo e algodão. Os isolados 1, 8 e 12 não se reproduziram em fumo 'NC95' e algodão 'Deltapine 61' e foram considerados pertencentes à raça 1. Já os isolados 2, 7 e 9 reproduziram-se em fumo, mas não em algodão e foram considerados raça 2. Os isolados 3, 4, 6, 10 e 11 reproduziram-se em algodão, mas não em fumo e foram considerados raça 3. O isolado 5 reproduziu-se em algodão e em fumo e foi considerado raça 4. Quanto aos isolados de *Meloidogyne* sp.2, ambos tiveram o comportamento de *M. incognita* raça 2 (Tabela 5).

5.4 Citogenética

Todas as populações de *M. incognita*, *Meloidogyne* spp. e *M. hispanica* se reproduzem por partenogênese mitótica. Duas formas cromossomais foram reconhecidas nesses isolados. Uma forma apresentou $2n=32-36$ cromossomos e foi considerada diplóide

e típica de *M. hispanica* (isolados 15-17) e a outra forma foi triplóide (3n=40-46) e, incluiu todos os isolados de *M. incognita*, *Meloidogyne* sp.1 e *Meloidogyne* sp.2 (Tabela 5).

Tabela 5: Características de isolados de *Meloidogyne* spp. quanto à origem, hospedeira, fenótipo enzimático e número de cromossomos.

Espécie/Isolado Código/Raça	Origem	Hospedeira	Fenótipo enzimático (1)	Número de cromossomos
<i>M. incognita</i>				
1 (raça 1)	Avilândia, SP, Brasil	<i>Coffea arabica</i> L.	I1N1	42-46
2 (raça 2)	Londrina, PR, Brasil	<i>Coffea arabica</i>	I1N1	40-44
3 (raça 3)	Londrina, PR, Brasil	<i>Coffea arabica</i>	I1N1	44-46
4 (raça 3)	Londrina, PR, Brasil	<i>Coffea arabica</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> L.	I2N1	42-46
5 (raça 4)	Jacuípe, PE, Brasil	<i>Curcubita pepo</i> L.	I2N1	40-44
6 (raça 3)	Santa Cruz, RS, Brasil	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	I2N1	44-46
7 (raça 2)	Brasília, DF, Brasil	<i>Solanum lycopersicum</i> Mill	I2N1	44-46
8 (raça 1)	Ijuí, RS, Brasil	<i>Solanum lycopersicum</i>	I2N1	44-46
<i>Meloidogyne</i> sp.1 (=<i>M. incognita</i>)				
9 (raça 2)	Dindorama, GO, Brasil	<i>Glycine max</i> (L.) Merr	S2N1	44-46
10 (raça 3)	Pelotas, RS, Brasil	<i>Ficus carica</i> L.	S2N1	40-44
11 (raça 3)	Garça, SP, Brasil	<i>Coffea arabica</i>	S2N1	44-46
12 (raça 1)	Cajati, SP, Brasil	<i>Musa</i> sp.	S2N1	40-44
<i>Meloidogyne</i> sp.2				
13 (raça 2)	Martinica	<i>Musa</i> sp.	S2N3	40-44
14 (raça 2)	Martinica	<i>Saccharum officinarum</i> L.	S2N3	40-44
<i>M. hispanica</i>				
15	Jacuípe, PE, Brasil	<i>Curcubita pepo</i> L.	H3N1	32-36

16	Tabuleiros Costeiros, PE, Brasil	<i>Saccharum officinarum</i>	H3N1	32-36
17	Sevilha, Espanha	<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	H3N1	32-36
<i>M. javanica</i>				
18	Petrolina, PE, Brasil	<i>Solanum lycopersicum</i>	J3N1	-

(1) Fenótipos de esterase (EST) e malato-desidrogenase (MDH).

5.5 Análise molecular: Marcadores SCAR

Todos os isolados de *M. incognita*, *M. hispanica* e *Meloidogyne* spp. foram testados com os marcadores espécie-específicos do tipo SCAR desenvolvidos para *M. incognita* (Fig. 7). Utilizando os pares de primers incB06F/R (Ziljstra *et al.*, 2000) e incK14F/R (Randig *et al.*, 2002), fragmentos de 1200 bp (Fig. 7A) e 399 bp (Fig. 7B), foram obtidos para os oito isolados de *M. incognita*, incluindo os fenótipos isoenzimáticos (I1N1 e I2N1), e para os isolados de *Meloidogyne* sp.1 (9-12, S2N1). Nenhum desses dois fragmentos específicos foram amplificados para os isolados de *Meloidogyne* sp.2. (13 e 14, S2aN3), nem para os isolados de *M. hispanica* (15-17, H3N1) (Figs. 7A-B). Usando o par de primers miF/R (Meng *et al.*, 2004), um fragmento de 955 bp foi obtido para os 8 isolados de *M. incognita* (I1N1 e I2N1) e para os isolados de *Meloidogyne* sp.1. (9-12, S2N1). Outro fragmento de aproximadamente 1650 bp foi obtido para os dois isolados de *Meloidogyne* sp.2. (13, 14, S2aN3) e para os isolados de *M. hispanica* (15-17) (Fig. 7C).

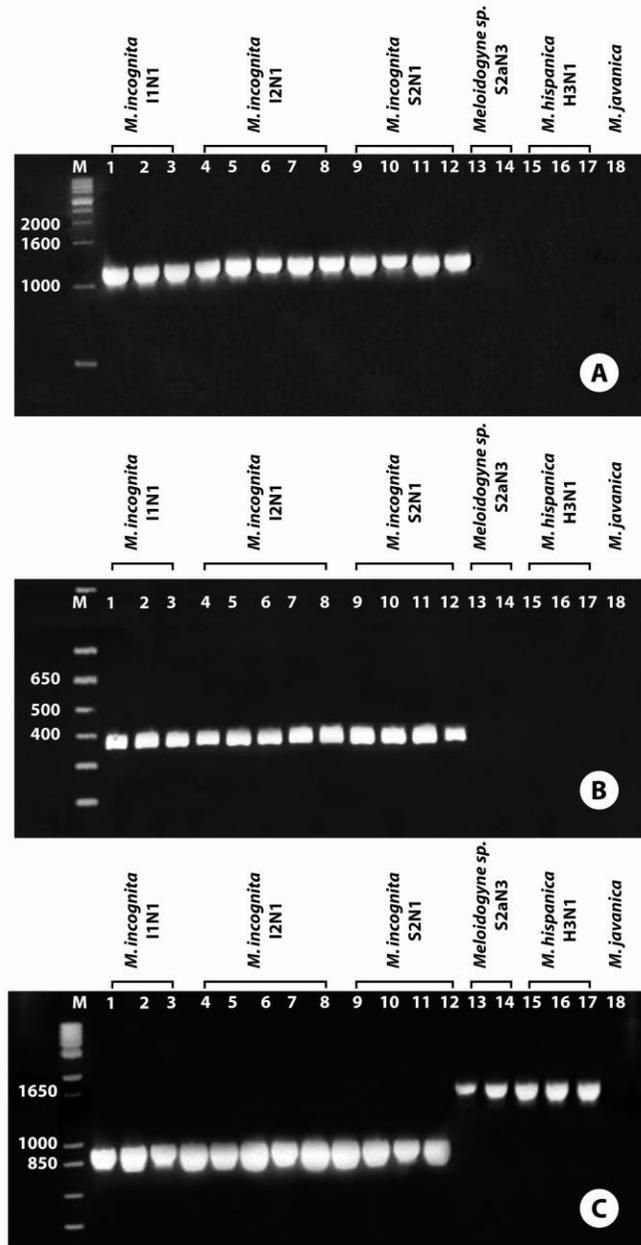


Figura 7: Amplificação específica de isolados de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne* sp.1 (1-12), e *Meloidogyne* sp.2 (13 e 14), *M. hispanica* (15, 16 e 17) e *M. javanica* (18). (A) *incB06F/R* (Ziljstra *et al.*, 2000), (B) *incK14F/R* (Randig *et al.*, 2002) e (C) *miF/R* (Meng *et al.*, 2004).

5.6 Diversidade genética de isolados de *Meloidogyne* spp. por marcadores moleculares RAPD e ISSR

O número de fragmentos amplificados por primer RAPD variou de 10 a 20 em um total de 555 fragmentos variando de 200 a 4.500 pb. Primers ISSR reproduziram 114 fragmentos de 200 a 1000 pb.

Todos os fragmentos amplificados com os marcadores ISSR e RAPD que apresentaram nitidez e reprodutibilidade foram registrados como ausentes (0) ou presentes (1) e convertidos em matriz binária como dados individuais (matrizes geradas por primer utilizado para RAPD e ISSR) e em conjunto (todos os primers RAPD e ISSR gerando uma única matriz). As matrizes obtidas foram utilizadas para análises filogenéticas de similaridade (agrupamento), objetivando a geração de dendrogramas. Os dendrogramas foram gerados com base nos métodos UPGMA (agrupamento da distância média), Máxima Parcimônia e Análise Bayesiana. A mesma topologia foi encontrada para todos os primers testados. Portanto, por causa desta congruência topológica, os dados dos três métodos analíticos foram considerados robustos, e somente a árvore construída pela Análise Bayesiana, realizada com a abordagem dos dados combinados, foi adotada.

A análise filogenética obtida identificou dois grupos monofiléticos (ambos com probabilidade posterior de Bayesian Inference $PP = 1$). O grupo I consiste de 3 isolados de *M. hispanica* (15-17, H3N1) e 2 isolados (13 e 14) de *Meloidogyne* sp2. atípicos (S2aN3) com $PP = 1$. Os resultados sugerem que os dois isolados de S2aN3 ou são *M. hispanica* ou pertencem a uma mesma espécie ainda não identificada, mas geneticamente próxima a *M. hispanica*. O grupo II consistiu de 8 isolados de *M. incognita* (1-8) com fenótipos I1N1 e I2N1, e os isolados atípicos de *Meloidogyne* sp.1 (9, 10, 11 e 12) com fenótipo S2N1 (Fig. 8). Dentro do grupo II, os isolados 9, 10, 11 e 12 (S2N1) se agruparam junto com *M.*

incognita (PP = 0.99) (Fig. 8), apesar de não haver correlação estrita entre os fenótipos isoenzimáticos, raças dos isolados e topologia da árvore. Reciprocamente, os fenótipos SCAR observados foram inteiramente congruentes com a topologia da árvore (Fig. 8).

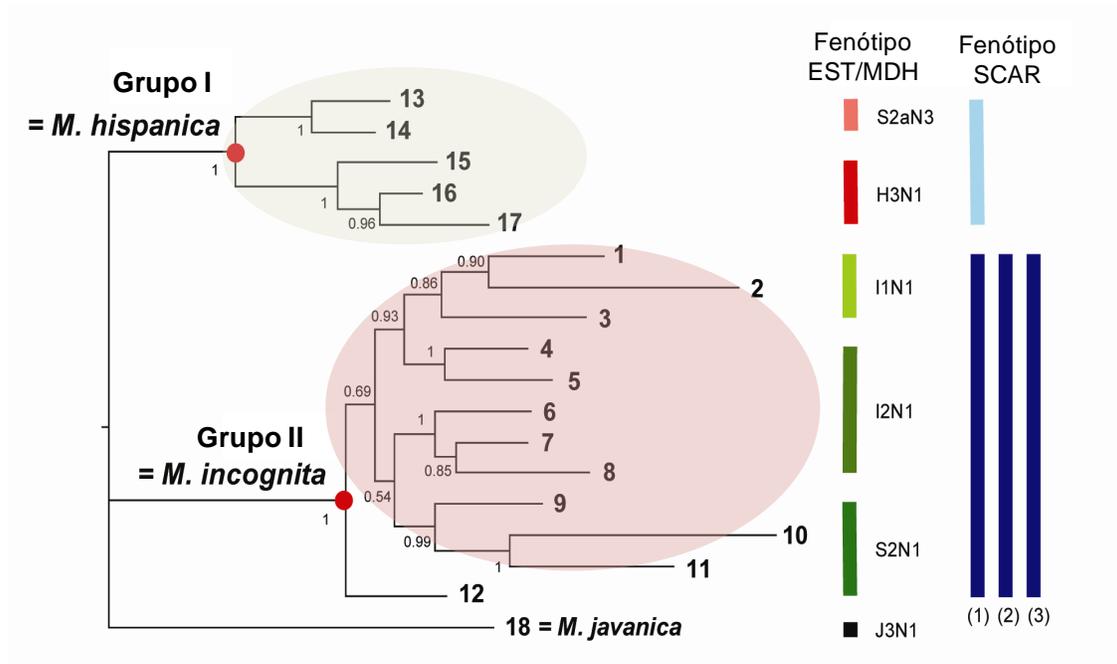


Figura 8: Árvore filogenética de dados conjuntos de dois marcadores moleculares (ISSR e RAPD) de *Meloidogyne* spp. Números em negrito no final de cada ramo representam os códigos dos isolados (Tabela 1). Números próximos aos nós indicam as probabilidades de similaridade. Os pontos vermelhos indicam os dois grupos monofiléticos. Colunas a direita indicam os fenótipos isoenzimáticos e de SCAR dos isolados. Os fenótipos de SCAR (1), (2) e (3) correspondem ao uso dos pares de primers miF/R, incB06F/R e incK14F/R, respectivamente.

6. DISCUSSÃO

Oito isolados de *M. incognita* e quatro de *Meloidogyne* sp.1 do Brasil foram estudados com abordagens morfológicas, bioquímicas, citológicas e moleculares, revelaram que os três fenótipos da enzima esterase (EST: I1, I2 e S2) e um único fenótipo de malato desidrogenase (MDH: N1) foram típicos da espécie *M. incognita*. Esse fenótipo S1/S2 já havia sido relatado por vários autores em diferentes culturas e países como populações atípicas (Janati *et al.*, 1982; Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Fargette, 1987; Castro *et al.*, 2003; Cofcewicz *et al.*, 2004, 2005; Carneiro *et al.*, 2005b). Uma única população S1 do cafeeiro foi identificada como *M. incognita*, sendo estudados apenas a região perineal, isoenzimas e hospedeiras diferenciadoras (Oliveira *et al.*, 2006). Entretanto, Blok & Powers (2009), relataram esse fenótipo novamente como atípico para a espécie. A ocorrência de mais de um fenótipo para a mesma enzima é conhecido em outras espécies de *Meloidogyne* (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Santos & Triantaphyllou, 1992; Carneiro *et al.*, 1996a; 2000). Os três fenótipos de esterase (I1, I2 e S2) de *M. incognita* quando testados em diferentes cultivares de cafeeiro quanto à patogenicidade mostraram que a população S2 foi bem menos patogênico que as demais (Muniz *et al.*, 2009).

Quanto à predominância de ocorrência dos fenótipos EST I2 é a mais frequente, seguida por EST I1, sendo EST S1/S2 pouco freqüente em levantamentos realizados em diferentes culturas (Carneiro *et al.*, 1996a; 2000; Castro *et al.*, 2003; Cofcewicz *et al.*, 2004; Carneiro *et al.*, 2005b; Cofcewicz *et al.*, 2005; Lima Medina *et al.*, 2006). Embora Esbenshade & Triantaphyllou (1985) tenham afirmado que o fenótipo EST I1 seja o mais comum em *M. incognita*, dependendo da metodologia utilizada, a separação dos dois fenótipos I1 de I2 em *M. incognita* não é de fácil resolução, pois uma das bandas eletroforéticas que caracterizam I2 é de baixa intensidade. A intensidade da banda depende

também do estado de conservação das fêmeas, sendo mais nítida em fêmeas jovens cujo macerado é esbranquiçado (Carneiro *et al.*, 1996a).

As análises citológicas deste estudo demonstraram que todos os isolados de *M. incognita* e *Meloidogyne* sp.1 e sp.2 apresentaram a forma triploide ($3n=42-46$), comprovando que esse cariótipo em *M. incognita* é o mais freqüente, concordando com as observações descritas por Triantaphyllou (1985a). A forma diplóide ($2N=32-36$) só ocorreu em *M. hispanica*, que no passado foi morfologicamente relacionada à *M. incognita* (Landa *et al.*, 2008). Estudos citogenéticos sobre populações brasileiras de espécies importantes, como *M. incognita* podem contribuir para a elucidação sobre o potencial de variabilidade genética desse grupo de organismos (Freire *et al.*, 2002).

Os testes com plantas hospedeiras diferenciadoras (Hartman & Sasser, 1985) foram conduzidos apenas para demonstrar a variabilidade fisiológica das espécies. As quatro raças de *M. incognita* foram identificadas em quatorze populações de *Meloidogyne* spp. (Tabela 5). A identificação de raças em *M. incognita* é de suma importância para a caracterização de resistência em programas de melhoramento genético (Fassuliotis, 1985; Castro *et al.*, 2003). Segundo Lordello & Lordello (1996), a identificação de raças é essencial para o manejo em áreas infestadas, principalmente na recomendação de rotação, o que permite conhecer a amplitude de distribuição das raças e a importância de cada uma para a agricultura local. No entanto, algumas espécies de *Meloidogyne* podem ser identificadas por sua especificidade de hospedeiras, como *Meloidogyne carolinensis* (Eisenback, 1982), que tem apenas duas espécies conhecidas de plantas hospedeiras (Hartman & Sasser, 1985). Embora o reconhecimento de raças seja importante na prática, Moens *et al.* (2009) recomendaram a descontinuidade da terminologia, sobretudo porque, esse conceito nunca

foi universalmente aceito, pois mede uma variabilidade muito restrita, considerando a ampla gama de hospedeiros das quatro principais espécies de nematóides de galhas.

A utilização da morfologia e morfometria na identificação de espécies é muito importante, porém é necessário que se conheça a amplitude de variação existente em um determinado caráter morfológico (Eisenback & Hunt, 2009). Como existe similaridade morfológica e morfométrica entre as espécies de *Meloidogyne*, vem sendo mais apropriado a escolha de caracteres diferenciais de fêmeas, machos e juvenis de segundo estágio (Eisenback *et al.*, 1980; 1981; Hirschmann, 1985; Jepson, 1987; Carneiro & Cofcewicz, 2008). Porém, na diferenciação de *Meloidogyne* spp., os caracteres morfológicos têm sido mais utilizados do que os morfométricos, uma vez que esses últimos podem ser mais afetados pelas condições ambientais (Esser *et al.*, 1976; Franklin, 1979; Eisenback *et al.*, 1981; Jepson, 1983a, b, c, 1987; Hirschmann, 1985; Rammah & Hirschman, 1990).

De todos os aspectos morfológicos estudados, o padrão perineal de fêmeas é ainda o mais utilizado no Brasil na identificação das espécies. No entanto, os padrões perineais apresentam uma grande variabilidade na sua morfologia e, muitas vezes, podem ser encontradas formas intermediárias e até mesmo aberrantes (Cliff & Hirschmann, 1985). A variabilidade existente nos padrões perineais e o aumento do número de espécies dentro do gênero dificulta a distinção entre as diferentes espécies (Eisenback *et al.*, 1980; Hirschmann, 1985, Eisenback & Hunt, 2009). Assim sendo, utilizar apenas caracteres do padrão perineal é um critério subjetivo e pouco preciso, não fornecendo informações confiáveis no diagnóstico da espécie (Carneiro *et al.*, 2004, Carneiro & Cofcewicz, 2008). No entanto, tais caracteres devem ser utilizados de forma complementar, junto com caracterização enzimática ou marcadores do tipo SCAR (Carneiro *et al.*, 2005b; Carneiro & Cofcewicz, 2008). Nesse estudo, embora a maioria dos padrões perineais de todos os

isolados de *M. incognita* foram típicos da espécie, uma variação considerável foi observada, sobretudo entre os diferentes cortes da mesma população. Adicionalmente, algumas espécies parasitas do café foram descritas apresentando semelhança no padrão perineal de *M. incognita*, incluindo *M. paranaensis* (Carneiro *et al.*, 1996b), *M. izalcoensis* (Carneiro *et al.*, 2005a), *M. inornata* (Carneiro *et al.*, 2008a). Dessa maneira, um conjunto de caracteres das fêmeas, machos e J2s devem ser considerados como relevantes para os estudos morfológicos (Carneiro & Cofcewicz, 2008).

Análises morfológicas detalhadas realizadas neste estudo com doze isolados mostraram que todas as populações de *M. incognita* (I1N1, I2N1, S2N1) são morfológicamente similares, sendo consideradas como unidade taxonômica. Neste estudo, a morfologia do estilete de fêmeas de *M. incognita* foi semelhante, sendo considerado um critério espécie-específico, concordando com as observações feitas por Eisenback & Triantaphyllou (1991). A morfologia da região anterior dos machos tem sido recomendada como fontes de caracteres taxonômicos consistentes na identificação de *Meloidogyne* spp. (Carneiro *et al.*, 2008b). Os machos dos isolados 1-8 (I1N1 e I2N1) apresentaram características típicas de *M. incognita* (Eisenback & Triantaphyllou, 1991), ao passo que os isolados 9-12 (S2N1) apresentaram a região anterior dos machos diferente da descrição típica da espécie. No entanto, essas observações são consistentes com aquelas descritas por Eisenback & Triantaphyllou (1991) para algumas populações variantes de *M. incognita*, que nunca haviam sido correlacionadas ao perfil enzimático S2N1.

Os marcadores SCAR desenvolvidos para *M. incognita* (Ziljstra *et al.*, 2000, Randig *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2004) permitiram a amplificação de fragmentos específicos para os doze isolados de *M. incognita*, incluindo três diferentes fenótipos de EST/MDH e quatro raças fisiológicas. Os resultados deste estudo confirmam a validação desses marcadores

como uma ferramenta confiável na identificação molecular, considerando que os resultados anteriores tinham sido obtidos para um pequeno número de populações de *M. incognita*. A identificação realizada através de marcadores SCAR é simples, rápida e de baixo custo, permitindo o processamento de um grande número de amostras de *Meloidogyne* spp. ao mesmo tempo (Muniz *et al.*, 2008). Uma limitação dessa técnica é o pequeno número de primers específicos desenvolvidos para outras espécies de *Meloidogyne*. Estudos semelhantes com primers espécie-específicos foram realizados por Randig *et al.* (2002, 2004) para três espécies parasitas de cafeeiro no Brasil (*M. incognita*, *M. exigua* e *M. paranaensis*) em reação multiplex-PCR permitiram a diferenciação das espécies individuais ou em misturas em uma mesma reação, com nível mínimo de detecção de espécies em misturas de 1%. Além disso, essa técnica favorece um diagnóstico preciso a partir de um único juvenil ou fêmea, aspectos que também favorecem o uso dessa técnica em programas quarentenários ou para análise de J2s provenientes do solo (Randig *et al.*, 2002, 2004; Carneiro *et al.*, 2005b).

Os marcadores RAPD têm se mostrado valiosos na discriminação de *Meloidogyne* spp. (Cenis, 1993; Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Handoo *et al.*, 2004) e em estudos de variabilidade intra-específica (Blok *et al.*, 1997; Randig *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2004; Cofcewicz *et al.*, 2004, 2005). Estudos da variabilidade genética de *M. incognita* com a utilização de marcadores moleculares têm demonstrado que a espécie possui baixa variabilidade genética e os resultados têm sido congruentes com os fenótipos isoenzimáticos descritos para a espécie. Em geral, os fenótipos I1N1 e I2NI de *M. incognita* se agruparam com 100% de similaridade (Randig *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2004; Cofcewicz *et al.*, 2004). Os resultados observados através de análises RAPD e ISSR revelaram que apesar das populações de *M. incognita* serem provenientes de diferentes

culturas e regiões geográficas do Brasil, elas formaram um grupo monofilético e exibiram baixa diversidade genética se agrupando com probabilidade máxima (PP=1), estando assim em conformidade com resultados anteriores (Cenis, 1993; Castagnone Sereno *et al.*, 1994; Semblat *et al.*, 1998; Carneiro *et al.*, 2000; Randig *et al.*, 2002; Cofcewicz *et al.*, 2004, 2005).

Os resultados revelaram baixa variabilidade morfológica, citológica e molecular em *M. incognita* quando comparada a outras espécies partenogênicas mitóticas como *M. arenaria* (Carneiro *et al.*, 2008b, Cofcewicz *et al.*, 2004; 2005), considerada hoje como uma espécie 'swarms' e *M. exigua* uma espécie partenogênica meiótica facultativa (Muniz *et al.*, 2008). Entretanto, *M. enterolobii* que também é partenogênica mitótica, apresentou comportamento semelhante a *M. incognita*, ou seja, baixa variabilidade intraespecífica (Tigano *et al.*, 2010). Em geral, as espécies partenogênicas possuem baixa variabilidade genética, pois a partenogênese permite uma rápida colonização, não havendo a necessidade de acasalamento como em espécies anfimíticas (Trudgill & Blok, 2001).

Neste estudo, os doze isolados de *M. incognita* foram agrupados independentemente das origens geográficas, assim como Devran *et al.* (2008) relataram a ausência de correlação entre o nível de similaridade genética e a origem geográfica em três espécies, *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. incognita*. Adicionalmente, os marcadores RAPD e ISSR não demonstraram consistência na separação das quatro raças de *M. incognita*, assim como em estudos anteriores que mostraram que populações de *M. arenaria* e *M. incognita* não se agruparam de acordo com suas raças fisiológicas (Cenis, 1993; Baum *et al.*, 1994). Por outro lado, o uso de hospedeiros diferenciadores não é considerado um critério consistente para a identificação de variabilidade intra-específica dos nematoides das galhas (Moens *et al.*, 2009). As raças parecem ser mais uma adaptação fisiológica do nematoide do que uma

característica genética da população (Carneiro & Cofcewicz, 2008). Segundo Muniz *et al.* (2008), as raças fisiológicas de *M. exigua* não formaram grupos monofiléticos, ou seja, não apresentam um mesmo ancestral, logo a noção de raça não foi sustentada pelo determinismo genético. Além disso, nos estudos moleculares não houve correlação estrita entre fenótipos isoenzimáticos e raças fisiológicas nos doze isolados de *M. incognita*. Estudos semelhantes desenvolvidos por Lima Medina *et al.* (2006) mostraram também a inexistência de correlação entre os perfis de esterase I1 e I2 e as raças de *M. incognita* detectadas, assim como já havia sido relatada por Esbenshade & Triantaphyllou (1990).

Neste estudo, os isolados de *M. hispanica* apresentaram o fenótipo de EST/MDH (H3N1), padrão típico da espécie (Hirschmann, 1986). O fenótipo de EST dos isolados da Martinica (S2a – *Meloidogyne* sp.2) foi o mesmo descrito para *Meloidogyne petuniae* (Charchar, Eisenback & Hirschmann, 1999) (Charchar *et al.*, 2009), enquanto que o (MDH-N1) foi distinto (Charchar *et al.*, 1999): N3 para as populações da Martinica e N1 para *M. petuniae*.

Embora os três isolados (15-17) de *M. hispanica* (H3N1) e os isolados atípicos (13, 14) de *Meloidogyne* sp.2 (S2aN3) tenham se agrupado no dendograma, formando um grupo monofilético, diferenças entre *M. hispanica* e *Meloidogyne* sp.2 foram observadas em relação ao padrão perineal, estiletos de fêmeas e machos, algumas mensurações de fêmeas, machos e J2, fenótipos de EST e MDH, além do número de cromossomos. Quanto a morfologia, *Meloidogyne* sp.2 é mais próxima de *M. petuniae* do que de *M. hispanica* (região perineal, estiletos da fêmeas e machos). Entretanto, não é idêntica, pois difere em vários valores morfométricos como estilete, região hialina da cauda, entre outros. Esses resultados sugerem que os dois isolados *Meloidogyne* sp.2 (S2aN3) pertencem a uma espécie ainda não identificada, mas geneticamente próxima de *M. hispanica*. Porém estudos

comparativos a outras espécies são necessários para esclarecer a identidade taxonômica desses isolados.

6. CONCLUSÕES

Este estudo caracterizou três perfis enzimáticos de esterase (EST) para *M. incognita*. Todas as populações desses três perfis apresentaram características morfológicas e morfométricas, citológicas, fisiológicas e moleculares típicas de *M. incognita*, representando um grupo com baixa variabilidade genética. Três marcadores espécie-específicos para identificação de *M. incognita* foram validados com mais isolados dessa espécie pertencentes a diferentes raças, perfis enzimáticos, regiões geográficas do Brasil e culturas. Mais estudos relacionados aos isolados de *Meloidogyne* sp.2 são necessários para esclarecer a identidade taxonômica dessa espécie.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad P, Castagnone-Sereno P, Rosso MN, Engler JA, Favery B (2009) Invasion, feeding and development. *In*: Perry R, Moens M, Starr JL, eds. Root-knot Nematodes. Cambridge, MA, USA, CABI International, p. 163-181.

Alfenas AC, Peters I, Brune W, Passador GC (1991) Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa: SIF, 242p.

Arias MC, Infante-Malanchias ME (2001) RFLP: o emprego de enzimas de restrição para a detecção de polimorfismo no DNA. *In*: Matioli SR, ed. *Biologia molecular e evolução*: São Paulo: Nobel, p.143-152.

Baum TJ, Gresshoff PM, Lewis AS, Dean RA (1994) Characterization and phylogenetic analysis of four root-knot nematode species using DNA amplification fingerprint and automated polyacrylamide gel electrophoresis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7: 39-47.

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

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

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

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

Carneiro RMDG, Carneiro RG, Abrantes MO, Santos MSNA, Almeida MR (1996b) *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot Nematode Parasitizing Coffee in Brazil. *Journal of Nematology* 28: 177-189.

Carneiro RMDG, Castagnone-Sereno P, Dickson D (1998) Variability among four populations of *Meloidogyne javanica* from Brazil. *Fundamental and Applied Nematology* 21: 319 – 326.

Carneiro RMDG, Randig O, Freitas LG, Dickson DW (1999) Attachment of endospores of *Pasteuria penetrans* to males and juveniles of *Meloidogyne* spp. *Nematology* 1: 267-271.

Carneiro RMDG, Almeida MRA (2000) Caracterização isoenzimática e variabilidade intraespecífica dos nematóides de galhas do cafeeiro no Brasil. *In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas (Resumos)*. p. 280- 282

Carneiro RMDG, Almeida MRA (2001) Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira* 25: 555–560.

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

Carneiro RMDG, Carneiro RG, Neves DIN, Almeida MRA (2003) Nova raça de *Meloidogyne javanica* detectada em *Arachis pintoi* no estado do Paraná. *Nematologia Brasileira* 27: 219-222.

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

Carneiro RMDG, Almeida MRA, Gomes ACMM, Hernandez A (2005a) *Meloidogyne izalcoensis* n.sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasiting coffee in El Salvador. *Nematology* 7: 819-32.

Carneiro RMDG, Randig O, Almeida MRA, Gonçalves W (2005b) Identificação e caracterização de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiro nos Estados de São Paulo e Minas Gerais através dos fenótipos de esterase e SCAR-Multiplex-PCR. *Nematologia Brasileira* 29: 233-241.

Carneiro RMDG, Cofcewicz ET (2008) Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. *In*: Souza RM, ed. Plant parasitic nematodes of coffee. Springer, Holand, p.87-122.

Carneiro RMDG, Mendes ML, Almeida MRA, Santos MFA, Gomes ACMM, Karssen G (2008a) Additional information on *Meloidogyne inornata* Lordello, 1956 (Tylenchida: Meloidogynidae) and its characterization as a valid species. *Nematology* 10: 123-136.

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

Castagnone-Sereno P, Piotte C, Abad P, Bongiovanni M, Dalmaso A (1991) Isolation of a repeated DNA probe showing polymorphism among populations. *Journal of Nematology* 23: 316-320.

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

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

Cenis JL (1993) Identification of four major *Meloidogyne* spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Phytopathology* 83: 76-80.

Charchar JM, Eisenback JD, Hirschmann H (1999) *Meloidogyne petuniae* n.sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitic on Petunia in Brazil. Journal of Nematology 31: 81-91.

Charchar JM, Eisenback, JD, Vieira JV, Boiteux MEN, Boiteux LS (2009) *Meloidogyne polycephanulata* n. sp. (Nemtoda:Meloidogynidae) a root-knot nematode parasitizing carrots in Brazil. Journal of Nematology 41: 174-186.

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

Cliff GM, Hirschmann H (1985) Evaluation of morphological variability in *Meloidogyne arenaria*. Journal of Nematology 17: 445-459.

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

Cofcewicz ET, Carneiro RMDG, Randig O, Chambrier C, Quénehervé P (2005) Diversity of *Meloidogyne* spp. on *Musa* in Martinique, Guadeloupe and French Guiana. Journal of Nematology 37: 313-322.

Curran J, Macclure MA, Webster JM (1986) Genotypic differentiation of *Meloidogyne* populations by detection of restriction fragment length difference in total DNA. *Journal of Nematology* 18: 83-86.

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

De Ley P, Blaxter ML (2002) Systematic position and phylogeny. *In*: Lee DL, ed. *The Biology of Nematodes*. Taylor and Francis, London, p. 1-30.

Devran Z, Zogut MA, Gozel U, Tor M, Elekcioglu H (2008) Analysis of genetic variation between population of *Meloidogyne* spp. from Turkey. *Russian Journal of Nematology* 16: 143-149.

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

Eisenback JD, Hirschmann H, Triantaphyllou AC (1980) Morphological comparison of *Meloidogyne* females structures, perineal patterns, and stylets. *Journal of Nematology* 12: 300-313.

Eisenback JD Hirschmann H, Sasser JN, Triantaphyllou AC (1981) A guide to the four most common species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.), with a pictorial key. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, 48p.

Eisenback J (1982) Morphological comparisons of head shape and stylet morphology of second-stage juveniles of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 14: 339-343.

Eisenback JD (1985a) Detailed morphology and anatomy of second-stage juveniles, males and females of the genus *Meloidogyne* (root-knot nematodes). *In*: Carter CC, Sasser JN, eds. An advanced treatise on *Meloidogyne*. v.1, Biology and control, North Carolina State University. Graphics, Raleigh.

Eisenback JD (1985b) Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *In*: Sasser JN & Carter CC, eds. An advanced treatise on *Meloidogyne*. v.1. Biology and control. North Carolina State University Graphics, Raleigh, p. 95-112.

Eisenback JD (1985c) Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. *In*: Carter CC, Sasser JN, eds. An advanced treatise on *Meloidogyne*. Raleigh: North Carolina State University Graphics, v. 2, p. 79-105.

Eisenback JD, Triantaphyllou HH (1991) Root-knot nematode: *Meloidogyne* spp. and races. *In*: Nickle WR, ed. Manual of agricultural nematology. New York, NY, USA, Marcel Dekker, Inc., p. 191-274.

Eisenback JD, Bernard EC, Schmitt DP (1994) Description of the Kona coffee root- knot nematode, *Meloidogyne konaensis* n. sp. *Journal of Nematology* 26: 363-374.

Eisenback JD, Hunt DJ (2009) General morphology. *In*: Perry RN, Moens N, Starr JL, eds. Root-knot Nematodes. CABI North America Office, Cambridge, MA, USA, p. 18-54.

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

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

Esser RP, Perry VG, Taylor AL (1976) A diagnostic compendium of the genus *Meloidogyne* (Nematoda: Heteroderidae). *Proceeding of the Helminthological Society of Washington* 43: 138-150.

Fargette M (1987) Use of esterase phenotype in the taxonomy of genus *Meloidogyne*. 2 Esterase phenotypes observed in West African populations and their characterization. *Revue de Nématologie* 10: 45-56.

Fassuliotis G (1985) The role of the nematologist on the development of resistant cultivars. *In: Sasser JN, Carter CC, eds. An advanced treatise on Meloidogyne, biology and control. Raleigh: North Carolina State University Graphics., v.1 20, p. 233-240.*

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Ferraz LCCB, Monteiro AR (1995) Nematóides. *In: Bergamim Filho A, Kimati H, Amorim L. Manual de Fitopatologia, v.1: Princípios e conceitos, cap. 8. 3º ed. São Paulo, Ceres. p. 168-201.*

Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. , Brasília: EMBRAPA/CENARGEN 220p.

Franklin MT (1979) Taxonomy of the genus *Meloidogyne*. *In: Lamberty F, Taylor CE. Eds. Root-knot nematodes (Meloidogyne species) systematics, biology and control. New York, Academic Press. p: 37-54.*

Fourie H, Zijlstra C, McDonald AH (2001) Identification of root-knot nematode species occurring in South Africa, using the SCAR-PCR technique. *Nematology* 3: 675-80.

Freire CR, Davide LC, Campos VP, Santos CD, Freire PW (2002) Cromossomos de três espécies brasileiras de *Meloidogyne*. *Ciência Agrotécnica, Lavras. v.2 6, n.5, p. 900-903.*

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

Handoo ZA, Nyczepir AP, Esmenjaud D, Van Der Beek JG, Castagnone-Sereno P, Carta LK, Skantar AM, Higgins JA (2004) Morphological, molecular and differential-host characterization of *Meloidogyne floridensis* n.sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing peach in Florida. *Journal of Nematology* 36: 20-35.

Hartman RM, Sasser JN (1985) Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. *In*: Barker KR, Carter CC, Sasser JN, eds. An advanced treatise on Meloidogyne. v 2, Methodology. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, p. 69-77.

Hirschmann H (1985) The genus *Meloidogyne* and morphological characters differentiating its species. *In*: Sasser JN, Carter CC, eds. An advanced treatise on *Meloidogyne*. v 1. Biology and Control. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, 79-93.

Hirschmann H (1986) *Meloidogyne hispanica* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae) the 'Seville Root-knot nematode'. *Journal of Nematology* 18: 520-532.

Hunt DJ, Handoo ZA (2009) Taxonomy, identification and principal species. *In*: Perry RN, Moens N, Starr JL, eds. Root-knot Nematodes. Cambridge, MA, USA, CABI North America Office, p. 55-97.

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

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

Jepson SB (1983a) Identification of *Meloidogyne*: a general assessment and a comparison of males morphology using light microscopy, with a key to 24 species. *Revue de Nématologie* 6: 291-306.

Jepson SB (1983b) Identification of *Meloidogyne* species: a comparison of female stylets. *Nematologica* 29: 132-143.

Jepson SB (1983c) The use of second-stage juveniles tails as an aid in the identification of *Meloidogyne* species. *Nematologica*: 29-11-28.

Jepson SB (1987) Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Wallingford, U.K., CAB International, 265 pp.

Karsen G, Moens M (2006) Root-knot nematodes. *In*: Perry RL, Moens M, eds. *Plant Nematology*, Cambridge, MA, USA, CABI North America Office, p. 59-90.

Landa BB, Juan E, Palomares Rius JE, Vovlas N, Carneiro RMDG, Abrantes IMO, Castillo P (2008) Molecular characterization of the Seville root-knot nematode, *Meloidogyne hispanica*, by phylogenetic analysis of genes within the rDNA in *Meloidogyne* spp. (Nematoda, Meloidogynidae) support its species identity. Plant Disease 92:1104-1110.

Lax P, Dueñas JCR, Gardenal CN, Doucet ME (2007) Assessment of genetic variability in populations of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944) Nematoda: Pratylenchidae) from Argentina. Nematology 9: 261-270.

Lima-Medina I, Gomes CB, Rossi CE, Carneiro RMDG (2006) Caracterização isoenzimática e biológica de populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de figueira do Rio Grande do Sul e São Paulo. Nematologia Brasileira 30: 179-188.

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

Lordello AIL, Lordello RRA (1996) Identificação de raças de *Meloidogyne incognita* associada a algumas plantas. Summa Phytopathologica, 22: 43-45.

Maggenti A (1981) General Nematology. New York: Springer-Verlag.

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

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

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

Moens M, Perry RN, Starr JL (2009) *Meloidogyne* Species – a diverse group of novel and important plant parasites. *In*: Perry RN, Moens M, Starr JL, eds. *Root-knot Nematodes*. Cambridge, MA, USA, CABI North America Office, p. 1-17.

Mojtahedi H, Santo GS, Pinkerton JN (1988) Differential response of Thor alfalfa to *Meloidogyne chitwoodi* races and *M. hapla*. *Journal of Nematology* 20: 410-416.

Moura RM (1996) Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. *In*: *Revisão Anual de Patologia de plantas*, v. 4, p. 209-245.

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

Muniz MFS, Campos VP, Almeida MRA, Gomes ACMM, Santos MFA, Mota FC, RMDG (2009) Additional information on an atypical population of *Meloidogyne exigua* Göldei, 1887 (Tylenchida: Meloidogynidae) parasitizing rubber tree in Brazil. *Nematology* 11: 95-106.

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

Oliveira DS, Oliveira RDL, Gonçalves W (2006) Fenótipo S1 de esterase em *Meloidogyne incognita* no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 31: 207.

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

Perry RN, Moens M, Starr JL (2009) Root-knot nematodes. *In*: Eisenback JD & Hunt DJ, eds. *General morphology*. Virginia, USA. CABI International, p. 18-54.

Rammah A, Hirschmann H (1990) Morphological comparison of three host races of *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 22: 56-68.

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

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

Roberts PA (1995) Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance. *Annual Review of Phytopathology* 33:199.

Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

Salgado SML, Carneiro RMDG, Pinho RSC (2011) Aspectos técnicos dos nematoides parasitas do cafeeiro. *Boletim técnico* nº 98. 60p.

Santos JM, Triantaphyllou HH (1992) Determinação dos fenótipos isoenzimáticos e estudos comparativos da morfologia de 88 populações de *Meloidogyne* spp., parasitas do cafeeiro. *Nematologia Brasileira* 16:88.

Santos PV (2008) Reação de acessos de pimenteiras (*Capsicum* spp.) a *Meloidogyne incognita* raça 3. Dissertação de Mestrado Universidade Estadual de Santa Cruz Ilhéus, BA.

Semblat JP, Wajnberg E, Dalmaso A, Abad P, Castagnone-Sereno P (1998) High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis. *Molecular Ecology* 7: 119-125.

Silva RV (2005) Produção de inóculo e diferenciação de raças de *Meloidogyne exigua* em *Coffea* spp. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.

Swofford DL (2002) PAUP*. Phylogenetic analysis using UPGMA (*and other methods). Version 4 b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Taylor DP, Netscher C (1974) An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. *Nematologica* 20: 268-269.

Taylor AL, Sasser JN (1978) Biology, identification and control of rootknot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Coop. Publ. Dept. Plant Pathology, North Carolina State University Graphics, Raleigh, NC, 111pp.

Taylor DT, Sasser JN (1983) Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (*Meloidogyne* species). A Coop. Public. Dept. Pl Pathology, North Carolina State University and USAID, 111 pp.

Tigano M, Siqueira K, Castagnone-Sereno P, Mulet K, Queiroz P, Santos M, Teixeira C, Almeida M, Silva J, Carneiro R (2010) Genetic diversity of the root-knot nematode

Meloidogyne enterolobii and development fo SCAR marker for this guava-damaging species. *Plant Pathology* 59: 1054-1061.

Tihohod D (1993) *Nematologia agricola aplicada*. Jaboticabal: UNESP/FUNEP. 372 p.

Triantaphyllou AC (1985a) Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. *In: Barker KR, Carter CC, Sasser JN, eds. An advanced treatise on Meloidogyne, v. 1, Biology and Control*. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, p. 107-14.

Triantaphyllou AC (1985b) Cytological methods for the study of oogenesis and reproduction of root-knot nematode. *In: Barker KR, Carter CC, Sasser JN, eds. An advanced treatise on Meloidogyne, v. 2, Methodology*. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, p. 107-14.

Trudgill DL (1991) Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. *Annual Review of Phytopathology* 29: 167.

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

Whitehead AG, Hemming JR (1965) A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Annals of Biology* 55: 25-38.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.

Wofford DS, Gray FA, Eckert JW (1989) Pathogenicity of two populations of *Meloidogyne hapla* Chitwood on Alfalfa and Sainfoin. *Journal of Nematology* 21:87-91.

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

Zijlstra C, Donkers-Venne DTHM, Fargette M (2000) Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified regions (SCAR) based PCR assays. *Nematology* 2: 847-53.

