



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

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA,
ENZIMÁTICA E MOLECULAR DE
POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE
MELOIDOGYNE SPP.: IDENTIFICAÇÃO E
SINONIMIZAÇÃO DE ESPÉCIES**

Jessica da Mata dos Santos Monteiro

Brasília-DF

2016

JESSICA DA MATA DOS SANTOS MONTEIRO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, ENZIMÁTICA E MOLECULAR DE
POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *MELOIDOGYNE* SPP.: IDENTIFICAÇÃO E
SINONIMIZAÇÃO DE ESPÉCIES**

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

Orientador

Prof. Juvenil Enrique Cares

Co-Orientadora

Dra. Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL

BRASIL

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Monteiro, Jessica da Mata dos Santos.

Caracterização morfológica, enzimática e molecular de populações brasileiras de *Meloidogyne* spp.: identificação e sinonimização de espécies / Jessica da Mata dos Santos Monteiro.

Brasília, 2016. Número de páginas p.: 151 il.

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

1. Fitopatologia – Nematologia

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Caracterização morfológica, enzimática e molecular de populações brasileiras de *Meloidogyne* spp.: identificação e sinonimização de espécies / Jessica da Mata dos Santos Monteiro.

A Deus Pai de todos, por me permitir a vida, e aos meus pais Pedro dos Santos Monteiro *in memoriam* e Maria da Cruz Nunes Luciano da Mata *in memoriam*, por terem me trazido ao mundo e me educado

...dedico!

À Doutora Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro, por toda ajuda, preocupação, dedicação, incentivo e sobretudo, pelo senso de humanidade e atenção com que me tratou nesses anos

...ofereço!

AGRADECIMENTOS

Antes de mais nada e com a devida vênia, agradeço a DEUS por me permitir viver a cada dia, e por me conceder tantas graças e bênçãos como a minha família.

Em seguida, dirijo os meus agradecimentos aos meus familiares consanguíneos, que mesmo distantes me fazem sentir uma integrante nata e querida da grande família da Mata e Monteiro.

Estendo os meus agradecimentos também á Dr.^a Dulce Gomes e Adriana Ramos pela amizade, carinho, atenção e proteção com que me ajudaram no período que antecedeu a minha vida no Brasil, e pela consideração que me estimam mesmo estando distante por todos esses anos.

Ao Erllel Q. R. L. Jesus, agradeço profundamente e com muito amor e carinho, por fazer parte da minha vida. Saiba que sem você, tudo seria bem mais difícil.

Ao Prof. Juvenil Enrique Cares, por ter se disponibilizado a me orientar por mais quatro anos, contribuindo com este trabalho e com meu aprendizado, e também por todo apoio me concedido na esfera não acadêmica. Muito obrigada!

Um grande agradecimento à Dra. Regina Carneiro, primeiramente, por ter me acolhido e aceitado como sua orientada, e pela esplêndida dedicação e todo apoio que me deu durante esses anos não só no âmbito acadêmico, por ter contribuído de forma tão determinante para a realização deste trabalho, e por ter me ensinado a gostar mais ainda da área de Nematologia. Queira aceitar os meus sinceros e profundos agradecimentos.

Ao Dr. Valdir Correa pela grande contribuição dada para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Aos colegas de laboratório que com amizade e muito carinho contribuíram direta ou indiretamente para a realização e sucesso deste trabalho: Vanessa Mattos, Marcilene Fernandes, Joelma Silva, Aldemiro Jorge Júnior, Maria Ritta Almeida, Mariana Guimarães, Edriana Araújo, Guillermo Gomez e Daniela Souza.

A Ana Cristina Gomes, pela amizade e por tudo que fez para me ajudar na realização deste trabalho, sobretudo na Microscopia Eletrônica de Varredura.

Às minhas queridas amigas e irmãs Giselle Marques e Nayra Bomfim por estarem sempre presente na minha vida, por terem me emprestado as suas famílias e por todo apoio que sempre me prestaram, me apoiando em momentos difíceis e por serem quem são. Não mudem, vocês são perfeitas, cada uma do seu jeito, e eu amo muito vocês para sempre!

À Cláudia Lustosa e sua família pela amizade, solidariedade, bondade e pelas importantíssimas ajudas nos momentos em que precisei muito.

À amiga Kamila Araújo pela amizade e pelas horas de tensão que passou com a Giulia enquanto eu assistia as aulas. Muito obrigada Kamilitia!

Aos amigos mades, Vips e não mades pela amizade e por fazerem parte da minha vida. Que os nossos convívios e encontros nunca acabem! Cecília Rodrigues, Bárbara Teixeira, Mônica Alves, Kim Lustosa, Hugo Moreira, Lilian, Claudênia da Silva, Cláudia Oliveira, Amanda Veloso, Renato Silva, Klênia Pacheco, Eder Marques e Joelly Castro.

À Embrapa Cenargen e a seus funcionários por possibilitarem a realização deste trabalho em suas instalações.

À Universidade de Brasília pelos recursos humanos e financeiros gastos na minha formação.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia-UnB, pelos preciosos ensinamentos e assistência durante os anos de doutorado. Aprendi muito com vocês!

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, e a CAPES pelo auxílio financeiro concedido a mim durante os anos do curso.

A todos, o meu muito obrigada!

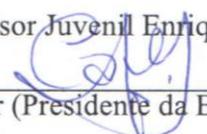
Jessica Monteiro

**Caracterização morfológica, enzimática e molecular de populações Brasileiras de
Meloidogyne spp.: identificação e sinonimização de espécies.**

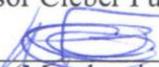
JESSICA DA MATA DOS SANTOS MONTEIRO

TESE APROVADA EM: 10/06/2016, POR:

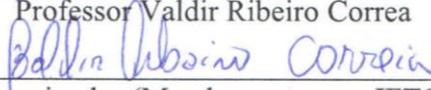
Professor Juvenil Enrique Cares


Orientador (Presidente da Banca - UnB)

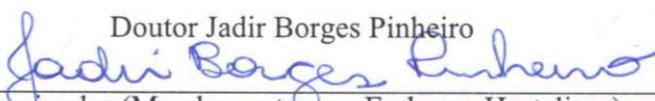
Professor Cleber Furlanetto


Examinador (Membro interno - UnB)

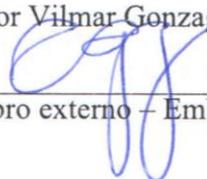
Professor Valdir Ribeiro Correa


Examinador (Membro externo - IFTO)

Doutor Jadir Borges Pinheiro


Examinador (Membro externo - Embrapa Hortaliças)

Doutor Vilmar Gonzaga


Examinador (Membro externo - Embrapa Cenargen)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL – 2016

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| ÍNDICE DE TABELAS..... | ii |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | ii |
| RESUMO GERAL..... | iii |
| GENERAL ABSTRACT..... | vi |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 1 |
| OBJETIVOS..... | 2 |
| REVISÃO DE LITERATURA..... | 2 |
| BIOLOGIA E CICLO DE VIDA..... | 3 |
| MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE <i>MELOIDOGYNE</i> SPP..... | 5 |
| CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA..... | 6 |
| CARACTERIZAÇÃO DE FÊMEAS..... | 7 |
| CARACTERIZAÇÃO DOS MACHOS..... | 9 |
| CARACTERIZAÇÃO DOS JUVENIS DO SEGUNDO ESTÁDIO..... | 11 |
| RAÇAS FISIOLÓGICAS..... | 11 |
| CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR..... | 15 |
| DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>MELOIDOGYNE</i> SPP..... | 20 |
| <i>MELOIDOGYNE ARENARIA</i> (NEAL, 1889) CHITWOOD, 1949..... | 23 |
| <i>MELOIDOGYNE MOROCCIENSIS</i> RAMMAH & HIRSCHMANN, 1990..... | 25 |
| <i>MELOIDOGYNE INCOGNITA</i> (KOFOID & WHITE, 1919) CHITWOOD, 1949..... | 26 |
| <i>MELOIDOGYNE ETHIOPICA</i> WHITEHEAD, 1968..... | 27 |
| <i>MELOIDOGYNE BRASILIENSIS</i> CHARCHAR & EISENBACK, 2002..... | 31 |
| <i>MELOIDOGYNE KONAENSIS</i> EISENBACK ET AL., 1994..... | 32 |
| <i>MELOIDOGYNE PETUNIAE</i> CHARCHAR ET AL., 1999..... | 33 |
| <i>MELOIDOGYNE PHASEOLI</i> CHARCHAR ET AL., 2008..... | 33 |
| <i>MELOIDOGYNE POLYCEPHANNULATA</i> CHARCHAR ET AL., 2009..... | 34 |
| <i>MELOIDOGYNE PISI</i> CHARCHAR ET AL., 2009..... | 34 |
| <i>MELOIDOGYNE PARANAENSIS</i> CARNEIRO ET AL., 1996..... | 35 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 36 |
| CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE ESPÉCIES BRASILEIRAS DE <i>MELOIDOGYNE</i> POR MEIO DE MARCADORES ENZIMÁTICOS E MOLECULARES..... | 51 |
| RESUMO..... | 51 |
| ABSTRACT..... | 52 |
| INTRODUÇÃO..... | 53 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 54 |
| RESULTADOS..... | 62 |
| DISCUSSÃO..... | 69 |
| CONCLUSÃO..... | 70 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 70 |
| CAPÍTULO 2 – <i>MELOIDOGYNE BRASILIENSIS</i> UM SINÔNIMO JÚNIOR DE <i>M. ETHIOPICA</i>..... | 79 |
| RESUMO..... | 79 |
| ABSTRACT..... | 80 |
| INTRODUÇÃO..... | 81 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 83 |
| RESULTADOS..... | 88 |
| DISCUSSÃO..... | 103 |
| CONCLUSÃO..... | 106 |
| ANEXO..... | 107 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 115 |
| CAPÍTULO 3 - PRIMEIRA DETECÇÃO DE <i>MELOIDOGYNE KONAENSIS</i> PARASITANDO DIFERENTES CULTURAS NO BRASIL, E INFORMAÇÕES ADICIONAIS A CERCA DA ESPÉCIE..... | 120 |
| RESUMO..... | 120 |
| ABSTRACT..... | 121 |
| INTRODUÇÃO..... | 122 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 125 |
| RESULTADOS..... | 130 |
| DISCUSSÃO..... | 143 |
| CONCLUSÃO..... | 147 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 147 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE ESPÉCIES BRASILEIRAS DE <i>MELOIDOGYNE</i> POR MEIO DE MARCADORES ENZIMÁTICOS E MOLECULARES..... | 51 |
| TABELA 1. POPULACAO DE NEMATOIDES UTILIZADAS NAS ANÁLISES ENZIMÁTICAS E MOLECULARES..... | 55 |
| TABELA 2. POLIMORFISMOS DE RAPD E AFLP OBTIDOS NAS ANALISES..... | 68 |
| CAPÍTULO 2 – <i>MELOIDOGYNE BRASILIENSIS</i> UM SINÔNIMO JÚNIOR DE <i>M. ETHIOPICA</i>..... | 79 |
| TABELA 1. SEQUENCIAS DE PRIMERS ITS E D2D3 UTILIZADOS NO SEQUENCIAMENTO..... | 86 |
| TABELA 2. SEQUÊNCIAS DO BANCO DE DADOS (NCBI) URILIZADAS NAS ÁRVORES..... | 87 |
| TABELA 3. POPULACAO DE NEMATOIDES UTILIZADAS NAS ANÁLISES ENZIMÁTICAS E MOLECULARES..... | 88 |
| TABELA 4. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DAS FEMEAS DE <i>M. ETHIOPICA</i> | 93 |
| TABELA 3. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DOS MACHOS DE <i>M. ETHIOPICA</i> | 94 |
| TABELA 4. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DOS J2 DE <i>M. ETHIOPICA</i> | 95 |
| TABELA 5. MORFOMETRIA COMPARADA DE <i>M. ETHIOPICA</i> | 97 |
| CAPÍTULO 3 - PRIMEIRA DETECÇÃO DE <i>MELOIDOGYNE KONAENSIS</i> PARASITANDO DIFERENTES CULTURAS NO BRASIL, E INFORMAÇÕES ADICIONAIS A CERCA DA ESPÉCIE..... | 120 |
| TABELA 1. DADOS DA MORFOMETRIA DE <i>M. KONAENSIS</i> | 132 |
| TABELA 2. DIFERENCAS ENTRE <i>M. KONAENSIS</i> E <i>M. PARANAENSIS</i> | 138 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE ESPÉCIES BRASILEIRAS DE <i>MELOIDOGYNE</i> POR MEIO DE MARCADORES ENZIMÁTICOS E MOLECULARES..... | 51 |
| FIGURA 1. PERFIS DE ESTERASE DE ESPÉCIES BRASILEIRAS DE <i>MELOIDOGYNE</i> SPP..... | 64 |
| FIGURA 2. PADRAO DE AMPLIFICAO DA PCR SCAR ESPECIE ESPECIFICO..... | 65 |
| FIGURA 2. POLIMORFISMO DE FRAGMENTOS RAPD V07..... | 66 |
| FIGURA 3. POLIMORFISMO DE FRAGMENTOS AFLP 15..... | 67 |
| FIGURA 4. DENDOGRAMA OBTIDO DAS ANÁLISES RAPD E AFLP..... | 69 |
| CAPÍTULO 2 – <i>MELOIDOGYNE BRASILIENSIS</i> UM SINÔNIMO JÚNIOR DE <i>M. ETHIOPICA</i>..... | 79 |
| FIGURA 1. PERFIL DE ESTERASE DE <i>M. BRASILIENSIS</i> (= <i>M. ETHIOPICA</i>)..... | 99 |
| FIGURA 2. PADRAO DE AMPLIFICAO DA PCR SCAR ESPECIE ESPECIFICO..... | 100 |
| FIGURA 3. ARVORE FILOGENETICA DA REGIAO ITS1-5.8S-ITS2..... | 101 |
| FIGURA 4. ARVORE FILOGENETICA DO FRAGMENTO D2D3 (28S)..... | 102 |
| CAPÍTULO 3 - PRIMEIRA DETECÇÃO DE <i>MELOIDOGYNE KONAENSIS</i> PARASITANDO DIFERENTES CULTURAS NO BRASIL, E INFORMAÇÕES ADICIONAIS A CERCA DA ESPÉCIE..... | 120 |
| FIGURA 1. PADRÕES PERINEAIS DE FÊMEAS DE <i>MELOIDOGYNE KONAENSIS</i> | 133 |
| FIGURA 2. MICROGRAFIAS DE FÊMEAS DE <i>MELOIDOGYNE KONAENSIS</i> | 134 |
| FIGURA 3. MICROGRAFIAS DE MACHOS DE <i>MELOIDOGYNE KONAENSIS</i> | 135 |
| FIGURA 4. MICROGRAFIAS DE ESTILETES DE <i>MELOIDOGYNE PARANAENSIS</i> | 136 |
| FIGURA 5. MICROGRAFIAS DE J2 DE <i>MELOIDOGYNE KONAENSIS</i> | 137 |
| FIGURA 6. FENÓTIPOS DE ESTERASES DE <i>M. KONAENSIS</i> E <i>M. PARANAENSIS</i> | 139 |
| FIGURA 7. PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO COM MARCADOR SCAR..... | 141 |
| FIGURA 8. ÁRVORE DE NEIGHBOUR-JOINING OBTIDO DAS ANÁLISES DE SEQUENCIAS DA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 E DO FRAGMENTO D2D3 DO GENE 28S..... | 142 |

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, ENZIMÁTICA E MOLECULAR DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *MELOIDOGYNE* SPP.: IDENTIFICAÇÃO E SINONIMIZAÇÃO DE ESPÉCIES

RESUMO GERAL - Os nematoides-das-galhas são classificados no gênero *Meloidogyne* e estão amplamente distribuídos ao redor do mundo com mais de 100 espécies descritas e mais de 2000 espécies hospedeiras, representando ameaça à produção agrícola mundial. A identificação precisa e acurada das espécies é de extrema importância para o controle efetivo das doenças causadas por esses organismos. A taxonomia do gênero *Meloidogyne* no passado, geralmente era baseada em caracteres morfológicos e biométricos, e as vezes citológicos. No entanto, a variabilidade dos padrões perineais e dos caracteres morfológicos diagnósticos, variações na biometria e cromossomos muito pequenos, muitas vezes difíceis de se observar e de se contar, constituem até aos dias de hoje, limitações que tornam a identificação específica difícil, até para os taxonomistas mais experientes. Por isso, faz-se necessário a integração dos métodos clássicos de identificação com as técnicas mais modernas, como o uso dos marcadores enzimáticos e moleculares, que corroborem para uma identificação específica mais precisa. Neste trabalho, são apresentados os resultados dos estudos da diversidade genética de populações brasileiras de *Meloidogyne* spp. recentemente descritas, em comparação com espécies comumente encontradas no Brasil. É feita também, a sinonimização de *M. brasiliensis* com *M. ethiopica*, com base em estudos enzimáticos (perfil de esterase), marcadores SCAR espécie – específicos, sequenciamento das regiões ITS1-5.8S-ITS2 e fragmento D2-D3 do rRNA, e uma análise comparativa das descrições originais de ambas espécies. Além disso, é feito também, o primeiro relato de *M. konaensis* no Brasil e comparação com *M. paranaensis*. Das cinco espécies de *Meloidogyne* descritas no Brasil

nas últimas duas décadas, tratadas como espécies brasileiras de *Meloidogyne* (*M. petuniae*, *M. brasiliensis*, *M. pisi*, *M. phaseoli* e *M. polycephannulata*), quatro delas foram descritas apenas com base em caracteres morfológicos e morfométricos. Essas espécies foram submetidas a análises adicionais com marcadores bioquímicos e moleculares. Análises de isoenzimas realizadas com essas espécies revelaram novos padrões de esterase para *M. petuniae* (Est Pe2 Rm: 0,95, 1,1) e *M. pisi* (Est Pi5 Rm: 0,85, 0,90, 1,0, 1,25, 1,30). *M. brasiliensis*, *M. phaseoli* e *M. polycephannulata*, apresentaram padrões de esterases idênticos aos padrões de espécies anteriormente descritas como, *M. ethiopica* (Est E3 Rm: 0,9, 1,05, 1,20), *M. morocciensis* (Est A3 Rm: 1,1, 1,2, 1,3) e *M. incognita* (Est I1 Rm: 1,05, 1,1), respectivamente. Marcadores SCAR espécie-específicos desenvolvidos para *M. ethiopica*, *M. phaseoli* e *M. morocciensis*, e testados para as espécies brasileiras cujos padrões de esterase tinham sido idênticos aos dessas espécies, resultou na amplificação de um único produto de 350 pb para populações de *M. ethiopica* e *M. brasiliensis*, 420 pb para populações de *M. morocciensis* e *M. phaseoli*, e 399 pb para *M. incognita* e *M. polycephannulata*, corroborando com os padrões de esterase. O estudo da variabilidade genética dentro desses grupos foi realizado com utilização de 30 primers RAPD e 11 AFLP, e os resultados revelaram níveis de polimorfismos médios entre as populações dessas espécies, sendo 40,7% de polimorfismo nas populações de *M. ethiopica* e *M. brasiliensis*, 43,6% em populações de *M. morocciensis* e *M. phaseoli* e 34,7% em populações de *M. incognita* e *M. polycephannulata*. No entanto, populações de *M. ethiopica* e *M. brasiliensis*, *M. morocciensis* e *M. phaseoli*, e *M. incognita* e *M. polycephannulata* se agruparam entre si em dendograma obtido a partir das análises desses marcadores com suporte de bootstrap de 77%, 100% e 100%, respectivamente. *Meloidogyne brasiliensis* foi sinonimizado com *M. ethiopica*, com base em estudos comparativos das descrições de ambas espécies e estudo da proximidade genética entre

elas, baseados em análise com marcadores enzimáticos e SCAR espécie – específicos e sequenciamento das regiões ITS1-5.8S-ITS2 e D2-D3 (28S) do rRNA. Finalmente, *M. konaensis*, descrita pela primeira vez a partir de espécimes coletadas em solos provenientes de áreas cultivadas com café (*Coffea arabica*) na Ilha do Kona, Hawaii, foi relatada pela primeira vez no Brasil em plantas de repolho, mamão, noni e canapum, no estado do Ceará. Estudos morfológicos mostraram características típicas de *M. konaensis*. O padrão de esterase K3 é finalmente caracterizado como espécie-específico para essa espécie, com três bandas principais de Rm: 1,0, 1,17, 1,27 e uma banda secundária Rm: 1,10. Alguns equívocos acerca da verdadeira identidade de *M. konaensis* são esclarecidos neste estudo, incluindo as suas diferenças com *M. paranaensis*.

Palavras-Chaves: D2-D3, esterase, filogenia, ITS, marcadores moleculares, primeiro relato, taxonomia.

Orientador: Professor Juvenil Enrique Cares

Universidade de Brasília

Co-Orientadora: Dra. Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**MORPHOLOGICAL, ENZYMATIC AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF BRAZILIAN POPULATIONS OF *MELOIDOGYNE*
SPP.: SPECIES IDENTIFICATION AND SYNONYMIZATION**

GENERAL ABSTRACT - The root-knot-nematodes are classified in the genus *Meloidogyne*, and are widely distributed around the world with more than 100 described species and more than 2000 hosts, representing threat worldwide to agriculture. Accurate and precise species identification is very important for effective control of diseases caused by these organisms. The taxonomy of the genus *Meloidogyne* years ago, was generally based on morphological and biometric characters, and sometimes cytological. However, variability of the perineal patterns and diagnostic morphological characters, variations in biometrics and small chromosomes, often difficult to be observed and counted, are up to today, limitations that make it difficult or impossible to specific identification, even for experienced taxonomists. Therefore, the integration of classical methods of identification with modern techniques such as the use of enzymatic and molecular markers is necessary to a more accurate and reliable specific identification. In this work, we present the results of the study of genetic diversity of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. recently described, compared with previously identified species. *Meloidogyne brasiliensis* was synonymized with *M. ethiopica*. Moreover, *Meloidogyne konaensis* is reported here for the first time in Brazil. The five *Meloidogyne* species described in Brazil in the last two decades, treated as Brazilian species (*M. petuniae*, *M. brasiliensis*, *M. pisi*, *M. phaseoli* and, *M. polycephannulata*), four of which were described based only on morphological and morphometric characters. In this study, these species were subjected to further analysis with biochemical and molecular markers. Isoenzyme analysis performed with these species revealed new patterns of esterase for *M. petuniae* (Est Pe2 Rm: 0.95, 1.1)

and *M. pisi* (Est Pi5 Rm: 0.85, 0.90, 1.0, 1.25, 1.3). *Meloidogyne brasiliensis*, *M. phaseoli* and *M. polycephannulata* showed esterase patterns very similar to the patterns of previously existing species as *M. ethiopica* (Est E3 Rm: 0.9, 1.05, 1.20), *M. morocciensis* (Est A3 Rm: 1.1, 1.2, 1.3) and *M. incognita* (Est I1 Rm: 1.05, 1.1), respectively. Species-specific SCAR markers developed to *M. ethiopica*, *M. morocciensis* and *M. incognita* and tested for these group of species, resulted in amplification of a single 350 bp product for *M. ethiopica* and *M. brasiliensis* populations, 420 bp for *M. morocciensis* and *M. phaseoli* populations, and 399 bp for *M. incognita* and *M. polycephannulata* populations, corroborating with the esterase patterns. The study of genetic variability within these groups was carried out using 30 RAPD primers and 11 AFLP, and the results showed relatively medium levels of polymorphism between populations of these species, 40.7% polymorphism within populations of *M. ethiopica* and *M. brasiliensis*, 43.6% in *M. morocciensis* and *M. phaseoli* populations and 34.7% in *M. incognita* and *M. polycephannulata* populations. However, populations of *M. ethiopica* and *M. brasiliensis*; *M. morocciensis* and *M. phaseoli*; *M. incognita* and *M. polycephannulata* clustered together in the same clade in dendrogram obtained from the analysis of these markers with 77%, 100% and 100% bootstrap support, respectively. *Meloidogyne brasiliensis* described and illustrated from specimens collected from tomato and pea plants based only on the morphology and morphometry, now is synonymized with *M. ethiopica* based on comparative studies of descriptions of both species and genetic study of the similarities between them, based on analysis of enzymatic markers, species – specific SCAR and sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 regions and D2-D3(28S) rRNA. Finally, *M. konaensis*, first described in soil cultivated with coffee plants in Kona Island, Hawaii, is now reported for the first time in Brazil, parasitizing plants of cabbage, papaya, noni and canapum in Ceará state. Morphological studies showed typical characteristics for the species *M.*

konaensis. The esterase pattern K3 is unique and species-specific with three major bands (Rm: 1.0, 1.17, 1.27) and a secondary band (Rm 1.10). Confusion on the real identity of this species is clarified in this study, including the differentiation from *M. paranaensis*. Pathogenicity tests indicated that coffee is not a host of *M. konaensis* as previously reported in the original description of this species.

Key-Words: D2-D3, esterase, first report, ITS, molecular markers, phylogeny, taxonomy.

Student Advisory Comitee:

Advisor: Prof. Juvenil Enrique Cares

Universidade de Brasília

Co-advisor: Dra Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

INTRODUÇÃO GERAL

Os nematoides formadores de galhas radiculares são pertencentes ao gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1887, e constituem o grupo de nematoides fitoparasitas mais importantes no mundo, com mais de 100 espécies descritas (Karssen *et al.*, 2013), e mais de 2000 espécies de plantas hospedeiras, representando ameaça à produção agrícola mundial (Perry *et al.*, 2009). A identificação precisa dos nematoides-das-galhas é crucial para o controle efetivo das doenças. A variação morfológica inter e intraespecífica de *Meloidogyne* spp., torna a identificação muitas vezes difícil, mesmo para os taxonomistas mais experientes (Carneiro *et al.*, 2000).

A caracterização das espécies é baseada, sobretudo, em características morfológicas de fêmeas, machos e juvenis do segundo estágio. Informações sobre a gama de hospedeiros ou especificidade parasitária também são incluídas nas descrições de várias espécies (Carneiro *et al.*, 2000). Entretanto, identificações precisas e confiáveis baseadas somente na morfologia e morfometria se tornam uma tarefa árdua mesmo para nematologistas qualificados e especializados no gênero *Meloidogyne* (Esbenshade & Triantaphyllou, 1990).

Atualmente, os métodos mais utilizados para a identificação das espécies de *Meloidogyne* no Brasil são o exame da configuração perineal, combinado ou não com a análise bioquímica, baseada em estudos dos fenótipos das esterases. Dentre esses métodos, as análises bioquímicas são os mais precisos, embora, com o inconveniente da necessidade das amostras estarem em bom estado de preservação, devido à rápida degradação das enzimas, e, também por existirem até o momento padrões isoenzimáticos para poucas espécies (40) (Hunt & Handoo, 2009). Para espécies atípicas quanto ao perfil das isoenzimas, a única forma de identificação é o estudo detalhado da morfologia e morfometria de fêmeas, machos e juvenis de segundo estágio (Hunt & Handoo, 2009).

Estudos com as técnicas AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) têm se mostrado muito importantes para a caracterização da variabilidade inter e intraespecífica, e o uso dos marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) espécie-específicos têm sido úteis e algumas vezes determinantes, permitindo a diferenciação precisa e rápida de algumas espécies de *Meloidogyne*, como foi mostrado por Randig *et al.*, 2002 e Silva *et al.*, 2014, para as espécies brasileiras de *Meloidogyne*. Dessa maneira, há a necessidade de integrar metodologias adequadas para identificação dos nematoides do gênero *Meloidogyne* a nível específico e, concomitantemente, pesquisar métodos alternativos de controle, garantindo a sustentabilidade dos sistemas agrícolas.

OBJETIVOS

Esta tese teve como objetivos: caracterizar populações de espécies brasileiras de *Meloidogyne*, descritas entre 1999 e 2009, por meio de marcadores enzimáticos e moleculares, e, compará-las a populações de espécies detectadas anteriormente (capítulo 1); proceder a caracterização enzimática, molecular e filogenética de uma população de *M. brasiliensis* Charchar & Eisenback, 2002 e, sinonimizá-la a *M. ethiopica* Whitehead, 1968 (capítulo 2); proceder a caracterização morfológica, morfométrica, bioquímica e molecular de uma população atípica de *Meloidogyne* sp. proveniente do estado do Ceará e clarificar a sua identidade taxonômica (capítulo 3).

REVISÃO DE LITERATURA

Os nematoides-das-galhas são membros do gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1892, e constituem um grupo polífago de parasitas de plantas economicamente importantes. Estão

distribuídos ao redor do mundo, parasitando precocemente muitas das espécies de plantas superiores (Moens *et al.*, 2009). Estão dentre os nematoides parasitas de plantas mais destrutivos, devido à sua ampla distribuição e gama de hospedeiras e danos severos que causam às culturas de importância econômica. Mais de 2000 espécies de plantas são parasitadas por esses organismos, representando grande ameaça à produção agrícola em escala mundial (Sasser, 1980), com perdas orçadas em cerca de 90 bilhões de dólares por ano. No Brasil, esses nematoides se constituem fator limitante à produtividade agrícola de diversas culturas como café, cana-de-açúcar, soja, fruteiras e culturas olerícolas, dentre outras.

Os nematicidas em geral não apresentam um controle efetivo em relação ao custo do tratamento, considerando as vastas extensões a serem tratadas. Além disso, alguns compostos vêm sendo retirados do mercado devido à alta toxicidade à saúde humana ou porque foram detectados em níveis não aceitáveis nas águas do lençol freático (Hague & Gowen, 1986).

A caracterização das espécies de *Meloidogyne* é baseada, sobretudo, em características morfológicas de fêmeas, machos e juvenis do segundo estágio. Informações sobre a gama de hospedeiros ou especificidade parasitária são também incluídas nas descrições de várias espécies. A variação morfológica inter e intraespecífica de *Meloidogyne* spp., torna a identificação muitas vezes difícil e uma tarefa árdua, mesmo para experientes taxonomistas (Carneiro *et al.*, 2000).

Biologia e ciclo de vida de *Meloidogyne* spp.

Os nematoides-das-galhas são endoparasitas sedentários, cuja fêmea produz em média 400 a 500 ovos em matriz gelatinosa denominada massa de ovos, na maioria das vezes, externamente à raiz, podendo também ocorrer internamente no parênquima

cortical. Após o desenvolvimento embrionário, o juvenil de primeiro estágio (J1) passa pela primeira ecdise ainda dentro do ovo, dando origem ao juvenil de segundo estágio (J2), que eclode do ovo por força mecânica exercida por seu estilete, e também pela ação das quitinases produzidas nas glândulas esofagianas e liberadas através do estilete (Abad *et al.*, 2009).

Ao migrar para o solo, o J2 que é a fase infectiva, inicia a procura de raiz para se alimentar, guiado pelos exsudatos radiculares das plantas. Com auxílio das enzimas degradadoras de parede celular vegetal, o J2 penetra na ponta da raiz, migrando intercelularmente até atingir a região do parênquima vascular, onde estabelece o seu sítio de alimentação, ou seja, a formação de células gigantes multinucleadas (Taylor & Sasser, 1983), precedidas pela injeção de secreções de substâncias provenientes das glândulas esofagianas. O nematoide ingere o conteúdo citoplasmático das células gigantes, atuando como drenos metabólicos que desviam os nutrientes da planta para o proveito próprio. A injeção de secreções leva a hipertrofia e hiperplasia de células acompanhadas geralmente pelo alargamento das raízes com a formação das galhas (Moens *et al.*, 2009). Durante esse processo, o juvenil tem a sua largura aumentada e passa por novas ecdises com formação dos estádios juvenis três e quatro (J3 e J4), e finalmente, os adultos (fêmea ou macho). Quando há boas condições para o desenvolvimento do nematoide, na maioria das vezes ocorre o desenvolvimento de fêmeas. Durante esse desenvolvimento pós-embrionário, o sistema reprodutivo desenvolve-se e crescem as gônadas (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

No entanto, em condições adversas, como elevada população de nematoides na raiz ou resistência da planta hospedeira, os juvenis que originariam fêmeas, tornam-se machos, pois seu primórdio sexual se desenvolve em testículos em vez de ovários. Esse fenômeno é conhecido por reversão sexual, 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). Não há acasalamento nas espécies partenogênicas permanecendo os machos no solo até a morte (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). A duração do ciclo de vida é fortemente afetada pela temperatura, umidade e planta hospedeira. Como exemplo, *M. ethiopica* necessitou de 67, 48 e 36 dias para completar um ciclo de reprodução em temperaturas médias diárias de 18,3, 22,7 e 26,3°C, respectivamente, em um estudo realizado por Strajnar *et al.* (2011). Não houve reprodução a 13,9 °C. Em porta enxerto de videira suscetível essa mesma espécie completou o seu ciclo de vida em 27 dias a 25°C (Somavilla *et al.*, 2011).

As fêmeas de *Meloidogyne* spp., produzem ovos por três semanas, depois desse tempo, 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).

Métodos de identificação de espécies de *Meloidogyne*

A identificação de nematoides-das-galhas a nível de espécie é repleta de dificuldades. Morfologia conservada, morfometria variável, efeitos do hospedeiro, variação intraespecífica, reprodução partenogênica, existência de espécies crípticas, e o número cada vez maior de espécies descritas, cujo diagnóstico e as relações de muitas, variam de pouco ideal a duvidosa, servem para ofuscar os limites interespecíficos (Hunt & Handoo, 2009). Para complicar ainda mais, existe o problema não negligenciável do conceito de espécie para organismos predominantemente partenogênicos (Trudgill, 1991; Hunt & Handoo, 2009).

A verificação das populações mistas e/ou detecção de novas espécies, requer outras técnicas de identificação que inclui o teste de hospedeiros diferenciadores, a

morfologia (padrão perineal de fêmeas adultas, características do macho e fêmea, forma da região labial do J2, morfologia do estilete, comprimento e forma da cauda do J2), e, as metodologias bioquímicas e/ou moleculares (Hunt & Handoo, 2009). A utilização da isoenzima esterase é a única técnica que permite de forma não subjetiva a separação de espécies mistas e purificação das mesmas (Carneiro & Almeida, 2001).

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

Durante muitos anos, a forma do padrão perineal da fêmea adulta e várias características morfométricas e morfológicas do J2 foram usadas na caracterização de espécies de *Meloidogyne*. Foram acrescentadas depois, as características dos machos (muitas vezes raros), tais como a forma da região labial, incluindo a anelação, e a forma do estilete e dos bulbos basais do estilete. No entanto, com o crescente número de espécies descritas, o valor de muitos caracteres que apresentam muitas vezes grandes variações intraespecíficas, foi desgastado quase ao ponto da identificação válida tender para medidas do acaso, levando à identificação errônea da espécie. Como exemplo disso, existe o caso de *M. paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes, Santos & Almeida, 1996b, que foi incorretamente identificada como *M. incognita* através da configuração da região perineal e tratada como tal por mais de 20 anos no Brasil (Carneiro *et al.*, 1996a), e, também por muitos anos na Guatemala (Carneiro *et al.*, 2004 a).

Caracterização morfológica e morfométrica

A morfologia até o momento é a base da taxonomia e da classificação de *Meloidogyne* spp. (Eisenback & Hunt, 2009). Os caracteres morfométricos e

morfológicos tendem a variar sob a influência de condições geográficas e ecológicas que resultam em ecotipos e populações hospedeiro-específicas. Por isso, é importante que se conheça a amplitude da variabilidade de um caráter em particular sob diferentes condições. Esses ecotipos e populações hospedeiro-específicas são algumas vezes, descritas como espécies novas, embora as diferenças entre elas sejam variações intraespecíficas (Hunt & Handoo, 2009).

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

Descrição das fontes dos caracteres diagnósticos

Características das fêmeas

Configuração perineal - A fonte de caracteres mais utilizada para a identificação de espécies de *Meloidogyne* é a morfologia do padrão perineal, que está localizado na região posterior do corpo de fêmeas adultas. Esta região compreende a área da vulva e ânus (períneo), término da cauda, fasmídios, linhas laterais e estrias cuticulares circundantes. A preparação da região perineal para observação e identificação de *Meloidogyne* spp., foi descrita por Taylor *et al.* (1995), Eisenback (1985a), Franklin

(1965b), Sasser & Carter (1982), Hartman & Sasser (1985), Hirschmann (1985) e Charchar & Eisenback (2000). Um relato mais detalhado sobre o padrão perineal dos nematoides-das-galhas foi elaborado por Karssen (2002).

A configuração perineal de fêmeas adultas foi uma das principais técnicas utilizadas na identificação de *Meloidogyne* spp. (Ferraz & Monteiro, 1995). Porém, essa técnica tem sido criticada, devido à ocorrência de variações nas configurações perineais mesmo em populações oriundas de uma mesma massa de ovos (Moura, 1996). Segundo Eisenback *et al.* (1994), os padrões perineais de *M. konaensis* Eisenback *et al.*, 1994, *M. incognita* (Kofoid & White, 1919), Chitwood, 1949 e *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949 são similares, demonstrando a dificuldade de utilização dessa técnica. Mas, são úteis como métodos complementares a serem utilizados juntamente com a caracterização enzimática e/ou molecular (Carneiro *et al.*, 2004, Carneiro & Cofcewicz, 2008). Atualmente, existem mais de 40 espécies de *Meloidogyne* caracterizadas por perfis típicos e atípicos de esterase e malato desidrogenase (Blok & Powers, 2009).

Geralmente, 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, 1985b). Em várias espécies, o corpo é simétrico com pescoço e região perineal (vulva-ânus) em linha reta. Mas em algumas espécies, o pescoço pode projetar-se formando um ângulo que varia de 15-90° com relação ao eixo do corpo (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Estilete: O estomatoestilete de fêmeas de *Meloidogyne* consiste de um cone, que em várias 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).

DEGO: O orifício da glândula esofagiana dorsal está localizado posteriormente aos bulbos basais do estilete (Karszen & Moens, 2006). A distância da DEGO aos nódulos do estilete tem uma ampla variação entre as espécies (2-10 μm) e pode ser importante na identificação destas espécies (Jepson, 1987).

Poro excretor: O poro excretor está localizado anteriormente ao bulbo mediano do esôfago, mas esta posição varia muito dentro e entre as espécies, não sendo um bom parâmetro para diagnóstico (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Sistema reprodutor: As fêmeas são didélficas e as duas gônadas são longas ocupando a maior parte do interior 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 caracteres para diagnóstico de espécies (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Seis glândulas retais secretam material gelatinoso, em que os ovos não retidos no corpo são depositados (Hunt & Handoo, 2009).

Características dos machos

Os caracteres morfológicos 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 de cafeeiro da Guatemala eram na verdade *M. paranaensis*. Os machos são vermiformes, não sedentários e muito variáveis no comprimento do corpo medindo de 700 a 2000 μm . 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 têm pouco valor taxonômico, porém, a morfologia

da região anterior e do estilete são importantes caracteres morfológicos (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Região cefálica: A região cefálica dos machos inclui um disco labial 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 que são as sensilas cefálicas, e outros seis ao redor do estoma que são as 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).

Estilete: O comprimento do estilete varia de 13 a 30 μ m, mas, em muitas espécies a variação média é de 18-24 μ m. Isso representa uma característica diferencial entre as espécies. Tamanho e forma do cone do estilete, da haste e dos bulbos são importantes componentes na identificação das espécies.

DEGO: A distância entre a base do estilete e o orifício da glândula esofagiana dorsal varia de 2 a 13 μ m e às vezes pode ser uma característica importante na identificação das espécies (Hunt & Handoo, 2009).

Poro excretor: A posição do poro excretor nos machos exibe uma ampla variação intraespecífica e tem valor limitado como característica diferencial. O hemizonídeo é localizado anteriormente ao poro excretor e pode auxiliar na identificação apenas de algumas espécies nas quais o poro excretor esteja localizado posteriormente (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Sistema reprodutor: Os machos geralmente apresentam um longo testículo produzindo espermatozoides continuamente ao longo de toda vida. Os espículos são longos, variando de 20 a 40 μ m (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Linhas de campos laterais: Em muitas espécies o campo lateral tem quatro incisuras.

Região posterior: A cauda é muito pequena, abruptamente arredondada e sem bursa. Pequenos fasmídeos estão posicionados próximos à cloaca.

Características dos Juvenis de Segundo Estádio (J2s)

Os J2s, fase infectiva, 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 MEV. Em geral, a morfologia da região labial é 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. Os J2s possuem estilete delicado de tamanho variado, em média de 8 a 18 μm de comprimento (Eisenback, 1985c)

A distância da DEGO aos nódulos do estilete varia de 2 a 8 μm , assim como a posição do hemizonídeo posterior ao poro excretor, são fontes de caracteres que também auxiliam na identificação das espécies (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Os parâmetros dos J2 mais utilizados na identificação de espécies tem sido a morfometria e a morfologia da cauda, que varia de 15 a 100 μm de comprimento, o que constitui parâmetros importantes na diferenciação clara de algumas espécies (Jepson, 1987).

Raças fisiológicas

A identificação de raças fisiológicas em espécies de *Meloidogyne* é realizada pelo teste de hospedeiros diferenciadores estabelecidos na Universidade Estadual da Carolina do Norte (Hartman & Sasser, 1985) e as variações intraespecíficas que podem ser encontradas em populações de campo são frequentes.

O conhecimento das raças é de suma importância para caracterização da resistência nos 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 destas e a importância de cada uma para a agricultura local, bem como fornece populações para a avaliação de genótipos e progênies em programas de melhoramento.

Para algumas espécies de *Meloidogyne*, as raças são diferenciadas através de reações positivas e negativas, verificadas em diferentes espécies de plantas, como 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') (Hartman & Sasser, 1985). Nunca foi possível diferenciar raças de *Meloidogyne* por outros métodos, a não ser através de reações diferenciadoras em plantas (Moura, 1996).

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 de plantas hospedeiras. Nesse caso, as hospedeiras são cultivares de uma mesma 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 diferenças na preferência alimentar, porém, quando essas diferenças ocorrem dentro de uma mesma espécie, essas passam a ser denominadas de raças fisiológicas (Lordello, 1992; Freitas *et al.*, 2006). As raças de uma mesma espécie de *Meloidogyne* não podem ser diferenciadas morfológica ou geneticamente (Freitas *et al.*, 2006).

Raças fisiológicas já foram relatadas em importantes espécies como *M. javanica* (Rammah & Hirschmann, 1990a e 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 hospedeiras, sendo que, todas infectam várias hortaliças em comum, incluindo tomate, muitas vezes considerado hospedeiro universal de *Meloidogyne* spp. (Santos, 2008). Destas quatro espécies, apenas algumas populações (raças 3 e 4) de *M. incognita* parasitam algodão. *Meloidogyne hapla* se reproduz pouco ou quase nada em gramíneas e plantas produtoras de grãos. O 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. Na literatura, já foram relatadas quatro raças de *M. javanica*, sendo que a raça 1 parasita o fumo, a melancia e tomate; a raça 2, parasita além dessas plantas, o pimentão; a raça 3 parasita as mesmas plantas que a raça 1, além do amendoim (Rammah & Hirschmann, 1990a), e por fim a raça 4, infecta fumo, melancia, tomate, pimentão e amendoim, sendo o algodão, imune (Carneiro *et al.*, 2003).

Já *M. arenaria* possui duas raças diferenciadas pela reação de hospedeiros, raça 1 que infecta o amendoim e raça 2 que não infecta o amendoim (Jepson, 1987).

Carneiro & Almeida (2000) e Muniz *et al.* (2008) propuseram a separação de ‘raças fisiológicas’ de *M. exigua* Goldi, 1887 com base na capacidade de reprodução de diversas populações em plantas de quatro espécies botânicas. A raça 1 infecta o pimentão e o cafeeiro, mas não infecta o tomateiro; a raça 2 infecta o tomateiro, o pimentão e o cafeeiro; e, a raça 3 não infecta o tomateiro, pimentão, nem o cafeeiro, mas infecta a seringueira.

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

O teste de hospedeiros diferenciadores proposto pela Universidade Estadual da Carolina do Norte não separa claramente a maioria das espécies descritas nas últimas décadas. Embora o reconhecimento da variação na gama de hospedeiros seja importante, Moens *et al.* (2009) sugere que o reconhecimento formal das raças fisiológicas baseadas em reações positivas e/ou em determinadas hospedeiras (muitas vezes referida simplesmente como raça) seja interrompido. De acordo com o autor, desde a década de 1970 tem sido reconhecida a variação na preferência de hospedeiros dentro das quatro principais espécies (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla*), principalmente entre populações de *M. javanica*, que hoje é reconhecida como variável no que diz respeito à reprodução em pimentão e amendoim, sendo esse fato, um diferencial importante para o teste de hospedeiras diferenciadoras. Isto compromete a teoria do uso do teste de hospedeiras diferenciadoras como auxiliar na identificação de espécies. Esse problema é agravado ainda mais com o aumento substancial do número de novas espécies descritas desde os anos 1970, muitas delas provenientes de populações misturadas com uma ou mais de uma das quatro espécies principais, e algumas se reproduzem bem nas

mesmas culturas de importância econômica, que são hospedeiras de uma ou mais de uma das quatro espécies mais importantes. O conceito de raça nunca foi universalmente aceito, em parte porque mede apenas uma pequena parcela da variação em potencial capacidade parasitária. Dado o grande número de hospedeiras de muitas espécies, é improvável que toda a extensão da variação nunca seja adequadamente caracterizada (Moens *et al.*, 2009).

Identificação bioquímica e molecular

O uso de marcadores isoenzimáticos, como os perfis de esterase e marcadores moleculares baseados no DNA, já permitiram a identificação correta de várias espécies de *Meloidogyne* e comprovaram que essas técnicas são confiáveis (Blok e Powers, 2009).

Apesar de ainda serem restritas a poucas espécies, as técnicas que envolvem ferramentas moleculares são excelentes métodos de diagnóstico para *Meloidogyne* spp., com a vantagem de serem independentes da variação fenotípica das esterases, que as vezes envolvem interpretação mais complexa. Os marcadores moleculares permitem a identificação simples, precisa e rápida (Blok & Powers, 2009), embora não permitam a detecção de espécies novas ou crípticas, que são relativamente frequentes no gênero *Meloidogyne*, e são facilmente caracterizados pelas esterases.

Nas últimas décadas, vários estudos bioquímicos com proteínas solúveis já foram realizados, e mostraram que várias espécies de nematoides-das-galhas podem ser diferenciadas pelos fenótipos enzimáticos obtidos através de eletroforese em gel de poliacrilamida (Janati *et al.*, 1982; Esbenshade & Trientaphyllou, 1985; Fargette, 1987; Pais & Abrantes, 1989; Carneiro *et al.*, 1996; Carneiro & Almeida, 2001). As primeiras pesquisas com o uso de isoenzimas na sistemática de *Meloidogyne* spp., foram desenvolvidas por Dickson *et al.* (1971), seguido por Hussey *et al.* (1972). Naquela época, foram identificadas cerca de 30 enzimas em várias espécies de *Meloidogyne*. No entanto,

apenas as enzimas esterase, malato desidrogenase, superóxido dismutase e glutamato oxaloacetato transaminase despertaram interesse do ponto de vista taxonômico. Tempos depois, Dalmasso & Berge (1978) identificaram *Meloidogyne* spp. a partir da extração de proteínas de fêmeas individuais e separação das mesmas através de eletroforese em gel ultrafino.

A técnica de eletroforese de isoenzimas, consiste na avaliação da mobilidade relativa (R_m) das bandas polimórficas das isoenzimas. A mobilidade das enzimas em gel de poliacrilamida 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, incluem o reconhecimento de *Meloidogyne* spp., mesmo em população mista, caracterização de populações atípicas, eficiência, confiabilidade e rapidez (Carneiro *et al.*, 2000; Blok & Powers, 2009).

Dentre as isoenzimas estudadas, as esterases (EST) são as mais utilizadas na identificação de espécies de nematoides-das-galhas, 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 utilizadas como auxiliares na caracterização de espécies previamente identificadas (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985).

Um dos trabalhos mais relevantes com o 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 que as esterases são as enzimas mais precisas na identificação das espécies de *Meloidogyne*, e as malato-

desidrogenases são utilizadas como critério auxiliar na diferenciação de espécies cujas esterases são idênticas, como é o caso de *M. 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 com 90 populações brasileiras de *Meloidogyne* spp. Neste estudo, 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*, *M. coffeicola* Lordello & Zamith, 1960, *M. paranaensis*, *M. konaensis*, *M. exigua* e *M. enterolobii* Yang & Eisenback, 1983.

Em outro estudo realizado por Carneiro *et al.* (2004) com populações de *Meloidogyne* spp., provenientes de cafezais de diferentes regiões do Brasil, América Central e Havaí, 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 *M. izalcoensis* Carneiro, Almeida, Gomes & Hernadez, 2005 (Carneiro *et al.*, 2005).

Até o presente, não existem padrões enzimáticos para todas as espécies do gênero *Meloidogyne* descritas, e infelizmente, esses marcadores 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 extensivas mudanças evolutivas (McLain *et al.*, 1987).

Além da caracterização bioquímica, estudos baseados em análise de DNA intensificaram 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 técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) fez progredir consideravelmente 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 estudos genéticos e filogenéticos 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). Uma abordagem mais recente é a conversão dos marcadores 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 guanina e citosina (GC), e, de sequência específica. É uma ferramenta

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 sua utilização como pontos de referência física no genoma, servindo para o mapeamento, ou como marcadores genéticos espécie-específicos, quando estão associados a algum genótipo/fenótipo de interesse (Mienie *et al.*, 2002; Noir *et al.*, 2003).

Marcadores SCAR já foram desenvolvidos para separar *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, presentes principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Zijlstra, 2000; Meng *et al.*, 2004), *M. hapla* (Zijlstra *et al.*, 2000), e espécies quarentenárias como *M. chitwoodi* e *M. fallax* (Karssen, 1996). Foram também desenvolvidos para as três principais espécies de *Meloidogyne* parasitas de cafeeiro no Brasil: *M. incognita*, *M. exigua* e *M. paranaensis* (Randig *et al.*, 2002) e, recentemente, incluídos nesse kit SCAR-café, *M. arabicida* e *M. izalcoensis* (Correa *et al.*, 2013), espécies ocorrentes em cafeeiros na Américas. Foram também desenvolvidos marcadores SCAR para *M. enterolobii*, o nematoide-das-galhas da goiabeira (Tigano *et al.*, 2010), e mais recentemente para *M. ethiopica* (Correa *et al.*, 2014).

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 da banda obtida (Randig *et al.*, 2002). Entretanto, até o presente, poucas espécies podem ser identificadas por marcadores SCAR (Blok & Powers, 2009).

Diversidade genética em *Meloidogyne* spp.

O desenvolvimento de técnicas moleculares abriu novas perspectivas para os estudos de variabilidade intraespecífica dos nematoides do gênero *Meloidogyne*. A utilização da técnica de PCR, tem trazido avanços significativos na implementação de novos marcadores moleculares. Foi com o desenvolvimento de técnicas de amplificação de DNA utilizando *primers* iniciadores pequenos e de sequências aleatórias, que o uso da PCR foi difundido no mundo, permitindo a análise genética de diversas espécies à custos relativamente baixos e de forma mais simplificada (Hadrys *et al.*, 1992). Vários estudos foram realizados a partir da análise de marcadores do tipo RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism), RAPD e ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) com resultados interessantes para a genética das populações (Curran *et al.*, 1986; Castagnone-Sereno *et al.*, 1991; Lax *et al.*, 2007).

A técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é baseada em 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* de sequências aleatórias (Cenis, 1993; Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997; Randig *et al.*, 2002). Além de utilizar pequenas quantidades de material genético, a técnica 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. Portanto, esses marcadores comportam-se como dominantes e os dados têm natureza binária (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O polimorfismo dos marcadores RAPD é revelado pela amplificação de locos de cromossomos utilizando-se *primers* compostos de sequências curtas. Na reação de amplificação, estes *primers* quando submetidos a condições apropriadas de temperatura, se hibridizam com sequências genômicas que lhes são complementares. Para que ocorra

a amplificação, há necessidade da existência no genoma, de dois sítios complementares ao *primer*, localizados em direções opostas e distantes entre si, no máximo, 3000 pb. Como a sequência de cada iniciador é determinada de modo aleatório, este pode encontrar várias regiões complementares à sua sequência e, por isso, revelar vários locos. Os fragmentos amplificados, por sua vez, são separados em um gel de agarose, e visualizados após coloração com brometo de etídeo sob luz ultravioleta.

O polimorfismo detectado por marcadores RAPD é gerado por mutações ou por rearranjos (inserções ou deleções) entre os dois sítios, ou no próprio sítio de hibridização dos dois *primers*. Diferenças em apenas um par de bases (mutações de ponto) podem ser suficientes para inibir a amplificação. Em diferentes espécies, dados experimentais evidenciam que locos RAPD estão dispersos no genoma. As sequências internas dos segmentos amplificados abrangem desde cópia única até altamente repetitivas (Williams *et al.*, 1993).

A baixa reprodutibilidade dos marcadores RAPD é uma questão bastante discutida. Na verdade, a técnica requer certa experiência com procedimentos moleculares, cuidado com o preparo das reações, e rigor na leitura e análise dos fragmentos visualizados no gel. A quantidade e qualidade do DNA, a concentração de íons magnésio e da enzima Taq polimerase são alguns dos aspectos que devem ser considerados nos ensaios de RAPD. Deve-se dar preferência a protocolos de extração de DNA que sejam simples e rápidos, como os que usam tampão CTAB ou SDS. Porém, é importante que o DNA não esteja contaminado pela presença de proteínas e outros compostos que podem diminuir ou até inibir a atividade da Taq polimerase. A quantidade de íons magnésio influencia diretamente na reprodutibilidade dos experimentos de RAPD, pois interfere na ação da Taq polimerase, e conseqüentemente, na intensidade das bandas visualizadas no gel.

A técnica de PCR-AFLP é baseada na amplificação, via PCR, de um subconjunto de fragmentos gerados a partir da digestão do DNA genômico com combinações de enzimas de restrição tipo II, que clivam o DNA em sítios específicos, de corte raro (reconhecem sítios de 6-8 bases, ex. ApaI, EcoRI, HindIII e PstI) e de corte frequente (reconhecem sítios de 4 bases, ex. MseI e TaqI). É fundamental que a digestão do DNA seja completa, pois a digestão parcial pode revelar falsos polimorfismos. Para obtenção da digestão total é necessário usar DNA de alta pureza. Portanto, é preciso prestar atenção no método de extração e quantificação usado. A técnica baseia-se na propriedade de certas enzimas de restrição de deixar, após a clivagem do DNA, extremidades coesivas de sequência conhecida. Assim, é possível construir sequências de nucleotídeos de fita dupla que se ligam às extremidades dos fragmentos de restrição, denominadas adaptadores. Uma vez que a sequência dos adaptadores e a do sítio de restrição são conhecidas, pode-se construir iniciadores específicos a essas sequências para pré-amplificação dos fragmentos de restrição.

Os marcadores moleculares servem para estudos da genética de populações, mapeamento e análises de similaridade e distância genética. As espécies partenogenéticas 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 partenogenética 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).

O primeiro estudo sobre diversidade de populações brasileiras de *Meloidogyne* spp., foi realizado por Randig *et al.* (2002) quando estudou, através de PCR-RAPD, 18

populações de *Meloidogyne* spp., provenientes de diferentes regiões do Brasil. Nesse estudo, observou-se que as espécies de *Meloidogyne* se diferenciaram em grupos, de acordo com os perfis enzimáticos descritos para cada espécie. Esse estudo mostrou ainda um alto grau de variabilidade intraespecífica em populações de *M. exigua*, *M. hapla* e *M. arenaria*, que apresentaram: 67,5%, 67,5% e 69,8% de fragmentos polimórficos, respectivamente. Diferentemente, populações de *M. incognita* e *M. javanica* apresentaram baixa variabilidade intraespecífica, 30% e 19% respectivamente.

Carneiro *et al.* (2004) avaliaram 18 populações de *Meloidogyne* spp. do cafeeiro provenientes do Brasil, América Central e Haváí. Utilizando-se de marcadores RAPD, os autores detectaram baixos níveis de polimorfismo intraespecífico 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 intraespecífico elevado (24,6 – 57,8 %) para essa espécie. Mas, todas as populações agruparam-se com 100% de bootstrap apesar da grande variabilidade intraespecífica encontrada. Diferentemente de *M. exigua*, a grande variabilidade encontrada em populações de *M. arenaria* revelou a presença de uma espécie distinta dentro do “complexo *M. arenaria*”, o caso de *M. morocciensis* Rammah & Hirschmann, 1990b, anteriormente identificada como *M. arenaria* (EST A3) (Carneiro *et al.*, 2008a, b).

Meloidogyne arenaria

M. arenaria é considerada uma das principais espécies devido à importância econômica ao redor do mundo. É comumente encontrada em regiões quentes, e raramente

encontrada em regiões frias (Carneiro *et al.*, 2008a). É a espécie com maior variação morfológica, isoenzimática, citológica e molecular, dentro do gênero *Meloidogyne* (Eisenback & Triantaphyllou, 1991), e se reproduz por partenogênese mitótica obrigatória (Triantaphyllou, 1985).

Duas raças quanto às hospedeiras são reconhecidas: a raça 1 que infecta o amendoim (*Arachis hypogea* L.) e a raça 2 que não infecta amendoim (Hartman & Sasser, 1985). Bioquimicamente, populações de *M. arenaria* são mais variáveis do que as de outras espécies também muito comuns como *M. javanica*, *M. incognita* e *M. hapla*. Três fenótipos de atividade de esterase são mais comuns (A1, A2 e A3). O fenótipo da atividade da enzima malato desidrogenase, varia de N1 a N3 de acordo com a população (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Carneiro *et al.*, 2000; Cofcewicz *et al.*, 2004, 2005).

Em análises baseadas em PCR-RAPD, isolados de *M. arenaria* mostraram uma variabilidade intraespecífica muito alta e esse resultado é congruente com os fenótipos de isoenzimas. O fenótipo A2N1 se agrupou com A1N1 com 100% de bootstrap, e se separou dos isolados com fenótipo A2N3 (Cofcewicz *et al.*, 2005) e A3N1 (Cofcewicz *et al.*, 2004). Esses resultados são condizentes com as análises moleculares anteriores (Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Semblat *et al.*, 1998; Randig *et al.*, 2002).

No passado, marcadores RAPD foram transformados em SCAR, e o primer específico (A12-F/R) foi desenvolvido para *M. arenaria* usando apenas quatro isolados desta espécie (Zijstra *et al.*, 2000). Esses primers foram usados para separar *M. arenaria* de outras espécies do gênero *Meloidogyne* em uma chave de diagnóstico molecular proposta por Adam *et al.* (2007).

Meloidogyne morocciensis

M. morocciensis foi identificada de espécimes que parasitavam porta-enxertos de pessegueiro (*Prunus persica* cv. Missouri) em Marrocos, e já havia sido provisoriamente identificada como *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949 com base nos padrões perineais. A espécie exibe uma combinação de caracteres morfológicos similar a *M. arenaria*, *M. incognita* e *M. javanica*. Bioquimicamente, *M. morocciensis* compartilha o mesmo fenótipo de esterase A3 (Rm: 1,1, 1,2, 1,3) com *M. arenaria* (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985). No entanto, a resposta do teste de hospedeiras diferenciadoras foi similar a *M. incognita* raça 2, infectiva ao fumo, pimentão, melancia e tomate, e não infectiva ao algodão e amendoim (Hartman & Sasser, 1985). Estudo detalhado de microscopia eletrônica e de luz mostrou que cada estágio de vida possuía aspectos morfológicos característicos, e diferentes de *M. arenaria*, *M. incognita*, ou, qualquer outra espécie descrita anteriormente. Devido a essas diferenças morfológicas e biológicas, os espécimes foram descritos como nova espécie, e recebeu o nome de *Meloidogyne morocciensis*.

Mais recentemente, Carneiro *et al.* (2008a), utilizando diferentes técnicas, estudaram treze isolados de *M. arenaria* provenientes de diversos países contendo dois tipos citológicos ($3n=51-56$ e $2n=42-48$) e quatro fenótipos enzimáticos (Esterase e Malato Desidrogenase: 2 isolados A3N1, sete isolados A2N1, 1 isolado A1N1 e 3 isolados A2N3). As análises dos marcadores moleculares mostraram um alto nível de polimorfismo entre os isolados. De acordo com os caracteres morfológicos e morfométricos, foi possível concluir que o isolado com o fenótipo enzimático A2N3 raça 1 era *M. arenaria* descrita em 1949 por Chitwood, e apareceu claramente separado na árvore filogenética. Os isolados com fenótipos enzimáticos A2N1 provenientes de diferentes localidades, e o isolado A1N1 foram considerados morfométricamente típicos

de *M. arenaria* raça 2, e estes, aparentemente se agruparam por regiões geográficas, e diferiram morfológicamente dos A2N3 raça 1. Os dois isolados de *M. arenaria* com fenótipos enzimáticos A3N1 apareceram intimamente relacionados com o isolado do *M. morocciensis* também usado neste estudo, e considerando todos os caracteres descritos para essa espécie, os isolados A3N1 foram então considerados *M. morocciensis*.

Meloidogyne incognita

M. incognita é considerada uma das espécies mais importante de nematoides-das-galhas devido à ampla distribuição no mundo e importância econômica. Essa espécie é comumente encontrada em regiões quentes e restrita a casas de vegetação em regiões de clima temperado (Karssen & Moens, 2006). De acordo com os hospedeiros diferenciadores da Carolina do Norte existem quatro raças fisiológicas de *M. incognita*. Populações das quatro raças se reproduzem em plantas de pimentão, melancia e tomateiro, mas variam na resposta ao fumo e algodão. Embora, seja considerada uma espécie pouco variável do ponto de molecular, existem três fenótipos variantes isoenzimáticos no Brasil (I1N1, I2N1, S2N1) e alguns variantes morfológicos (Santos *et al.*, 2012). Estudos morfológicos detalhados de várias isolados das quatro raças fisiológicas demonstraram que as populações de *M. incognita* foram suficientemente similares para serem consideradas uma única unidade taxonômica (Eisenback & Triantaphyllou, 1991 e Santos *et al.*, 2012). Dois fenótipos de esterase denominados I1 (Rm: 1.0) e I2 (Rm: 1.05, 1,1) são os mais frequentes e somente um fenotipo de malato-desidrogenase N1 foi caracterizado em todas as populações estudadas (Carneiro *et al.*, 2000, Castro *et al.*, 2003; Carneiro *et al.*, 2004; Cofcewicz *et al.*, 2004, 2005, Santos *et al.*, 2012). Em trabalhos mais recentes um terceiro fenotipo menos frequente (S2N1) foi observado em algumas culturas: café, banana, soja e figo (Santos *et al.*, 2012).

Citologicamente, praticamente todas as populações estudadas apresentaram $2n= 42-48$ cromossomos, entretanto algumas populações apresentaram 32-38 cromossomos (Triantaphyllou, 1985a) e foram caracterizadas como *M. hispanica* (Santos *et al.*, 2012). Neste estudo todos os isolados foram amplificados com os três marcadores SCAR desenvolvidos para *M. incognita*. Os pares de *primers* B06F/R (Ziljstra *et al.*, 2000), incK14F/R (Randig *et al.*, 2002) and incK14F/R (Meng *et al.*, 2004) amplificaram três fragmentos espécie-específicos de 1,200 pb, 399 pb e 955 pb, respectivamente. Os marcadores SCAR juntamente com as isoenzimas são ferramentas extremamente interessantes para diagnosticar a espécie *M. incognita*. Embora os padrões da região perineal sejam bem característicos, algumas outras espécies apresentam padrões perineais semelhantes.

Meloidogyne ethiopica

M. ethiopica foi descrita de uma única massa de ovos inoculada em tomateiro (hospedeira tipo) da região de Mlalo, Distrito de Lushoto, Província de Tanga, Tanzania (localidade tipo) (Whitehead, 1968). O mesmo autor estudou também espécimes dessa mesma espécie, por meio de uma única massa de ovos inoculada em tomateiro proveniente do Zimbábue e África do Sul; ambas populações já haviam sido identificadas anteriormente como *M. arenaria*. Na descrição original, os padrões perineais de *M. ethiopica* foram caracterizados como variantes de *M. arenaria* e *M. incognita*, mesmo com espécimes provenientes de uma mesma massa de ovos (Whitehead, 1968). Este fato evidenciou a limitação do uso dos padrões perineais na identificação de espécies de *Meloidogyne* spp. A natureza dos padrões perineais de *M. ethiopica* fez com que a sua identificação precisa fosse muito difícil ou mesmo impossível, especialmente na ausência de outras características que distinguíssem as fêmeas (Golden, 1992).

No continente Africano, foram relatadas mais de 10 espécies de plantas hospedeiras de *M. ethiopica*. Depois da descrição original, a espécie foi coletada e relatada na cultura de feijão (*Vicia faba* L.) na acácia-negra (*Acacia mearnsii* L.), pimenta, repolho (*Capsicum frutescens* L.), batata, abóbora e fumo, na região de Mlalo, Tanzania (Whitehead, 1969). Alguns anos depois, O' Bannon (1975) encontrou *M. ethiopica* em duas localidades da Etiópia. Em Awasa Road, uma das localidades, os espécimes foram coletados de alface, soja, sisal e três espécies de plantas daninhas (*Ageratum conyzoides* L., *Datura stramonium* L. e *Solanum nigrum* L.). Já no estado de Tendaho-Dubte, a outra localidade, pouquíssimos espécimes foram recuperados de amostras de algodão. Mais de uma década depois, Jepson (1987) elaborou uma discussão sobre essa espécie, mas não acrescentou mais informações sobre a morfologia e morfometria, sua distribuição e suas hospedeiras. Mais recentemente no Brasil, Carneiro *et al.* (2003) relataram a primeira detecção da espécie que parasitava e causava grandes perdas em plantas de quivi (*Actinidia deliciosa* (Chevalier) Liang & Ferfuson) nos pomares dos municípios de Lagoa Vermelha, Encruzilhada do Sul e Via Lângaro, no estado do Rio Grande do Sul. Um ano depois, foi relatada a primeira detecção no Chile parasitando videiras (*Vitis vinífera* L.) (Carneiro *et al.*, 2004). Com essa detecção, Carneiro *et al.* (2004) redescobriram *M. ethiopica* Whitehead, 1968, comparando as populações do Brasil com as do Chile e do Quênia. Os principais caracteres qualitativos e quantitativos variaram ligeiramente entre as três populações estudadas, mas características que as distinguissem entre si não foram observadas (Carneiro *et al.*, 2004).

Sabe-se que em 1989, plantas de Quivi do Chile (Curicó) foram introduzidas no município de Lagoa Vermelha, região da Serra Gaúcha, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Dez anos mais tarde, o fraco desenvolvimento das plantas foi associado a altas populações de nematoides-das-galhas. Estas populações foram submetidas a análises

bioquímicas e expressaram um perfil de esterase denominado KI3, que nunca tinha sido encontrado em outras populações de nematoide-das-galhas no Brasil (Carneiro *et al.*, 1996, 2000). Para confirmar a hipótese de que o nematoide tinha sido introduzido do Chile (Comunicação pessoal de J.C. Magunacelaya), amostras contendo raízes de videira infectadas por *Meloidogyne* sp., coletados em Casa Blanca, Chile, foram analisadas utilizando o método bioquímico. Observou-se o mesmo perfil de esterase KI3, provando que o nematoide era da mesma espécie que parasitava plantas de quivi no Brasil. No Chile, o mesmo fenótipo de esterase foi detectado também em quivi, durante uma pesquisa realizada no Vale Central, embora esta população tenha sido caracterizada incorretamente como *M. javanica* (Treub, 1985) Chitwood, 1949) (Philippe *et al.*, 1996). Suspeita-se que a introdução de mudas de videiras contaminados no Chile tenha resultado em graves infestações em vários vinhedos no Brasil.

Com base em diferenças morfológicas, biológicas e moleculares com outras espécies de *Meloidogyne*, e com base em uma comparação com o material tipo da descrição original e uma população de *M. ethiopica* do Quênia, estes nematoides isolados no Brasil e no Chile foram identificados, caracterizados e ilustrados como *M. ethiopica* (Carneiro *et al.*, 2004). Levantamentos realizados no Brasil mostraram que *M. ethiopica* é uma espécie difundida em plantas de quivi no Rio Grande do Sul (Somavilla *et al.*, 2011), em soja (Castro *et al.*, 2003), hortaliças (Carneiro *et al.*, 2008b) e em bulbos infestados de *Polymnia sonchifolia* L. (Yacón ou maçã peruana) no Distrito Federal (Carneiro & Almeida, 2005). Apesar de *M. ethiopica* ocorrer frequentemente em vinhedos do Chile, ainda não foi encontrada em videiras no Brasil (Somavilla *et al.*, 2011). No Chile, o nematoide é considerado invasivo e ocorre em uma faixa de cerca de 1000 km. Foi detectado desde o vale de Copiapó, situado a cerca de 800 km ao norte de Santiago, até Talva, município localizado a 250 km ao sul de Santiago. É comumente

encontrado em videiras, quivis e batatas em 80 % das amostras coletadas. A proibição da produção de mudas em áreas com nematoides-das-galhas e da livre circulação de mudas infestadas para novas áreas de plantio, parecem não serem eficazes no Chile, considerando que muitas plantas de viveiro em todo o país estão severamente infectadas com *M. ethiopica* (Carneiro *et al.*, 2007).

O primeiro relato de *M. ethiopica* na Europa se deu na Eslovênia, quando o nematoide foi encontrado em estufa de tomateiros (Sirca *et al.*, 2004). Foi adicionada à lista de alerta da EPPO como praga quarentenária em 2011 (MPE, 2011). Recentemente, esta espécie foi detectada em aspargos (*Asparagus officinalis* L.) no Peru (Murga-Gutierrez *et al.*, 2012).

Meloidogyne ethiopica é uma espécie polífaga e muitas de suas hospedeiras são culturas de importância econômica como olerícolas, fruteiras e ornamentais. A detecção desta espécie no Brasil, Chile e Eslovênia, demonstra que ela tem potencial para se estabelecer em diferentes regiões. Estudos recentes mostraram que apesar de sua origem tropical, *M. ethiopica* é capaz de sobreviver em condições de campo, em locais de clima continental de verões quentes e invernos frios como ocorre em várias regiões do Chile, mesmo em áreas onde as temperaturas do solo caem em níveis abaixo de zero durante o inverno, bem como em sub-clima mediterrâneo (Strajnar *et al.*, 2009, 2011). Trata-se de um novo patógeno na América do Sul e na Europa (Carneiro *et al.*, 2003; Sirca *et al.*, 2004). No Brasil, *M. ethiopica* ocorre em áreas tropicais (DF, MG e SP) e subtropicais (RS, SC e PR).

O fenótipo de esterase específico de *M. ethiopica* (E3) com três bandas (Rm: 0,9, 1,05, 1,20) foram observadas nos três isolados do Brasil, Chile e Quênia, assim como um fenótipo malato desidrogenase (N1) com uma banda (Rm: 1,0), que é partilhada com

várias espécies de *Meloidogyne* (Carneiro *et al.*, 2000). A espécie se reproduz por partenogênese mitótica e possui de 36 a 38 cromossomos (Carneiro *et al.*, 2004).

Carneiro *et al.* (2003) quando detectaram *M. ethiopica* no Brasil e no Chile, estudaram populações da espécie dos dois países e também populações do Quênia, com base em marcadores moleculares. Os resultados mostraram que essas populações apresentam alta similaridade genética se agrupando entre si com cerca de 82 % de bootstrap (Carneiro *et al.*, 2004). Outra evidência da baixa diversidade genética entre as populações de *M. ethiopica* foi mostrada por Correa *et al.* (2014), que trabalhando com 15 populações, incluindo uma do Brasil e uma do Chile, obtiveram um polimorfismo de 22,5% em análise de marcadores RAPD e AFLP. Dos resultados dessas análises, um marcador SCAR espécie específico foi obtido para identificação da espécie.

Meloidogyne brasiliensis

Meloidogyne brasiliensis foi descrita e ilustrada de espécimes que parasitavam raízes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Rossol, em Londrina (PR) e ervilha (*Pisum sativum* L.) cv. Mikado em Brasília (DF). A população de Londrina (Localidade tipo) foi coletada na propriedade da Fazenda João Alves em plantas de tomate cv. Rossol que é considerada resistente a *M. incognita* e *M. javanica* (Sasser & Kirby, 1979). A população de Brasília foi coletada de plantas de ervilha cv. Mikado cultivada em solo naturalmente infestado no Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças (Embrapa Hortaliças), localizado a cerca de 1500 km da localidade tipo. Essa descrição foi publicada sem detalhes de análise bioquímica e molecular. Em teste de hospedeiras, a espécie não reproduziu em pimentão, melancia, algodão, soja e milho (Charchar & Eisenback, 2002). Não existe na literatura estudos de variabilidade genética envolvendo a espécie.

***Meloidogyne konaensis* Eisenback, Bernard & Schmitt, 1994**

Meloidogyne konaensis foi descrita de populações isoladas de solos cultivados com café (*Coffea arabica* L.) na ilha do Kona, Havaí, EUA e multiplicados em plantas de tomate para a identificação da espécie. É tida como uma espécie parasita do cafeeiro, e segundo os autores da descrição original, os padrões perineais de *M. konaensis* varia entre as características dos padrões de espécies já conhecidas como *M. arenaria* e *M. incognita*. No entanto, o perfil de bandas de esterase foi semelhante a uma banda de rápida mobilidade encontrada em outras populações de *Meloidogyne* do Brasil, Peru e Suriname, descrita posteriormente como *M. paranaensis* em plantas de café no Brasil (Carneiro *et al.*, 1996a, 1996b).

Estudos realizados no Havaí têm relatado que *M. konaensis* apresenta três diferentes fenótipos de esterase Est F1 (=Est P1), Est II (= *M. incognita*) e Est F1II dependendo da hospedeira (Sipes *et al.*, 2005). De acordo com esses autores, apenas o isolado que apresenta o fenótipo Est F1 (= Est P1 de *M. paranaensis*) parasita café. Nessa publicação, as comparações da morfologia entre os isolados dos três diferentes fenótipos Est F1, Est II e Est F1II (todas consideradas *M. konaensis*) são superficiais e a principal característica indicada na descrição original como sendo a determinante para classificação da espécie, que é a ocorrência de 6 a 12 grandes protuberâncias em volta da haste do estilete de *M. konaensis*, não foi visível em MEV.

Em estudo de filogenia realizado com essas populações de *M. konaensis* do Havaí (Est P1), a espécie apresentou alto índice de homogeneidade com *M. paranaensis*, se agrupando com *M. paranaensis* do Brasil com 100% de bootstrap (Carneiro *et al.*, 2004).

***Meloidogyne petuniae* Charchar, Eisenback & Hirschmann, 1999**

Essa espécie foi descrita e ilustrada a partir de espécimes coletados em petúnia (*Petunia hybrida* L.), em Brasília, Brasil (Charchar *et al.* 1999). O padrão perineal da fêmea é bastante variável, não existindo um padrão que a caracterize. O fenótipo esterase Est Pe 2 (Rm:0,95, 1,1) com duas bandas de esterase fortes (Charchar *et al.* 2009) é espécie-específico e a única forma prática de identificar essa espécie. Petúnia, tomate, tabaco, ervilha e feijão foram consideradas boas hospedeiras, enquanto pimentão, melancia e milho doce: hospedeiras pouco favoráveis; amendoim, algodão e soja reagiram como não hospedeiras (Charchar *et al.* 1999). Embora descrita há vários anos, essa espécie não tem sido encontrada em levantamentos recentes realizados no DF (Carneiro *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2014), devido provavelmente à ocorrência restrita. Não há marcadores SCAR desenvolvidos para *M. petuniae*.

Meloidogyne phaseoli

Essa espécie foi descrita e ilustrada a partir de amostras coletadas em feijão cv. Carioca, em Brasília, Brasil (Charchar *et al.*, 2008b). O padrão perineal da fêmea é bastante variável, não sendo um bom critério para identificar a espécie. O fenótipo da isoenzima esterase foi caracterizado como A3 (Rm: 1,1, 1,2, 1,3, Fig. 1) (Charchar *et al.*, 2009), idêntico a *M. morocciensis* (Carneiro *et al.*, 2008). Análises com primers SCAR confirmaram os resultados das isoenzimas: *M. phaseoli* (população tipo) e *M. morocciensis*, apresentaram ambas um único fragmento de 420 pb (Carneiro *et al.*, 2008; Mattos *et al.* 2014,). Dessa maneira, tanto o perfil da esterase, como o marcador SCAR confirmam a coincidência entre as duas espécies. Estudos adicionais comparativos, incluindo morfologia, morfometria, sequenciamento e filogenia de diferentes regiões do genoma são necessárias para esclarecer a entidade taxonômica dessa espécie. Tomate,

tabaco, feijão e ervilha foram considerados bons hospedeiros, enquanto o milho foi um hospedeiro pouco favorável; pimenta, melancia, amendoim, algodão e soja não foram considerados hospedeiros dessa espécie (Charchar *et al.*, 2008b).

Meloidogyne polycephannulata

A espécie foi descrita a partir de amostras coletadas de uma área cultivada com cenoura cv. Brasília na região do Alto Paranaíba, Minas Gerais. O padrão perineal da fêmea é similar a algumas populações de *M. incognita*, com campo lateral apresentando um sulco profundo que separa a região dorsal da ventral (Charchar *et al.* 2009). Quanto ao fenótipo de enzimas, as bandas de esterases de *M. polycephannulata* coincidem com o perfil mais frequente de *M. incognita* no Brasil: Est I2 (Rm: 1.05, 1,1) e MDH N1. Em estudo sobre a diversidade de isolados de *M. incognita* (Santos *et al.*, 2012) várias características morfológicas descritas para essa espécie aparecem na descrição de *M. polycephannulata*, como a região anterior dos machos, estilete das fêmeas, entre outras. Estudos adicionais comparativos, incluindo morfologia, morfometria, sequenciamento e filogenia de diferentes regiões do genoma são necessárias para esclarecer a entidade taxonômica dessa espécie. Quanto ao estudo dos hospedeiros diferenciadores *M. polycephannulata* só se reproduziu em plantas de cenoura e tomate (Charchar *et al.*, 2009).

Meloidogyne pisi

Essa espécie foi descrita e ilustrada a partir de amostras obtidas de raízes de ervilha cv. Mikado, em Brasília. O padrão perineal das fêmeas é bastante variável e difícil de ser usado na diagnose (Charchar *et al.*, 2009). Muitas galhas e massas de ovos foram formadas nas culturas de tomate, tabaco e variedades de ervilha e de feijão. Poucas galhas

e baixa reprodução ocorreram em melancia e nenhuma reprodução ocorreu em amendoim, algodão e soja (Charchar *et al.*, 2008a). O perfil de enzima Pi5 com quatro bandas mais fortes (Rm: 0,85, 0,90, 1,25, 1,30) e uma mais fraca (Rm; 1,00) nunca havia sido detectado anteriormente e parece ser espécie - específico e característico da espécie. Essa espécie nunca foi registrada em outros levantamentos realizados no Brasil e não existe marcador SCAR para a sua identificação.

Meloidogyne paranaensis

M. paranaensis foi descrita de espécimes que parasitavam café no estado do Paraná. A configuração da região perineal é semelhante a *M. incognita* com a qual foi confundida durante muitos anos (Carneiro *et al.*, 1996). Essa espécie foi durante muitos anos denominada *M. incognita* biótipo IAPAR ou raça 5 por apresentar no teste com hospedeiros diferenciadores a mesma reação de *M. javanica* (Carneiro *et al.*, 1996). Os danos causados por essa espécie no cafeeiro são muito severos, levando as plantas à morte em poucos anos (Campos & Vilain, 2005). *M. paranaensis* foi primeiramente caracterizada como um fenótipo de esterase atípico por Janatti *et al.*, 1982 e posteriormente por Esbenshade & Tryantaphyllou, 1985, sendo denominado de F1. Posteriormente, Carneiro *et al.* 1996 caracterizando várias espécies brasileiras quanto ao perfil das isoenzimas, caracterizou o biótipo Iapar como o perfil de enzima F1 já descrito por outros autores. Logo em seguida, a espécie *M. paranaensis* foi descrita e o perfil de esterase P1 (Rm:1,40), caracterizado como espécie- específico. Posteriormente, um outro Perfil Est P2 (Rm: 0,9, 1,40) foi detectado em uma população de *M. paranaensis* proveniente da Guatemala (Carneiro *et al.* 2004). Mais recentemente, um novo perfil P2a (Rm:1,0 e 1,40) foi detectado para essa espécie nos estados de São Paulo e Paraná (Santos *et al.*, 2015). Convém ressaltar que a banda principal Est P1 de *M. paranaensis* está

presente em todos os perfis, sendo as demais suplementares. A análise filogenética dos diferentes isolados mostrou uma baixa variabilidade intraespecífica entre os isolados de *M. paranaensis* do mesmo perfil de enzima, que se agruparam de acordo com o perfil Est P1 e Est P2, em dois grupos com similaridade de 99% e 100%, respectivamente, exceto o isolado de perfil enzimático P2a da Guatemala que se agrupou separadamente de todos os outros isolados de *M. paranaensis*. (Santos *et al.*, 2015). Um marcador SCAR foi desenvolvido para *M. paranaensis* e os pares de primers amplificaram o fragmento de 208 pb (Randig *et al.*, 2002). Esse marcador também amplificou os fenótipos P2 e P2a (M.F.A. Santos, inform. pessoal). A isoenzima esterase e o marcador SCAR são ferramentas extremamente precisas para diagnosticar essa espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; ENGLER, J.A & FAVERY, B. 2009. Invasion, feeding and development. *In*: Perry, R.; Moens, M. & Starr, J.L. (eds). Root-knot Nematodes. Cambridge, MA, USA, CABI International, p. 163-181.
- ADAM, M.A.M.; PHILLIPS, M.S. & BLOK, V.C. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology* 56:190-197.
- ARIAS, M.C & INFANTE-MALANCHIAS, M.E. 2001. RFLP: o emprego de enzimas de restrição para a detecção de polimorfismo no DNA. *In*: Matioli, S.R. (eds.). *Biologia molecular e evolução*. São Paulo. Nobel. p.143-152.
- BLOK, V.C.; PHILLIPS, M.S.; MCNICOL, J.W. & FARGETTE, M. 1997. Genetic variation in tropical *Meloidogyne* spp. as shown by RAPDs. *Fundamental and Applied Nematology* 20: 127-133.

- BLOK, V.C. & POWERS, O. 2009. Biochemical and molecular identification. In: Perry, R.; Moens, M.; Starr, J.L. (eds). Root-knot Nematodes. Cambridge, CABI International, p. 98-118.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. & CARNEIRO, R.G. 1996a. Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. *Fundamental and Applied Nematology* 19: 555-560.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; CARNEIRO, R.G.; ABRANTES, M.O.; SANTOS, M.S.N.A. & ALMEIDA, M.R. 1996b. *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. *Journal of Nematology* 28: 177-189.
- CARNEIRO, R.D.M.G.; RANDIG, O.; FREITAS, L.G. & DICKSON, D.W. 1999. Attachment of endospores of *Pasteuria penetrans* to males and juveniles of *Meloidogyne* spp. *Nematology* 1: 267-271.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & ALMEIDA, M.R.A. 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, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. & QUÉNÉHERVÉ, P. 2000. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology* 2: 645-654.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & ALMEIDA, M.R.A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira* 25: 35-44.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & ALMEIDA, M.R.A. 2001. Caracterização isoenzimática e variabilidade intraespecífica dos nematoides de galhas do cafeeiro no Brasil. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas (Resumos). p. 280-282.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; GOMES, C.B.; ALMEIDA, A.C.M.M. & MARTINS, I. 2003. First record of *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968 on kiwi in Brazil and reaction of different plant species. *Nematologia Brasileira* 27(2): 152-158.

- CARNEIRO, R.M.D.G.; TIGANO, M.S.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A. & SARAH, J.L. 2004. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology* 6: 287-298.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; RANDIG, O. ALMEIDA, M.R.A. & GOMES, A.C.M.M. 2004. Additional information on *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968 (Tylenchida: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing quivi fruit and grape-vine from Brazil and Chile. *Nematology* 6:109–123.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; GOMES, A.C.M. & HERNANDEZ, A. 2005. *Meloidogyne izalcoensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in El Salvador. *Nematology* 7: 819-832.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & ALMEIDA, M.R.A. 2005. First report of *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968 on yacon and tomato plants in Brasilia, DF, Brazil. *Nematologia Brasileira* 29(2): 285-287.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; COFCEWICZ, E.T.; MAGUNACELAYA, J.C. & ABALLAY, E. 2007. *Meloidogyne ethiopica*, a major root-knot nematode parasitizing *Vitis vinifera* and other crops in Chile. *Nematology* 9(5): 635-641.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & COFCEWICZ, E.T. 2008. Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In: Souza R.M., (ed). Plant parasitic nematodes of coffee. Springer, Holand, p.87-122.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; SANTOS, M.F.A.; ALMEIDA, M.R.A.; MOTA, F.C.; GOMES, A.C.M.M. & TIGANO, M.S. 2008a. Diversity of *Meloidogyne arenaria* using morphological, cytological and molecular approaches. *Nematology* 10: 819-834.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; MARTINS, I.; SOUZA, J.F.; PIRES, A.Q.; TIGANO, M.S. 2008b. Ocorrência de *Meloidogyne* spp. e fungos nematófagos em hortaliças no Distrito Federal, Brasil. *Nematologia Brasileira* 32(2): 135-141.

- CASTAGNONE-SERENO, P.; VANLERBERGHE-MASUTTI, F. & LEROY, F. 1994. Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers. *Genome* 37: 904-909.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; PIOTTE, C.; ABAD, P.; BONGIOVANNI, M. & DALMASSO, A. 1991. Isolation of a repeated DNA probe showing polymorphism among populations. *Journal of Nematology* 23:316-320.
- CASTRO, J.M.C.; LIMA, R.D. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2003. Variabilidade isoenzimática de populações de *Meloidogyne* spp. de regiões brasileiras produtoras de soja. *Nematologia Brasileira* 27:1-12.
- CENIS, J.L. 1993. Identification of four major *Meloidogyne* spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Phytopathology* 83:76-80.
- CHARCHAR, J.M. & EISENBACK, J.D. 2000. An improved technique to prepare perineal patterns of root-knot nematodes for SEM. *Nematologia Brasileira* 24: 245–247.
- CHARCHAR, J.M. & EISENBACK, J.D. 2002. *Meloidogyne brasilensis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing tomato cv. Rossol in Brazil. *Nematology* 4:629–643.
- CHARCHAR, J.M.; EISENBACK, J.D. & 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, J.M.; EISENBACK, J.D.; CHARCHAR, M.J. & BOITEUX, M.E.N.F. 2008a. *Meloidogyne pisi* n. sp. (Nematoda:Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising pea in Brazil. *Nematology* 10:479–493.
- CHARCHAR, J.M.; EISENBACK, J.D.; CHARCHAR, M.J. & BOITEUX, M.E.N.F. 2008b. *Meloidogyne phaseoli* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising bean in Brazil. *Nematology* 10:525–538.

- CHARCHAR, J.M.; EISENBACK, J.D.; VIEIRA, J.V.; FONSECA-BOITEUX, M.E.N. & BOITEUX, L.S. 2009. *Meloidogyne polycephannulata* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing carrot in Brazil. *Journal of Nematology* 41 (3): 174-186.
- CHITWOOD, B.G. 1949. Root-knot nematodes – Part 1. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 16:90–104.
- COFCEWICZ, E.T.; CARNEIRO, R.M.D.G.; CASTAGNONE-SERENO, P. & QUÉNÉHERVÉ, P. 2004. Enzyme phenotypes and genetic diversity of root-knot nematodes parasitizing *Musa* in Brazil. *Nematology* 6:85-95.
- COFCEWICZ, E.T.; CARNEIRO, R.M.D.G.; RANDIG, O.; CHAMBRIER, C. & QUÉNÉHERVÉ, P. 2005. Diversity of *Meloidogyne* spp. on *Musa* in Martinique, Guadeloupe and French Guiana. *Journal of Nematology* 37:313-322.
- CORREA, V.R.; SANTOS, M.F.A.; ALMEIDA, M.R.A.; PEIXOTO, J.R.; CASTAGNONE-SERENO, P. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2013. Species-specific DNA markers for identification of two root-knot nematodes of coffee: *Meloidogyne arabicida* and *M. izardoensis*. *European Journal of Plant Pathology*, 137:305-313.
- CORREA, V.R.; MATTOS, V.S.; ALMEIDA, M.R.A.; SANTOS, M.F.A.; TIGANO, M.S.; CASTAGNONE-SERENO, P. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2014. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* and development of a specie-specific SCAR marker for this diagnosis. *Plant Pathology*, 63:476-483.
- CURRAN, J.; MACCLURE, M.A. & WEBSTER, J.M. 1986. Genotypic differentiation of *Meloidogyne* populations by detection of restriction fragment length difference in total DNA. *Journal of Nematology* 18:83-86.
- DALMASSO, A. & BERGE, J.B. 1978. Molecular polymorphism and phylogenetic relationship in some *Meloidogyne* spp.: application to the taxonomy of *Meloidogyne*. *Journal of Nematology* 10:323-332.

- DICKSON, D.W.; HUISINGH, D. & SASSER, J.N. 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, J.D. & TRIANTAPHYLLOU, H.H. 1991. Root-knot nematode: *Meloidogyne* spp. and races. In: Nickle, W.R. (ed.). *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, New York, p. 191–274.
- EISENBACK, J.D. 1985a. Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: Sasser, J.N. and Carter, C.C. (eds). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. v. 1: Biology and Control. A cooperative publication of the Department of Plant Pathology and the United States Agency for International Development, North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, p. 95–112.
- EISENBACK, J.D. 1985b Detailed morphology and anatomy of second-stage juveniles, males and females of the genus *Meloidogyne* (root-knot nematodes). In: Carter, C.C., Sasser, J.N.(eds). *An advanced treatise on Meloidogyne*. v.1. Biology and control, North Carolina State University. Graphics, Raleigh.
- EISENBACK, J.D. 1985c. Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. In: Carter, C.C., Sasser, J.N., (eds). *An advanced treatise on Meloidogyne*. Raleigh: North Carolina State University Graphics 2:79-105.
- EISENBACK, J.D.; BERNARD, E.C. & SCHMITT, D.P. 1994. Description of the Kona coffee root-knot nematode, *Meloidogyne konaensis* n. sp. *Journal of Nematology* 26:363–374.
- EISENBACK, J.D. & HUNT, D.J. 2009. General morphology. In: Perry, R.N., Moens, N., Starr, J.L. (eds). *Root-knot Nematodes*. CABI North America Office, Cambridge, MA, USA, p. 18-54.
- ESBENSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida). *Journal of Nematology* 17: 6-20.

- ESBENSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 22: 10-15.
- FARGETTE, M. 1987. Use of esterase phenotype in the taxonomy of genus *Meloidogyne*. 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, J.N. & Carter, C.C. (eds.). *An advanced treatise on Meloidogyne, biology and control*. North Carolina State University Graphics. v. 20., p. 233-240.
- FERRAZ, L.C.C.B. & MONTEIRO, A.R. 1995. Nematoides. In: Bergamim Filho, A.; Kimati, H. & Amorim, L. *Manual de Fitopatologia*, v.1. 3º ed. Princípios e conceitos. Cap. 8. p. 168-201.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 220p.
- FOURIE, H.; ZIJLSTRA, C. & MCDONALD, A.H. 2001. Identification of root-knot nematode species occurring in South Africa, using the SCAR-PCR technique. *Nematology* 3: 675-80.
- FRANKLIN, M.T. 1965. A root-knot nematode, *Meloidogyne naasi* n. sp., on field crops in England and Wales. *Nematologica* 11:79–86.
- FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L. & FERRAZ, S. 2006. Introdução à Nematologia. 3ª ed. Viçosa: Editora, UFV. 83p.
- GOLDEN, A.M. 1992. Large phasmids in the female of *M. ethiopica* Whitehead, 1968. *Fundamental and Applied Nematology* 15(2): 189-191.
- HADRYIS, H.; BALICK, M. & SCHIERWATER, B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1:55-63.

- HAGUE, N.G. & GOWEN, R.S. 1986. Chemical control of nematodes. *In*: Brown, R.H. & Kerry, B.R. (eds). Principles and practice of nematode control in crops. London Academic Press, p.131-173.
- HARTMAN, K.M. & SASSER, J.N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. *In*: Barker, K.R.; Carter, C.C. & Sasser, J.N. (eds). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. v.1.: 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*: J.N. & Carter, C.C. (eds). An advanced treatise on *Meloidogyne*, V. 1. Biology and Control. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, 79-93.
- HUNT, D.J. & HANDOO, Z.A. 2009. Taxonomy, identification and principal species. *In*: Perry, R.N.; Moens, N. & Starr, J.L. (eds). Root-knot Nematodes. Cambridge, MA, USA, CABI North America Office, p. 55-97.
- HUSSEY, R.S.; SASSER, J.N. & HUISING, D. 1972. Disc-electrophoretic studies of soluble proteins and enzymes of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Journal of Nematology* 4: 183-189.
- JANATI, A.A.; BERGÉ, A.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. & DALMASSO, A. 1982. Nouvelles données sur l'utilisation des isoestérases pour l'identification des *Meloidogyne*. *Revue de Nématologie* 5: 147-154.
- JEPSON, S.B. 1987. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Wallingford, UK, CAB International, 265p.
- KARSSSEN, G. & MOENS, M. 2006. Root-knot nematodes. *In*: Perry, R.L. & Moens, M. (eds). *Plant Nematology*, Cambridge, MA, CABI North America Office, p. 59-90.

- KARSSSEN, G. 1996. Description of *Meloidogyne fallax* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae), a root-knot nematode from The Netherlands. *Fundamental and Applied Nematology* 19:593–599.
- KARSSSEN, G. 2002. The Plant-parasitic nematode genus *Meloidogyne* Goldi, 1892 (Tylenchida) in Europe. Brill Academic Publishers, Leiden, The Netherlands.
- KARSSSEN, G.; WESEMAEL, W. & MOENS, M. 2013. Root-knot nematodes. *In*: Perry, R.N. & Moens, M. (eds). *Plant Nematology*. 2nd edition, CAB International, Wallingford, UK, p. 73–108.
- LAX, P.; DUEÑAS, J.C.R.; GARDENAL, C.N. & DOUCET, M.E. 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, C.B.; ROSSI, C.E. & CARNEIRO, R.M.D.G. 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, L.G.E. 1992. *Nematoides das plantas cultivadas*. 8ª ed. São Paulo: Editora Nobel. 314 p.
- LORDELLO, A.I.L. & LORDELLO, R.R.A. 1996. Identificação de raças de *Meloidogyne incognita* associada a algumas plantas. *Summa Phytopathologica* 22:43-45.
- MATTOS, V.S.; MONTEIRO, J.M.S.; CARES, J.E.; CORREA, V.R. ALMEIDA, M.R.A.; BORGES, J.P. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2014. Study of Brazilian species of *Meloidogyne*: enzymatic and molecular characterizations. 6th International Congress of Nematology. Cape Town, South Africa.
- MCLAIN, D.K.O.; RAI, K.S. & FRASER, J.M. 1987. Intraespecific and interspecific variation in the sequence and abundance of highly repeated DNA among mosquitoes of the *Aedes albopictus* subgroup. *Heredity* 58:373-381.

- MENG, Q.P.; LONG, H. & XU, J.H. 2004. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. *Acta Phytopathologica Sinica* 34:204-210.
- MIENIE, C.M.S.; FOURIE, H.; SMIT, M.A.; VAN STADEN, J. & BOTHA, F.C. 2002. Identification of AFLP markers in soybean linked to resistance to *Meloidogyne javanica* and conversion to sequence characterized amplified regions (SCARs). *Plant Growth Regulation* 37:157-166.
- MOENS, M.; PERRY, R.N. & STARR, J.L. 2009. *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: Perry, R.N.; Moens, M. & Starr, J.L. (eds). Root-knot nematodes. Cambridge, MA, USA, CABI North America Office, p. 1-17.
- MOJTAHEDI, H.; SANTO, G.S. & PINKERTON, J.N. 1988. Differential response of Thor alfalfa to *Meloidogyne chitwoodi* races and *M. hapla*. *Journal of Nematology* 20:410-416.
- MOURA, R.M. 1996. Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. In: Revisão Anual de Patologia de Plantas 4: 209-245.
- MUNIZ, M.F.S.; CAMPOS, V.P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CASTRO, J.M.C.; ALMEIDA, M.R.A. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2008. Diversity of *Meloidogyne exigua* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations from coffee and rubber tree. *Nematology* 10: 897-910.
- MURGA-GUTIERREZ, S.N.; COLAGIERO, M.; ROSSO, L.C.; SIALER, M.M.F. & CIANCIO, A. 2012. Root-knot nematodes from asparagus and associated biological antagonists in Peru. *Nematropica* 42: 57-62.
- NOIR, S.; ANTHONY, F.; BERTRAND, B. & COMBES, M.C. 2003. Identification of a major gene (Mex-1) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. *Plant Pathology* 52:97-103.
- O'BANNON, J. H. 1975. Nematode survey in Ethiopia. Institute of Agricultural Research. Adis Abada. Ethiopia and FAO, Rome (Unpubl.).

- OLIVEIRA, D.S.; OLIVEIRA, R.D.L. & GONÇALVES, W. 2006. Fenótipo S1 de esterase em *Meloidogyne incognita* no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 31:207.
- PAIS, C.S. & ABRANTES, I.M.O. 1989. Esterase and malate dehydrogenase phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 21:342–346.
- PARAN, I. & MICHELMORE, R.W. 1993. Development of reliable PCR–based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 985-993.
- PERRY, R.N.; MOENS, M & STARR, J.L. 2009. Root-knot nematodes. In: Eisenback, J.D. & Hunt, D.J. (eds). *General morphology*. Virginia, USA. CABI International, p. 18-54.
- PHILIPPI, I.; LATORRE, B.A.; PTREZ, G.F. & CASTILLO, L. 1996. Identification of the root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) on kiwifruit by isoenzyme analysis in Chile. *Fitopatologia* 31(2):96-101; 34 ref.
- RAMMAH, A. & HIRSCHMANN, H. 1990a. Morphological comparison of three host races of *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 22:56-68.
- RAMMAH, A. & HIRSCHMANN, H. 1990b. *Meloidogyne morocciensis* n. sp. (*Meloidogyninae*), a root-knot nematode from Morocco. *Journal of Nematology* 22:279–291.
- RANDIG, O.; BONGIOVANNI, M.; CARNEIRO, R.M.D.G. & CASTAGNONE-SERENO, P. 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome* 45: 862-870.
- RANDIG, O.; CARNEIRO, R.M.D.G. & CASTAGNONE-SERENO, P. 2004. Identificação das principais espécies de *Meloidogyne* parasitas do cafeeiro no Brasil com marcadores SCAR-CAFÉ em Multiplex-PCR. *Nematologia Brasileira* 28:1-10.
- RIGGS, R.D. 1990. Making perineal patterns of root-knot nematodes and vulval cones of cyst nematodes. In: Zuckerman, B.M., Mai, W.F. & Krusberg, L.R. (eds). *Plant Nematology*

Laboratory Manual. University of Massachusetts Agricultural Experiment Station, Amherst, Massachusetts, p. 103–106.

SANTOS, M.F.A.; FURLANETTO, C.; ALMEIDA, M.R.A.; CARNEIRO, M.D.G.; MOTA, F.C.; SILVEIRA, N.O.R.; SILVA, J.G.P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; TIGANO, M.S. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2012. Biometrical, biological and molecular characteristics of *Meloidogyne incognita* isolates and related species. *European Journal of Plant Pathology* 134:671-684.

SANTOS, M.F.A.; PEIXOTO, J.R.; MATTOS, V.S.; ALMEIDA, M.R.A.; CASTAGNONE-SERENO, P. & CARNEIRO, R.M.D.G. Variabilidade genética de populações de *Meloidogyne paranaensis* por meio de marcadores moleculares. In: 32º Congresso Brasileiro de Nematologia, 2015, Londrina, PR. *Anais do 32º Congresso Brasileiro de Nematologia*. Londrina, PR. p.132, 2015.

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

SASSER, J.N. 1980. Root-knot nematodes: a global menace to crop production. *Plant Disease Reporter*: 64:36-41.

SASSER, J.N. & KIRBY, M.F. 1979. Crop cultivars resistant to root-knot nematodes, *Meloidogyne* species with information on seed sources. International *Meloidogyne* Project. A Cooperative Publication of the Department of Plant Pathology North Carolina

SASSER, J.N. & CARTER, C.C. 1982. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.): identification, morphological and physiological variation, host-range, ecology, and control. In: Riggs, R.D. (ed). *Nematology in the Southern Region of the United States*. Southern Cooperative Series Bulletin 276, Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, Arkansas, p. 21–32.

- SEMBLAT, J.P.; WAJNBERG, E.; DALMASSO, A.; ABAD, P. & CASTAGNONE-SERENO, P. 1998. High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis. *Molecular Ecology* 7:119-125.
- SILVA, R.V. 2005. Produção de inóculo e diferenciação de raças de *Meloidogyne exigua* em *Coffea* spp. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.
- SILVA, J.G.P.; FURLANETTO, C.; ALMEIDA, M.R.A.; ROCHA, D.B.; MATTOS, V.S.; CORREA, V.R. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2014. Occurrence of *Meloidogyne* spp. in Cerrado Vegetations and Reaction of Native Plants to *Meloidogyne javanica*. *Journal of Phytopathology* 162:449-455.
- SIPES, B.S.; SCHMITT, D.P.; XU, K. & SERRACIN, M. 2005. Esterase polymorphism in *Meloidogyne konaensis*. *Journal of Nematology* 37(4):438-443.
- SIRCA, S.; UREK, G. & KARSSSEN, G. 2004. First report of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* in Europe. *Plant Disease* 88:680.
- SOMAVILLA, L.; GOMES, C.B.; CARNEIRO, R.M.D.G. & CARBONARI, J.J. 2011. Levantamento e caracterização de espécies do nematoide-das-galhas em quivi no Rio Grande do Sul. *Tropical Plant Pathology* 36: 89-94.
- STRAJNAR, P.; SIRCA, S.; GERIC STARE, B. & UREK, G. 2009. Characterization of root knot nematode *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968 from Slovenia. *Russian Journal of Nematology* 17: 135-142.
- STRAJNAR, S.; SIRCA, S.; KNAPIC, M. & UREK, G. 2011. Effect of Slovenian climatic conditions on the development and survival of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica*. *European Journal of Plant Pathology* 129: 81-8.
- TAYLOR, A.L. & SASSER, J.N. 1978. Biology, identification and control of rootknot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Coop. Publ. Dept. Plant Pathology, North Carolina State University Graphics, Raleigh, NC, 111pp.

- TAYLOR, D.T. & SASSER, J.N. 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, p. 111.
- TAYLOR, A.L.; DROPKIN, V.H. & MARTIN, G.C. 1995. Perineal patterns of root-knot nematodes. *Phytopathology* 45: 26–34.
- 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 of SCAR marker for this guava-damaging species. *Plant Pathology* 59:1054-1061.
- TIGANO, M.S.; CARNEIRO, R.M.; JEYAPRAKASH, A.; DICKSON, D.W. & ADAMS, B. J. 2005. Phylogeny of *Meloidogyne* spp. based on 18S rDNA and the intergenic region of mitochondrial DNA sequences. *Nematology* 7(6):851-862.
- TRIANANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Cytogenetics, taxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. In: Carter, C.C. & Sasser, J.N. (eds). *An advanced treatise on Meloidogyne*, v. 1., Biology and control. Raleigh, North Carolina State University Graphics, p. 113-126.
- TRUDGILL, D.L. 1991. Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. *Annual Review of Phytopathology* 29: 167.
- TRUDGILL, D.L. & BLOK, V.C. 2001. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review Phytopathology* 39:53-77.
- WHITEHEAD, A.G. 1968. Taxonomy of *Meloidogyne* (Nematoda: Heteroderidae) with descriptions of four new species. *Transactions of the Zoological Society of London* 31: 263–401.
- WHITEHEAD, A.G. 1969. The distribution of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in tropical Africa. *Nematology* 15:315-333.

- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- WILLIAMS, J.G.Y.; RAFALSKI, L.A. & TINGEY, S.V. 1993. Genetic analysis using RAPD markers. *Methods in Enzymology* 218:704-740.
- WOFFORD, D.S.; GRAY, F.A. & ECKERT, J.W. 1989. Pathogenicity of two populations of *Meloidogyne hapla* Chitwood on Alfalfa and Sainfoin. *Journal of Nematology* 21:87-91.
- YANG, B.J. & EISENBACK, J.D. 1983. *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing pacara earpod tree in China. *Journal of Nematology* 15:381-391.
- ZIJLSTRA, C. 2000. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. *European Journal of Plant Pathology* 106:283-290.
- ZIJLSTRA, C.; DONKERS-VENNE, D.T.H.M. & FARGETTE, M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified regions (SCAR) based PCR assays. *Nematology* 2:847-53.

CAPÍTULO 1. CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE ESPÉCIES BRASILEIRAS DE *MELOIDOGYNE* POR MEIO DE MARCADORES ENZIMÁTICOS E MOLECULARES.

RESUMO - *Meloidogyne petuniae*, *M. brasiliensis*, *M. pisi*, *M. phaseoli* e *M. polycephannulata* são espécies brasileiras de *Meloidogyne* descritas e publicadas nos últimos anos, contudo, sem os estudos bioquímicos e moleculares. Análises dos perfis de esterase foram realizadas em algumas populações dessas espécies. *Meloidogyne petuniae* e *M. pisi* apresentaram perfis de esterase (Est Pe2 Rm: 0,95, 1,1 e Est Pi5 Rm: 0,85, 0,90, 1,0, 1,25, 1,3), respectivamente, diferentes dos perfis já detectados no Brasil e no Mundo. Já, *M. brasiliensis*, *M. phaseoli* e *M. polycephannulata* apresentaram perfis de esterase idênticos a *M. ethiopica* (Est E3, Rm: 0,9, 1,05, 1,20), *M. morocciensis* (Est A3, Rm: 1,1, 1,2, 1,3) e *M. incognita* (Est I2, Rm: 1,05, 1,1), respectivamente. Os resultados das análises com marcadores PCR-SCAR espécie-específicos corroboraram com os fenótipos de esterase. *Meloidogyne brasiliensis* e *M. ethiopica* amplificaram um fragmento de banda comum de 350 pb, assim como *M. phaseoli* e *M. morocciensis* com 420 pb e *M. polycephannulata* e *M. incognita* com 399 pb. Em estudos de variabilidade genética realizados com marcadores RAPD e AFLP, foram observados níveis de polimorfismos médios entre as populações das espécies comparadas entre si. As populações de *M. brasiliensis* e *M. ethiopica*, *M. incognita* e *M. polycephannulata*, e, *M. morocciensis* e *M. phaseoli* apresentaram um polimorfismo de 40,7%, 34,7% e 43,6%, respectivamente. No entanto, em dendograma resultante dessas análises, populações de *M. brasiliensis* e *M. ethiopica* se agruparam no mesmo clado com 77% de bootstrap, *M. phaseoli* com *M. morocciensis*, e *M. polycephannulata* com *M. incognita* com 100 % de bootstrap.

Palavras-Chaves: Esterase, PCR-SCAR, PCR-RAPD, PCR-AFLP, polimorfismo, *Meloidogyne brasiliensis*, *Meloidogyne phaseoli*, *Meloidogyne polycephannulata*.

CHAPTER 1. CHARACTERIZATION OF BRASILIAN POPULATIONS OF MELOIDOGYNE SPECIES USING ESTERASES AND MOLECULAR MARKERS

ABSTRACT - *Meloidogyne petuniae*, *M. brasiliensis*, *M. pisi*, *M. phaseoli* and *M. polycephannulata* are species described and published in recent years in Brazil, however, without biochemical and molecular characterizations. Esterase profiling were performed in some populations of these species. *Meloidogyne petuniae* and *M. pisi* showed patterns (Est Pe2 Rm: 0.95, 1.1 and Est Pi5 Rm: 0.85, 0.90, 1.0, 1.25, 1.30) respectively, in both cases, new profiles not detected previously in Brazil and elsewhere. *Meloidogyne brasiliensis*, *M. phaseoli* and *M. polycephannulata* showed esterase profiles completely identical to those of *M. ethiopica* (Est E3, Rm: 0.9, 1:05, 1:20), *M. morocciensis* (Est A3, Rm: 1.1, 1.2, 1.3) and *M. incognita* (Est I2, Rm: 1.05, 1.1), respectively. Results obtained with species-specific SCAR markers corroborated with those esterase phenotypes. *Meloidogyne brasiliensis* and *M. ethiopica* amplified a common fragment of 350 bp; *M. phaseoli* and *M. morocciensis* a fragment of 420 bp; and, *M. polycephannulata* and *M. incognita* a fragment of 399 bp. Results from the genetic variability using RAPD and AFLP markers revealed medium levels of polymorphism among populations used in this study. Populations of *M. brasiliensis* with *M. ethiopica*, *M. polycephannulata* with *M. incognita* and *M. morocciensis* with *M. phaseoli* had an overall polymorphism of 40.7%, 34.7% and 43.6%, respectively. However, *M. brasiliensis* and *M. ethiopica* populations

clustered together in the same clade with 77% bootstrap, *M. morocciensis* with *M. phaseoli*; and, *M. polycephannulata* and *M. incognita* both with 100% bootstrap support.

Key-Words: Esterase, *Meloidogyne brasiliensis*, *Meloidogyne phaseoli*, *Meloidogyne polycephannulata*, polymorphism, PCR-RAPD, PCR-AFLP, SCAR-PCR.

INTRODUÇÃO

Os nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) estão entre os principais agentes fitopatogênicos causadores de danos em diversas culturas de interesse econômico, com perdas anuais orçadas em cerca de 90 bilhões de dólares correspondentes a cerca de 25 – 50% da produção no campo (Taylor & Sasser, 1978). Dentre as mais de 100 espécies descritas até o momento, a maioria são partenogenéticas, fato que influencia muito a variabilidade inter e intraespecífica do gênero, levando a alta complexidade e difícil compreensão da diversidade biológica e genética dentro do grupo.

No passado, isoenzimas representavam os principais tipos de marcadores utilizados no estudo da variação genética em populações de organismos (Handrick & Godt, 1989), e o surgimento da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), em meados da década de 80, trouxe uma verdadeira revolução nas pesquisas genéticas (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Newton *et al.*, 1999). Os avanços nos estudos moleculares trouxeram um aumento significativo nos conhecimentos na área de genética de populações, com diversas aplicações em estudos da evolução, o que permitiu a avaliação da diversidade genética diretamente no DNA, livre de influências ambientais ou do estágio de desenvolvimento do organismo analisado. Foi com o desenvolvimento de técnicas de amplificação de DNA utilizando *primers* iniciadores de tamanhos pequenos e de sequências aleatórias, que o uso da PCR foi difundido no mundo, permitindo a análise genética de diversas espécies

a custos relativamente baixos e de forma mais simplificada (Hadrys *et al.*, 1992). Os marcadores moleculares servem para estudos da genética de populações, mapeamento e análises de similaridade e distância genética.

Nos últimos anos foram publicadas descrições de cinco novas espécies de *Meloidogyne*, tidas como espécies brasileiras: *Meloidogyne petuniae* Charchar, Eisenback & Hirschmann, 1999 em plantas de petúnia (*Petunia hybrida* L.) (Charchar *et al.*, 1999); *M. brasiliensis* Charchar & Eisenback, 2002 em raízes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Rossol em Londrina e ervilha (*Pisum sativum* L.) em Brasília (Charchar & Eisenback, 2002); *Meloidogyne pisi* Charchar, Eisenback, Charchar & Boiteux, 2008a em plantas de ervilha cv. Mikado (Charchar *et al.*, 2008a), *Meloidogyne phaseoli* Charchar, Eisenback, Charchar & Boiteux, 2008b em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Carioca (Charchar *et al.*, 2008b), e *Meloidogyne polycephannulata* Charchar, Eisenback, Vieira, Fonseca-Boiteux & Boiteux, 2009 em plantas de cenoura (*Daucus carota* L.) cv. Brasília (Charchar *et al.*, 2009). Estas descrições foram publicadas com base em caracteres morfológicos e morfométricos, porém sem o suporte de estudos com marcadores isoenzimáticos ou moleculares.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo principal, caracterizar populações de espécies brasileiras de *Meloidogyne*, descritas entre 1999 e 2009, por meio de marcadores enzimáticos e moleculares e, compará-las a populações de espécies descritas anteriormente a estas.

MATERIAL E MÉTODOS

Populações de nematoides

As populações puras de todas as espécies de *Meloidogyne* spp. envolvidas neste estudo (Tabela 1), foram mantidas em regime de reinoculação periódica em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Santa Clara) em casa de vegetação, sob temperatura de 22-28 °C. Todos os estudos, biológicos e moleculares foram realizados utilizando-se espécimes dessas culturas.

Tabela 1: Populações de *Meloidogyne* spp. utilizadas nas análises bioquímicas e moleculares.

| Código | População (perfis de esterase) | Origem |
|--------|---------------------------------|---------------------------------------|
| 1 | <i>Meloidogyne ethiopica</i> E3 | Quênia |
| 2 | <i>M. ethiopica</i> E3 | Brasil |
| 3 | <i>M. ethiopica</i> E3 | Chile |
| 4 | <i>M. brasiliensis</i> E3 | Londrina, PR |
| 5 | <i>M. brasiliensis</i> E3 | Brasília, DF |
| 6 | <i>M. incognita</i> I1 | Londrina, PR |
| 7 | <i>M. incognita</i> I2 | Londrina, PR |
| 8 | <i>M. incognita</i> S2 | Garça, SP |
| 9 | <i>M. polycephannulata</i> I2 | Minas Gerais |
| 10 | <i>M. pisi</i> Pi5 | Brasília, DF |
| 11 | <i>M. petuniae</i> Pe2 | Brasília, DF |
| 12 | <i>M. paranaensis</i> P1 | Piumbi, SP |
| 13 | <i>M. konaensis</i> K3 | Ceará |
| 14 | <i>M. phaseoli</i> A3 | Brasília, DF |
| 15 | <i>M. morocciensis</i> A3 | Soja (Santa Rosa, RS) |
| 16 | <i>M. morocciensis</i> A3 | Cerrado (Parque Nacional de Brasília) |

Análises Bioquímicas

A caracterização de isoenzimas foi feita para esterase (Est) usando gel de poliacrilamida 7%, de acordo com Carneiro & Almeida (2001).

Várias fêmeas de coloração branco-leitosa de cada população de *Meloidogyne* spp., iniciando a fase de postura de ovos, foram extraídas individualmente de raízes de tomateiro com auxílio de um estilete, sob microscópio estereoscópico e transferidas para tubos de micro hematócrito, contendo 3 µl do tampão de extração (sacarose/Triton X-100). 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 3 mm, com dimensões de 1,5 x 4,0 mm e, após este procedimento, foi colocado nas cavidades do gel de poliacrilamida. Extratos proteicos de fêmeas de *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 jovens e leitosas foram incluídos em cada gel como fenótipo padrão para a caracterização da esterase. Gotas de bromofenol (azul de bromofenol a 0,1%) foram colocadas sobre as amostras para acompanhamento da migração, que 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) preparadas no momento do 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. Os fenótipos de esterase foram designados pelas letras sugestiva do nome

da espécie, acompanhada de um número que indica o número de bandas (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985, 1990).

Análises moleculares

Os ovos para análises de DNA foram extraídos de raízes infectadas conforme a metodologia descrita por Carneiro *et al.* (2004b).

Após três meses em casa de vegetação, as raízes dos tomateiros foram lavadas cuidadosamente, cortadas e trituradas em liquidificador com 500 ml da solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 1,25% por 40 segundos. Em seguida, o triturado foi passado por um conjunto de peneiras sobrepostas de 50, 100 e 500 mesh. Os resíduos da peneira de 500 mesh foram bem lavados com água corrente e coletados em um béquer.

A suspensão coletada foi distribuída em tubos de Falcon de 50 ml, aos quais adicionou-se caulim (aproximadamente 5 g) em cada tubo e esses foram centrifugados a 2500 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e, os tubos foram completados com uma solução gelada (4 °C) de sacarose a 30%, a suspensão foi homogeneizada, e centrifugada a 2500 rpm por 2 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi passado em peneira de 500 mesh e lavado com água destilada para retirar os resíduos de sacarose.

Os ovos retidos na peneira de 500 mesh foram transferidos para tubos Falcon de 15 ml, o volume do tubo foi completado com água estéril e esses foram centrifugados a 2500 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente com auxílio de uma pipeta (P5000), e o pelete formado foi conservado no fundo do tubo. Em seguida, com auxílio de uma pipeta (P100), o pelete formado em cada tubo Falcon (15 ml) foi distribuído em quantidades iguais para 4 ou 2 tubos eppendorf de 1,5 ml (dependendo da quantidade do pelete formado), que foram centrifugados a 13000 rpm por 2 minutos com

o objetivo de descartar o excesso de água contida nos ovos. Por fim, foram estimados a quantidade de ovos, e os tubos foram devidamente identificados e armazenados a -80°C para posterior extração do DNA genômico.

Para cada população de nematoides, o DNA genômico foi extraído e purificado de alíquotas de 200 – 300 µl de ovos, seguindo o procedimento clássico, fenol – clorofórmio (Randig *et al.*, 2002). Os ovos foram macerados em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido, e o macerado recuperado em tubo Eppendorf de 1,5 ml, ao qual foi adicionado 500 µl de 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, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por dois minutos, e o sobrenadante foi descartado. Esta etapa foi repetida duas vezes. Em seguida foram acrescentados 800 µl de tampão de homogeneização (0,1 M NaCl; 0,2 M sacarose; 10 mM EDTA) e 200 µl do tampão de lise (0,125 M EDTA; 0,5 M Tris pH 9,2; 2,3 % SDS), os tubos foram homogeneizados e incubados em banho maria a 55 °C por 30 minutos, seguido de 10 minutos à temperatura ambiente. A purificação foi realizada adicionando-se 1 V de fenol (1 ml), seguindo-se à homogeneização e centrifugação a 14000 rpm por três minutos. O sobrenadante foi recuperado e depois misturado à ½ V de fenol (0,5 ml) + ½ V de clorofórmio (0,5 ml) e centrifugado a 14000 rpm por três minutos. O sobrenadante foi recuperado em novo tubo, adicionando 200 µl de éter, e centrifugado a 14000 rpm por três minutos. O éter foi eliminado com auxílio de uma pipeta. Para precipitação do DNA, foi adicionado ao tubo 1 ml de etanol absoluto, seguido de homogeneização e observação do pelete formado. O tubo foi então deixado a -80 °C durante 30 minutos. Em seguida efetuou-se uma centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e, adicionou-se etanol 70%. Após a centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos, eliminou-se o etanol. O

precipitado foi seco à temperatura ambiente, e recuperado em volume de 10 a 20 µl de água esterilizada (Milli-Q) e o DNA foi armazenado a – 20 °C.

Considerando o fato dos perfis de esterase de *M. brasiliensis* com *M. ethiopica*, *M. phaseoli* com *M. morocciensis* e *M. polycephannulata* com *M. incognita* serem idênticos, ensaios de PCR-SCAR foram realizados utilizando-se mascadores SCAR desenvolvidos para *M. ethiopica* [MethF: 5'-ATGCAGCCGCAGGGAACGTAGTT-3', MethR: 3'-TGTTGTTTCATGTGCTTCGGCATC-5'] (Correa *et al.*, 2014), *M. arenaria* (= *M. morocciensis*), Far/Rar [F: 5'- TCGGCGATAGAGGTAAATGAC-3', R: 3'-TCGGCGATAGACACTACAAC-5'] (Zijlstra *et al.*, 2000), e *M. incognita*, incK14 [F: 5'-GGGATGTGTAAATGCTCCTG-3', R: 3'-CCCGCTACACCCTCAACTTC-5'] (Randig *et al.*, 2002), para o teste de identidade.

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µl, contendo 2 µl de DNA genômico [3 ng/µl], 1 µl de cada primer F (Operon Technologies, Alameda, CA, EUA), 4 µl de dNTPs [1,25 mM] (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) (Invitrogen®, São Paulo, Brasil), 2,5 µl de tampão de reação 10X + MgCl₂ (Phoneutria Biotecnologia & Serviços-pht®, São Paulo, Brasil), 0,25 µl da enzima Taq DNA polimerase (pht®) e 14,25 µl de água Milli-Q. As amplificações foram feitas usando o termociclador PTC-100 programmable thermal controller (MJ Research) e as condições da PCR para *M. ethiopica* foram 5 min. a 94 °C, 35 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 45 seg. a 66 °C, 1min. a 70 °C e extensão final de 8 min. a 70 °C; para *M. incognita* foram 5 min. a 94 °C, 35 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; e para *M. arenaria* (= *M. morocciensis*) foram 5 min. a 94 °C, 35 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 45 seg. a 61 °C, 1 min. a 70 °C, e extensão final de 8 min a 70 °C. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizados sob luz

ultravioleta após coloração com brometo de etídio [0,3 µg/ml]. Cada experimento foi repetido duas vezes.

Para o estudo da variabilidade genética, análises com marcadores RAPD e AFLP foram realizadas para as populações utilizadas neste estudo.

As reações de PCR-RAPD foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 1X de tampão de reação de PCR (Phoneutria Biotecnologia & Serviços-pht®, São Paulo, Brasil), 200 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) (Invitrogen®, São Paulo, Brasil), 10 µM do primer (Operon Technologies, Alameda, CA, EUA), 1U de Taq DNA polimerase (pht®) e 6 ng de DNA genômico total. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research Thermal) com as seguintes condições: 5 min. a 94 °C, 40 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 45 seg. a 36 °C, 2 min. a 70 °C e uma extensão final de 10 min. a 70 °C (Randig *et al.*, 2002). Cada reação foi feita em duplicata para maior segurança dos ensaios. Foram utilizados na análise um total de 30 primers: OPA01, OPA12, OPAB04, OPAU13, OPB06, OPC07, OPD2A, OPE07, OPE18, OPG13, OPJ20, OPK01, OPK16, OPK19, OPK20, OPL08, OPM20, OPN10, OPP01, OPR03, OPR07, OPR08, OPU05, OPV07, OPW06, OPW15, OPX16, OPX20, OPZ04, OPZ17. Os fragmentos amplificados foram separados por meio de electroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TBE 0,5% (90 mM Tris-HCl, 89 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA), à uma corrente constante de 100 mA por cerca de 4 horas, corados com solução de brometo de etídio (0,3µg/ml) e visualizados sob luz UV.

Para a análise com marcadores AFLP, a metodologia consistiu de quatro etapas de acordo com o protocolo descrito por Suazo & Hall (1999). Na primeira etapa o DNA genômico extraído dos ovos foi clivado pela enzima de restrição (EcoRI). Na segunda etapa, adaptadores específicos foram ligados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem. Os adaptadores EcoRI (upper e lower) foram aquecidos a 95°C

durante 5 min. no termociclador (PTC-100, MJ Research), e em seguida mantidos à temperatura ambiente durante cerca de 10 min.

A reação de ligação/digestão dos adaptadores ao DNA foi realizada num volume final de 20 µl, contendo: 2µl de tampão da T4 DNA Ligase 10X, 2µl de NaCl 0,5M, 0,5µl de BSA, 2µl de adaptadores EcoRI (25 µM), 0,5µl de cada enzima EcoRI (12 U/µl), 1µl T4 DNA Ligase (1 U/µl), 2µl de água Milli-Q, 10µl de DNA (100 ng/µl). Essa reação foi incubada a 37 °C “overnight”. Em seguida, 5 µl de cada reação foram retirados para corrida em gel de agarose 1,5% para confirmação da digestão. Após a verificação da digestão de cada amostra, o restante da reação (15 µl) foi diluída a um volume de 150 µl para a realização das reações de PCR, a terceira etapa. Onde, do total de 150 µl, foi utilizado 1µl do DNA digerido para cada reação. A reação de PCR com DNA digerido e ligado com adaptadores foi realizada em volume final de 25µl, contendo: 1µl de DNA total, 2,5µl de tampão 10X, 1µl de MgCl₂ [50mM], 1µl do primer [10µM], 0,5µl dNTP [10 mM], 0,7µl da enzima Taq DNA polimerase (5U/µl), 18,3µl de água Milli-Q, cada tubo de reação foi coberto com óleo mineral para evitar evaporação. O termociclador (PTC-100, MJ Research) foi programado para as seguintes condições: 1min. a 95 °C; 37 ciclos de 1min. a 94 °C, 1 min. a 56 °C e 2 min. e 30 seg a 72 °C; e um ciclo de extensão final de 5 min. a 72 °C.

Para essa análise, foram testados 11 primers (AFLP 6, AFLP 7, AFLP 8, AFLP 9, AFLP 10, AFLP 15, AFLP 16, AFLP 17, AFLP 18, AFLP 19, AFLP 23) selecionados com base em estudos de variabilidade genética anteriormente realizados com populações de *Meloidogyne* spp. (Mattos, 2010; Tigano *et al.*, 2010). Na quarta e última etapa, os fragmentos amplificados foram separados em gel de alta resolução 1,5% agarose-synergel, sendo 0,7% agarose e 0,4% Synergel (Diversified Biotech Synergel™), a uma

corrente constante de 100 mA por aproximadamente 3 horas. Para visualização, os géis foram corados com solução de brometo de etídio (0,2 µg/ml) e visualizados sob luz UV.

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

RESULTADOS

A técnica de eletroforese de isoenzimas revelaram as esterases para *M. petuniae* (Est Pe2 Rm: 0,95, 1,1) e *M. pisi* (Est Pi5 Rm: 0,85, 0,90, 1,0, 1,25, 1,30) e mostraram perfis de esterase específicos. *Meloidogyne brasiliensis*, *M. phaseoli* e *M. polycephannulata* apresentaram perfis de esterase idênticos aos de *M. ethiopica* Est E3 (Rm: 0,9, 1,05, 1,20), *M. morocciensis* Est A3 (Rm: 1,1, 1,2, 1,3) e *M. incognita* Est I2 (Rm: 1,05, 1,1), respectivamente (Figura 1).

As análises com marcadores SCAR espécies específicos de *M. ethiopica*, *M. morocciensis* e *M. incognita* testados para *M. brasiliensis*, *M. phaseoli* e *M. polycephannulata*, respectivamente, amplificaram um único fragmento de 399 pb para as populações de *M. incognita* e *M. polycephannulata*, 350 pb para *M. ethiopica* e *M. brasiliensis*, e 420 pb para *M. morocciensis* e *M. phaseoli* (Figura 2).

A maioria dos primers randômicos testados neste estudo produziu bons produtos de amplificação, com bandas comuns entre as populações dos três grupos como exemplificado pelas figuras 3 e 4. Como pode ser observado, os ensaios de PCR com o primer RAPD V07 (Figura 3), e AFLP 15 (Figura 4) produziram padrões idênticos entre populações dos três grupos formados por *M. ethiopica* com *M. brasiliensis*, *M. incognita* com *M. polycephannulata*, e *M. morocciensis* com *M. phaseoli*, respectivamente. E isso nos fornece subsídios para considerar que as espécies de cada par de espécies acima são intimamente relacionadas.

Os dados gerais dos produtos polimórficos amplificados são apresentados na Tabela 2. Apesar dos perfis idênticos, os 30 marcadores RAPD e 11 marcadores AFLP, produziram níveis de polimorfismos médios entre os grupos na ordem de 40,7% para *M. ethiopica* e *M. brasiliensis*, 34,7% para *M. incognita* e *M. polycephannulata*, e 43,6% para *M. morocciensis* e *M. phaseoli*.

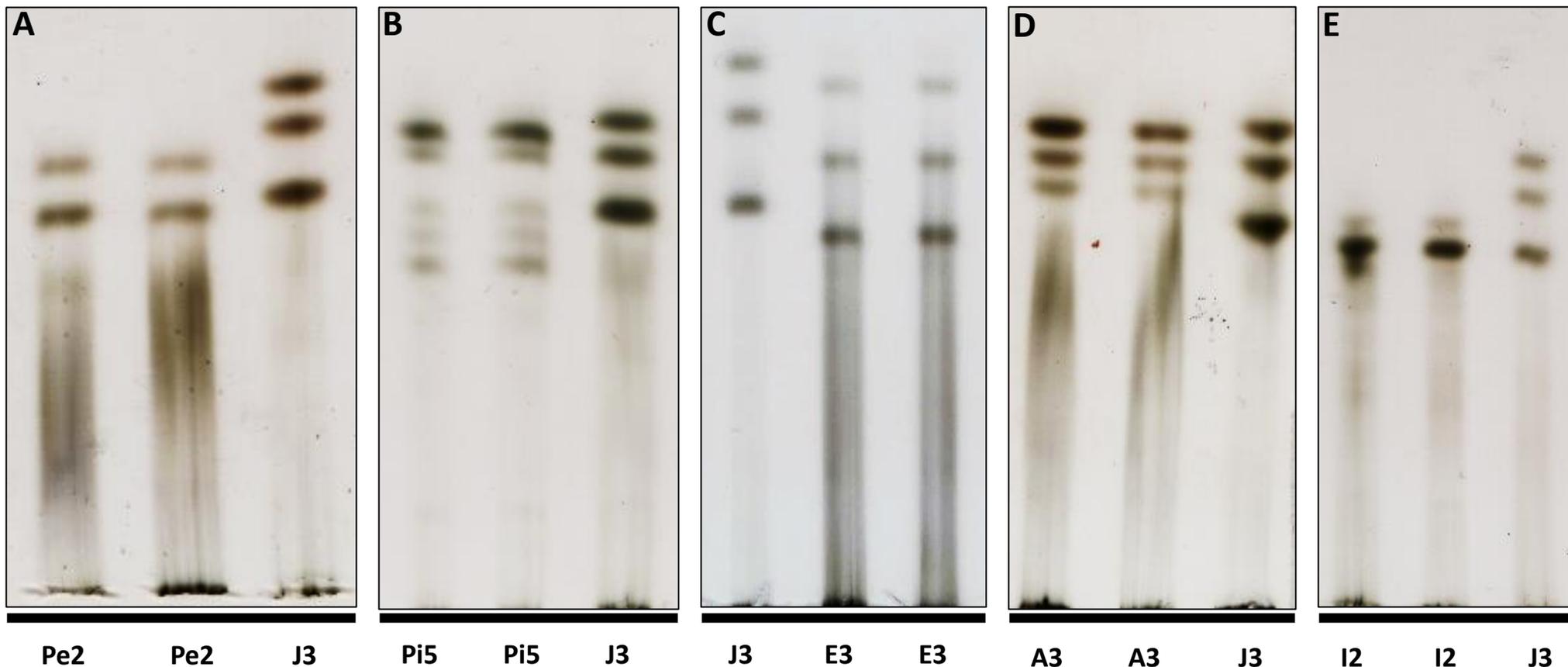


Figura 1: Perfis de esterase das espécies Brasileiras de *Meloidogyne*. A) Est Pe2 de *M. petuniae* (Rm: 0,95; 1,1) B) Est Pi5 de *M. pisi* (Rm: 0,85; 0,90; 1,0; 1,25; 1,3) C) Est E3 de *M. brasiliensis* (= *M. ethiopica* Rm: 0,9; 1,05; 1,20) D) Est A3 de *M. phaseoli* (= *M. morocciensis* Rm: 1,1; 1,2; 1,3) E) Est I2 de *M. polycephannulata* (= *M. incognita* I2 Rm: 1,05; 1,1). Est J3: *M. javanica* (fenótipo padrão).

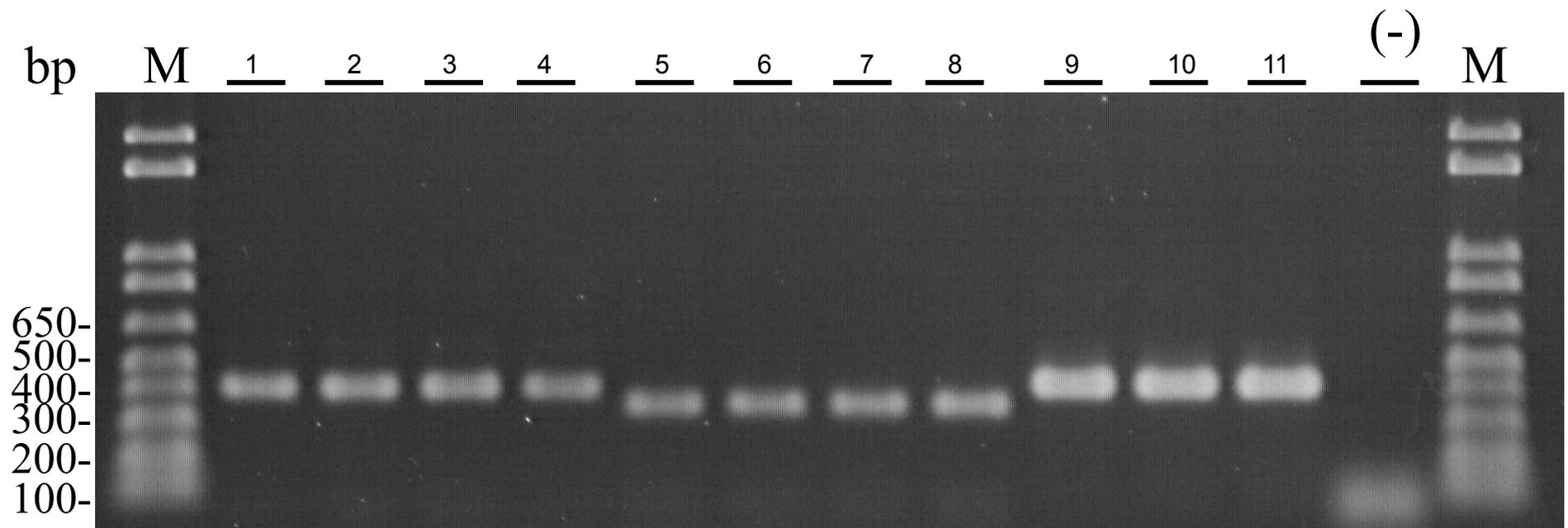


Figura 2. Padrão de amplificação de SCAR-PCR para populações de *Meloidogyne* usando primers espécies-específicos: inc-K14-F/R (Randig *et al.* 2002); meth-F/R (Correa *et al.*, 2014) e Far/Rar (Zijlstra *et al.* 2000). 1- *M. incognita* (Est I1), 2 - *M. incognita* (Est I2), 3 – *M. incognita* (Est S2), 4 – *M. polycephannulata*, 5– *M. ethiopica* (população do Brasil), 6 – *M. ethiopica* (população do Chile), 7 – *M. ethiopica* (população do Quênia), 8 – *M. brasiliensis* (população de Londrina), 9 – *M. morocciensis* (população da soja), 10– *M. morocciensis* (população do Cerrado), 11 - *M. phaseoli*. (-) controle negativo. M: 1 kb DNA ladder.

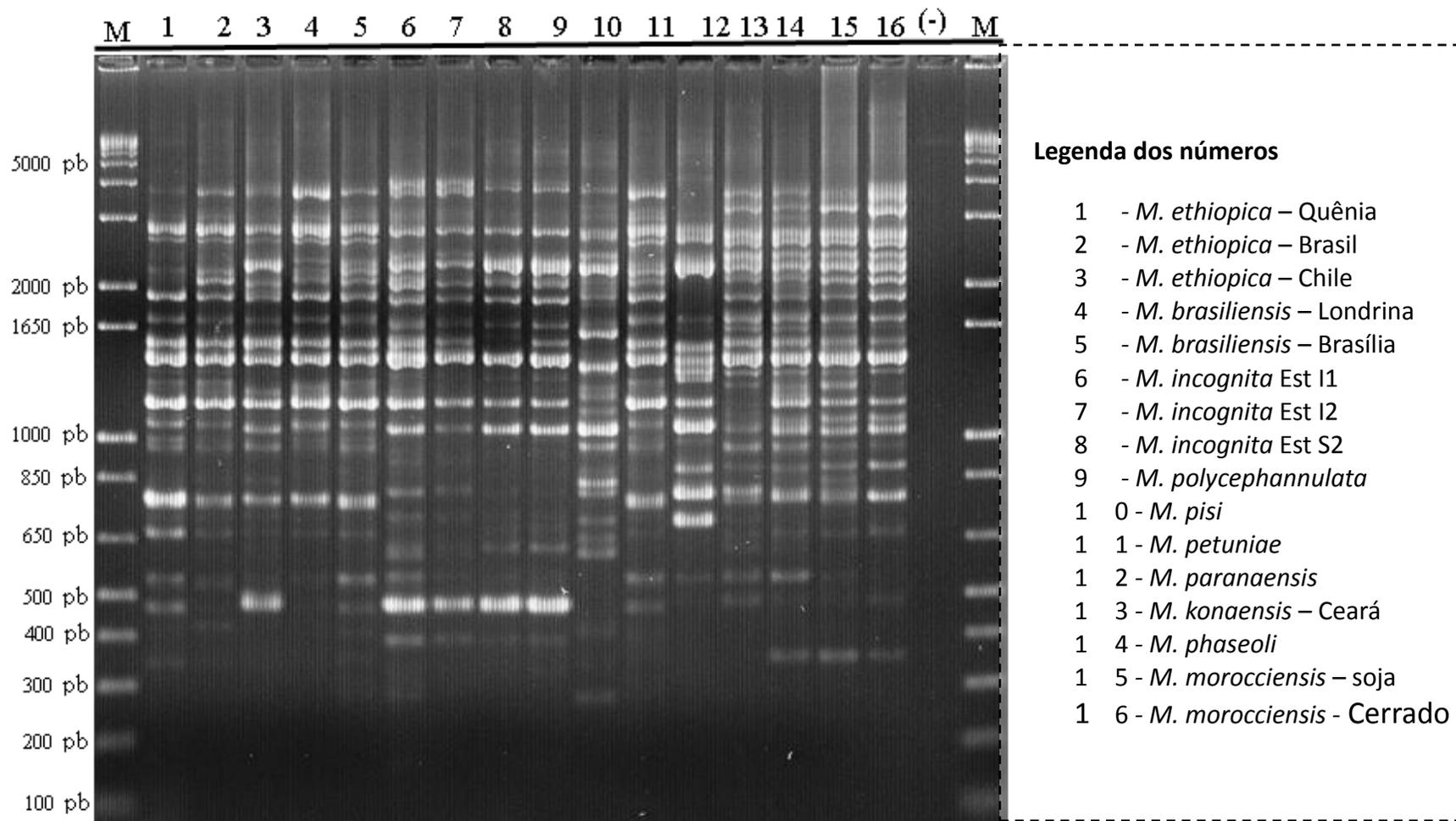


figura 3. Polimorfismo de fragmentos de DNA de 16 populações de *Meloidogyne* spp., gerado pelo primer RAPD V07. As reações foram realizadas em duplicata e a eletroforese em dois géis separados, sendo um a cópia do outro. (-): reação controle sem DNA; M: marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder

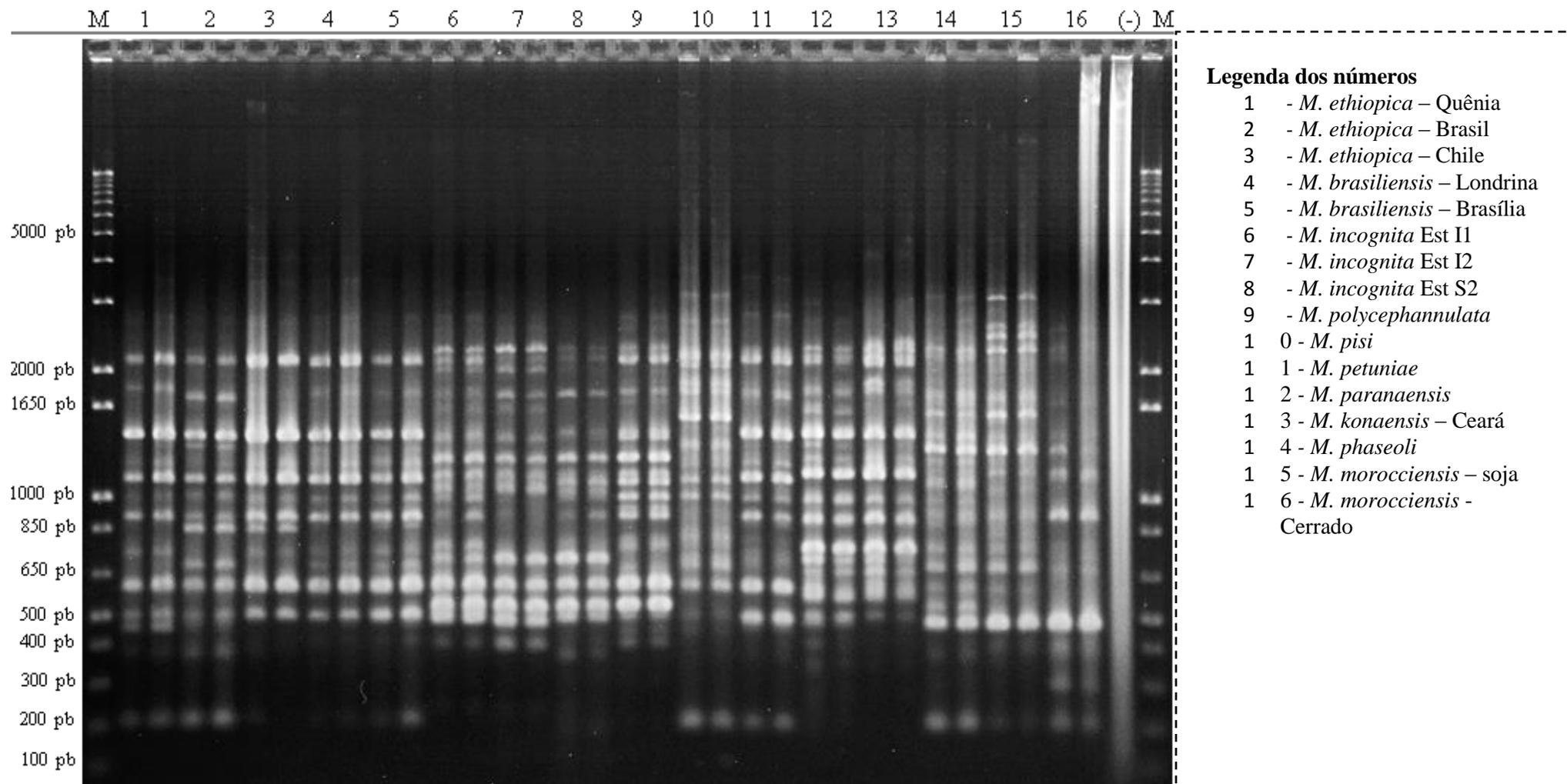


Figura 4. Polimorfismo de fragmentos de DNA de 16 populações de *Meloidogyne* spp., gerado pelo primer AFLP 15. As reações foram realizadas em duplicata e a eletroforese em um mesmo gel contendo as duas reações lado a lado (-): reação controle sem DNA; M: marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder.

Tabela 2. Proporção de fragmentos polimórficos de RAPD e AFLP observados a nível de grupos formados pelas populações de espécies brasileiras de *Meloidogyne* spp. com base na proximidade genética. Os números à direita das espécies indicam a quantidade de populações estudadas.

| Grupos | Fragmentos RAPD + AFLP | |
|--|------------------------|------------------|
| | Amplificados | Polimórficos (%) |
| <i>M. ethiopica</i> (3) + <i>M. brasiliensis</i> (2) (Est E3) | 501 | 204 (40,7) |
| <i>M. incognita</i> (3) + <i>M. polycephannulata</i> (1) (Est I1, I2 e S2) | 429 | 149 (34,7) |
| <i>M. morocciensis</i> (2) + <i>M. phaseoli</i> (1) (Est A3) | 433 | 189 (43,6) |
| <i>M. konaensis</i> (1) + <i>M. paranaensis</i> (1) (Est K3 ≠ Est P1) | 493 | 292 (59,2) |

No entanto, em dendograma obtido dessas mesmas análises por meio do método de Neighbour-Joining tree, as populações de *M. brasiliensis* se agruparam com as de *M. ethiopica* com 77% de suporte de bootstrap, demonstrando a alta proximidade entre elas. Da mesma forma, as populações de *M. phaseoli* e *M. polycephannulata* se agruparam com as de *M. morocciensis* e *M. incognita*, respectivamente com 100% de suporte de bootstrap (Figura 5).

Uma população de *M. konaensis* e uma de *M. paranaensis* incluídas no estudo obtiveram um polimorfismo de 59,2% entre as duas, corroborando com os perfis de RAPD e AFLP visivelmente diferentes (Figuras 2 e 3), e aparecem separadas uma da outra em dendograma (Figura 5).

Meloidogyne petuniae e *M. pisi* possuem perfis de esterases específicos, mas foram incluídas no estudo por se tratarem de espécies brasileiras, e, além de produzirem perfis de RAPD e AFLP diferentes entre si e das demais espécies estudadas, aparecem completamente separadas no dendograma, mostrando que não são espécies próximas entre si e de nenhuma das espécies estudadas (Figura 5).

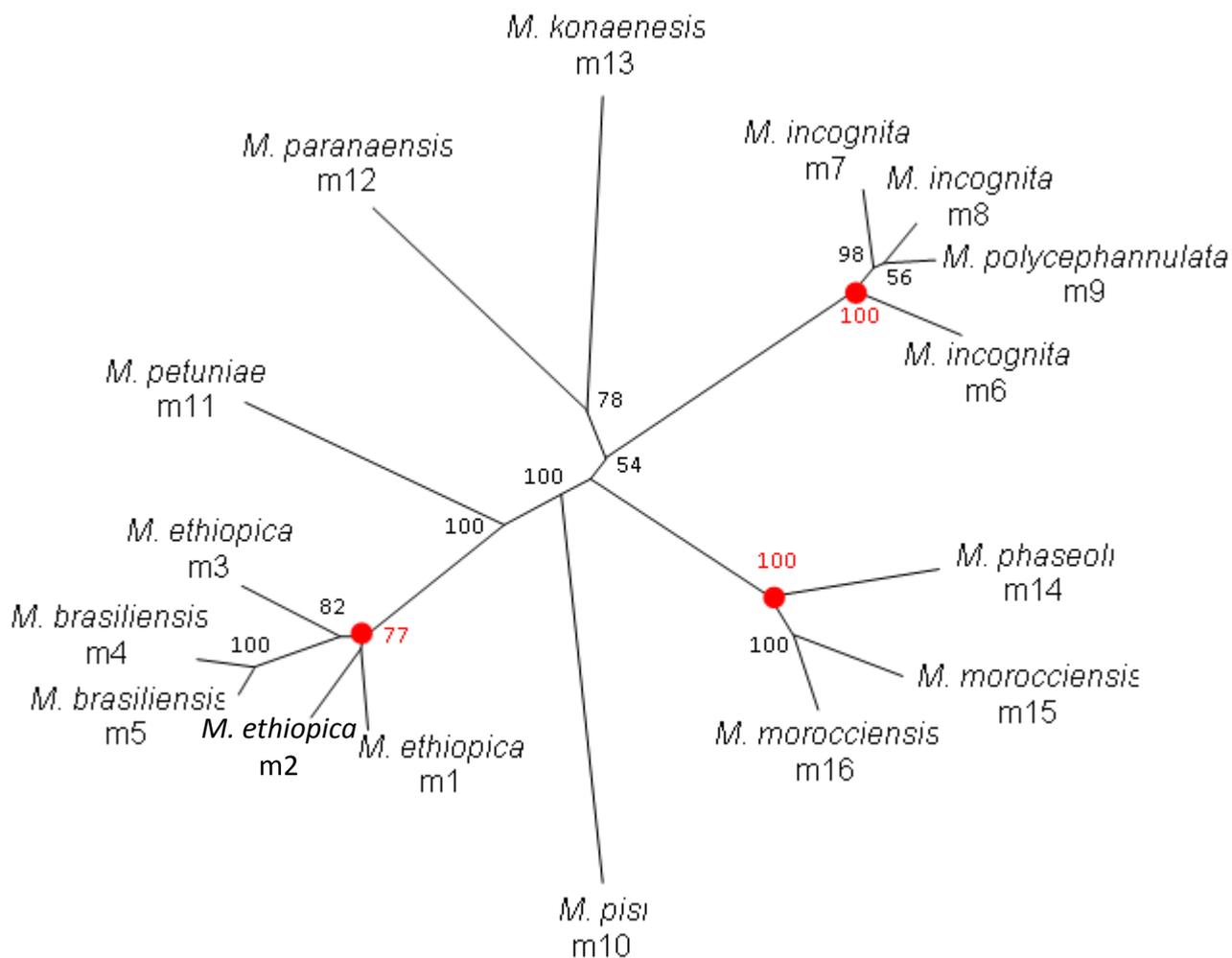


Figura 5. Dendrograma sem raiz gerado a partir da análise conjunta dos marcadores RAPD e AFLP com 16 populações de *Meloidogyne* spp. Somente valores de bootstrap acima de 50% são mostrados. Os códigos abaixo dos nomes das espécies indicam o número da ordem de cada população mostrada na Tabela 1.

DISCUSSÃO

Populações de espécies de *Meloidogyne* descritas no Brasil foram caracterizadas por meio de marcadores enzimáticos e moleculares, e algumas delas revelaram proximidade com espécies descritas anteriormente.

A variabilidade genética intra e interespecífica em *Meloidogyne* spp., já havia sido relatada em estudos anteriores realizados por Blok *et al.* (1997); Ferreira & Grattapaglia, (1998); Semblat *et al.*, (1998); Randig *et al.* (2002); Carneiro *et al.* (2004b); Cofcewicz *et al.* (2004, 2005); Muniz *et al.* (2007); Tigano *et al.*, (2010); Santos *et al.* (2012); Correa *et al.*

(2013) e Mattos (2016), com base nos marcadores moleculares do tipo PCR-RAPD, e PCR-AFLP. Neste estudo, estes mostraram variabilidade genética intraespecífica e interespecífica relativamente altas entre as populações de *Meloidogyne* estudadas.

Neste trabalho, estudos com os marcadores isoenzimáticos e SCAR espécie-específicos, revelaram que *M. ethiopica* e *M. brasiliensis* possuem alta similaridade de identidade com grande probabilidade de serem populações da mesma espécie, assunto a ser tratado no segundo capítulo desta tese.

Este estudo de variabilidade genética com RAPD e AFLP mostrou que as três populações de *M. ethiopica* provenientes do Quênia, Brasil e do Chile, e as duas de *M. brasiliensis* provenientes de Brasília e de Londrina, obtiveram um nível de polimorfismo médio (40,7%), quando comparado com os resultado obtidos por Correa *et al.* (2014), quando estudaram 15 populações de *M. ethiopica* do Brasil e do Chile e obtiveram um baixo polimorfismo de 22,5%, e por Carneiro *et al.* (2004a) em estudo realizado com três populações de *M. ethiopica* provenientes do Brasil, Chile e Quênia, obtendo um polimorfismo de 17,7% . Porém, Correa *et al.*, 2014 estudaram um número maior de isolados.

No entanto, em dendograma resultante das análises deste estudo, essas populações (*M. ethiopica* e *M. brasiliensis*) se agruparam com 77% de bootstrap em análise com o método de Neighbour-Joining.

Meloidogyne ethiopica se reproduz por partenogênese mitótica resultando em progênes clonais (Triantaphyllou, 1985), e com base nisso, são esperados baixos níveis de variabilidade intraespecífica. Mas, a variabilidade média observada entre essas populações pode ter conotação com a variação das origens geográficas ou origem dos hospedeiros.

O nematoide *M. ethiopica* é uma espécie polífaga e altamente prejudicial devido a seu potencial de se disseminar globalmente, assim como a sua capacidade de causar impactos significativos nas culturas de importância econômica (Carneiro *et al.*, 2003, 2007; Lima *et al.*,

2009; Strajnar *et al.*, 2011; Conceição *et al.*, 2012). No mesmo estudo realizado por Correa *et al.* (2014), foi possível desenvolver um par de *primers* capaz de identificar populações de *M. ethiopica*, trazendo mais um avanço à história da identificação desta espécie. Esse par de *primers* amplificou o fragmento alvo de 350 pb nas populações de *M. brasiliensis*, deixando claro de que esta seja uma variante de *M. ethiopica*. Os resultados do estudo da variabilidade genética apresentados aqui, não confirmam o nível real da variabilidade genética intraespecífica para *M. ethiopica* e *M. brasiliensis*, havendo a necessidade de um estudo mais abrangente, envolvendo um número maior de populações dessas espécies para validação dessa avaliação.

Vários estudos têm demonstrado baixo polimorfismo genético intraespecífico em *M. incognita* (Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Block *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2012). Cofcewickz *et al.* (2004), estudando a diversidade genética de nematoides parasitas coletados em *Musa* spp. no Brasil detectaram baixa variabilidade intraespecífica em cinco isolados de *M. incognita* na ordem de 20,1%, com base em marcadores RAPD. Um ano depois, os mesmos autores em outro estudo, relataram também baixo polimorfismo em populações de *M. incognita* (14,9%), quando avaliaram a variabilidade intraespecífica em populações de *Meloidogyne* spp. parasitas de bananeiras (Cofcewicz *et al.*, 2005). Carneiro *et al.* (2004b), também observaram baixo polimorfismo (11%) em populações de *M. incognita* (Est I1 e I2), quando estudaram a variabilidade genética de *Meloidogyne* spp. em cafeeiros no Brasil, América Central e Hawaii pela técnica RAPD.

Neste estudo, três populações de *M. incognita* (Est I1, I2 e S2) e uma população de *M. polycephannulata* produziram um polimorfismo de 34,7%, considerado médio, em relação aos resultados de Mattos *et al.* (2016) com 15,3%, por exemplo. Mas esse resultado está de acordo com Randig *et al.* (2002), que testaram 27 *primers* RAPD e obtiveram um polimorfismo de 30% para quatro populações de *M. incognita* patogênicas ao cafeeiro. No entanto, todas as populações deste estudo, se agruparam com 100% de suporte de bootstrap, corroborando os

resultados de Santos *et al.* (2012), que também obtiveram um agrupamento de 12 populações de *M. incognita* com 100% de bootstrap, ou seja, se a mesma análise for repetida 1000 vezes, há a probabilidade de se obter o mesmo agrupamento, igual a 1 (P=1). *Meloidogyne polycephannulata* mostrou-se idêntica a *M. incognita*, partilhando o perfil de esterase I2 e o mesmo fragmento alvo do DNA amplificado pelo par de *primers* (inck14F/R), desenhado para *M. incognita*. No entanto, são necessários mais estudos de morfologia e morfometria para ter certeza da tal inferência.

Meloidogyne arenaria é a espécie com maior variação morfológica, isoenzimática, citológica e molecular, dentro do gênero *Meloidogyne* (Eisenback & Triantaphyllou, 1991), e se reproduz por partenogênese mitótica obrigatória (Triantaphyllou, 1985). Talvez por isso, seja considerada uma espécie “Swarms”, ou seja, trata-se de um pool de espécies intimamente relacionadas.

Meloidogyne morocciensis foi pela primeira vez descrita no Marrocos, parasitando plantas de pessegueiros, e antes disso, a espécie teria sido identificada como *M. arenaria* com base nos padrões perineais. Em estudo realizado por Tigano *et al.* (2005), isolados de *M. arenaria* e *M. morocciensis* apresentaram fragmentos 18s rDNA amplificados do mesmo tamanho (1.112 pb). Carneiro *et al.* (2008), por sua vez, relataram um estudo em que *M. arenaria* (Est A3 Mdh N1) provenientes da França e do Brasil se agruparam com alto suporte de bootstrap a *M. morocciensis*, e se separaram completamente de populações de *M. arenaria* (Est A1 Mdh N1 e Est A2 Mdh N3). Com base em estudos morfológicos, foi comprovado que as populações Est A3 Mdh N1 eram na verdade *M. morocciensis*. Apesar de hoje, se tratar de duas espécies distintas, elas são intimamente relacionadas uma vez que um marcador SCAR desenhado para *M. arenaria*, amplifica o fragmento alvo de 420 pb em *M. morocciensis*. Apesar de molecularmente idênticas (SCAR), as duas espécies diferem citológica, morfológica e bioquimicamente. Este é com certeza, um dos motivos da obtenção de alto polimorfismo

intraespecíficos entre *M. morocciensis* e *M. phaseoli* (43,6%) neste estudo, por fazerem parte do complexo “Swarms” (complexo *M. arenaria*). No entanto, além da amplificação do fragmento comum de 420 pb, essas populações se agruparam com 100 % de bootstrap, mostrando que talvez se trate de uma só espécie, considerando o perfil de esterase comum entre as duas espécies. Estudos adicionais são necessários para a maior certeza e segurança dessa afirmação.

Meloidogyne konaensis e *M. paranaensis* incluídas neste estudo apresentaram alto polimorfismo interespecífico (59,2%), além de se tratar de duas espécies completamente diferentes em morfologia, citologia e padrões isoenzimáticos (Vide o capítulo 3 desta tese).

Meloidogyne petuniae e *M. pisi*, são espécies diferentes entre si e das outras espécies em todos os aspectos estudados.

CONCLUSÕES

As espécies *Meloidogyne brasiliensis*, *M. polycephannulata* e *M. phaseoli* possuem um altíssimo grau de proximidade genética e fenotípica, com *M. ethiopica*, *M. incognita* e *M. morocciensis*, respectivamente, podendo tratar-se de espécies previamente descritas. *Meloidogyne petuniae* e *M. pisi* mostraram ser espécies genética e fenotipicamente distintas entre si e das demais espécies deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLOK, V.C.; PHILLIPS, M.S.; MCNICOL, J.W. & FARGETTE, M. 1997. Genetic variation in tropical *Meloidogyne* spp. as shown by RAPDs. *Fundamental and Applied Nematology* 20:127-133.
- CARNEIRO, R. M. D. & ALMEIDA, M. R. A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécie. *Nematologia Brasileira* 25:35-44.

- CARNEIRO, R.M.D.G.; GOMES, C.B.; ALMEIDA, A.C.M.M. & MARTINS, I. 2003. First record of *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968 on kiwi in Brazil and reaction of different plant species. *Nematologia Brasileira* 27(2): 152-158.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; COFCEWICZ, E.T.; MAGUNACELAYA, J.C. & ABALLAY, E. 2007. *Meloidogyne ethiopica*, a major root-knot nematode parasitizing *Vitis vinifera* and other crops in Chile. *Nematology* 9(5): 635-641.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A.; GOMES, A.C.M.M. 2004a. Additional Information on *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968 (Tylenchida: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising kiwi and grape-vine from Brazil and Chile. *Nematology* 6:109-123.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; SANTOS, M.F.A.; ALMEIDA, M.R.A.; MOTA, F.C.; GOMES, A.C.M.M. & TIGANO, M.S. 2008. Diversity of *Meloidogyne arenaria* using morphological, cytological and molecular approaches. *Nematology* 10:819-834.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; TIGANO, M.S.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A. & SARAH, J.L. 2004b. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology* 6:287-298.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; WANLERBERGHE-MASSUTTI, F. & LEROY, F. 1994. Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers. *Genome* 37:904-909.
- CHARCHAR, J.M. & EISENBACK, J.D. 2002. *Meloidogyne brasiliensis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising tomato cv. Rossol in Brazil. *Nematology* 4:629-643.
- CHARCHAR, J.M.; EISENBACK, J.D. & 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, J.M.; EISENBACK, J.D.; CHARCHAR, M.J. & BOITEUX, M.E.N.F. 2008a. *Meloidogyne pisi* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising pea in Brazil. *Nematology* 10:479-493.

- CHARCHAR, J.M.; EISENBACK, J.D.; CHARCHAR, M.J. & BOITEUX, M.E.N.F. 2008b. *Meloidogyne phaseoli* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising bean in Brazil. *Nematology* 10:525–538.
- CHARCHAR, J.M.; EISENBACK, J.D.; VIEIRA, J.V.; BOITEUX, M.E.N.F. & BOITEUX, L.S. 2009. *Meloidogyne polycephannulata* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing corrot in Brazil. *Journal of Nematology* 41 (3): 174-186.
- COFCEWICZ, E.T.; CARNEIRO, R.M.D.G.; CASTAGNONE-SERENO, P. & QUÉNÉHERVÉ, P. 2004. Enzyme phenotypes and genetic diversity of root-knot nematodes parasitising *Musa* in Brazil. *Nematology* 6: 85-95.
- COFCEWICZ, E.T.; CARNEIRO, R.M.D.G.; RANDIG, O.; CHAMBRIER, C. & QUÉNÉHERVÉ, P. 2005. Diversity of *Meloidogyne* spp. on *Musa* in Martinique, Guadeloupe and French Guiana. *Journal of Nematology* 37: 313-322.
- CONCEIÇÃO, I. L.; TZORTZAKAKIS, E.A.; GOMES, P.; ABRANTES, I. & CUNHA, M.J. 2012. Detection of root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* in Greece. *European Journal of Plant Pathology* 134:451-457.
- CORREA, V.R.; MATTOS, V.S.; ALMEIDA, M.R.A.; SANTOS, M.F.A.; TIGANO, M.S.; CASTAGNONE-SERENO, P. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2014. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* and development of a specie-specific SCAR marker for this diagnosis. *Plant Pathology*, 63:476-483.
- EISENBACK, J.D. & TRIANTAPHYLLOU, H.H. 1991. Root-knot nematode: *Meloidogyne* spp. and races. In: Nickle, W.R. (ed.). *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, New York, p. 191–274.
- ESBENSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida). *Journal of Nematology* 17: 6-20.

- ESBENSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 22: 10-15.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. EMBRAPA-CENARGEN, Documento 20, 220p.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª edição. Embrapa. Brasília-DF
- HADRY, H.; BALICK, M. & SCHIERWATER, B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1:55-63.
- HANDRICK, J.L. & GODT, M.J.W. 1989. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L., Weir, B.S., (eds). *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, p. 43–63.
- LIMA, E. A.; MATTOS, J. K.; MOITA, A. W.; CARNEIRO, R. G. & CARNEIRO, R. M. D. G. 2009. Host status different crops for *Meloidogyne ethiopica* control. *Tropical Plant Pathology* 34(3):152-157.
- MATTOS, V.S. 2010. Variabilidade genética de populações de *Meloidogyne incognita* patogênicas ao algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) através de marcadores moleculares. Monografia (Bacharelado em Agronomia)—Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.
- MATTOS, V.S.; FURLANETTO, C.; SILVA, J.G.P.; SANTOS, D.F.; ALMEIDA, M.R.A.; CORREA, V.D.; MOITA, A.W.; CASTAGNONE-SERENO, P & CARNEIRO, R.M.D.G. 2016. *Meloidogyne* spp. populations from native Cerrado and soybean cultivated areas: genetic variability and aggressiveness. *Nematology* 00:1-11.
- MUNIZ, M.F.S.; CAMPOS, V.P.; MOITA, A.W.; GONÇALVES, W. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2007. Reação de genótipos de cafeeiro a populações de *Meloidogyne exigua*: detecção de virulência natural ao gene Mex-1. Resumos: 27 Congresso Brasileiro de Nematologia, Goiânia, 7-11 maio 2007, p. 84- 85.

- NEWTON, A.C.; ALLNUTT, T.R.; GILLIES, A.C.M.; LOWE, A.J. & ENNOS, R.A. 1999. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in Ecology and Evolution* 14:140-145.
- RANDIG, O.; BONGIOVANNI, M.; CARNEIRO, R.M.D.G. & CASTAGNONE-SERENO, P. 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome* 45: 862-870.
- SANTOS, M.F.A.; FURLANETTO, C.; CARNEIRO, M. D. G.; ALMEIDA, M. R.A.; MOTA, F.C.; GOMES, A.C.M.M.; SILVEIRA, N.O.R.; SILVA, J.G.P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; TIGANO, M. S. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2012. Biometrical, biological, biochemical and molecular characteristics of *Meloidogyne incognita* isolates and related species. *European Journal of Plant Pathology* 134:671–684.
- SEMBLAT, J.P.; WAJNBERG, E.; DALMASSO, A.; ABAD, P. & CASTAGNONE-SERENO, P. 1998. High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis. *Molecular Ecology* 7:119-125.
- STRAJNAR, S.; SIRCA, S.; KNAPIC, M. & UREK, G. 2011. Effect of Slovenian climatic conditions on the development and survival of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica*. *European Journal of Plant Pathology* 129: 81–88.
- SUAZO, A. & HALL, H.G. 1999. Modification of the AFLP protocol applied to honey bee (*Apis mellifera* L.) DNA. *BioTechniques* 26: 704–709.
- SWOFFORD, D.L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), version 4. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates.
- TIGANO, M.S.; CARNEIRO, R.M.; JEYAPRAKASH, A.; DICKSON, D.W. & ADAMS, B. J. 2005. Phylogeny of *Meloidogyne* spp. based on 18S rDNA and the intergenic region of mitochondrial DNA sequences. *Nematology* 7(6):851-862.
- TIGANO, M.; SIQUEIRA, K.; CASTAGNONE-SERENO, P.; MULET, K.; QUEIROZ, P.; SANTOS, M.; TEIXEIRA, C.; ALMEIDA, M.; SILVA, J. & CARNEIRO R. 2010. Genetic

diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* and development for SCAR marker for this guava-damaging species. *Plant Pathology* 59: 1054-1061.

TRIANANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Cytogenetics, taxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. *In: Carter, C.C. & Sasser, J.N. (eds). An advanced treatise on Meloidogyne, v. 2, Biology and control. Raleigh, North Carolina State University Graphics. p. 113-126.*

ZIJLSTRA, C.; DONKERS-VENNE, D.T.H.M. & FARGETTE, M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified regions (SCAR) based PCR assays. *Nematology* 2:847-853.

CAPÍTULO 2. MELOIDOGYNE BRASILIENSIS UM SINÔNIMO JÚNIOR DE M. ETHIOPICA WHITEHEAD, 1968

RESUMO - O nematoide-das-galhas *Meloidogyne brasiliensis* é sinonimizado com *Meloidogyne ethiopica* com base nas similaridades morfológicas e morfométricas, caracterização bioquímica e molecular, e estudo de filogenia. *Meloidogyne ethiopica* foi pela primeira vez descrita em 1968 na Tanzânia (considerada localidade tipo) na cultura de tomate (hospedeira tipo). Em 2004 no Brasil, a espécie foi redescrita com base na comparação das populações do Brasil, Chile e Quênia, onde foram detectadas ligeiras variações entre os caracteres morfológicos e morfométricos, mas não foram observadas características distintas suficientes para separá-las em espécies diferentes. Já *Meloidogyne brasiliensis* foi descrita em 2002 no Brasil, nas culturas de tomate cv. Rossol provenientes de Londrina e em ervilha cv. Mikado no Distrito Federal. Estudos envolvendo comparações da descrição e da redescricao de *M. ethiopica* com a descrição de *M. brasiliensis* revelaram importantes similaridades de certos caracteres morfológicos e morfométricos. O perfil da isoenzima esterase (E3) específico para *M. ethiopica* é perfeitamente idêntico ao de *M. brasiliensis*. O marcador SCAR espécie - específico para *M. ethiopica* quando testado em *M. brasiliensis*, gerou o mesmo fragmento de banda de 350 pares de base. Em estudo com sequências das regiões ITS1-5.8S-ITS2 e o fragmento D2D3 do gene 28S do rDNA, as populações de ambas espécies se agruparam na mesma clade com 100 % e 90% de bootstrap, respectivamente. Esses resultados fornecem evidências suficientes de que *M. brasiliensis* não é uma espécie válida, mas sim, um sinônimo júnior de *M. ethiopica*.

Palavras-Chave: Brasil, D2D3 (28S), fenótipo de esterase, ITS1-5.8S-ITS2, marcador SCAR, Morfologia, morfometria, Tanzânia, tomate cv. Rossol.

CHAPTER 2. MELOIDODOGYNE BRASILIENSIS A JUNIOR SYNONYM OF *M. ETHIOPICA*

ABSTRACT - The root-knot nematode *Meloidogyne brasiliensis* is synonymized as *M. ethiopica* based on morphological and morphometric similarities, as well as through biochemical and molecular characterization, and studies of phylogeny. *Meloidogyne ethiopica* was first described in 1968 in Tanzania (considered type locality) in tomato plants (host type). In 2003 in Brazil, the species was redescribed based on the comparison of populations from Brazil, Chile and Kenya, where they showed slight variations in morphological and morphometric characters, but did not show enough differences to separate them in distinct species. *Meloidogyne brasiliensis* was described in 2002 in Brazil, in tomato plants cv. Rossol from Londrina, and pea cv. Mikado from Brazilian Federal District. Studies involving comparisons of description and redescription of *M. ethiopica* with the description of *M. brasiliensis*, revealed important similarities of certain morphological and morphometric characters, with small variability of some of them. The esterase profile (E3) specific for *M. ethiopica* is perfectly identical to the one of *M. brasiliensis*. The species - specific SCAR marker of *M. ethiopica* when tested in *M. brasiliensis*, generated the same fragment of 350 bp. In a phylogenetic study with sequences of ITS1-ITS2 and D2D3 (28S) of rRNA regions, populations of both species clustered in the same clade with 100 % and 90 % bootstrap support, respectively. These results provide sufficient evidence that *M. brasiliensis* is not a valid species, but rather a junior synonym of *M. ethiopica*.

Key Words: Brazil, D2D3 (28S), esterase profile, ITS1-5.8S-ITS2, morphology, morphometry, pea cv. Mikado, SCAR marker, Tanzania, tomato cv. Rossol.

INTRODUÇÃO

O gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1887 compreende a maioria dos nematoides formadores de galhas radiculares. Contém mais de 100 espécies descritas (Karssen & Moens, 2006), e os seus membros são, sem dúvida, os organismos mais amplamente distribuído de todos os nematoides parasitas de plantas (Sasser, 1977). Esta distribuição ampla e sua importância econômica são os principais motivos pelos quais, nematoides do gênero têm sido objeto de pesquisas mais intensas, quando comparados com quaisquer outros nematoides parasitas de plantas, incluindo os nematoides formadores de cisto (Sasser & Carter, 1982). Apesar dos numerosos estudos sobre sua biologia e taxonomia, a sua identificação a nível de espécie, ainda representa um grande desafio para muitos pesquisadores (Blok & Powers, 2009), principalmente devido à pequena variação morfológica inter-específica (Jepson, 1987). Com o advento das isoenzimas e técnicas moleculares, a identificação de várias espécies se tornou bem mais simples através dos fenótipos das esterases e marcadores SCAR (Blok & Powers, 2009).

Meloidogyne ethiopica Whitehead, 1968 é um nematoide fitopatogênico de hábito polífago, classificado como uma espécie de nematoide-das-galhas de regiões de clima tropical, mas tem sido detectada em condições de clima temperado, como na Europa (Strajnar *et al.*, 2011) e no Chile (Carneiro *et al.*, 2007). É considerada uma espécie altamente prejudicial, pela sua capacidade de se multiplicar em diferentes tipos de plantas (dicotiledôneas e monocotiledôneas). A espécie foi descrita através de uma população proveniente de uma única massa de ovos inoculada em tomateiro (hospedeiro tipo) da região de Mlalo, Distrito de Lushoto, Província de Tanga, Tanzânia (localidade tipo). No continente africano foram relatadas mais de 10 espécies de plantas hospedeiras de *M. ethiopica*, incluindo feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), pimenteira (*Capsicum annum* L.), repolho (*Brassica oleracea var. capitata* L.), alface (*Lactuca sativa* L.), abóbora (*Cucurbita pepo* L.), e tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) (Whitehead, 1968; 1969).

Hoje, além da Tanzânia, há relatos de ocorrência da espécie em países como Etiópia, Quênia, Moçambique, África do Sul e Zimbábue, na África. Na Europa, o nematoide foi relatado na Eslovênia, Grécia e Grécia Continental, e na América do Sul, está presente no Brasil, Chile e Peru (EPPO, 2015). Foi introduzida no Rio Grande do Sul e disseminado nesse estado, por meio de material vegetal proveniente do Chile, onde esse nematoide está amplamente disseminado e, vem causando sérios prejuízos à videira (Carneiro *et al.*, 2007). Hoje no Brasil, o nematoide está presente nos estados de Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Distrito Federal (EPPO, 2015).

Embora *M. ethiopica* tenha sido detectada inicialmente no Brasil parasitando apenas quivi, testes de hospedabilidade evidenciaram que a cultivar de videira Niágara Rosada é altamente suscetível a esse nematoide (Carneiro *et al.*, 2003). Bioquimicamente, o fenótipo de esterase E3 (Rm: 0,9, 1,15 e 1,35) é espécie-específico e é um dos critérios mais utilizados para diferenciar *M. ethiopica* de outras espécies do nematoide-das-galhas (Carneiro *et al.*, 2004a).

Carneiro *et al.* (2003) detectaram *M. ethiopica* no Brasil parasitando plantas de quivi (*Actinidia deliciosa* (Chevalier) Liang & Ferguson) no estado do Rio Grande do Sul, e, em plantas de uvas (*Vitis vinifera* L.) em Casablanca, Chile. Essa espécie foi redescrita a partir da população brasileira de Farroupilha (RS) e, comparada com a descrição de *M. ethiopica* da Tanzânia (Whitehead, 1968), e enzimática e molecularmente com outra população proveniente do Quênia. Os resultados mostraram que essas populações apresentaram o mesmo perfil de esterase E3 e alta similaridade genética, cerca de 82%, e todas as populações se agruparam em uma mesma clade, confirmando que as três populações eram da mesma espécie (Carneiro *et al.*, 2004a). Correa *et al.* (2014) estudaram 15 populações de *M. ethiopica* provenientes do Chile, do Brasil e Africa, com marcadores RAPD e AFLP e obtiveram um baixo polimorfismo na ordem de 22,5%, e um marcador SCAR espécie-específico foi desenvolvido para identificação molecular de *M. ethiopica*.

Meloidogyne brasiliensis Charchar & Eisenback, 2002, foi descrita e ilustrada a partir de espécimes que parasitavam raízes de tomateiro cv. Rossol que é considerada resistente a *M. incognita* (Kofoid & White, 1919), Chitwood, 1949 e *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 (Sasser & Kirby, 1979), na Fazenda João Alves, Londrina, e em plantas de ervilha (*Pisum sativum* L.) cv. Mikado no Distrito Federal (DF).

Objetivando incluir todas as populações de espécies brasileiras de *Meloidogyne* na Coleção Nacional de Criopreservação de *Meloidogyne* spp. da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa Cenargen), as populações de *M. brasiliensis*, juntamente com outras espécies descritas recentemente no Brasil, foram submetidas à análise bioquímica como parte do procedimento padrão. Os resultados das análises revelaram um padrão de esterase de *M. brasiliensis* idêntico ao de *M. ethiopica* E3 (Rm: 0,9, 1,05 e 1,20), chamando a atenção para a possibilidade de serem a mesma espécie.

O objetivo deste trabalho foi sinonimizar *M. brasiliensis* com *M. ethiopica* com base na comparação morfológica das duas espécies, análises dos fenótipos de esterase, marcador SCAR espécie – específico e estudo da proximidade genética por meio de análise de sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 e fragmento D2D3 do gene 28S.

MATERIAL E MÉTODOS

Populações de nematoides

As populações puras de *M. ethiopica* provenientes de três países (Quênia, Brasil e Chile) e de *M. brasiliensis* de dois locais do Brasil (Londrina-PR, e Gama-DF), foram mantidas em regime de reinoculação periódica em plantas de tomate (*S. lycopersicum* L. cv. Santa Clara) em casa de vegetação, sob temperatura de 22-28 °C. Todos os estudos bioquímicos, biológicos e moleculares foram realizados utilizando-se espécimes dessas culturas. Os ovos para

análises de DNA foram extraídos de raízes infectadas conforme metodologia descrita por Carneiro *et al.* (2004b).

Estudos morfológicos e morfométricos

Embora a descrição original de *M. ethiopica* seja pouquíssimo detalhada (Whitehead, 1968), a sua redescricao realizada por Carneiro *et al.* (2004a) e a descricao de *M. brasiliensis* Charchar & Eisenback (2002) forneceram subsídios suficientes para comparacao. Devido a esse aspecto, os estudos de morfometria e morfologia foram realizados com base apenas na análise comparativa dos dados morfo-biométricos contidos nas descrições originais das duas espécies e redescricao de *M. ethiopica*, observando-se os dados dos caracteres diagnósticos sugeridos por Eisenback & Hunt (2009). As lâminas de holótipos e parátipos foram utilizadas durante a redescricao de *M. ethiopica*, porém, não estavam em boas condições de preservacao, por isso não foram novamente solicitadas.

Estudos bioquímicos e biológicos

O estudo isoenzimático foi feito com a caracterizacao das esterases (Est), usando gel de poliacrilamida 7%, de acordo com Carneiro & Almeida (2001). Extratos proteicos de fêmeas de *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 jovens e leitosas foram incluídos em cada gel, como fenótipo padrão para a caracterizacao da enzima esterase. Os fenótipos foram designados pelas letras sugestivas do nome da espécie, acompanhada de um número que indica o número de bandas (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; 1990).

O teste com hospedeiras diferenciadoras foi realizado para *M. brasiliensis* com as seguintes espécies botânicas: algodão cv. Deltapine 61, fumo cv. NC95, pimentão cv. Early California Wonder, melancia cv. Charleston Gray, amendoim cv. Florunner e tomate cv. Rutgers (Hartman & Sasser, 1985).

Cada planta foi inoculada com 5000 J2s de *M. brasiliensis*, e mantidas sob condições de casa de vegetação a 22-28 °C, com irrigação e adubação necessárias. Três meses depois, o sistema radicular foi lavado com água de torneira, e os ovos foram extraídos usando uma solução de NaOCl [1%] (Hartman & Sasser, 1985) e, quantificados com auxílio de um microscópio de luz, usando lâminas de Peters. O fator de reprodução (FR) foi calculado como $FR=PF/PI$, onde, PF=população final e PI=população inicial (PI=5000). Foram consideradas hospedeiras suscetíveis, as plantas que apresentaram $FR \geq 1$, com índice de galhas (nota) maior que 2 (mais de 11 galhas ou massas de ovos) e resistentes aquelas que apresentaram $FR \leq 1$ e nota ≤ 2 (0-10 galhas ou massa de ovos) (Taylor & Sasser, 1978).

Análises moleculares

Ovos de nematoides foram extraídos de raízes de tomateiros infectadas e armazenados a -80°C, até o momento do uso. Para cada população de nematoides, o DNA genômico foi extraído e purificado de alíquotas de 200 – 300 µl de ovos, seguindo o procedimento clássico fenol – clorofórmio (Randig *et al.*, 2002).

Para a reação de PCR com marcadores espécie-específicos SCAR, foram avaliadas as populações de *M. ethiopica* (Est E3), provenientes do Quênia, Chile e Brasil, e *M. brasiliensis* (Est E3), provenientes de Londrina e Brasília. Foram utilizados primers SCAR, espécie-específicos, descritos para a identificação de *M. ethiopica* (Correa *et al.*, 2014).

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µl, contendo 2 µl de DNA genômico [3 ng/µl], 1 µl de cada primer (Operon Technologies, Alameda, CA, EUA), 4 µl de dNTPs [1,25 mM] (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) (Invitrogen ®, São Paulo, Brasil), 2,5 µl de tampão de reação 1X + MgCl₂ (Phoneutria Biotecnologia & Serviços-pht ®, São Paulo, Brasil), 0,25 µl da enzima Taq DNA polimerase (pht ®) e 14,25 µl de água Milli-Q. Para as amplificações, foi utilizado o termociclador PTC-100 (MJ Research), programado de acordo

com as condições descritas para o conjunto de primers de *M. ethiopica* (Meth F/R 350 pb): desnaturação inicial do DNA por 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 45 seg. a 66 °C, 1 min a 70 °C e extensão final de 8 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.

O sequenciamento das regiões ITS1 – 5.8S - ITS2 e dea subunidade D2-D3 do gene 28S do rDNA foram realizados utilizando as metodologias descritas por Castillo *et al.* (2003), Tigano *et al.* (2005) e Holterman *et al.* (2006). Para as análises filogenéticas de regiões específicas do rDNA, os fragmentos foram amplificados com os conjuntos de primers ITS1-5.8S-ITS2 e 28 S (D2D3) (Tabela 1), utilizando as condições de PCR descritas por Subbotin *et al.*, (2000).

Tabela 1: Sequencias dos primers ITS1-ITS2 e D2D3 utilizados na amplificação para clonagem e sequenciamento.

| Regiões | Sequências | Referências |
|----------------|---|------------------------------|
| ITS1-5.8S-ITS2 | Forward: 5-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3 Reverse: 5-TCCTCCGCTAAATGATATG-3 | Schmitz <i>et al.</i> , 1998 |
| D2-D3 | Forward: 5-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3 Reverse: 5-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3 | De Ley <i>et al.</i> , 1999 |

Os produtos de PCR foram cortados do gel de agarose, utilizando o kit de extração Wizard®SV Gel/PCR Clean Up (Promega, Inc®) e clonados com o Kit de clonagem pGEM-T® Easy vector (Promega, Inc®), seguindo as instruções do fabricante.

O sequenciamento do inserto foi realizado em dois clones independentes pela Macrogen. As sequências de DNA das populações de *M. ethiopica* e *M. brasiliensis* foram

alinhadas e comparadas com sequências de populações de outras espécies de *Meloidogyne* spp. depositadas no banco de dados do NCBI (GenBank) (Tabela 2), e também com todas as outras populações envolvidas neste estudo (Tabela 3) através do programa ClustalX versão 1.83 com parâmetros padrões (Thompson *et al.*, 1997) e a árvore filogenética foi gerada usando o Neighbour-Joining (Saitou & Nei, 1987) para as regiões ITS1-5.8S-ITS2, e parcimonia para os fragmentos D2D3 (28S), através do programa PAUP v 4.0 (Swofford, 2002). Uma sequência de *Pratylenchus zae* Graham, 1951 (KF765428.1) foi utilizada como “outgroup” na árvore filogenética das regiões ITS1-5.8S-ITS2, e *P. vulnus* Allen & Jensen, 1951 (JX047009.1) na árvore D2D3.

Tabela 2. Lista de números de acessos do NCBI (BenBank) usados para gerar as árvores filogenéticas.

| Região ITS1-5.8S-ITS2 | | | Região D2D3 (28S) | | |
|-------------------------|----------------|--------------------------------|----------------------------|----------------|-------------------------------|
| Espécies | Código do NCBI | Referências | Espécies | Código do NCBI | Referências |
| <i>M. naasi</i> | AY302249.1 | Karssen <i>et al.</i> , 2003 | <i>M. hapla</i> | KJ755183.1 | Liao & Zhang, 2014 |
| <i>M. graminicola</i> | KJ572383.1 | Chen, 2014 | <i>M. paranaensis</i> | AF435799.1 | De Ley <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>M. enterolobii</i> | JF309158.1 | Humphreys <i>et al.</i> , 2011 | <i>M. arenaria</i> | KJ598135.1 | Hen, 2014 |
| <i>M. inornata</i> | KF482368.1 | Carneiro <i>et al.</i> , 2013 | <i>M. javanica</i> | JX100426.1 | Wu <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>M. hispanica</i> | JX885741.1 | Wang <i>et al.</i> , 2012 | <i>M. incognita</i> | JX100425.1 | Wu <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>M. arenaria</i> | AY438554.1 | Liao, 2003 | <i>M. konaensis</i> | AF435797.1 | De Ley <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>M. javanica</i> | KJ739710.1 | Ghule <i>et al.</i> , 2014 | <i>M. enterolobii</i> | KJ146862.1 | Wang <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>M. hapla</i> | AF516722.1 | Quader & Riley, 2002 | <i>M. hispanica</i> | EU443606.1 | Landa <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Pratylenchus zae</i> | Kf765428.1 | Wang <i>et al.</i> , 2015 | <i>M. inornata</i> | KF482374.1 | Carneiro <i>et al.</i> , 2013 |
| | | | <i>M. graminicola</i> | KF751067.1 | Wu <i>et al.</i> , 2013 |
| | | | <i>M. exigua</i> | AF435795.1 | Tenente <i>et al.</i> , 2001 |
| | | | <i>Pratylenchus vulnus</i> | JX047009 | Wang <i>et al.</i> , 2012 |

Tabela 3: Populações de *Meloidogyne* spp. utilizadas nas análises bioquímicas, moleculares, e estudos de filogenia.

| Código | População (perfis de esterase) | Origem |
|--------|---------------------------------|---------------------------------------|
| 1 | <i>Meloidogyne ethiopica</i> E3 | Quênia |
| 2 | <i>M. ethiopica</i> E3 | Brasil |
| 3 | <i>M. ethiopica</i> E3 | Chile |
| 4 | <i>M. brasiliensis</i> E3 | Londrina, PR |
| 5 | <i>M. brasiliensis</i> E3 | Brasília, DF |
| 6 | <i>M. incognita</i> I1 | Londrina, PR |
| 7 | <i>M. incognita</i> I2 | Londrina, PR |
| 8 | <i>M. incognita</i> S2 | Garça, SP |
| 9 | <i>M. polycephannulata</i> I2 | Minas Gerais |
| 10 | <i>M. pisi</i> Pi5 | Brasília, DF |
| 11 | <i>M. petuniae</i> Pe2 | Brasília, DF |
| 12 | <i>M. paranaensis</i> P1 | Piumbi, SP |
| 13 | <i>M. konaensis</i> K3 | Ceará |
| 14 | <i>M. phaseoli</i> A3 | Brasília, DF |
| 15 | <i>M. morocciensis</i> A3 | Soja (Santa Rosa, RS) |
| 16 | <i>M. morocciensis</i> A3 | Cerrado (Parque Nacional de Brasília) |

RESULTADOS

Morfologia

De um modo geral, a morfologia de *M. ethiopica* descrita originalmente de um isolado proveniente da Tanzânia por Whitehead (1968), apesar de pouco detalhada, corrobora com a redescritção realizada vários anos depois no Brasil por Carneiro *et al.* (2004a), e ambos

concordam com a morfologia descrita para *M. brasiliensis* Charchar & Eisenback (2002). Essas três descrições apresentam variações morfométricas já esperadas, entre populações da mesma espécie. Por serem as duas últimas descrições muito completas, não houve necessidade neste capítulo da realização de outros estudos morfológicos e morfométricos, de maneira que serão utilizadas as três descrições para sinonimizar as duas espécies.

A seguir são descritas as características morfológicas consideradas como sendo as mais diferenciais para discriminação de espécies dentro do gênero *Meloidogyne*, segundo Jepson (1987) e Karssen (2002). Nas Tabelas 4, 5 e 6 são apresentadas as descrições comparativas da morfologia de *M. ethiopica* e *M. brasiliensis*, com base nos estudos das características dos machos, fêmeas e J2s, segundo a descrição original de *M. ethiopica*, sua redescrição e a descrição de *M. brasiliensis*.

Fêmea

Padrão perineal: O formato dos padrões perineais varia de oval a quadrangular, as estrias são grossas e espaçadas entre si, usualmente contínuas, às vezes suaves e outras onduladas, término da cauda às vezes distinto, com ou sem estrias descontínuas. Dobras cuticulares presentes sobre o ânus. Fenda vulvar sem estrias próximas ao campo lateral. Fasmídios distintos. Arco dorsal moderadamente alto, às vezes com o formato arredondado, assemelhando-se a *M. arenaria* e outras com o formato quadrangular assemelhando-se a *M. incognita*, mas nunca formando “ombros”. Linhas laterais distintas ausentes, mas com pequenas estrias laterais próximo à área dos fasmídios. A região ventral arredondada (Ver detalhes Fig. 1C-F e 3 A-D de Carneiro *et al.* (2004a), Fig. 3 G-I e 4 A-F de Charchar & Eisenback (2002) em anexo).

Estilete: O estilete é robusto com o cone ligeiramente curvado dorsalmente em alguns exemplares, aumentando o seu diâmetro no sentido posterior. A haste possui um

alargamento na região próxima aos nódulos. Os nódulos são redondos e se afinam gradualmente em direção à haste (Ver detalhes Fig. 2 C-D de Carneiro *et al.* (2004a) e Fig. 2 D de Charchar & Eisenback (2002) em anexo).

Poro excretor: O poro excretor se localiza em posições variáveis entre a abertura da glândula faríngea dorsal (DEGO) e o metacorpo (Ver detalhes Fig. 1 A, G de Carneiro *et al.* (2004a) e Fig. 3 F Charchar & Eisenback (2002) em anexo).

Macho

Região anterior: O corpo do macho é vermiforme se afinando anteriormente e é abruptamente arredondado posteriormente. A região labial é alta, redonda, contínua com o contorno do corpo, mas às vezes marcada por anelacão incompleta. Sob microscópio de luz, o esqueleto cefálico é fortemente desenvolvido, com o vestíbulo e sua extensão bem distintos. A cápsula cefálica possui o disco labial bem distinto e cercado pelas aberturas dos anfídios em formato de fendas. Em vista frontal analisada ao MEV, o disco labial é alto, variando de pouco circular a hexagonal, distintamente separado dos lábios medianos. Lábios medianos são fundidos, com diâmetro menor do que o do disco labial e possuem distintas indentações laterais na junção com o disco labial. As sensilas cefálicas são obscuras. Os lábios laterais são ausentes. A abertura do estoma em formato de fenda é situada abaixo da grande cavidade hexagonal pré-estomática. O pró-corpo é bem definido, o metacorpo é oval, com válvula grande. A junção faringo-intestinal é obscura e situada na altura do anel nervoso. Os lobos das glândulas variam em comprimento, com apenas dois núcleos visíveis. (Ver detalhes nas Fig. 4 A-E, Fig. 5 A-L de Carneiro *et al.* (2004a) e Fig. 5 A-C, Fig 6 A-C de Charchar & Eisenback (2002) em anexo).

Estilete: O estilete é robusto e largo com o cone reto, pontiagudo e tão longo quanto a haste. O cone tem o seu diâmetro aumentado gradualmente no sentido posterior. A haste é cilíndrica e ligeiramente alargada perto da junção com os nódulos. Os nódulos são suaves com

formato de pera, base arredondada e inclinados posteriormente (Ver detalhes nas Fig 4 B, C, Fig 5 I de Carneiro *et al.* (2004a) e Fig. 6 e 7 D Charchar & Eisenback (2002) em anexo).

Campo lateral, poro excretor e hemizonídeo: As linhas do campo lateral dos machos são areoladas com quatro incisuras. O poro excretor tem a posição variável no corpo do macho que possui um ducto excretor longo. O hemizonídeo é localizado entre o segundo e o quarto anel anteriores ao poro excretor (ver detalhes na Fig. 5 H de Carneiro *et al.* (2004a) e Fig. 5 B, C de Charchar & Eisenback (2002) em anexo).

Juvenis de segundo estágio (J2s)

Região anterior: O corpo dos J2s é vermiforme, mais afunilado posteriormente do que anteriormente. A anelação do corpo é distinta, aumentando em número de anéis e tornando-se irregulares na região posterior. A região anterior tem forma de cone e sem anelações, e a região labial é contínua com o corpo. A cápsula cefálica é baixa, localizada na cavidade pré-estomática ovoide, mais estreita do que a região estomática, quando vista em MEV, cercada pelas aberturas em fenda das seis sensilas labiais. O disco labial é redondo e distintamente elevado. Os lábios laterais são fundidos com os lábios medianos, possuem margens arredondadas e ligeiramente triangulares, fundidos ou não com a região cefálica. As sensilas cefálicas são indistintas quando observadas em microscopia de luz, e o esqueleto cefálico é fraco e hexarradiado. O vestíbulo e sua extensão são mais distintos do que o restante das estruturas. O pró-corpo é pouco distinto. O metacorpo é ovoide com a válvula proeminente, é trirradiado com o interior fortemente esclerotizado, os orifícios da glândula sub-ventral são ramificados e se conectam ao lumem do metacorpo. O istmo é indistinto. A junção faringo-intestinal se localiza na altura do anel nervoso. O lobo das glândulas é variável em comprimento e possui três núcleos. (ver detalhes nas Fig. 6A-F, G, Fig. 7 A-F de Carneiro *et al.* (2004a) e Fig. 8 A-D de Charchar & Eisenback (2002) em anexo).

Estilete: O estilete dos J2s é delicado, com um cone que aumenta de forma gradual em diâmetro no sentido posterior, a haste é cilíndrica e se afunila posteriormente, os nódulos são redondos e separados da haste. O orifício da glândula faringiana (DEGO) se ramifica em três canais. (ver detalhes nas Fig. 6 A, B, Fig. 7 B de Carneiro *et al.* (2004a) e Fig. 8 C de Charchar & Eisenback (2002) em anexo).

Campo lateral, poro excretor e hemizonídeo: As linhas dos campos laterais dos J2s possuem quatro incisuras que se estendem por todo o comprimento do corpo do nematoide e diminui na região da cauda para três incisuras areoladas. As aréolas não estão presentes nos campos laterais de todo o corpo do nematoide. O poro excretor é distinto e o hemizonídeo se localiza entre o segundo e o quarto anel anteriores ao poro excretor. (Ver detalhes nas Fig. 6 C, D, Fig. 7 C, E de Carneiro *et al.* (2004a) e Fig. 5 D-F de Charchar & Eisenback (2002) em anexo).

Cauda: A região da cauda é distintamente estreita com anelações irregulares. A cauda delgada possui a ponta arredondada ou pontiaguda. O término hialino é bem distinto. O reto possui ampla dilatação. Na posição posterior ao ânus, estão presentes os fasmídios localizados na incisura ventral do campo lateral. (ver detalhes nas Fig. 6 D-F, Fig. 7 D-F de Carneiro *et al.* (2004a) e Fig. 8 e 9 D de Charchar & Eisenback (2002) em anexo).

Tabela 4. Características morfológicas das fêmeas de *Meloidogyne* spp. segundo as três publicações envolvidas neste estudo.

| Estruturas | <i>M. ethiopica</i> (Whitehead, 1968) | <i>M. brasiliensis</i> (Charchar & Eisenback, 2002) | <i>M. ethiopica</i> (Carneiro <i>et al.</i> , 2004a) |
|-----------------|---|---|---|
| Visão geral | Corpo em formato de pera, pescoço longo e usualmente bem destacado do resto do corpo, término posterior do corpo sem protuberância. | Corpo branco translúcido, variável no tamanho, formato variando de pera a ovóide, com pescoço relativamente longo, região posterior arredondada sem cauda protuberante. | Corpo branco translúcido, variável no tamanho, formato alongado variando de ovoide a piroide. Pescoço algumas vezes proeminente, término posterior redondo sem protuberância. |
| Região anterior | | Região cefálica separada do corpo regular com anelações. Esqueleto cefálico distinto, hexaradiado, setores laterais alargados. Disco labial arredondado, elevado e separado dos lábios. Lábios laterais triangulares, separados dos lábios medianos e do disco labial. | Região anterior destacada do corpo, usualmente marcada com anelações. Esqueleto cefálico levemente esclerotizado. Disco labial elevado, separado dos lábios medianos e laterais. |
| Estilete | Estilete com cone curvado dorsalmente, nódulos pequenos e arredondados. | Estilete longo, robusto, cone ligeiramente menor que a haste, e extremidade levemente curvada dorsalmente, se alargando gradualmente no sentido posterior. Haste cilíndrica se alargando gradualmente no sentido dos nódulos. Nódulos alongados, separados da haste, distintamente separados uns dos outros. | Estilete robusto com o cone ligeiramente curvado dorsalmente, e aumentando em diâmetro posteriormente. A haste com alargamento na região próxima aos nódulos, que são redondos e se afunilam gradualmente para a haste. |
| Padrão perineal | Os padrões perineais variam entre <i>M. arenaria</i> e <i>M. incognita</i> , com estrias bastante afastadas, arco dorsal variando de baixo, arredondado, para alto, trapezoidal, e algumas estrias bifurcam perto da linha lateral. | Padrões perineais pequenos, de formato arredondados a ovais. O arco dorsal varia de achatado a alto, quadrangular com estrias grossas e espaçadas. Campos laterais podem ter estrias parecidas com essas em um ou em ambos os lados. Estrias ventrais variam de onduladas a grossas. A área do término da cauda bem definida com estrias na maioria dos espécimes. Região do perímetro da vulvar não estriada, frequentemente com estrias perto das bordas laterais da vulva. Ductos dos fasmídios distintos, fasmídios com superfície não aparente ao MEV. Ânus distinto, frequentemente coberto por dobra cuticular | O formato dos padrões perineais varia de oval a quadrangular, estrias grossas largamente separadas, usualmente contínuas suaves a onduladas. Término da cauda as vezes distinto com ou sem estrias descontínuas. Dobra cuticular presente sobre o ânus. A fenda vulvar sem estrias perto do campo lateral. Fasmídios distintos. Arco dorsal moderadamente alto a alto, redondo a quadrangular, nunca formando “ombros”. Linhas laterais distintas ausentes. Linhas laterais ocasionalmente com pequenas estrias perto da área dos fasmídios. Região ventral arredondada |

Tabela 5. Características morfológicas dos machos segundo as três publicações envolvidas neste estudo.

| Estruturas | <i>M. ethiopica</i> (Whitehead, 1968) | <i>M. brasiliensis</i> (Charchar & Eisenback, 2002) | <i>M. ethiopica</i> (Carneiro <i>et al.</i> , 2004a) |
|--|--|---|--|
| Visão geral | | Nematoides moderadamente longos, corpo afunilado anteriormente, e abruptamente arredondado posteriormente. Cauda retorcida. | Corpo vermiforme, afunilado anteriormente, abruptamente arredondado posteriormente. Região labial alta, redonda, contínua com o contorno do corpo. |
| Região anterior | Região labial: com forma de cone, levemente destacada do resto do corpo, com dois anéis da mesma largura, localizados logo após a capa cefálica. Aberturas dos anfídios em formato de fenda. | Região labial: alta e distinta e separada do corpo; disco labial: arredondado, muito grande, distintamente elevado acima dos lábios medianos. Abertura dos anfídios em forma de fenda. | Região labial: ligeiramente separada do corpo, as vezes marcada por anelação incompleta. Disco labial: alto, pouco circular a hexagonal, distintamente separado dos lábios medianos. Esqueleto cefálico: fortemente desenvolvido. Aberturas dos anfídios em forma de fendas. |
| Estilete | Os nódulos do estilete são iguais, pequenos, arredondados. | Estilete delicado, esbelto. Cone: reto e pontiagudo. Aumenta gradualmente de diâmetro no sentido posterior. Haste: cilíndrica, com pequenas projeções. Nódulos: pequenos, muito estreitos em relação à haste, inclinados posteriormente. | Estilete robusto e largo. Cone: reto e pontiagudo. O diâmetro aumenta gradualmente no sentido posterior, Haste: cilíndrica e alargada ligeiramente perto da junção com os nódulos. Nódulos: suaves em forma de pera, arredondados e inclinados posteriormente. |
| Campo lateral | O campo lateral aparece depois da base do estilete com quatro incisuras, ocasionalmente, uma quinta incisura central aparece. | Campo lateral com quatro incisuras, sendo que inicia com duas, próximo à altura dos nódulos do estilete e outras duas se iniciam na altura do metacampo; incisuras areoladas cercando cauda. | Campo lateral com quatro incisuras areoladas. |
| Localização do hemizonídio em relação ao poro excretor | | Poros excretor: é distinto, variável em posição e com o ducto terminal longo. Hemizonídio: se localiza ligeiramente anterior ao poro excretor. | Poros excretor: variável em posição, com ducto terminal longo. Hemizonídio: localizado entre o segundo e o quarto anéis anteriores ao poro excretor. |
| Sistema reprodutor e cauda | Testículo: um testículo. Fasmídios: ligeiramente pre-cloacal a cerca da metade do comprimento da cauda atrás da cloaca. Espículos: Curtos, com parede ventral mais espessa do que a parede dorsal. Gubernáculo: distinto. Cauda terminal: suavemente arredondada, sem estrias. | Testículo: um testículo, raramente dois. Estendido, ou anteriormente reflexo. Fasmídios: abertura em forma de fendas localizados no campo lateral, na altura da cloaca. Espículos: longos e espessos, ligeiramente arqueados. Gubernáculo: distinto. Cauda curta e arredondada. | Testículos: A maioria dos machos reversos possuem dois testículos, apenas um testículo em machos desenvolvidos normalmente, estendidos ou distalmente reflexo. Fasmídios: situados na altura da cloaca. Espículos: grossos, arqueados e fortemente sulcados, com ponta cilíndrica e distinta, ligeiramente curvada ventralmente com dois poros distais. Gubernáculo: distinto. Cauda: curta. |

Tabela 6. Características morfológicas dos juvenis de segundo estágio conforme as três publicações envolvidas neste estudo.

| Estruturas | <i>M. ethiopica</i> (Whitehead, 1968) | <i>M. brasiliensis</i> (Charchar & Eisenback, 2002) | <i>M. ethiopica</i> (Carneiro et al., 2004a) |
|-----------------|--|--|---|
| Visão geral | | Corpo: longo e delgado; se afunila anteriormente, região da cauda distintamente estreita; anelações distintas, aumentam em número e tornam-se irregulares na região da cauda. | Corpo: vermiforme, se afunila anteriormente, região da cauda distintamente estreita; anulações: distintas, aumentam em número e tornam-se irregulares na região da cauda. |
| Região anterior | Região labial: baixa, não separada do corpo, cabeça: tem forma de cone truncado vista lateralmente; é mais hemisférica em vista dorso-ventral; a vista frontal da cabeça mostra uma pequena tampa circular (disco labial), e regiões ventral e dorsal mais proeminentes dos que as regiões laterais; o esqueleto cefálico é hexaradiado. | Disco labial: redondo e alto, mais estreito do que o restante da região anterior; lábios medianos e discos labiais em forma de halteres. Região cefálica: lisa, sem anelações; aberturas dos anfídios em forma de fendas, localizadas entre o disco labial e os lábios laterais; esqueleto cefálico: hexaradiado, levemente esclerosado quando analisado em microscopia de luz, vestíbulo e sua extensão distinto. | Disco labial: redondo, distintamente elevado, região anterior truncada e sem anelações, e não separada do corpo; região cefálica: baixa, localizada na cavidade pré-estomática, cercada por seis sensilas labiais em forma de fendas, lábios laterais fundidos com os lábios medianos em forma de halteres; esqueleto cefálico: fraco e hexaradiado, vestíbulo e sua extensão mais distinta do que o restante das estruturas. |
| Estilete | Estilete com bulbos arredondados. | Estilete moderadamente longo, mas delicado com cone bruscamente pontiagudo, haste cilíndrica podendo levemente se alargar posteriormente, nódulos redondos. | O cone do estilete aumenta gradualmente em diâmetro, haste cilíndrica e se afunila posteriormente, nódulos redondos e separados da haste. |
| Cauda | Cauda suavemente afinada com termino sub-agudo; reto inflado. | Cauda delgada, com término abruptamente redonda pontiaguda; termino da cauda hialina pequeno; ampla dilatação retal; fasmídios pequenos, localizados posteriormente ao ânus. | Cauda delgada com termino arredondado ou estreitamente pontiaguda, anelações ocasionalmente de dimensão irregular na região posterior. Término hialino distinto, ampla dilatação retal. |

Morfometria

Quase todas as médias dos parâmetros estudados estão dentro de intervalos compreendidos tanto na descrição original como na redescrição de *M. ethiopica* e na descrição de *M. brasiliensis* (Tabela 7). Assim como na morfologia, a morfometria de *M. ethiopica* na descrição original de 1968 é muito pobre, quando comparada com os parâmetros medidos na redescrição de 2004 e na descrição de *M. brasiliensis* em 2002. No entanto, quando comparados os dados obtidos nas três publicações, estes revelam alta proximidade.

No caso da descrição original de *M. ethiopica*, a morfometria foi baseada apenas nas estruturas com características diferenciais como o comprimento do corpo (L), estilete e DEGO para as fêmeas, acrescentando os espículos e o gubernáculo para os machos e a cauda para os juvenis de segundo estágio. Esses valores mostraram pouquíssimas variações quando comparadas à redescrição de *M. ethiopica* e a descrição de *M. brasiliensis*. Os outros caracteres estudados durante a redescrição de *M. ethiopica* e a descrição de *M. brasiliensis* também mostram poucas variações pontuais conforme listados na Tabela 7.

Tabela 7: Dados compilados da morfometria de fêmeas, machos e juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne ethiopica* da descrição original (Whitehead, 1968), *M. brasiliensis* (Charchar & Eisenback, 2002) e da redesccrição de *M. ethiopica* (Carneiro *et al.*, 2004a). Todos os valores são expressos em μm , e os valores entre parênteses correspondem ao intervalo de variação (valores mínimos e máximos observados).

| Mensurações | Whitehead, 1968 | | | Charchar & Eisenback, 2002 | | | Carneiro <i>et al.</i> , 2004a | | |
|---|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| | Fêmea | Macho | J2 | Fêmea | Macho | J2 | Fêmea | Macho | J2 |
| n | 20 | 25 | 25 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| L (μ) | 599 \pm 72 (459-723) | 1556 \pm 274 (831-2101) | 410 \pm 12 (383-432) | 763 \pm 94 (601-959) | 1885 \pm 414 (883-2489) | 434 \pm 34,5 (322-473) | 700 \pm 13 (594-798) | 1171 \pm 48 (890-1500) | 468 \pm 3 (326-510) |
| a | 1,54 \pm 0,196 (1,25-2,00) | 47,4 \pm 7,96 (34-61,9) | 32,2 \pm 1,25 (29,1-34,7) | 1,50 \pm 0,1 (1,3-1,6) | 44,8 \pm 4,9 (35,8-55,1) | 25,1 \pm 1,7 (20,7-27,7) | - | 27,7 \pm 0,8 (24,8-31,0) | 24 \pm 0,27 (21,3-28,2) |
| b' | - | 19,6 \pm 2,44 (12,2-23,3) | 5,2 \pm 0,4 (4,7-6,0) | 8,0 \pm 0,5 (7,2-8,7) | 19,3 \pm 3,4 (10,5-25,3) | 7,2 \pm 0,2 (6,3-7,4) | - | - | - |
| c | - | 103 \pm 24,6 (61-168) | 8,8 \pm 0,39 (8,1-9,8) | - | 109 \pm 23,2 (52,5-167,7) | 8,2 \pm 0,2 (7,5-8,6) | - | 114 \pm 12,2 (69,5-147,2) | 4,8 \pm 0,1 (3,9-6,4) |
| Diâmetro Máximo de Corpo | - | - | - | 508 \pm 77 (387-728) | 42 \pm 8,5 (23-57) | 17 \pm 1,7 (15,6-20,8) | 522 \pm 12 (120-282) | 48 \pm 0,8 (32-59) | 20 \pm 0,3 (15-22) |
| Comprimento do pescoço | - | - | - | 271 \pm 74 (138-442) | - | - | - | - | - |
| Comprimento do corpo sem pescoço | - | - | - | - | - | - | 530 \pm 17 (420-750) | - | - |
| Comprimento do corpo sem pescoço /Diâmetro do corpo | - | - | - | - | - | - | 1,4 \pm 0,01 (0,8-1,8) | - | - |
| Comprimento do estilete | 13 (11-15) | 21,4 \pm 1,88 (14,4-24,1) | 10,0 \pm 0,52 (9,1-10,9) | 14,3 \pm 0,9 (12,6-16,4) | 22,8 \pm 1,6 (18,9-25,2) | 11 \pm 0,7 (9,7-12,2) | 13,5 \pm 0,1 (12-15) | 24,8 \pm 0,6 (23-27) | 12,2 \pm 0,1 (11-14) |
| Altura dos nódulos do estilete | - | - | - | 1,8 \pm 0,3 (1,3-2,5) | 2,4 \pm 0,4 (1,3-3,4) | 0,8 \pm 0,14 (0,4-1,1) | 2,0 \pm 0,1 (1,5-2,5) | 3,3 \pm 0,1 (3,0-4,0) | - |
| Largura dos nódulos do estilete | 2 (2-3) | 4,3 \pm 0,44 (3,6-5,0) | - | 3,7 \pm 0,5 (2,9-4,6) | 3,9 \pm 0,4 (2,9-4,6) | 1,6 \pm 0,19 (1,3-2,1) | 3,4 \pm 0,1 (3,0-5,0) | 4,3 \pm 0,6 (3,5-5,0) | - |
| Largura dos nódulos do estilete/ Altura dos nódulos do estilete | - | - | - | - | - | - | 1,7 \pm 0,03 (1,5-2,5) | 1,3 \pm 0,2 (1,1-1,5) | - |
| DEGO | 4 (3-5) | - | - | 4,0 \pm 0,6 (2,9-5,0) | 2,7 \pm 0,6 (1,7-4,2) | 3,0 \pm 0,3 (2,5-3,4) | 3,8 \pm 0,1 (3,0-5,0) | 2,5 \pm 0,1 (2,0-3,5) | 2,6 \pm 0,1 (2,0-3,0) |
| Distância do poro excretor ao termino anterior | - | - | - | 50 \pm 11 (35-76) | 186 \pm 30,5 (127-250) | 88 \pm 8,0 (73-108) | 65,3 \pm 2,1 (41-79) | 200 \pm 3,1 (187-215) | 93 \pm 0,9 (75-106) |
| Comprimento da fenda vulvar | - | - | - | 23,9 \pm 1,8 (19,3-27,1) | - | - | 25,2 \pm 0,7 (25,4-26,9) | - | - |
| Distância do ânus a vulva | - | - | - | 19,9 \pm 1,9 (15,5-23,2) | - | - | 19,2 \pm 0,5 (17,3-21,0) | - | - |

Tabela 7: Continuação...

| | | | | | | | | | |
|----------------------------|---|--------------------------|-----------------|------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| Distancia interfasmidial | - | - | - | 23,7±2,5 (18,1-29,) | - | - | 20,4±0,3 (19-23) | - | - |
| Comprimento da cauda | - | - | 47±2 (41-52) | - | 17,3±2,1 (13,4-22,7) | 53±3,9 (43-58) | - | 13,4±0,5 (10,2-17,2) | 62±0,6 (52-72) |
| Comprimento do testículo | - | - | - | - | 831-254 (334-1337) | - | - | 991±25 (942-1062) | - |
| Comprimento do espículo | - | 33,4±2,20 (28,8-36,0) | - | - | 31,6±3,3 (25,2-36,1) | - | - | 39±0,6 (34-42) | - |
| Comprimento do gubernaculo | - | 9,0±1,00 (7,2-10,1) | - | - | 7,4±0,8 (5,9-8,4) | - | - | - | - |
| Termino hialino | - | - | - | - | - | 13,1±1,6 (10-16) | - | - | 13,5±0,2 (12-15) |

Testes bioquímicos e biológicos

O resultado da análise de isoenzimas revelou um padrão específico de esterase E3 (Rm: 0,9, 1,05, 1,20) tanto para *M. ethiopica* quanto para *M. brasiliensis* (população tipo), conforme mostra a Figura 1. No teste de hospedeiras diferenciadoras, *M. brasiliensis* de Londrina, PR reproduziu em tomate vc. Rutgers (FR=41,86) e fumo cv. NC95 (FR=5,0). Melancia cv. Charleston Gray foi considerada má hospedeira (FR=0,62). Não houve reprodução em pimentão cv. California Wonder (FR 0,0), algodão cv. Deltapine 61 (FR=0,0) e amendoim cv. Florunner (FR=0,0).

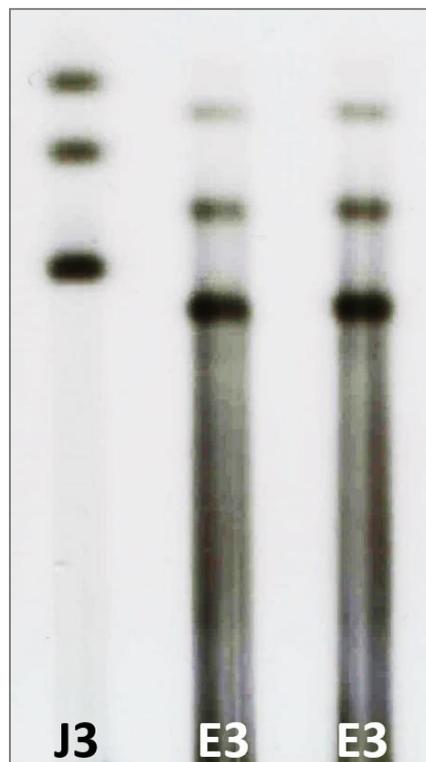


Figura 1. Perfis de esterase E3 das populações de *Meloidogyne brasiliensis* = *M. ethiopica*. J3: *M. javanica* (padrão).

Análises moleculares

Com o marcador PCR-SCAR específico de *M. ethiopica* foi possível amplificar um único fragmento de 350 pb para todas as populações de *M. ethiopica* e *M. brasiliensis* testadas, conforme mostrado na Figura 2.

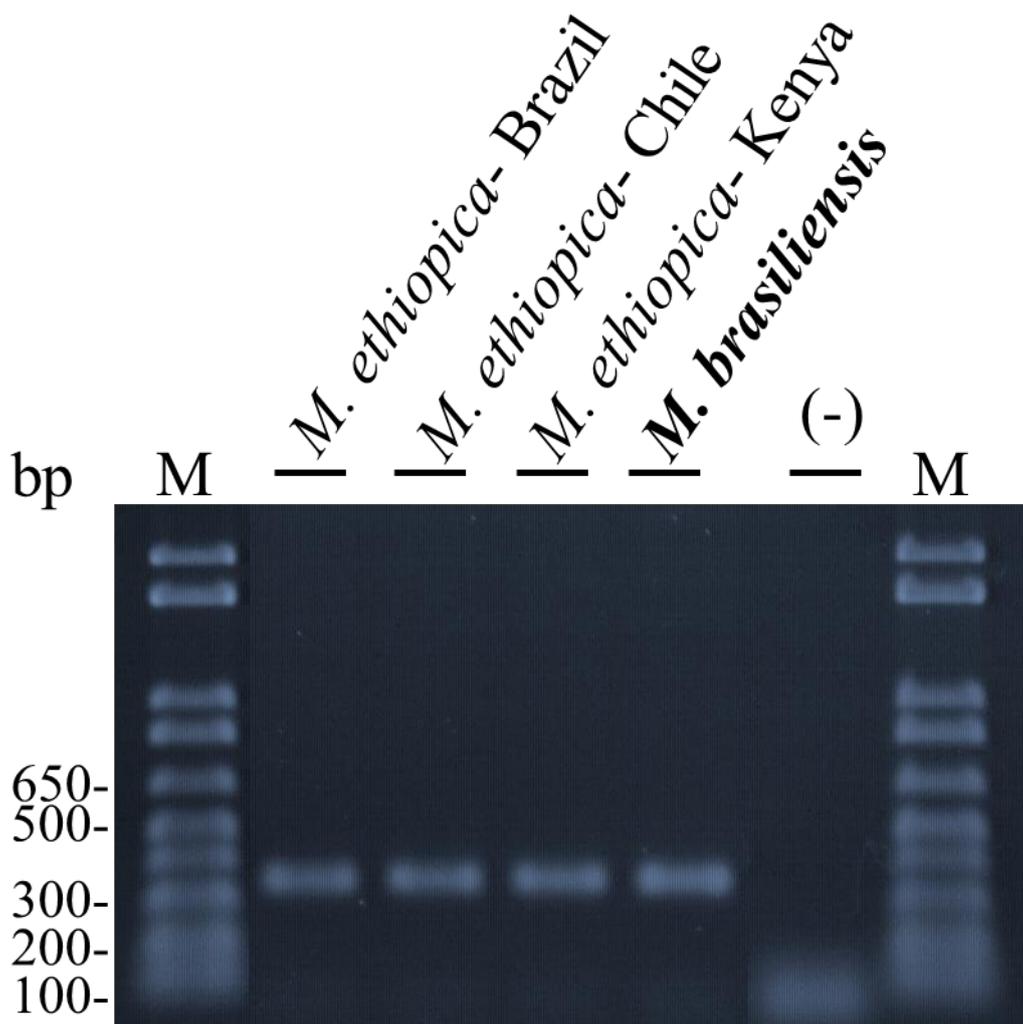


Figura 2: Padrão de amplificação de SCAR-PCR para populações de *M. ethiopica* e *M. brasiliensis* utilizando o par de primers espécie – específico de *M. ethiopica* (Correa *et al.*, 2014). (-) Controle negativo; M: Marcador 1kb (Invitrogen).

A árvore filogenética obtida a partir da análise por Neighbour-Joining das sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 mostra que as populações de espécies brasileiras de *Meloidogyne* se agrupam com outras espécies já descritas anteriormente, dando ênfase ao agrupamento das populações de *M. brasiliensis* com as de *M. ethiopica*, com 100 % bootstrap (Figura 3). Da mesma maneira, a árvore filogenética resultante das análises de sequências da região D2-D3 (28S) com base no método da parcimônia, mostra o agrupamento das populações de *M. brasiliensis* com *M. ethiopica* na mesma clade com 90% de bootstrap (Figura 4)

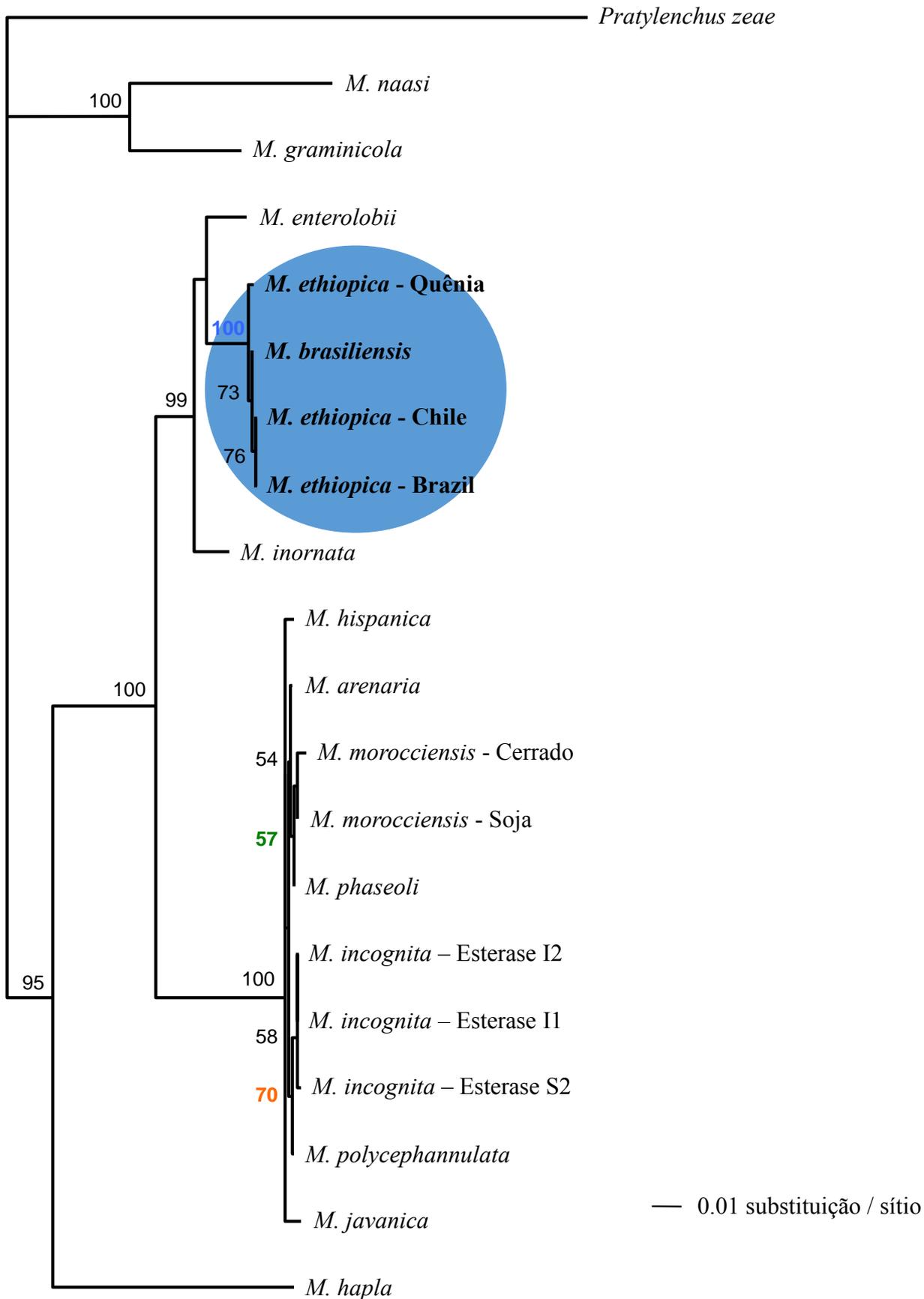


Figura 3. Árvore filogenética obtida da análise de sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 de populações brasileiras de *Meloidogyne* spp, em comparação com sequências de outras espécies descritas anteriormente, através do método de Neighbour-Joining. Os valores á esquerda são os suportes de bootstrap.

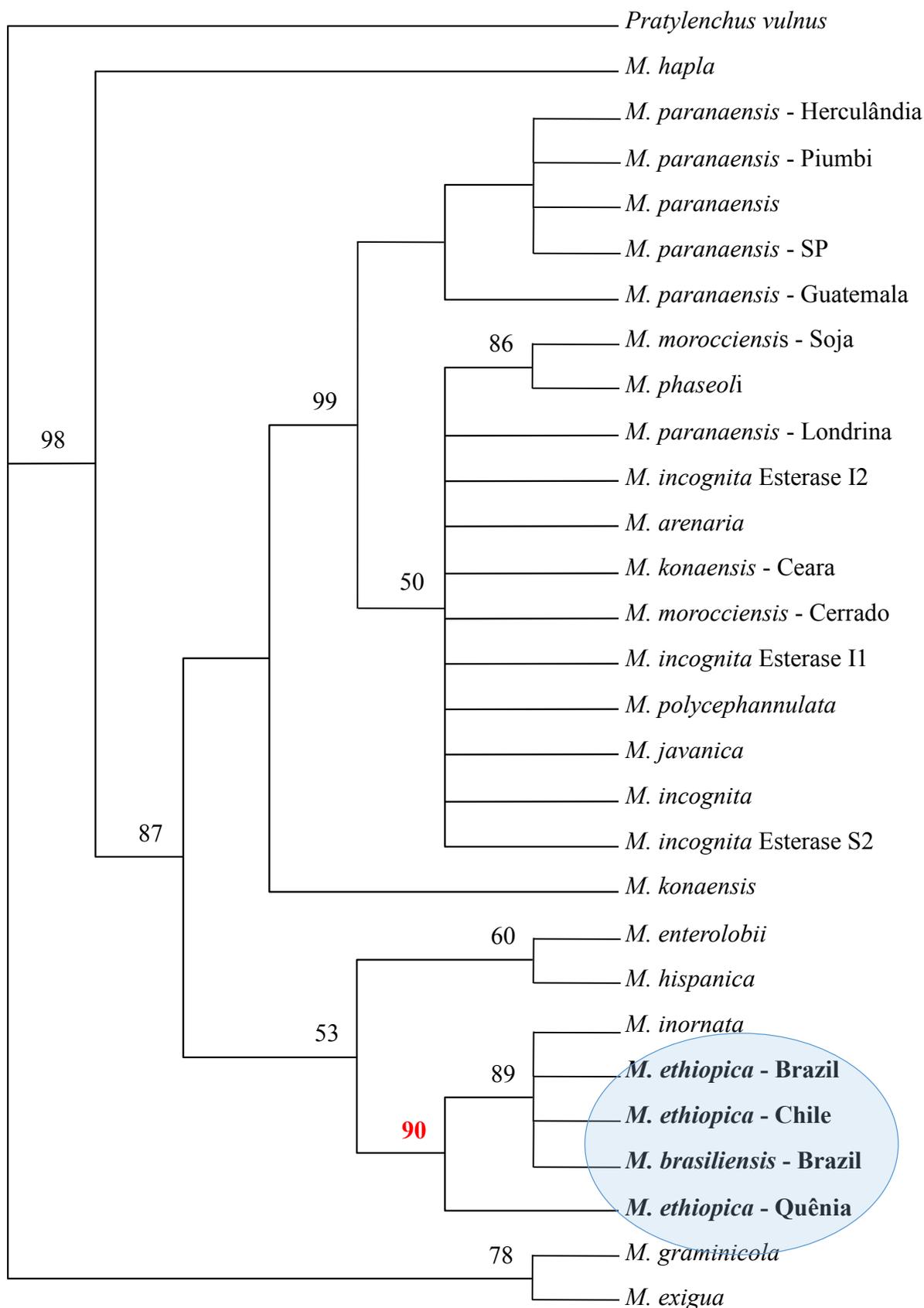


Figura 4. Árvore filogenética obtida da análise de seqüências da subunidade D2-D3 do gene 28S de populações brasileiras de *Meloidogyne* spp, em comparação com seqüências de outras espécies descritas anteriormente, através do método de Parcimônia. Os valores á esquerda são os suportes de bootstrap.

DISCUSSÃO

A identificação precisa dos nematoides-das-galhas a nível de espécie é crucial para o controle eficaz da doença e implica em medidas de controle adequadas a serem implementadas junto aos agricultores. No entanto, a identificação de espécie de *Meloidogyne* é repleta de dificuldades: morfologia conservada, morfometria variável, variação intraespecífica, modo de reprodução partenogenética, existência de espécies crípticas ou enxames, e o grande número de espécies descritas (Hunt & Handoo, 2009). Para aumentar a confusão, há o problema não negligenciável do conceito de espécie para organismos que dependem predominantemente de uma estratégia reprodutiva partenogenética (Hunt & Handoo, 2009). Dessa maneira, a descrição de pelo menos duas populações de uma mesma espécie, provenientes de diferentes localidades, foi realizada no passado. Esse fenômeno não é raro de se detectar, e se tornará cada vez mais frequente devido ao advento de técnicas enzimáticas e moleculares, que são exigidas atualmente nas descrições de espécies novas ou novas detecções, o que vem ocorrendo com mais frequência nos últimos sete anos (Eisenback & Hunt, 2009).

A dificuldade de identificação de algumas espécies é um fenômeno extremamente complexo quando se trata de espécies descritas há muitos anos atrás, antes do advento do MEV e das técnicas moleculares, como é o caso de *M. ethiopica* Whitehead, 1968. Desde a sua primeira detecção no Brasil, como espécie atípica (Carneiro *et al.*, 2000), esses mesmos autores levaram três anos para completar a sua identificação (Carneiro *et al.*, 2003 e 2004a) e mesmo assim, foi necessária a ajuda de uma população de referência (com o mesmo perfil de esterase) proveniente do Quênia, enviada pelo Dr. Gerrit Karssen (Carneiro *et al.*, 2004a). A descrição de *M. brasiliensis* Charchar & Eisenback, 2002, ocorreu nesse mesmo intervalo de tempo, onde os autores omitiram o perfil da enzima esterase, que só foi descrito por Carneiro *et al.*, 2003 e 2004a para *M. ethiopica*, sendo a descrição de *M. brasiliensis* baseada somente em morfologia e morfometria.

A descrição original de *M. ethiopica*, sua redescrição e a descrição de *M. brasiliensis* foram analisadas e comparadas a fim de demonstrar as semelhanças morfológicas, morfométricas, enzimáticas e moleculares que existem entre as duas espécies.

Para a redescrição de *M. ethiopica*, Carneiro *et al.* (2004a) utilizaram espécimes provenientes de uma população coletada no Brasil (Farroupilha, RS), multiplicados em casa de vegetação, e os compararam com espécimes de uma população proveniente do Quênia. Essas populações foram comparadas também com os holótipos e parátipos preparados por Whitehead (1968), que infelizmente apresentavam sinais de deterioração, provavelmente devido ao longo período de armazenamento das lâminas. Apenas a configuração das regiões perineais puderam ser observadas com precisão.

Na morfologia, a região perineal é semelhante nas três descrições, sendo uma configuração mista entre *M. arenaria* e *M. incognita* (Whitehead, 1968; Charchar & Eisenback, 2002; Carneiro *et al.*, 2004a). Os estiletos das fêmeas nas duas descrições ao MEV são também muito semelhantes (Charchar & Eisenback, 2002; Carneiro *et al.*, 2004a). Dois outros caracteres muito importantes são a região anterior e estiletos dos machos ao MEV, idênticos nas duas descrições (Charchar & Eisenback, 2002; Carneiro *et al.*, 2004a). Quanto aos juvenis de segundo estágio (J2), podem ser destacadas a região anterior ao MEV e o formato das caudas ao microscópio de luz (Charchar & Eisenback, 2002; Carneiro *et al.*, 2004a).

A maioria dos dados morfométricos para as duas espécies estão dentro do intervalo de valores relatados na descrição original de *M. ethiopica* (Whitehead, 1968), como por exemplo, a posição do DEGO nas fêmeas. A distância ânus-vulva, a distância entre fasmídios, o comprimento da fenda vulvar nas fêmeas, o comprimento do estilete, o comprimento do testículo, o comprimento do gubernáculo nos machos, o comprimento

do corpo do J2, também seguem os intervalos de variação idênticos nos três trabalhos. No entanto, para alguns caracteres morfométricos os valores registrados mostraram variações, mas nenhuma variação exorbitante foi observada. Por exemplo, os valores de “L”, nos machos variaram significativamente entre as três análises, isso deve-se ao grande coeficiente de variação desse parâmetro, uma vez que caracteres morfométricos tendem a variar sob a influência de condições geográficas e ecológicas (Jepson, 1987)

A distância da abertura dos ductos da glândula esofagiana dorsar aos bulbos basais do estilete (DEGO), de acordo com Jepson (1987) tem variação interespecífica, tornando-se muito útil para a discriminação das espécies. As três análises obtiveram valores parecidos para as fêmeas. Nos machos, onde essa distância possui um peso maior na discriminação específica, foram observados valores bem parecidos (2,7 e 2,5) entre *M. brasiliensis* (Charchar & Eisenback, 2002) e *M. ethiopica* (Carneiro *et al.*, 2004a), respectivamente.

Eisenback & Hirschmann (1981) destacaram a importância dos estudos da forma da região labial do macho nos estudos taxonômicos de *Meloidogyne* sob MEV, descrevendo seu papel na importância dos machos na separação de espécies. A morfologia da região anterior do corpo e do estilete dos machos fornece caracteres taxonômicos suplementares mais úteis em estudos com o uso do MEV (Eisenback & Hirschmann 1979; 1981). Com base nessas informações, pode-se confirmar o alto grau de similaridade entre *M. ethiopica* e *M. brasiliensis*, uma vez que a descrição da morfologia da região anterior desses nematoides, são praticamente idênticas conforme mostram as descrições das duas espécies (Charchar & Eisenback, 2002; Carneiro *et al.*, 2004a).

Um dos aspectos mais importantes para considerar *M. brasiliensis* um sinônimo júnior de *M. ethiopica* é o perfil de esterase E3, idêntico nestas duas espécies, referido

anteriormente por Carneiro *et al.*, 2003 e 2004a e por Charchar *et al.*, 2009, como espécie-específicos. Os marcadores SCAR específicos de *M. ethiopica*, obtidos por Correa *et al.*, 2014 amplificaram um único fragmento de 350 pb para todas as populações de *M. ethiopica* e *M. brasiliensis* testadas, comprovando a mesma identidade taxonômica dessas duas espécies. As árvores filogenéticas obtidas da região ITS1-5.8S-ITS2 e do fragmento D2D3 (28S) mostraram mais uma vez o agrupamento das populações de *M. brasiliensis* com as de *M. ethiopica*, com 100 % e 90% bootstrap, respectivamente, dando subsídios para a sinonimização.

Os testes com as hospedeiras diferenciadoras sugeridas pela Universidade Estadual da Carolina do Norte (EUA) (Hartman & Sasser, 1985) confirmaram os resultados do presente estudo quanto à hospedabilidade, obtidos por Charchar & Eisenback (2002) para *M. brasiliensis* e não corroboram totalmente os resultados obtidos por Carneiro *et al.* (2004a). Isso sugere a existência de mais de uma raça fisiológica em populações de *M. ethiopica*, o que deverá ser confirmado em estudos futuros.

CONCLUSÕES

De uma maneira geral, pode-se concluir com base em parâmetros morfológicos, morfométricos, isoenzimáticos e moleculares que *M. brasiliensis* é um sinônimo júnior de *M. ethiopica*.

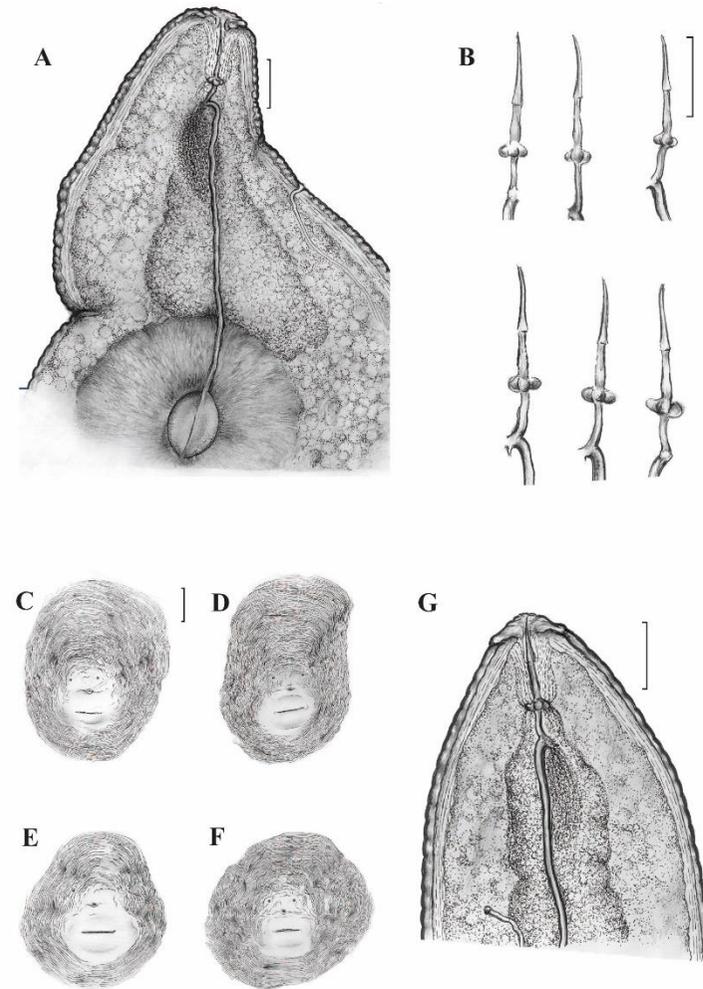


Figura 1. Fêmeas de *Meloidogyne ethiopica*. A: Região faringea em vista lateral; B: Estiletes; C-F: Padrões perineais; G: Término anterior em vistasubventral (escalas: A, B, G10 μ m; C-F 20 μ m) (Carneiro et al., 2004).

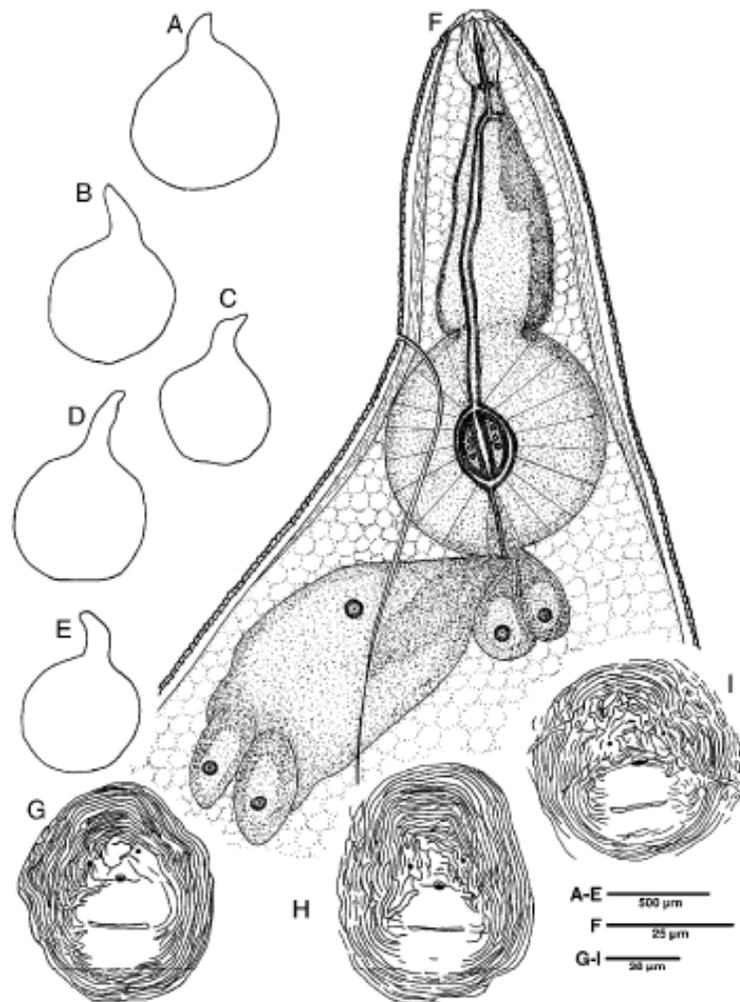


Figura 3. Desenhos de fêmeas de *Meloidogyne brasilensis* n. sp. A-E: Contornos de espécimes inteiras em vista lateral; F: Término anterior em vista lateral; G-I: Padrões perineais. (Charchar & Eisenback, 2002).

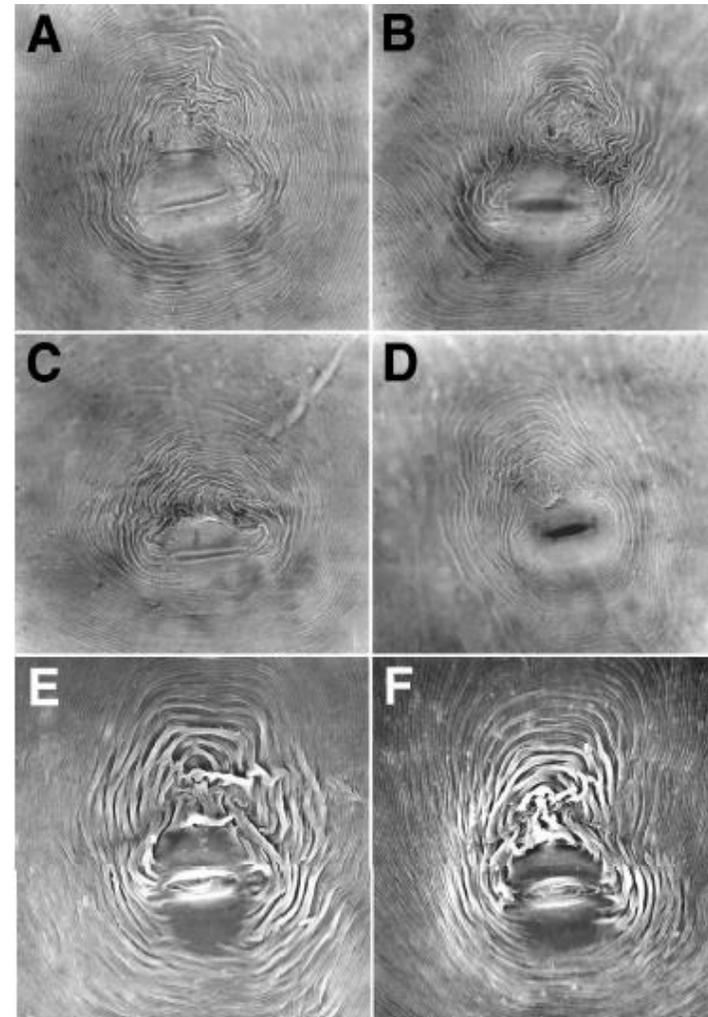


Figura 4. Padrões perineais de fêmeas de *Meloidogyne brasilensis* n. sp. A-D: Micrografia em Microscopia óptica; E-F: Micrografias em MEV. (Charchar & Eisenback, 2002).

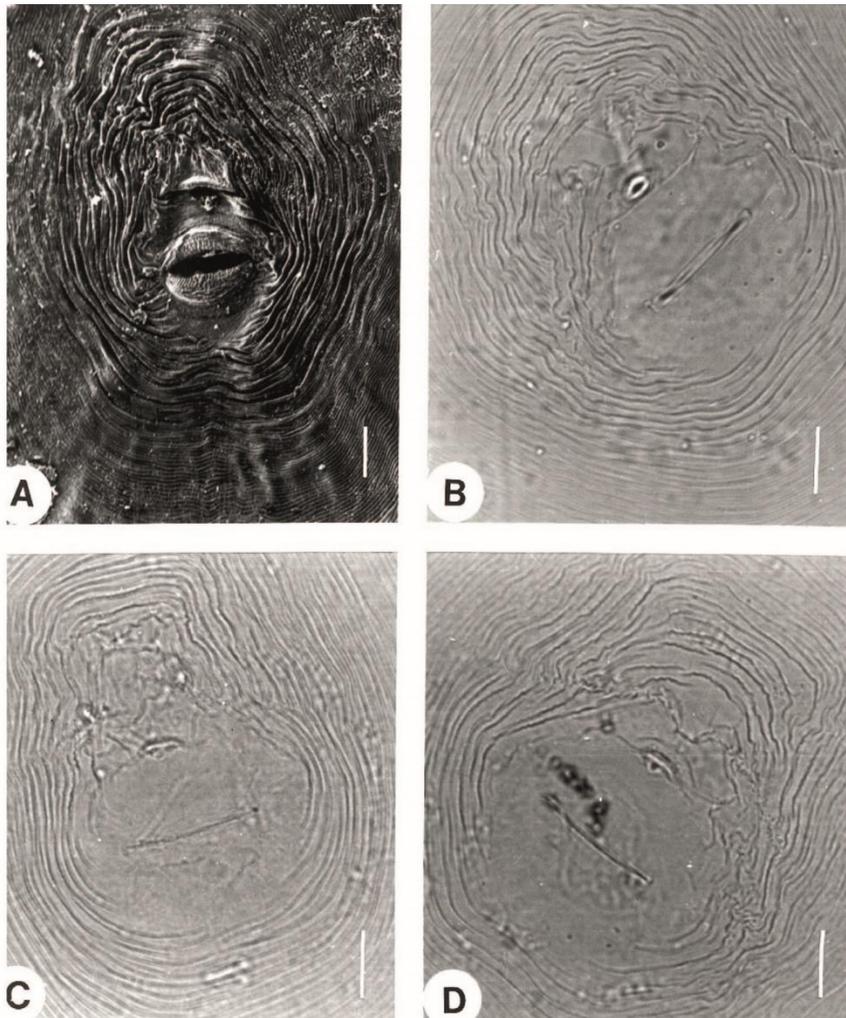


Figura 3. Padrões perineais de *Meloidogyne ethiopica*. A: Micrografia em MEV; B-D: Micrografias em MO. (Carneiro *et al.*, 2004).

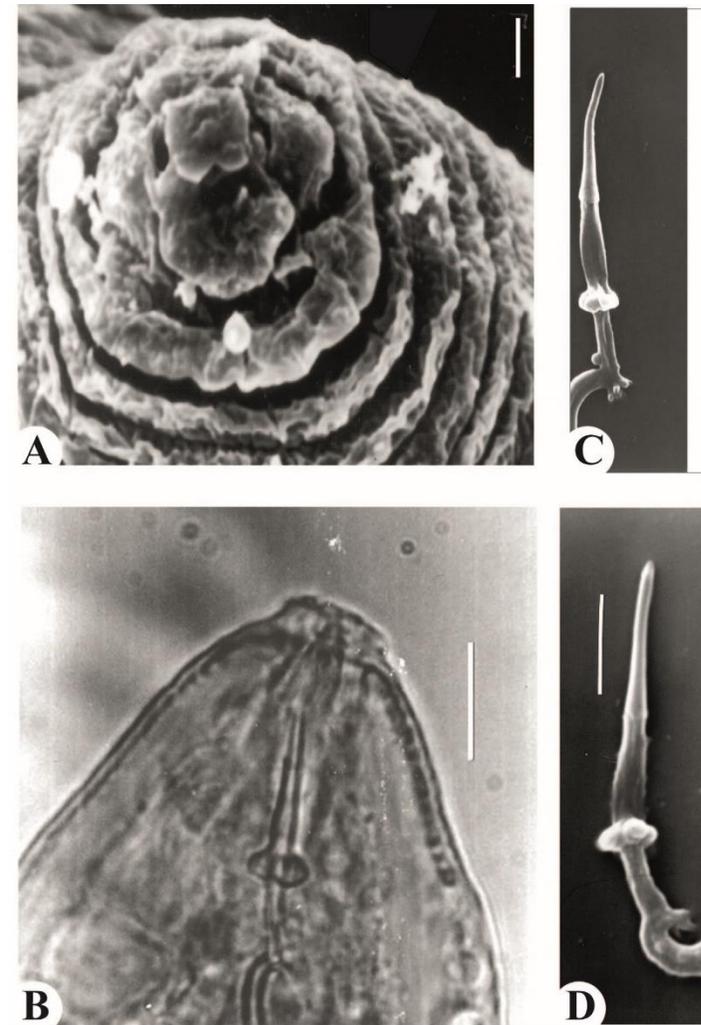


Figura 2. Fêmeas de *Meloidogyne ethiopica*. A: Região anterior em MEV; B: Região anterior em MO; C, D: Estiletos em MEV (scale bars: A 1 μ m; B 10 μ m; C-D 5 μ m). (Carneiro *et al.*, 2004).

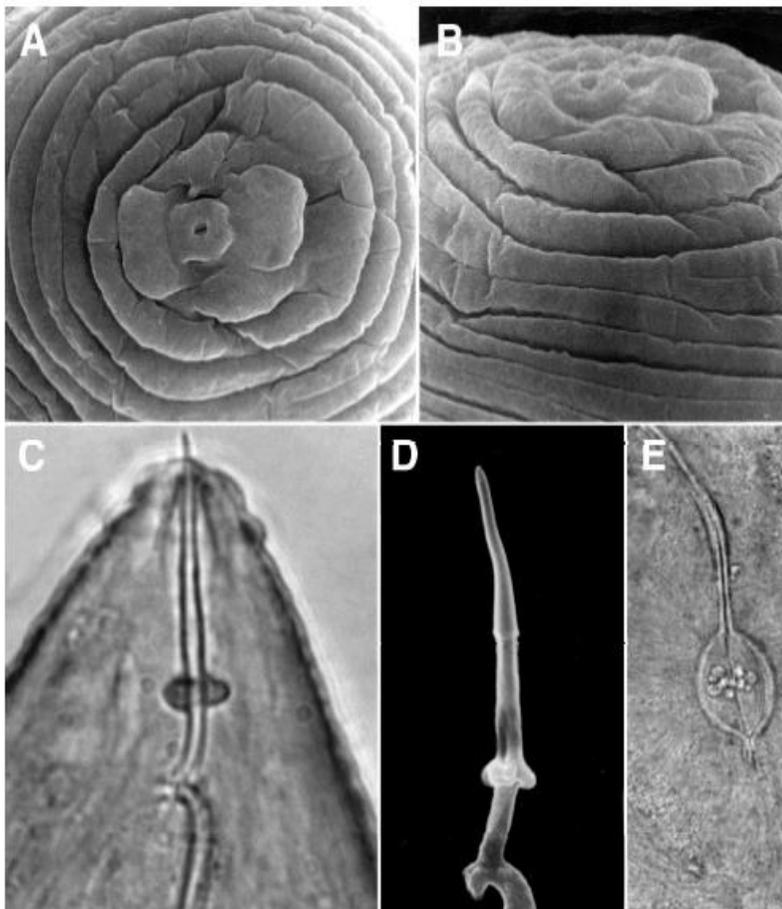


Figura 2. Fêmeas de *Meloidogyne brasilensis* n. sp. População de Brasília. A, B: Micrografias da região anterior em MEV, vista frontal e lateral; C: Micrografia em MO da região anterior, vista lateral; D: Estilete em MEV; E: MO da faringe excisada com o revestimento cuticular de metacorpo. Charchar & Eisenback, 2002.

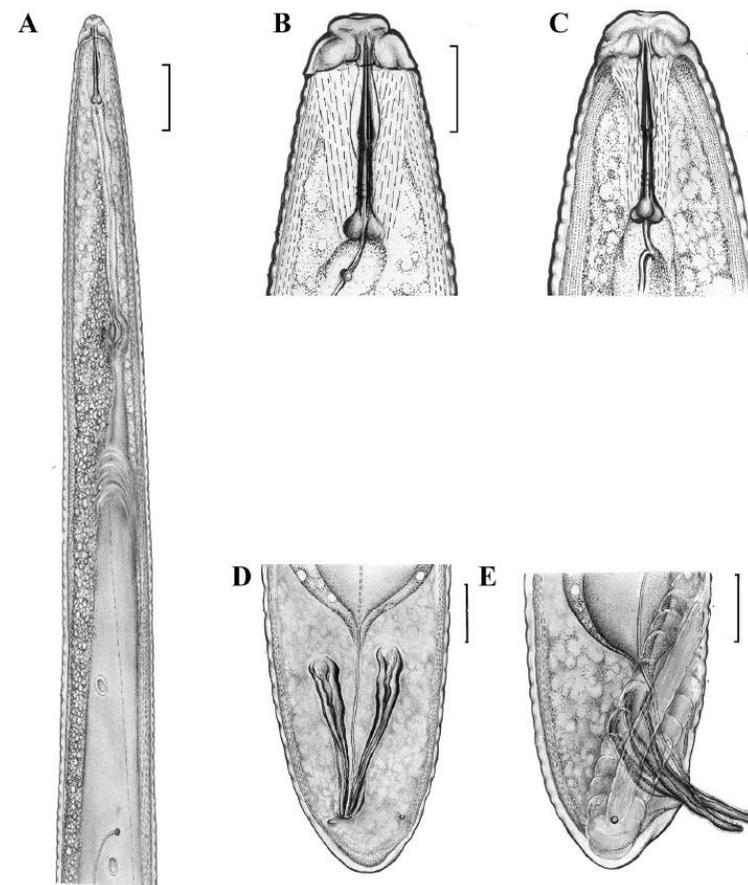


Figura 4. Desenhos do macho de *Meloidogyne ethiopica*. A: Região anterior; B, C: Término anterior em vista dorsal e lateral; D, E: Cauda em vista ventral e lateral (Escale: A 25 μ m; B, C 10 μ m; D 25 μ m; E 10 μ m). (Carneiro *et al.*, 2004).

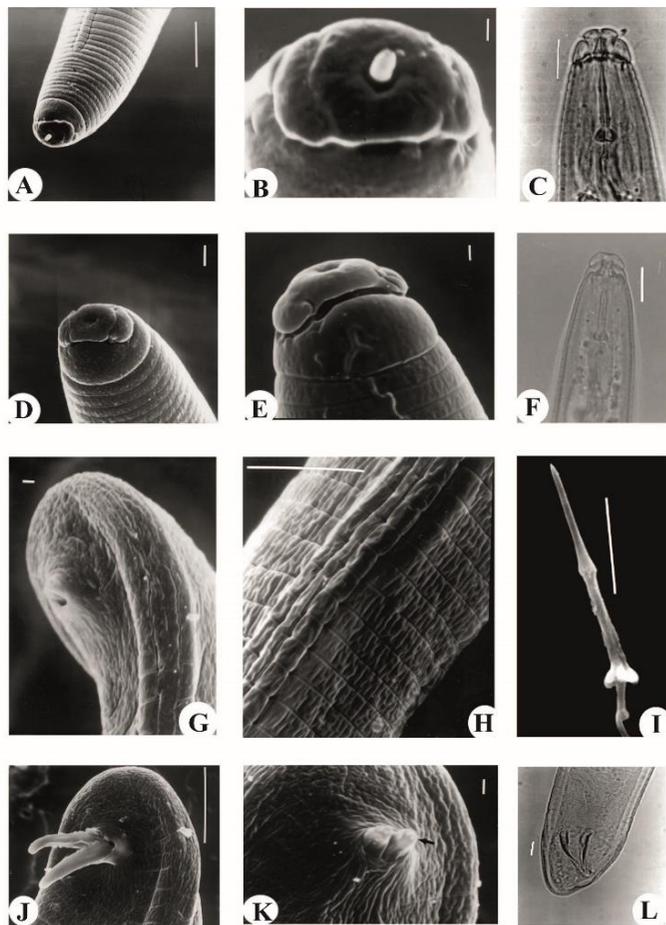


Figura 5. Macho de *Meloidogyne ethiopica*. A: Região anterior em MEV; B, D: Região cefálica em MEV, vista frontal e lateral; C, F: Término anterior em MO, vista dorsal e lateral; G, H: Campo lateral em MEV; I: Estilete em MEV; J, K: Cauda em MEV com espículos projetados, mostrando poros (seta); L: Cauda em MOI (Escala: A, C, F, H, I, J 10 μ m; B, E, G, K, L 1 μ m; D 2 μ m). (Carneiro *et al.*, 2004).

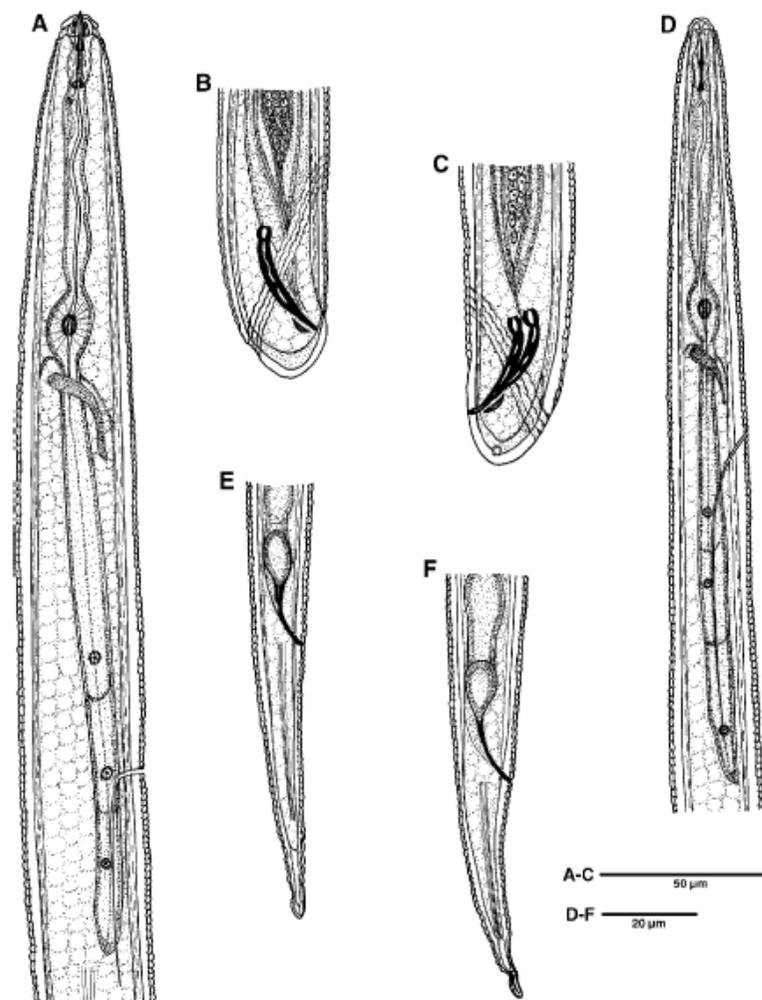


Figura 5. Desenhos dos machos e J2 de *Meloidogyne brasilensis* n. sp. A: Término anterior do macho em vista lateral; B, C: Cauda do macho em vista lateral; D: Término anterior do J2 em vista lateral; E, F: Caudas dos J2 em vista lateral. (Charchar & Eisenback, 2002).

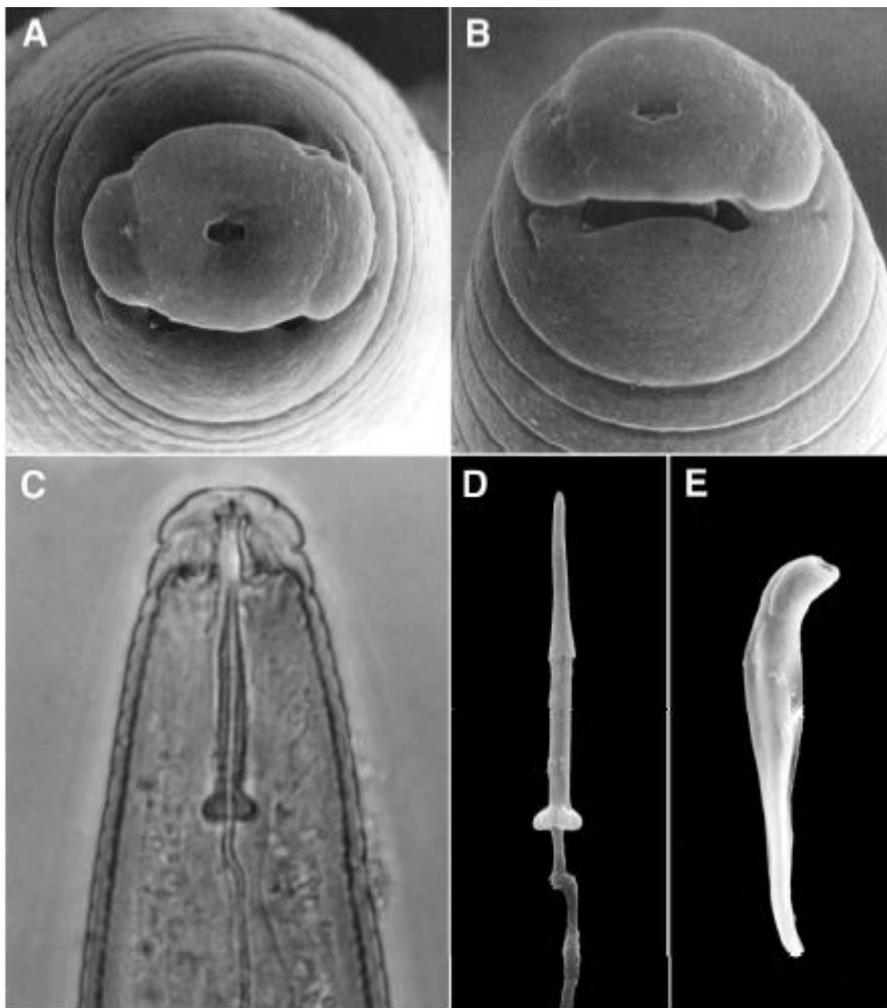


Figura 6. Machos de *Meloidogyne brasilensis* n. sp. População de Londrina. A, B: Término anterior em MEV, vista frontal e lateral; C: Término anterior em MO, vista lateral; D: Estilete em MEV; E: Espículo excisado em MEV. (Charchar & Eisenback, 2002).

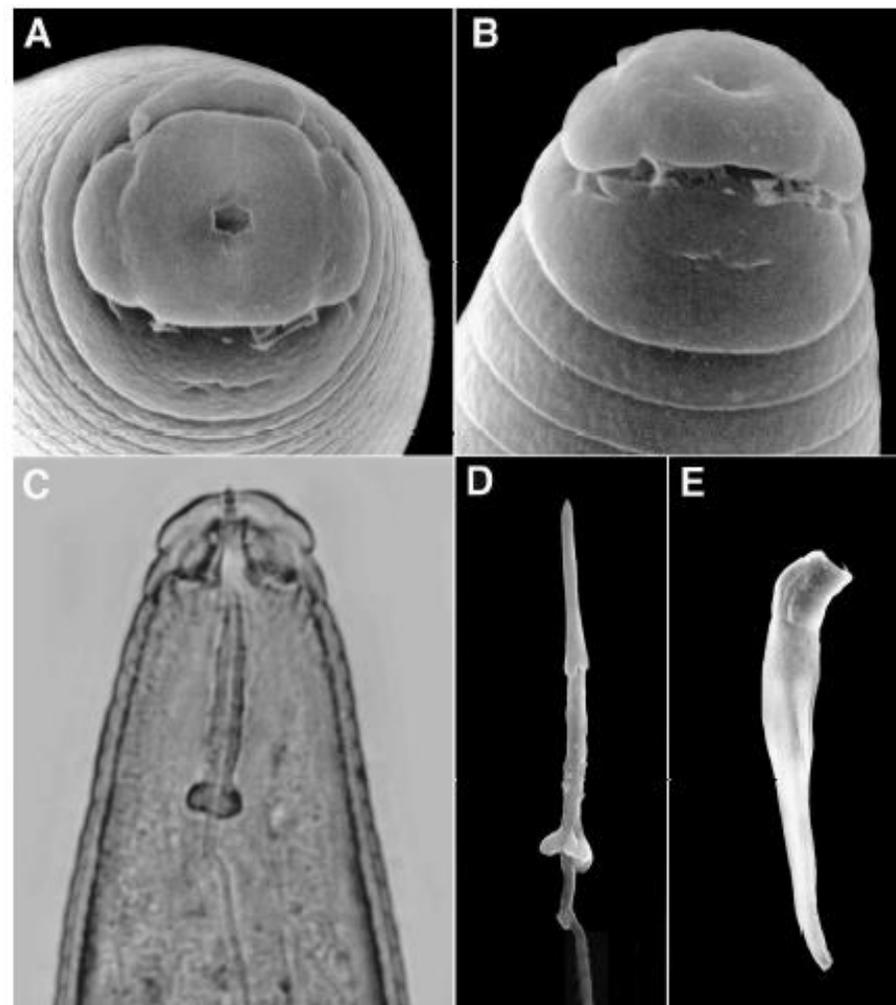


Figura 7. Machos de *Meloidogyne brasilensis* n. sp. População de Brasilia. A, B: Término anterior em MEV, vista frontal e lateral; C: Região anterior em MO, vista lateral; D: Estilete em MEV; E: Espículo excisado em MEV. (Charchar & Eisenback, 2002).

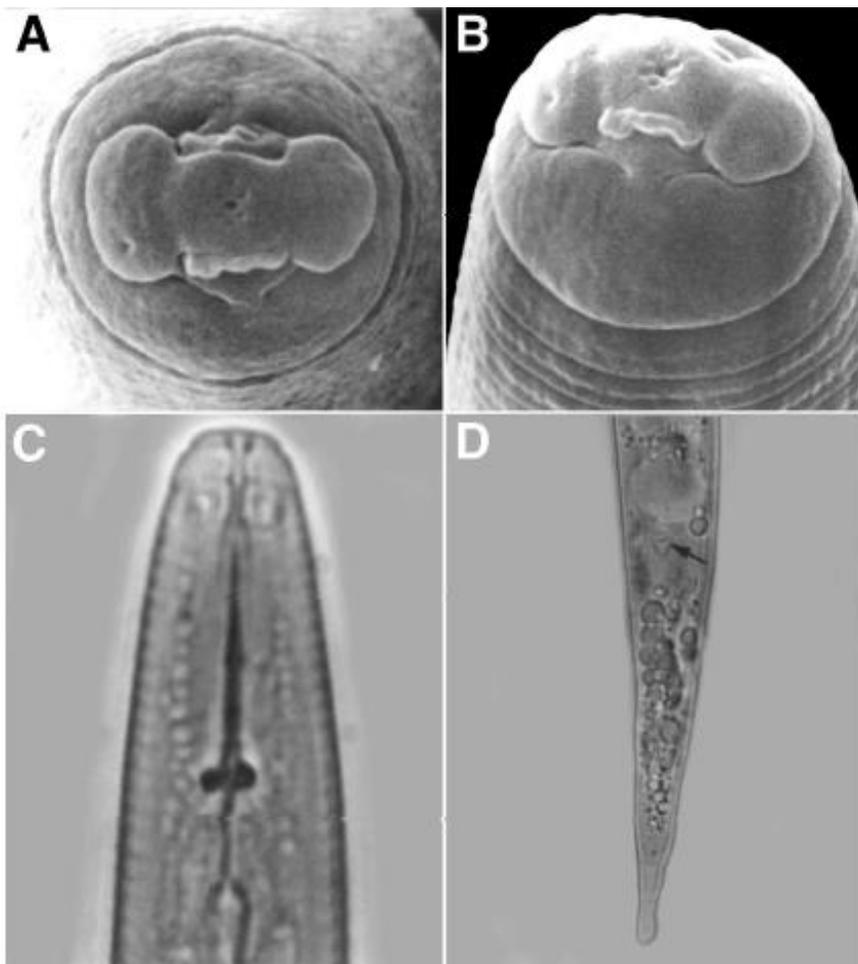


Figura 8. J2 de *Meloidogyne brasilensis* n. sp. População de Londrina. A, B: Região da cabeça em MEV, vista frontal e lateral; C: Região da cabeça em MO, vista lateral; D: Caula em Mo, vista lateral (a seta indica o reto). (Charchar & Eisenback, 2002).

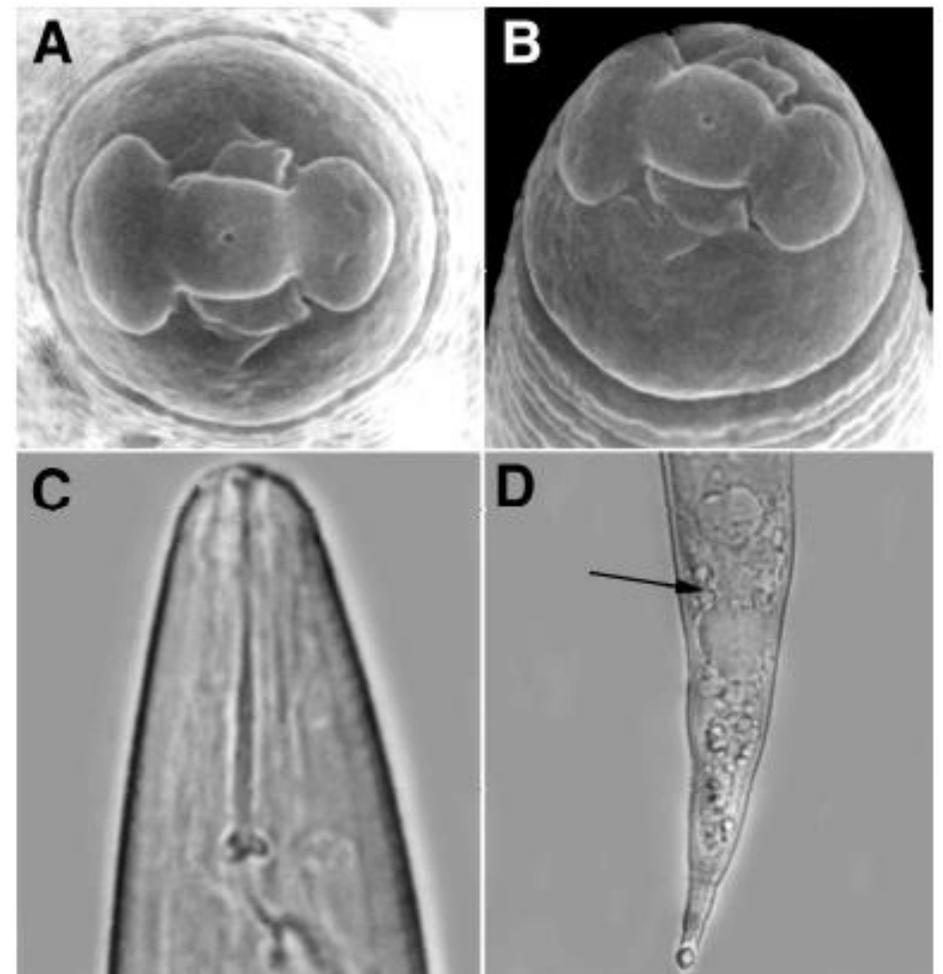


Figura 9. J2 de *Meloidogyne brasilensis* n. sp. População de Brasília. A, B: Região da cabeça em MEV, vista frontal e lateral; C: Região da cabeça em MO, vista lateral; D: Caula em Mo, vista lateral (a seta indica o reto). (Charchar & Eisenback, 2002).

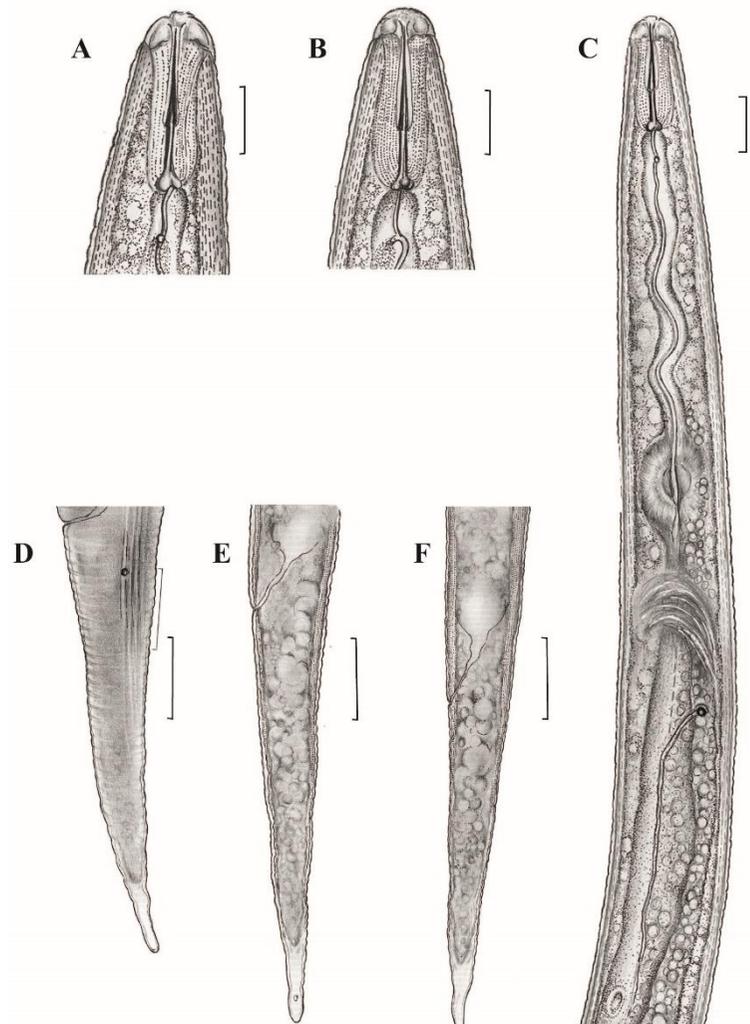


Figura 6. Desenhos de J2 de *Meloidogyne ethiopica*. A, B: Head end, dorsal and lateral views; C: Anterior region, lateral view; D, E: Tails, lateral and ventral views (scale bars: A-E 10 μ m). Carneiro et al., 2004.

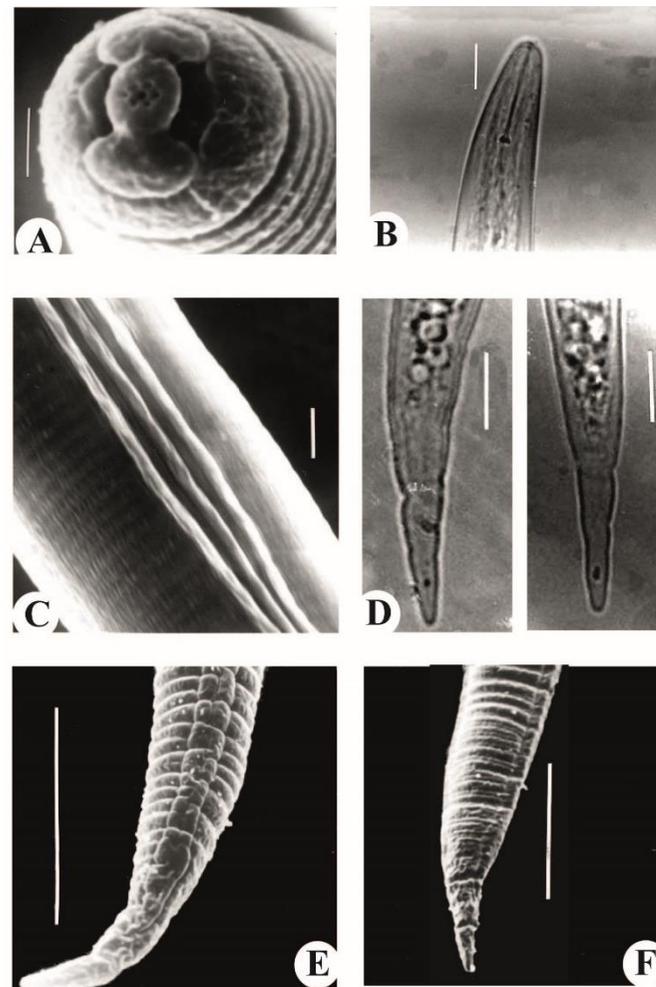


Figura 7. J2 de *Meloidogyne ethiopica*. A: Região cefálica em MEV, vista frontal; B: Região anterior em MO, vista lateral; C: Campo lateral em MEV; D: Caudas em MO, vista lateral; E, F: Caudas em MEV, vistas lateral e ventral. (Escala: A 1 μ m; B 5 μ m; C 2 μ m; D 10 μ m). Carneiro et al., 2004.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLOK, V.C. & POWERS, T.O. 2009. Biochemical and molecular identification. In: Perry, R. Moens, M., Starr, J.L. (eds). Root-knot nematodes. p. 98-118.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & ALMEIDA, M.R.A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira* 25: 35-44.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; GOMES, C.B.; ALMEIDA, M.R.A.; GOMES, A.C.M.M. & MARTINS, I. 2003. First report of *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968 on kiwi in Brazil and reaction on different plant species. *Nematologia Brasileira* 27:151-158.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A. & GOMES, A.C.M.M. 2004a. Additional information on *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968 (Tylenchida: *Meloidogynidae*), a root-knot nematode parasitising kiwi fruit and grape-vine from Brazil and Chile. *Nematology* 6, 109–123.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; TIGANO, M.S.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A. & SARAH, J.L. 2004b. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: *Meloidogynidae*) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology* 6: 287-298.
- CASTILLO, P.; VOVLAS, N.; SUBBOTIN, S. & TROCCOLI, A. 2003 A new root-knot nematode, *Meloidogyne baetica* n. sp (Nematoda: Heteroderidae), parasitizing wild olive in Southern Spain. *Phytopathology* 93:1093-1102.
- CHARCHAR, J.M. & EISENBACK, J.D. 2002. *Meloidogyne brasiliensis* n. sp. (Nematoda: *Meloidogynidae*), a root-knot nematode parasitising tomato cv. Rossol in Brazil. *Nematology* 4:629–643.
- CORREA, V.R.; MATTOS, V.S.; ALMEIDA, M.R.A.; SANTOS, M.F.A.; TIGANO, M.S.; CASTAGNONE-SERENO, P. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2014. Genetic diversity of the

root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* and development of a specie-specific SCAR marker for this diagnosis. *Plant Pathology*, 63:476-483.

DE LEY, I.T.; KARSSSEN, G.; DE LEY, P.; VIERSTRAETE, A.; WAEYENBERGE, L.; MOENS, L. & VANFLETEREN, J. 1999. Phylogenetic analyses of internal transcribed spacer region equences within *Meloidogyne*. *Journal of Nematology* 31:530–531 (Abstr.).

EISENBACK, J.D. & HIRSCHMANN, H. 1979. Morphological comparison of second-stage juveniles of several *Meloidogyne* species (root-knot nematodes) by scanning electron microscopy. *Scanning Electron Microscopy* 3, 223–230.

EISENBACK, J.D. & HIRSCHMANN, H. 1981. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of head shape and stylet morphology. *Journal of Nematology* 13, 513–521.

EISENBACK, J.D. & HUNT, D.J. 2009. General morphology. In: Perry, R.N., Moens, M., Starr, J.L., (eds). *Root-knot Nematodes*. p. 18-54.

EPPO.2015.https://www.eppo.int/QUARANTINE/Alert_List/nematodes/Meloidogyne_ethiopica.htm.

ESBENSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida). *Journal of Nematology* 17: 6-20.

ESBENSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 22: 10-15.

HARTMAN, R.M. & SASSER, J.N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: Barker, K.R.; Carter, C.C. & Sasser, J.N. (eds). *An advanced treatise on Meloidogyne*. v. 2, Methodology. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, p. 69-77.

HOLTERMAN, M.; KARSSSEN, G.; VAN DEN ELSEN, S.; VAN MEGEN, H.; BAKKER, J. & HELDER, J. 2009. Small subunit rDNA-based phylogeny of the Tylenchida sheds light

on relationships among some high-impact plant-parasitic nematodes and the evolution of plant feeding. *Phytopathology* 99: 227-235.

HOLTERMAN, M.; VAN DER WURFF, A.; VAN DEN ELSEN, S.; VAN MEGEN, H.; BONGERS, T.; HOLOVACHOV, O.; BAKKER, J. & HELDER, J. 2006. Phylum wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. *Molecular Biology and Evolution* 23: 1792-1800.

JEPSON, S.B. (1987). Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Wallingford, UK, CABI International. 265p.

KARSSSEN, G. 2002. The plant-parasitic nematode genus *Meloidogyne* Goldi, 1892 (Tylenchida) in Europe. Brill Academic Publishers, Leiden, The Netherlands.

KARSSSEN, G. & MOENS, M. 2006. Root-knot nematodes. In: Perry, R.N. & Moens, M. (eds). *Plant Nematology*, Cambridge, MA, CABI North America Office, p. 59-90.

RANDIG, O.; BONGIOVANNI, M.; CARNEIRO, R.M.D.G. & CASTAGNONE-SERENO, P. 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome* 45:862-870.

SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

SASSER, J.N. 1977. Worldwide dissemination and importance of the root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. *Journal of Nematology* 9: 26-29.

SASSER, J.N. & CARTER, C.C. 1982. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.): Identification, morphological and physiological variation, host range, ecology, and control. In: Riggs, R.D. (eds). *Nematology in the southern region of the United States*. Southern Cooperative Series Bulletin 276, Arkansas Agricultural Experimental Station, Fayetteville, Ark, 21-32.

- SASSER, J.N. & KIRBY, M.F. 1979. Crop cultivars resistant to root-knot nematodes, *Meloidogyne* species with information on seed sources. International *Meloidogyne* Project. A Cooperative Publication of the Department of Plant Pathology North Carolina State University and the United States Agency for International Development. Raleigh, NC, USA, 24 p.
- SCHMITZ, B.; BURGERMEISTER, W. & BRAASCH, H. 1998. Molecular genetic classification of Central European *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax* populations. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 50:310-317.
- STRAJNAR, S.; SIRCA, S.; KNAPIC, M. & UREK, G. 2011. Effect of Slovenian climatic conditions on the development and survival of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica*. *European Journal of Plant Pathology* 129: 81–8.
- SUBBOTIN, S.A.; WAEYENBERGE, L. & MOENS, M. 2000. Identification of cyst forming nematodes of the genus *Heterodera* (Nematoda: Heteroderidae) based on the ribosomal DNA-RFLP. *Nematology* 2:153-164.
- SWOFFORD, D.L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), version 4. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates.
- TAYLOR, A.L. & SASSER, J.N. 1978. Biology, identification and control of rootknot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Coop. Publ. Dept. Plant Pathology, North Carolina State University Graphics, Raleigh, NC, 111p.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D.G. 1997. The ClustalX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876- 4882.
- TIGANO, M.S.; CARNEIRO, R.M.D.G.; JEYAPRAKASH, A.; DICKSON, D.W. & ADAMS, B.J. 2005. Phylogeny of *Meloidogyne* spp. based on 18S rDNA and the intergenic region of mitochondrial DNA sequences. *Nematology* 7:851–862.

WHITEHEAD, A.G. 1968. Taxonomy of *Meloidogyne* (Nematoda: Heteroderidae) with descriptions of four new species. Transactions of the Zoological Society of London 31:263–401.

WHITEHEAD, A.G. 1969. The distribution of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in tropical Africa. Nematology 15:315-333.

CAPÍTULO 3. PRIMEIRA DETECÇÃO DE *MELOIDOGYNE KONAENSIS* PARASITANDO DIFERENTES CULTURAS NO BRASIL, E INFORMAÇÕES ADICIONAIS ACERCA DA ESPÉCIE

RESUMO - Em um levantamento de *Meloidogyne* spp. em diferentes culturas de 11 municípios do estado do Ceará, por meio do método de eletroforese de isoenzimas, caracterizaram-se quatro populações atípicas de *Meloidogyne*, originárias de plantas de repolho, mamão, noni e canapum, que apresentaram um perfil de esterase diferente de todos já detectados no Brasil. Estudos morfológicos mostraram características típicas de *M. konaensis*. Os padrões perineais das fêmeas são semelhantes aos de *M. arenaria* e *M. incognita*, o comprimento dos estiletos de 14-20 µm, bulbos que se fundem gradualmente com a haste do estilete, e DEGO medindo 4-7 µm, são algumas características das fêmeas. Embora os machos sejam raros, a presença de 6-12 grandes projeções na haste do estilete é o caráter mais usual na identificação dessa espécie. O padrão de esterase K3 é único e específico da espécie, com três bandas principais (Rm: 1,0, 1,17, 1,27) e uma banda secundária (Rm: 1,10). Alguns equívocos a respeito da verdadeira identidade dessa espécie foram esclarecidos neste estudo, inclusive as suas diferenças em relação a *M. paranaensis*. Um marcador SCAR espécie específico desenvolvido para *M. paranaensis* foi testado em *M. konaensis* e não foi observado a amplificação de nenhum fragmento. Em análise Neighbour-Joining, nas árvores das sequências (ITS1-ITS2 e D2-D3) do rDNA, *M. konaensis* do Ceará apareceu claramente separado de *M. paranaensis*. Testes de hospedeiras mostraram que cafeeiro (*Coffea arabica* L.) não é hospedeiro de *M. konaensis* como foi relatado na descrição original da espécie.

Palavras – Chaves: Gama de hospedeiros, identificação de espécie, *M. konaensis*, Morfologia, taxonomia.

CHAPTER 3: FIRST REPORT OF *MELOIDOGYNE KONAENSIS* PARASITIZING DIFFERENT CROPS IN BRAZIL, AND ADDITIONAL INFORMATION ON THIS SPECIES

SUMMARY - In a survey for *Meloidogyne* spp. in different crops from eleven regions at Ceará State, Brazil using esterase isozyme electrophoresis as a specific identification method, four atypical populations were characterized from cabbage, papaya, noni and canapum plants, which showed an esterase profile different from those previously detected in Brazil. Morphological studies showed typical characteristics of the species *M. konaensis*. Perineal patterns of females were variable, similar to *M. arenaria* and *M. incognita*, stylet length 14-20 μm , the knobs gradually merging with the shaft and the dorsal esophageal gland orifice (DEGO) ranging from 4-7 μm , are some characteristics of females. Although males are not frequently found, the stylet with 6-12 large projections protruding from the shaft are the most useful diagnostic characters for this species. The esterase pattern K3 is unique and species-specific with three major bands (Rm 1.0, 1.17, 1.27) and a secondary band (Rm 1.10). Some confusion about the true identity of this species was clarified in this study including the differentiation from *M. paranaensis*. A species-specific SCAR marker developed for *M. paranaensis* was tested and no amplification products were observed. In Neighbour-Joining analyses of ITS and D2-D3 rRNA sequences, *M. konaensis* from Brazil appeared clearly separated from *M. paranaensis*. Pathogenicity tests indicated that coffee is not a host of *M. konaensis* as previously reported in the original description of this species.

Key-words- host-range, *M. konaensis*, morphology, species identification, taxonomy.

INTRODUÇÃO

Os nematoides-das-galhas pertencem ao gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1887, com mais de 100 espécies descritas e constituem o grupo mais importante de nematoides parasitas de plantas no mundo (Karssen *et al.*, 2013). Os membros deste gênero têm sido objeto de muitas pesquisas quando comparados com outros nematoides fitoparasitas, devido à sua ampla distribuição no mundo e, conseqüentemente, a sua importância econômica (Sasser, 1977; Sasser & Carter, 1982; Moens *et al.*, 2009).

A identificação precisa e acurada de espécies de *Meloidogyne* é baseada na combinação de vários métodos como análises da morfologia e morfometria, preferência de hospedeiras (Eisenback *et al.*, 1981), número de cromossomos, assim como as técnicas bioquímicas e moleculares. Todas essas técnicas são muito importantes para a completa caracterização de espécies (Blok & Powers, 2009). Apesar de numerosos estudos acerca da sua taxonomia, a identificação de *Meloidogyne* spp. a nível de espécie é muito difícil, até mesmo para os taxonomistas mais experientes e especializados no gênero (Carneiro *et al.*, 2000; Blok & Powers, 2009), sendo na maioria das vezes devido a sutis variações intra e inter específicas (Jepson, 1987; Hunt & Handoo, 2009).

Meloidogyne konaensis Eisenback, Bernard & Schmitt, 1994 foi descrita de populações isoladas de solos cultivados com café (*Coffea arabica* L.) na ilha do kona, Havaí, EUA, cujos nematoides foram multiplicados em plantas de tomate para a identificação da espécie. De acordo com a descrição da espécie, os padrões perineais de *M. konaensis* variam entre as características dos padrões de espécies já conhecidas como *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949 e *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949. Adicionalmente, um perfil de bandas de esterase era semelhante a uma banda de rápida mobilidade encontrada em outras populações de *Meloidogyne* spp. do Brasil, Peru e Suriname, descrita posteriormente como *M. paranaensis* Carneiro,

Carneiro, Abrantes, Santos & Almeida, 1996, em plantas de café no Brasil (Carneiro *et al.*, 1996a, Carneiro *et al.*, 1996b). Em 1999, Dr. Mario Serracin enviou para o Brasil a cultura tipo de *M. konaensis* do Havaí, e esta foi multiplicada em tomateiro. Utilizando fêmeas individuais, o fenótipo de esterase (Est) K3 foi caracterizado para *M. konaensis* (Carneiro *et al.*, 2000), e o número de cromossomos estimado no intervalo de 40-44 (dados não publicados). Depois disso, a população foi inoculada em plantas de cafeeiro suscetíveis cv. Mundo Novo, mas 8 meses após a inoculação não foi observada a multiplicação da população (dados não publicados), o que infelizmente levou à perda desse isolado tipo. Um ano mais tarde, outra população de *M. konaensis* do Havaí, isolada de cafeeiros foi enviada para o Brasil e apenas o fenótipo de esterase F1 (= Est P1 de *M. paranaensis*) foi caracterizado de fêmeas multiplicadas em plantas de café. Utilizando-se marcadores PCR-SCAR multiplex desenvolvido para *M. exigua* Goeldi, 1892, *M. incognita* e *M. paranaensis* (Randig *et al.*, 2002), o DNA deste último isolado enviado do Havaí apresentou fragmento amplificado de 208 pb esperado para *M. paranaensis* (Randig *et al.*, 2004).

Em outro estudo, a mesma população do Havaí enviado como sendo *M. konaensis* (exibindo um perfil de esterase Est P1), e que não apresentou caracteres morfológicos dessa espécie (6 a 12 grandes projeções em volta da haste do estilete), mostrou alta homogeneidade, e se agrupou com populações de *M. paranaensis* do Brasil com 100 % de bootstrap (Carneiro *et al.*, 2004). Essas populações de *M. paranaensis* apresentaram o número de cromossomos variando de 52 a 54 (dados não publicados), e foram identificadas como pertencendo a *M. paranaensis* do Havaí (Carneiro & Cofcewicz, 2008).

Tem sido relatado, que *M. konaensis* do Havaí apresenta três diferentes fenótipos de esterase Est F1 (=Est P1), Est I1 (= *M. incognita*) e Est F1I1, dependendo do

hospedeiro (Sipes *et al.*, 2005). De acordo com esses autores, apenas o isolado que apresenta o fenótipo Est F1 (= Est P1 de *M. paranaensis*) parasita café. Nessa publicação, as comparações da morfologia entre os isolados dos três diferentes fenótipos Est F1, Est II e Est F1II (todas consideradas *M. konaensis*) são muito pobres e a principal característica que é a presença de 6 – 12 grandes projeções em volta da haste do estilete de *M. konaensis* não foi possível a sua visualização ao MEV.

Recentemente no Brasil, foram detectadas populações de uma espécie atípica parasitando três culturas e uma planta daninha, em quatro localidades do estado do Ceará, em repolho (*Brassica capitata* L.) com uma amostra coletada em Guaraciaba, região norte do estado; em mamão (*Carica papaya* L.) com três amostras coletadas em Jaguaribara e Guaiuba; noni (*Morinda citrifolia* L.) com uma amostra coletada em Fortaleza; e canapum (*Physalis angulata* L.), com uma amostra coletada em Guaiuba (Silva & Santos, 2012; Silva, 2014). Uma dessas populações do estado do Ceará foi enviada ao Laboratório de Nematologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília, para confirmar a identificação da espécie. Essa população apresentou o mesmo fenótipo de esterase K3, caracterizado por Carneiro *et al.* (2000) em população tipo do Havaí descrita como *M. konaensis*.

Os objetivos deste estudo foram: relatar pela primeira vez a ocorrência de *M. konaensis* no Brasil; esclarecer a identidade taxonômica dessa espécie por critérios morfológicos, morfométricos, citológicos, enzimáticos e moleculares; dirimir equívocos na interpretação da identidade de *M. konaensis*, possivelmente decorrentes de mistura de espécies parasitas do cafeeiro como *M. paranaensis* e *M. incognita* na ilha de Kona, no Havaí; prover informações sobre suas preferências de hospedeiras, inclusive sanar dúvidas sobre a hospedabilidade do cafeeiro a essa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

População do nematoide

A população pura de *Meloidogyne* sp. proveniente do estado do Ceará, foi mantida em regime de reinoculação periódica em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Santa Clara), em casa de vegetação, sob temperatura de 22-28 °C. Todos os estudos morfológicos, biológicos e moleculares foram realizados utilizando-se espécimes dessa cultura. Massas de ovos das fêmeas foram recuperadas de raízes de tomateiros infectados, e os juvenis de segundo estágio (J2s) foram obtidos a partir de ovos em câmara de eclosão, através da técnica de funil de Baermann modificado (Whitehead & Hemming, 1965).

Os machos foram obtidos através da imersão do sistema radicular em água, sob oxigenação com auxílio de uma bomba de aquário, durante um período de 15 dias, com coletas realizadas de dois em dois dias (Carneiro *et al.*, 2004). Para a extração das fêmeas, raízes infectadas foram lavadas e submetidas a dissecação, com auxílio de uma agulha de seringa sob microscópio estereoscópio. Os ovos para análises de DNA foram extraídos de raízes infectadas conforme metodologia descrita por Carneiro *et al.* (2004).

Estudos morfológicos e morfométricos

Os padrões perineais foram obtidos de fêmeas jovens e vivas, cortadas em ácido láctico [45 %] e montados em glicerina (Taylor & Netscher, 1974). Fêmeas, machos, J2s e estiletos dos machos e das fêmeas foram preparados para visualização em MEV de acordo com os métodos previamente descritos por Eisenback *et al.* (1986). Os espécimes já extraídos, foram fixados a 4 °C, em glutaraldeído 2%, diluído em tampão de cacodilato

de sódio 1 M, pH 7,4, por 24h. Posteriormente, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (2%), durante 2h. Após esse período, os espécimes foram submetidos a desidratação em série com etanol (10, 30, 50, 70, 90 e 100%), com intervalos de 15 minutos. Logo após, foram submetidos a secagem em ponto crítico, para a completa eliminação do álcool. Os espécimes foram montados apoiados em fios de cabelo, dispostos previamente em “stubs” revestidos por fita-cola dupla-face.

Estudos biométricos foram conduzidos em fêmeas, machos e J2s. Machos e J2s foram mortos em formaldeído [2%], frio (5 °C), e medidos imediatamente, diretamente do microscópio óptico (MO). Estudos morfométricos foram feitos usando as medições sugeridas por Eisenback & Hunt (2009).

Para a excisão dos estiletos de fêmeas e machos, seguiu-se a metodologia descrita por Eisenback (1985a), pela qual os espécimes coletados foram colocados em lamínulas contendo ácido láctico 45%. Posteriormente, foi feito um corte na região 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 formalina 2%. Foi inserida uma seta de papel indicando a localização do estilete, a ser visualizado ao MEV.

Após a metalização com 35 nm de ouro, os espécimes foram visualizados e fotografados com o MEV Zeiss DSM-962. Trinta espécimes fêmeas, 30 J2s e 30 machos foram estudados com base na observação da morfologia das seguintes estruturas: região anterior (macho, fêmea e J2), cauda (J2 e macho), campo lateral e estiletos excisados (macho e fêmea) (Eisenback, 1985b). 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 morfológicas foram realizadas também em microscopia óptica de luz em cerca de 20 espécimes de cada estágio e nos padrões perineais, montados em lâminas com glicerina.

Estudos bioquímicos e biológicos

A caracterização de isoenzimas foi feita para esterase (Est) e malato desidrogenase (Mdh) usando gel de poliacrilamida 7% de acordo com Carneiro & Almeida (2001). Extratos proteicos de fêmeas de *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, jovens e leitosas foram incluídos em cada gel como fenótipo padrão para a caracterização de esterase e malato desidrogenase. Os fenótipos de esterase foram designados pela letra sugestiva do nome da espécie do nematoide, acompanhada de um número que indica o número de bandas (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985, 1990).

Estudos citológicos foram realizados com o método de coloração com Orceína-propionica conforme descrito por Triantaphyllou (1985).

O teste de hospedeiros diferenciadores foi realizado com as seguintes plantas: algodão cv. Deltapine 61, fumo cv. NC95, pimentão cv. Early California Wonder, melancia cv. Charleston Gray, amendoim cv. Florunner e tomate cv. Rutgers (Hartman & Sasser, 1985). Seis plantas de café cv. Mundo Novo suscetível a *M. incognita*, *M. exigua* e *M. paranaensis* foram incluídas no teste. Cada planta foi inoculada com 5000 J2s de *Meloidogyne* sp. do Ceará ou *M. paranaensis* do Brasil, e mantidas sob condições de casa de vegetação a 25-30 °C, com irrigação e adubação necessárias. Oito meses após a inoculação (para plantas de café) e três meses depois (para outras plantas), o sistema radicular foi lavado com água corrente e ovos foram extraídos usando uma solução de NaOCl [1%] (Hartman & Sasser, 1985) e quantificados sob microscópio de luz usando lâminas de Peters. O fator de reprodução (FR) foi calculado como $FR=PF/PI$, onde,

PF=população final e PI=população inicial (P1=5000). Foram consideradas hospedeiras susceptíveis, as plantas que apresentaram $FR \geq 1$ com nota maior que 2 (mais de 11 galhas ou massas de ovos), e resistentes aquelas que apresentaram $FR \leq 1$ e nota ≤ 2 (0-10 número de galhas ou massa de ovos) (Taylor & Sasser, 1978).

Análises moleculares

Ovos de *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. paranaensis* e *Meloidogyne* sp. do Ceará foram extraídos de raízes de tomateiros, infectadas e armazenados em -80 °C até o momento do uso. Para cada população de nematoides, o DNA genômico foi extraído e purificado de alíquotas de 200 – 300 µl de ovos, seguindo o procedimento clássico fenol – clorofórmio (Randig *et al.*, 2002). Os ovos foram macerados em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido, e recuperado em tubo Eppendorf de 1,5 ml, ao qual foi adicionado 500 µl de 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, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por dois minutos, e o sobrenadante foi descartado. Esta etapa foi repetida duas vezes. Em seguida foram acrescentados 800 µl de tampão de homogeneização (0,1 M NaCl; 0,2 M sacarose; 10 mM EDTA) e 200 µl do tampão de lise (0,125 M EDTA; 0,5 M Tris pH 9,2; 2,3 % SDS), os tubos foram homogeneizados e incubados em banho maria a 55 °C por 30 minutos, seguido de 10 minutos à temperatura ambiente. A purificação foi realizada adicionando-se 1 V de fenol (1 ml), seguindo-se à homogeneização e centrifugação a 14000 rpm por três minutos. O sobrenadante foi recuperado e depois misturado à ½ V de fenol (0,5 ml) + ½ V de clorofórmio (0,5 ml) e centrifugado a 14000 rpm por três minutos. O sobrenadante foi recuperado em novo tubo, adicionando 200 µl de éter, e centrifugando a 14000 rpm por três minutos. O éter foi eliminado com auxílio de uma pipeta. Para precipitação do DNA, foi adicionado ao tubo

1 ml de etanol absoluto, seguido de homogeneização e observação do pelete formado. O tubo foi então deixado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Em seguida efetuou-se uma centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e adicionou-se etanol 70%. Após a centrifugação a 14000 rpm por cinco minutos, eliminou-se o etanol. O precipitado foi seco à temperatura ambiente, e recuperado em volume de 10 a 20 μl de água esterilizada (Milli-Q) e o DNA foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Considerando a ambiguidade na identificação de *M. konaensis*, ensaios de PCR foram realizados utilizando-se marcadores SCAR desenvolvidos para *M. incognita*, o par de primers incK14 [F: 5'- GGGATGTGTAAATGCTCCTG-3', R: 3'- CCGCTACACCCTCAACTTC-5'], *M. paranaensis*, Par-09 [F: 5'- FGCCCGACTCCATTTGACGGA-3', R: 3'- CCGTCCAGATCCATCGAAGTC-5'] (Randig *et al.*, 2002) e *M. arenaria*, Far/Rar [F: 5'- TCGGCGATAGAGGTAAATGAC-3', R: 3'- TCGGCGATAGACTACAAC-5'] (Zijlstra *et al.*, 2000).

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 μl , contendo 2 μl de DNA genômico [3 ng/ μl], 1 μl de cada primer (Operon Technologies, Alameda, CA, EUA), 4 μl de dNTPs [1,25 mM] (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) (Invitrogen®, São Paulo, Brasil), 2,5 μl de tampão de reação 1X + MgCl₂ (Phoneutria Biotecnologia & Serviços-pht®, São Paulo, Brasil), 0,25 μl da enzima Taq DNA polimerase (pht®) e 14,25 μl de água Milli-Q. As amplificações foram feitas usando o termociclador PTC-100 (MJ Research) e as condições da PCR para *M. paranaensis* e *M. incognita* foram 5 min. a 94 $^{\circ}\text{C}$, 35 ciclos de 30 seg. a 94 $^{\circ}\text{C}$, 45 seg. a 64 $^{\circ}\text{C}$, 1 min. a 70 $^{\circ}\text{C}$ e extensão final de 8 min. a 70 $^{\circ}\text{C}$; e para *M. arenaria* foram 5 min. a 94 $^{\circ}\text{C}$, 35 ciclos de 30 seg. a 94 $^{\circ}\text{C}$, 45 seg. a 61 $^{\circ}\text{C}$, 1 min. a 70 $^{\circ}\text{C}$, e extensão final de 8 min. a 70 $^{\circ}\text{C}$. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizados sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio [0,3 $\mu\text{g/ml}$]. Cada experimento foi repetido duas vezes.

Para os estudos de filogenia, as regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA (sequências do *primer*=F:5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3' e R:5'-TCCTCCGCTAAATGATATG-3' (Schmitz *et al.*, 1998), e fragmento D2-D3 do gene 28S rRNA (sequências do *primer* = F: 5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3 e 5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3) (De Ley *et al.*, 1999) foram amplificadas usando as condições de PCR descritas por Subbotin *et al.* (2000).

Os produtos da PCR foram limpos usando o kit Wizard® SV Gel/PCR Clean Up System (Promega) e clonados no vetor pGem-T® Easy Vector (Promega), seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento do inserto foi feito em dois clones independentes pela Macrogen. O alinhamento foi feito com sequências de duas populações de *M. paranaensis*, duas de *M. incognita*, uma de *M. konaensis* (Brasil) e outras sequências de *Meloidogyne* spp. retiradas do banco de dados do NCBI (*M. arenaria* KJ572384.1, AY438554.1, AF435803.1, KJ598135.1 e *M. konaensis* (Havaí) AF435797.1).

O software ClustalX versão 1.83 foi executado com parâmetros predefinidos por Thompson *et al.* (1997) e as árvores foram geradas usando o algoritmo Neighbour-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) com o software PAUP*, versão 4b10 (Swofford, 2002). Sequências de *Pratylenchus neglectus* (Rensch, 1924) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 (KP995311.1) e *P. vulnus* Allen & Jensen, 1951 (JQ003994.1) foram usadas como outgroups. Para o teste do suporte dos nós das árvores geradas, 1000 repetições de bootstrap foram executadas e apenas valores acima de 50% foram considerados.

RESULTADOS

Os estudos da morfologia mostraram características típicas de *M. konaensis* Eisenback *et al.*, 1994.

Estudos morfológicos e morfométricos

Em geral, os dados da morfologia e da morfometria da população de *M. konaensis* do Brasil foram congruentes com a descrição original da espécie, com pequenas variações já esperadas, já que são frequentes no gênero. As medidas estão apresentadas na Tabela 1.

A morfologia da fêmea é apresentada nas Figuras 1 e 2. Os padrões perineais são variáveis em formato, similares a *M. incognita* com arco dorsal alto e quadrangular (Figura 1a), e a *M. arenaria* com o arco dorsal baixo e arredondado (Figuras 1b, 1c e 1d). As estrias são grossas, em alguns casos suavemente contínuas a onduladas, algumas vezes com linhas laterais. Pequenos fasmídios estão localizados em ambos os lados a nível do ânus (Figura 1b). O padrão perineal não é característico para essa espécie, uma vez que é altamente variável, portanto, não é utilizado para identificação da espécie. O corpo tem o formato de pera, variável no tamanho, coloração branca translúcida, na maioria das vezes, com o pescoço longo e proeminente (Figura 2c) e curvados para vários ângulos do corpo. O disco labial é geralmente retangular, algumas vezes, divididos em pares de lábio distintos, os lábios laterais grandes e triangulares (Figura 2a, b). O esqueleto cefálico é fraco, e o poro excretor se localiza a 2-3 comprimentos do estilete, posteriormente, à base do estilete (Figura 2d). O estilete é forte, com o cone curvado dorsalmente, haste alargada com algumas projeções pequenas, e três bulbos que se fundem gradualmente com a haste (Figura 2 e, f). A abertura da glândula esofágica dorsal (DEGO) situa-se no intervalo de 4-7 μm da base do estilete.

Tabela 1. Dados morfométricos de *Meloidogyne konaensis* do Brasil. Todas as medidas são apresentadas em μm e nos modelos: média \pm desvio padrão (variação) e coeficiente de variação.

| Mensurações | Fêmea | Macho | J2 |
|--|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| n | 30 | 15 | 30 |
| L | 860,1 \pm 198 (650 – 1200) | 1812,6 \pm 640 (1060 - 2050) | 474,5 \pm 65 (395 - 550) |
| | 13,82 | 13,7 | 7,9 |
| Comprimento corpo/diâmetro máximo do corpo | 1,76 \pm 0,1 (1,1 – 2,40) | 4,4 \pm 0,2 (2,7 – 5,4) | 33,0 \pm 17,0 (23,0 – 55,0) |
| | 0,19 | 0,16 | 8,94 |
| Comprimento do corpo /Comprimento da cauda | - | 126,3 \pm 70 (66,2 - 205) | 8,8 \pm 0,5 (6,1 - 15,2) |
| | | 25,1 | 2,1 |
| Diâmetro máximo do corpo | 500,6 \pm 191 (350 - 770) | 42,1 \pm 1,3 (35 - 52) | 14,9 \pm 0,5 (10 - 21) |
| | 22,7 | 11,9 | 0,47 |
| Comprimento do pescoço | 240,5 \pm 89,9 (70 - 380) | - | - |
| | 22,4 | | |
| Comprimento do estilete | 16,0 \pm 0,4 (14,0 - 20,0) | 23,2 \pm 0,44 (20,0 - 24,0) | 14,5 \pm 0,2 (13,0 - 15,0) |
| | 3,2 | 6,7 | 0,5 |
| Altura dos nódulos do estilete | 2,2 \pm 0,1 (1,5 – 3,0) | 3,2 \pm 0,1 (3,0-4,0) | 1,5 \pm 0,04 (1,0 – 2,0) |
| | 2,3 | 0,1 | 0,21 |
| Largura dos nódulos do estilete | 3,6 \pm 0,1 (3,0 – 5,0) | 4,9 \pm 0,1 (4,0 -5,0) | 2,5 \pm 0,1 (2,0 – 3,0) |
| | 3,5 | 0,14 | 0,10 |
| DEGO | 5,0 \pm 0,2 (4,0 - 7,0) | 5,8 \pm 1,0 (5,0 – 9,0) | 4,8 \pm 0,2 (4,0 – 6,0) |
| | 3,8 | 2,3 | 0,8 |
| Distância do poro excretor ao termino anterior | 45,7 \pm 20,6 (29 – 75) | 162,3 \pm 14,2 (146 - 179) | 86,6 \pm 21,4 (65 - 120) |
| | 25,2 | 10,4 | 13,3 |
| Comprimento da fenda vulvar | 23,1 \pm 0,2 (20,0 - 25,0) | - | - |
| | 4,7 | | |
| Distância ânus vulva | 18,6 \pm 0,3 (14,0 – 21,0) | - | - |
| | 8,5 | | |
| Distância interfasmidial | 31,4 \pm 0,5 (22-36) | - | - |
| | 9,4 | | |
| Comprimento do espículo | | 34,1 \pm 05 (30-36) | |
| | | 5,6 | |
| Comprimento do Gubernáculo | - | 9,8 \pm 0,23 (8 - 11) | - |
| | | 5,5 | |
| Comprimento da cauda | - | 13,6 \pm 0,4 (10-16) | 56,1 \pm 17,1 (35 - 76) |
| | | 11,9 | 17,5 |
| Término hialino da cauda | - | | 15,6 \pm 0,5 (13 – 19) |
| | | | 15,6 |

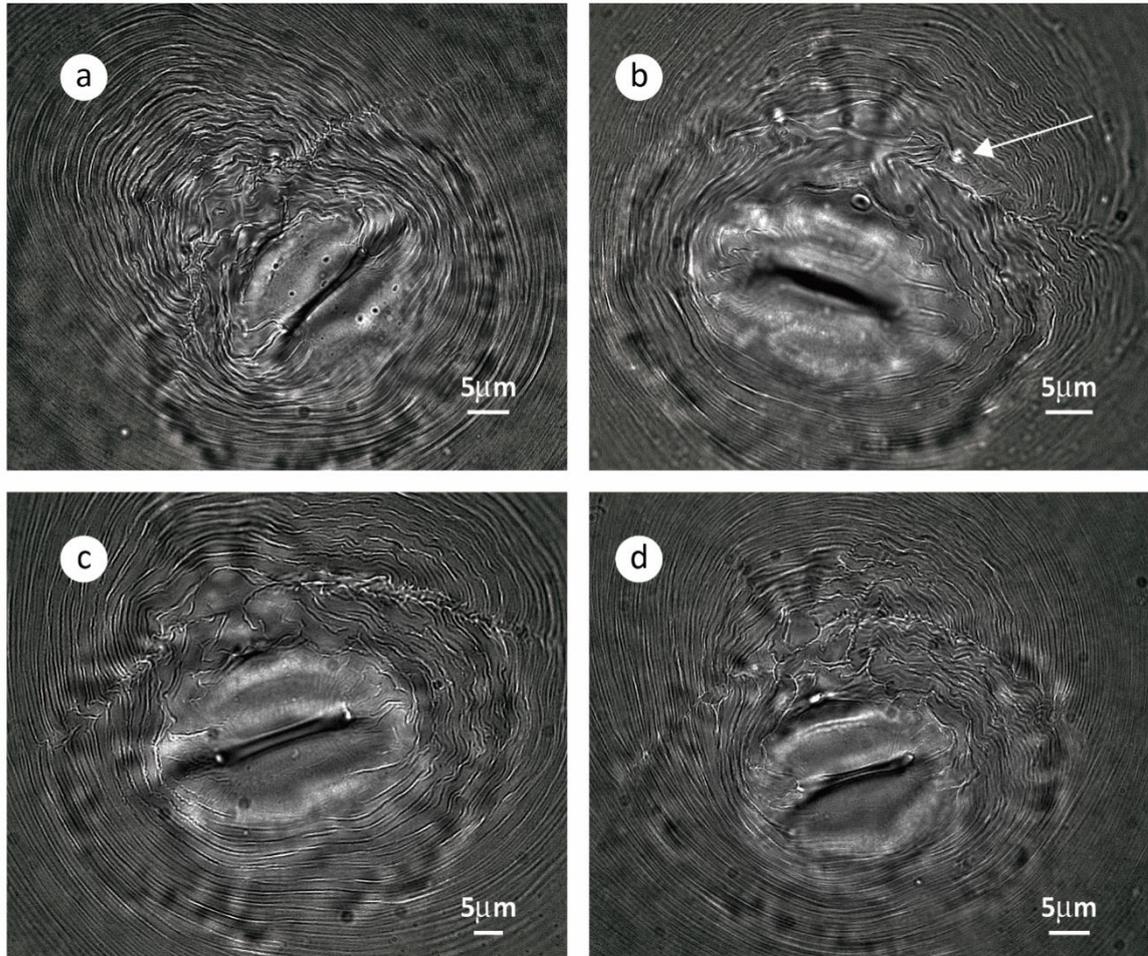


Figura 1. Padrões perineais de *Meloidogyne konaensis* dos Brasil. A-D: Microscopia Óptica (MO) mostrando as variações típicas da espécie. A seta indica o fasmídeos.

Os machos (Figura 3) não são frequentes. O corpo é vermiforme, abruptamente arredondado posteriormente (Figura 3f). A região labial é alta e arredondada, e a região anterior sem anelações, é bem distinta do primeiro anel do corpo (Figura 3a). A morfologia do estilete é bem distinta, com cone reto e pontiagudo, com o seu diâmetro aumentando gradualmente na parte posterior (Figura 3c); a haste é cilíndrica, ligeiramente mais larga na região central, com 6 – 12 grandes projeções, bulbos amplamente alongados, fundindo com a haste, arredondado posteriormente (Figura 3 c, d). O forte estilete com grandes projeções na haste, é o carácter diagnóstico mais utilizado para identificar *M. konaensis* (Figura 3c, d). Em Microscopia óptica (MO), o esqueleto cefálico

é moderadamente desenvolvido, e é possível visualizar as projeções emergindo da haste do estilete (Figura 3b). O campo lateral tem quatro incisuras (Figura 3e). A cauda é curta, com espículos arqueados e gubernáculo distinto (Figura 3f).

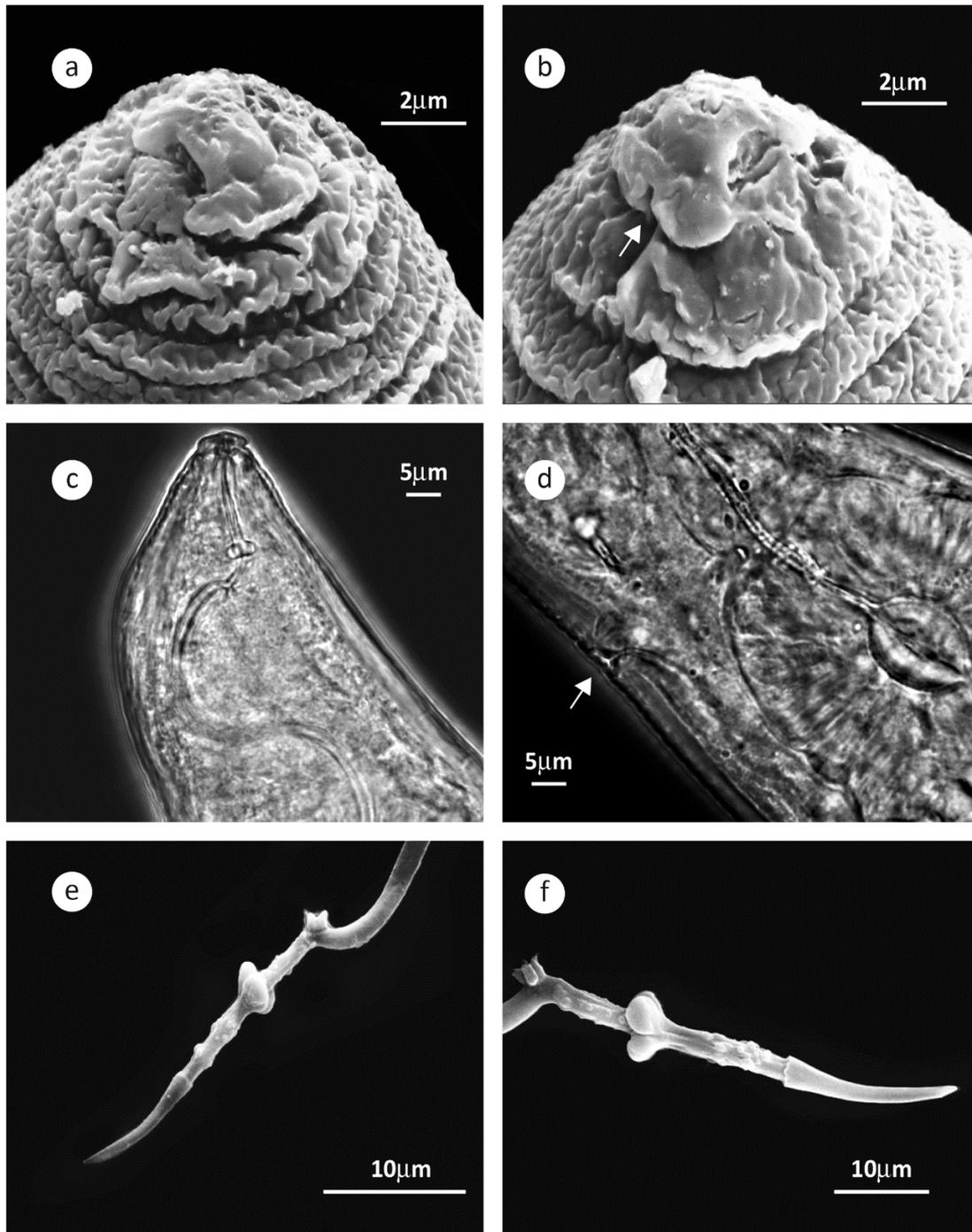


Figura 2. Fêmeas de *Meloidogyne konaensis* do Brasil. A-B: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da região anterior; Seta indica a constrição do lábio mediano. C-D: Microscopia Óptica (MO) da região anterior, mostrando o poro excretor; Seta indica o poro excretor. E-F: MEV de estiletes excisados.

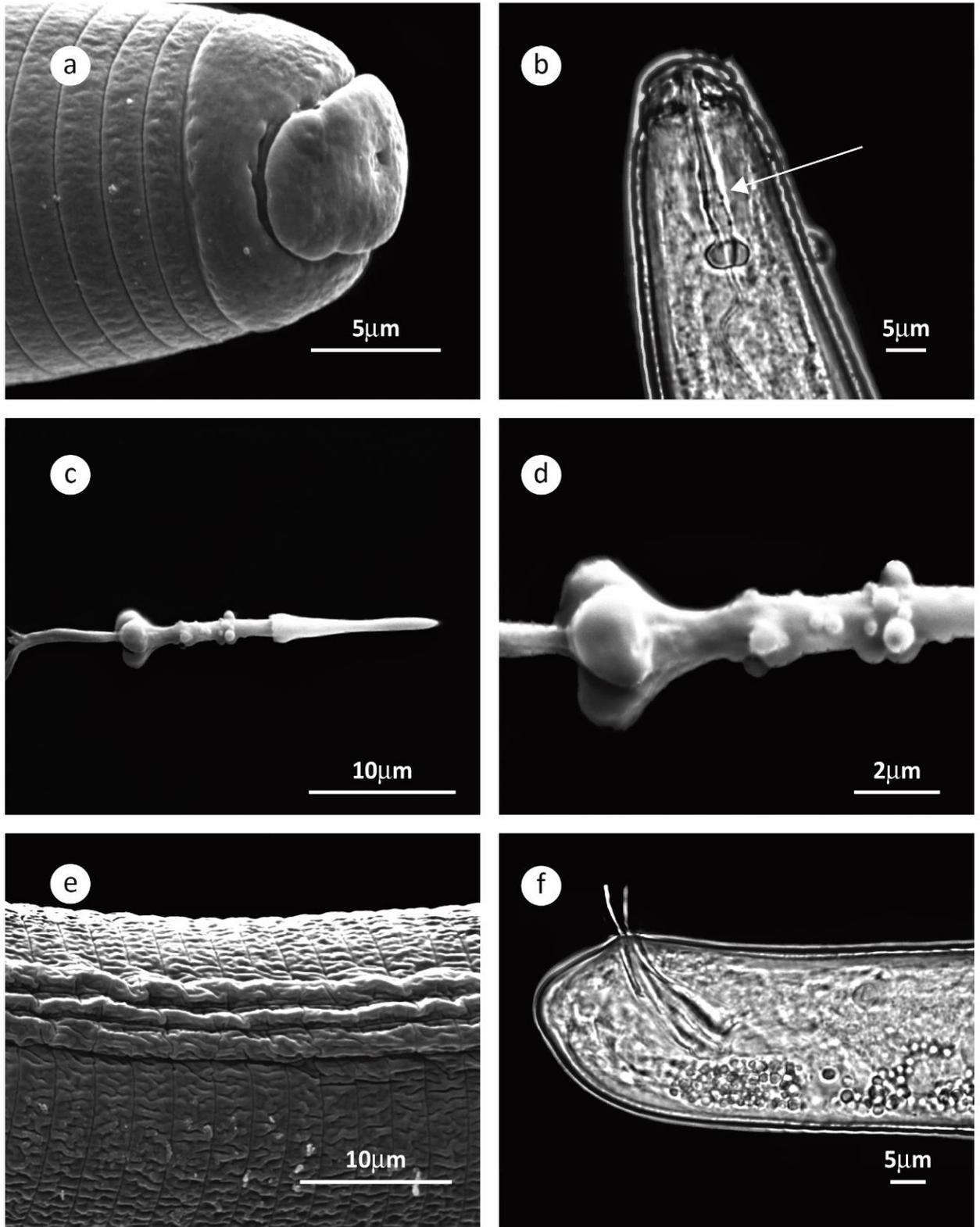


Figura 3. Machos de *Meloidogyne konaensis* do Brasil. A: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da região anterior; B: Microscopia Óptica (MO) da região anterior e vista lateral, com a haste do estilete mostrando de 6-12 grandes projeções (seta); C-D: MEV do estilete excisado, mostrando as grandes projeções na haste; E: MEV do campo lateral; F: MO da cauda em vista lateral.

A Figura 4 representa os estiletos de *M. paranaensis* (Est P1 e P2) do Brasil. O estilete da fêmea (Figura 4a) é idêntico ao da descrição original: cone do estilete ligeiramente curvado dorsalmente, haste cilíndrica sem as pequenas projeções em torno da superfície. Na Figura 4b e c são apresentados os estiletos dos machos de *M. paranaensis* (Est P1 e P2, respectivamente). Os bulbos basais são mais espaçados entre si, e a haste não possui projeções.

Os juvenis de segundo estágio têm esqueleto cefálico fraco, e a região labial lisa, às vezes com poucos anéis (Figura 5a, b). Têm um campo lateral com quatro incisuras (Figura 5c). A cauda frequentemente curvada ventralmente com larga anelacão posteriormente (Figura 5d, e), e o térmico hialino bem distinto (Figura 5f).

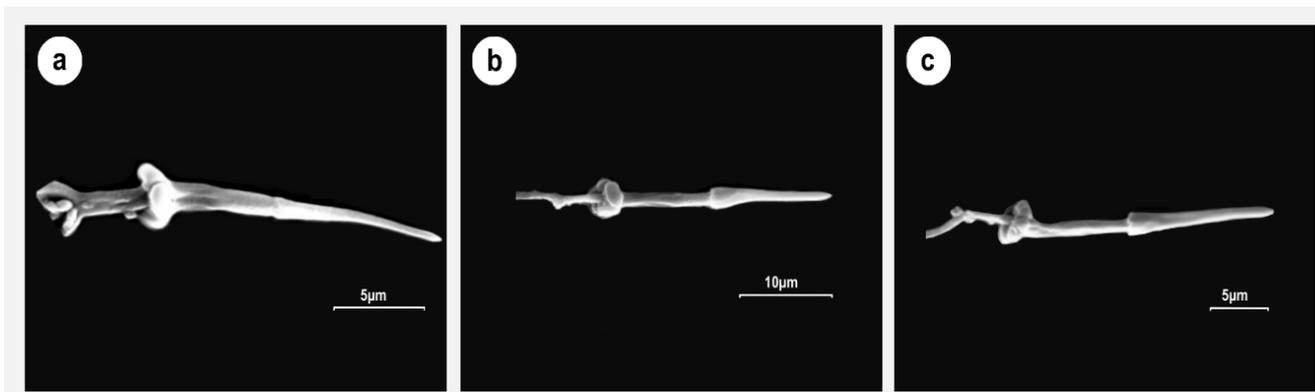


Figura 4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos estiletos excisados de *Meloidogyne paranaensis*; A- fêmea, B- macho de uma população (Est P1) de Rolândia, PR, C- macho de uma população (Est P2) da Herculândia, SP.

As diferenças morfológicas, morfométricas e biológicas entre *M. konaensis* e *M. paranaensis* são apresentadas na Tabela 2.

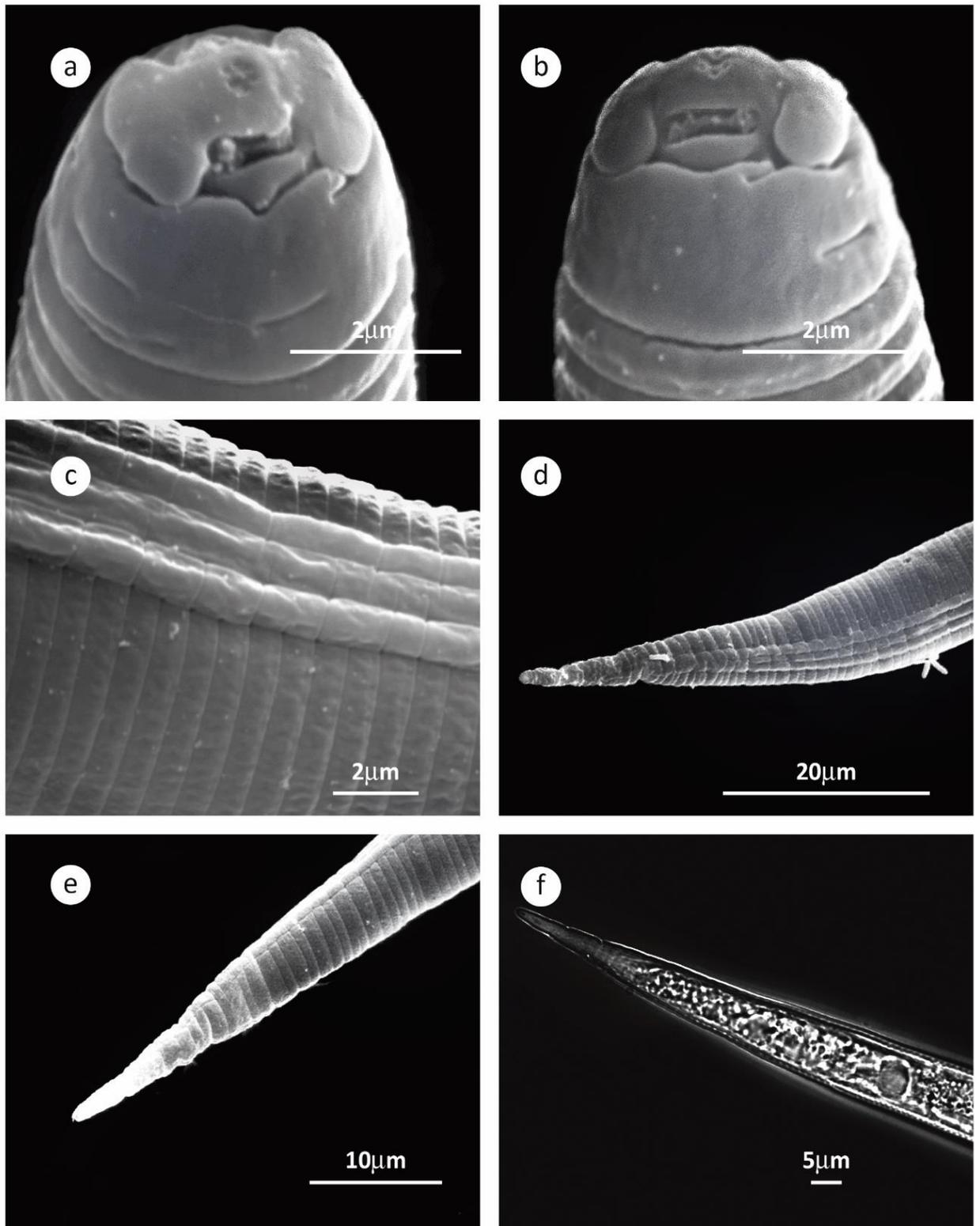


Figura 5. Juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne konaensis* do Brasil. A-B: MEV da região anterior; C- MEV do campo lateral; D-E: MEV das caudas de J2; F: Microscopia Óptica da cauda.

Meloidogyne konaensis se reproduz por partenogênese mitótica e duas populações apresentaram um cariótipo $2n=40-44$ cromossomos. As duas populações de *M. paranaensis*, do Havaí e do Brasil possuem um cariótipo $3n=50-54$ cromossomos (Tabela 2).

Tabela 2. Diferenças entre *Meloidogyne konaensis* do Havaí e Brasil, e *M. paranaensis*, na descrição original e neste estudo.

| Fontes de caractéres | <i>M. konaensis</i> Havaí | <i>M. konaensis</i> Brasil | <i>M. paranaensis</i> Brasil |
|-----------------------------------|--|--|----------------------------------|
| Fêmeas | | | |
| Comprimento do corpo | 992 (532-1510)* | 860 (650-1200) | 681(512-780) |
| Comprimento do estilete | 16,0 (14,3-18,5) | 16,1 (14,0-19,0) | 16,1 (15,0-17,5) |
| DEGO | 5,0 (3,4-6,7) | 5,0 (4,0-7,0) | 5,0 (4,2-5,5) |
| Haste do estilete | Com poucas projeções pequenas | Com várias projeções pequenas | Sem projeções |
| Comprimento do pescoço | 381 (148-978) | 240 (70-380) | 212 (140-284) |
| Padrões perineais | Similar a <i>M. arenaria</i> + <i>M. incognita</i> | Similar a <i>M. arenaria</i> + <i>M. incognita</i> | Similar a <i>M. incognita</i> |
| Fenótipo de esterase | | | |
| MDH | K3 (= M3-F1) N1 | K3 (= M3-F1) N1 | P1 (=F1) N1 |
| Numero de cromossomos | 40-44 | 40-44 | 50-52 |
| Machos | | | |
| Comprimento do corpo | 1522(1149-1872) | 1812 (1060-2050) | 681(512-780) |
| Comprimento do estilete | 22,1(20,2-24,4) | 23,2 (20,0-24,0) | 24,7 (20,0-27,0) |
| DEGO | 6,9 (5,9-8,4) | 5,8 (5,0-9,0) | 4,6 (3,5-5,0) |
| Haste do estilete | Com algumas projeções grandes | Com algumas projeções grandes | Com raras ou nenhuma projeção |
| Comprimento do espículo | 26,9 (21,8-29,4) | 34,1 (30,0-36,0) | 26,0 (22,0-35,0) |
| Juvenis de segundo estágio | | | |
| Comprimento do corpo | 502(468-530) | 474 (395-550) | 458 (389-513) |
| Comprimento do estilete | 13,4 (12,6-14,3) | 14,8(13,0-16,0) | 13,5 (13,0-14,0) |
| DEGO | 4,6 (4,2-5,9) | 4,8 (4,0-6,0) | 4,2 (4,0-4,5) |
| Comprimento da cauda | 58,0 (48,7-73,1) | 56,1 (35,0-76,0) | 49,0(48,0-51,0) |
| Termino hialino | - | 15,7(10,0-20,0) | 10,1(10-12) |

* As medidas são apresentadas em μm : média (intervalo)

Estudos bioquímicos e biológicos

Fenótipos de esterase espécie específicos (Est K3) com três bandas principais (Rm: 1,0, 1,17, 1,27) e uma banda secundária (Rm: 1,10) (Figura 6a) e malato desidrogenase (Mdh N1), com uma banda (Rm: 1,0) foram observados na população de *M. konaensis* do estado do Ceará, Brasil. A figura 6b representa o perfil de esterase caracterizado para a população de *M. konaensis* proveniente do Havaí em 1999, publicado por Carneiro *et al.*, 2000. A figura 6c corresponde ao perfil de esterase de *M. paranaensis* P1 do Brasil, que é idêntico ao perfil F1 tratado como *M. konaensis* no Havaí atualmente.

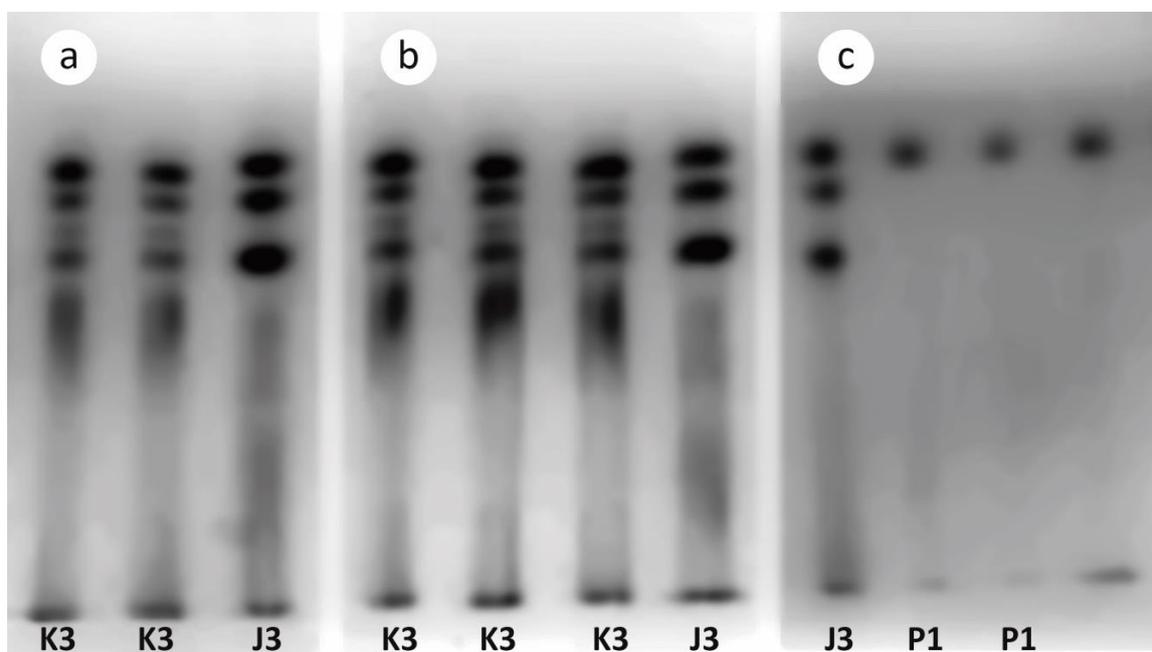


Figura 6. Fenótipos de Esterase de *Meloidogyne konaensis*. A: do Brasil (Est K3), B: do Havaí (Est K3), C: *M. paranaensis* do Brasil e do Havaí (Est P1). *Meloidogyne javanica* (Est J3) foi incluída como referência.

No teste de hospedeiros diferenciadores, a população de *M. konaensis* do Brasil se reproduziu em tomate cv. Rutgers (FR=84,8), fumo cv. NC95 (FR=384,6) e em melancia cv. Charleston Gray (FR=88,9). Não houve reprodução em pimentão cv. Early California Wonder (FR=0), algodão cv. Deltapine 61 (FR=0,3), nem em amendoim cv. Florunner

(FR=0). Adicionalmente, não houve reprodução em café suscetível a *M. paranaensis*, *M. incognita* e *M. exigua* cv. Mundo Novo (FR=0), contrastando com *M. paranaensis* (Est P1) que se reproduziu no café com FR=28,5.

Análises moleculares

Através da análise com marcadores PCR-SCAR, um fragmento de 208 pb foi usado para identificar *M. paranaensis* (Est P1 e P2) do Brasil e *M. konaensis* do Havaí (Est F1 = P1 = *M. paranaensis*). Um outro fragmento de 399 pb para *M. incognita* e um de 420 pb para *M. arenaria* também foram usados. Usando os primers específicos para essas espécies parasitas do café, esses três fragmentos específicos foram amplificados, mas não amplificaram para *M. konaensis* (Est K3) do Brasil (Figura 7).

Os resultados das análises de filogenia comparando sequencias dos segmentos ITS1-5.8S-ITS2 rRNA e D2-D3 do gene 28S rRNA de *M. konaensis* do Brasil com populações de outras espécies relacionadas são apresentados na figura 8. O dendograma obtido de análises de sequências da subunidade D2-D3 (28s), mostra que a população de *M. konaensis* do Brasil se apresentou completamente distinta de *M. konaensis* (Havaí) e das populações de *M. paranaensis*, se agrupando na mesma clade com populações de *M. incognita* e *M. arenaria*, no entanto, claramente separada desta identificada como *M. konaensis* do Havaí, que por sua vez se agrupou com *M. paranaensis* (Figura 8b).

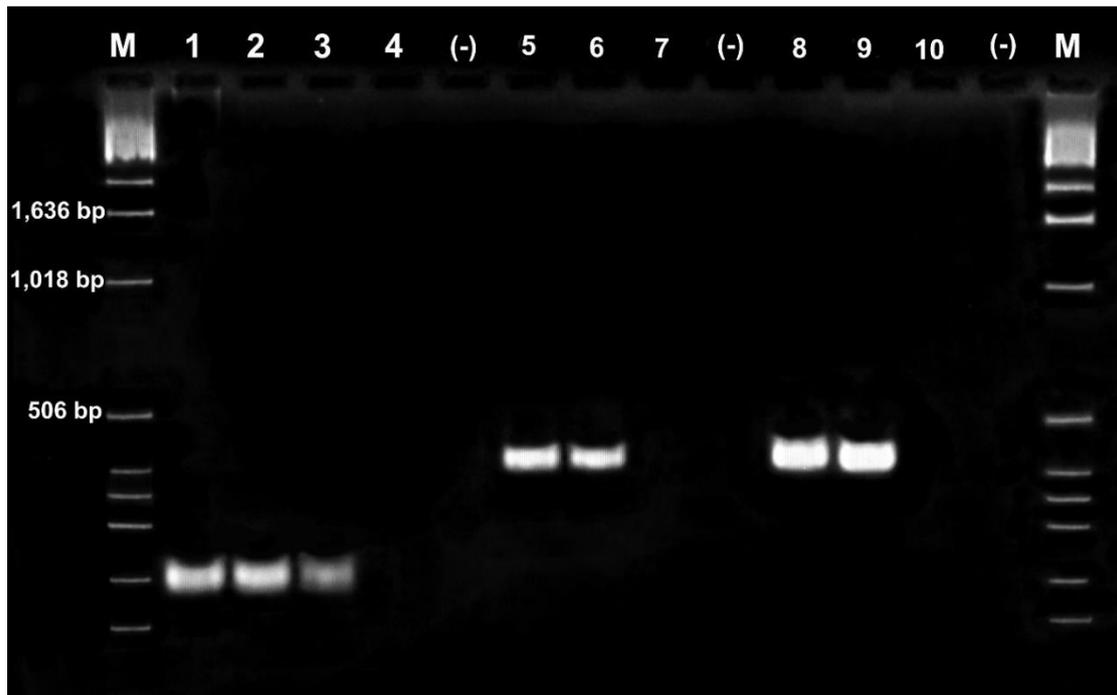
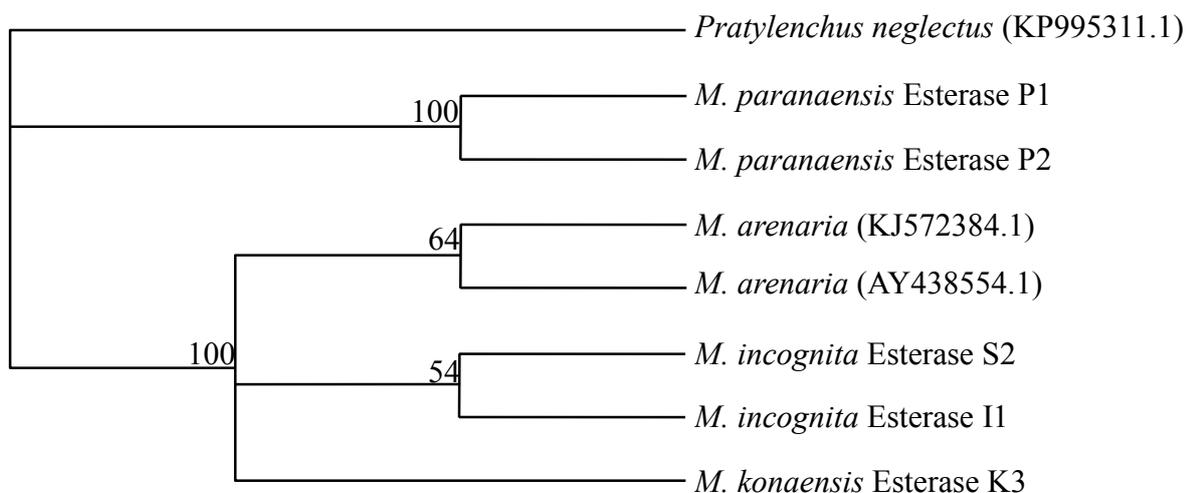


Figura 7. Padrões de amplificação de PCR-SCAR para *Meloidogyne konaensis* e outras espécies de nematoide-das-galhas gerados com os primers: Par-09 F/R para *M. paranaensis* (Randig *et al.*, 2002) (códigos 1-4 [1 – *M. paranaensis* P1, 2 – *M. paranaensis* P2, 3 – *M. konaensis* do Havaí, e 4 – *M. konaensis* do Brasil]); Inck14 F/R para *M. incognita* (Randig *et al.*, 2002) (códigos 5-7 [5 – *M. incognita* Est I1, 6 – *M. incognita* Est S2, 7 – *M. konaensis* do Brasil]), e Far/Rar para *M. arenaria* (Zijlstra *et al.*, 2000) (códigos 8 - 10 [8 – *M. arenaria* Est A2 do Pernambuco/Brasil, 9- *M. arenaria* da Florida Est A2 /USA, 10- *M. konaensis* do Brasil]). (-) Controle negativo. M= marcador 1 kb DNA Extension ladder (Invitrogen).

A



B

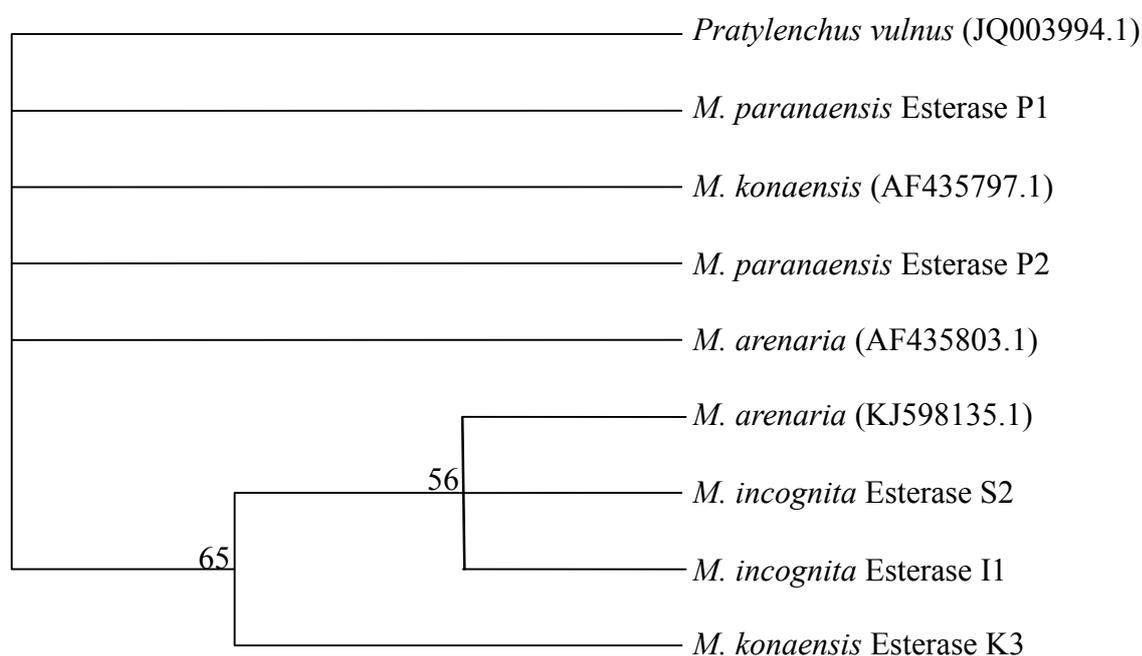


Figura 8. Árvore elaborada com base em análise Neighbour-Joining mostrando as relações filogenéticas de *Meloidogyne konaensis* do Brasil com espécies relacionadas com base em sequências ITS1-5.8S-ITS2 rRNA; (A) e nas sequências D2-D3 do gene 28S rRNA (B). Números á esquerda dos braços são os valores de bootstrap para 1000 repetições. Os códigos das populações e números de acessos para sequências do gene são listados logo a seguir aos nomes das espécies.

DISCUSSÃO

A identificação precisa dos nematoides-das-galhas a nível de espécie é, por vezes, repleto de dificuldades: morfologia conservada, morfometria variável, variações intraespecíficas, e existência de espécies crípticas e o crescente número de espécies descritas (Hunt & Handoo, 2009).

Meloidogyne konaensis e *M. paranaensis* foram descritos na década de 1990 e foram considerados como espécies crípticas do café nos últimos 20 anos no Havaí devido ao perfil da enzima esterase (Est F1=P1) erroneamente caracterizado para *M. konaensis* (Carneiro & Cofcewicz, 2008). As duas populações de *M. konaensis* do Havaí e do Brasil foram morfologicamente muito semelhantes, de acordo com a descrição feita por Eisenback *et al.* (1994).

O carácter morfológico mais útil para distinguir essa espécie é o estilete dos machos com 6-12 grandes projecções salientes a partir da haste do estilete (Eisenback *et al.*, 1994). Essas projecções são bem visíveis ao microscópio óptico, ao contrário das projecções pequenas dos estiletos das fêmeas que são só visíveis ao MEV.

Bioquimicamente, *M. konaensis* do Brasil apresentou três bandas principais (RM: 1,0, 1,17, 1,27) e uma banda fraca ou secundária (Rm: 1,10) para a isoenzimas esterase (EST). É o mesmo perfil descrito por Carneiro *et al.* (2000) quando caracterizou a população tipo de *M. konaensis* do Havaí.

O fenótipo Est K3 (= M3F1) foi relatado pela primeira vez por Esbenshade & Triantaphillou (1985) como uma população atípica de *M. arenaria* de El Salvador. Naquela época, os padrões perineais eram os critérios taxonômicos mais importantes para a identificação de espécies de *Meloidogyne*. Pode-se concluir que o perfil de esterase Est K3 é espécie-específico de *M. konaensis*. Posteriormente, esta população foi inoculada em café e foi observada uma reacção de imunidade, que mostra que a população tipo de

M. konaensis não é capaz de se reproduzir em cafeeiros suscetíveis a *M. paranaensis* e *M. incognita*. A resposta do cafeeiro como não hospedeiro de *M. konaensis* foi semelhante à resposta a *M. javanica* no Brasil, ou seja, ambas as espécies ocorrem nas entre-linhas dos cafeeiros, em plantas daninhas e são muitas vezes confundidas com as espécies de *Meloidogyne* do cafeiro, quando reproduzidas em tomateiros (Carneiro & Cofcewicz, 2008).

Usando o marcador SCAR específico para *M. arenaria* (Zijlstra *et al.*, 2000), não foram observados produtos de amplificação de DNA extraído de *M. konaensis* (Brasil). Além disso, levando em conta as semelhanças entre os padrões perineais de *M. konaensis* e *M. incognita*, marcadores SCAR desenvolvido para *M. incognita* (Randig *et al.*, 2002) também foram testados, e, novamente não resultaram em qualquer produto de amplificação.

Análises filogenéticas foram usadas para validar os resultados obtidos nos estudos de morfologia, morfometria, padrões de isoenzimas esterases e marcadores moleculares espécie-específicos, comparando sequências do fragmento ITS1-5,8S-ITS2 e D2-D3 do gene 28S do rRNA de *M. konaensis* do Brasil com outras espécies de *Meloidogyne* relacionadas, tais como *M. paranaensis*, *M. arenaria* e *M. incognita*.

Na árvore Neighbour-Joining obtida com estas sequências, *M. konaensis* do Brasil como esperado apareceu completamente separada de *M. paranaensis*. Assim, a hipótese de que a sequência de *M. konaensis* disponível no NCBI (AF435797.1), obtida a partir de uma população do Havaí, é de fato pertencente a *M. paranaensis*. Portanto, já era de se esperar que os estudos filogenéticos destas populações resultassem em um agrupamento com populações de *M. paranaensis* na mesma clade, como observado no presente estudo. Outra evidência para esta espécie é o agrupamento de *M. paranaensis* com *M. konaensis* do Havaí, na árvore NJ obtida por Tomalova *et al.* (2012), quando analisaram

filogeneticamente espécies de nematoides-das-galhas comparando as sequências SSU do rDNA. Além disso, no presente estudo testou-se o marcador SCAR desenvolvido especificamente para *M. paranaensis*, com DNA isolado a partir de *M. konaensis* (= *M. paranaensis* do Havaí), e um produto de amplificação típica de 208 pb foi obtido, mostrando que eles são de fato da mesma espécie.

Ao todo, análises filogenéticas com base nestas duas sequências suportaram os dados obtidos a partir de outras abordagens de diagnóstico utilizados neste estudo, incluindo fenótipo de esterase, morfologia e análise SCAR, e confirma que o isolado de *M. konaensis* do cafeeiro (Havaí) é de fato *M. paranaensis* (Carneiro & Cofcewicz, 2008).

Meloidogyne konaensis (Est K3) foi descrita como um parasita do cafeeiro do Havaí e multiplicados em plantas de tomateiros para descrição da espécie. Duas diferentes populações desta espécie, uma do Havaí (isolado tipo) e uma do Brasil, foram inoculadas duas vezes em cultivar de café suscetível (Mundo Novo). Observou-se uma reação de imunidade (RF = 0), mostrando claramente que *M. konaensis* (Est K3) não é um parasita do cafeeiro, contrariamente a *M. paranaensis* (Est P1). Resultados semelhantes foram observados por Sipes *et al.* (2005) que inocularam plantas de cafeeiros com nematoides-das-galhas de áreas cultivadas com café no Havaí e obtiveram diferentes fenótipos de esterase, no entanto, apenas o Est P1 (= F1) de *M. paranaensis* foi capaz de infectar café. No Brasil, as populações mistas de *M. incognita* (Est I1) e *M. javanica* (Est J3) ocorreram em associação com *M. paranaensis* (Est P1) em condições de campo, mas apenas a primeira e última parasitam o café (Carneiro *et al.*, 2005).

Considerando os resultados deste estudo, a espécie de nematoide que infecta café no Havaí deve ser considerada como *M. paranaensis* (Carneiro *et al.*, 2004; Carneiro & Cofcewicz, 2008; Vilain *et al.*, 2013). Outras espécies vegetais (tomate, tabaco, melancia, couve, mamão, noni e canapum) também são bons hospedeiros de *M. konaensis*. O status

polífago dessa espécie pode ser confirmada por meio de testes com diferentes hospedeiros. Considerando-se várias pesquisas feitas no Brasil, *M. konaensis* parece ser uma espécie de importância secundária, ao contrário de *M. paranaensis*, que é considerado uma grande ameaça para a cultura do café no Brasil (Carneiro *et al.*, 2005).

A suposta espécie *M. konaensis* detectada apenas na Ilha de Kona no Havaí em cafeeiro (Eisemback *et al.*, 1994), agora foi detectada no Brasil parasitando quatro outras espécies de plantas (não o cafeeiro), em quatro localidades do Estado do Ceará. Essa espécie foi finalmente muito bem caracterizada, utilizando análises morfológica, morfométrica, citológica, bioquímica, hospedeiros diferenciadores e abordagens moleculares. Comparando agora *M. konaensis* com *M. paranaensis*, várias diferenças podem ser observadas. O comprimento do corpo das fêmeas e dos machos são significativamente mais curtos e o padrão perineal semelhante a *M. incognita* em *M. paranaensis* e *M. arenaria* e *M. incognita* em *M. konaensis*. O estilete de fêmeas de *M. paranaensis* não apresenta projeções em torno da haste, e são ausentes ou raras nos estiletos dos machos. Os números de cromossomos variam de 40-44 em *M. konaensis* e 50-54 em *M. paranaensis* e o fenótipo de esterase Est K3 e Est P1 são únicos para a identificação das duas espécies, respectivamente, como previamente descrito por Carneiro *et al.* (2000). O marcador SCAR desenvolvido para *M. paranaensis* (Randig *et al.*, 2002) não amplificou qualquer fragmento em *M. konaensis* do Brasil, mas amplificou um fragmento na população de *M. konaensis* do Havaí (Carneiro *et al.*, 2004).

A distribuição irregular de *M. paranaensis* na América do Sul, América Central, nas Ilhas Caribenhas e Havaianas, está provavelmente ligada ao transporte de plantas de café (Villain *et al.*, 2013). No Havaí, o café é relatado como introduzido em várias ocasiões. A primeira introdução bem-sucedida foi feita em 1825 com 30 plantas de café

‘*in vivo*’ provenientes do Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Goto, 1982). É possível que *M. paranaensis* tenha sido introduzido na Ilha de Kona partindo do Brasil.

Uma caracterização precisa das espécies de nematoides e populações que ocorrem em cafeeiros é essencial para o desenvolvimento eficiente e sustentável de programas de manejo, especialmente aqueles baseados na resistência da planta (Lima *et al.*, 2015). Uma avaliação da diversidade de nematoides-das-galhas patogênicos ao cafeeiro no Brasil e em outros países foi realizada por Carneiro *et al.* (2004), porém, mais estudos são necessários para uma triagem ampla da gama de genótipos de cafeeiros em relação a diferentes espécies de nematoides-das-galhas e de suas variantes. É importante ressaltar a grande importância deste trabalho, pois, além de assinalar o primeiro relato da espécie *M. konaensis* Eisenback *et al.* (1994) no Brasil, ele traz uma grande contribuição na elucidação de um grande equívoco que perdurou durante 20 anos no Havaí, ou seja, a incorreta identificação de *M. konaensis*, ao invés de *M. paranaensis*, espécie completamente negligenciada nesse país.

CONCLUSÕES

Em conclusão, os estudos de morfologia, morfometria, marcadores bioquímicos e moleculares realizados para a espécie críptica que parasitava culturas e planta daninha no estado do Ceará, culminou com o primeiro registro de *M. konaensis* Eisenback *et al.*, 1994 no Brasil, e esclareceu os equívocos com relação *M. paranaensis*, mostrando as diferenças entre as duas espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLOK, V.C. & POWERS, O. 2009. Biochemical and molecular identification. In: Perry, R., Moens, M., Starr, J.L. (eds). Root-knot nematodes. Cambridge, MA, USA, CABI International, p. 98-118.

- CAMPOS, V.P. & VILLAIN, L. 2005. Nematodes parasites of coffee and cocoa. In: Luc, M., Sikora, R.A. & Bridge, J. (eds). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. *Wallingford*: CABI Publishing, p. 529-579.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; CARNEIRO, R.G.; ABRANTES, I.M.O.; SANTOS, M.S.N.A. & ALMEIDA, M.R.A. 1996b. *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. *Journal of Nematology* 28:177–189.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & ALMEIDA, M.R.A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira* 25:35-44.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & COFCEWICZ, E.T. 2008. Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In: Souza, R.M. (ed). Plant parasitic nematodes of coffee. Springer, Holand, p. 87-122.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. & CARNEIRO, R.G. 1996a. Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. *Fundamental and Applied Nematology* 3:555-560.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. & QUÉNÉHERVÉ, P. 2000. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology* 2(6):645-654.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A. & GONÇALVES, W. 2005. 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* 29:233-242.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; TIGANO, M.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A. & SARAH, J.L. 2004. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology* 6:287-298.

- DE LEY, P.; FELIX, M.A.; FRISSE, L.M.; NADLER, S.A.; STEMBER, P.W. & THOMAS, W.K. 1999. Molecular and morphological characterization of two reproductive species with mirrorimage anatomy (Nematoda: Cephalobidae). *Nematology* 1:591-612.
- EISENBACK, J.D. 1985b Detailed morphology and anatomy of second-stage juveniles, males and females of the genus *Meloidogyne* (root-knot nematodes). *In*: Carter, C.C., Sasser, J.N.(eds). An advanced treatise on *Meloidogyne*. v.1. Biology and control, North Carolina State University. Graphics, Raleigh.
- EISENBACK, J.D. 1985c. Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. *In*: Carter, C.C., Sasser, J.N., (eds). An advanced treatise on *Meloidogyne*. Raleigh: North Carolina State University Graphics 2:79-105.
- EISENBACK, J.D. & HUNT, D.J. 2009. General morphology. *In*: Perry, R.N., Moens, N. & Starr, J.L. (eds). Root-knot nematodes. Cambridge, MA, USA, CABI North America Office, p. 18-54.
- EISENBACK, J.D.; BERNARD, E.C. & SCHMITT, D.P. 1994. Description of the Kona coffee root- knot nematode, *Meloidogyne konaensis* n. sp. *Journal of Nematology* 26:363-374.
- EISENBACK, J.D.; HIRSCHMANN H.; SASSER, J.N. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1981. A guide to the four most common species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.), with a pictorial key. Raleigh, N. C., USA, North Carolina State University Graphics, 48p.
- EISENBACK, J.D.; STROMBERG, E.L. & MCCOY, M.S. 1986. First report of the Columbia root-knot nematode (*Meloidogyne chitwoodi*) in Virginia. *Plant Disease* 70:801.
- ESBENSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida). *Journal of Nematology* 17:6-20.
- ESBENSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 22:10-15.

- GOTO, B. 1982. Ethnic groups and the coffee industry in Hawaii. *Hawaiian Journal of History* 16:112-124.
- HARTMAN, K.M. & SASSER, J.N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: Barker, K.R., Carter, C.C. & Sasser, J.N. (eds). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. v. 2. North Carolina, Methodology, p. 69–77.
- HUNT, D.J. & HANDOO, Z.A. 2009. Taxonomy, identification and principal species. In: Perry, R.N. Moens, N. & Starr, J.L. (eds). *Root-knot nematodes*. Cambridge, MA, USA, CABI North America Office, p. 55-97.
- JEPSON, S.B. 1987. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Wallingford, UK, CABI International 265, p.
- KARSSSEN, G.; WESEMAEL, W. & MOENS, M. 2013. Root-knot nematodes. In: Perry, R.N. & Moens, M. (eds). *Plant Nematology*. 2nd edition, CABI International, Wallingford, UK, p. 73–108.
- LIMA, E.A.; FURLANETTO, C.; NICOLE, M.; GOMES, A.C.M.M.; ALMEIDA, M.R.A.; JORGE-JUNIOR, A.; CORREA, V.R.; SALGADO, S.M.; FERRÃO, M.A.G. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2015. The multi-resistant reaction of drought tolerant coffee ‘Conilon clone 14’ to *Meloidogyne* spp. and late hypersensitivelike response in *Coffea canephora*. *Phytopathology* 105:805-814.
- MOENS, M.; PERRY, R.N. & STARR J.L. 2009. *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: Perry, R.N., Moens, M., Starr, J.L. (eds). *Root-knot nematodes*. Cambridge, MA, USA, CABI North America Office, p. 1-17.
- RANDIG, O.; BONGIOVANNI, M.; CARNEIRO, R.M.D.G. & CASTAGNONE-SERENO, P. 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome* 45:862-870.

- RANDIG, O.; CARNEIRO, R.M.D.G. & CASTAGNONE-SERENO, P. 2004. Identificação das principais espécies de *Meloidogyne* parasitas do cafeeiro no Brasil com marcadores SCAR-café em Multiplex-PCR, *Nematologia Brasileira* 28:1-10.
- SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4:406-425.
- SASSER, J. 1977. Worldwide dissemination and importance of the root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. *Journal of Nematology* 9:26-29.
- SASSER, J.N. & CARTER, C.C. 1982. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.): identification, morphological and physiological variation, host-range, ecology, and control. In: Riggs, R.D. (ed). *Nematology in the Southern Region of the United States*. Southern Cooperative Series Bulletin 276: 21-32.
- SCHMITZ, B.; BURGERMEISTER, W. & BRAASCH, H. 1998. Molecular genetic classification of Central European *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax* populations. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 50:310-317.
- SILVA, M.C.L. & SANTOS, C.D.G. 2012. Identificação de espécies de *Meloidogyne* ocorrendo naturalmente em culturas no estado do Ceará por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida. *Tropical Plant Pathology* 37 (Suplemento), 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia - Manaus, AM.
- SILVA, M.C.L. 2014. Identificação e caracterização de espécies de *Meloidogyne* em áreas agrícolas e dispersão de *M. enterolobii* em pomares de goiabeira no estado do Ceará. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, Brasil.
- SIPES, B.S.; SCHMITT, D.P.; XU, K. & SERRACIN, M. 2005. Esterase polymorphism in *Meloidogyne konaensis*. *Journal of Nematology* 37(4):438-443.
- SUBBOTIN, S.A.; WAEYENBERGE, L. & MOENS, M. 2000. Identification of cyst forming nematodes of the genus *Heterodera* (Nematoda: Heteroderidae) based on the ribosomal DNA-RFLP. *Nematology* 2:153-164.

- SWOFFORD, D.L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), version 4. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates.
- TAYLOR, D.P. & NETSCHER, C. 1974. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. *Nematologica* 20:268-269.
- TAYLOR, A.L. & SASSER, J.N. 1978. Biology, identification and control of rootknot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Coop. Publ. Dept. Plant Pathology, North Carolina State University Graphics, Raleigh, NC, 111pp.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D.G. (1997). The ClustalX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876- 4882.
- TOMALOVA, I.; IACHIA, C.; MULET, K. & CASTAGNONE-SERENO, P. 2012. The map-1 gene family in root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp.: A set of taxonomically restricted genes specific to clonal species. *PLoS ONE* 7(6), e38656. doi: 10.1371/journal.pone.0038656
- TRIANANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Cytological methods for the study of oogenesis and reproduction of root-knot nematodes. In: K.R. Barker, C.C. Carter, & J.N. Sasser (eds). *An Advanced treatise on Meloidogyne*. v. 2, Methodology. Raleigh, NC, North Carolina State University Graphics p. 107-114.
- VILLAIN, L.; SARAH, J.L.; HERNÁNDEZ, A.; BERTRAND, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P.; CHARMETANT, P.; ANZUETO, F.; FIGUEROA, P. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2013. Diversity of root-knot nematodes associated with coffee orchards in Central America. *Nematropica* 43:194-206.
- ZIJLSTRA, C.; DONKERS-VENNE, D.T.H.M. & FARGETTE, M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified regions (SCAR) based PCR assays. *Nematology* 2: 847-853.