



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

**DIVERSIDADE DE *Meloidogyne* spp., CARACTERIZAÇÃO DE
NOVA ESPÉCIE NA CULTURA DO ARROZ E SELEÇÃO DE
FONTES DE RESISTÊNCIA MÚLTIPLA EM *Oryza* spp.**

RAYCENNE ROSA LEITE

BRASÍLIA – DF

2020

RAYCENNE ROSA LEITE

DIVERSIDADE DE *Meloidogyne* spp., CARACTERIZAÇÃO DE NOVA ESPÉCIE NA CULTURA DO ARROZ E SELEÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA MÚLTIPLA EM *Oryza* spp.

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

Orientador: Prof. Juvenil Enrique Cares

Coorientadora: Dra. Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro

Brasília
Distrito Federal – Brasil
2020

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Prof. **Juvenil Enrique Cares** e da Professora **Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro** com apoio institucional e financeiro da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Diversidade de *Meloidogyne* spp., caracterização de nova espécie na cultura do arroz e seleção de fontes de resistência múltipla em *Oryza* spp.

RAYCENNE ROSA LEITE

TESE APROVADA EM 27 / 04 / 2020

Dr. Juvenil Enrique Cares
Orientador (Presidente da Banca – UnB)

Dr. Cleber Furlanetto (Universidade de Brasília)
Examinador (Membro Interno)

Dr. Valdir Ribeiro Correia (Instituto Federal do Tocantins)
Examinador (Membro Externo)

Dr. César Bauer Gomes (Embrapa Clima Temperado)
Examinador (Membro Externo)

Brasília-DF

2020

A meus pais e meu marido dedico!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Juvenil E. Cares por ter me aceitado como aluna de doutorado e por todos ensinamentos que colaboraram muito em meu crescimento profissional.

A professora Regina M. D. G. Carneiro, por ter me recebido em seu laboratório e pela paciência e ensinamentos dispensados. Por toda orientação e acompanhamento durante todo esse percurso, sem isso eu não teria conseguido completar com sucesso esta etapa. Sempre serei grata e sempre lhe terei em alta estima. Muito obrigada!

A todos os amigos do laboratório: Ana Cristina Gomes, Marcilene Fernandes, Carina Lopes, Daniela Stefanelo, Jessica da Mata, Guilherme Feitosa, Mayra Soares, William. Gratidão também à Marcia Gabriel e Jório Saraiva por toda ajuda nos meus experimentos, me socorrendo em momentos cruciais. Em especial, a Vanessa Mattos, por ter sido parceira em todos esses anos, confiado em mim para dar continuidade nas pesquisas, sempre com muita paciência para me ensinar e explicar tudo o que questionava. À Daniela Aguiar e ao Caio Augusto pelos convites, pela companhia e todos os momentos agradáveis. Vocês todos foram essenciais para chegar até aqui.

Aos meus amigos Jennifer Decloquement e Lincoln Vicente, agradeço a parceria e o amor, seremos sempre GROOT.

A minha igreja por estar me cobrindo com orações e pelo cuidado, em especial aos meus pastores Ronilson, Jeane e Efigênia, a missionária Sandra, Fernanda, Rose e Osvaldo. Obrigada!

A meus pais Rauricene Leite e Pedro Costa Leite, obrigada pelo amor dispensado, pelas orações feitas e pelos incentivos proferidos. Vocês são parte fundamental de tudo isso aqui. As minhas irmãs Raylanne Leite e Raynna Leite, e a minha sobrinha Sofia Leite, com quem eu sempre revisava os estudos em fitopatologia ao tentar explicar o que eram os microorganismos.

Ao meu marido, revisor e estatístico pela paciência, cumplicidade e amor.

A Universidade de Brasília e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pelos ensinamentos. Em especial aos professores Cláudio L. Costa e Marisa Ferreira pelo carinho demonstrado. Aos amigos da UnB: Bianca Samay, Cristiano Rodrigues, Rildo Alexandre, Deziany Ferreira, Aline Suellen, Justino Dias, Débora Guterres e Samuel Galvão; amo vocês todos e foi uma honra trabalhar com vocês no Grupo de Estudos em Patologia de Plantas – GEPPLANT.

À Valácia Lemes S. Lobo da Embrapa Arroz e Feijão pela concessão das sementes de arroz utilizadas no estudo de resistência.

Ao Laboratório de Microscopia e Microanálises do Instituto de Ciências Biológicas da UnB, na pessoa de Ingrid Gracielle da Silva, por nos ajudar a obter belíssimas fotos no microscópio eletrônico de varredura.

À CAPES e ao CNPq pelo financiamento através da concessão de bolsas de estudo durante esses 3 anos de pesquisa e estudo.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por me proporcionar toda estrutura e suporte necessário ao desenvolvimento da minha tese. A Embrapa Arroz e Feijão por nos ceder os genótipos de arroz utilizados nos trabalhos.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	13
GENERAL ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO	17
OBJETIVO GERAL	21
Objetivos específicos	21
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
Aspectos econômicos e sociais do cultivo do arroz	23
O gênero <i>Oryza</i>	25
O gênero <i>Meloidogyne</i>	32
Ciclo biológico de <i>Meloidogyne</i>	34
Métodos de identificação de espécies de <i>Meloidogyne</i>	39
Raças fisiológicas.....	44
Citogenética e modo de reprodução	46
Identificação bioquímica e molecular	48
Nematoides parasitas do arroz	54
Caracterização das espécies de <i>Meloidogyne</i> no Sul do Brasil.....	61
Resistência ao nematoide das galhas do arroz	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
TAXONOMIA INTEGRATIVA DE <i>Meloidogyne ottersoni</i> (Thorne,1969) Franklin, 1971 (Nematoda: Meloidogynidae) PARASITANDO ARROZ IRRIGADO NO BRASIL	99
RESUMO	99
ABSTRACT	100
INTRODUÇÃO	102
MATERIAL E MÉTODOS	104
RESULTADOS.....	108
DISCUSSÃO.....	125
CONCLUSÕES.....	130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
COMPLEXO DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Meloidogyne</i> EM ARROZ IRRIGADO: DIVERSIDADE GENÉTICA E NOVAS FONTES DE RESISTÊNCIA EM <i>Oryza</i> spp. ...	138
RESUMO	138
ABSTRACT.....	139
INTRODUÇÃO	140

MATERIAL E MÉTODOS	143
RESULTADOS	148
DISCUSSÃO.....	157
CONCLUSÕES.....	164
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165
HISTOPATOLOGIA COMPARADA DE <i>Oryza sativa</i> e <i>o. glumaepatula</i> quando infectadas com <i>Meloidogyne graminicola</i>	176
RESUMO	176
ABSTRACT	177
INTRODUÇÃO	178
MATERIAL E MÉTODOS	180
RESULTADOS	184
DISCUSSÃO.....	189
CONCLUSÕES.....	192
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	193
CONCLUSÕES GERAIS	200

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Genomas e espécies pertencentes ao gênero *Oryza* 27

Tabela 2. Hospedeiras de *Meloidogyne graminicola* 59

Capítulo 2

Tabela 1. Lista de isolados de *Meloidogyne ottersoni* estudados neste trabalho 105

Tabela 2. Dados morfométricos de fêmeas, machos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne ottersoni* do Brasil 110

Tabela 3. Relação de hospedeiras de diferentes espécies botânicas inoculadas com *Meloidogyne ottersoni* 123

Capítulo 3

Tabela 1. Lista de isolados de *Meloidogyne* spp. utilizados no presente estudo 144

Tabela 2. Origem das espécies de *Oryza* utilizadas no estudo 147

Tabela 3. Visão geral dos dados de RAPD e AFLP entre os isolados de *Meloidogyne* spp 150

Tabela 4. Reação de seis genótipos de *Oryza* spp. a *Meloidogyne ottersoni* 90-120 dias após inoculação com 5000 ovos 152

Tabela 5. Comparação entre *Oryza glaberrima* não inoculada e inoculada com 5000 ovos de *Meloidogyne ottersoni*..... 152

Tabela 6. Reação de seis genótipos de *Oryza* spp. a *Meloidogyne graminicola* G2, 90-120 dias após inoculação com 5000 ovos 153

Tabela 7. Reação de seis genótipos de *Oryza* spp. a *Meloidogyne oryzae* 90-120 dias após inoculação com 5000 ovos 155

Tabela 8. Reação de seis genótipos de *Oryza* spp. a *Meloidogyne graminicola* G3, 90-120 dias pós-inoculação com 5000 ovos 156

Capítulo 4

Tabela 1. Reação de nove acessos de <i>Oryza</i> spp. a <i>Meloidogyne graminicola</i> , 90 dias após a infecção	183
---	-----

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.** Área total de cultivo e produção global de arroz 23
- Figura 2.** Mapa da produção total de arroz nos estados do Brasil. 25
- Figura 3.** Esquema dos fenótipos de esterase (Est) e malato desidrogenase (Mdh) observados nas populações de *Meloidogyne* coletadas em plantas de arroz no sul do Brasil 63

Capítulo 2

- Figura 1.** Micrografia ótica de *Meloidogyne ottersoni* parasitando alpiste vermelho (*Phalaris arundinacea*) 50 dias após a inoculação com 5.000 ovos. 109
- Figura 2.** Micrografias óticas (MO) e eletrônicas (MEV) de padrões perineais de fêmeas de *Meloidogyne ottersoni* 111
- Figura 3.** Micrografias óticas (MO) e eletrônicas (ME) de fêmeas de *Meloidogyne ottersoni* 112
- Figura 4.** Micrografias óticas (MO) e eletrônicas (MEV) de machos de *Meloidogyne ottersoni* 113
- Figura 5.** Micrografias óticas (MO) e eletrônicas (MEV) de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne ottersoni* 115
- Figura 6.** Fenótipos de esterase (a) e malato desidrogenase (b) de *Meloidogyne ottersoni* (Ot0, N1A) 116
- Figura 7.** Micrografia ótica dos cromossomos de *Meloidogyne ottersoni* corados com orceína 116

Figura 8. Análise de máxima verossimilhança (MV) das relações filogenéticas de *Meloidogyne ottersoni* (= *Meloidogyne* sp0) e outras populações de *Meloidogyne* spp. baseadas na sequência ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA 118

Figura 9. Análise de máxima verossimilhança (MV) das relações filogenéticas de *Meloidogyne ottersoni* (= *Meloidogyne* sp0) e outras populações de *Meloidogyne* spp. baseadas no fragmento D2-D3 da sequência 28S do rRNA 119

Figura 10. Análise de máxima verossimilhança (MV) das relações filogenéticas de *Meloidogyne ottersoni* (= *Meloidogyne* sp0) e outras populações de *Meloidogyne* spp. baseadas na sequência da região mitocondrial COXII 120

Capítulo 3

Figura 1. Polimorfismo de fragmentos de DNA gerados de populações de *Meloidogyne* spp. de arroz irrigado 149

Figura 2. Árvore concatenada de Neighbour-Joining (NJ) mostrando a variabilidade genética (RAPD e AFLP) de populações de *Meloidogyne* spp. parasitas do arroz 150

Figura 3. Raízes de *Oryza sativa* e *O. glaberrima* inoculadas com *Meloidogyne ottersoni* e *O. glaberrima* não inoculada 154

Capítulo 4

Figura 1. Raízes de arroz 90 dias após inoculação com *Meloidogyne graminicola*. 184

Figura 2. Interação de suscetibilidade. Raízes de *Oryza sativa* BR-IRGA 410 (controle) infectada com *Meloidogyne graminicola* 186

Figura 3. Interação de resistência. Raízes de *Oryza glumaepatula* BGA014179 infectadas com *Meloidogyne graminicola*. 188

RESUMO GERAL

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo cereal mais cultivado no mundo. O Brasil desponta como principal produtor dentre os países ocidentais, ocupando a nona posição no ranking mundial. Um complexo de espécies de nematoides das galhas (NG) foi detectado na região sul do Brasil causando danos ao cultivo de arroz irrigado. Dentre as espécies encontradas, além de *Meloidogyne graminicola* e *M. javanica*, outras quatro espécies com perfis de esterase atípicos foram detectadas. A primeira (Est O1) foi identificada recentemente como *M. oryzae* através de taxonomia integrativa. A correta identificação e caracterização dos NG é imprescindível para o manejo adequado em áreas orizícolas. As espécies de *Meloidogyne* desse grupo que parasitam o arroz são de difícil identificação, principalmente por características morfológicas e morfométricas que são muito próximas. Até o momento, o uso de cultivares resistentes ainda é um dos métodos de manejo mais eficientes para os NG, mas, infelizmente, fontes de resistência em *O. sativa* são escassas, variando apenas em suscetibilidade. Neste estudo relatou-se pela primeira vez no Brasil, a presença de *M. ottersoni* infectando arroz irrigado no Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Essa espécie apresentou perfil de esterase sem bandas (Est Ot0). Estudos morfológicos mostraram características típicas dessa espécie como a configuração da região perineal das fêmeas, muito diferente das espécies do ‘grupo graminis’ e tamanho dos estiletos de fêmeas e machos, menores que as demais espécies desse grupo. Também foram realizados estudos citogenéticos que confirmaram o número de cromossomos já descrito para *M. ottersoni* (n=18), assim como o parasitismo no hospedeiro tipo *Phalaris arundinacea* L. Nas análises filogenéticas as populações de *M. ottersoni* se agruparam com 99-100% de bootstrap (sequências ITS, D2D3 e COXII-16S do rRNA). Para estudos de resistência, quatro espécies selvagens de *Oryza* e duas cultivadas (*O. sativa* e *O. glaberrima*) foram testadas em casa-de-vegetação para *M. oryzae*, *M. ottersoni* e duas variantes de *M. graminicola*, avaliados quanto a patogenicidade. Quanto a

variabilidade genética (marcadores RAPD e AFLP) dessas espécies foi observada baixa taxa de polimorfismo para *M. oryzae* (17%) e uma alta taxa de polimorfismo para *M. ottersoni* (41%) e *M. graminicola* (83%). Das seis espécies de arroz avaliadas, *O. glumaepatula* mostrou-se altamente resistente ou resistente a todas as espécies de *Meloidogyne* testadas, podendo ser considerada uma fonte de resistência múltipla. As espécies *O. grandiglumis*, *O. glaberima* e *O. alta*, em geral, apresentaram bom grau de resistência a todas as espécies de NG testadas. Já a espécie alógama *O. longistaminata* apresentou variação quanto a resistência às diferentes espécies de *Meloidogyne*. Estudos de histopatologia foram conduzidos com *M. graminicola* em *O. sativa* (suscetível) e *O. glumaepatula* (resistente), para elucidar os mecanismos de resistência apresentados por essa espécie de arroz selvagem. Na espécie suscetível, *M. graminicola* se desenvolveu normalmente, penetrando em grande quantidade nas raízes e apresentando fêmeas e massas de ovos aos 17 dias após a inoculação (DAI), enquanto na resistente, observaram-se atrasos na penetração, reação de hipersensibilidade (RH) aos 2 DAI, em células ao redor do nematoide e, também, acúmulo de compostos fenólicos dentro de raras fêmeas e nos sítios de alimentação aos 33 DAI, revelando uma resposta química pós-infeccional sobretudo precoce. A espécie *O. glumaepatula* mostrou múltipla resistência aos NG e alto potencial para uso em programas de melhoramento genético como doadora de genes para *O. sativa*.

Palavras-chaves: arroz, diversidade genética, histopatologia, nematoide das galhas, resistência genética, taxonomia integrativa.

Orientador: Prof. Juvenil Enrique Cares – Universidade de Brasília

Coorientadora: Dra. Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

GENERAL ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa*) is the second most cultivated cereal in the world. Brazil emerges as the main producer among western countries and ranks ninth on the list of rice producers. A root-knot nematodes (RKN) species complex was detected damaging irrigated rice crops in southern Brazil. Among the species found, besides *M. graminicola* and *M. javanica*, four other species with atypical esterase profiles were detected. The first species (Est O1) was recently identified as *M. oryzae* by integrative taxonomy. The correct identification and characterization of root-knot nematodes are crucial for proper management in rice growing areas. Identification of *Meloidogyne* species, which affect rice, is challenging, mainly due to their close morphological and morphometric characteristics. So far, the use of resistant cultivars is one of the most efficient management methods for RKN, but unfortunately, sources of resistance in *Oryza sativa* are scarce, only varying in susceptibility. The current study reported for the first time in Brazil the presence of *M. ottersoni* infecting irrigated rice in the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. This species presents an esterase profile without bands (Est Ot0). Morphological studies showed typical characteristics of the species such as perineal region of females, very different to the ‘graminis group’ species and stylet size of females and males, smaller than the others in the group. Also, cytogenetic studies were performed that confirmed the chromosomes number described to *M. ottersoni* (18), as well as parasitism in the host type (*Phalaris arundinacea* L.). In phylogenetic analysis, the populations of *M. ottersoni* clustered with 99-100% bootstrap (ITS, D2D3 and COXII-16S of rRNA sequences). For resistance studies, four wild species of *Oryza* and two cultivated species (*O. sativa* and *O. glaberrima*) were evaluated in greenhouse for *M. oryzae*, *M. ottersoni*, and two variants of *M. graminicola*, which were evaluated for pathogenicity. Regarding the genetic variability (RAPD and AFLP markers) of these species, a low polymorphism rate was observed for *M. oryzae* (17%) and a high polymorphism rate observed

to *M. ottersonii* (41%) and *M. graminicola* (83%). Among six rice species evaluated, *O. glumaepatula* showed high resistance or resistance to all *Meloidogyne* species tested, can be considered a multiple source of resistance. *Oryza grandiglumis*, *O. glaberrima* and *O. alta*, generally, showed good resistance rate to all RKN species tested. The allogama species *O. longistaminata*, showed variation in resistance to the different species of *Meloidogyne*. Histopathology studies were conducted with *M. graminicola* in *O. sativa* (susceptible) and *O. glumaepatula* (resistant), to elucidate the resistance mechanisms by this wild species. In the susceptible species, *M. graminicola* developed normally, penetrating in high quantity inside the roots and presenting females and egg masses, at 17 days after inoculation (DAI), whereas in the resistant species there was a delay in penetration, hypersensitivity reaction (HR) at 2 DAI in cells around the nematode, and also accumulation of phenolic compounds inside rare female and the feeding site at 33 DAI, revealing an early post-infection chemical response. *Oryza glumaepatula* showed multiple resistance to RKN and a high potential for use in breeding programs as a gene donor for *O. sativa*.

Key-words: genetic diversity, genetic resistance, histopathology, integrative taxonomy, rice, root-knot nematode.

Advisor: Prof. Juvenil Enrique Cares – Universidade de Brasília

Co-Advisor: Dra. Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo cereal mais cultivado no mundo e o Brasil ocupa a nona posição mundial na produção de arroz irrigado, com um total de 12,4 milhões de toneladas produzidas. Maior parte da produção de arroz do país é proveniente do Rio Grande do Sul com 55% da produção total, seguido de Santa Catarina que detém 7,5% da produção nacional (CONAB, 2018; FAO, 2019).

Agentes fitopatogênicos podem limitar a produção de arroz, como por exemplo, o nematoide da ponta branca do arroz (*Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942), espécies de *Hirschmanniella* Luc & Goodey, 1964 e os nematoides das galhas do gênero *Meloidogyne* Göldi, 1887, em especial, a espécie *M. graminicola* Golden & Birchfield, 1965 (Bridge *et al.*, 2005).

Meloidogyne graminicola, também conhecido como nematoide das galhas do arroz, é considerado a maior ameaça ao cultivo de arroz, principalmente na Ásia, e de ampla distribuição no Brasil e no mundo, tanto em regiões tropicais quanto subtropicais (Matelin *et al.*, 2017; Negretti *et al.*, 2017). Esse nematoide é bem adaptado a sobreviver e se desenvolver em ambientes alagados sendo de ampla ocorrência em lavouras de arroz irrigado, em países asiáticos e americanos (Prot & Matias, 1995; Soriano & Reversat, 2003; Padgham *et al.*, 2004; Bridge *et al.*, 2005; Gilces *et al.*, 2016).

Recentemente, um levantamento detectou além das espécies *M. graminicola* e *M. javanica*, três espécies com fenótipos de esterase atípicos associados a danos na cultura do arroz em regiões produtoras no Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Negretti *et al.*, 2017). Uma das espécies antes denominada *Meloidogyne* sp.1, foi identificada como *M. oryzae* (Mattos *et al.*, 2018). Outra espécie, sem perfil de esterase, denominada *Meloidogyne* sp.0, foi encontrada em lavouras de arroz do Paraná (Soares, 2017) e posteriormente em Santa Catarina (Mattos *et al.*, 2017). No Paraná as espécies encontradas formaram um complexo

predominando *Meloidogyne* sp.3, *Meloidogyne* sp.2 e *M. graminicola* (Soares, 2017, Mattos *et al.*, 2017).

A correta caracterização e identificação das espécies dos nematoides das galhas é essencial para a adoção de medidas de manejo. A identificação precisa das espécies de *Meloidogyne* é dificultada pelo elevado número de espécies já descritas, muitas vezes de forma duvidosa, pela alta variabilidade intraespecífica observada em espécies como *M. graminicola*, bem como a presença de espécies crípticas. Além do fato de que as espécies de *Meloidogyne* não se enquadrarem no conceito biológico de espécie e constituírem clones. Outro aspecto importante, é que, frequentemente, a identificação é baseada em caracteres subjetivos como a configuração da região perineal (Triantaphyllou, 1985; Trudgill, 1991; Castagnone-Sereno *et al.*, 1993; Roberts, 1995; Hunt & Handoo, 2009).

O gênero *Meloidogyne* tem uma grande variação interespecífica quanto ao número de cromossomos, podendo ser haploides, diploides, triploides ou mesmo poliploides (Triantaphyllou, 1985). Espécies haploides possuem $n=18$, como por exemplo a espécie *M. graminicola* que apresenta reprodução por partenogênese meiótica. *Meloidogyne oryzae* é conhecida por ter 51-55 cromossomos e é considerada uma espécie poliploide, com reprodução partenogenética mitótica (Mattos *et al.*, 2018).

O desenvolvimento de técnicas moleculares permitiu novas perspectivas na identificação de espécies e estudos da variabilidade intraespecífica dos nematoides de galhas (NG). A técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), baseada na PCR, é utilizada para estudos genéticos e para a diferenciação de espécies de *Meloidogyne*, a partir de perfis gerados com o auxílio de *primers* aleatórios (Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997; Semblat *et al.*, 1998; Randig *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2004, 2008; Fargette *et al.*, 2005; Muniz *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2012).

As regiões do DNA de espécies de NG mais estudadas são 18S rDNA (Powers, 2004), 28S D2-D3 (Palomares-Ruis *et al.*, 2007), regiões intergênicas IGS (Blok *et al.*, 1997; Wishart *et al.*, 2002), ITS (Powers & Harris, 1993) e DNA mitocondrial (Powers & Harris, 1993; Stanton *et al.*, 1997; Blok *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2004; Jeyaprakash *et al.*, 2006). Uma sequência parcial do gene que codifica a proteína Hsp90 foi utilizada para confirmar a identidade de uma população atípica e agressiva de *M. hapla* Chitwood, 1949 que infecta cafeeiros em Maui, no Havaí (Handoo *et al.*, 2005), mostrando potencial para estabelecer relações filogenéticas entre espécies de fitonematoides (Skantar & Carta, 2005).

Estudos filogenéticos (ITS) com diversas populações de *M. graminicola* têm demonstrado a existência de diferente haplótipos, sem padrão claro de distribuição geográfica, sugerindo uma recente expansão da espécie. Genomas mitocondriais inteiros de dois isolados de *M. graminicola* das Filipinas e da China foram sequenciados (Besnard *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014), fornecendo informações moleculares potencialmente úteis para estudos de genética populacional e evolução da espécie.

Atualmente, para *Meloidogyne*, as medidas de controle mais eficientes são a rotação com culturas não hospedeiras ou má hospedeiras e a resistência genética. Para *M. graminicola* as opções são limitadas, estando restrita a plantas resistentes como estratégia mais viável. Resistência para *M. graminicola* foi identificada nas espécies africanas *O. glaberrima* Steud. e *O. longistaminata* A. Chev & Roehr. (Plowright *et al.*, 1999; Soriano *et al.*, 1999) enquanto que para a espécie asiática, *O. sativa*, foram observadas apenas variabilidade da suscetibilidade dos genótipos testados, sendo raros os trabalhos de resistência em *O. sativa* (Jena & Rao, 1976; Bridge *et al.*, 2005; Prasad *et al.*, 2006; Cabasan *et al.*, 2014). Um estudo conduzido na China, com 136 genótipos de *O. sativa* apresentaram dois híbridos (aus Shenliangyou 1 e indica Cliangyou 4418) e, principalmente, a variedade aus Zhonghua 11 como altamente resistentes a *M. graminicola* (Zhan *et al.*, 2018). Algumas progênes

interespecíficas do cruzamento de *O. glaberrima* e *O. sativa* foram menos suscetíveis a *M. graminicola* que o progenitor *O. sativa* (Plowright *et al.*, 1999).

O gênero *Oryza* engloba duas espécies cultivadas, uma africana (*O. glaberrima*) e uma asiática (*O. sativa*), além de mais de 20 espécies selvagens (Magalhães Júnior *et al.*, 2004). *Oryza sativa* e *O. glaberrima*, além de outras seis espécies selvagens (*O. rufipogon* Griff., *O. nivara* Sharma & Shastri., *O. barthii* A. Chev., *O. longistaminata*, *O. glumaeapatula* Steud. e *O. meridionalis* Ng.) são categorizadas como espécies de genoma AA. Vários estudos têm sido realizados para desenvolver e explorar os recursos genéticos de espécies selvagens de arroz de genoma AA. Alguns genes úteis foram introduzidos em arroz cultivado através de hibridação interespecífica, objetivando características agronômicas desejáveis e resistência a estresses bióticos e abióticos, por exemplo (Khush, 1997; Farooq *et al.*, 2008; Cheema *et al.*, 2008).

A presença de genes de resistência a nematoides do gênero *Meloidogyne* em genótipos selvagens do gênero *Oryza*, especialmente do grupo de genoma AA, pode ser de grande interesse para estudos futuros de melhoramento genético.

OBJETIVO GERAL

Estudar a diversidade biológica e molecular de espécies de *Meloidogyne* parasitas de arroz, identificando e caracterizando uma espécie críptica; identificar possíveis fontes de resistência em materiais selvagens e cultivados de *Oryza* spp. a *Meloidogyne* spp, estudando os mecanismos de ação envolvidos na resistência de *O. glumaepatula*.

Objetivos específicos:

1. Identificar uma espécie críptica de *Meloidogyne* sp. do arroz, através de taxonomia integrativa, descrevendo características enzimáticas, citogenéticas, morfométricas, morfológicas e moleculares;
2. Avaliar a reação de quatro espécies selvagens de *Oryza* e duas cultivadas (*O. sativa* e *O. glaberrima*) às três espécies e populações de *Meloidogyne* detectadas na cultura do arroz;
3. Estudar a variabilidade genética das diferentes populações dessas três espécies e populações de *Meloidogyne* através de marcadores RAPD e AFLP;
4. Estudar os mecanismos de resistência de *Oryza glumaepatula* a *Meloidogyne graminicola*.

Capítulo 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Aspectos econômicos e sociais do cultivo do arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo cereal mais cultivado no mundo, com uma produção de 772,5 milhões de toneladas de arroz em casca (513 milhões de toneladas de arroz branco), ocupando uma área de 167 milhões de hectares (FAO, 2019) (Fig. 1).

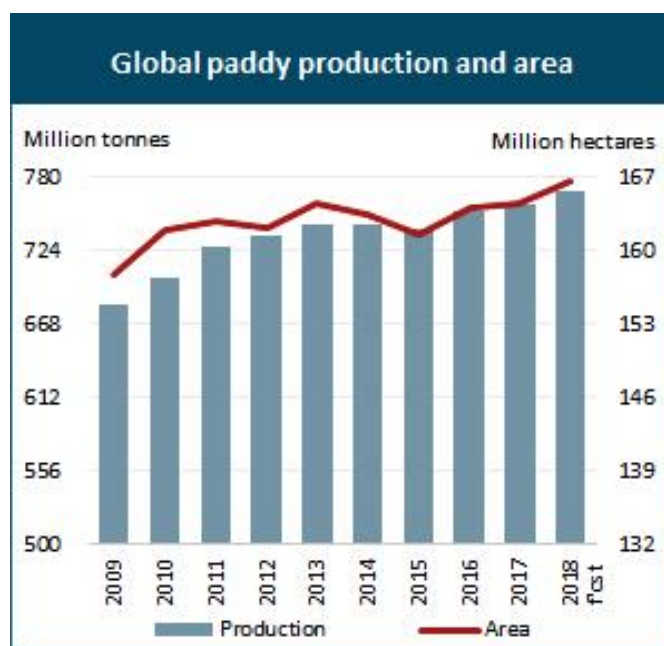


Figura 1. Área total de cultivo e produção global de arroz. Dados FAO (<http://www.fao.org/economic/est/publications/rice-publications/rice-market-monitor-rmm/en/>) em 10/02/2020.

O arroz é um dos produtos mais estratégicos no mundo, estando intimamente relacionado à segurança alimentar, crescimento econômico e geração de empregos. É o alimento básico de metade da população ou de aproximadamente 3 bilhões de pessoas em todo o mundo (IRRI, 2019). Sua importância se destaca, principalmente, em países em desenvolvimento, onde aproximadamente 90% da produção é consumida localmente, desempenhando papel fundamental para economia e desenvolvimento social (Vaughan et al., 2003; Walter et al., 2008).

Os maiores produtores e consumidores de arroz no mundo são os países asiáticos. A Ásia representa 90% da produção mundial e em todos os países produtores dessa região o arroz é a base da alimentação, fornecendo de 50 a 80% das calorias diárias dessa população. No Brasil, essas proporções representam 14% da energia e 10% da proteína consumida pela população diariamente (Fornasieri & Fornasieri Filho, 2006; Naves & Bassinello, 2006). O consumo médio mundial de arroz beneficiado é de 54 kg/pessoa/ano, alcançando 78 kg/pessoa/ano em países asiáticos. Na América do Sul são consumidos em média 24 kg/pessoa/ano, destacando-se o Brasil com uma média de 32 kg/pessoa/ano (SOSBAI, 2018).

O arroz é cultivado em aproximadamente 200 países ao redor do mundo, a China desponta como maior produtor (214 milhões de toneladas), seguida da Índia (172 milhões) e Indonésia (83 milhões) (FAO, 2019). Aproximadamente 80% de toda a área global plantada com arroz está distribuída entre 8 países: China, Índia, Indonésia, Bangladesh, Filipinas, Vietnã, Tailândia e Myanmar. Os principais países produtores de arroz, em ordem crescente são: China, Índia, Indonésia, Bangladesh, Vietnã, Tailândia, Myanmar, Filipinas, Brasil, Paquistão, Estados Unidos e Japão (FAO, 2019).

Com uma produção de 12,4 milhões de toneladas em uma área cultivada de 2,13 milhões de hectares, de um total de 5,2 milhões de hectares de arroz produzido em toda a América do Sul, o Brasil ocupa a nona posição no ranking mundial e desponta como principal produtor dentre os países ocidentais, seguido dos Estados Unidos (Schwanck et al., 2015; FAO, 2019). A maior parte da produção de arroz do país é proveniente da região Sul sob condição de cultivo irrigado, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor nacional com 55% da produção total, seguido por Santa Catarina que detém 7,5% da produção nacional (CONAB, 2018; SOSBAI, 2018). Outras regiões possuem destaque na produção nacional de arroz, a região Norte desponta como segunda maior produtora com contribuição dos estados de Tocantins e Roraima, e o Centro-Oeste com produção representativa nos estados de Mato

Grosso do Sul e Goiás (CONAB, 2018) (Fig. 2). O Brasil é um dos poucos países que possuem importância equivalente nos dois sistemas de produção de arroz: irrigado e sequeiro, sendo possível produzir arroz em todas as regiões do país (DEPEC, 2015).

Apesar de grande parte da produção do arroz ser destinada a atender o mercado interno, o Brasil está entre os dez maiores exportadores mundiais de arroz, com participação de 1,7% no mercado (USDA, 2020; FAO, 2019).

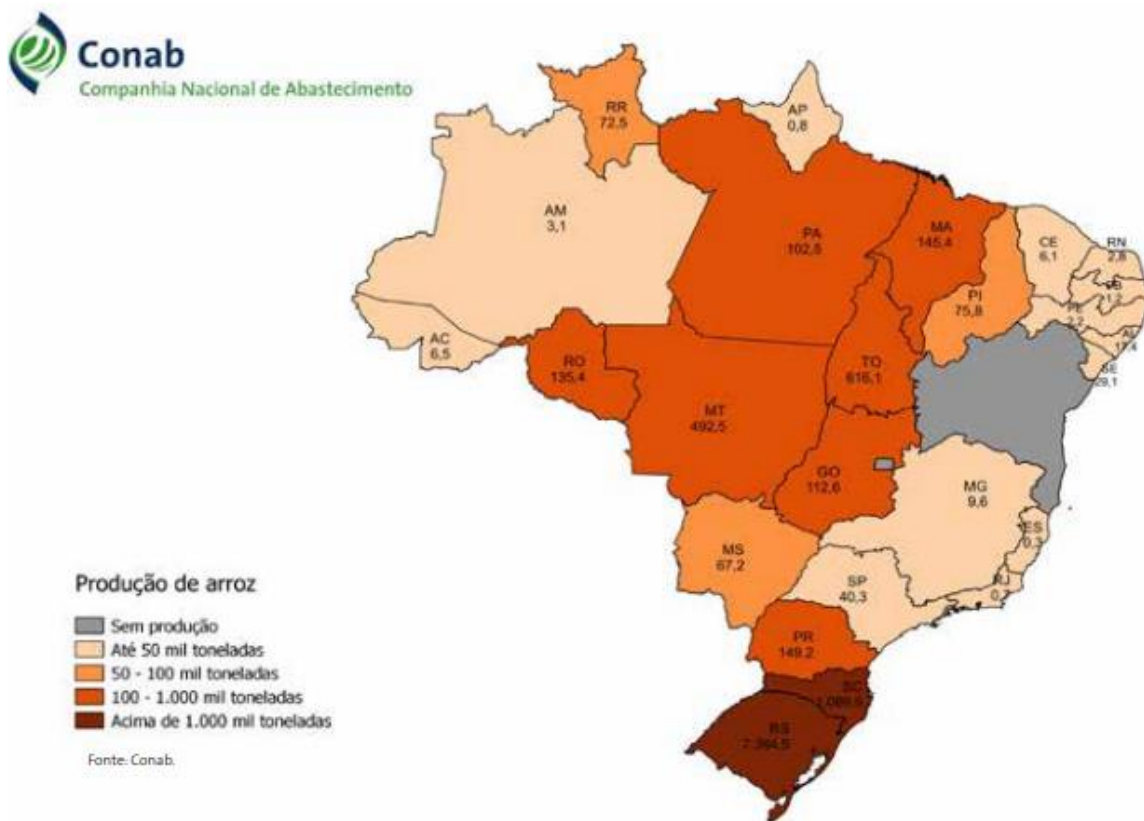


Figura 2. Mapa da produção total de arroz nos estados do Brasil. (Fonte: Conab, 2018)

O gênero *Oryza*

O gênero *Oryza* (Linnaeus, 1753) é pequeno e inclui 23 espécies, mas é notável a diversidade existente em relação as adaptações ecológicas entre suas espécies (Vaughan *et al.*, 2003). O gênero *Oryza* pertence à Divisão Magnoliophyta, Classe Liliopsida, Ordem

Cyperales, Família Poaceae, Subfamília Oryzoideae, Tribo Oryzeae. Gêneros próximos são *Zizania* L. e *Zizaniopsis* Doll & Asch, conhecidos como “arroz selvagem norte-americano”. Apesar de serem gêneros próximos a *Oryza*, não são propensos à domesticação, sendo encontrados em regiões alagadiças dos Estados Unidos e da China (Vaughan *et al.*, 2003; Magalhães Junior *et al.*, 2004).

O gênero *Oryza* engloba duas espécies cultivadas: *O. glaberrima* Steud., espécie africana cultivada no Oeste da África e Ásia e *O. sativa*, espécie asiática mais conhecida na alimentação humana e plantada em todo o mundo, além de mais de 20 espécies selvagens diploides e tetraploides classificadas em 10 grupos genômicos (Magalhães Júnior *et al.*, 2004; Zhu & Ge, 2005), agrupados em quatro complexos: *O. sativa* (AA), *O. officinalis* (BB, CC, BBCC, CCDD, EE), *O. ridleyi* (HHJJ) e *O. granulata* (GG) (Vaughan *et al.*, 2008). O número haploide de cromossomos para os membros do gênero *Oryza* é $n=12$ (Kurata, 2008; Vaughan *et al.*, 2008) (Tabela 1). Embora seja possível o cruzamento interespecífico, existe uma barreira (baixa taxa de cruzamento, aborto de embrião e macho-esterilidade, por exemplo) para o cruzamento entre as espécies de arroz e seus parentes próximos dentro dos complexos, o que aumenta a taxa de esterilidade em progênes híbridas (Vaughan *et al.*, 2003).

Tabela 1. Genomas e espécies pertencentes ao gênero *Oryza* (Kurata, 2008).

Espécies	Número de cromossomos	Grupo genômico	Distribuição geográfica
Complexo <i>Oryza sativa</i>			
<i>Oryza sativa</i> L.	24	AA	Em todo o mundo
<i>O. rufipogon sensu lato</i>	24	AA	Ásia, Oceania
<i>O. glaberrima</i> Steud.	24	AA	Leste da África
<i>O. barthii</i> A. Chev.	24	AA	África
<i>O. longistaminata</i> Chev. et Roehr.	24	AA	África
<i>O. meridionalis</i> Ng	24	AA	Austrália
<i>O. glumaepatula</i> Steud.	24	AA	Américas Central e do Sul
Complexo <i>O. officinalis</i>			
<i>O. officinalis</i> Wall et Watt	24	CC	Ásia
<i>O. minuta</i> J. S. Presl. ex C. B. Presl.	48	BBCC	Filipinas
<i>O. rhizomatis</i> Vaughan	24	CC	Sirilanka
<i>O. eichingeri</i> Peter	24	CC	África, Sirilanka
<i>O. punctata</i> Kotschy ex Steud.	24,48	BB, BBCC	África
<i>O. latifolia</i> Desv.	48	CCDD	Américas Central e do Sul
<i>O. alta</i> Swallen	48	CCDD	Américas Central e do Sul
<i>O. grandiglumis</i> (Doell) Prod.	48	CCDD	América do Sul
<i>O. australiensis</i> Domin	24	EE	Austrália
Complexo <i>O. ridleyi</i>			
<i>O. ridleyi</i> Hook.	48	HHJJ	Ásia, Nova Guiné
<i>O. longiglumis</i> Jansen	48	HHJJ	Nova Guiné
Complexo <i>O. granulata</i>			
<i>O. granulata</i> Nees et Arn. ex Watt	24	GG	Ásia
<i>O. meyeriana</i> (Zoll. et Mor. ex Steud.) Baill.	24	GG	Ásia
Outros			
<i>O. brachyantha</i> Chev. et Roehr	24	FF	África
<i>O. schlechteri</i> Pilger	48	Desconhecido	Nova Guiné

A seção 'sativa' pode ser subdividida em dois grupos, cada um contendo uma espécie cultivada com história de domesticação única (Fornasieri & Fornasieri Filho, 2006; Sweeney & McCouch, 2007). Atualmente, *O. sativa* é a espécie cultivada mais comum em todos os continentes, exceto a Antártida. Até recentemente houve um longo debate sobre o centro de domesticação e origem evolucionária de *O. sativa* (Normile, 2004; Sweeney & McCouch, 2007). Huang *et al.* (2012) através de sequências de genomas de espécies selvagens e cultivadas de arroz concluíram que *O. sativa* foi domesticada de uma população de *O. rufipogon* Griff. na região do Rio Pearl na província Guangxi ao Sul da China, onde provavelmente foi o primeiro lugar de desenvolvimento do arroz cultivado, embora achados arqueológicos tenham identificado o baixo Yangtze, região leste da China como um dos centros do cultivo do arroz. *Oryza glaberrima* encontra-se limitada a algumas partes do Oeste da África e proximidades do Saara (Fornasieri & Fornasieri Filho, 2006; Londo *et al.*, 2006). Originada nas bacias do delta do Rio Nilo no Oeste da África, foi independentemente domesticada de seu ancestral selvagem *O. barthii* A.Chev. há 3.500 anos (Jones *et al.*, 1997; Sarla & Swamy, 2005). Estudos de diversidade genética demonstraram que o arroz africano é único, sendo facilmente separado do arroz asiático e mantendo uma relação genética próxima com *O. barthii* (Second, 1982; Semon *et al.*, 2005; Sweeney & McCouch, 2007).

Além de *O. sativa* e *O. glaberrima*, existem no complexo *sativa* outras seis espécies selvagens: *O. rufipogon*, *O. nivara* Sharma & Shastri (também considerada de ecotipo de *rufipogon*), *O. barthii*, *O. longistaminata*, *O. glumaeaptula* e *O. meridionalis*, todas estas categorizadas como espécies de genoma diploide AA. Quanto à distribuição, *O. sativa* é cultivada e consumida em todo o mundo, com destaque para a Ásia. Já *O. glaberrima* tem o cultivo restrito a algumas regiões do Oeste da África (Londo *et al.*, 2006). *Oryza rufipogon* uma espécie perene é encontrada na Ásia e Oceania. *Oryza nivara* é uma espécie com hábito de crescimento anual e, embora proximamente relacionada a *O. rufipogon* são ecologicamente

distintas (Li *et al.*, 2006). *Oryza barthii*, anteriormente denominada *O. breviligulata* A. Chev. & Roehr. é uma espécie endêmica na África Ocidental. A espécie *O. longistaminata* é alógama, perene e parcialmente auto incompatível, e nativa da África. Já *O. meridionalis* é nativa da Austrália além de possuir hábito de crescimento anual e ser autógama. *Oryza glumaepatula* é endêmica nas Américas Central e do Sul (Vaughan *et al.*, 2003; Zhu & Ge, 2005).

Com o processo evolutivo e a domesticação a que foi submetido *O. sativa*, ao longo do tempo foram surgindo inúmeros tipos geneticamente divergentes que foram se adaptando as mais variadas condições geográficas e ecológicas no mundo (Crispim, 2012). Métodos moleculares modernos confirmam as divisões observadas dentro de *O. sativa*. Essa espécie é subdividida em cinco populações principais: aus, indica, japonica (também chamada sinica), javanica (japonica tropical) e arroz aromático, diferenciados enzimática (Second, 1982; Glaszmann, 1987) e geneticamente (Garris *et al.*, 2005; McNally *et al.*, 2009). Estudos sugerem um modelo em que a subespécie japonica tenha sido primeiramente domesticada de *O. rufipogon* no Sul da China, e que a subespécie indica tenha sido gerada de subsequentes cruzamentos da subespécie japonica com espécies de arroz selvagens locais no Sudeste e Sul da Ásia (Huang *et al.*, 2012). De maneira geral, *O. sativa* ssp. *indica* é encontrada em regiões inundadas da Ásia Tropical e *O. sativa* ssp. *japonica* é encontrada nas regiões de terras altas e elevações do Sul e Sudeste da Ásia (Garris *et al.*, 2005).

O arroz africano, *O. glaberrima*, por milhares de anos foi produzido no Leste da África estando bem adaptado ao cultivo, possuindo importantes características como tolerância a estresses bióticos e abióticos tais como tolerância à seca e resistência a insetos e fitopatógenos (Plowright *et al.*, 1999; Soriano *et al.*, 1999), incluindo *M. graminicola* (Bimpong *et al.*, 2010), além da habilidade de se desenvolver em ambientes variados e possuir elevado vigor

de planta, o que lhe permite competir com plantas invasoras (Heuer *et al.*, 2003; Sarla & Swamy, 2005).

O arroz selvagem africano, *O. longistaminata*, é uma planta alógama rizomatosas que pode produzir sementes e apresenta características únicas como alta diversidade genética, alta frequência de heterozigose e elevado número de alelos raros introgrididos (Ghesquière, 1988). Trabalhos anteriores mostram que *O. longistaminata* apresenta resistência a vírus (Thottapilly & Rossel, 1993), bactérias (Zhang *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1996) e ao nematoide *M. graminicola* (Soriano *et al.*, 1999).

Vários estudos têm sido realizados para desenvolver e explorar os recursos genéticos de espécies selvagens de genoma AA em cruzamentos interespecíficos no intuito de introduzir alelos de interesse em variedades de arroz cultivado (Khush, 1997). Um pré-requisito para a introdução de novos caracteres é a existência de um amplo pool gênico de germoplasma de arroz (Ko *et al.*, 1994). Xiao *et al.* (1998) foram pioneiros na utilização de *O. rufipogon* como doadora de alelos para uma cultivar de *O. sativa*, e verificaram que as introgressões de genes silvestres tinham o potencial de melhorar o desempenho em características agrônômicas como a produção de grãos. A avaliação de parentes silvestres tem permitido a identificação de resistência a fatores bióticos e abióticos como tolerância à salinidade (Vaughan, 1994), resistência a pragas e doenças (Zhang *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1996; Plowright *et al.*, 1999; Soriano *et al.*, 1999), bem como fontes de esterilidade citoplasmática e conteúdo de proteínas nas sementes (Buso *et al.*, 1998). O desejo de melhorar características quantitativas e ampliar a base genética de cultivares de arroz, resultaram no desenvolvimento de programas de hibridização em vários países (Brondani *et al.*, 2001; Vaughan *et al.*, 2003).

No Brasil existem quatro espécies selvagens de arroz: uma diploide ($2n=24$, AA) *O. glumaepatula* e três tetraploides ($2n=48$, CCDD) *O. alta* Swallen, *O. grandiglumis* (Doell.) Prod. e *O. latifolia* Desv. Todas essas espécies selvagens estão restritas à América Central e

do Sul, crescem ao longo de rios, lagos e margens de pântanos como plantas aquáticas emergentes (Morishima, 1994; Hilbert *et al.*, 2017). *Oryza glumaepatula* por ser autógena, diploide e possuir genoma semelhante ao de *O. sativa* é a que possui maior potencial para uso em programas de melhoramento genético de arroz, enquanto as outras espécies são tetraploides e fazem parte de outros complexos (Brondani *et al.*, 2002; Sánchez & Espinoza, 2005).

No Brasil as populações de *O. glumaepatula* são encontradas nas extensas bacias hidrográficas dos biomas Amazônia e Pantanal e nas bacias hidrográficas menores nos estados de Goiás, Tocantins e Roraima (Oliveira, 1994; Brondani *et al.*, 2005), sendo raramente encontradas em áreas não alagadas. Seu habitat natural são os leitos e margens de rios e várzeas. Se reproduz por sementes que germinam na época seca (Juliano *et al.*, 1998; Vaughan *et al.*, 2003; Karasawa *et al.*, 2007). As plantas crescem rapidamente em resposta a alta dos rios no período chuvoso, os colmos das plantas adultas se quebram e estas flutuam na superfície da água, daí ser vulgarmente conhecida como arroz flutuante (Buso *et al.*, 1998; Rangel, 2008).

Cruzamentos interespecíficos feitos entre *O. glumaepatula* e *O. sativa* originaram linhagens que apresentaram características vegetativas e reprodutivas melhoradas (Brondani *et al.*, 2001; 2002; Rangel *et al.*, 2005). Com o objetivo principal de obter variedades mais produtivas e com características específicas que permitam o seu cultivo em determinada região, uma rede de pesquisa consolidada se estabeleceu no país, para conservação e uso de germoplasma de *O. glumaepatula* em programas de melhoramento genético, tendo até o momento armazenadas e mapeadas mais de 130 populações no Banco de Germoplasma da Embrapa (Rangel *et al.*, 2006).

Oryza grandiglumis é encontrada no oeste da Amazônia, nas bacias hidrográficas dos rios Solimões, Negro, Japurá, Purus e Madeira. Sua presença está relacionada, principalmente,

a locais sombreados nas proximidades ou dentro dos sub-bosques da floresta, iniciando seu crescimento através das brotações de órgãos vegetativos, como colmos, seguindo-se o alongamento dos entrenós e permanecendo presa no solo até o final do ciclo (Crispim, 2012).

Oryza alta é uma espécie selvagem tetraploide com genoma CCDD que possui alta produção de biomassa e se encontra amplamente distribuída em Belize, Colômbia, Guiana, Paraguai e Brasil, incluindo a Bacia Amazônica, Região Nordeste (Maranhão) e Região Sudeste (Floresta Tropical Atlântica). Pode ocorrer em savana e também em bosque, e pode ser encontrada em bacias hidrográficas, córregos, margens de lagos e canais de águas profundas (Gireesh, 2018). Esta espécie apresenta diversos genes de resistência identificados contra pragas como a broca do colmo (*Diatrea saccharalis* Fabricius, 1794) e fitopatógenos tais como a podridão bacteriana dos grãos (*Burkolderia glumae* Kurita & Tabei, 1967), a queima da bainha (*Rhizoctonia solani* Kühn) e a brusone do arroz (*Magnaporthe oryzae* (Herbert) Barr) (Eizenga *et al.*, 2009; Mizobuchi *et al.*, 2016).

O gênero *Meloidogyne*

O gênero *Meloidogyne* Göldi, 1887, constitui uma pequena parte do Filo Nematoda que abrange nematoides parasitas do homem, animais, plantas, além de nematoides de vida livre de solo, água doce e marinhos (Maggenti, 1981). O gênero *Meloidogyne* está inserido na Classe Chromadorea, Ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Infraordem Tylenchomorpha, Superfamília Tylenchoidea e Família Meloidogynidae (De Lay & Blaxter, 2002; Karssen & Moens, 2009).

Os nematoides desse gênero são também conhecidos como nematoides das galhas (NG), sendo considerados os mais importantes na economia mundial. Amplamente distribuídos no mundo e parasitas obrigatórios de raízes, tubérculos e colmos de milhares de espécies de plantas, a interação nematoide-planta resulta em efeitos adversos devastadores

sobre a qualidade e rendimento das culturas. Nematoides desse gênero possui distribuição nas regiões tropical, subtropical e temperada, sendo fato que danos e perdas ocorrem predominantemente em climas tropicais e subtropicais onde a diversidade do patógeno é maior, as condições ambientais são mais favoráveis para o seu desenvolvimento e predominam os sistemas agrícolas de subsistência. Assim, os nematoides das galhas causam importantes impactos financeiros e sociais e têm sido objeto de extensas pesquisas, incluindo estudos sobre taxonomia, biologia, interações entre plantas e nematoides e, especialmente, estratégias de controle (Moens *et al.*, 2009; Hunt & Handoo, 2009).

A alta toxicidade e os efeitos colaterais ao homem e ao meio ambiente são a causa da retirada de nematicidas químicos do mercado. Alternativas para o controle de fitonematoides incluem agentes de controle biológico, biofumigantes, resistência genética e práticas culturais como rotação de culturas e plantas antagônicas (Nyczepir & Thomas, 2009). A identificação rápida e precisa dos nematoides das galhas a nível de espécie é crucial para a escolha de medidas de controle efetivas a serem utilizadas, bem como evitar a disseminação indiscriminada de patógenos exóticos quarentenários (Powers, 2004; Blok, 2005; Skantar & Carta, 2005; Blok & Powers, 2009; Hunt & Handoo, 2009; Castagnone-Sereno *et al.*, 2011).

Mais de 100 espécies do gênero *Meloidogyne* já foram descritas (Hunt & Handoo, 2009). Esse grupo de nematoides apresenta alta diversidade genética, seja pelo grande número de espécies ou pela diversidade citogenética entre as espécies e o modo de reprodução que varia de anfimixia a partenogênese meiótica ou mitótica. Esse alto nível de diversidade contribui para uma relação complexa com os hospedeiros, o que resulta em um parasitismo bem sucedido.

A identificação dos NG a nível de espécie é uma tarefa difícil devido à morfologia conservada, variabilidade morfométrica, efeitos do hospedeiro, variação intraespecífica, modo de reprodução por partenogénia, existência de espécies crípticas ou espécies enxames e o

crescente número de espécies descritas onde, a diagnose e as relações entre muitas variam de pouco ideal a duvidosa, ofuscando a real delimitação de limites interespecífico. Somado a essa complexidade, há o problema do “conceito de espécie” para organismos que possuem reprodução predominantemente partenogenética (Trudgill, 1991; Hunt & Handoo, 2009).

A investigação de populações mistas e/ou detecção de espécies raras requer outras técnicas como a purificação usando as esterases (Carneiro *et al.*, 2000), o padrão perineal de fêmeas adultas, características morfológicas da região labial de machos, fêmeas e juvenis de segundo estágio (J₂), morfologia dos estiletos, comprimento e forma da cauda do J₂ e métodos bioquímicas e moleculares (Hunt & Handoo, 2009).

Ciclo biológico de *Meloidogyne*

Os nematoides do gênero *Meloidogyne* são endoparasitas sedentários e apresentam dimorfismo sexual evidente, com machos e fêmeas morfológicamente diferentes. As fêmeas são sedentárias, obesas e tem formato periforme com mobilidade apenas na região anterior do corpo para alimentação, elevada taxa reprodutiva liberando em média 400 a 500 ovos em uma matriz gelatinosa denominada massa de ovos, que pode ser depositada externamente à raiz ou manter-se dentro do parênquima cortical. A matriz gelatinosa mantém os ovos unidos e protegidos contra condições ambientais adversas e predação, além de apresentar propriedades antimicrobianas (Orion & Kritzman, 1991).

Meloidoginose é uma patogenia resultante da interação nematoide-raiz que induz a diferenciação de focos celulares, com a formação de galhas radiculares (Krusberg & Nielsen, 1958; Siddiqui & Taylor, 1970; Jones & Dropkin, 1976; Finley, 1981 Rocha *et al.*, 2007). No interior dos ovos, após o desenvolvimento embrionário forma-se o juvenil de primeiro estágio (J₁), que logo passa pela primeira ecdise, formando o juvenil de segundo estágio (J₂). O J₂ eclode quando há condições ambientais favoráveis à sua sobrevivência, tais como temperatura

apropriada, disponibilidade de oxigênio, níveis de umidade do solo adequados e ausência de barreiras fisiológicas, como a diapausa (Curtis *et al.*, 2009). A habilidade para sobrevivência de *Meloidogyne* é melhorada pelas diversas adaptações, incluindo o atraso na embriogênese (diapausa) e a reserva de lipídeos que prolonga a viabilidade do J2 até que ele encontre e penetre uma hospedeira (Moens *et al.*, 2009).

No solo, o J2 se encontra vulnerável a estresses ambientais, e portanto precisa encontrar uma hospedeira o mais rápido possível. Este estágio móvel, vermiforme e infectante migra através do solo em direção a um gradiente de concentração de exsudatos liberados por uma raiz e a penetra. Há evidências de que quando plantas suscetíveis e resistentes estão presentes em uma área infestada, a planta suscetível é mais atrativa ao nematoide (Curtis *et al.*, 2009). Os J2s penetram as raízes através de punções do estilete e secreção de enzimas que degradam a parede celular, penetrando na região da zona de elongação da raiz, migrando entre as células do córtex rumo à região meristemática da raiz. Alcançando a região meristemática, retorna pela região central da raiz até atingir a zona de diferenciação celular, estabelecendo seu sítio de alimentação no parênquima vascular, iniciando assim, o parasitismo. Por meio de injeção de secreções esofagianas nas células das plantas através do estilete, o nematoide causa alterações morfológicas e fisiológicas em um grupo de células parenquimatosas tornando-as multinucleadas e hipertrofiadas com função nutridora, chamadas células gigantes (Huang & Maggenti, 1969). Nesse momento, o J₂ adquire uma forma robusta e torna-se sedentário, sendo esta a fase parasítica (Freitas *et al.*, 2001; Agrios, 2005; Ferraz & Monteiro, 2011; Castagnone-Sereno *et al.*, 2013).

Uma vez iniciada uma célula gigante e em condições favoráveis, o J2 já sedentário passa pela segunda (J₂>J₃), terceira (J₃>J₄) e a quarta ecdises (J₄>adulto: macho ou fêmea) (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). O tempo de duração dos estádios J₃ e J₄ são bem menores do que o de J₂ e adulto, em média 4-6 dias. Os estádios J₃ e J₄ não possuem estilete

funcional portanto, não se alimentam. Após a última ecdise a fêmea jovem começa a se alimentar e permanece naquele mesmo local por toda a vida. A hipertrofia e hiperplasia que ocorrem nas células resultam, via de regra, nas galhas radiculares (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Essas células nutridoras recebem o nome de células gigantes. As células gigantes são células selecionadas e modificadas por secreções esofagianas do J₂, e em número de 5 a 7, constituem o sítio de alimentação do nematoide. As células gigantes, ao contrário do sincício, desenvolvem-se cada uma de uma única célula, sendo o resultado de repetidas cariocineses sem citocinese. Esse conjunto de células modificadas é hipertrofiada com um volume final de 100 vezes o tamanho normal da célula, metabolicamente hiperativa, multinucleada (contendo até 80 núcleos por célula), e possui um citoplasma denso (Huang & Maggenti, 1969; Wiggers *et al.*, 1990). Existem diversos estudos documentando os efeitos da infecção por nematoides na expressão de genes, havendo uma variedade de genes sendo superexpressos (Gheysen & Jones, 2006; Schaff *et al.*, 2007) e outros sendo subexpressos (Schaff *et al.*, 2007). Poucos estudos da expressão de genes em células gigantes têm relatado que mRNA de alguns genes podem estar presentes nas células gigantes em níveis maiores do que em células radiculares não alteradas (Ramsey *et al.*, 2004; He *et al.*, 2005). Há relatos de uma repressão generalizada de genes nas células gigantes em estádios iniciais de desenvolvimento (Schaff *et al.*, 2007; Caillaud *et al.*, 2008; Barcala *et al.*, 2010; Portillo *et al.*, 2013), sendo também os genes de defesa das plantas suprimidos (Smant & Jones, 2011; Hewezi & Baum, 2015). Esses resultados demonstram que as células gigantes induzidas por espécies de *Meloidogyne* são exemplos únicos de como um parasita pode afetar o desenvolvimento normal do seu hospedeiro (Ramsey *et al.*, 2004; He *et al.*, 2005; Gheysen & Jones, 2006; Schaff *et al.*, 2007; Smant & Jones, 2011; Hewezi & Baum, 2015).

Essas células especializadas funcionam como um dreno nutritivo, mobilizando fotoassimilados das folhas para as células gigantes nas raízes, servindo de alimento contínuo para as fêmeas (Endo, 1975; Taylor & Sasser, 1978; Hussey, 1989; Hussey & Mims, 1991; Van Der Eycken *et al.*, 1996; Abad *et al.*, 2003). Com a formação de células gigantes há a obstrução física dos vasos condutores de água e minerais, resultando em sintomas de murcha no período mais quente do dia, deficiência nutricional e raquitismo (McClure, 1977).

Os machos, quando presentes, são vermiformes e não há evidências que se alimentam (Moens *et al.*, 2009). A mudança de forma nos machos (piriforme para adulto vermiforme) ocorre durante o quarto estágio juvenil (J4) (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Os machos são formados em espécies partenogênicas quando as condições não são favoráveis ao desenvolvimento das fêmeas, como quando a densidade populacional está muito alta e provavelmente haverá limitação na alimentação, assim, o macho migra para fora da raiz (Abad *et al.*, 2009; Moens *et al.*, 2009).

As espécies de nematoides das galhas diferem na proporção da formação de fêmeas e machos, pois depende do tipo de reprodução. Espécies anfimíticas como *M. carolinensis* Eisenback, 1962 e *M. spartinae* (Rau & Fassuliotis, 1965) Whitehead, 1968 tem uma proporção de 1:1. Espécies que se reproduzem por partenogênese meiótica facultativa (*M. chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley, 1980, *M. exigua* Göldi, 1887, *M. graminicola* Golden & Birchfield, 1965) ou mitótica obrigatória (*M. hapla* Chitwood, 1949 e *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949) tem proporções variáveis de machos e fêmeas.

Em condições ambientais favoráveis, o número de machos em populações partenogênicas obrigatórias de *Meloidogyne* usualmente é muito pequeno. Todavia se tais populações são expostas a períodos de estresse ambiental, alta densidade populacional ou mesmo resistência da planta hospedeira, elevado número de machos são formados dos juvenis que porventura se tornariam fêmeas. Esse fenômeno, conhecido por reversão sexual, é um

mecanismo de sobrevivência desses nematoides, pois diminuindo a quantidade de ovos o parasitismo na planta hospedeira é mais brando, garantindo a sobrevivência das fêmeas já estabelecidas (Freitas *et al.*, 2006; Ferraz & Brown, 2016).

Algumas diferenças nas formações das galhas entre as espécies de *Meloidogyne* e suas hospedeiras já são conhecidas. *Meloidogyne hapla*, por exemplo, é conhecido por induzir grande número de raízes adventícias que se desenvolvem das galhas (Sasser, 1954). Na interação *M. trifoliophila* Bernard & Eisenback, 1997 – trevo, há a produção de galhas marcadamente mais alongadas e massas de ovos que estão frequentemente mais inseridas nas galhas do que aquelas que se externam na superfície das galhas (Mercer *et al.*, 1997). Outras espécies tem a tendência de produzir galhas, em sua grande maioria, nas pontas das raízes, como é o caso de *M. graminicola* que causa nas raízes do arroz galhas com formato de ‘cabo de guarda-chuva’ ou ‘gancho’ (Negretti, 2013; Mattos *et al.*, 2019). Mas há casos em que as galhas radiculares podem ser tão pequenas ou indistintas em muitos hospedeiros, que frequentemente resulta na falha do reconhecimento de que a planta está sendo parasitada, como exemplo, hospedeiras entre as gramíneas que raramente formam galhas e a maioria das plantas com raízes fibrosas ou lenhosas podem apresentar galhas pequenas ou indistintas, especialmente no início do crescimento ou quando a população do nematoide está baixa (Moens *et al.*, 2009).

O parasitismo dos nematoides nas raízes tem grande impacto sobre a fisiologia e crescimento das plantas. Esse impacto se dá pela remoção de nutrientes durante a alimentação, pela diminuição da absorção e translocação de água pelas raízes e pela alteração ou destruição do tecido radicular, retardando o crescimento (Hussey & Williamson, 1998).

A duração do ciclo de vida do nematoide das galhas é fortemente afetada pela temperatura, umidade e planta hospedeira. As fêmeas produzem ovos por três semanas, depois

cessam a produção, podendo viver um pouco mais. Os machos vivem semanas e os J2 podem viver de poucos dias a meses (Taylor & Sasser, 1978).

Métodos de identificação de espécies de *Meloidogyne*

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

Descrição dos caracteres diagnósticos

Configuração perineal

A região perineal, está localizada na região posterior do corpo de fêmeas adultas, compreende a área da vulva e ânus (períneo), término da cauda, fasmídios, linhas laterais e estrias cuticulares circundantes. A primeira descrição e ilustração de padrão perineal foi feito

por Müller *et al.* (1884) apud Karssen & Van Aelst (2001). A preparação da região perineal para observação e identificação de *Meloidogyne* spp., foi descrita por Franklin (1965), Sasser & Carter (1982), Eisenback (1985b), Hartman & Sasser (1985), Hirschmann (1985) e Taylor *et al.* (1995).

O diagnóstico tradicional de espécies de *Meloidogyne* se baseia na caracterização da configuração perineal de fêmeas maduras, ainda sendo muito utilizada por muitos laboratórios no Brasil e no mundo (Carneiro *et al.*, 2016). Porém, essa característica morfológica é subjetiva, permitindo a identificação apenas de espécies cujos padrões sejam característicos, como é o caso de *M. javanica* e *M. hapla*. Para algumas outras espécies de *Meloidogyne*, como é o caso de *M. paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes, Santos & Almeida, 1996, *M. incognita* e *M. enterolobii* Yang & Eisenback, 1983, as perineais são semelhantes, levando a erros na identificação (Jepson, 1987; Carneiro *et al.*, 2000; Tigano *et al.*, 2010). Há registro da ocorrência de variações nas configurações perineais mesmo em populações oriundas de uma mesma massa de ovos (Moura, 1996). As configurações perineais, porém, são úteis como métodos complementares a serem utilizados juntamente com a caracterização enzimática e/ou molecular (Carneiro *et al.*, 2004; Carneiro & Cofcewicz, 2008).

Características das fêmeas

As fêmeas adultas do gênero *Meloidogyne* são sedentárias, tem o corpo dilatado em forma de saco, comprimento médio de 0,44-1,30 mm e largura variando de 0,325-0,70 mm (Eisenback, 1985a, b). O pescoço se sobressai na região anterior do corpo, já a vulva e o ânus estão localizados terminalmente. Na maioria das espécies, as fêmeas têm o corpo simétrico estando o pescoço e a região perineal em uma linha reta. Entretanto, em algumas espécies o pescoço está projetado em um ângulo de 15-90° para um dos lados do corpo (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Estilete: Possui um estilete delicado formado por um cone (em várias espécies é um pouco curvado dorsalmente), uma haste reta e três bulbos na base do estilete (possuem altura, largura e disposição variáveis), variando o comprimento de 10-24 μm entre as espécies (Eisenback & Triantaphyllou, 1991; Hunt & Handoo, 2009). A morfologia do estilete ao MEV é uma boa fonte de caracteres suplementares para a identificação de espécies, havendo casos em que são espécie-específico (Jepson, 1987; Eisenback & Triantaphyllou, 1991). O formato dos bulbos do estilete das fêmeas ao MEV é uma característica especialmente importante para separar as espécies que parasitam o arroz: *M. graminicola*, *M. graminis* (Sledge & Golden, 1964) Whitehead, 1968, *M. marylandi* Jepson & Golden, 1987 e *M. oryzae* (Jepson, 1987).

DEGO: O orifício da glândula esofagiana dorsal está localizado posteriormente aos bulbos do estilete. A distância do DEGO até os bulbos do estilete tem uma ampla variação entre as espécies de *Meloidogyne* (2-10 μm) e este caráter é importante na identificação de espécies (Jepson, 1987; Eisenback & Triantaphyllou, 1991; Karssen & Moens, 2009).

Poros excretor: É sempre localizado na região anterior ao metacorpo, mas sua posição varia muito dentro e entre as espécies, por isso nem sempre é uma característica confiável para a identificação. Mas há situações em que a posição do poro excretor é um indicativo de um grupo de espécies (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Sistema reprodutor: As fêmeas são didélficas e possuem duas gônadas muito longas que ocupam a maior parte do interior do corpo. Cada gônada é composta por um ovário com zona germinal e zona de crescimento, um oviduto, uma espermateca globular e um útero longo. O número de células do oviduto é constante para todas as espécies (8 células), enquanto as células da espermatoteca diferem entre as espécies e podem ser usadas como caráter diferencial de espécies (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Seis glândulas retais, grandes e unicelulares, estão na região posterior do corpo conectadas ao reto e produzem uma grande

quantidade de matriz gelatinosa que é secretada através do reto. É nessa matriz que todos os ovos são depositados (Eisenback & Triantaphyllou, 1991; Hunt & Handoo, 2009).

Características dos machos

Os machos dos nematoides das galhas são vermiformes, não sedentários, variando muito no comprimento do corpo (de 700-2000 μm) devido a variações das condições ambientais que, porventura, aconteçam durante o seu desenvolvimento (Eisenback, 1985b). Características morfométricas tais como comprimentos do corpo, esôfago e cauda, além da espessura do corpo são de baixo valor taxonômico, porém a morfologia da região anterior e do estilete constituem caracteres excelentes para a identificação de espécies (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Região cefálica: A região cefálica dos machos possui um disco labial formado por lábios laterais e medianos, podendo em algumas espécies, os lábios laterais estarem reduzidos ou ausentes. Centralizada está a abertura do estoma. Quatro órgãos sensoriais terminais nos lábios medianos, que são as sensilas cefálicas, e seis outros órgãos sensoriais circundando a área do estoma, chamados sensilas labiais. O tamanho, altura, forma e inclinação da região cefálica, forma e proporção do disco labial e lábios, expressão dos lábios e sensilas cefálicas, e presença ou ausência de anulações na região cefálica, podem ser utilizadas para distinguir espécies e populações (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Estilete: O comprimento do estilete varia dentro do gênero de 13-30 μm , embora para a maioria das espécies a média do comprimento seja de 18-24 μm , isso o torna um bom caráter de diferenciação, assim como o tamanho e forma do cone do estilete, haste e bulbos que podem ser usados para diferenciação de espécies, como *M. graminicola*, *M. graminis* e *M. oryzae* (Jepson, 1987; Eisenback & Triantaphyllou, 1991), podendo também ser um caráter espécie-específico como no caso do estilete nodoso de *M. konaensis* (Monteiro *et al.*, 2016).

DEGO: O orifício da glândula esofageana dorsal está localizado a 2-13 µm da base posterior dos bulbos do estilete. Em geral, é um caráter morfométrico que exibe muita variação, embora algumas espécies possam ser distinguidas com base na distância do DEGO (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Poro excretor: A posição do poro excretor exibe uma grande variação intraespecífica e possui valor limitado como característica diferencial, geralmente está localizado anteriormente ao metacorpo. O hemizonídeo, normalmente está localizado anterior ao poro excretor e pode ajudar taxonomicamente apenas nas poucas espécies em que o hemizonídeo estiver localizado posteriormente ao poro excretor (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Sistema reprodutor: Normalmente os machos possuem um único testículo, entretanto quando formados por reversão sexual por estresse ambiental podem ter dois testículos. A gônada contém um longo vaso deferente (vesícula seminal) que armazena espermatozoides maduros, que são produzidos continuamente ao longo da vida do nematoide. Os espículos são estruturas pareadas e esclerotizadas, localizados em uma bolsa dentro da cloaca, com o comprimento variando de 19-40 µm entre as espécies. Um gubernáculo está localizado dorsalmente aos espículos e serve para guiá-los para fora da abertura cloacal (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Região posterior e linhas laterais: A cauda é abruptamente arredondada, curta, possui uma torção de 90° em alguns exemplares e não possui asas caudais, havendo pouca variação no comprimento da cauda entre as espécies (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). As linhas do campo lateral podem variar entre as espécies do gênero *Meloidogyne*, sendo uma característica específica para *M. africana* Whitehead, 1959 que possui de 10-14 linhas no campo lateral (Janssen *et al.*, 2017).

Características dos juvenis de segundo estágio (J2)

O J2, estágio infectivo dos nematoides das galhas, são vermiformes, móveis e anelados. O comprimento do corpo varia de 290-912 μm dentro do gênero. Várias espécies se sobrepõem quanto ao comprimento do corpo, por isso, essa característica é inadequada para identificação de espécies. Devido ao pequeno tamanho dos J2, é difícil discernir precisamente a morfologia da região cefálica. Os juvenis de segundo estágio, a semelhança dos machos, são melhor observados sob microscópio eletrônico de varredura. Geralmente, a morfologia da região cefálica é similar entre as espécies podendo, algumas espécies, diferir na forma dos discos labiais, dos lábios laterais e medianos, a expressão das sensilas labiais e cefálicas e a ocorrência de anulações cefálicas (Eisenback, 1985b).

Os J2 possuem um estilete delicado com comprimento variando de 8-18 μm dentro do gênero. A distância do DEGO até a base dos bulbos do estilete é de 2-8 μm e pode ser uma boa característica diferenciadora, bem como o hemizonídeo, localizado posteriormente ao poro excretor (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

O comprimento da cauda varia consideravelmente entre as espécies, de 15-100 μm e, devido a sua pequena variação intraespecífica, é uma medida muito útil na diferenciação de espécies, inclusive entre os nematoides das galhas do arroz (Jepson, 1987).

Raças fisiológicas

As espécies de *Meloidogyne* apresentam preferências alimentares diferentes, e quando essas diferenças ocorrem dentro de uma mesma espécie, diz-se tratar de raças fisiológicas diferentes. As raças de uma espécie não podem ser diferenciadas morfologicamente, então usa-se a reação positiva (reprodução) ou negativa (não-reprodução) da população em plantas previamente estabelecidas, chamadas hospedeiros diferenciadores (Hartman & Sasser, 1985; Freitas *et al.*, 2007).

A identificação de raças fisiológicas em espécies de *Meloidogyne* realizada pelo teste de hospedeiras diferenciadoras foi estabelecida na Universidade Estadual da Carolina do Norte (Hartman & Sasser, 1985) e as variações intraespecíficas 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 espécies de *Meloidogyne* é essencial para o manejo em áreas infestadas, principalmente na recomendação de sistemas de rotação de culturas, além de permitir conhecer a distribuição das raças e a importância de cada uma para a agricultura local, bem como fornecer populações para a avaliação de genótipos e progênes em programas de melhoramento.

O termo ‘raça’ para o gênero *Meloidogyne* não tem a mesma conotação de raça usado em fitopatologia. O conceito de raça fisiológica é: grupo de biótipos que apresentam as mesmas características morfológicas, mas diferem em características fisiológicas e patogênicas sobre diferentes variedades de uma mesma espécie de hospedeiro (Gasparotto *et al.*, 2016). Para espécies de *Meloidogyne* as hospedeiras diferenciadoras pertencem a espécies botânicas diferentes.

Até hoje, nenhum estudo comprovou a existência de relação entre raças fisiológicas e variabilidade enzimática e molecular (Silva *et al.*, 2014).

Recentemente, um estudo realizado em colaboração entre a Embrapa Cenargen e o INRA/Antibes-França sequenciou integralmente o genoma de onze populações de *M. incognita*, pertencentes às quatro raças definidas para essa espécie e chegou a conclusão que não existe determinismo genético que prove a existência de raças fisiológicas nessa espécie de nematoide (Castagnone-Sereno *et al.*, 2019).

Citogenética e modo de reprodução

O modo de reprodução dos nematoides das galhas varia consideravelmente entre as espécies, desde a anfimixia clássica até a partenogênese mitótica obrigatória (Triantaphyllou, 1985). Poucas espécies de *Meloidogyne* são anfimíticas e produzem ovos a partir de reprodução cruzada. Nesse caso, o material genético masculino e feminino é fundido e a recombinação cria variação genética (nova combinação de genes) em cada geração. No entanto, essas espécies anfimíticas (incluindo *M. carolinensis*, *M. megatylo* Baldwin & Sasser, 1979, *M. microtylo* Mulvey, Townshend & Potter, 1975 e *M. pini* Eisenback, Yang & Hartman, 1985) são consideradas como espécies de NG secundárias devido à sua restrita distribuição, estreita gama de hospedeiros e baixo impacto econômico (Jepson, 1987). De fato, a maioria das espécies de *Meloidogyne* se reproduzem por partenogênese, com muitas variações. Algumas espécies (por exemplo, *M. chitwoodi*, *M. exigua*, *M. fallax* Karssen, 1996, a maioria das populações de *M. hapla* e *M. graminicola*) podem se reproduzir tanto pela fertilização cruzada como pela partenogênese meiótica (automítica). Quando os machos estão presentes, o acasalamento ocorre livremente, e a reprodução é através da fertilização cruzada. Quando os machos não estão presentes, o óvulo passa por redução do número de cromossomos através da meiose e o número de cromossomos somáticos é restabelecido após a fusão do segundo núcleo polar com o pronúcleo do ovo (Triantaphyllou, 1966; Dalmaso & Berge, 1978; Van der Beek *et al.*, 1998). O terceiro modo de reprodução é a partenogênese mitótica (apomítica) obrigatória, encontrada nas espécies mais importantes em termos de distribuição geográfica e impacto agrônomo, isto é, *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949, *M. incognita* e *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. Neste caso, não há redução nem fusão de núcleos, e o ovo se desenvolve diretamente em um embrião. Quando os machos estão presentes, eles podem inseminar as fêmeas, mas o núcleo do espermatozoide se degenera e não participa da fertilização (Triantaphyllou, 1962; 1963; 1981).

A reprodução assexual exclusiva é rara em organismos eucarióticos, normalmente estando associada a latitudes e altitudes altas, ambientes áridos, perturbados e marginais e com recursos naturais limitados, também conhecida como partenogênese geográfica (Kearney, 2003). Dentre alguns benefícios da reprodução cruzada (anfimixia) tem-se a geração de diversidade genética, sendo assim os clones (linhagens assexuadas) podem ser considerados como um fim evolucionário (Maynard Smith, 1978; Kondrashov, 1993). Nesse cenário, as espécies de *Meloidogyne* aparecem como uma excepcional exceção. Por exemplo, *M. incognita*, é a espécie de nematoides das galhas mais comum e globalmente distribuída (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). As populações apomíticas de *Meloidogyne* possuem ampla gama de hospedeiros que englobam um grande número de famílias de plantas, além de ampla distribuição nos diversos ambientes, o que contraria a hipótese da partenogênese geográfica que afirma que esses organismos normalmente ocupariam nichos ecológicos restritos e altamente especializados (Eisenback & Triantaphyllou, 1991; Trudgill, 1997). Pode-se ainda afirmar que espécies partenogénicas possuem alta capacidade de resposta ao processo de seleção, que é percebido pela capacidade de suplantar genes de resistência em plantas (Castagnone-Sereno, 2002). Todas essas características biológicas mostram o extremo sucesso desses nematoides clonais como fitoparasitas (Trudgill & Blok, 2001).

Assim, os nematoides das galhas são altamente variáveis em relação ao número cromossômico. Em geral admite-se que o número haploide do gênero seja $n=18$, mas a maioria das populações tem o número de cromossomos somáticos variando entre 30 e 50, e portanto, são considerados diploides e triploides (Triantaphyllou, 1985). De fato, os números de cromossomos somáticos que são múltiplos perfeitos de 18 não são frequentemente observados no gênero *Meloidogyne*, sugerindo uma taxa frequente de aneuploidia ou polissomia extensa e rearranjos estruturais tais como deleções, duplicações e translocações. As espécies anfimíticas dos nematoides são, necessariamente, diploides, enquanto nas

espécies partenogênicas, além da diploidia, estão incluídas as poliploidias (triploidia e casos de poliploidia) (Perry & Moens, 2011).

Uma das espécies de nematoides do arroz mais importantes, *M. graminicola*, apresenta reprodução por partenogênese meiótica, com 18 cromossomos, sendo considerada uma espécie haploide, bem como *M. ottersoni* (Thorne, 1969). Um importante patógeno do arroz na Costa Rica, *M. salasi* López, 1984, é considerada diploide com 36 cromossomos, embora haja a possibilidade de uma possível reprodução por partenogênese mitótica, como ocorre em outra espécie patogênica ao arroz, *M. oryzae* cujo número de cromossomos relatados é de 51-55 (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; 1990). A pluralidade no número de cromossomos apresentada em espécies descritas em uma mesma hospedeira, demonstra a complexidade e também a importância do estudo da citogenética para entendimento da biologia e evolução das espécies de nematoides das galhas.

Identificação bioquímica e molecular

O uso de marcadores isoenzimáticos como os perfis de esterase e malato desidrogenase e os marcadores moleculares baseados no DNA, já permitiram a identificação correta de várias espécies de *Meloidogyne* e comprovaram que essas técnicas são confiáveis (Blok & Powers, 2009; Villain *et al.*, 2018). Estudos enzimáticos extensivos, com cerca de 800 populações originárias de diferentes países demonstraram que as espécies de *Meloidogyne* podem ser diferenciadas por meio de marcadores enzimáticos, sobretudo as esterases (EST) e malato desidrogenases (MDH) (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Carneiro *et al.*, 2000). Infelizmente, ainda não existem padrões enzimáticos para todas as espécies descritas e esses perfis não fornecem informações suficientes para estudos de variabilidade intraespecífica como os de raças fisiológicas. A variabilidade intraespecífica a nível enzimático geralmente é muito baixa, pois as enzimas são produzidas por genes

conservados que representam uma pequena fração do genoma funcional (McLain *et al.*, 1987).

Um dos primeiros exemplos do uso de fenótipos de isoenzimas para distinguir *Meloidogyne* spp. foi publicado por Esbenshade & Triantaphyllou (1985), que relataram padrões de esterase de 16 espécies de *Meloidogyne*, sendo os fenótipos mais comuns A2 e A3 (*M. arenaria*), H1 (*M. hapla*), I1 (*M. incognita*) e J3 (*M. javanica*). Em 1990, Esbenshade & Triantaphyllou usaram isoenzimas em sua pesquisa histórica envolvendo aproximadamente 300 populações originárias de 65 países e vários continentes. Em pesquisas posteriores, Carneiro *et al.* (2000) encontraram 18 fenótipos de esterase entre 111 populações de *Meloidogyne* spp. no Brasil e em outros países da América do Sul, e Xu *et al.* (2004) examinaram 46 populações de 14 províncias da China e encontraram cinco fenótipos de esterase. As isoenzimas continuam a ser amplamente utilizadas para estudos de *Meloidogyne* e apesar de algumas de suas limitações, fenótipos de isoenzimas para determinado número de espécies foram publicados. Diagramas esquemáticos de padrões isoenzimáticos de várias espécies, incluindo aqueles conduzidos no Projeto Internacional *Meloidogyne*, foram publicados e fornecem importantes referências para identificação de espécies de *Meloidogyne* (Dalmaso & Berge, 1978; Janati *et al.*, 1982; Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; 1990; Farguette, 1987; Carneiro *et al.*, 2000; Hernandez *et al.*, 2004). Carneiro *et al.* (2016) publicaram um diagrama com todos os 20 fenótipos de esterases encontrados em espécies de *Meloidogyne* no Brasil.

Padrões enzimáticos são geralmente comparados com um padrão conhecido, frequentemente o de *M. javanica*, que é incluído na eletroforese para determinar distâncias de migração das bandas, e para a técnica de isoenzimas, são utilizadas principalmente fêmeas no estágio adulto (Dalmaso & Berge, 1978). Há a possibilidade de ocorrência de variantes intraespecíficos como, por exemplo, *M. incognita* (fenótipos Est: I1, I2, S2, Santos *et al.*,

2012), *M. javanica* (fenótipos Est: J2a e J2b, Cofcewicz *et al.*, 2004), *M. arenaria* (fenótipos Est: A2 e A1, Carneiro *et al.*, 2008), *M. exigua* (fenótipos Est: E1, E2 e E3, Muniz *et al.*, 2008) e *M. paranaensis* (fenótipos Est: P1, P2 e P2a, Carneiro *et al.*, 2004, Santos *et al.*, 2018) que pode acarretar certas complicações à técnica. Casos raros como o mesmo fenótipo de esterase para duas espécies diferentes, por exemplo, as esterases de *M. exigua* e *M. naasi* Franklin, 1965, exige a utilização de mais de um sistema enzimático como a malato desidrogenase – Mdh, para confirmar a identidade dessas espécies (Esbenshade & Triantaphyllou, 1990). Entretanto, a intensidade da concentração da enzima esterase pode exigir a utilização de muitas fêmeas, como para *M. exigua* (Carneiro *et al.*, 2000; Muniz *et al.*, 2008). E em outros casos, dificultar a leitura do gel, como no caso de *M. graminicola* (G1) e *M. graminis* (Mg1), que além de possuírem fenótipos de esterase similares, nesses casos a enzima possui alta atividade sendo visualizada no gel na forma de um arrastão (Esbenshade & Triantaphyllou, 1990; Carneiro *et al.*, 2000; Brito *et al.*, 2010).

Um dos primeiros métodos utilizados para diferenciar molecularmente os nematoides das galhas foi o RFLP (Curran *et al.*, 1985; 1986). Esta técnica também foi utilizada juntamente com a hibridização de DNA utilizando sondas radioativas ou não (Curran & Webster, 1987; Castagnone-Sereno *et al.*, 1991; Hiatt *et al.*, 1995). Embora tenha-se mostrado eficiente diferenciando isolados, esse método passou a ser menos utilizado nos dias atuais devido principalmente à complexidade da técnica e a quantidade de DNA para realizar o protocolo, uma quantidade bem elevada (Blok & Powers, 2009; Castagnone-Sereno *et al.*, 2011).

Posteriormente, com o advento da PCR, novos métodos de diagnose para o nematoide das galhas foram desenvolvidos, tendo como base principalmente regiões alvo do DNA dos nematoides utilizando primers espécie-específicos (Perry *et al.*, 2007). Assim como também, a possibilidade da aplicação de técnicas moleculares para estudos de variabilidade

intraespecífica em *Meloidogyne* spp. a partir da análise de marcadores do tipo AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) com resultados significativos para a genética de populações (Curran *et al.*, 1986; Castagnone-Sereno *et al.*, 1991; Lax *et al.*, 2007) em análises de similaridade e distância genética.

A técnica RAPD, baseada na PCR é utilizada atualmente para os estudos genéticos e para a diferenciação de várias espécies de *Meloidogyne*, a partir de perfis gerados com o auxílio de *primers* aleatórios (Cenis, 1993; Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997; Randig *et al.*, 2002). A análise de RAPD, além de utilizar pequenas quantidades de material genético (6 - 30 ng DNA), não necessita do conhecimento prévio do genoma a ser estudado, pois se utilizam *primers* de sequência aleatória (Williams *et al.*, 1990). A técnica é considerada simples, rápida e de baixo custo quando comparada à RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). A principal limitação dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informação genética por loco. Apenas um alelo é detectado, o segmento que é amplificado, enquanto que as demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como um alelo nulo. Os marcadores RAPD, portanto, comportam-se como marcadores dominantes: os dados têm natureza binária (presença ou ausência de fragmentos). Genótipos heterozigotos não podem ser diretamente discriminados dos homozigotos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O primeiro estudo sobre diversidade de populações brasileiras de *Meloidogyne* spp. foi realizado por Randig *et al.* (2002) onde foram estudadas através de PCR-RAPD, 18 populações de *Meloidogyne* spp., provenientes de diferentes regiões do Brasil. Nesse estudo, pode-se observar que as espécies de *Meloidogyne* se diferenciaram em grupos, de acordo com os perfis enzimáticos descritos para cada espécie. Esse estudo mostrou um alto grau de variabilidade intraespecífica em populações de *M. exigua*, *M. hapla* e *M. arenaria*, que apresentaram: 67,5%, 67,5% e 69,8% de fragmentos polimórficos. Diferentemente,

populações de *M. incognita* e *M. javanica* apresentaram baixa variabilidade intraespecífica, 30% e 19% respectivamente.

Em estudo recente, Mattos *et al.* (2018) mostraram uma maior variabilidade genética para *M. graminicola* (acima de 60% de polimorfismo) semelhante a outras espécies meióticas facultativas, quando comparado a *M. oryzae*, outra espécie parasita do arroz irrigado, que apresentou menor variabilidade (<20%), o que pode estar relacionado ao seu modo de reprodução partenogenético mitótico.

A conversão dos marcadores RAPD em SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), termo estabelecido por Paran & Michelmore (1993) para definir marcadores RAPD cuja sequência interna tenha sido determinada, permitindo compor primers mais longos, ricos em GC (guanina-citosina) e de sequência específica tem sido utilizada para a identificação de espécies. Até o dado momento, vários primers SCAR espécie-específicos foram desenvolvidos para espécies de *Meloidogyne* como duas espécies quarentenárias, *M. chitwoodi* e *M. fallax*, ou ainda, para separar as três espécies: *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, presentes principalmente em regiões tropicais e subtropicais ou em plantios em sistema protegido (Zijlstra, 2000; Zijlstra *et al.*, 2000; Fourie *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2004). Marcadores SCAR espécie-específicos foram definidos para as três principais espécies de *Meloidogyne* do cafeeiro: *M. exigua*, *M. incognita*, *M. paranaensis* (Randig *et al.*, 2002). Recentemente, também foram desenvolvidos primers para as espécies *M. izalcoensis* Carneiro, Almeida, Gomes & Hernández, 2005, *M. arabicida* López & Salazar, 1989 (Correa *et al.*, 2013) e *M. ethiopica* Whitehead, 1968 (Correa *et al.*, 2014). Marcadores espécie-específicos foram propostos para *M. oryzae*, *M. salasi* (Mattos *et al.*, 2018) e *M. graminicola* (Bellafiore *et al.*, 2015; Htay *et al.*, 2016; Mattos *et al.*, 2018), porém, a especificidade dos marcadores de *M. graminicola* tem sido questionada, como demonstrado por Negretti *et al.* (2017) e no capítulo 3 desta tese.

Outras regiões do DNA também foram exploradas para o diagnóstico dos nematoides das galhas, entre elas estão a região do DNA ribossomal (rDNA) e do DNA mitocondrial (mtDNA).

A região do DNA ribossomal (rDNA) tem sido muito utilizada também para estudos das relações filogenéticas entre as espécies de *Meloidogyne* (Castagnone-Sereno *et al.*, 2011). McClure *et al.* (2012) propuseram um novo método de identificação que permite separar *M. graminis*, *M. marylandi*, e outras espécies relacionadas a gramíneas baseado no perfil RFLP do DNA amplificado da região mtDNA.

A presença de variabilidade intraespecífica nas sequências de rDNA foi relatada para *M. graminicola* (Pokharel *et al.*, 2007; Bellafiore *et al.*, 2015; Salalia *et al.*, 2017). No entanto, Besnard *et al.* (2019) contestaram essas informações com base em seu estudo genômico comparativo entre 12 populações de *M. graminicola*, assumindo que a coexistência de sequências de rDNA divergentes em indivíduos e sequências quiméricas geradas por PCR poderiam explicar a alta variação nos dados de ITS relatados anteriormente. Também é possível observar em muitos desses trabalhos anteriores, uma alta variabilidade morfométrica de *M. graminicola*, levantando a suspeita da existência de espécies crípticas nessas amostras.

Os genomas mitocondriais são geralmente pequenos variando entre 12-20kb (Brown, 1985; Castagnone-Sereno *et al.*, 2011). Divergências em sequências no mtDNA devido a inserções, deleções ou a maiores taxas de mutação comparadas com o DNA nuclear (Castagnone-Sereno *et al.*, 2011) proporcionaram o estudo de regiões-alvo para a distinção de *Meloidogyne* spp. (Powers & Harris, 1993; Jeyaprakash *et al.*, 2006).

O genoma mitocondrial completo de mais de uma população *M. graminicola* foi recentemente sequenciado (Besnard *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014; Besnard *et al.*, 2019). O DNA mitocondrial evolui mais rapidamente no filo Nematoda do que em outros taxa (Humphreys-Pereira & Elling, 2015; Lunt & Hyman, 1997).

Embora as técnicas bioquímicas e moleculares para identificação de nematoides das galhas têm sido amplamente utilizadas, ainda não são capazes de identificar todas as espécies de *Meloidogyne*, mas já podem identificar cerca de 40 espécies. Um entendimento claro sobre os limites de espécie para esse gênero, assim como mais estudos a partir de coletas de populações de espécies bem identificadas ao redor do mundo ainda são necessários (Blok & Powers, 2009).

Atualmente, recomenda-se uma diagnose múltipla para os nematoides das galhas que não apresentem perfis de enzima ou moleculares típicos, ou seja, diagnose baseada em mais de um método (morfológico, bioquímico e molecular).

Nematoides parasitas do arroz

Aproximadamente 200 espécies de nematoides já foram relatadas associadas a cultura do arroz (Prot, 1994). De acordo com Peng *et al.* (2018), cerca de 30 espécies de nematoides estão relacionadas com perdas no cultivo de arroz. Essas espécies possuem diversos hábitos, mas todas causam danos mecânicos e/ou mau funcionamento dos processos fisiológicos (Bridge *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2018). Os principais nematoides parasitas associados à cultura do arroz são o nematoide das galhas do arroz, *M. graminicola*, o nematoide de cistos, *Heterodera oryzicola* Rao & Jayaprakash, 1978, o nematoide da ponta branca do arroz, *Aphelenchoides besseyi*, o nematoide da haste *Ditylenchus angustus* (Buther, 1913) Filipjev, 1936, o nematoide das lesões radiculares *Pratylenchus* spp. e espécies de *Hirschmanniella*; embora alguns sejam de ocorrência esporádica e localizada. As perdas causadas por essas espécies juntas estão estimadas em mais de 10% (Jain *et al.*, 2007).

Dentre as principais espécies, duas são parasitas de parte aérea (*A. besseyi* e *D. angustus*) e as demais (*M. graminicola*, *H. oryzicola*, *Hirschmanniella* spp. e *Pratylenchus* spp.) parasitas radiculares (Bridge *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2018). *Ditylenchus angustus*,

nematoide ectoparasito, está restrito a alguns países asiáticos e pode causar grandes perdas na produção quando mudas infectadas são transplantadas, mesmo em um baixo percentual de infecção inicial (Bridge *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2018). *Aphelenchoides besseyi* é também conhecido como o nematoide da ponta branca do arroz, sobrevive em anidrobiose nas sementes de arroz, tendo como distribuição local a água de irrigação, e como distribuição mundial a dispersão de sementes infestadas (Bridge *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2018). Quatro principais espécies de nematoides de cisto parasitam o arroz: *H. orizicola*, *H. sacchari* Luc & Merni, 1963, *H. elachista* Oshima, 1974 e *H. oryzae* Luc & Berdon, 1961 (Bridge *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2018). Embora de ocorrência restrita, *H. orizicola* possui grande importância na Índia, com perdas de 17-42% (Coyne & Plowright, 1998). A espécie mais comumente relatada de *Hirschmanniella* é *H. oryzae* (Van Breda de Haan, 1902) Luc & Goodey, 1964. São endoparasitas migradores que parasitam arroz nos sistemas irrigados, sequeiro e inundado em diversos países. *Pratylenchus* apresenta mais de 10 espécies que parasitam o arroz no mundo, embora apenas para *P. zae* e *P. indicus* sejam relatados danos e perdas de produção de 30% em arroz sequeiro (Prasad & Rao, 1978; Plowright *et al.*, 1990; Bridge *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2018).

Na literatura tem-se registro de 10 espécies de *Meloidogyne* associadas a arroz irrigado: *M. graminicola*, *M. oryzae*, *M. hainanensis* Liao & Feng, 1995, *M. lini* Yang, Hu & Xu 1988, *M. triticoryzae* Gaur, Saha & Khan, 1993, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. sasseri* Handoo, Huettel & Golden, 1993 e *M. salasi* López, 1984 (Jepson, 1987; Bridge *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2018). Outras duas espécies, embora não relatadas parasitando arroz em campo, foram testadas e conseguem se reproduzir em *O. sativa*: *M. marylandi* Jepson & Golden in Jepson, 1987 e *M. graminis* (Sledge & Golden, 1964) Whitehead, 1968 (Pokharel *et al.*, 2007; Faske & Starr, 2009).

As espécies de *Meloidogyne* do grupo do arroz, em sua maioria, possuem uma descrição pobre em detalhes, como é o caso de *M. hainanensis* cuja descrição foi feita em chinês. Posteriormente, alguns estudos feitos ao MEV elucidaram e complementaram as descrições taxonômicas de algumas espécies principais (Jepson, 1987; Eisenback & Triantaphyllou, 1991; Oka *et al.*, 2003). Em seu estudo sobre identificação de nematoides das galhas, Jepson (1987) classificou a maioria das espécies de *Meloidogyne* do arroz no grupo ‘*graminis*’. Esse é um grupo considerado de difícil diagnose por possuírem características morfológicas e morfométricas extremamente semelhantes entre as espécies.

O grupo ‘*graminis*’ é o mais bem definido dentro do gênero *Meloidogyne*. Inclui onze espécies: *M. aquatilis* Ebsary & Eveleigh, 1983, *M. graminicola*, *M. graminis*, *M. kralli* Jepson, 1984, *M. naasi*, *M. oryzae*, *M. ottersoni*, *M. spartinae* (Rau & Fassuliotis, 1965) Whitehead, 1968, *M. sewelli* Mulvey & Anderson, 1980, *M. marylandi* e *M. maritima* Jepson, 1987 que possuem algumas características biológicas em comum, como por exemplo: preferência por hospedeiros pertencentes as famílias Poaceae e Cyperaceae; induzem galhas pequenas; as fêmeas possuem corpo marcadamente alongado; a vulva das fêmeas está localizada em uma protuberância posterior, fato que pode estar ligado ao modo de reprodução (geralmente anfimíticas ou partenogenéticas meióticas – exceto *M. oryzae* e *M. salasi* que são apomíticas) (Lopez, 1984; Mattos *et al.*, 2018). Algumas características são úteis para distinção interespecífica, dentre elas a cauda do J2, principalmente a porção hialina, morfologia e morfometria do estilete e bulbos do estilete em machos e fêmeas, e a região perineal das fêmeas (Jepson, 1987).

A espécie *M. graminicola* é considerada a mais danosa e está amplamente distribuída ao redor do mundo, sendo comum nos trópicos e subtropicais (Eisenback & Triantaphyllou, 1991; Bridge *et al.*, 2005). Nos países asiáticos, em sequeiro e irrigado, os prejuízos causados

por este nematoide na produtividade do arroz estão em torno de 11-90% (De Waele & Elsen, 2007; Jain *et al.*, 2012).

Meloidogyne graminicola foi descrito pela primeira vez em raízes de capim-arroz (*Echinochloa colonum* L.) em Louisiana, EUA (Golden & Birchfield, 1965) sendo posteriormente detectada em raízes de arroz (Golden & Birchfield, 1968). Esse nematoide é bem adaptado a condições irrigadas, não apenas porque grandes quantidades de nematoides conseguem sobreviver em solo inundado, mas porque os ovos são depositados dentro da raiz e a segunda geração de J2 eclode e permanece dentro da raiz, ou na mesma galha ou migrando e incitando novas galhas (Roy, 1976; Bridge & Page, 1982). Jain *et al.* (2012) discriminam uma extensa lista de países onde a presença de *M. graminicola* já foi relatada. Além de países asiáticos (Padgham *et al.*, 2004; Sobita & Anamika, 2011), norte e sulamericanos (Soriano & Riversat, 2003; Xu *et al.*, 2004), um relato da presença restrita desse nematoide na África do Sul (Kleynhans, 1991) e na Itália (Fanelli *et al.*, 2017).

No Brasil, relatos da presença de *Meloidogyne* em cultivos de arroz foram feitos desde a década de 1980 por Ribeiro *et al.* (1984). Somente 10 anos mais tarde, na década de 1990 Sperandio & Monteiro (1991) fizeram menção da espécie *M. graminicola*, pela primeira vez no Estado do Rio Grande do Sul (RS), parasitando arroz. O primeiro levantamento de nematoides das galhas em arroz foi feito no RS (Steffen *et al.*, 2007), em que os autores detectaram a presença generalizada de *M. graminicola* nas áreas amostradas. Dois anos mais tarde, em um segundo levantamento, foi detectado *M. graminicola* em uma área de arroz irrigado em Santa Catarina (SC) (Gomes *et al.*, 2009).

Meloidogyne graminicola possui ampla gama de hospedeiros, incluindo muitas espécies espontâneas recorrentes em campos de arroz (Tabela 2) (Bridge *et al.*, 2005; Negretti *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2018). Os sintomas da infecção por *M. graminicola* são galhas terminais com formato de gancho, geralmente em raízes secundárias (Eisenback &

Triantaphyllou, 1991; Gomes *et al.*, 1997; Bridge *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2018), além de áreas em reboleira na lavoura, onde plantas de arroz apresentam amarelecimento foliar, crescimento reduzido, raquitismo e floração precoce (Sperandio & Monteiro, 1991; Steffen *et al.*, 2007; Negretti *et al.*, 2013). Sintomas semelhantes são causados por *M. oryzae*, engrossamento e galhas terminais (Bridge *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2018). As galhas causadas por *M. salasi* geralmente ocorrem nas pontas das raízes (Sancho *et al.*, 1987). Galhas pequenas e engrossamentos são sintomas característicos de *M. ottersoni*.

Tabela 2. Hospedeiras de *Meloidogyne graminicola* (Bridge *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2018).

<i>Abelmoschus esculentus</i> (L.) Moench.	<i>Impatiens balsamina</i> L.
<i>Ageratum conyzoides</i> L.	<i>Imperata cylindrica</i> (L.) Beauv.
<i>Allium cepa</i> L.	<i>Lactuca sativa</i> L.
<i>Alopecurus carolinianus</i> Walt.	<i>Leersia hexandra</i> Sw.
<i>Amaranthus viridis</i> L.	<i>Leucas lavendulaefolia</i> J. E. Smith
<i>Ammania petandra</i> Roxb.	<i>Ludwigia repens</i> J. R. Forst.
<i>Andropogon</i> sp.	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.
<i>Avena sativa</i> L.	<i>Murdannia nudiflora</i> (L.) Brenan
<i>Beta vulgaris</i> L.	<i>Musa</i> sp.
<i>Blumea</i> sp.	<i>Oplismenus compositus</i> (L.) Beauv.
<i>Borreria hispida</i> (L.) K. Schum.	<i>Oryza sativa</i> (L.)
<i>B. ramosa</i> (L.) Stapf.	<i>Oxalis corniculata</i> L.
<i>Brassica juncea</i> (L.) Czern. & Coss	<i>Panicum miliare</i> Lam.
<i>B. oleracea</i> L.	<i>P. milaceum</i> L.
<i>Catharanthus roseus</i> (L.) Don	<i>P. repens</i> L.
<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban	<i>Paspalum scrobiculatum</i> L.
<i>Commelina benghalensis</i> L.	<i>Pennisetum typhoides</i> (Burm. f.) Stapf & Hubbard
<i>Colocasia esculenta</i> (D) Schott	<i>P. pedicellatum</i> L.
<i>Corchorus capsularis</i> L.	<i>Petunia</i> sp.
<i>Courtosia cyperoides</i> Nees	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
<i>Cucumis sativus</i> L.	<i>Phlox drummondii</i> Hook.
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.	<i>Phyllanthus urinaria</i> L.
<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.	<i>Pisum sativum</i> L.
<i>Cyperus brevifolis</i> (Rottb.) Hassk	<i>Poa annua</i> L.
<i>C. compressus</i> L.	<i>Portulaca oleracea</i> L.
<i>C. deformis</i> L.	<i>Ranunculus pusilus</i> Poir.
<i>C. iria</i> L.	<i>Rungia parviflora</i> Nees.
<i>C. pilosus</i> Vahl.	<i>Saccharum officinarum</i> L.
<i>C. procerus</i> Rottb.	<i>Sacciolepis indica</i> (L.) Chase
<i>C. pulcherrimus</i> Wild. ex Kunth	<i>Scirpus articulatus</i> L.
<i>C. rotundus</i> L.	<i>Scoparia dulcils</i> L.
<i>Desmodium triflorum</i> (L.) DC.	<i>Setaria italic</i> (L.) Beauv.
<i>Digitaria longiflora</i> (Retz.) Pers.	<i>Solanum melongena</i>
<i>D. sanguinalis</i> (L.) Scop.	<i>S. nigrum</i> L.
<i>Echinochloa colonum</i> (L.) Link	<i>S. sisymbriifolium</i> L.

<i>E. crusgalli</i> (L.) Beauv.	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench
<i>Eclipta prostrata</i> L.	<i>Sphaeranthus africanus</i> L.
<i>Eleusine coracana</i> (L.) Gaertn.	<i>Sphenoclea zeylanica</i> Gaertn.
<i>E. indica</i> (L.) Gaertn.	<i>Spinacea oleracea</i> L.
<i>Eragrostis gangetica</i> (Roxb.) Steud.	<i>Stellaria media</i> (L.) Cyrillo
<i>E. plumosa</i> Link	<i>Trifolium repens</i> L.
<i>Euphorbia hirta</i> L.	<i>Triticum aestivum</i> L.
<i>Fimbristylis miliacea</i> (L.) Vahl	<i>Urena lobata</i> L.
<i>F. podocarpa</i> Nees	<i>Vandellia</i> sp.
<i>Fuirena glomerata</i> Lam.	<i>Vernonia cinerea</i> (L.) Less
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	<i>Vicia faba</i> L.
<i>Gnaphalium purpureum</i> L.	<i>Vigna mungo</i> (L.) Heppner
<i>Grangea maderaspatana</i> Poir.	<i>V. radiata</i> (L.) Wilcz.
<i>Hedyotis diffusa</i> Wild.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.
<i>Herminium</i> sp.	<i>Zea mays</i> L.

Existe variabilidade na suscetibilidade a *M. graminicola* em *O. sativa*, embora poucas linhagens realmente apresentem algum nível de resistência (Jena & Rao, 1976; Plowright *et al.*, 1999; Bridge *et al.*, 2005; Prasad *et al.*, 2006; Cabasan *et al.*, 2012; Dimpka *et al.*, 2015). Resistência tem sido encontrada nas espécies africanas *O. glaberrima* (cultivada) e *O. longistaminata* (selvagem). Embora alguns acessos dessas espécies africanas permitam a reprodução desse nematoide (Plowright *et al.*, 1999; Soriano *et al.*, 1999; Bimpong *et al.*, 2010; Mattos *et al.*, 2019).

Isolados de *M. graminicola* foram caracterizados usando morfologia, gama de hospedeiros e análises de sequência de DNA juntamente com caracteres morfológicos, como comprimento do corpo e estilete de J2, foi possível a identificação de populações oriundas do Vietnam (Bellafiore *et al.*, 2015), Nepal, Bangladesh, EUA e Índia (Pokharel *et al.*, 2007; 2010). A agressividade avaliada em condições controladas mostrou diferenças significativas entre os isolados, sugerindo uma possível variação intraespecífica (Pokharel *et al.*, 2007). Pokharel *et al.* (2010) relataram além de diferenças quantitativas e qualitativas entre os

isolados da Flórida e os Asiáticos, pós-inoculados em uma gama de hospedeiros similar, os isolados da Flórida não multiplicaram bem nas duas variedades de arroz utilizadas. Estudos de patogenicidade em uma variada gama de hospedeiros, sugerem raças para *M. graminicola*, por exemplo, pela capacidade variável de parasitar milho e tomate (Yik & Birchfield, 1979; Pokharel *et al.*, 2010; Bellafiore *et al.*, 2015). Outra explicação para a aparente divergência na virulência de *M. graminicola* é a existência de um complexo de espécies (Negretti *et al.*, 2017).

Dentre as espécies de nematoides das galhas danosas a arroz no Brasil, além de *M. graminicola* tem-se *M. oryzae* e *Meloidogyne* sp.0. *Meloidogyne oryzae* foi detectado pela primeira vez no Suriname em 1971 causando danos em arroz (Maas *et al.*, 1978). No final do século 20, essa espécie foi detectada novamente no Suriname e também na Guiana Francesa, através de diagnóstico feito por fenótipo de esterase (O1) (Carneiro *et al.*, 2000), embora a presença dessa espécie nesses locais seja duvidosa já que a identidade taxonômica não foi confirmada por morfologia. Estudos posteriores adicionais do número de cromossomos e modo de reprodução, concluíram que *M. oryzae* havia sido detectado apenas uma vez no Suriname em 1971 segundo a descrição de Maas *et al.* (1978) e, posteriormente nos estudos de Esbenshade & Triantaphyllou (1985) e Jepson (1987) utilizando a mesma população. Estudo recente detectou essa espécie pela primeira vez no Brasil (Mattos *et al.*, 2018) com base em taxonomia integrativa: características morfométricas, morfológicas, enzimáticas e moleculares, confirmando também a segunda detecção mundial.

Caracterização das espécies de *Meloidogyne* no Sul do Brasil

O nematoide das galhas tem sido relatado em plantios de arroz irrigado no Brasil desde os anos 1980 (Ribeiro *et al.*, 1984). No entanto, 30 anos mais tarde, a primeira pesquisa acerca do controle do nematoide das galhas e da suscetibilidade de cultivares brasileiras foi

realizada por Steffen *et al.* (2007). Neste estudo, os autores detectaram ocorrência generalizada de *M. graminicola* (Est.VS1) na região da depressão central do Estado do RS. Apesar dos relatos de ocorrência de NG em arroz irrigado no sul do Brasil (Sperandio & Monteiro, 1991; Steffen *et al.*, 2007), ainda existe pouca informação sobre a diversidade de espécies de *Meloidogyne* no arroz irrigado dessa importante região produtora.

Negretti *et al.* (2017) realizaram um levantamento em campos de arroz irrigado nos estados RS e SC. Utilizando caracterização bioquímica foi possível caracterizar 56 populações de *Meloidogyne* por meio do fenótipo de esterase. De acordo com os resultados apresentados pelos autores, dois fenótipos conhecidos corresponderam a *M. graminicola* (fenótipo Est VS1, Rm: 0,70, cuja banda se estende de 0,68-0,72) e *M. javanica* (fenótipo Est J3, Rm: 1,00, 1,20, 1,35), sendo *M. graminicola* a espécie predominante em ambos os estados. Três fenótipos de esterase atípicos foram detectados nas populações de nematoides das galhas coletadas em campos de arroz desses estados: *Meloidogyne* sp. 1 (Est R1, Rm 1,02 cuja banda se estende de 1,0-1,04) com alta atividade enzimática, recentemente identificada como sendo *M. oryzae* (Mattos *et al.*, 2018), *Meloidogyne* sp. 2 (Est. R2, Rm: 0,85, 0,91, cuja banda se estende de 0,91 a 1,0) e *Meloidogyne* sp. 3 (Est R3, Rm: 0,74, 0,80 , cuja banda se estende de 0,74 a 0,82), além de uma espécie sem perfil de esterase denominada *Meloidogyne* sp.0 encontrada em levantamento no estado de Santa Catarina (Mattos *et al.*, 2017) e no Paraná (Soares, 2017) (Fig. 3).

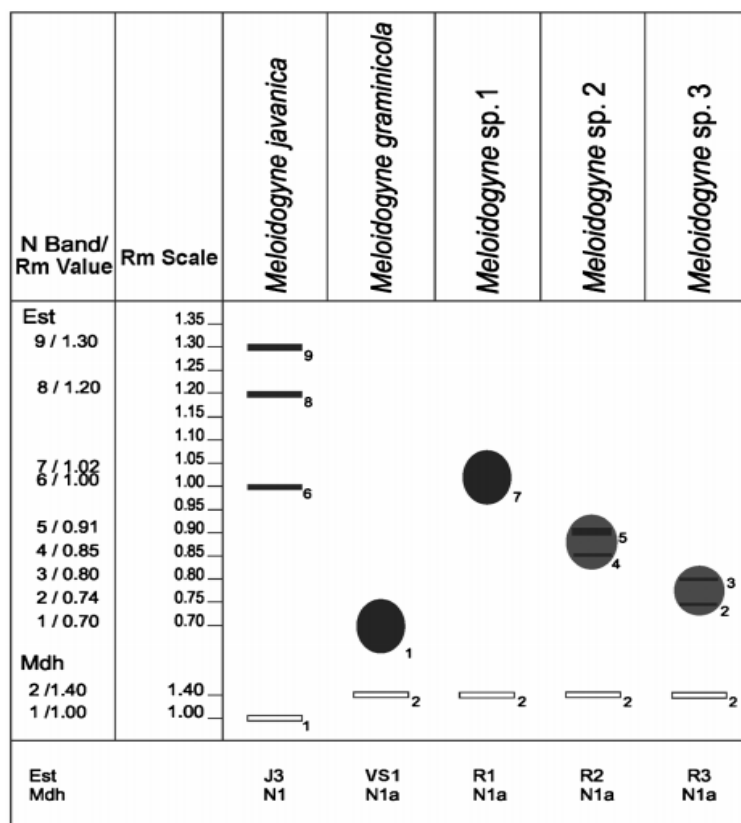


Figura 3. Esquema dos fenótipos de esterase (Est) e malato desidrogenase (Mdh) observados nas populações de *Meloidogyne* coletadas em plantas de arroz no sul do Brasil. *M. javanica* (J3; N1), *M. graminicola* (VS1; N1a), *Meloidogyne* sp.1=*M. oryzae* (R1=O1; N1a), *Meloidogyne* sp.2 (R2; N1a) e *Meloidogyne* sp.3 (R3; N1a); Rm (Ratio of migration): proporção de migração das bandas. Negretti *et al.* (2017).

Populações mistas de *Meloidogyne* spp. foram detectadas em cerca de 44% das amostras de arroz, em ambos os estados, sendo em Santa Catarina a maior porcentagem de espécies de *Meloidogyne* (62,5%) quando comparada ao Rio Grande do Sul (30%). Com frequência de ocorrência de diferentes espécies de *Meloidogyne* para o estado de Santa Catarina: *M. graminicola* (87,5%), *M. javanica* (12,5%), *Meloidogyne* sp. 1 (62,5%), *Meloidogyne* sp. 2 (12,5%) e *Meloidogyne* sp. 3 (6,25%). Para o estado do Rio Grande do Sul: *M. graminicola* (80%), *Meloidogyne* sp. 2 (40%) e *Meloidogyne* sp. 3 (10%). Recentemente Soares (2017) mostrou a presença de um complexo de espécies no Paraná predominando *Meloidogyne* sp.3 (72,21%) e *Meloidogyne* sp.2 (16,73%), superando *M. graminicola* (11,32%), além de relatar uma população que não apresentava atividade da enzima esterase,

denominada *Meloidogyne* sp.0, que também foi encontrada em Santa Catarina (Mattos *et al.*, 2017). Análises isoenzimáticas (esterases) levaram os autores destes trabalhos a relatar a existência de um complexo de espécies de *Meloidogyne* ocorrendo em mistura nas áreas de arroz irrigado no Sul do país (Mattos *et al.*, 2017; Negretti *et al.*, 2017; Soares, 2017).

Os resultados obtidos por Negretti *et al.* (2017) através da análise filogenética da região ITS mostraram que todas as populações de *M. graminicola* pertenciam a um único agrupamento. *Meloidogyne* sp. 2 e *Meloidogyne* sp. 3 agruparam-se com as populações de *M. graminicola*, sugerindo que elas estão relacionadas por serem espécies partenogênicas meióticas facultativas. E as duas populações de *M. oryzae* do estudo, agruparam-se em conjunto com as populações partenogênicas mitóticas obrigatórias (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985). Os resultados obtidos por Negretti *et al.* (2017) ressaltaram a possibilidade de identificação errônea de uma espécie também parasita do arroz, *M. oryzae*, população do Suriname enviada pelo Pesquisador Patrick Quénehervé e estudada por Carneiro *et al.* (2000) e Tigano *et al.* (2005). Essa população apresentou um perfil de esterase semelhante ao de *M. graminicola* e o de Mdh N3 semelhante a *M. salasi*, entretanto essa população não foi morfológicamente caracterizada e seu real status taxonômico não foi bem definido pelos autores, embora tenha sido denominada *M. oryzae*. Estudos posteriores realizados por Mattos *et al.* (2018) mostraram a real identidade taxonômica de *M. oryzae*, (esterase O1 e Mdh N1a). Dessa maneira, hoje há a suspeita de que essa população do Suriname era *M. salasi* (VS1, N3).

Levando em conta as perdas provocadas por NG e a importância da região Sul para a produção nacional de arroz, a correta identificação de espécies de *Meloidogyne* é de extrema importância para a implementação de estratégias de controle em um manejo integrado de pragas e doenças (Negretti *et al.*, 2017). Para isso, estudos de caracterização das espécies,

definição do estatus taxonômica e novas ferramentas para identificação e diagnóstico se fazem necessárias.

Resistência ao nematoide das galhas do arroz

Resistência pode ser definida como a habilidade da planta em dificultar ou impedir o desenvolvimento ou reprodução do patógeno (Robinson, 1969). Basicamente, dois tipos de resistência são relatadas: resistência pré-infectiva e resistência pós-infectiva. A resistência pré-infectiva é passiva e constitutiva, ocorrendo antes da penetração do nematoide ainda na superfície da raiz, evitando ou dificultando a penetração, como exemplo tem-se a produção de exsudatos radiculares repelentes ou tóxicos aos J2. A resistência pós-infectiva é ativa e considerada a mais comum. É ativada após a penetração do nematoide na planta e é determinada pela relação nematoide-planta (Pascholati & Dalio, 2011). A resistência pode variar de baixa a moderada (parcial ou intermediária) até alta. A planta altamente resistente não permite a reprodução do nematoide ou permite uma reprodução bem reduzida e a planta moderadamente resistente permite uma quantidade intermediária de reprodução. A suscetibilidade é usada como oposto da resistência, onde o nematoide se reproduz normalmente alcançando altos níveis populacionais (Roberts, 2002). A resistência é relatada como um modo de herança expresso por um único gene (monogênica) ou por poucos genes (oligogênica) ou mesmo por vários genes (poligênica). Vanderplank (1978) classificou a resistência como Resistência Vertical (monogênica, raça-específica, qualitativa) e Resistência Horizontal (poligênica, amplo espectro, quantitativa). A resistência vertical normalmente é controlada por um ou poucos genes R (genes de efeito maior), apresentando uma interação do tipo gene-a-gene como as que ocorrem com planta-patógeno (Flor, 1971), geralmente sendo pouco durável. A resistência horizontal é controlada por muitos genes recessivos de efeitos

menores com efeitos aditivos, conhecida por ser durável e conferir nível quantitativo de resistência (Roberts, 2002).

Fontes naturais de resistência são difíceis de serem encontradas (Fassuliotis, 1979). Resistência genética a *M. exigua* tem sido relatada em *Coffea canephora* L., *C. congensis* Froehner, *C. eugenioides* e *C. racemosa* (Schieber & Sosa, 1960; Curi, 1969; Carvalho *et al.*, 1970; Fazuoli, 1975). Resistência genética a *M. exigua* em *C. canephora* é determinada pelo gene de resistência *Mex-1* que reduz a penetração e desenvolvimento do nematoide (Alpizar *et al.*, 2007). Villain *et al.* (2002; 2004) reportam resistência em *C. canephora* e *C. congensis* a *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*. Bertrand & Anthony (2008) relataram que *C. canephora* e seus híbridos e *C. racemosa* são fontes de resistência a *M. exigua*. Embora resistência a nematoides esteja disponível em algumas espécies vegetais, novas fontes de resistências são necessárias (Roberts, 2002).

Quando a resistência não for encontrada em plantas cultivadas, atenção deve ser voltada para espécies selvagens, pois são importantes fontes com potencial considerável para doação de genes (Roberts, 2002). Shepherd (1974a, b) desenvolveu duas linhas de algodão provenientes do cruzamento de *Gossypium barbadense* L. e *G. hirsutum* L., que apresentam alta resistência a *M. incognita*. Lopes *et al.* (2019) avaliaram três acessos de *G. hirsutum* com genes de resistência e um acesso selvagem de *G. barbadense* a 6 populações de *M. incognita* coletadas na Bahia e observaram baixa reprodução dessas populações nos acessos estudados. Em relação a *M. enterolobii*, fontes de resistência foram encontradas nas espécies de solanáceas selvagens como *Solanum stramonifolium* Jacq., *S. paniculatum* L. e *S. subinerme* Jacq. (Pinheiro & Pereira, 2009). Para *M. graminicola* foi relatada resistência nas espécies africanas cultivada *O. glaberrima* e selvagem *O. longistaminata* (Soriano *et al.*, 1999).

A resistência de plantas ao parasitismo do nematoide pode ser expressa em pré ou pós penetração (Huang, 1985; Trudgill, 1991). O mecanismo de pré-penetração pode ser pela

produção de exsudatos radiculares ou por uma barreira morfológica preexistente (Huang, 1985). Já os mecanismos de pós-penetração envolvem a ativação de processos fisiológicos, moleculares e genéticos que previnem ou atrasam o desenvolvimento dos J2 e inibem a formação do sítio de alimentação e/ou limitando a reprodução da fêmea (Huang, 1985; Trudgill, 1991). Genes de resistência relacionados a uma reação de hipersensibilidade (HR) são caracterizados pela formação de necrose em células do hospedeiro próximas ao sítio de infecção, isolando o patógeno (Dropkin, 1969). Anthony *et al.* (2005) observaram células apresentando coloração escura ao redor da região anterior do nematoide ou mesmo de células gigantes na cultivar Iapar 59 que possui o gene *Mex-1*, indicando uma resposta de HR. Reação de HR pode ser identificada com uma coloração escura ao redor do nematoide ou mesmo das células gigantes (Anthony *et al.*, 2005), exibindo características de acúmulo de compostos fenólicos e aspecto necrótico das células (Albuquerque *et al.*, 2010). Uma reação de hipersensibilidade comum apresentada na forma de necrose celular e acúmulo de compostos fenólicos já foi observada em algodão, café, tomate, pimenta e ameixa (Williamson & Hussey, 1996; Anthony *et al.*, 2005; Pegard *et al.*, 2005; Moon *et al.*, 2010; Khallouk *et al.*, 2011; Mota *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2015; Lopes *et al.*, 2020); bem como a lignificação (Galeng-Lawilao *et al.*, 2019). Além da HR, a baixa quantidade de penetração de J2 na planta resistente comparada à planta suscetível já foi relatada em cenoura-*M. javanica*, soja/pimenta/caupi-*M. incognita*, uva/amendoim-*M. arenaria* e arroz-*M. graminicola* (Huang, 1986; Niblack *et al.*, 1986; Bleve-Zacheo *et al.*, 1998; Anwar & McKenry, 2000; Bendezu & Starr, 2003; Das *et al.*, 2008; Moon *et al.*, 2010; Cabasan *et al.*, 2012; 2014). Atraso no desenvolvimento dos J2 que conseguiram penetrar nas plantas resistentes foi registrado em milho/algodão-*M. incognita*, soja-*M. arenaria*, batata-*M. fallax* Karssen, 1996 e arroz-*M. graminicola* (Windham & Williams, 1994; Pedrosa *et al.*, 1996; Kouassi *et al.*, 2004; Faske & Starr, 2009; Cabasan *et al.*, 2012; 2014; Mattos *et al.*, 2019).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; ROSSO, M.N.; ENGLER, J.D.A.; FAVERY, B. 2009. Invasion, feeding and development. In: Pierry, R.N., Moens, M., Starr, J.L. (Eds.). Root-knot nematodes. CABI. Wallingford, UK. P.163-181.
- ABAD, P.; FAVERY, B.; ROSSO, M.N.; CASTAGNONE-SERENO, P. 2003. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology*, 4(4):217-224.
- AGRIOS, G.N. 2005. Plant diseases caused by nematodes. In: Agrios, G.N. (Ed.) *Plant Pathology*, 5 ed. Academic Press, London, p. 825-874.
- ALBUQUERQUE, E.V.S.; CARNEIRO, R.M.D.G.; COSTA, P.M.; GOMES, A.C.M.M.; SANTOS, M.; PEREIRA, A.A.; GROSSI-DE-SA, M.F. 2010. Resistance to *Meloidogyne incognita* expresses a hypersensitive-like response in *Coffea arabica*. *European Journal of Plant Pathology*, 127(3):365-373.
- ALPIZAR, E.; ETIENNE, H.; BERTRAND, B. 2007. Intermediate resistance to *Meloidogyne exigua* root-knot nematode in *Coffea arabica*. *Crop Protection*, 26:903-910.
- ANTHONY, F.; TOPART, P., MARTINEZ, A.; SILVA, M.; NICOLE, M. 2005. Hypersensitive-like reaction conferred by the Mex1 resistance gene against *Meloidogyne exigua* in coffee. *Plant Pathology*, 54(4):476-482.
- ANWAR, S.A. & MCKENRY, M.V. 2000. Penetration, development and reproduction of *Meloidogyne arenaria* on two new resistant *Vitis* spp. *Nematropica*, 30:9-17.
- BARCALA, M.; GARCÍA, A.; CABRERA, J.; CASSON, S.; LINDSEY, K.; FAVERY, B.; ESCOBAR, C. 2010. Early transcriptomic events in microdissected *Arabidopsis* nematode-induced giant cells. *The Plant Journal*, 61(4): 698-712.
- BELLAFIGLIORE, S.; JOUGLA, C.; CHAPUIS, E.; BESNARD, G.; SUONG, M.; VU, P. N.; THI, X. N. 2015. Intraspecific variability of the facultative meiotic parthenogenetic root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) from rice fields in Vietnam. *Comptes Rendus Biologies*, 338(7): 471-483.

- BENDEZU, I.F.; STARR, J.L. (2003). Mechanism of resistance to *Meloidogyne arenaria* in the peanut cultivar COAN. *Journal of Nematology*, 35 115-118.
- BERTRAND, B., ANTHONY, F. 2008. Genetics of resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and breeding. In: Souza, R. M. (Ed.) *Plant-Parasitic Nematodes of Coffee*. Dordrecht, NL. Springer Science+Business. pp.165-190.
- BESNARD, G., THI-PHAN, N., HO-BICH, H., DEREPPER, A., TRANG NGUYEN, H., QUÉNÉHERVÉ, P., ARIBI, J., BELLAFFIORE, S. 2019. On the Close Relatedness of Two Rice-Parasitic Root-Knot Nematode Species and the Recent Expansion of *Meloidogyne graminicola* in Southeast Asia. *Genes*, 10(2):175.
- BESNARD, G.; JÜHLING, F.; CHAPUIS, É.; ZEDANE, L.; LHUILLIER, É.; MATEILLE, T.; BELLAFFIORE, S. 2014. Fast assembly of the mitochondrial genome of a plant parasitic nematode (*Meloidogyne graminicola*) using next generation sequencing. *Comptes Rendus Biologies*, 337:295-301.
- BIMPONG, I.K.; CARPENA, A.L.; MENDIORO, M.S.; FERNANDEZ, L.; RAMOS, J.; REVERSAT, G.; BRAR, D.S. 2010. Evaluation of *Oryza sativa* x *O. glaberrima* derived progenies for resistance to rootknot nematode and identification of introgressed alien chromosome segments using SSR markers. *African Journal of Biotechnology*, 9(26): 3988-3997.
- BLEVE-ZACHEO, T.; BONGIOVANNI, M.; METILLO, M.T.; CASTAGNONE-SERENO, P. 1998. The pepper resistance genes *Me1* and *Me3* induce differential penetration rates and temporal sequences of root cell ultrastructural changes upon nematode infection. *Plant Science*, 133, 79-90.
- BLOK, V.C. 2005. Achievements in and future prospects for molecular diagnostics of plantparasitic nematodes. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27:76-185.
- 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. CABI International, Cambridge, p.98-118.
- BLOK, V.C.; WISHART, J.; FARGETTE, M.; BERTHIER, K.; PHILLIPS, M.S. 2002. Mitochondrial DNA differences distinguishing *Meloidogyne mayaguensis* from the major species of tropical root-knot nematodes. *Nematology*, 4:773–781.
- BRIDGE, J.; PAGE, S. J. 1982. The rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*, on deep water rice (*Oryza sativa* subsp. *indica*). *Revue de Nematologie*, 5:225–32.
- BRIDGE, J.; PLOWRIGHT, R. A.; PENG, D. 2005. Nematode parasites of rice. In: Luc, M.; Sikora, R. A.; Bridge, J. (Eds). Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CAB International, Wallingford, England, p. 87–128.
- BRITO, J.A.; KAUR, R.; CETINTAS, R.; STANLEY, J.D.; MENDES, M.L.; POWERS, T.O.; DICKSON, D.W. 2010. *Meloidogyne* spp. infecting ornamental plants in Florida. *Nematropica*, 40(1):87-104.
- BRONDANI, C.; PEREIRA, R.; BRONDANI, V.; RANGEL, P.H.N.; FERREIRA, M.E. 2001. Development and mapping of *Oryza glumaepatula*-derived microsatellite markers in the interspecific cross *Oryza glumaepatula* X *O. sativa*. *Hereditas*, 134:59-71.
- BRONDANI, C.; RANGEL, P.H.N.; BRONDANI, R.P.V.; FERREIRA, M.E. 2002. QTL mapping and introgression of yield related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 104:1192-1203.
- BRONDANI, R.P.V.; ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, C.; RANGEL, P.H.N.; BORBA, T.C.O.; RANGEL, P.N.; MAGALHÃES, M.R.; VENCOVSKY, R. 2005. Genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* populations in three Brazilian biomes using microsatellite markers. *Genetica*, 125:115-123.
- BROWN, W.M. 1985. The mitochondrial genome of animals. In: MacIntyre, R.H. (Ed.). *Molecular Evolutionary Genetics*. Plenum Press, New York, p.95–130.

- BUSO, G.S.C.; RANGEL, P.H.; FERREIRA, M.E. 1998. Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. *Molecular Ecology*, 7, 107-117.
- CABASAN, M.T.N.; KUMAR, A.; BELLARIORE, S.; DE WAELE, D. 2014. Histopathology of the root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*, on *Oryza sativa* and *O. glaberrima*. *Nematology*, 16:73-81.
- CABASAN, M.T.N.; KUMAR, A.; DE WAELE, D. 2012. Comparison of migration, penetration, development and reproduction of *Meloidogyne graminicola* on susceptible and resistant rice genotypes. *Nematology*, 14(4):405-415.
- CAILLAUD, M. C.; DUBREUIL, G.; QUENTIN, M.; PERFUS-BARBEOCH, L., LECOMTE, P; DE ALMEIDA ENGLER, J.; FAVERY, B. 2008. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology*, 165(1):104-113.
- 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.; COFCEWICZ, E.T. 2008. Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In: Souza, R.M. (Ed.). *Plant parasitic nematodes of coffee*. Springer, New York, p.87–122.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; MONTEIRO, J.M.S.; SILVA, U.C.; GOMES, G. 2016. Gênero *Meloidogyne*: diagnose através de eletroforese de isoenzimas e marcadores SCAR. In: Oliveira, C.M.; Dos Santos, M.A.; Castro, L.H.S. (Eds). *Diagnose de Fitonematoides*. Millennium Editora, Campinas, SP, p.71-93.
- 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.
- CARVALHO, A.; MORAES, F.P.; MONACO, L C. & RRUDA, H.V. de. 1970. Novas fontes de resistência genética de *Coffea* no controle do nematóide do cafeeiro, *Meloidogyne exigua*. *Biológico*, 36(10):293-295.

- CASTAGNONE-SERENO, P. 2002. Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes. *Euphytica*, 124: 193-199.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E.G.; PERFUS-BARBEOCH, L.; ABAD, P. 2013. Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: new insights from the genomic era. *Annual Review of Phytopathology*, 51: 203-220.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; MASUTTI, F.V.; LEROY, F. 1994. Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers. *Genome*, 37:904-909.
- CASTAGNONE-SERENO, P., MULET, K., DANCHIN, E. G. J., KOUTSOVOULOS, G. D., KARAUIC, M., DA ROCHA, M., BAILLY-BECHET, M., PRATX, L., PERFUS-BARBEOCH, L., ABAD, P. 2019. Gene copy number variations as signatures of adaptive evolution in the parthenogenetic, plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Ecology*, 28(10):2559-2572.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; PIOTTE, C.; ABAD, P.; BONGIOVANNI, M.; DALMASSO, A. 1991. Isolation of a repeated DNA probe showing polymorphism among *Meloidogyne incognita* populations. *Journal of Nematology*, 23:316-320.
- CASTAGNONE-SERENO, P., PIOTTE, C., UIJTHOF, J., ABAD, P., WAJNBERG, E., VANLERBERGHE-MASUTTI, F., BONGIOVANNI, M., DALMASSO, A. 1993. Phylogenetic relationships between amphimictic and parthenogenetic nematodes of the genus *Meloidogyne* as inferred from repetitive DNA analysis. *Heredity*, 70(2):195-204.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; SKANTAR, A.; ROBERTSON, L. 2011. Molecular tools for diagnostics. In: Jones, J.; Gheysen, G.; Fenoll, C. (Eds). *Genomics and Molecular Genetics of Plant Nematode-Interactions*. Springer, London, UK, p.443-464.
- CENIS, J.L. 1993. Identification of four major *Meloidogyne* spp. by Random Amplified Polymorphic DNA (TAPD-PCR). *Phytopathology*, 83:76-78.
- CHEEMA, K. K., BAINS, N. S., MANGAT, G. S., DAS, A., VIKAL, Y., BRAR, D. S., KHUSH, G. S., SINGH, K. 2008. Development of high yielding IR64× *Oryza rufipogon* (Griff.) introgression lines and identification of introgressed alien chromosome segments using SSR markers. *Euphytica*, 160(3):401-409.

- 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.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO
<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253.pdf> Grãos: Safra 2017/2018. 08 de fevereiro de 2020. 16h21.
- CORREA, V. R., DOS 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. izalcoensis*. *European Journal of Plant Pathology*, 137(2):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 species-specific SCAR marker for its diagnosis. *Plant pathology*, 63(2):476-483.
- COYNE, D.L.; PL OWRIGHT, R.A. 1998. Use of solarisation to control *Heterodera sacchari* and other plant parasitic nematodes in the field: a modified technique for experimental purposes. *International Journal of Nematology*, 8:81-84.
- CRISPIM, B.C.F. 2012. Variabilidade genética no gênero. *Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos*, 5(4).
- CURI, S.M. 1969. *Coffea canephora* var. Kouillou, promissora fonte de resistência genética no controle de nematóide do cafeeiro, *Meloidogyne exigua*. *Biológico*, 35(1):21-22.
- CURRAN, J.; BAILLIE, D.L.; WEBSTER, J.M. 1985. Use of restriction fragment length differences in genomic DNA to identify nematode species. *Parasitology*, 90:137-144.
- 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.

- CURRAN, J.; WEBSTER, J.M. 1987. Identification of nematodes using restriction fragment length differences and species-specific DNA probes. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 9:162-166.
- CURTIS, R.H.; ROBINSON, A.F.; PERRY, R.N. 2009. Hatch and host location. In: Perry, R.N.; Moens, M.; Starr, J.L. *Root-knot nematodes*. CAB International, Wallingford, p.139-162.
- DALMASSO, A.; BERGÉ, J.B. 1978. Molecular polymorphism and phylogenetic relationship in some *Meloidogyne* spp.: Application to the taxonomy of *Meloidogyne*. *Journal of Nematology*, 10(4):323.
- DAS, S.; DEMASON, D.A.; EHLERS, J.D.; CLOSE, T.J.; ROBERTS, P.A. 2008. Histological characterization of root-knot nematode resistance in cowpea and its relation to reactive oxygen species modulation. *Journal of Experimental Botany*, 59:1305-1313.
- DE LEY, P.; BLAXTER, M. 2002. Systematic position and phylogeny. In: LEE, D.L. *The biology of nematodes*. CRC Press. Boca Raton. p.1-30.
- DEPEC-Departamento de Pesquisas e Estudos Econômicos. 2015. Arroz. Depec-Bradesco, junho de 2015. Disponível em:< www.economiaemdia.com.br>. Acesso em:08 de junho de 2019. 16h29.
- DIMKPA, S.O.N.; LAHARI, Z.; SHRESTHA, R.; DOUGLAS, A.; GHEYSEN, G.; PRICE, A.H. 2015. A genome-wide association study of a global rice panel reveals resistance in *Oryza sativa* to root-knot nematodes. *Journal of Experimental Botany*, 37:1191–1200.
- DROPKIN, V.H. 1969. Cellular response of plants to nematode infection. *Annual Review of Phytopathology*, 7:101-122.
- 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.; Carter, C.C. (Eds). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. v.1: Biology and Control. 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, p. 47-77.
- 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.
- 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.
- EIZENGA, G.S.; AGRAMA, H.S.; LEE, F.N.; JIA, Y. 2009. Exploring genetic diversity and potential novel disease resistance genes in a collection of rice (*Oryza* spp.) wild relatives. Genetic Resource Crop Evolution, 56:65–76.
- ENDO, B.Y. 1975. Pathogenesis of nematode-infected plants. Annual Review of Phytopathology, 13:213-238.
- ESBENSHADE, P.R.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. 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.
- FANELLI, E.; COTRONEO, A.; CARISIO, L.; TROCCOLI, A.; GROSSO, S.; BOERO, C.; DE LUCA, F. 2017. Detection and molecular characterization of the rice root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* in Italy. European Journal of Plant Pathology, 149(2):467-476.
- FAO, 2019. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> 08 de fevereiro de 2020, 16h29.
- FARGETTE, M.; LOLLIER, V.; PHILLIPS, M.; BLOK, V.; FRUTOS, R. 2005. AFLP analysis of the genetic diversity of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*, major agricultural pests. Comptes Rendus Biologies, 328(5):455-462.

- FAROOQ, M., BASRA, S. M. A., WAHID, A., CHEEMA, Z. A., CHEEMA, M. A., KHALIQ, A. 2008. Physiological role of exogenously applied glycinebetaine to improve drought tolerance in fine grain aromatic rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(5):325-333.
- FASKE, T.R.; STARR, J.L. 2009. Reproduction of *Meloidogyne marylandi* and *M. incognita* on several Poaceae. *Journal of Nematology*, 41(1):2.
- FASSULIOTIS, G. 1985. "The role of the nematologist in the development of resistant cultivars". In: Sasser, J.N.; Carter, C.C. (Eds). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. v.1: Biology and Control. North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, p.233–240.
- FASSUOLIOTIS, G. 1979. Plant breeding for root-knot nematode resistance. In: Lambert, F.; Taylor, C.E. (Eds). *Root-knot nematodes (Meloidogyne species) Systematics, Biology and Control*. Academic Press, New York, p. 425-453.
- FAZUOLI, L.C. 1975. Resistência de *Coffea racemosa* ao *Meloidogyne exigua*. *Ciência Cult.*, S. Paulo 27(7):230. (Resumo).
- FERRAZ, L.C.C.B.; BROWN, D.J.F. 2016. *Nematologia de plantas: fundamentos e importância*. Norma Editora. Manaus, Brasil. 251p.
- FERRAZ, L.C.C.B.; MONTEIRO, A.R. 2011. Nematoides. In: Amorim, L., Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A. (Eds). *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. Ceres. São Paulo, Brasil. p. 277-306.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*, 3ª edição. Embrapa, Brasília-DF. 220p.
- FINLEY, A.M. 1981. Histopathology of *Meloidogyne chitwoodi* on Russet Burbank Potato. *Journal of Nematology*, 13(4):486-491.
- FLOR, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology*, 9(1):275-296.
- FORNASIERI FILHO, D., FORNASIERI, J. L. 2006. *Manual da cultura do arroz*. Funep.

- 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(7):675-680.
- 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.; NEVES, W.S.; OLIVEIRA, R.D.L. 2007. Métodos em nematologia vegetal. In: Alfenas, A. C.; MAFIA, R. G. (Eds) Métodos em fitopatologia. Editora UFV, Viçosa, MG, p. 253-291.
- FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L., FERRAZ, S. 2006. Introdução à Nematologia. 3ª edição. Ed. UFV. Viçosa - MG.
- FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L.; FERRAZ, S. 2001. Introdução à Nematologia. Editora UFV, Viçosa, MG, 84p. (Cadernos Didáticos, 58).
- GALENG-LAWILAO, J.; KUMAR, A.; CABASAN, M.T.N.; DE WAELE, D. 2019. Comparison of the penetration, development and reproduction of *Meloidogyne graminicola*, and analysis of lignin and total phenolic content in partially resistant and resistant recombinant inbred lines of *Oryza sativa*. *Tropical Plant Pathology*, 44(2):171-182.
- GARRIS, A. J.; TAI, T.H.; COBURN, J.; KRESOVICH, S.; MCCOUCH, S. 2005. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics*, 169:1631–1638.
- GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.; HANADA, R.; CARES, J.E.; ARAÚJO, J.D.; ÂNGELO, P.D.S. 2016. Glossário de fitopatologia. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica.
- GHESEQUIÈRE, A. 1988. Diversité génétique de l'espèce sauvage de riz, *Oryza longistaminata* A. Chev. & Roehr, et dynamique des flux géniques au sein du groupe *sativa* en Afrique. Tese de Doutorado. Université de Paris-SUD. Paris, França.
- GHEYSEN, G.; JONES, J.T. 2006. Molecular aspects of plant–nematode interactions. In: Perry, R.N.; Moens, M. (Eds). *Plant Nematology*. CAB International, Wallingford, UK, p. 234–254.

- GILCES, C.T.; NAVIA-SANTILLÁN, D.; VELASCO, Y.L. 2016. Nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de arroz en Ecuador. *Nematropica*, 46:45-53.
- GIREESH, C. 2018. *Oryza alta Swollen*. In: Mondal, T.K., Henry, R.J. (Eds.) *The Wild Oryza Genomes*. Springer, Cham. p. 55-59.
- GLASZMANN, J.C. 1987. Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 74:21–30.
- GOLDEN, A.M.; BIRCHFIELD, W. 1965. *Meloidogyne graminicola* (Heteroderidae), a new species of root-knot nematode from grass. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 32: 228-231.
- GOLDEN, A.M.; BIRCHFIELD, W. 1968. Rice root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) as a new pest of rice. *Plant Disease Reporter*, 52(6):423.
- GOMES, C.B.; MARCHEZAN, E.; FONTANA, I.; CARNEIRO, R.M.G.; ALMEIDA, M. R. A. 1997. Ocorrência *Meloidogyne graminicola* em Santa Maria, RS. *Ciência Rural*, 27(3):501-502.
- GOMES, C.B.; STEFFEN, R.B.; ANTONIOLLI, Z.I. 2009. Levantamento do nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em arroz irrigado na região Sul do Brasil. *Embrapa Clima Temperado. Boletim de pesquisa e desenvolvimento*.
- HANDOO, Z.A.; SKANTAR, A.M.; CARTA, L.K.; SCHMITT, D.P. 2005. Morphological, molecular and host-range evaluation of a *Meloidogyne hapla* population damaging coffee (*Coffea arabica*) in Maui, Hawaii. *Journal of Nematology*, 37:136–145.
- 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.: Methodology*. North Carolina State University Graphics, Raleigh, p. 69–77.
- HE, L., THOMSON, J.M., HEMANN, M.T., HERNANDO-MONGE, E., MU, D., GOODSON, S., POWERS, S., CORDON-CARDO, C., LOWE, S.W., HANNON, G., HAMMOND, S.M. 2005. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 435(7043), 828-833.

- HERNANDEZ, A., FARGETTE, M., SARAH, J.L. 2004. Pathogenicity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) isolates from Central America and Brazil on four genotypes of *Coffea arabica*. *Nematology* 6:205-213.
- HEUER, S., MIÉZAN, K.M.; SIÉ, M.; GAYE, S. 2003. Increasing biodiversity of irrigated rice in Africa by interspecific crossing of *Oryza glaberrima* (Steud.)× *O. sativa indica* (L.). *Euphytica*, 132(1):31-40.
- HEWEZI, T.; BAUM, T.J. 2015. Gene silencing in nematode feeding sites. In: Escobar, C.; FENOLL, C. (Eds). *Advances in botanical research: plant nematode onteractions*, v. 73. Elsevier, Oxford, UK, p. 221–239.
- HIATT, E.E.; GEORGIT, L.; HUSTON, S.; HARSHMAN, D.C.; LEWIS, S.A.; ABBOTT, A.G. 1995. Intra- and inter- population genome variation in *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology*, 27:143-152.
- HILBERT, L.; NEVES, E.G.; PUGLIESE, F.; WHITNEY, B.S.; SHOCK, M.; VEASEY, E.; IRIARTE, J. 2017. Evidence for mid-Holocene rice domestication in the Americas. *Nature Ecology & Evolution*, 1(11):1693-1698.
- HIRSCHMANN, H. 1985. The genus *Meloidogyne* and morphological characters differentiating its species. In: Sasser, J.N.; Carter, C.C. (Eds). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. v. 1. *Biology and Control*. North Carolina State University Graphics, Raleigh, p.79-93.
- HTAY, C.; PENG, H.; HUANG, W.; KONG, L.; HE, W.; HOLGADO, R.; PENG, D. 2016. The development and molecular characterization of a rapid detection method for rice rootknot nematode (*Meloidogyne graminicola*). *European Journal of Plant Pathology*, 146(2):281-291.
- HUANG, C.S. 1985. Formation, anatomy and physiology of giant cells induced by root-knot nematodes. In: Sasser, J.N.; Carter, C.C.; BARKER, K.R. (Eds). *An advanced treatise on Meloidogyne: Methodology*. North Carolina State University Graphic, Raleigh, p. 151-164.

- HUANG, C.S.; MAGGENTI, A.R. 1969. Mitotic aberration and nuclear changes of developing giant cells in *Vicia faba* caused by *Meloidogyne javanica*. *Phytopathology*, 59:447-455.
- HUANG, S.P. 1986. Penetration, development, reproduction, and sex ratio of *Meloidogyne javanica* in three carrot cultivars. *Journal of Nematology*, 18:408-412.
- HUANG, X.; KURATA, N.; WANG, Z. X.; WANG, A.; ZHAO, Q.; ZHAO, Y.; LU, Y. 2012. A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice. *Nature*, 490 (7421):497-501.
- HUMPHREYS-PEREIRA, D. A., ELLING, A. A. 2015. Mitochondrial genome plasticity among species of the nematode genus *Meloidogyne* (Nematoda: Tylenchina). *Gene*, 560(2):173-183.
- HUNT, D.J.; HANDOO, Z.A. 2009. Taxonomy, identification and principal species. In: Perry, R.N.; Moens, M.; Starr, J.L. (Eds). *Root-knot nematodes*. CABI North America Office, Cambridge. MA, U.S.A, p.55-97.
- HUSSEY, R.S. 1989. Disease - inducing secretion of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 27:123-141.
- HUSSEY, R.S.; MIMS, C.W. 1991. Ultrastructure of feeding tubes formed in giant-cells induced in plants by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Protoplasma*, 162:99-107.
- HUSSEY, R.S.; WILLIAMSON, V.M. 1998. Physiological and molecular aspects of nematode parasitism. In: Barher, K.R.; Pederson, G.A.; Windham, G.L. (Eds). *Plant and Nematode Interactions*. 1. Ed. v. 36, ASA, Madison, p. 87-108.
- IRRI, 2019. <http://ricetoday.irri.org/feeding-the-world-while-caring-for-the-planet/> acesso em 08 de fevereiro de 2020, 16h10.
- JAIN, R.K.; KHAN, M.R.; KUMAR, V. 2012. Rice root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) infestation in rice. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45(6):635-645.

- JAIN, R.K.; MATHUR, K.N.; SINGH, R.V. 2007. Estimation of losses due to plant parasitic nematodes on different crops in India. *Indian Journal of Nematology*, 37:217–219.
- JANATI, A.; BERGÉ, J.B.; TRIANTAPHYLLOU, A.; DALMASSO, A. 1982. Nouvelles données sur l'utilisation des isoestérases pour l'identification des Meloidogyne. *Revue Nématologie*, 5(1) :147-154.
- JENA, R.N.; RAO, Y.S. 1976. Nature of root-knot (*Meloidogyne graminicola*) resistance in rice (*Oryza sativa*). Isolation of resistant varieties. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences*, 83:177–184.
- JEPSON, S.B. 1987. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). CABI, Wallingford. 265p.
- JEYAPRAKASH, A.; TIGANO, M.S.; BRITO, J.; CARNEIRO, R.M.D.G.; DICKSON, D.W. 2006. Differentiation of *Meloidogyne floridensis* from *M. arenaria* using high-fidelity PCR amplified mitochondrial AT-rich sequences. *Nematropica*, 36:1-12.
- JONES, M.G.K.; DROPKIN, V.H. 1976. Scanning electron microscopy of nematode induced giant transfer cell. *Cytobios*, 5:149-161.
- JONES, M.P.; DINGKUHN, M.; ALUKO, G.K.; SEMON, M. 1997. Interspecific *Oryza sativa* L.×*O. glaberrima* Steud. progenies in upland rice improvement. *Euphytica*, 92:237–246.
- JULIANO, A.B., NAREDO, M.E.B., JACKSON, M.T. 1998. Taxonomic status of *Oryza glumaepatula* Steud. I. Comparative morphological studies of New World diploids and Asian AA genome species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45(3): 197-203.
- KARASAWA, M.M.; VENCOVSKY, R.; SILVA, C.M.; ZUCCHI, M.I.; OLIVEIRA, G.C.; VEASEY, E.A. 2007. Genetic structure of Brazilian wild rice (*Oryza glumaepatula* Steud., Poaceae) populations analyzed using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, 30(2), 400-410.
- KARSSSEN, G.; MOENS, M. 2009. Root-knot nematodes. In: Perry, R.L.; Moens, M. (Eds). *Plant Nematology*. CABI North America Office, Cambridge. MA. p.59-90.

- KARSSSEN, G; VAN AELST, A.C. 2001. Root-knot nematode perineal pattern development: a reconsideration. *Nematology*, 3(2):95-111.
- KEARNEY, M.R. 2003. Why is sex so unpopular in the Australian desert? *Trends in Ecology & Evolution*, 18:605–607.
- KHALLOUK, S.; VOISIN, R.; VAN GHELDER, C.; ENGLER, G.; AMIRI, S.; ESMENJAUD, D. 2011. Histological mechanisms of the resistance conferred by the *Ma* gene against *Meloidogyne incognita* in *Prunus* spp. *Phytopathology*, 101:945-951.
- KHUSH, G.S. 1997. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Molecular Biology*, 35(1-2): 25-34.
- KLEYNHANS, K.P.N. 1991. The root-knot nematodes of South Africa (No. 231).
- KO, H.L.; COWAN, D.C.; HENRY, R.J.; GRAHAM, G.C.; BLAKENEY, A.B.; LEWIN, L.G. 1994. Random amplified polymorphic DNA analysis of Australian rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Euphytica*, 80: 179-189.
- KONDRASHOV, A.S. 1993. Classification of hypothesis on the advantages of amphimixis. *Journal of Heredity*, 84:372–387.
- KOUASSI, A.B.; KERLAN, M.C.; SOBCZAK, M.; DANTEC, J.P.; ROUAUX, C.; ELLISSECHE, D.; MUGNIERY, D. 2004. Resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne fallax* in *Solanum sparsipilum*: analysis of the mechanisms. *Nematology*, 6:389-400.
- KRUSBERG, L.R.; NIELSEN, L.W. 1958. Pathogenesis of root-knot nematodes to the Porto Rico variety of sweet potato. *Phytopathology*, 48:30-39.
- KURATA, N. 2008. Chromosome and genome evolution in rice. In: Hirano, H. Y.; Hirai, A.; Sano, Y.; Sasaki, T. (Eds). *Rice biology in the genomics era*. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 235-246.
- LAX, P., DUEÑAS, J. R., GARDENAL, C., DOUCET, M. 2007. Assessment of genetic variability in populations of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae) from Argentina. *Nematology*, 9(2):261-270.

- LI, C.; ZHOU, A.; SANG, T. 2006. Genetic analysis of rice domestication syndrome with the wild annual species, *Oryza nivara*. *New phytologist*, 170(1):185-194.
- LIMA, E.A.; FURLANETTO, C.; NICOLE, M.; GOMES, A.C.; ALMEIDA, M.R.; JORGE-JÚNIOR, A.; CARNEIRO, R.M. 2015. The multi-resistant reaction of drought-tolerant coffee 'Conilon clone 14' to *Meloidogyne* spp. and late hypersensitive-like response in *Coffea canephora*. *Phytopathology*, 105(6):805-814.
- LONDO, J.P.; CHIANG, Y.C.; HUNG, K.H.; CHIANG, T.Y.; SCHAAL, B.A. 2006. Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(25):9578-9583.
- LOPES, C. M. L., CARES, J. E., PERINA, F. J., NASCIMENTO, G. F., MENDONÇA, J. S. F., MOITA, A. W., CASTAGNONE-SERENO, P., CARNEIRO, R. M. D. G. 2019. Diversity of *Meloidogyne incognita* populations from cotton and aggressiveness to *Gossypium* spp. accessions. *Plant Pathology*, 68(4):816-824.
- LOPES, C.M.L.; SUASSUNA, N.D.; CARES, J.E.; GOMES, A.C.M.M.; PERINA, F.J.; NASCIMENTO, G.F.; CARNEIRO, R.M.D.G. 2020. Marker-assisted selection in *Gossypium* spp. for *Meloidogyne incognita* resistance and histopathological characterization of a near immune line. *Euphytica*, 216(2):1-15.
- LOPEZ, R. 1984. *Meloidogyne salasi* sp. n. (Nematoda: Meloidogynidae), a new parasite of rice (*Oryza sativa* L.) from Costa Rica and Panama. *Turrialba* 34:275-286.
- LORDELLO, A.I.L.; LORDELLO, R.R.A. 1996. Identificação de raças de *Meloidogyne incognita* associada a algumas plantas. *Summa Phytopathologica*, 22:43-45.
- LUNT, D. H., HYMAN, B. C. (1997). Animal mitochondrial DNA recombination. *Nature*, 387(6630):247-247.
- MAAS, P.T.; SANDERS, H.; DEDE, J. 1978. *Meloidogyne oryzae* n. sp. (Nematoda, Meloidogynidae) infesting irrigated rice in Surinam (South America). *Nematologica*, 24(3):305-311.

- MAGALHÃES JR, A.M.; TERRES, A.L.; FAGUNDES, P.R.; FRANCO, D.F.; ANDRES, A. 2004. Aspectos genéticos, morfológicos e de desenvolvimento de plantas de arroz irrigado. In: Gomes, A. da S.; Magalhães JR., A.M. (Eds). Arroz irrigado no Sul do Brasil. Embrapa Clima Temperado. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.899.
- MAGGENTI, A.R. 1981. "Nematodes: development as plant parasites." Annual Reviews in Microbiology, 35(1):135-154.
- MATTOS, V.D.S.; SOARES, M.; GOMES, A.; ARIEIRA, C.; GOMES, C.; CARNEIRO, R. 2017. Caracterização de um complexo de espécies do nematoide das galhas parasitando arroz irrigado na região sul do Brasil. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E).
- MATTOS, V.S.; CARES, J.E.; GOMES, C.B.; GOMES, A.C.M.M.; MONTEIRO, J.M.S.; GOMEZ, G.M.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R.M.D.G. 2018. Integrative taxonomy of *Meloidogyne oryzae* (Nematoda: Meloidogyninae) parasitizing rice crops in Southern Brazil. European Journal Plant Pathology, 151:649-662. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1400-9>.
- MATTOS, V.S.; LEITE, R.R.; CARES, J.E.; GOMES, A.C.M.; MOITA, A.W.; LOBO, V.L.; CARNEIRO, R.M. 2019. *Oryza glumaepatula*, a new source of resistance to *Meloidogyne graminicola* and histological characterization of its defense mechanisms. Phytopathology, 109(11):1941-1948.
- MAYNARD SMITH, J. 1978. The evolution of sex. Cambridge University Press: Cambridge.
- MCCLURE, A.M. 1977. *Meloidogyne incognita*: a metabolic sink. Journal of Nematology, 9(1): 1-3.
- MCCLURE, M.A.; NISCHWITZ, C.; SKANTAR, A.M.; SCHMITT, M.E.; SUBBOTIN, S.A. 2012. Root-knot nematodes in golf course greens of the western United States. Plant Disease, 96(5):635-647.
- 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.

- MCNALLY, K.L.; CHILDS, K.L.; BOHNERT, R.; DAVIDSON, R.M.; ZHAO, K.; ULAT, V.J.; STOKOWSKI, R. 2009. Genomewide SNP variation reveals relationships among landraces and modern varieties of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106:12273–12278.
- 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(3):204-210.
- MERCER, C.F.; STARR, J.L.; MILLER, K.J. 1997. Host-parasite relationships of *Meloidogyne trifoliophila* isolates from New Zealand. *Journal of Nematology*, 29(1):55.
- MIZOBUCHI, R.; FUKUOKA, S.; TSUSHIMA, S.; YANO, M.; SATO, H. 2016. QTLs for resistance to major rice diseases exacerbated by global warming: brown spot, bacterial seedling rot, and bacterial grain rot. *Rice*, 9(23):1–12.
- 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*. CABI North America Office, Cambridge, MA, USA, p. 1-17.
- MONTEIRO, J.M.; CARES, J.E.; GOMES, A.C.M.; CORREA, V.R.; MATTOS, V.S.; SANTOS, M.F.; CARNEIRO, R.M. 2016. First report of, and additional information on, *Meloidogyne konaensis* (Nematoda: Meloidogyninae) parasitising various crops in Brazil. *Nematology*, 18(7):831-844.
- MOON, H.S.; KHAN, Z.; KIM, S.G.; SON, S.H.; KIN, Y.H. 2010. Biological and structural mechanisms of disease development and resistance in chili pepper infected with the root-knot nematode. *Plant Pathology Journal*, 26:149-153.
- MORISHIMA, H. 1994. Investigations of plant genetic resources in the Amazon basin with the emphasis on the genus *Oryza*. Monbusho International Scientific Research Program/FAPESP. p. 10-15.
- MOTA, F C.; ALVES, G.C.S.; GIBAND, M.; GOMES, A.C.M.M.; SOUSA, F.R.; MATTOS, V.S.; ROCHA, M.R. 2013. New sources of resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in wild cotton accessions and histological characterization of the defence mechanisms. *Plant Pathology*, 62(5):1173-1183.

- MOURA, R.M. 1996. Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. Revisão Anual de Patologia de Plantas, 4:209-245.
- MÜLLER, C. 1884. Mittheilungen über die unseren Kulturpflanzen schädlichen, das Geschlecht *Heterodera* bildenden Würmer. LandwirtschaftlichJahrbüche, 13:1-42.
- 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.
- NAVES, M.M.V.; BASSINELLO, P.Z. 2006. Importância na nutrição humana. A cultura do arroz no Brasil, 2:17-30.
- NEGRETTI, R.R.D. 2013. Caracterização do nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em cultivo de arroz irrigado nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina e hospedabilidade de plantas daninhas e forrageiras a *Meloidogyne graminicola*. Dissertação de Mestrado, Curso de Fitossanidade. Universidade de Pelotas, RS. 70 p.
- NEGRETTI, R.R.D.; GOMES, C.B.; MATTOS, V.S.; SOMAVILLA, L.; MANICA-BERTO, R.; AGOSTINETTO, D.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R.M.G. 2017. Characterization of a *Meloidogyne* species complex parasitising rice in Southern Brazil. Nematology, 19(4):403-412.
- NEGRETTI, R.R.D.; MANICA-BERTO, R.; AGOSTINETTO, D.; THÜRMER, L.; GOMES, C.B. 2014. Host suitability of weeds and forage species to root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* as a function of irrigation management. *Planta daninha*, 32(3), 555-561.
- NIBLACK, T.L.; HUSSEY, R.S.; BOERMA, H.R. 1986. Effects of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne incognita* on early growth of soybean. Journal of Nematology, 18:444-550.
- NORMILE, D. 2004. Yangtze seen as earliest rice site. Science, 275:309.

- NYCZEPIR, A.P.; THOMAS, S.H. 2009. Current and future management strategies in intensive crop production systems. In: Perry, R.N.; Moens, M./ Starr, J.L. (Eds). Root-knot nematodes. CABI North America Office, Cambridge. MA, U.S.A, p. 412-443.
- OKA, Y.; KARSSSEN, G.; MOR, M. 2003. Identification, host range and infection process of *Meloidogyne marylandi* from turf grass in Israel. *Nematology*, 5(5):727-734.
- OLIVEIRA, G.C.X. 1994. Geographic distribution of wild *Oryza* species in Brazil. In: Morishima, H.; Martins, P.S. (Eds). Investigations of plant genetic resources in the Amazon basin with emphasis on the genus *Oryza*. Report of 1992/93 Amazon Project. The Monbusho International Scientific Research Program, Japan and FAPESP, Brazil, p.10–15.
- ORION, D.; KRITZMAN, G. 1991. Antimicrobial activity of *Meloidogyne javanica* gelatinous matrix. *Revue de Nématologie*, 14(4):481-483.
- PADGHAM, J.L.; DUXBURY, J.M.; MAZID, A.M.; ABAWI, G.S.; HOSSAIN, M. 2004. Yield loss caused by *Meloidogyne graminicola* on lowland rainfed rice in Bangladesh. *Journal of Nematology*, 36:42-48.
- PALOMARES -RUIS, J.E.; VOVLAS, N.; TROCCOLI, A.; LIEBANAS, G.; LANDA, B.B.; CASTILLO, P. 2007. A new root-knot nematode parasitizing sea rocket from Spanish Mediterranean coastal sand dunes: *Meloidogyne dunesis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae). *Journal of Nematology*, 39:190–202.
- 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(8):985-993.
- PASCHOLATI, S.F.; DALIO, R.J.D. 2011. Fisiologia do parasitismo: como os patógenos atacam as plantas. In: AMORIM, L., REZENDE, J. A. M., BERGAMIN FILHO, A. (Eds). Manual de fitopatologia: princípios e conceitos, 1. p.543-592.
- PEDROSA, E.M.R.; HUSSEY, R.S.; BOERMA, H.R. 1996. Penetration and post-infectious development and reproduction of *Meloidogyne arenaria* races 1 and 2 on susceptible and resistant soybean genotypes. *Journal of Nematology*, 28:343-351.

- PEGARD, A.; BRIZZARD, G.; FAZARI, A.; SOUCAZE, O.; ABAD, P.; DJIAN-CAPORALINO, C. 2005. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology*, 95:158-165.
- PENG, D.; GAUR, H. S.; BRIDGE, J. 2018. Nematode parasites of Rice. In: Sikora, R. A., Coyne, D., Hallman, J., Timper, P. (Eds). *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CAB International, Wallingford, England, p. 120-162.
- PERRY, R.N.; MOENS, M. 2011. Introduction to plant-parasitic nematodes; modes of parasitism. In: Jones, J.; Gheysen, G.; Fenoll, C. (Eds). *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions*. Springer, Dordrecht, p. 3-20.
- PERRY, R.N.; SUBBOTIN, S.A., MOENS, M. 2007. Molecular diagnostics of plant-parasitic nematodes. In: Punja, Z.; De Boer, S.H.; Sanfaçon, H. (Eds). *Biotechnology and Plant Disease Management*. CABI International, Wallingford. p.195-226.
- PINHEIRO, J.B.; PEREIRA, J.D.S. 2009. Solanáceas silvestres: potencial de uso como porta-enxertos resistentes ao nematóide-das-galhas (*Meloidogyne* ssp.). *Embrapa Hortaliças-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)*.
- PLOWRIGHT, R. A., MATIAS, D., AUNG, T., MEW, T. W. 1990. The effect of *Pratylenchus zae* on the growth and yield of upland rice. *Revue Nématologie*, 13:283-292..
- PLOWRIGHT, R.A.; COYNE, D.L.; NASH, P.; JONES, M.P. 1999. Resistance to the rice nematodes *Heterodera sacchari*, *Meloidogyne graminicola* and *M. incognita* in *Oryza glaberrima* and *O. glaberrima* × *O. sativa* interspecific hybrids. *Nematology*, 1:745–751.
- POKHAREL, R.R.; ABAWI, G.S.; DUXBURY, J.M.; SMAT, C.D.; WANG, X.; BRITO, J.A. 2010. Variability and the recognition of two races in *Meloidogyne graminicola*. *Australasian Plant Pathology*, 39(4):326-333.
- POKHAREL, R.R.; ABAWI, G.S.; ZHANG, N.; DUXBURY, J.M.; SMART, C.D. 2007. Characterization of isolates of *Meloidogyne* from rice-wheat production fields in Nepal. *Journal of Nematology*, 39(3):221-230.

- PORTILLO, M.; CABRERA, J.; LINDSEY, K.; TOPPING, J.; ANDRÉS, M.F.; EMILIOZZI, M.; RESNICK, N. 2013. Distinct and conserved transcriptomic changes during nematode induced giant cell development in tomato compared with *Arabidopsis*: a functional role for gene repression. *New Phytologist*, 197(4):1276-1290.
- POWERS, T. 2004. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. *Annual Review of Phytopathology*, 42:367–383.
- POWERS, T.O.; HARRIS, T.S. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 25:1-6.
- PRASAD, J. S., RAO, S. Y. 1978. Potentiality of *Pratylenchus indicus* the root lesion nematode as a new pest of upland rice. *Annales de Zoologie et Ecologie Animale*, 10:635-640.
- PRASAD, J.S.; VIJAYAKUMAR, C.H.M.; SANKAR, M.; VARAPRASAD, K.S.; PRASAD, M.S.; RAO, Y.K. 2006. Root-knot nematode resistance in advanced back cross populations of rice developed for water stress conditions. *Nematologia Mediterranea*, 34:3–8.
- PROT, J.C. 1994. Effects of economic and policy changes on the status of nematode rice pests in Vietnam and the Philippines. *Fundamental and Applied Nematology*, 17(3):195–198.
- PROT, J.C.; MATIAS, D.M. 1995. Effects of water regime on the distribution of *Meloidogyne graminicola* and other root-parasitic nematodes in a rice field toposequence and pathogenicity of *M. graminicola* on rice cultivar UPL R15. *Nematologica*, 41:219-228.
- 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.
- RANGEL, P.H.N.; BRONDANI, C.; FONSECA, J.R.; SILVA, S.C.; RABELO, R.R.; PEREIRA, J.A.; KAMINSKI, P.E. 2006. Mapeamento da distribuição geográfica das espécies brasileiras de *Oryza*, com vistas à conservação dos parentes silvestres e das variedades crioulas de arroz (*O. sativa* L.). In: Coradin, L. (Coord.). *Parentes silvestres das espécies de plantas cultivadas*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente.

- RANGEL, P.H.N.; BRONDANI, C.; RANGEL, P.N.; BRONDANI, R.P.V.;
ZIMMERMANN, F.J.P. 2005. Development of rice lines with gene introgression from the wild *Oryza glumaepatula* by the AB-QTL methodology. *CBAB* 5:10-21.
- RANGEL, P.N. 2008. Utilização da espécie silvestre *Oryza glumaepatula* como doadora de alelos para aumento da produção e da tolerância à seca do arroz (*Oryza sativa*) via análise de AB-QTLs. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Goiás, Goiás, Brasil.
- RIBEIRO, A.S.; SPERANDIO, G.A.D.; SELISTRE, J.F.D. 1984. Novo nematoide ataca o arroz no RS. *Revista Lavoura Arrozeira* 37:6-7.
- ROBERTS, P.A. 1995. Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 33: 199–221.
- ROBERTS, P.A. 2002. Concepts and consequences of resistance. In: Star, J.L., Cook, R., Bridge, J. (Eds.). *Plant resistance to parasitic nematodes*. CABI Publishing. Wallingford, UK. p. 23-41.
- ROBINSON, R.A. 1969. Disease resistance terminology. *Review of Applied Mycology*, 48:593-606.
- ROCHA, T.L.; MURAD, A.M.; ESPINDOLA, L.S.; FIRMINO, A.A.P.; OLIVEIRA NETO, O.B.; COUTINHO, M.V.; SILVA, M.C.M.; SÁ, M.F.G. 2007. Prospecção de moléculas de extratos vegetais do bioma cerrado para o controle de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *Meloidogyne incognita*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Documentos 228), Brasília, DF.
- ROY, A.K. 1976. Pathological effects of *Meloidogyne graminicola* on rice and histopathological studies on rice and maize. *Indian Phytopathology*, 29:359–362.
- SALALIA, R., WALIA, R. K., SOMVANSI, V. S., KUMAR, P., KUMAR, A. 2017. Morphological, morphometric, and molecular characterization of intraspecific variations within Indian populations of *Meloidogyne graminicola*. *Journal of nematology*, 49(3):254.
- SÁNCHEZ, E.; ESPINOZA, A.M. 2005. Ultrastructure of *Oryza glumaepatula*, a wild rice species endemic of tropical America. *Revista de Biología Tropical*, 53(1-2):15-22.

- SANCHO, C.; SALAZAR, L.; LOPEZ, R. 1987. Efecto de la densidad inicial del inóculo sobre la patogenicidad de *Meloidogyne salasi* en tres cultivares de arroz. *Agronomía Costarricense*, 11(2):233-238.
- SANTOS, M. F. A., CORREA, V. R., PEIXOTO, J. R., MATTOS, V. S., SILVA, J. G. P., MOITA, A. W., SALGADO, S. M. L., CASTAGNONE-SERENO, P., CARNEIRO, R. M. D. G. 2018. Genetic variability of *Meloidogyne paranaensis* populations and their aggressiveness to susceptible coffee genotypes. *Plant Pathology*, 67(1):193-201.
- 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.
- SARLA, N.; SWAMY, B.P.M. 2005. *Oryza glaberrima*: A source for the improvement of *Oryza sativa*. *Current Science*, 89:955-963.
- SASSER, J.N. 1954. Identification and host-parasite relationships of certain root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Maryland Agriculture Experiment Station Bulletin, A-77.
- 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.
- SCHAFF, J.E.; NEILSEN, D.M.; SMITH, C.P.; SCHOLL, E.H.; BIRD, D. MCK. 2007. Comprehensive transcription profiling in tomato reveals a role for glycosyltransferase in *Mi*-mediated nematode resistance. *Plant Physiology*, 144: 1079–1092.
- SCHIEBER, E.; SOSA, O.N. 1960. Nematodes on coffee in Guatemala. *Plant Disease Reporter*, 44(9) :722-723.
- SCHWANCK, A.A.; MENESES, P.R.; FARIAS, C.R.; FUNCK, G.R.; MAIA, A.H.; DEL PONTE, E.M. 2015. *Bipolaris oryzae* seed borne inoculum and brown spot epidemics

- in the subtropical lowland rice-growing region of Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 142(4): 875-885.
- SECOND, G. 1982. Origin of the genic diversity of cultivated rice (*Oryza* spp.): study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. *The Japanese Journal of Genetics*, 57:25–57.
- 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.
- SEMON, M.; NIELSEN, R.; JONES, M.; MCCOUCH, S.R. 2005. The population structure of African cultivated rice *Oryza glaberrima* (Steud.): evidence for elevated levels of LD caused by admixture with *O. sativa* and ecological adaptation. *Genetics*, 169:1639–1647.
- SHEPHERD, R.L. 1974a. Breeding root-knot resistant *Gossypium hirsutum* L. using a resistant wild *G. barbadense* L. *Crop Science*, 14:687-691.
- SHEPHERD, R.L. 1974b. Transgressive segregation for root-knot nematode resistance in cotton. *Crop Science*, 14:872-875.
- SIDDIQUI, I.A.; TAYLOR, D.P. 1970. Histopathogenesis of galls induced by *Meloidogyne naasi* in wheat roots. *Journal of Nematology*, 2(3):239-247.
- SILVA, E.H. da; MATTOS, V. da S.; FURLANETO, C.; GIBAND, M.; BARROSO, P.A.V.; MOITA, A.W.; JORGE JUNIOR, A.; CORREA, V.R.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R.M.D.G. 2014. Genetic variability and virulence of *Meloidogyne incognita* populations from Brazil to resistant cotton genotypes. *European Journal of Plant Pathology*, 139(1): 195-204.
- SKANTAR, A.M.; CARTA, L.K. 2005. Multiple displacement amplification (MDA) of total genomic DNA from *Meloidogyne* spp. and comparison to crude DNA extracts in PCR of ITS1, 28S D2-D3 rDNA and Hsp90. *Nematology*, 7(2):285-293.
- SMANT, G.; JONES, J. 2011. Suppression of plant defences by nematodes. In: Jones, J; Gheysen, G.; Fenoll, C. (Eds). *Genomics and molecular genetics of plant–nematode interactions*. Springer, Dordrecht, the Netherlands, p. 273–286.

- SOARES, M.R.C. 2017. Caracterização isoenzimática de *Meloidogyne* spp. em arroz irrigado no Noroeste do Paraná e tratamento de semente no controle do nematoide. Dissertação de Mestrado, Curso de Agronomia. Universidade Estadual de Maringá, PR. 64 p.
- SOBITA, S. AND ANAMIKA, A. 2011. Management of root knot disease in rice caused by *Meloidogyne graminicola* through nematophagous fungi. *Journal Agricultural Science*, 3:122-127.
- SORIANO, I.R.; SCHMIT, V.; BRAR, D.S.; PROT, J.C.; REVERSAT, G. 1999. Resistance to rice root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* identified in *Oryza longistaminata* and *O. glaberrima*. *Nematology*, 1:395–98.
- SORIANO, I.R.S.; REVERSAT, G. 2003. Management of *Meloidogyne graminicola* and yield of upland rice in South-Luzon, Philippines. *Nematology*, 5(6):879-884. DOI: 10.1163/ 156854103773040781.
- SOSBAI. 2018. Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado – Farroupilha, RS. 205p.
- SPERANDIO, C.A.; MONTEIRO, A.R. 1991. Ocorrência de *Meloidogyne graminicola* em arroz irrigado no Rio Grande do Sul. *Nematologia Brasileira*, 15:24.
- STANTON, J.; HUGALL, A.; MORITZ, C. 1997. Nucleotide polymorphisms and an improved PCR-based mtDNA diagnostic for pathenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Fundamental and Applied Nematology*, 20:261–268.
- STEFFEN, R.B.; ANTONIOLLI, Z.I.; KIST, G.P.; LUPATINI, M.; GOMES, C.B. 2007. Caracterização bioquímica do nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em lavouras de arroz irrigado na região central do Rio Grande do Sul. *Ciência e Natura*, 29: 37-46. <https://periodicos.ufsm.br/cienciaenatura/article/view/9746/5839>.
- SUN, L.; ZHUO, K.; LIN, B.; WANG, H.; LIAO, J. 2014. The complete mitochondrial genome of *Meloidogyne graminicola* (Tylenchina): a unique gene arrangement and its phylogenetic implications. *Plos One*, 9, e98558.
- SWEENEY, M.; MCCOUCH, S. 2007. The complex history of the domestication of rice. *Annals of Botany*, 100(5), 951-957.

- TAYLOR, A.L.; DROPKIN, V.H.; MARTIN, G.C. 1995. Perineal patterns of root-knot nematodes. *Phytopathology*, 45:26–34.
- TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Coop. Publ. Dept. Plant Pathology. North Carolina State University Graphics, Raleigh. N.C., p.111.
- THORNE, G. 1969. *Hypsoerine ottersoni* sp. n. (Nemata, Heteroderidae) infesting canary grass, *Phalaris arundinacea* (L.) reed in Wisconsin. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 36:98-102.
- THOTTAPILLY, G.; ROSSEL, H.W. 1993. Evaluation of resistance to rice yellow mottle virus in *Oryza* species. *Indian Journal of Virology*, 9:6573.
- TIGANO, M.; DE SIQUEIRA, K.; CASTAGNONE-SERENO, P.; MULET, K.; QUEIROZ, P.; DOS SANTOS, M.; CARNEIRO, R.M.D.G. 2010. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* and development of a SCAR marker for this guava-damaging species. *Plant pathology*, 59(6):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.
- TRANTAPHYLLOU, A.C. 1962. Oogenesis in the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematologica*, 7:105–113.
- TRANTAPHYLLOU, A.C. 1963. Polyploidy and parthenogenesis in the root-knot nematode *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Morphology*, 113:489–500.
- TRANTAPHYLLOU, A.C. 1966. Polyploidy and reproductive patterns in the root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. *Journal of Morphology*, 118(3):403-413.
- TRANTAPHYLLOU, A.C. 1981. Oogenesis and the chromosomes of the parthenogenetic root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 13:95–104.
- TRANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of 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, p.113–126.
- TRUDGILL, D.L. 1991. Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. *Annual Review of Phytopathology*, 29:167-192.
- TRUDGILL, D.L. 1997. Parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.); how can these biotrophic endoparasites have such an enormous host range?. *Plant Pathology*, 46(1):26-32.
- TRUDGILL, D.L.; BLOK, V.C. 2001. Apomictic, polyphagous rootknotnematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 39:53–77.
- VAN DER BEEK, J.G.; LOS, J.A.; PIJNACKER, L.R. 1998. Cytology of parthenogenesis of five *Meloidogyne* species. *Fundamental and Applied Nematology*, 21 (4):393-399.
- VAN DER EYCKEN, W.; ENGLER, J.A.; INZÉ, D.; MONTAGU, M.V.; GHEYSEN, G. 1996. A molecular study of root-knot nematode-induced feeding sites. *The Plant Journal*, 9(1):45-54.
- VANDERPLANK, J.E. 1978. Genetic and molecular basis of plant pathogenesis. Springer Verlag, Berlin. 168p.
- VAUGHAN, D. A.; GE, S.; KAGA, A.; TOMOOKA, N. 2008. Phylogeny and biogeography of the genus *Oryza*. In: Hirano, H. Y.; Hirai, A.; Sano, Y.; Sasaki, T. (Eds). *Rice biology in the genomics era*. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 219-234.
- VAUGHAN, D.A. 1994. The wild relatives of rice: a genetic resources handbook. International Rice Resource Institute.
- VAUGHAN, D.A.; MORISHIMA, H.; KADOWAKI, K. 2003. Diversity in the *Oryza* genus. *Current Opinion in Plant Molecular Biology*, 6:139–146.
- VILLAIN, L., ANZUETO, F., SARAH, J. L. 2004. Resistance to root-lesion nematodes on *Coffea canephora*. *Nematology*, 4:157-158.

- VILLAIN, L., BAULLARD, P., ANZUETO, F., HERNANDEZ, A., SARAH, J. L. 2002. Integrated protection of 146 coffee plantings in Central America against nematodes. *Plantations, Recherche, Développement: Recherche et Caféculture*, p.118-133.
- VILLAIN, L.; SALGADO, S. M. L.; TRINH, P. Q. 2018. Nematode parasites of coffee and cocoa. In: Sikora, R. A.; Coyne, D., Hallman, J., Timper, P. (Eds). *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CAB International, Wallingford, England, p. 536-583.
- WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L.A.D. 2008. Arroz: composição e características nutricionais. *Ciência Rural*, 38(4):1184-1192.
- WHITEHEAD, A.G. 1968. Taxonomy of *Meloidogyne* (Nematodea: Heteroderidae) with descriptions of four new species. *The Transactions of the Zoological Society of London*, 31(3):263-401.
- WIGGERS, R.J.; STARR, J.L.; PRICE, H.J. 1990. DNA content variation and chromosome number in plant cells affected by *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Phytopathology*, 80:1391–1395.
- WILLIAMS, C. E.; WANG, B.; HOLSTEN, T.E.; SCAMBRAY, J.; DA SILVA, F.D.A. G.; RONALD, P.C. 1996. Markers for selection of the rice Xa21 disease resistance gene. *Theoretical Applied Genetics*, 93:1119-1122.
- 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, V.M.; HUSSEY, R.S. 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *The Plant Cell*, 8:1735-1745.
- WINDHAM, G.L.; WILLIAMS, W.P. 1994. Penetration and development of *Meloidogyne incognita* in roots of resistant and susceptible corn genotypes. *Journal of Nematology*, 26:80-85.

- WISHART, J.; PHILLIPS, M.S.; BLOK, V.C. 2002. Ribosomal intergenic spacer: A polymerase chain reaction diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, and *M. hapla*. *Phytopathology*, 92:884–892.
- XIAO, J.; LI, J.; GRANDILLO, S.; AHN, S.N.; YUAN, L.; TANKSLEY, S.D.; MCCOUCH, S.R. 1998. Identification of trait-improving quantitative trait loci alleles from a wild rice relative, *Oryza rufipogon*. *Genetics*, 150(2):899-909.
- XU, J.; LIU, P.; MENG, Q.; LONG, H. 2004. Characterization of *Meloidogyne* species from China using isozyme phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. *European Journal of Plant Pathology*, 110(3):309-315.
- YIK, C.P.; BIRCHFIELD, W. 1979. Host studies and reactions of cultivars to *Meloidogyne graminicola*. *Journal of Phytopathology*, 69:497-499.
- ZHAN, L. P., ZHONG, D. I. N. G., PENG, D. L., HUAN, P. E. N. G., KONG, L. A., LIU, S. M., LIU, Y., LI, Z. C., HUAG, W. K. 2018. Evaluation of Chinese rice varieties resistant to the root-knot nematode *Meloidogyne graminicola*. *Journal of integrative agriculture*, 17(3):621-630.
- ZHANG, Q.; WANG, C.L.; SHI, A.N.; BAI, J. F.; LING, S.C.; LI, D.Y.; CHEN, C.B.; PANG, H.H. 1994. Evaluation of resistance to bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) in wild rice species. *Scientia Agricola Sinica*, 27:1-9
- ZHU, Q; GE, S. 2005. Phylogenetic relationships among A-genome species of the genus *Oryza* revealed by intron sequences of four nuclear genes. *New Phytologist*, 167:249-265.
- 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(3):283-290.
- ZIJLSTRA, C., DONKERS-VENNE, D. T., FARGETTE, M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology*, 2(8):847-853.

Capítulo 2

**TAXONOMIA INTEGRATIVA DE *Meloidogyne ottersoni*
(Thorne, 1969) Franklin, 1971 (NEMATODA: Meloidogynidae)
PARASITANDO ARROZ IRRIGADO NO BRASIL**

TAXONOMIA INTEGRATIVA DE *Meloidogyne ottersoni* (THORNE,1969) FRANKLIN, 1971 (NEMATODA: MELOIDOGYNIDAE) PARASITANDO ARROZ IRRIGADO NO BRASIL

*Manuscrito aceito para publicação no periódico European Journal of Plant Pathology em 12/05/2020.

**O primeiro relato de ocorrência de *Meloidogyne ottersoni* no Brasil foi comunicado à Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em 19/05/2020, atendendo à Instrução Normativa N° 2 do MAPA, de 02 de janeiro de 2002, através do email enviado ao Sr. Tiago Lohmann.

RESUMO

O presente estudo identificou como *Meloidogyne ottersoni* (Thorne, 1969) Franklin, 1971 uma espécie críptica de nematoide das galhas (NG) parasitando arroz (*Oryza sativa*) e causando danos e perdas de produção nos estados brasileiros de Santa Catarina (SC), Rio Grande do Sul (RS) e Paraná (PR). A espécie foi redescrita usando a população brasileira de Meleiro (Santa Catarina) e comparada com a descrição de *M. ottersoni* de Wind Lake (Wisconsin, EUA), com adição de caracterização morfológica, bioquímica e molecular. As fêmeas e os machos possuem estiletos menores: 9-13 µm, 14-16 µm, respectivamente, quando comparados com *M. graminicola*: 12-14 µm, 16-18 µm e *M. oryzae*: 14-16 µm, 18-20 µm. *Meloidogyne ottersoni* apresenta padrões perineais localizados ao redor de uma ligeira protuberância na porção terminal do corpo. As estrias são em sua maioria contínuas, nunca cortadas por estrias transversais irregulares, como frequentemente observado em *M. graminicola* e *M. oryzae*. *Meloidogyne ottersoni* pertence ao grupo 11 dos NG descrito por Jepson (1987), a reprodução é por partenogênese meiótica e o número somático de cromossomos é 18. A cauda dos juvenis de segundo estágio é muito longa e fina, e se afunila em um longo e estreito término hialino irregular (*M. ottersoni*, 20,5 µm vs. *M. graminicola*, 17,9 µm e *M. oryzae*, 22,0 µm, respectivamente). A capacidade da população brasileira de *M. ottersoni* de parasitar alpinete vermelho, *Phalaris arundinacea* (hospedeiro tipo) e capim-arroz:

Echinocloa crus-galli foi confirmada. Bioquimicamente, o perfil de esterase de *M. ottersoni* não possui banda (Est Ot0, Rm = 0), o que o diferencia de *M. graminicola* e *M. oryzae* (Est VS1, Rm=0,70 e Est O1, Rm=1,02, respectivamente). Na análise de máxima verossimilhança das sequências de ITS, D2D3 rDNA e COXII mtDNA, populações de *M. ottersoni* de diferentes estados do Brasil se agruparam e foram separadas de outras espécies de *Meloidogyne*, confirmando que todas as quatro populações são muito semelhantes e conspecíficas.

Palavras-chaves: COXII, D2D3, fenótipo de esterase, ITS, morfologia, nematoide das galhas, *Oryza*.

INTEGRATIVE TAXONOMY OF *Meloidogyne ottersoni* (THORNE, 1969) FRANKLIN
1971 (NEMATODA: MELOIDOGYNIDAE) PARASITIZING IRRIGATED RICE IN
BRAZIL

ABSTRACT

An atypical root-knot nematode species (RKN) parasitizing and causing damage to rice (*Oryza sativa*) in Santa Catarina (SC), Rio Grande do Sul (RS) and Paraná (PR) states (Brazil) was identified as *Meloidogyne ottersoni* (Thorne, 1969) Franklin, 1971 a cryptic root-knot nematode (RKN) species. The species was redescribed from specimens collected in Brazilian rice field (Meleiro-SC) and compared with the original description of *M. ottersoni* (Wind Lake, WI, USA) with additional morphological, biochemical and molecular data. The female and male bear smaller stylets: 9-13 μm , 14-16 μm , respectively, when compared with *M. graminicola*: 12-14 μm , 16-18 μm , and *M. oryzae*: 14-16 μm , 18-20 μm . *Meloidogyne ottersoni* presents perineal patterns located on the contour of a slight protuberance at the body end. Striae are mostly continuous, never raised by transverse irregular striae, as frequently

observed in *M. graminicola* and *M. oryzae*. *Meloidogyne ottersoni* belongs to the RKN group 11 described by Jepson (1987), its reproduction by meiotic parthenogenesis, with n=18 somatic chromosomes. The tail of second-stage juveniles is very long and thin, and tapers to a long, narrow, irregular hyaline terminus (*M. ottersoni*, 20.5 µm vs. *M. graminicola*, 17.9 µm and *M. oryzae*, 22.0 µm, respectively). *Meloidogyne ottersoni* from Brazil was able to parasitize canary grass, *Phalaris arundinacea* (type host) and barnyard grass: *Echinochloa crus-galli*. Biochemically, the esterase profile of *M. ottersoni* lacks any band (Est Ot0, Rm=0), which differentiates it from *M. graminicola* and *M. oryzae* (Est VS1, Rm=0.70 and Est O1, Rm=1.02, respectively). In Maximum Likelihood analysis of ITS, D2D3 rDNA and COXII mtDNA sequences, populations of *M. ottersoni* from southern Brazil grouped in the same clade and were clearly separated from other *Meloidogyne* spp., thus confirming that all four populations are very similar and conspecific.

Keywords: COXII, D2D3, esterase phenotyping, ITS, morphology, *Oryza*, root-knot nematode.

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo cereal mais produzido no mundo, logo após o milho e o trigo, e desempenha papel fundamental na segurança alimentar atual e futura em todo o mundo. Fora da Ásia, o Brasil é o maior produtor de arroz (Chauhan *et al.*, 2017), sendo os estados do sul responsáveis por mais de 80% de toda a produção nacional, com predominância de arroz irrigado (Conab, 2018).

Vários fatores podem interferir no rendimento da cultura de arroz, incluindo nematoides. Cerca de 35 gêneros de nematoides foram observados parasitando plantas de arroz, mas poucas espécies foram descritas como capazes de causar danos significativos (Khan, 2015). Em particular, o sistema de arroz irrigado determina a comunidade de nematoides fitoparasitas, selecionando os mais adaptados, e vários autores relataram a predominância de *Meloidogyne graminicola* Golden & Birchfield, 1965 nesse sistema de cultivo (De Waele & Elsen, 2007; Khan, 2015).

Todas as populações do complexo de espécies de *Meloidogyne* detectadas em plantios de arroz no Brasil (Mattos *et al.*, 2017) pertencem ao 'grupo *graminis*' que inclui algumas espécies com características semelhantes: fêmeas profundamente fixadas nas raízes do hospedeiro e corpo alongado com diferentes formas, vulva situada em protuberância posterior, juvenis de segundo estágio com a parte hialina da cauda muito fina e longa, partenogênese meiótica como o modo de reprodução, sendo comum a presença de machos (Jepson, 1987). Uma pesquisa recente no Brasil detectou *M. graminicola* e outras populações de *Meloidogyne* com fenótipos de esterase atípicos em campos de arroz irrigados nos estados do Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e Paraná (PR), causando danos (Negretti *et al.*, 2017; Mattos *et al.*, 2017). Nesses estudos, as análises enzimáticas e moleculares revelaram a existência de um 'complexo de espécies' parasitando o arroz na região sul do Brasil. Dessa maneira, em 2018 foi identificada uma das espécies crípticas proveniente do estado de SC, Brasil. Essa

espécie foi redescrita a partir de uma população brasileira e comparada com a descrição da espécie tipo de *M. oryzae* do Suriname, com caracterização morfológica, bioquímica e molecular (Mattos *et al.*, 2018).

Na pesquisa realizada por Mattos *et al.* (2017), outra espécie críptica denominada provisoriamente de *Meloidogyne* sp.0, foi detectada e caracterizou-se pela ausência de bandas de esterase, provavelmente devido a fraca concentração da enzima. Nesse mesmo trabalho, essa espécie foi detectada em quatro municípios de três estados do sul do Brasil: Capão do Leão (RS), Meleiro (SC), Nova Veneza (SC) e Santa Cruz de Monte Castelo (PR) (Mattos *et al.*, 2017). A identificação de espécies crípticas de *Meloidogyne* não é uma tarefa fácil, considerando o grande número de espécies pertencentes ao gênero, sua distribuição mundial e sua ampla gama de hospedeiros. A semelhança morfológica entre as espécies também é um fator que dificulta a identificação, pois as diferenças interespecíficas e intraespecíficas são muito sutis (Jepson, 1987; Karssen & Moens, 2006; Moens *et al.*, 2009). Por outro lado, métodos moleculares têm contribuído para o sucesso na identificação de espécies de *Meloidogyne*. Em particular, para *M. graminicola*, sequências de DNA ribossômico nuclear (rDNA) e mitocondrial (mtDNA) têm sido amplamente aplicadas (Pokharel *et al.*, 2007, 2010; McClure *et al.*, 2012; Bellafiore *et al.*, 2015; Htay *et al.*, 2016) para diagnosticar essa espécie. Recentemente, dois marcadores SCAR foram propostos para diagnose de *M. graminicola* (Bellafiore *et al.*, 2015; Mattos *et al.*, 2019) e também para *M. oryzae* e *M. salasi* Lopez, 1984 (Mattos *et al.*, 2019).

Considerando a frequente ocorrência da espécie críptica *Meloidogyne* sp.0 em Santa Catarina (Mattos *et al.*, 2017), em condições de campo, foi objetivo deste estudo identificar e caracterizar essa espécie desconhecida usando uma abordagem taxonômica integrativa, com base nas diferenças morfológicas, morfométricas, citogenética e moleculares em comparação com outras espécies de *Meloidogyne* do 'grupo *graminis*'. Dessa maneira, identificou-se

Meloidogyne sp.0 como *M. ottersoni* (Thorne, 1969) Franklin, 1971, sendo relatada sua primeira ocorrência no Brasil, em arroz irrigado na região sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Populações do nematoide

Quatro populações puras de NG exibindo fenótipo de esterase sem banda (*Meloidogyne* sp.0, Rm = 0) coletadas em arrozais dos estados do RS e SC foram multiplicadas em plantas de arroz, *O. sativa* (IRGA-410 e IRGA-424), em casa de vegetação, com temperatura média diária de 15 a 28 °C. Todos os estudos bioquímicos e moleculares foram realizados usando essas quatro culturas puras (Tabela 1). Estudos morfológicos, morfométricos, citogenéticos e os ensaios em casa-de-vegetação foram realizados com a população de Meleiro, SC. Massas de ovos e fêmeas foram obtidas diretamente das raízes de arroz infectadas. Os juvenis do segundo estágio (J2) foram eclodidos em funil de Baerman adaptado (Baerman, 1917). Os machos foram obtidos colocando-se as raízes de arroz infectadas em água sob aeração usando uma bomba de aquário. Os espécimes foram coletados periodicamente da água (a cada 24 horas para J2 e 48 horas para machos) (Carneiro *et al.*, 1998).

Tabela 1: Isolados de *Meloidogyne ottersoni* estudados neste trabalho.

Código ^a	Espécie	Origem Município-Estado ^b	Fenótipos de Isoenzimas (Est) ^c	Número de Acesso no GenBank ^d		
				ITS	D2D3	COXII
Ot1	<i>M. ottersoni</i>	Capão do Leão-RS	Ot0	MN563096	MN578129	MN585719
Ot 2	<i>M. ottersoni</i>	Nova Veneza-SC	Ot0	MN563095	MN578130	MN585718
Ot 3	<i>M. ottersoni</i>	Nova Veneza-SC	Ot0	MN563094	MN578131	MN585717
Ot 4*	<i>M. ottersoni</i>	Meleiro-SC	Ot0	MN563093	MN578132	MN585716

^a Código de populações usado no estudo.

^b Estados brasileiros: RS = Rio Grande do Sul e SC = Santa Catarina.

^c Est: fenótipo de esterase.

^d Números de acessos do GenBank para os fragmentos D2-D3 do 28S rRNA, ITS1-5.8S-ITS2 rRNA, COXII mtDNA clonados em nosso laboratório e usados para alinhamento e análise filogenética.

* População utilizada nos estudos morfológicos e citogenéticos.

Estudos morfológicos e morfométricos

Estudos morfológicos e morfométricos foram realizados com um mínimo de 30 espécimes de cada estágio de desenvolvimento. Machos e J2 foram mortos em formaldeído a 2% gelado (5 °C), medidos e fotografados imediatamente ao microscópio óptico. Os estudos morfométricos foram realizados utilizando as medições recomendadas por Eisenback & Hunt (2009). Os estudos biométricos foram realizados com fêmeas adultas, cortadas em ácido láctico a 45% e a região cefálica montada com formaldeído a 2% à temperatura ambiente. Os cortes perineais foram montados em glicerina (Taylor & Netscher, 1974). As micrografias e medidas foram realizadas em microscópio Zeiss - Axiophot sob luz branca. Fêmeas, machos, J2 e os estiletos (de fêmeas e machos) foram preparados para microscopia eletrônica de varredura

(MEV) de acordo com os métodos propostos por Eisenback (1985). As amostras foram visualizadas e fotografadas com um microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM-7001F.

Estudos bioquímicos e citogenéticos

A caracterização bioquímica das quatro populações de NG foi realizada por isoenzimas em gel de poliacrilamida a 7% em sistema de eletroforese horizontal, de acordo com Carneiro & Almeida (2001). *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 (EST J3, MDH N1) foi usado como referência. Ambas enzimas, esterase (EST) e malato desidrogenase (MDH) foram utilizadas. Os estudos citogenéticos foram realizados usando o método de coloração com orceína propiônica (Triantaphyllou, 1985).

Teste na hospedeira tipo

Com o objetivo de verificar a hospedabilidade de alpine vermelho (*Phalaris arundinacea* L.) a *Meloidogyne* sp. 0, sementes desta planta obtidas da Cobase – Embrapa Cenargen, foram germinadas em vasos de 3 l. Mudanças de 5 cm de comprimento foram inoculadas com 5.000 ovos de *Meloidogyne* sp.0 e mantidas em casa de vegetação a uma temperatura média de 15 e 25 °C, com irrigação e adubação, conforme necessário. Cinquenta dias após a inoculação (DAI), as raízes foram lavadas cuidadosamente com água corrente, coradas com fucsina ácida (Byrd *et al.*, 1983) e observadas em microscópio estereoscópico para documentar a penetração de J2, o desenvolvimento de fêmeas e postura de ovos dentro das raízes.

Hospedabilidade de outras plantas

Para verificar a reprodução de *Meloidogyne* sp.0 em outras plantas: milho, trigo, milheto, braquiária, feijão caupi, aveia branca, aveia preta, cevada, azevém italiano, soja, capim-mombaça, capim-arroz, arroz de selva, alpine vermelho, tomate e a cultivar de arroz

IRGA 424 como controle positivo. As sementes foram germinadas em vasos de 3 litros. Todas as plantas (5/tratamento) foram inoculadas com 10.000 ovos de *Meloidogyne* sp.0 e mantidas em casa de vegetação por 60 dias, à temperatura média diária de 25 a 30 °C, com irrigação e adubação, conforme necessário. Após o período de multiplicação dos nematoides, os sistemas radiculares foram enxaguados em água corrente, pesados e os ovos dos nematoides extraídos usando 1% de NaClO de acordo com metodologia de Hussey & Barker (1973), usando liquidificador por 30 segundos. O número total de ovos por planta foi determinado sob microscópio ótico em lâmina de Peter.

O fator de reprodução (FR) foi calculado a partir da equação: $FR = \text{população final de nematoides} / \text{população inicial (10.000 ovos/planta)}$ (Ostenbrink, 1966). As médias do número total de ovos, ovos/g de raiz e FR foram transformados para $\log(x+1)$ e submetidas a análise de variância. As médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knot ($P < 0,05$). As espécies botânicas foram classificadas como não-hospedeiras quando o $FR < 1$ e para demais classificações considerou-se análise estatística onde má-hospedeira é quando o $FR > 1$ e $FR < 10\%$ do FR de *O. sativa* (padrão suscetível) e hospedeira quando o $FR > 10\%$ do FR de padrão.

Análise filogenética

Para as análises filogenéticas, duas sequências de rDNA e uma de mtDNA das quatro populações de *Meloidogyne* sp.0 de arroz, originárias do Brasil foram amplificadas pela região ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA (conjunto de primers: forward 5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3' e reverse 5'-TCCTCCGCTAAATGATATG-3'; Schmitz *et al.*, 1998); o fragmento D2-D3 do gene 28S rRNA (conjunto de primers: forward 5'-ACAAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3' e reverse 5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'; De Ley *et al.*, 1999); e a porção 3' de COXII e a 5' de 16S rRNA da região mitocondrial de 16S rRNA (conjunto de primers: forward 5'-GGTCAATGTTTCAGAAATTTGGG-3' e reverse

5'-TACCTTTGACCAATCACGCT-3'; Powers & Harris, 1993), usando as condições de PCR descritas por Subbotin *et al.* (2000) Os produtos de PCR foram purificados usando o kit Wizard® SV Gel / PCR (Promega) e clonados no pGem-T® Easy Vector (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Dois fragmentos independentes foram clonados e sequenciados pela Macrogen, Coreia do Sul.

As sequências clonadas foram alinhadas usando o ClustalW no Mega 5.0.3 (Tamura *et al.*, 2011) e comparadas com outras sequências recuperadas do banco de dados NCBI. O programa MrModeltest (Nylander, 2004) implementado no PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony; v.4.0 b10) foi usado para identificar os melhores modelos de cada análise. As árvores filogenéticas foram geradas com base na análise de máxima verossimilhança (ML) em IQtree (Trifinopoulos *et al.*, 2016). A confiabilidade dos nós da árvore filogenética foi checada via bootstrap com 1.000 simulações e apenas valores de suporte acima de 50% foram considerados.

RESULTADOS

Sintomas em plantas de arroz e alpiste vermelho

A infecção causada por *Meloidogyne* sp.0 em arroz levou a formação de uma galha alongada e arqueada e, em seguida, se desenvolveram uma série de galhas semelhantes, contendo algumas fêmeas completamente fixadas no interior da raiz, onde os ovos foram depositados. Massas de ovos foram encontradas no interior da raiz ou no exterior das galhas. Os machos foram frequentes e geralmente encontrados nas raízes com as fêmeas e os J2. A população de *Meloidogyne* sp.0 de Meleiro-SC também se reproduziu em alpiste vermelho, *P. arundinacea* (hospedeiro tipo), exibindo os mesmos sintomas observados em arroz, mostrando J2 dentro das raízes e fêmeas com massa de ovos aos 50 dias após a inoculação (Fig. 1).

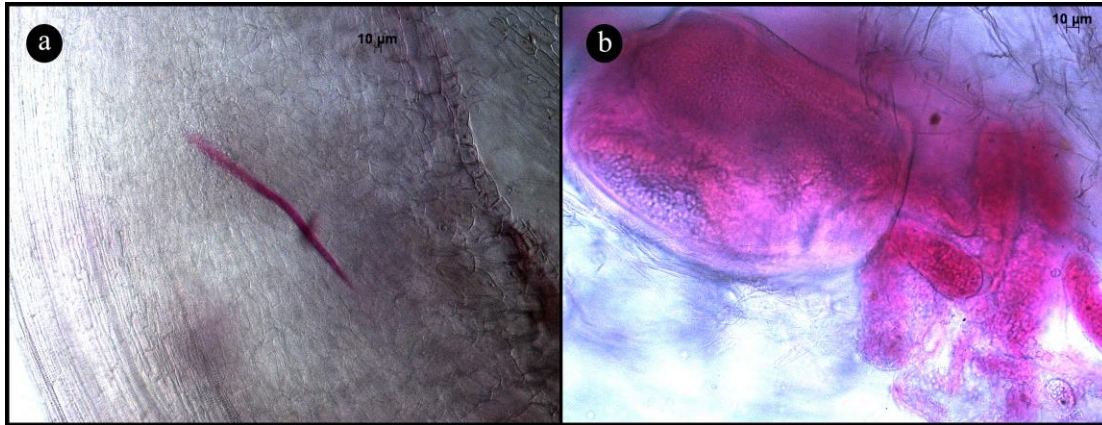


Figura 1. Micrografia ótica de *Meloidogyne ottersoni* parasitando alpiste vermelho (*Phalaris arundinacea*), 50 dias após a inoculação com 5.000 ovos. a: juvenis de segundo estágio dentro da raiz; b: fêmeas e ovos dentro da raiz.

Estudos morfológicos e morfométricos

Fêmeas. As medidas de 30 fêmeas são apresentadas na Tabela 2. O corpo é variável em forma e tamanho (668,9 µm, variando entre 410-960 µm), geralmente em formato oval, de pera ou alongada, branco translúcido, comprimento de pescoço variável (92,2 µm, variando 78-118 µm) projetando-se em diferentes ângulos, região vulvar e ânus geralmente com protuberância leve (Fig. 2 a, b), embora as vezes essa elevação não esteja presente. Padrões perineais arredondados/ovais dorsoventralmente, com estrias predominantemente contínuas e sem marcas de linhas laterais (Fig. 2 a-f), estrias grossas, arco dorsal baixo e arredondado. Região perivulvar geralmente livre de estrias e nenhuma estria acima do ânus. Nenhuma pontuação observada. Término da cauda e campos laterais não claramente definidos e fasmídeos distintos. Região ventral arredondada. Poro excretor localizado a dois estiletos de distância ou menos abaixo da extremidade da região cefálica (26,88 µm) (Fig. 3 a, f). Ao MEV (Fig. 3 b, c), disco labial fundido com os lábios medianos, formando uma região cefálica contínua. Lábios laterais distintos e triangulares. Anfídeos levemente ovais, localizados sobre os lábios laterais, as vezes contínuos com o primeiro anel claramente demarcado (Fig. 3 b, c). Estilete robusto (11,4 µm, 9-13 µm), cone reto ou ligeiramente curvado dorsalmente e aumentando gradualmente o diâmetro na parte posterior. A haste se

alarga gradualmente na parte posterior próximo a junção com os bulbos do estilete, que são arredondados e destacados da haste (Fig. 3 d, e). O orifício da glândula dorsal (DGO) está 4,4 μm (3-6 μm) da base do estilete.

Tabela 2. Dados morfométricos de fêmeas, machos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne ottersoni* do Brasil. Todas as medidas estão em μm ; média \pm , desvio padrão, valor mínimo e máximo entre parênteses, coeficiente de variação em %.

Característica	Fêmea	Macho	J2
N	30	30	30
Comprimento do corpo (L)	668,9 \pm 134,77 (410-960) 20,15	1188,62 \pm 195,90 (760-1430) 16,48	474,20 \pm 45,66 (400-550) 9,63
Diâmetro do corpo	503,06 \pm 95,22 (230-700) 21,70	43,76 \pm 7,20 (30-60) 16,45	19,94 \pm 0,36 (19-21) 1,80
Comprimento do pescoço	92,23 \pm 9,67 (78-118) 10,48	-	-
Comprimento / Diam. (a)	1,35 \pm 0,21 (0,95-1,78) 15,42	27,81 \pm 6,21 (15,33-42,33) 22,32	23,83 \pm 2,27 (20,5-27,9) 9,51
Comprimento do corpo / comprimento da cauda (c)	-	129,97 \pm 31,82 (66,67-197,14) 24,48	6,94 \pm 0,70 (5,71-8,33) 10,15
Comprimento do estilete	11,40 \pm 1,37 (9-13) 12,03	15,91 \pm 1,41 (13-19) 8,89	10,74 \pm 0,93 (9-13) 8,66
Altura do bulbo do estilete	2,1 \pm 0,28 (2-3) 13,48	2,4 \pm 0,49 (2-3) 20,40	1,82 \pm 0,38 (1-2) 20,71
Largura do bulbo do estilete	3,43 \pm 0,50 (3-4) 14,70	4,17 \pm 0,66 (3-5) 15,78	2,24 \pm 0,43 (2-3) 18,99
DEGO	4,36 \pm 0,78 (3-6) 17,90	4,38 \pm 0,78 (3-6) 17,70	3,87 \pm 0,88 (2-5) 22,86
Distância do poro excretor à extremidade anterior	26,88 \pm 3,17 (21-32) 11,78	92,55 \pm 13,88 (51-114) 15,00	73,19 \pm 5,19 (63-80) 7,09
Fenda da vulva	24,07 \pm 1,62 (21-28) 6,71	-	-
Distância vulva - ânus	16,96 \pm 1,81 (15-20) 10,66	-	-
Distância interfasmídeos	17,09 \pm 3,32		

	(12-24) 19,44	-	-
Comprimento da cauda	-	9,45 ±1,82 (7-14) 19,31	69,04 ±3,3 (62-76) 4,78
Região hialina da cauda	-	-	20,52 ±2,42 (15-26) 11,79
Comprimento do espículo	-	25,41 ±3,94 (16-30) 15,52	-
Gubernáculo	-	7,1 ±1,0 (5-9) 14,03	-

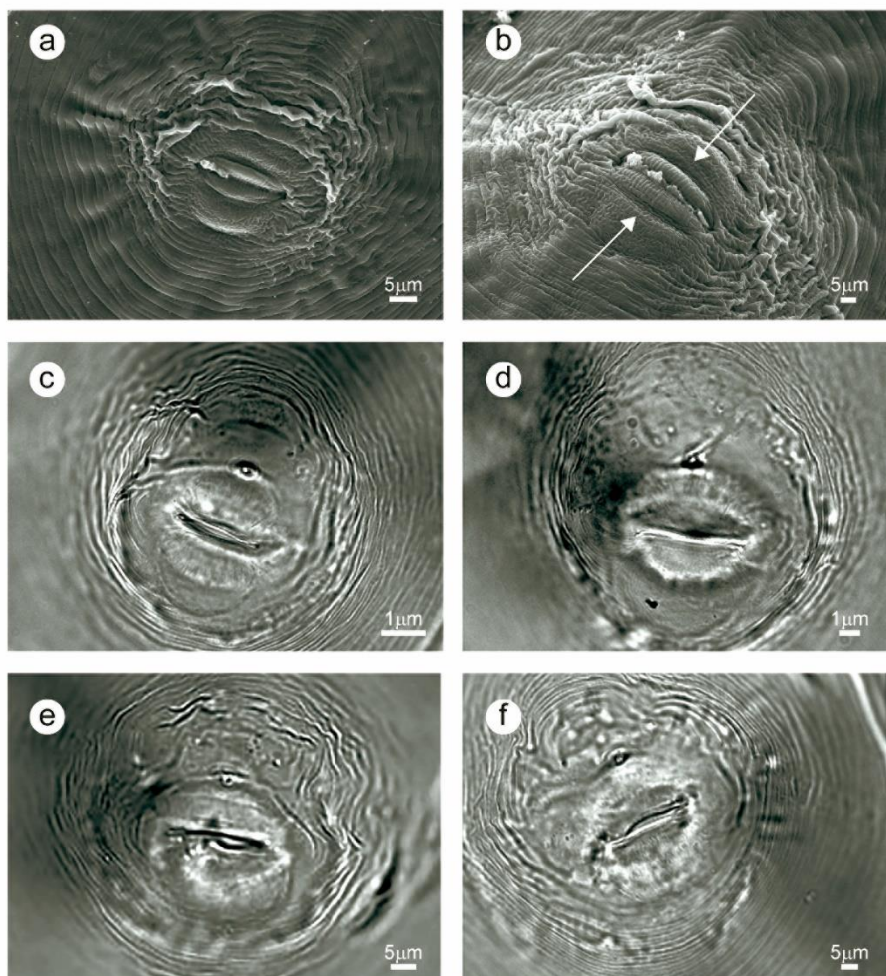


Figura 2. Micrografias óticas (MO) e eletrônicas (MEV) de padrões perineais de fêmeas de *Meloidogyne ottersoni*. a, b: Micrografia eletrônica de varredura (MEV); c-f: Micrografia ótica. Setas mostrando ligeira protuberância da região vulvar.

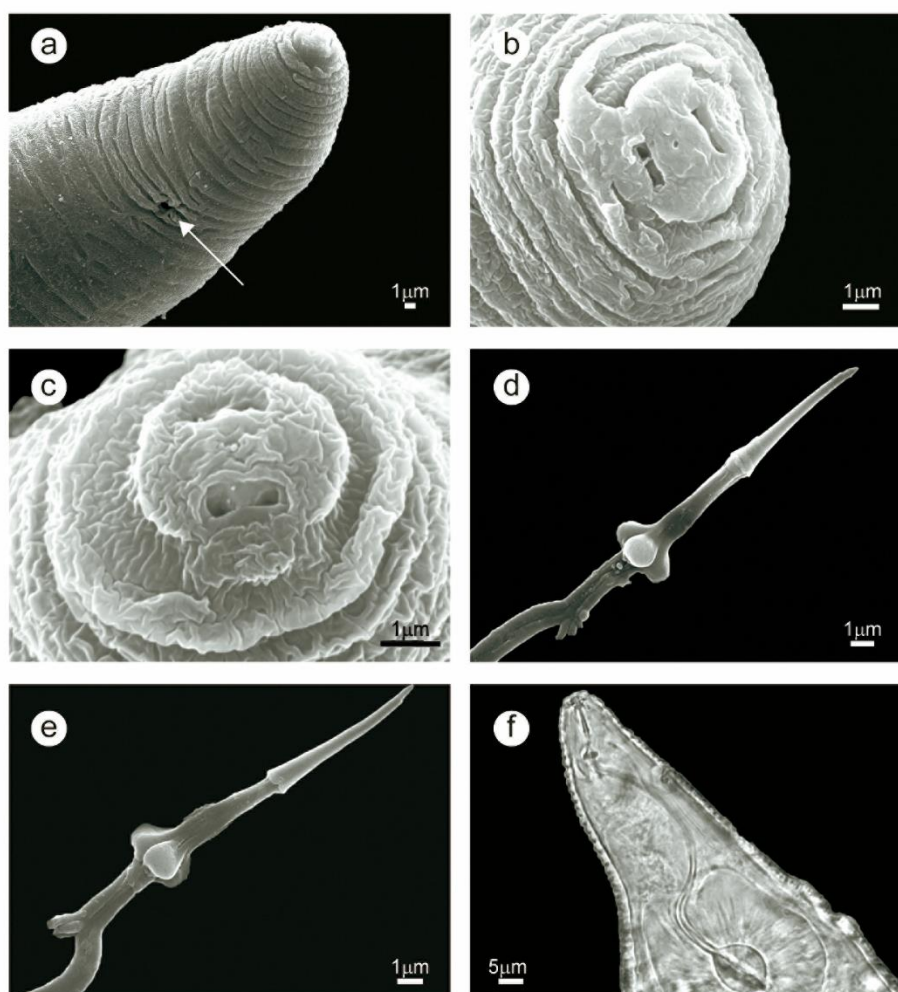


Figura 3. Micrografias óticas (MO) e eletrônicas (ME) de fêmeas de *Meloidogyne ottersoni*. a-e: Micrografia eletrônica de varredura (MEV) da região anterior (a-c) e estiletes (d, e). Micrografia ótica (MO) da região anterior (f). Seta mostrando o poro excretor da fêmea.

Machos. As medidas de 30 machos são mostradas na Tabela 2. Corpo vermiforme, de tamanho variável (1.188,6 μm , variando entre 760-1.430 μm), afinando na região cefálica, forma da cauda variável, às vezes com uma expansão (Fig. 4 f), geralmente com uma torção em um ângulo de 90°. As anulações cuticulares são grosseiras (Fig. 4 a-c). Região cefálica alta, arredondada, em forma de cúpula; região cefálica distinta do primeiro anel do corpo, sem (Fig. 4 a, d) ou com algumas anelações fracas (Fig. 4 b, c) ao MEV. Disco labial e lábios medianos fundidos formando uma região cefálica suave e contínua (Fig. 4 a-d). Disco labial

ligeiramente elevado acima dos lábios medianos. Lábios laterais marcados ou não na região anterior (Fig. 4 a-d). Aberturas anfidiais formando fendas alongadas (Fig. 4 a-d). Estilete robusto (15,9 μm , variando entre 13-19 μm), cone apontado para a ponta, alargando na junção com a haste, que é cilíndrica. Bulbos do estilete de formato redondos a oval, inclinados para trás (Fig. 4 h, i). Canal excretor proeminente com torção irregularmente visível até o final da projeção da glândula. A distância do orifício da glândula dorsal até a base do estilete (DEGO) é de 4,4 μm (3-6 μm). Campo lateral variável, composto de diferentes formas e números de incisuras (4-7). Espículos e gubernáculo arqueados, fasmídeos quase terminais.

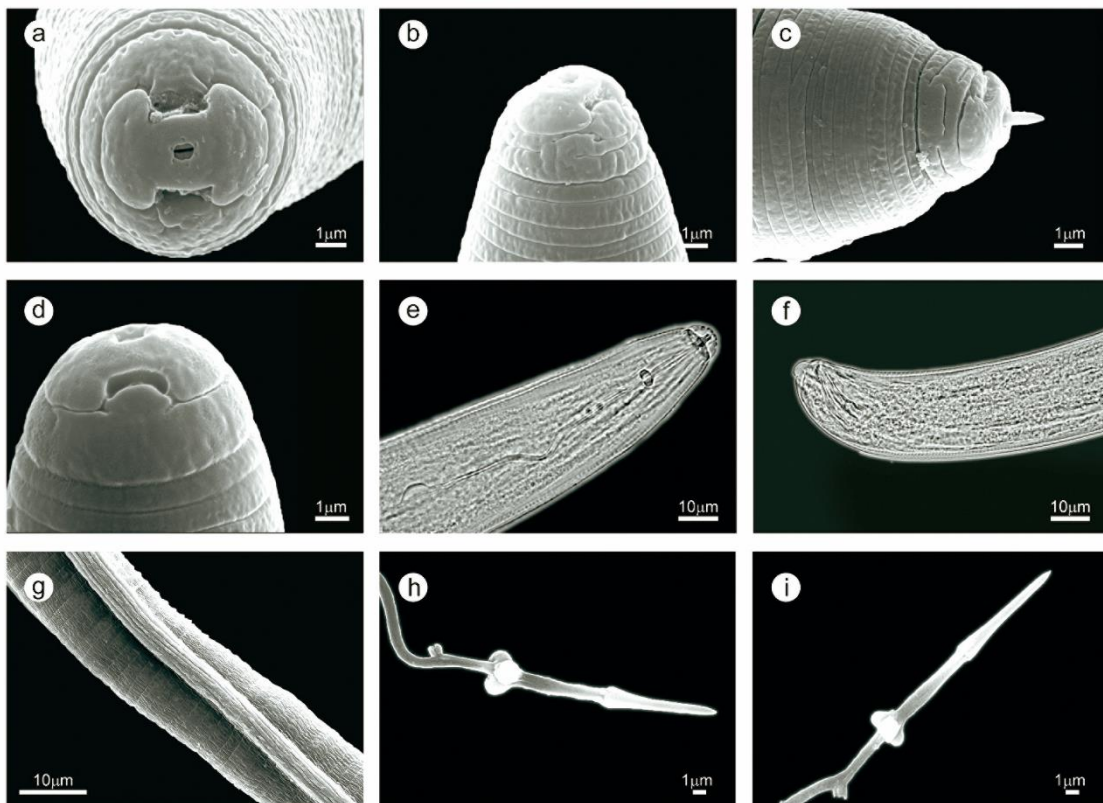


Figura 4. Micrografias óticas (MO) e eletrônicas (MEV) de machos de *Meloidogyne ottersoni*. a-d: Micrografia eletrônica de varredura (MEV) da região anterior. e, f: Micrografia ótica (MO) da região anterior (e) cauda final (f). g: Micrografia em MEV dos campos laterais; h, i: Fotografia em MEV de estiletos excisados.

Juvenis de segundo estágio (J2). As medidas de 30 J2 são apresentadas na Tabela 2. Corpo cilíndrico e vermiforme afinando para uma cauda alongada. Cabeça com estruturas cefálicas delicadas não destacadas do corpo e sem anulações labiais (Fig. 5 a, b). Estilete delicado (10,7 μm , 9-13 μm), bulbos do estilete arredondados. Orifício da glândula dorsal até a base do estilete (3,7 μm , 2-5 μm). Metacorpo amplamente oval, válvula grande e fortemente esclerotizada (Fig. 5 c). Poro excretor abaixo do anel nervoso. Abertura anal não bem determinada. No MEV, o disco labial e os lábios mediais se fundiram formando uma região cefálica lisa e contínua, em forma de gravata de borboleta. Seis sensilas deprimidas cercaram o pré-estoma (Fig. 5 a, b). Aberturas da glândula anfídial grandes como fendas. Lábios laterais alongados (Fig. 5 a, b). Poro excretor imediatamente posterior ao hemizonídeo. Campos laterais variáveis geralmente com 4 incisuras. Reto não inflado. Cauda conoide alongada (69,2 μm , 62-76 μm). Região hialina da cauda longa, geralmente sem anelção regular (20,5 μm , 15-26 μm), constrição em um, dois ou três pontos da cauda, afinando-se para uma ponta digitiforme terminal e delgada (Fig. 5 e-i).

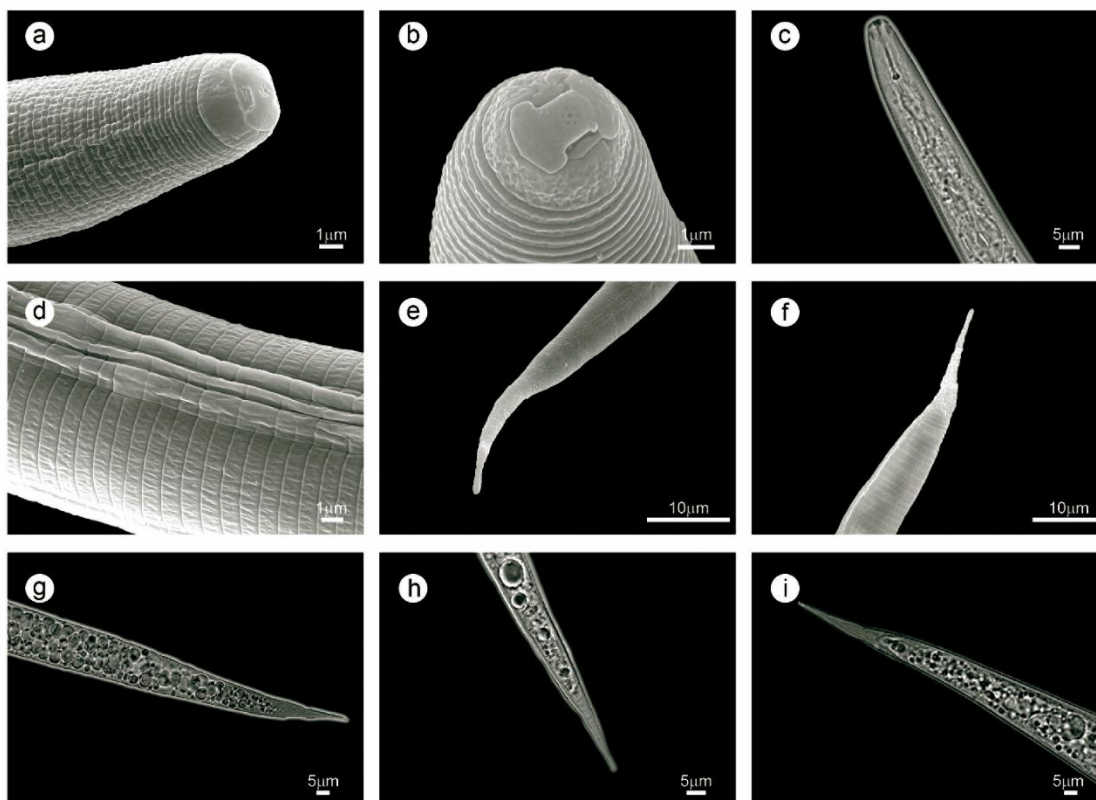


Figura 5. Micrografias óticas (MO) e eletrônicas (MEV) de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne ottersoni*. a, b: Micrografia eletrônica de varredura (MEV) da região anterior. c: Micrografia ótica (MO) da região anterior; d: Micrografia ao MEV dos campos laterais; e, f: Micrografia ao MEV das caudas nas vistas lateral e ventral, g-i: Micrografia em MO das caudas nas vistas ventral e lateral.

Estudos bioquímicos e citológicos

As análises enzimáticas revelaram a ausência de banda de esterase ($R_m = 0$) para as quatro populações de *M. ottersoni* (= *Meloidogyne* sp.0). Essa observação foi reforçada usando o macerado de mais de 20 fêmeas em cada análise individual (Fig. 6). Para a enzima Mdh, o fenótipo obtido foi N1a ($R_m: 1,4$), o mesmo das espécies *M. graminicola*, *M. oryzae* e *M. naasi* (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985). A reprodução de *Meloidogyne* sp.0 é por partenogênese meiótica e o número de cromossomos somáticos é 18 (Fig. 7).

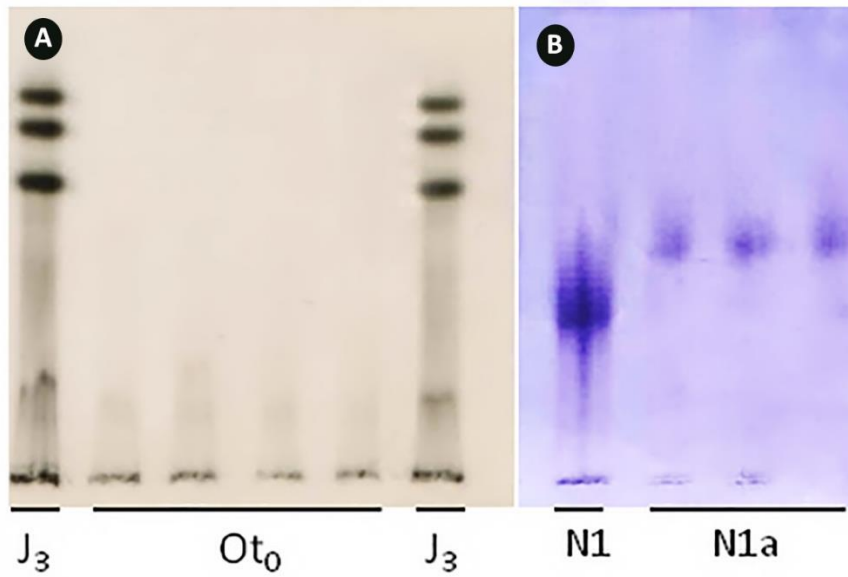


Figura 6. Fenótipos de esterase (a) e malato desidrogenase (b) de *Meloidogyne ottersoni* (Ot0, N1A). *Meloidogyne javanica* (J3, N1) foi utilizado como referência.



Figura 7. Micrografia ótica dos cromossomos de *Meloidogyne ottersoni* corados com orceína (seta).

Análises moleculares

Análises filogenéticas foram conduzidas para validar os resultados obtidos com abordagens morfológicas e enzimáticas, através de comparação de sequências ITS1-5.8S-ITS2 rRNA, região D2-D3 28S do rRNA e a sequência parcial da região mitocondrial entre os genes COXII e 16S rRNA das populações de *Meloidogyne* sp.0 com sequências homólogas de outras espécies de *Meloidogyne* obtidas do GenBank. As árvores individuais de máxima verossimilhança (ML) obtidas para todas as sequências foram semelhantes e mostraram que os quatro isolados de *M. ottersoni* (= *Meloidogyne* sp.0) do Brasil foram agrupados em um único cluster (com valores de 99-100% de bootstrap), como mostram as Figuras 8, 9 e 10, sugerindo fortemente que eles pertencem à mesma espécie.

Foi observada variabilidade intraespecífica entre as quatro populações de *Meloidogyne* sp.0, de 1 a 4 nucleotídeos (em um total de 755 nucleotídeos) para sequências ITS e cerca de 11-16 nucleotídeos (em 743 nucleotídeos) para D2D3. A população do RS (Ot1) parece ser geneticamente diferente das demais de SC (Ot2, Ot3 e Ot4). A região mitocondrial COXII-16S rRNA das populações de *Meloidogyne* sp.0 também mostrou baixa variabilidade intraespecífica; isto é, 1–2 nucleotídeos em 522. No entanto, esta região contém uma sequência intergênica variável que separa claramente as populações de *Meloidogyne* sp.0 de outras espécies relacionadas de nematoide das galhas do arroz.

Meloidogyne ottersoni está intimamente relacionada a espécies meióticas como *M. graminicola*, *M. salasi*, *M. naasi* Franklin, 1965, *M. trifoliophila* Bernard & Eisenback, 1997 e outras espécies pertencentes ao grupo 11 segundo classificação de Jepson (1987). Por outro lado, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. minor* Karssen, Bolk, van Aelst, van den Beld, Kox, Korthals, Molendijk, Zijlstra, van Hoof & Cook, 2004 estão geneticamente distantes dessa espécie, como demonstrado nas árvores filogenéticas geradas. *Meloidogyne oryzae* esteve intimamente relacionado a *M. ottersoni* nas árvores D2D3 e COXII de máxima

verossimilhança (MV). No entanto, na análise ITS, esta espécie apareceu próxima a espécies partenogenéticas obrigatórias mitóticas, como *M. incognita* e *M. javanica* (Fig. 8).

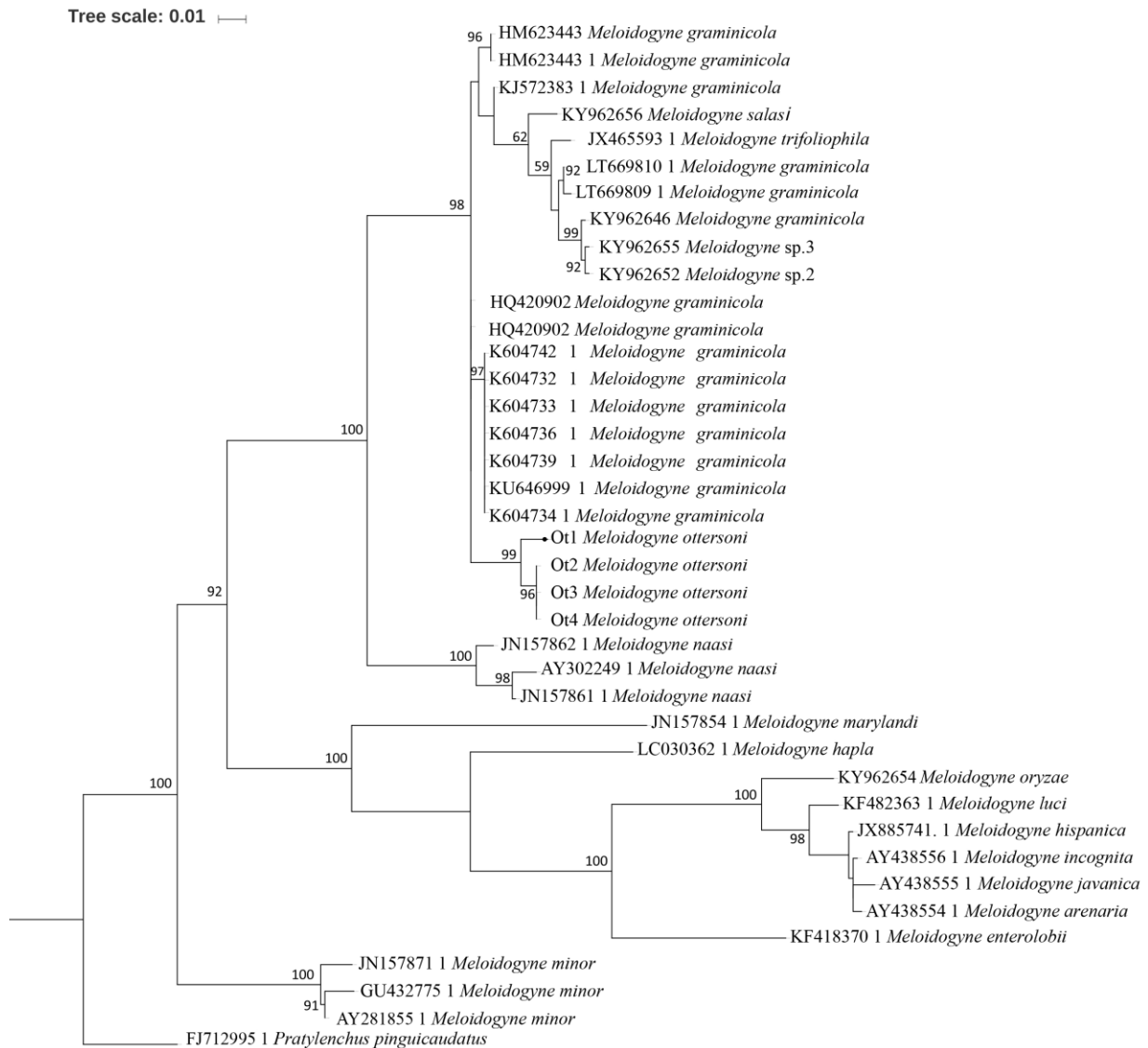


Figura 8. Análise de máxima verossimilhança (MV) das relações filogenéticas de *Meloidogyne ottersoni* (= *Meloidogyne* sp0) e outras populações de *Meloidogyne* spp. baseadas na sequência ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA. Números a esquerda dos braços são os valores de bootstrap de 1000 réplicas. Números de acesso do GenBank estão listados antes dos nomes das espécies.

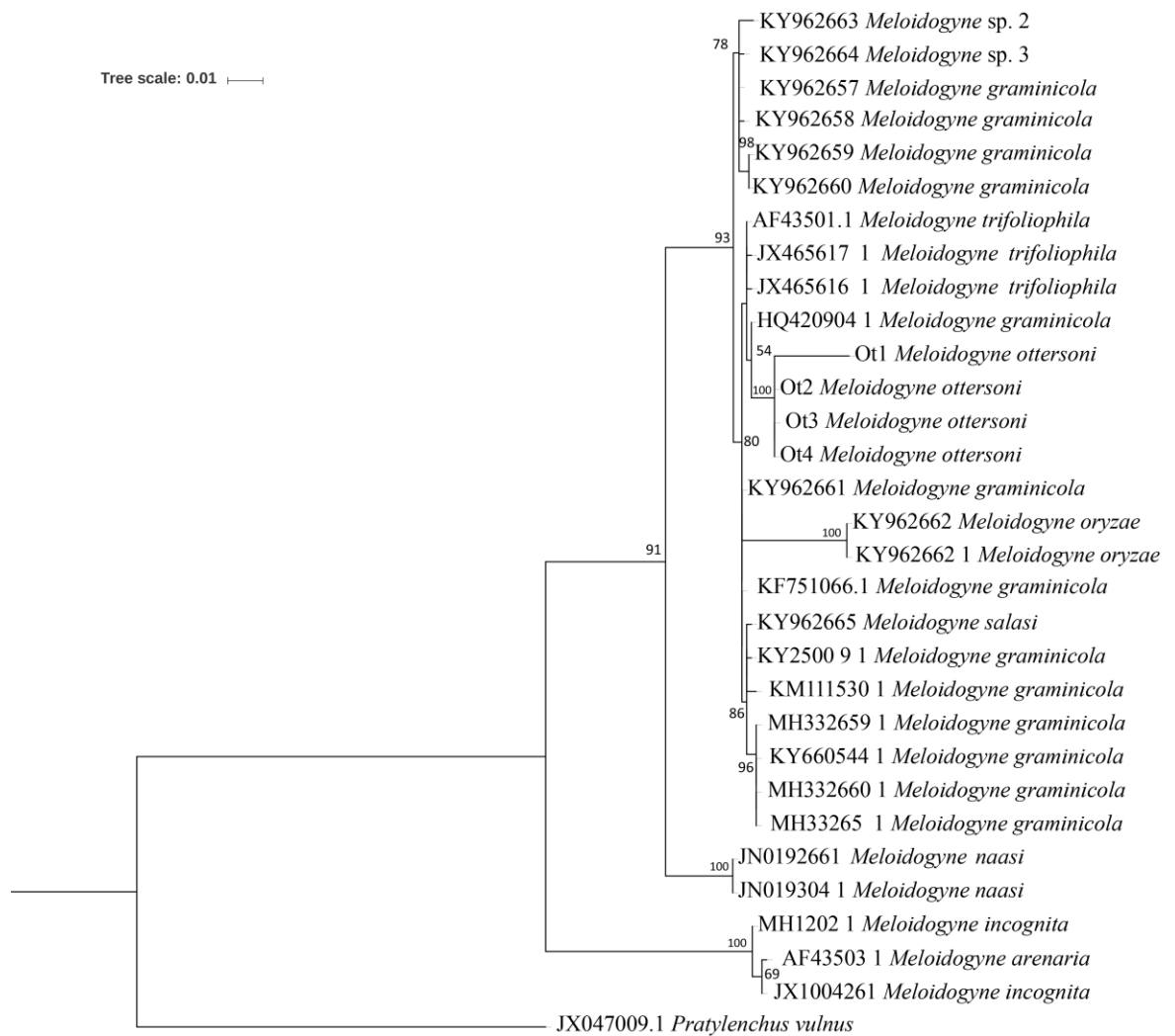


Figura 9. Análise de máxima verossimilhança (MV) das relações filogenéticas de *Meloidogyne ottersoni* (= *Meloidogyne* sp0) e outras populações de *Meloidogyne* spp. baseadas no fragmento D2-D3 da sequência 28S do rRNA. Números a esquerda dos braços são os valores de bootstrap de 1000 réplicas. Números de acesso do GenBank estão listados antes dos nomes das espécies.

Tree scale: 0.01

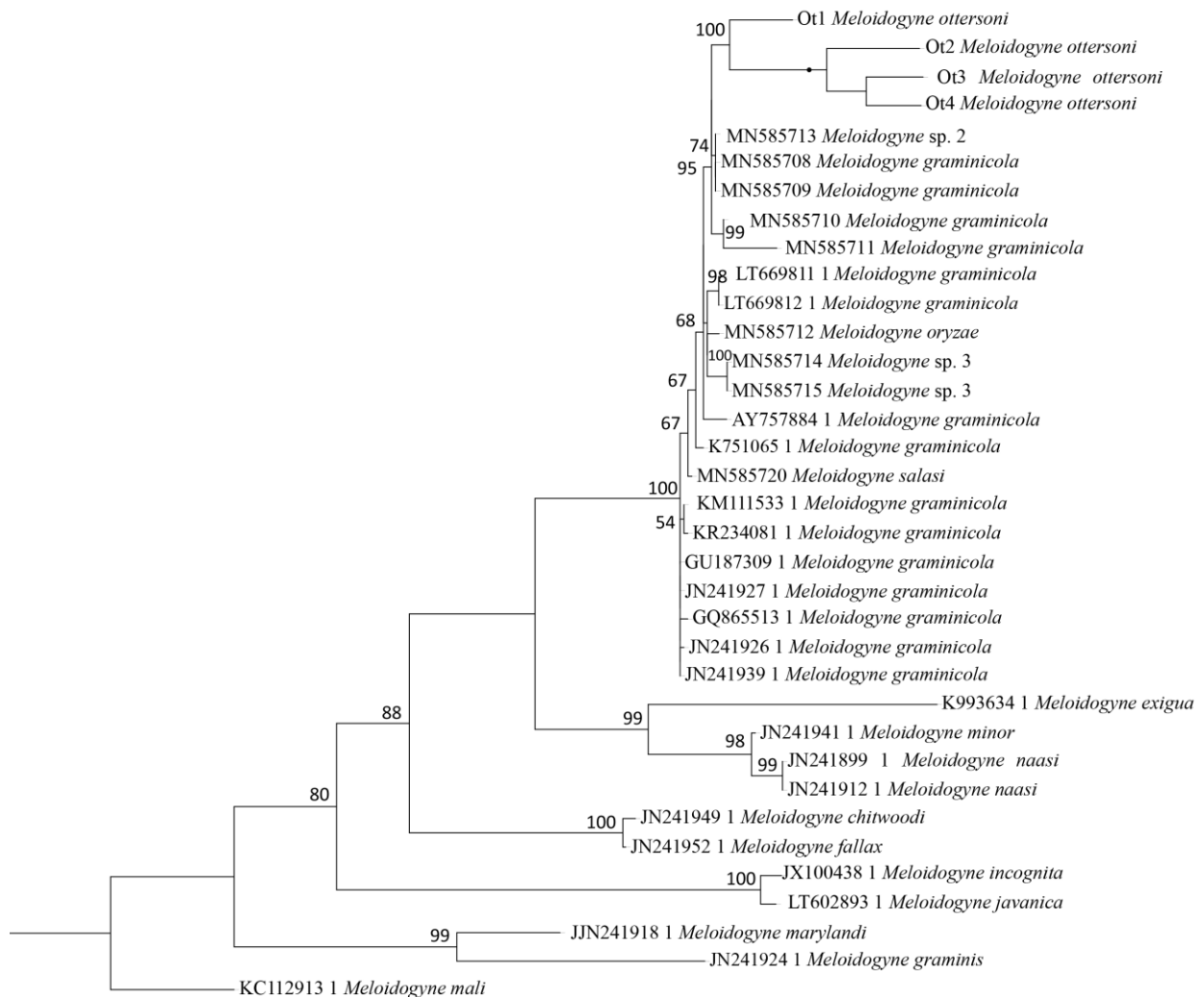


Figura 10. Análise de máxima verossimilhança (MV) das relações filogenéticas de *Meloidogyne ottersoni* (= *Meloidogyne* sp0) e outras populações de *Meloidogyne* spp. baseadas na sequência da região mitocondrial COXII. Números a esquerda dos braços são os valores de bootstrap de 1000 réplicas. Números de acesso do GenBank estão listados antes dos nomes das espécies.

Diagnóstico e Relações

Com base nos resultados aqui obtidos, concluímos que as quatro populações brasileiras de *Meloidogyne* sp.0 caracterizadas neste estudo pertencem, de fato à espécie *M. ottersoni* (Thorne, 1969) Franklin, 1971. A identificação correta de *M. ottersoni* requer um estudo detalhado das características morfológicas distintas das fêmeas, machos e J2. Infelizmente, o material tipo não estava disponível nas coleções dos EUA (Jepson, 1987),

nem populações vivas (Jonathan D. Eisenback e Zafar Handoo, informações pessoais). Comparando as populações do Brasil com a descrição feita por Thorne (1969) e Jepson (1987), foi possível observar que elas apresentam características morfológicas e morfométricas semelhantes, bem como os caracteres comuns abaixo descritos para a população de *M. ottersoni* de Wisconsin, EUA. As fêmeas são alongadas, em forma de limão, quase arredondadas. Os padrões perineais estão localizados no contorno da protuberância, variando de arredondados a ovais; arco dorsal hemisférico com estrias levemente espaçadas; as estrias são principalmente contínuas (Fig. 2), nunca cruzadas por estrias transversais irregulares, como frequentemente observadas em *M. graminicola* e *M. oryzae*. Diferenças mensuráveis entre as espécies pertencentes ao grupo 11 da Jepson são reduzidas, mas *M. ottersoni* mostra um estilete de fêmea pequeno (9-13 µm), diferente de outras espécies: *M. graminicola*, 12-14 µm e *M. oryzae*, 14-16 µm (Jepson, 1987, Mattos *et al.*, 2018). Os bulbos do estilete também podem diferenciar essas três espécies: em *M. graminicola* (Eisenback e Triantaphyllou, 1991) os bulbos são grandes e transversalmente alongados, em *M. ottersoni* arredondados e se destacam claramente da haste e em *M. oryzae* menores e menos destacados (Mattos *et al.*, 2018). Considerando o tamanho do cone em relação a haste, o cone é maior em *M. graminicola*, menor em *M. oryzae* e do mesmo tamanho ou maior em *M. ottersoni* (Jepson, 1987; Eisenback & Triantaphyllou, 1991; Mattos *et al.*, 2018). Os intervalos de comprimentos do estilete dos machos também são diferentes entre as três espécies: 13-19 µm para *M. ottersoni*, 16-18 µm para *M. graminicola* e 18-20 µm para *M. oryzae* (Jepson, 1987). A cauda do J2 das três espécies é muito longa e fina e afunila em um término hialino irregular longo e estreito (*M. ottersoni*: 20,5 µm, *M. graminicola*: 17,9 µm e *M. oryzae*: 22,0 µm), terminando em uma ponta clavada (Fig. 5 e-i). As populações de *M. ottersoni* mostram fenótipo de esterase sem bandas ou atividade enzimática (Rm = 0, Est Ot0), completamente diferente de *M. graminicola* (Est VS1) e *M. oryzae* (Est O1) com uma extensa área de atividade

enzimática (Mattos *et al.*, 2018). O fenótipo de esterase é, portanto, uma ótima ferramenta para diferenciar *M. ottersoni* (Est Ot0) de outras espécies de *Meloidogyne* do arroz (Fig. 6). Considerando os marcadores SCAR desenvolvidos por Belafiore *et al.* (2015), Htay *et al.* (2016) e Mattos *et al.* (2018), infelizmente, não foram espécie-específicos para *M. graminicola*, pois também amplificaram para *M. oryzae* e algumas populações de *M. ottersoni*, respectivamente. No entanto, *M. ottersoni* possui sequências específicas de ITS, D2-D3 e parciais da região mitocondrial COXII-16S rRNA (Figs. 8, 9, 10). *Meloidogyne ottersoni* do arroz também se reproduziu na planta hospedeira típica, alpiste vermelho – *P. arundinacea*, mostrando J2 e fêmeas com massa de ovos dentro das raízes, 50 dias após a inoculação (Fig. 1), confirmando os postulados de Koch.

Plantas hospedeiras

Quinze plantas de espécies botânicas diferentes de ocorrência local ou com potencial para serem utilizadas em rotação de culturas foram analisadas quanto à aptidão como hospedeiras de *M. ottersoni*. A maioria das plantas foi classificada como não-hospedeira ou má-hospedeira (Tabela 3). Além de *O. sativa* e da planta tipo, *P. arundinacea*, apenas três outras espécies avaliadas foram consideradas boas hospedeiras: *Echinochloa crus-galli*, *Echinochloa colonum* (L.) Link e *Phalaris canariensis* L.

Tabela 3. Relação de diferentes espécies botânicas inoculadas com *Meloidogyne ottersoni* (condição de sequeiro).

Espécies botânicas	Peso da raiz	Total de ovos	Ovos/g raiz	FR*	Fenótipo
Arroz <i>Oryza sativa</i> L. Var. IRGA 424	50,00 b	2389200 a	8283,26 b	238,92 a	Controle suscetível
Trigo <i>Triticum aestivum</i> L. Var. Torsik	5,20 d	1353 b	314,04 c	0,14 b	Não-hospedeira
Trigo <i>Triticum aestivum</i> L. Var. Sonik	2,40 e	773 b	410,67 c	0,08 b	Não-hospedeira
Capim-braquiária <i>Brachiaria decumbens</i> Stapf Variedade desconhecida	41,80 b	807 b	21,12 d	0,08 b	Não-hospedeira
Feijão caupi <i>Vigna unguiculata</i> L. Walp Variedade desconhecida	6,88 d	900 b	122,14 d	0,09 b	Não-hospedeira
Aveia preta <i>Avena strigosa</i> Schreb Variedade desconhecida	17,80 c	1080 b	60,09 d	0,11 b	Não-hospedeira
Aveia branca <i>Avena sativa</i> L. Var. Estampa	6,40 d	59020 b	4245,67 c	5,90 b	Má hospedeira
Tomate <i>Solanum lycopersicum</i> L. Var. Santa Clara	55,75 b	2417 b	48,57 d	0,24 b	Não-hospedeira
Milheto pérola <i>Pennisetum glaucum</i> L. Var. ADR905	144,40 a	3467 b	21,94 d	0,35 b	Não-hospedeira
Milheto pérola <i>Pennisetum glaucum</i> L. Var. ADR500	160,70 a	3467 b	20,38 d	0,35 b	Não-hospedeira
Azevém-italiano <i>Lolium multiflorum</i> Lam Variedade desconhecida	21,80 c	4207 b	189,08 c	0,42 b	Não-hospedeira
Soja	16,67 c	4778 b	326,79 c	0,48 b	Não-

<i>Glycine max</i> (L.) Mer. Var. Potência					hospedeira
Soja	8,50 d	350 b	53,13 d	0,04 b	Não-hospedeira
<i>Glycine max</i> Var. Vini M8210					
Cevada	33,30 c	6180 b	519,71 c	0,62 b	Não-hospedeira
<i>Hordeum vulgare</i> L. Variedade desconhecida					
Milho	104,80 a	26000 b	270,12 d	2,60 b	Má hospedeira
<i>Zea mays</i> L. IPR164					
Capim-mombaça	31,30 b	17400 b	590,80 c	1,74 b	Má hospedeira
<i>Panicum maximum</i> Jacq Variedade desconhecida					
Capim-arroz	8,88 d	615567 a	56311,50 a	61,56 a	Boa hospedeira
<i>Echinochloa crus-galli</i> (L.) P. Beauv Var. crus -galli					
Arroz de selva	17,00 c	1107667 a	62383,97 a	110,77 a	Boa hospedeira
<i>Echinochloa colonum</i> (L.) Link Variedade desconhecida					
Alpiste	86,50 a	813933,33 a	9547,64 b	81,39 a	Boa hospedeira
<i>Phalaris canariensis</i> L. Var. Canadian					
CV%	13,73	28,92	31,83	32,59	-

O número de repetições foi de 5 plantas por tratamento.

* Os valores dos fatores de reprodução (FR = população final / 10.000 ovos) foram transformados em $\log(x + 1)$. As médias seguidas de letras diferentes na coluna são significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott ($P < 0,5$).

DISCUSSÃO

Os métodos tradicionais de identificação de NG são baseados em morfologia (Jepson, 1987; Eisenback & Triantaphyllou, 1991; Hunt & Handoo, 2009), fenótipos de esterase (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Carneiro *et al.*, 2000) e marcadores moleculares (Blok & Powers, 2009). A identificação de espécies de *Meloidogyne* do arroz (grupo 11) tem sido um desafio diante da complexidade taxonômica do grupo, como a morfologia conservada, e os limites pouco claros entre as espécies do grupo (Jepson, 1987), além da falta de marcadores SCAR para várias espécies (Belafiore *et al.*, 2015; Mattos *et al.*, 2018) o que dificulta o diagnóstico.

As espécies de NG encontradas no arroz foram geralmente classificadas como *M. graminicola*, baseadas principalmente em caracteres morfométricos, nos sintomas e na capacidade dessa espécie de causar infecção no arroz de terras baixas (Pokharel *et al.*, 2007). No entanto, ainda faltam informações detalhadas sobre identidade e variabilidade dos NG encontrados em arroz. A identificação e o diagnóstico de *M. graminicola* sempre foram um desafio. Recentemente, Salalia *et al.* (2017), estudando 14 populações pertencentes ao 'grupo *M. graminicola*' da Índia, sugeriu que podem ocorrer espécies crípticas misturadas de NG no arroz. Em pesquisa recente no sul do Brasil, 21 populações de espécies de *Meloidogyne* foram detectadas no estado de SC. *Meloidogyne* sp.0, agora identificado como *M. ottersoni*, ocorreu em 19% das amostras, sem misturas com outras espécies (Mattos *et al.*, 2017). Sendo *Meloidogyne graminicola* o nematoide detectado mais difundido em plantios de arroz na região sul do Brasil (Negretti *et al.*, 2017).

Meloidogyne ottersoni do Wind Lake, Wisconsin, EUA é uma espécie bem adaptada às condições de inundação e se reproduz bem em alpiste vermelho, *P. arundinacea*. Esta planta é uma gramínea perene que geralmente forma extensas moitas ao longo das margens de

lagos e córregos e em áreas abertas úmidas, com ampla distribuição na Europa, Ásia, norte da África e América do Norte (Thorne, 1969).

No Brasil, *M. ottersoni* (= *Meloidogyne* sp.0) foi detectado em regiões de arroz em solo inundado, com baixa capacidade de drenagem, onde a temperatura média é de 19,5 °C, variando de 10 °C a 25 °C no verão e de 10 °C a 18 °C no inverno. A inundação do arroz na região de Meleiro – SC ocorre por canais de irrigação e a água vem do rio local Aranguará e seus afluentes. Essa região cobre cerca de 9.500 ha de arroz cultivado por pelo menos 320 famílias e é caracterizada por inundações prolongadas nas áreas de cultivo. Durante a estação de entressafra, os solos com pouca drenagem natural permanecem inundados durante o inverno, onde algumas ervas daninhas como capim-boiador, *Leersia hexandra* Sw., que contribuem para manter ou proliferar populações de nematoides durante esta estação. Na Argentina (Tucumã), *M. ottersoni* foi detectado em capim-arroz, *Echinocloa crus-galli* (L.) P. Beauv. por Doucet & Pinochet (1992) usando apenas o padrão perineal típico descrito por Thorne (1969) e Jepson (1987). Nossos resultados confirmam a identificação correta de *M. ottersoni* por esses autores, considerando que *E. crus-galli* também foi um bom hospedeiro para a população brasileira dessa espécie de NG.

A morfologia da cauda do J2 de *M. ottersoni* o coloca no grupo 11 de Jepson (Jepson, 1987). Este é o grupo mais bem definido dentro do gênero *Meloidogyne*, que inclui agora dez espécies que parasitam arroz e apresentam comprimento diferenciado da porção hialina da cauda: *M. graminicola* (17,9 µm), *M. graminis* (Sledge & Golden, 1964) Whitehead, 1968 (18,5 µm), *M. lini* Yang, Hu & Xu, 1988 (~ 14,0 µm), *M. hainanensis* Liao & Feng, 1995 (~ 15,3 µm), *M. salasi* (19,7 µm), *M. triticoryzae* Gaur, Saha & Khan, 1993 (17,6 µm), *M. marylandi* Jepson & Golden, 1987 (11,8 µm), *M. sasseri* Handoo, Huettel e Golden, 1995 (19,5 µm), *M. oryzae* (22,0 µm) (Mattos *et al.*, 2018), e finalmente *M. ottersoni* (20,5 µm).

A maioria das espécies de *Meloidogyne* do arroz (Grupo 11) descritas não foi devidamente caracterizada de forma citogenética, enzimática e molecular. Alguns caracteres morfológicos e biológicos são comuns nessas espécies: corpo da fêmea alongado, vulva às vezes situada em protuberância posterior, modo de reprodução anfimítico ou partenogênético, semi-endoparasitismo, com machos abundantes e fêmeas profundamente fixadas nas raízes do hospedeiro (Jepson, 1987). Exceção é feita para *M. oryzae* que se reproduz por partenogênese mitótica e apresenta poucos machos (Mattos *et al.*, 2018).

Na descrição de *M. ottersoni* feita por Thorne (1969) e um número muito pequeno de espécimes foi obtido e medido: fêmeas (10), machos (7) e J2 (10), colhidos diretamente de raízes de alpinete vermelho coletadas em campo. No presente estudo, as populações de *M. ottersoni* foram multiplicadas em arroz em casa de vegetação por vários meses. Em geral, os dados morfológicos e morfométricos das populações desta espécie no Brasil foram semelhantes aos da descrição original (Thorne, 1969; Jepson, 1987), com variações esperadas frequentes para o gênero *Meloidogyne*. As populações do Brasil apresentaram fêmeas, machos e J2 maiores em comparação com a população tipo dos EUA. Essa variação no comprimento do corpo pode ocorrer em populações da mesma espécie e em hospedeiros diferentes (Handoo *et al.*, 1993). Os estiletos de fêmeas e machos foram semelhantes em comprimento, mas a população dos EUA apresentou J2 com estilete mais longo. Alguns autores consideram os aspectos morfológicos mais relevantes na caracterização das espécies do que os caracteres morfométricos (Jepson, 1987; Eisenback e Triantaphyllou, 1991). Considerando esses aspectos, as populações de *M. ottersoni* coletadas no Brasil foram muito próximas da população descrita nos EUA e parasitam a mesma planta hospedeira tipo *P. arundinaceae*, corroborando os postulados de Koch. Considerando a estreita gama de hospedeiros registrada para *M. ottersoni*, algumas espécies botânicas podem ser utilizadas na rotação de culturas com arroz: soja, aveia preta, azevém, cevada, entre outras apresentadas na Tabela 3. Mais estudos

são necessários para confirmar os resultados deste estudo, incluindo mais culturas e cultivares.

Bioquimicamente, *M. ottersoni*, *M. graminicola* e *M. oryzae* apresentaram perfis distintos de esterase; o primeiro sem bandas ($R_m = 0$) e os outros com bandas arrastadas em posições diferentes (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Mattos *et al.*, 2018). Este fenótipo nunca foi claramente caracterizado antes e parece ser novo e uma característica específica da espécie *M. ottersoni*. Um fenômeno semelhante ocorre com *M. exigua* Göldi, 1887 onde são necessárias mais de 10 fêmeas para revelar perfil de esterase satisfatoriamente (Carneiro *et al.*, 2000). Isto é devido ao tamanho reduzido das fêmeas e à baixa concentração da enzima esterase. Para *M. ottersoni*, mesmo que mais de 20 fêmeas por análise individual tenham sido utilizadas neste estudo, nenhuma banda de esterase foi observada. Entretanto, para que seja usado como critério diagnóstico, será necessário revelar outra atividade enzimática (MDH) com o mesmo extrato, para garantir que a falta de atividade da enzima esterase não se deva à degradação de proteínas na amostra.

Oogênese e espermatogênese da população de *M. ottersoni* de Wisconsin, EUA, foram descritas como do tipo meiótico ($n = 18$). Quando os machos foram abundantes, a reprodução foi por anfimixia. Considerando os estudos citogenéticos, *M. ottersoni* está intimamente relacionado a *M. graminicola*, *M. graminis* e *M. naasi* (Triantaphyllou, 1973). A população de *M. ottersoni* de Meleiro-SC aqui estudada, reproduziu-se por partenogênese meiótica e apresentou 18 cromossomos, sendo semelhante à população tipo de *M. ottersoni* e *M. graminicola* e completamente diferente de *M. oryzae* ($3n = 50-56$ cromossomos) (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985, Mattos *et al.*, 2018).

Meloidogyne oryzae é a única espécie triploide relacionada ao arroz e, como estudado anteriormente (Mattos *et al.*, 2018), agrupa-se com outras espécies apomíticas em árvores filogenéticas baseadas em ITS (Negretti *et al.*, 2017). Os resultados moleculares para esta

região confirmaram que *M. oryzae* foi mais próxima de outras espécies partenogênicas mitóticas, enquanto *M. ottersoni* agrupou-se com espécies partenogênicas meióticas. Espécies com cerca de 51 a 56 cromossomos foram provavelmente derivadas após a hibridação de formas partenogênicas meióticas como *M. graminicola*, envolvendo a fertilização de um ovo não reduzido com 36 (18 + 18) cromossomos, com um espermatozoide com 18 cromossomos (Triantaphyllou, 1985). Um provável processo de especiação pode estar ocorrendo com essas espécies de NG associadas ao arroz, conforme sugerido por Negretti *et al.* (2017) e Mattos *et al.* (2018).

A base de múltiplas cópias do rDNA fornece amostra alvo para amplificação por PCR e permite detectar variações intraespecíficas em populações de espécies de *Meloidogyne* spp. (Zijlstra *et al.*, 1995; Adam *et al.*, 2007). Semelhante a *M. ottersoni*, a presença de variabilidade intraespecífica nas sequências de rDNA foi relatada para *M. graminicola* (Pokharel *et al.*, 2007) e *M. oryzae* (Mattos *et al.*, 2018; Besnard *et al.*, 2019).

Do ponto de vista da identificação, o genoma mitocondrial oferece uma fonte rica de marcadores genéticos (Rubinoff & Holland, 2005; Hu & Gasser, 2006). Essa região possui uma taxa de evolução mais rápida que os genes nucleares correspondentes (Hugall *et al.*, 1994; Blok & Powers, 2009). De fato, a região mitocondrial codante já é considerada uma região potencialmente melhor para desenvolver um ‘barcode’ para alguns grupos de espécies de *Meloidogyne*, uma vez que regiões intergênicas mostraram repetições de AT que parecem não se correlacionar com eventos de especiação (Hugall *et al.*, 1997; Pagan *et al.*, 2015). *Meloidogyne ottersoni* apresenta uma sequência COII única, com baixa variabilidade intraespecífica, que pode ser útil na identificação de espécies e em estudos filogenéticos futuros.

Os resultados do presente estudo esclareceram a posição taxonômica de *M. ottersoni* e ilustraram o interesse da abordagem da taxonomia integrativa para a redescrição precisa das

espécies (Padial *et al.*, 2010; Pante *et al.*, 2015; Mattos *et al.*, 2018). De fato, estudos morfológicos, morfométricos, citológicos e moleculares detalhados foram realizados para caracterizar corretamente esse nematoide de áreas de arroz irrigado. A identificação precisa de espécies de nematoides é importante para dar suporte a futuros estudos biológicos ou agronômicos, a fim de esclarecer a distribuição e importância dessa espécie no campo e, assim, planejar medidas de controle eficientes para o manejo da doença causada por este patógeno do arroz na região sul do Brasil.

CONCLUSÕES

A espécie críptica *Meloidogyne* sp.0 foi identificada como *M. ottersoni* por meio de Taxonomia Integrativa.

Características morfológicas e morfométricas da população estudada se assemelharam à da descrição original da espécie *M. ottersoni*.

Os estudos citológicos confirmaram o número de $n = 18$ cromossomos e forma de reprodução por partenogênese meiótica já estudada anteriormente.

Este é a primeira detecção de *M.ottersoni* no Brasil na cultura do arroz e a segunda na América do Sul.

Meloidogyne ottersoni é uma espécie que possui alta capacidade reprodutiva no arroz em condições favoráveis, e tem se mostrado de ocorrência isolada, em áreas produtoras de arroz no Sul do país.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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(1), 190-197.
- BAERMANN, G. 1917. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) larven in Erdproben. *Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch Indië*, v.57, p.131-137.
- BELLAFIGLIORE, S., JOUGLA, C., CHAPUIS, E., BESNARD, G., SUONG, M., VU, P. N., THI, X. N. 2015. Intraspecific variability of the facultative meiotic parthenogenetic root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) from rice fields in Vietnam. *Comptes Rendus Biologies*, 338(7), 471–483.
- BERNARD, E. C., EISENBACK, J. D. 1997. *Meloidogyne trifoliophila* n.sp. (Nemata: Meloidogynidae), a parasite of clover from Tennessee. *Journal of Nematology*, 29(1), 43-54.
- BESNARD, G., THI-PHAN, N., HO-BICH, H., DEREPPER, A., TRANG NGUYEN, H., QUÉNÉHERVÉ, P., BELLAFIGLIORE, S. 2019. On the close relatedness of two rice-parasitic root-knot nematode species and the recent expansion of *Meloidogyne graminicola* in Southeast Asia. *Genes*, 10(2), 175. 16p.
- BLOK, V. C. & POWERS, T. O. 2009. Biochemical and molecular identification. In: Perry, R.N., Moens, M. & Starr, J.L. (Eds). *Root-knot nematodes*. CABI Publishing, Wallingford, UK, p. 98-118.
- BYRD JR, D. W., KIRKPATRICK, T., BARKER, K. R. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, 15(1), 142.

- CARNEIRO, R. M. D. G., CASTAGNONE-SERENO, P., & DICKSON, D. W. 1998. Variability among four populations of *Meloidogyne javanica* from Brazil. *Fundamental and Applied Nematology*, 4(21), 319–326.
- 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., ALMEIDA, M. R. A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira*, 25(1), 35-44.
- CHAUHAN, B. S., JABRAN, K., MAHAJAN, G. 2017. Rice Production Worldwide. In: Prasad, R., Shivay, Y. S., Kumar, D. (Eds). *Current status, challenges, and opportunities in rice production*. Springer International Publishing, Basel, Switexerland, p. 1-15.
- CONAB-COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. 2018, 7(5), 51-60.
- DE LEY, P., FELIX, M. A., FRISSE, L. M., NADLER, S. A., STEMBER, P. W., THOMAS, W. K. 1999. Molecular and morphological characterisation of two reproductive species with mirror image anatomy (Nematoda: Cephalobidae). *Nematology*, 1(6), 591–612.
- DE WAELE, D., ELSEN, A. 2007. Challenges in tropical plant nematology. *Annual Review of Phytopathology*, 45(1), 457–485.
- DOUCET, M. E., PINOCHET, J. 1992. Occurrence of *Meloidogyne* spp. in Argentina. Supplement to *Journal of Nematology*, 24(4S), 765-770.
- EISENBACK, J. D. 1985. Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. In: Barker, K. R.; Carter, C. C.; Sasser, J. N. (Eds.). *An advanced treatise on Meloidogyne*, v. 2. North Carolina States, University Graphics, p. 79-105.
- EISENBACK, J. D., HUNT, D. J. 2009. General morphology. In: Perry, R. N., Moens, M., Starr, J. L. (Eds). *Root-knot nematodes*. CABI Publishing, Wallingford, UK, p. 18-54.

- EISENBACK, J. D., TRIANTAPHYLLOU, H. H. 1991. Root-knot nematode: *Meloidogyne* spp. and races. In: Nickle, W. R. (Ed). Manual of Agricultural Nematology. Macel Deccker, Inc, 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(1), 6-20.
- HANDOO, Z. A., HUETTEL, R. N., GOLDEN, A. M. 1993. Description and SEM observations of *Meloidogyne sasseri* n.sp. (Nematoda: Meloidogynidae), parasitizing beachgrasses. Journal of Nematology, 25(4), 628.
- HTAY, C., PENG, H., HUANG, W., KONG, L., HE, W., HOLGADO, R., PENG, D. 2016. The development and molecular characterization of a rapid detection method for rice root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*). European Journal of Plant Pathology, 146(2), 281-291.
- HU, M., GASSER, R. B. 2006. Mitochondrial genomes of parasitic nematodes – progress and perspectives. Trends in Parasitology, 22(2), 78–84.
- HUGALL, A., MORITZ, C., STANTON, J., WOLSTENHOLME, D. R. 1994. Low, but strongly structured mitochondrial DNA diversity in root knot nematodes (*Meloidogyne*). Genetics, 136(3), 903-912.
- HUGALL, A., STANTON, J., MORITZ, C. 1997. Evolution of the AT-rich mitochondrial DNA of the root knot nematode, *Meloidogyne hapla*. Molecular Biology and Evolution, 14(1), 40–48.
- HUNT, D. J., HANDOO, Z. A. 2009. Taxonomy, identification and principal species. In: Perry, R. N., Moens, M., Starr, J. L. (Eds.). Root-knot nematodes. CABI Publishing, Wallingford, UK, p. 55-97.

- JEPSON, S. B. 1987. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). CABI Publishing, Wallingford, UK.
- KARSSSEN, G., MOENS, M. 2006. Root-knot nematodes. In: Perry, R., Moens, M. (Eds.). Plant Nematology. CABI Publishing, Wallingford, UK, p. 59-90.
- KHAN, M. R. 2015. Nematode diseases of crop in India. In: Awasthi, L. P. (Ed). Recent advances in the diagnosis and managment of plant diseases. Springer, New Delhi, p.183-224.
- MATTOS, V. S., SOARES, M. R. C., GOMES, A. C. M. M., ARIEIRA, C. R. D., GOMES, C. B., CARNEIRO, R. M. D. G. 2017. Caracterização de um complexo de espécies do nematoide das galhas parasitando arroz irrigado na região sul do Brasil. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 331, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnoloiga. 28p.
- MATTOS, V. S., CARES, J. E., GOMES, C. B., GOMES, A. C. M. M., MONTEIRO, J. D. M. S., GOMEZ, G. M., CASTAGNONE-SERENO, P., CARNEIRO, R. M. D. G. 2018. Integrative Taxonomy of *Meloidogyne oryzae* (Nematoda: Meloidogyninae) parasitizing rice crops in Southern Brazil. European Journal of Plant Pathology, 151(3), 649-662.
- MCCLURE, M. A., NISCHWITZ, C., SKANTAR, A. M., SCHMITT, M. E., SUBBOTIN, S. A. 2012. Root-knot nematodes in golf course greens of the western United States. Plant Disease, 96(5), 635-647.
- 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. CABI Publishing, Wallingford, UK, p. 1-17.
- NEGRETTI, R. R., GOMES, C. B., MATTOS, V. S., SOMAVILLA, L., MANICA-BERTO, R., AGOSTINETTO, D., CASTAGNONE-SERENO, P., CARNEIRO, R. M. D. G. 2017. Characterisation of a *Meloidogyne* species complex parasitising rice in southern Brazil. *Nematology*, 19(4), 403–412.

- NYLANDER J. A. A. 2004. *MrModelTest*, version 2 Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- PADIAL, J. M., MIRALLES, A., DE LA RIVA, I., VENCES, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7(1), 16.
- PAGAN, C., COYNE, D., CARNEIRO, R., KARIUKI, G., LUAMBANO, N., AFFOKPON, A., WILLIAMSON, V. M. 2015. Mitochondrial haplotype-based identification of ethanol-preserved root-knot nematodes from Africa. *Phytopathology*, 105(3), 350-357.
- PANTE, E., ABDELKRIM, J., VIRICEL, A., GEY, D., FRANCE, S. C., BOISSELIER, M. C., SAMADI, S. 2015. Use of RAD sequencing for delimiting species. *Heredity*, 114(5), 450.
- POKHAREL, R. R., ABAWI, G. S., DUXBURY, J. M., SMAT, C. D., WANG, X., BRITO, J.A. (2010). Variability and the recognition of two races in *Meloidogyne graminicola*. *Australasian Plant Pathology*, 39(4), 326–333.
- POKHAREL, R. R., ABAWI, G. S., ZHANG, N., DUXBURY, J. M., SMART, C. D. 2007. Characterization of isolates of *Meloidogyne* from rice-wheat production fields in Nepal. *Journal of Nematology*, 39(3), 221.
- POWERS, T. O., HARRIS, T. S. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 25(1), 1–6.
- RUBINOFF, D., HOLLAND, B. S. 2005. Between two extremes: mitochondrial DNA is neither the panacea nor the nemesis of phylogenetic and taxonomic inference. *Systematic Biology*, 54(6), 952-961.
- SALALIA, R., WALIA, R. N., SOMVANSI, V. S., KUMAR, P., KUMAR, A. 2017. Morphological, morphometric and molecular characterization of intraspecific variation within Indian populations of *Meloidogyne graminicola*. *Journal of Nematology*, 49 (3): 254-267.

- SCHMITZ, B., BURGERMEISTER, W., BRAASCH, H. 1998. Molecular genetic classification of Central European *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax* populations. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes, 50(12), 310–317.
- SUBBOTIN, S., WAEYENBERGE, A.L., MOENS, M. 2000. Identification of cyst forming nematodes of the genus *Heterodera* (Nematoda: Heteroderidae) based on the ribosomal DNA RFLPs. Nematology, 2(2), 153–164.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28(10), 2731–2739.
- TAYLOR, D. P., NETSCHER, C. 1974. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. Nematologica, 20(2), 268-269.
- THORNE, G. 1969. *Hypsoperine ottersoni* sp. n. (Nemata, Heteroderidae) infesting canary grass, *Phalaris arundinacea* (L.) reed in Wisconsin. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 36: 98–102.
- TRIANANTAPHYLLOU, A. C. 1973. Gametogenesis and reproduction of *Meloidogyne graminis* and *M. ottersoni* (Nematoda: Heteroderidae). Journal of Nematology, 5(2), 84.
- TRIANANTAPHYLLOU, A. C. 1985. Cytological methods for the study of oogenesis and reproduction of root-knot nematodes. In: Barker, K. R., Carter, C. C., Sasser, J. N. (Eds.). An advanced treatise on *Meloidogyne: Methodology*, v. 2. Raleigh: North Carolina State University Graphics, p. 107–114.
- TRIFINOPOULOS, J., NGUYEN, L. T., VON HAESELER, A., MINH, B. Q. 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. Nucleic Acids Research, 44(W1), W232–W235.

ZIJLSTRA, C., LEVER, A. E. M., UENK, B. J., VAN SILFHOUT, C. H. Y. 1995.
Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla*
and *M. chitwoodi*. *Phytopathology*, 85(10), 1231-1237.

Capítulo 3

**COMPLEXO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Meloidogyne* EM
ARROZ IRRIGADO: DIVERSIDADE GENÉTICA E NOVAS
FONTES DE RESISTÊNCIA EM *Oryza* spp.**

COMPLEXO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Meloidogyne* EM ARROZ IRRIGADO NO BRASIL: DIVERSIDADE GENÉTICA E NOVAS FONTES DE RESISTÊNCIA EM *Oryza* SPP.

RESUMO

O arroz é uma importante cultura para o agronegócio brasileiro. A recente detecção de um complexo de espécies de *Meloidogyne* parasitando e causando danos em arroz irrigado no Sul do Brasil alertou para a necessidade de estudos acerca da diversidade genética dessas espécies e da patogenicidade a *Oryza* spp, visando a obtenção de resistência múltipla. O objetivo deste estudo foi comparar a variabilidade genética de populações de *Meloidogyne* spp. encontradas em arroz irrigado e avaliar a reação de quatro espécies selvagens de *Oryza* a populações de *M. ottersoni*, *M. oryzae* e duas variantes de *M. graminicola* (Est R2 e Est R3). O estudo da variabilidade genética foi realizado com marcadores RAPD e AFLP. A presença ou ausência de bandas polimórficas foram convertidas em uma matriz binária para construção de um dendograma. *Meloidogyne graminicola* e *M. ottersoni* apresentaram alta variabilidade intraespecífica: 83,76% e 41,14%, respectivamente. Análises de clusters mostraram a separação clara entre as espécies parasitas do arroz em subclados com 100% de bootstrap. Para o ensaio de resistência, plantas de arroz (estádio V4) foram inoculadas com 5.000 ovos e avaliadas aos 90 (ensaio 1) e 120 (ensaio 2) dias após a inoculação, de acordo com o fator de reprodução dos patógenos. O ensaio foi repetido em duas épocas do ano. Das seis espécies avaliadas, *O. glumaepatula* mostrou-se altamente resistente ou resistente a todas as espécies de *Meloidogyne* testadas, podendo ser considerada uma fonte de resistência múltipla. As espécies *Oryzae grandiglumis*, *O. glaberima* e *O. alta*, em geral, apresentaram certo grau de resistência. Já, *O. longistaminata* apresentou variação entre resistência e suscetibilidade às espécies testadas. A presença de genes de resistência aos nematoides do gênero *Meloidogyne*

em genótipos selvagens de *Oryza* spp., especialmente do grupo de genoma AA, pode ser de grande interesse para estudos futuros de melhoramento genético.

Palavras-chaves: arroz selvagem, nematoides das galhas do arroz, *Oryza glumaepatula*, resistência, variabilidade genética.

***Meloidogyne* RICE SPECIES COMPLEX: GENETIC DIVERSITY AND NEW SOURCES OF RESISTANCE IN *ORYZA* SPP.**

ABSTRACT

Rice is an important crop for Brazilian agribusiness. Recent detection of *Meloidogyne* species complex (RRKN) parasitizing and causing damage to irrigated rice in the southern Brazil showed to the need for studies on the genetic diversity of these species and their pathogenicity to *Oryza* spp., aiming to obtain multiple resistances. The aim of this study was to compare the genetic diversity of *Meloidogyne* species populations found in irrigated rice and to evaluate the reaction of four wild *Oryza* species (*O. glumaepatula*, *O. grandiglumis*, *O. alta* and *O. longistaminata*) and two cultivated ones *O. glaberrima* and *O. sativa* (control) to populations of *M. ottersoni*, *M. oryzae* and two variants of *M. graminicola* (Est R2 and Est R3). The genetic variability of RKN was assessed using RAPD and AFLP markers. The presence/absence of polymorphic DNA bands was converted into a binary matrix for construction of a dendogram. *Meloidogyne graminicola* and *M. ottersoni* showed high intraspecific variability: 83,76% and 41,14%, respectively. Cluster analysis showed a clear separation among RRKN species into subclades with 100% bootstrap. For the rice resistance screening, plants (n=8, stage V4) grown under greenhouse were inoculated with 5,000 eggs and after three months they wer evaluated 90-120 days post-inoculationby the nematode reproduction factor. The essay was repeated once in different seasons. From the six *Oryza*

species evaluated, *O. glumaepatula* was highly resistant or resistant to all RRKN species tested and comprise a valuable source of multiple resistances. to RKN. Overall, the species *O. grandiglumis*, *O. glaberima* and *O. alta*, showed a level of resistance according to Hussey & Janssen' concepts. Conversely, *O. longistaminata* showed variation between resistance and susceptibility. Source of resistance genes in wild *Oryza* genotypes against *Meloidogyne* spp., especially of the AA genome, may be of great interest for future breeding programs in cultivated rice.

Key-words: genetic variability, *Oryza glumaepatula*, resistance, rice root-knot nematodes, wild rice.

INTRODUÇÃO

Dentre as principais culturas de alimento básico, o arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo cereal mais produzido e consumido no mundo. Trata-se de uma das culturas mais importantes do Brasil, ocupando uma área cultivada de 1.705.400 ha. Mais de 67% das áreas de arroz do Brasil pertencem aos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, que respondem por 70% e 9% da produção de arroz nacional, respectivamente (SOSBAI, 2018; CONAB, 2019).

Várias espécies de nematoides estão associadas à cultura do arroz, mas apenas algumas delas realmente causam danos significativos (Kyndt *et al.*, 2014). O nematoide das galhas do arroz (NG) *Meloidogyne graminicola* Golden e Birchfield, 1965 é considerado o mais prejudicial para a cultura no mundo. É um organismo bem adaptado a ambientes inundados, sendo disseminado mundialmente em vários países do Sul e Sudeste da Ásia, EUA, América Latina e Europa (Soriano & Reversat, 2003; Bridge *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2012; Padgham *et al.*, 2014; Gilces *et al.*, 2016; Fanelli *et al.*, 2017) e relatado apenas uma

vez na África do Sul (Kleynhans, 1991). Na Ásia, os danos causados por *M. graminicola* variam entre 11 e 80% (Soriano & Reversat, 2003; De Waele & Elsen, 2007).

Recentemente foram detectados no Sul do Brasil, *M. oryzae* Mass, Sanders & Dede, 1978 e *M. ottersoni* (Thorne, 1969) Franklin, 1971 e duas variantes de *M. graminicola* com fenótipos de esterase atípicos (Est R2 e R3), que mostraram a existência de um complexo de espécies de NG em áreas de arroz irrigado causando perdas de produção (Mattos *et al.*, 2017; Negretti *et al.*, 2017; Soares, 2017; Mattos *et al.*, 2018).

A presença de variantes dentro de *M. graminicola* reforça a alta diversidade anteriormente associada a esta espécie amplamente distribuída no mundo. Por outro lado, *M. oryzae* apresenta distribuição limitada no mundo e no Brasil, tendo sido detectada apenas no estado de Santa Catarina (Mattos *et al.*, 2018). Por outro lado, *M. ottersoni*, espécie descrita nos EUA (Thorne, 1969), e posteriormente detectada na Argentina (Doucet & Pinochet, 1992), ocorreu em 19% das áreas de arroz amostradas no sul do Brasil (Mattos *et al.*, 2017; Negretti *et al.*, 2017). A recente detecção destas duas espécies e das duas variantes de *M. graminicola* traz à tona a necessidade de um estudo mais aprofundado da diversidade biológica e molecular, uma vez que pouco se sabe sobre elas.

Ferramentas moleculares, particularmente marcadores moleculares neutros como a técnica de RAPD (Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997; Randig *et al.*, 2002) e AFLP (Semblat *et al.*, 1998; Fargette *et al.*, 2005) têm sido amplamente utilizadas para analisar a diversidade genética dentro de espécies de *Meloidogyne* (Carneiro *et al.*, 2004, 2008; Muniz *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2012; Correa *et al.*, 2013). Mattos *et al.* (2019a), usando marcadores RAPD, investigaram a variabilidade genética entre *M. graminicola* (Est VS1, R2, R3) e outras espécies de *Meloidogyne* associadas ao arroz, incluindo *M. oryzae* (Est O1). Foi detectada alta diversidade genética em *M. graminicola* (cerca de 73%) e menor em *M. oryzae* (12%). *Meloidogyne ottersoni* não foi incluído naquele estudo, apenas duas

populações de cada variante de *M. graminicola* (Est R2 e Est R3), então denominadas *Meloidogyne* sp.2 e *Meloidogyne* sp.3 foram consideradas.

O controle eficiente das espécies de nematoides das galhas envolve rotação com culturas não-hospedeiras ou más hospedeiras e/ou cultivares resistentes. A rotação de culturas é limitada para *M. graminicola* devido à sua alta polifagia, com ampla gama de hospedeiras alternativas (Bridge *et al.*, 2005) e a necessidade de ajustar diferentes formas de cultivo que reduzem as opções de espécies botânicas (Padgham *et al.*, 2004; Luc *et al.*, 2005; Pokharel *et al.*, 2007; Santos & Gomes, 2011; Jain *et al.*, 2012). O plantio de espécies ou cultivares resistentes é a medida de manejo mais sustentável e econômica. Embora tenha sido encontrada variabilidade na suscetibilidade de variedades de *O. sativa*, apenas resistência parcial foi relatada nessa espécie (Jena & Rao, 1976; Bridge *et al.*, 2005; Prasad *et al.*, 2006; Cabasan *et al.*, 2012; Dimpka *et al.* 2015; Bellafiore *et al.* 2018).

Algumas espécies correlatas de *Oryza* podem ser fontes alternativas de resistência, tais como alguns acessos de *O. longistaminata* A. Chev. & Roehrich e *O. glaberrima* Steud. (Plowright *et al.*, 1999; Soriano *et al.*, 1999; Dutta *et al.*, 2012; Cabasan *et al.*, 2014).

Oryza é um pequeno gênero botânico, apresentando apenas duas espécies cultivadas (*O. sativa* e *O. glaberrima*) e 21 espécies selvagens. No Brasil, são encontradas quatro espécies de arroz selvagem: *O. glumaepatula* Steud., *O. alta* Swallen., *O. grandiglumis* (Döll) Prod. e *O. latifolia* Desv. *Oryza glumaepatula* é uma espécie de arroz nativa das Américas que apresenta alto grau de resistência a *M. graminicola* (Est VS1) (Mattos *et al.*, 2019b). Além de *O. glumaepatula*, outras espécies de *Oryza* foram estudadas neste trabalho e apresentaram fenótipos variando de resistente à suscetível.

Este trabalho objetivou estudar a diversidade genética das espécies do nematoide das galhas relacionadas ao arroz irrigado através de marcadores neutros (AFLP e RAPD) e avaliar quatro espécies de arroz selvagem (*O. longistaminata*, *O. grandiglumis*, *O. alta* e *O.*

glumaepatula) e duas cultivadas: *O. glaberrima* e *O. sativa* (controle), com o objetivo de identificar fontes de resistência múltipla em *Oryza* spp., a esse complexo de espécies de *Meloidogyne* associadas ao arroz.

MATERIAL E MÉTODOS

Populações dos nematoides

Populações puras de *Meloidogyne* spp. (Tabela 1) coletadas em campos de arroz no Sul do Brasil e purificadas na Embrapa Clima Temperado foram reproduzidas na cultivar suscetível *O. sativa* (BR-IRGA 410) em casa de vegetação, e posteriormente usadas para todas as análises genéticas e testes de resistência com os nematoides. A identidade das espécies foi confirmada pelo perfil das enzimas de esterase (Est) e malato desidrogenase (Mdh) (Carneiro & Almeida, 2001). Ovos dessas populações foram extraídos de raízes de arroz infectadas (Carneiro *et al.*, 2004) e separados para extração de DNA (Randig *et al.*, 2002). Uma população de cada espécie ou variante (*M. ottersoni*, *M. oryzae*, *M. graminicola* (G2 e G3) (Tabela 1) foi selecionada como inóculo para os experimentos em casa de vegetação, e os ovos foram extraídos de acordo com metodologia de Hussey & Barker (1973), modificado pelo uso de liquidificador por 30 segundos, ao invés de agitação manual. Após a extração, os ovos foram contados em uma lâmina de Peter sob microscópio de luz.

Tabela 1. Isolados de *Meloidogyne* spp. utilizados no presente estudo.

Código da população	Espécies	Fenótipo ¹		Origem (Município, Estado, País) ²
		Est	Mdh	
<i>G1.2</i>	<i>M. graminicola</i>	VS1	N1a	Guaramirim/SC/Brasil
<i>G1.6</i>	<i>M. graminicola</i>	VS1	N1a	Camburiú/SC/Brasil
<i>G1.8</i>	<i>M. graminicola</i>	VS1	N1a	Capão do Leão/RS/Brasil
<i>G1.P</i>	<i>M. graminicola</i>	VS1	N1a	Filipinas ³
<i>Mo1</i>	<i>M. oryzae</i>	R1	N1a	Ilhota/SC/Brasil
<i>Mo2*</i>	<i>M. oryzae</i>	R1	N1a	Camburiú/SC/Brasil
<i>G2RS*</i>	<i>M. graminicola</i>	R2	N1a	Uruguaiana/RS/Brasil
<i>G2SC</i>	<i>M. graminicola</i>	R2	N1a	Camburiú/SC/Brasil
<i>G3RS*</i>	<i>M. graminicola</i>	R3	N1	Uruguaiana/SC/Brasil
<i>G3SC</i>	<i>M. graminicola</i>	R3	N1	Rio do Oeste/SC/Brasil
<i>G3RS2</i>	<i>M. graminicola</i>	R3	N1	Guaíba/SC/Brasil
<i>Mot1</i>	<i>M. ottersoni</i>	R0	N1a	Capão do Leão/RS/Brasil
<i>Mot2*</i>	<i>M. ottersoni</i>	R0	N1a	Meleiro/SC/Brasil
<i>Mot3</i>	<i>M. ottersoni</i>	R0	N1a	Nova Veneza/SC/Brasil
<i>Mot4</i>	<i>M. ottersoni</i>	R0	N1a	Nova Veneza/SC/Brasil
<i>Ms</i>	<i>M. salasi</i>	VS1-2	N3	Costa Rica ⁴
<i>Ment</i>	<i>M. enterolobii</i>	En2	N1a	Petrolina/PE/Brasil ⁵

*populações usadas nos experimentos para avaliação de resistência em casa de vegetação.

¹Perfis obtidos de Siqueira *et al.*, 2010; Negretti *et al.*, 2017; Mattos *et al.*, 2019a.

²Estados brasileiros: RS = Rio Grande do Sul, SC = Santa Catarina, PE= Pernambuco

³População de *M. graminicola* das Filipinas fornecida por Dr. Gerrit Karssen (Universidade de Wageningen, Países Baixos).

⁴População de *M. salasi* López, 1984 fornecida por M.Sc Lorena Flores (Universidade de San José, Costa Rica).

⁵Isolado de *M. enterolobii* Yang & Eisenback, 1983, pertencentes à coleção da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e originário da goiabeira.

Análise da diversidade genética

Para cada população, o DNA genômico total foi extraído e purificado a partir de alíquotas de 100 µl de ovos seguindo o método descrito por Randig *et al.* (2002). O DNA isolado foi quantificado em um gel de agarose a 1%. Uma população de *M. enterolobii* (Est En2) foi incluída no estudo molecular como *outgroup* e analisada separadamente.

Análise de RAPD

Reações RAPD-PCR foram realizadas em um volume final de 13 μl contendo 1,3 μl 10 \times tampão de reação PCR (Invitrogen®), 0,4 μl 10 μM primer (Operon Technologies), 2 μl 1,25 mM dNTPs (Invitrogen®), 0,2 μl 5U μl^{-1} Taq DNA polimerase (Phoneutria Biotecnologia & Serviços) e 3 μl DNA genômico total (3 ng μl^{-1}) de cada população de nematoide. Na análise foram utilizados 30 oligonucleotídeos decâmeros e aleatórios (Operon Technologies): OPA-02 (TGCCGAGCTG), OPA-07 (GAAACGG GTG), OPA-12 (TCGGCGATAG), OPA-13 (CAGCACCCAC), OPAB-02 (GGAAACCCCT), OPAB-03 (TGGCGCACAC), OPAB-06 (GTGGCTTGGA), OPF-06 (GGGAATTCGG), OPG-02 (GGCACTGAGG), OPG-04 (AGCGTGTCTG), OPG-13 (CTCTCCGCCA), OPJ-09 (TGAGCCTCAC), OPJ-20 (AAGCGGCCTC), OPK-19 (CACAGGCGGA), OPL-12 (GGGCGGTACT), OPM-10 (TCTGGCGCAC), OPM-20 (AGGTCTTGGG), OPN-07 (CAGCCCAGAG), OPN-10 (ACAACCTGGGG), OPP-02 (TCGGCACGCA), OPQ-10 (TGTGCCCCGAA), POR-07 (ACTGGCCTGA), OPS-20 (TCTGGACGGA), OPU-05 (TTGGCGGCCT), OPV-02 (AGTCACTCCC), OPV-07 (GAAGCCAGCC), OPW-05 (GGCGGATAAG), OPX-16 (CTCTGTTCGG), OPY-05 (GGCTGCGACA), OPZ-04 (AGGCTGTGCT). A amplificação foi realizada em um termociclador PTC-100, usando as seguintes configurações: 5 min a 94 °C; 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 36 °C, 2 min a 70 °C; e extensão final de 10 min a 70 °C (Randig *et al.*, 2002). Os produtos PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), corados com brometo de etídio (0,3 $\mu\text{g ml}^{-1}$) e visualizados sob luz UV. Todas as análises RAPD foram repetidas pelo menos duas vezes.

Análise de AFLP

Para cada isolado, 1 µg de DNA genômico total foi digerido *overnight* a 37 °C com EcoRI (15 U µl⁻¹; Invitrogen) e ligado aos adaptadores específicos, seguindo o método de Suazo & Hall (1999). Foi utilizada uma série de sete primers aleatórios (Tecnologias Integradas de DNA), consistindo na sequência de núcleo adaptado EcoRI 5' - GACTGCGTACCAATTCAGT-3' mais os 3 nucleotídeos seletivos (AGT, ACT, ATT, GGC, CAG, CCT e TCG). As reações de PCR foram realizadas num volume final de 25 µl contendo 1 µl (50 ng µl⁻¹) de DNA digerido, 2,5 µl 10× Tampão PCR sem cloreto de magnésio (Invitrogen®), 1 µl 50 mM MgCl₂, 0,5 µl 10 mM dNTPs, 1 µl 10 µM primer e 0,3 µl Taq DNA polimerase (5 U µl⁻¹; Invitrogen®). O DNA foi amplificado usando termociclador PTC100 (MJ Research) sob os seguintes parâmetros cíclicos: 1 min a 95 °C; 37 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 56 °C, 2 min e 30 s a 72 °C; e extensão final de 10 min a 72 °C (Suazo & Hall, 1999). Os produtos PCR foram separados por eletroforese em gel 1,5% (p/v) (0,7% agarose, 0,4% synergel; Diversified Biotech), corados com brometo de etídio (0,3 µg ml⁻¹) e fotografados sob luz UV. A análise foi repetida pelo menos duas vezes.

Análise filogenética

Os fragmentos de sequências de DNA obtidas com marcadores AFLP e RAPD foram usados para inferir a diversidade genética de 16 populações de *Meloidogyne* spp. do arroz mais uma população de *M. enterolobii* usada como *outgroup*. Para cada tipo de marcador, as bandas amplificadas foram caracterizadas como presentes ou ausentes nas imagens digitalizadas dos géis e convertidas em uma matriz binária 0-1. A reconstrução filogenética foi realizada usando o algoritmo Neighbour-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) em PAUP* versão 4b10 (Swofford, 2002), considerando os dados como não ordenados e sem ponderação. A confiabilidade de cada nó para as árvores resultantes foi avaliada por meio de bootstrap com 1000 repetições e usando um valor de corte de 50%. Como os dois tipos de marcadores

podem ser considerados independentes, os dois conjuntos de dados foram analisados em uma análise global de NJ usando a abordagem de evidência total proposta por Huelsenbeck *et al.* (1996) com as mesmas configurações como as utilizadas para a análise individual de NJ.

Avaliação da resistência de *Oryza* spp. a *Meloidogyne* spp

O Banco de Germoplasma da Embrapa Arroz e Feijão (Goiás, Brasil) forneceu as sementes de arroz. As espécies selvagens avaliadas neste estudo foram *O. glumaepatula*, *O. grandiglumis*, *O. alta* e *O. longistaminata*. As espécies cultivadas *O. glaberrima* e *O. sativa* também foram incluídas neste estudo. *Oryza sativa* cv. BR-IRGA 410 foi o controle suscetível (Tabela 2).

Tabela 2. Origem das espécies de *Oryza* utilizadas no estudo.

Espécies	Genótipo	Origem
<i>O. glumaepatula</i>	BGA14179 ¹	Brasil (MS) ³
<i>O. glaberrima</i>	BGA 2712 ¹	Filipinas
<i>O. grandiglumis</i>	BGA 13958 ¹	Brasil (AM) ³
<i>O. alta</i>	BGA 14258 ¹	Brasil (TO) ³
<i>O. longistaminata</i>	BGA 7383 ¹	Costa do Marfim
<i>O. sativa</i>	BR IRGA 410 ²	Cedida para estudo

¹ Estes códigos pertencem ao Banco de Germoplasma de Arroz e Feijão da Embrapa (Goiás, Brasil).

² Variedade comercial de arroz.

³ Estados brasileiros: MS – Mato Grosso do Sul; AM – Amazonas; TO – Tocantins.

Os experimentos foram repetidos uma vez em casa-de-vegetação na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: primeiro ensaio (*M. ottersoni* (Est O0) e *M. graminicola* G2 (Est R2) de março a maio de 2018; *M. oryzae* (Est O1) e *M. graminicola* G3 (Est R3) - de fevereiro a abril de 2019); e segundo ensaio (*M. ottersoni* e *M. graminicola* G2 - de junho a setembro de 2018; *M. oryzae* e *M. graminicola* G3 - de julho a outubro de 2019). Oito plantas de cada espécie foram plantadas em vasos contendo uma mistura (1:1) de solo autoclavado e composto Bioplant. As plântulas com quatro folhas verdadeiras (estádio V4) foram inoculadas

com 5000 ovos de *M. ottersoni*, *M. oryzae*, *M. graminicola* G2 e *M. graminicola* G3, em delineamento experimental inteiramente casualizado. As plantas foram regadas e adubadas conforme necessário. Três a quatro meses após a inoculação os sistemas radiculares foram enxaguados em água corrente, pesados e os ovos dos nematoides extraídos usando 1% de NaOCl de acordo com a metodologia de Hussey & Barker (1973) modificada. O número total de ovos por planta foi determinado sob microscópio ótico usando lâmina de Peter.

Análise de Dados

O fator de reprodução (FR) foi calculado como $FR = Pf/Pi$, onde Pf = população final do nematoide e Pi = população inicial (5000 ovos) (Ostenbrink, 1966). As médias de número total de ovos, ovos/g de raiz e FR foram transformadas para $\log(x+1)$ e submetidas à análise de variância. As médias foram agrupadas pelo teste Scott-Knot ($P < 0,05$) e os genótipos foram classificados como altamente resistente (AR) quando $FR < 1$, e para as outras classificações considerou-se a análise estatística e os conceitos de Hussey & Janssen (2002) adaptados, onde o genótipo resistente (R) permite pouca reprodução do nematoide (<10% do genótipo suscetível). O genótipo moderadamente resistente (MR) permite uma taxa de reprodução intermediária: de 10 a 20% do genótipo resistente, e pouco resistente (PR) de 21 a 30 % do genótipo suscetível. Os demais > 30 % podem ser considerados suscetíveis.

RESULTADOS

Diversidade genética de *Meloidogyne* spp

O tamanho dos fragmentos amplificados variou entre 200 a 4000 pares de base (Fig. 1 A e B) e o número de fragmentos reproduzíveis variou de 30 a 325, em relação a ambos os marcadores (Tabela 3). Em geral, observou-se um alto nível de polimorfismo dentro dos três tipos de *M. graminicola* (Est VS1, R2 e R3) (83,76%) e para *M. ottersoni* (41,14%), ao passo que *M. oryzae* apresentou baixa variabilidade (17,85%). A matriz binária 0-1

(ausência/presença de fragmentos) obtida de ambos os marcadores foi utilizada para inferir filogenia entre os isolados através de uma árvore de Neighbour-Joining (NJ) (Fig. 2). Os resultados do dendograma de NJ mostraram que isolados de cada espécie de *Meloidogyne* e de diferentes populações de *M. graminicola* (G1, G2, G3) subagruparam com suporte de 100% de bootstrap, embora haja uma proximidade genética entre essas espécies advindas do arroz irrigado (99%). As populações se agruparam na árvore filogenética de acordo com as espécies e os perfis de esterase para *M. graminicola* (Est VS1, Est R2, Est R3) (Tabela 1). *Meloidogyne salasi* mostrou-se geneticamente distante das outras espécies, agrupando-se separadamente.

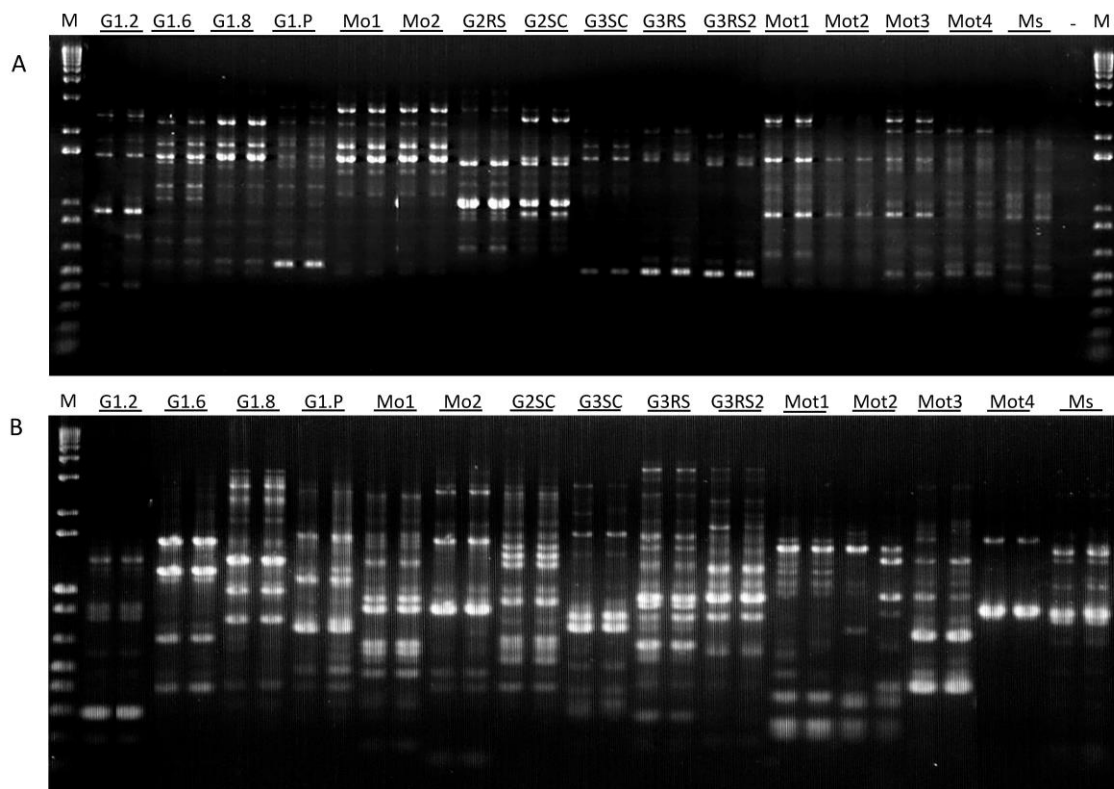


Figura 1. Polimorfismo de fragmentos de DNA gerados de populações de *Meloidogyne* spp. de arroz irrigado: A) pelo primer RAPD OPA-12 (TCGGCGATAG) e B) pelo primer AFLP 02 (GACTGCGTACCAATTCAGT ACT). Cada isolado foi analisado em duplicata e corrido lado a lado; M: marcador de peso molecular 1kb. Códigos das populações na Tabela 1.

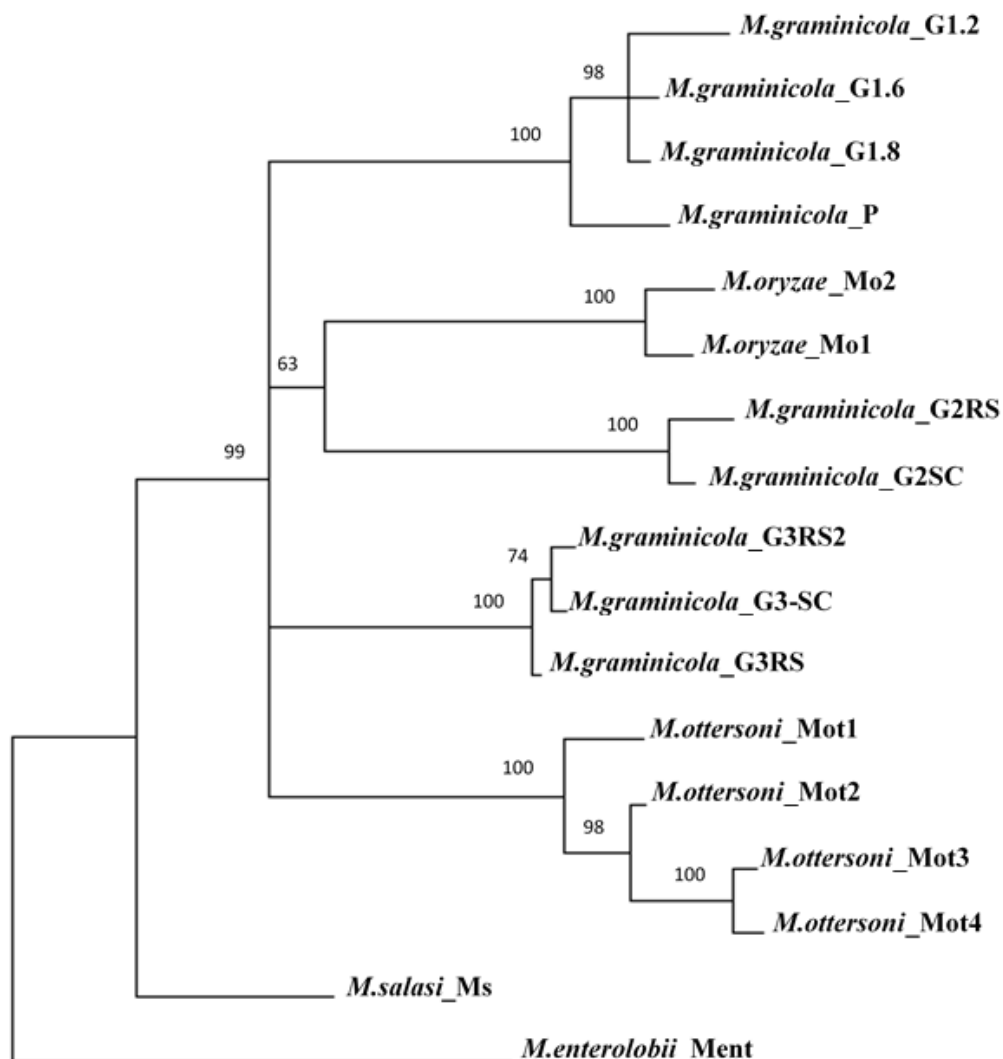


Figura 2. Árvore concatenada de Neighbour-Joining (NJ) mostrando a variabilidade genética (RAPD e AFLP) de populações de *Meloidogyne* spp. parasitas do arroz. Números a esquerda dos braços são os valores de bootstrap de 1000 réplicas.

Tabela 3. Visão geral dos dados de RAPD e AFLP entre os isolados de *Meloidogyne* spp.

ESPÉCIES	Nº DE FRAGMENTOS RAPD AMPLIFICADOS	Nº DE BANDAS POLIMÓFICAS (% DE POLIMORFISMO)
<i>Meloidogyne graminicola</i> (G1, G2 e G3)	388	325(83,67)
<i>Meloidogyne oryzae</i>	168	30 (17,85)
<i>Meloidogyne ottersoni</i>	174	72 (41,14)

Avaliação da resistência de *Oryza* spp. a *Meloidogyne* spp.

Os resultados dos ensaios de resistência são apresentados nas Tabelas 4, 5, 6, 7 e 8. Todas as espécies de NG testadas foram capazes de se reproduzir em *O. sativa* (controle), apresentando elevados valores de FR em ambos os ensaios: primeiro ensaio (FR entre 53,80 e 273,37) e segundo (FR entre 27,03 e 371,92) em condições de sequeiro. *Meloidogyne ottersoni* apresentou maiores valores de FR no primeiro ensaio (Tabela 4) e *M. graminicola* G3 no segundo (Tabela 8); os menores valores de FR em *O. sativa* foram apresentados por *M. oryzae* (Tabela 7), mostrando ser a espécie menos agressiva.

Como os FR de *O. sativa* foram muito altos (Tabelas 4-8), todas as espécies selvagens de *Oryza*, assim como *O. glaberrima* apresentaram um certo nível de resistência a todas às três espécies e populações de NG testadas.

Oryza alta, *O. glaberrima*, *O. glumaepatula* e *O. grandiglumis* foram classificadas como altamente resistentes (AR) ou resistentes (R) a *M. ottersoni* (Tabela 4), *M. oryzae* (Tabela 7) e *M. graminicola* G2 (Tabela 6). Já para *M. graminicola* G3, a mais agressiva, essas quatro espécies de arroz foram apenas resistentes. Para *M. oryzae*, com exceção de *O. longistaminata* considerada resistente (R), todas as plantas foram altamente resistentes (AR).

Tabela 4. Reação de seis genótipos de *Oryza* spp. a *Meloidogyne ottersoni* 90-120 dias após inoculação com 5000 ovos.

Ensaio 1 (Mar/Abr/Maio)					
Genótipo	Peso fresco da raiz (g)	Total de ovos*	Ovos/g de raiz*	Fator de Reprodução ^{1*}	Fenótipo ²
<i>Oryza sativa</i>	8,69 b	354083,3 a	45827,45 a	70,82 a	S (controle)
<i>O. glumaepatula</i>	10,0 b	625,0 d	50,10 c	0,13 d	AR
<i>O. grandiglumis</i>	41,69 a	16666,7 b	446,65 b	3,33 c	R
<i>O. glaberrima</i>	11,25 b	1166,7 d	112,99 c	0,23 d	AR
<i>O. longistaminata</i>	45,43 a	79761,9 b	2290,73 b	15,95 b	PR
<i>O. alta</i>	34,75 a	2375,0 c	75,80 c	0,48 d	AR
CV%	50,68	22,72	27,00	46,48	-

Ensaio 2 (Jun/Jul/Ago/Set)					
Genótipo	Peso fresco da raiz (g)	Total de ovos*	Ovos/g de raiz*	Fator de Reprodução ^{1*}	Fenótipo ²
<i>Oryza sativa</i>	52,21 b	1859625 a	35633,17 a	371,92 a	S (controle)
<i>O. glumaepatula</i>	36,13 b	333 c	9,75 b	0,067 b	AR
<i>O. grandiglumis</i>	102,56 a	10042 b	109,76 b	2,01 b	R
<i>O. glaberrima</i>	20,50 b	0,0 c	0,0 b	0,0 b	AR
<i>O. longistaminata</i>	84,74 a	32375 b	405,24 b	6,48 b	R
<i>O. alta</i>	74,06 a	2250 b	31,02 b	0,45 b	AR
CV%	25,93	36,18	43,59	52,02	-

* Médias (8 repetições) transformadas em $[\log_{10}(x+1)]$. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

¹Fator de reprodução = População final/5000 ovos

² S - suscetível; PR- pouco resistente, MR - moderadamente resistente; R - resistente; AR - altamente resistente

Tabela 5. Comparação entre *Oryza glaberrima* não inoculada e inoculada com 5000 ovos de *Meloidogyne ottersoni*.

	<i>O. glaberrima</i> Não-inoculada*	<i>O. glaberrima</i> Inoculada*	<i>O. sativa</i> *	CV%
Peso fresco da raiz	21,75 b	17,56 b	75,44 a	22,6
Ovos/g de raiz*	-	143,08 b	2746,02 a	26,68
FR*¹	-	0,33 b (AR)	40,54 a (S)	29,55

*Médias (6 repetições) transformadas em $\log(x+1)$. Médias seguidas por letras diferentes na linha são significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

¹Fator de reprodução = População final/5000 ovos.

² S - suscetível; PR- pouco resistente, MR - moderadamente resistente; R - resistente; AR - altamente resistente

Tabela 6. Reação de seis genótipos de *Oryza* spp. a *Meloidogyne graminicola* G2, 90-120 dias após inoculação com 5000 ovos.

Ensaio 1 (Mar/Abr/Maio)					
Genótipo	Peso fresco da raiz (g)	Total de ovos*	Ovos/g de raiz*	Fator de Reprodução ^{1*}	Fenótipo ²
<i>Oryza sativa</i>	13,38 b	269000,00 a	21886,63 a	53,80 a	S (controle)
<i>O. glumaepatula</i>	17,88 b	1291,70 b	92,86 b	0,26 c	AR
<i>O. grandiglumis</i>	82,00 a	15708,30 b	179,19 b	3,14 b	R
<i>O. glaberrima</i>	15,13 b	6166,70 b	749,31 b	1,23 b	R
<i>O. longistaminata</i>	63,86 a	33857,10 b	499,92 b	6,77 b	MR
<i>O. alta</i>	57,75 a	3958,30 b	56,71 b	0,79 c	AR
CV%	55,89	25,04	29,80	56,52	-
Ensaio 2 (Jun/Jul/Ago/Set)					
Genótipo	Peso fresco da raiz (g)	Total de ovos*	Ovos/g de raiz*	Fator de Reprodução ^{1*}	Fenótipo ²
<i>Oryza sativa</i>	77,32 c	1601875 a	21828,78 a	320,37 a	S (controle)
<i>O. glumaepatula</i>	57,50 c	292 d	5,71 c	0,06 c	AR
<i>O. grandiglumis</i>	146,19 a	8083 b	55,25 b	1,62 b	R
<i>O. glaberrima</i>	27,00 d	667 c	41,45 b	0,13 c	AR
<i>O. longistaminata</i>	91,50 b	28667 b	433,73 b	5,73 b	R
<i>O. alta</i>	99,37 b	792 c	9,23 c	0,16 c	AR
CV%	36,61	27,03	37,53	49,48	-

* Médias (8 repetições) transformados em $[\log_{10}(x+1)]$. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott ($P < 0,05$)

¹Fator de produção = População final/5000 ovos

² S - suscetível; PR- pouco resistente, MR - moderadamente resistente; R - resistente; AR - altamente resistente

No segundo ensaio, um número significativo de plantas de *O. glaberrima* morreu (FRs = 0), quando inoculadas com *M. ottersoni*. Essas plantas também apresentaram folhas amareladas e sistema radicular atrofiado quando infectadas por esse nematoide. Essa observação levou a outro ensaio complementar, comparando *O. glaberrima* inoculada com *M. ottersoni* e plantas não-inoculadas. Após dois meses, apesar das plantas inoculadas apresentarem sistema radicular reduzido em comparação com as não inoculadas (Figura 3), não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa do peso fresco da raiz (Tabela 5). Essa figura mostrando redução do sistema radicular e a mortalidade das plantas de *O. glaberrima* no segundo ensaio evidenciaram o que foi definido como intolerância a *M. ottersoni* por Roberts (2002): plantas que são danificadas e crescem menos ou mesmo morrem quando são infectadas. Esse fenômeno não ocorreu para outras espécies de *Meloidogyne*.

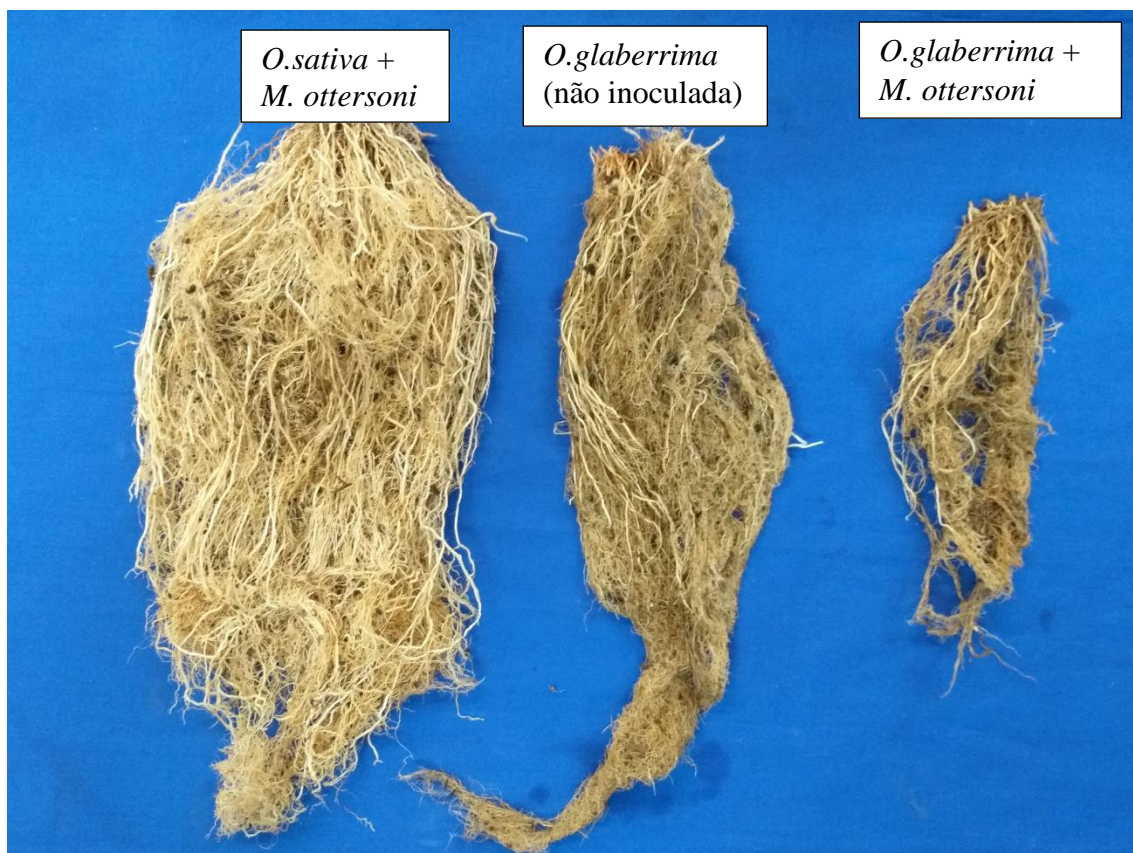


Figura 3. Raízes de *Oryza sativa* e *O. glaberrima* inoculadas com *Meloidogyne ottersoni* e *O. glaberrima* não inoculada.

Tabela 7. Reação de seis genótipos de *Oryza* spp. a *Meloidogyne oryzae* 90-120 dias após inoculação com 5000 ovos.

Ensaio 1 (Mar/Abr/Maio)					
Genótipo	Peso fresco da raiz (g)	Total de ovos*	Ovos/g de raiz*	Fator de Reprodução ^{1*}	Fenótipo ²
<i>Oryza sativa</i>	54,67 c	992333,33 a	18892,92 a	198,47 a	S (controle)
<i>O. glumaepatula</i>	41,13 c	2791,67 c	50,48 c	0,56 c	AR
<i>O. grandiglumis</i>	101,44 a	3208,33 c	32,39 c	0,64 c	AR
<i>O. glaberrima</i>	9,80 d	266,67 c	26,67 c	0,05 c	AR
<i>O. longistaminata</i>	70,25 b	18500,00 b	268,59 b	3,70 b	R
O. alta	52,00 c	1857,14 c	37,39 c	0,37 c	AR
CV%	35,75	41,06	41,91	61,98	
Ensaio 2 (Jun/Jul/Ago/Set)					
Genótipo	Peso fresco da raiz (g) *	Total de ovos*	Ovos/g de raiz*	Fator de Reprodução ^{1*}	Fenótipo ²
<i>Oryza sativa</i>	40,25 b	135166,67 a	3397,63 a	27,03 a	S (controle)
<i>O. glumaepatula</i>	26,44 c	250,00 d	6,54 d	0,05 c	AR
<i>O. grandiglumis</i>	61,06 a	875,00 c	15,80 c	0,18 c	AR
<i>O. glaberrima</i>	16,81 c	208,33 d	11,39 d	0,42 c	AR
<i>O. longistaminata</i>	25,83 c	10222,22 b	410,33 b	2,04 b	R
O. alta	32,50 b	791,67 c	29,67 c	0,16 c	AR
CV%	31,24	49,07	46,16	50,68	

* Médias (8 repetições) transformados em $[\log_{10}(x+1)]$. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott ($P < 0,05$)

¹Fator de produção = População final/5000 ovos

² S - suscetível; PR- pouco resistente, MR - moderadamente resistente; R - resistente; AR - altamente resistente

Oryza longistaminata apresentou variabilidade quanto aos fatores de reprodução e reações para os diferentes nematoides, nos diferentes ensaios, sendo considerada como pouco resistente (FR = 15,95) e resistente (FR = 6,48) para *M. ottersoni* (Tabela 4). No ensaio com *M. graminicola* G3 os fatotes de reprodução variaram de pouco resistente (FR = 58,75) no primeiro ensaio para resistente (FR = 8,71) no segundo ensaio (Tabela 8). Essa variação deve-se, provavelmente, a possíveis introgressões com *O. sativa*.

Tabela 8. Reação de seis genótipos de *Oryza* spp. a *Meloidogyne graminicola* G3, 90-120 dias pós-inoculação com 5000 ovos.

Ensaio 1 (Mar/Abr/Maio)					
Genótipo	Peso fresco da raiz (g)	Total de ovos*	Ovos/g de raiz*	Fator de Reprodução ^{1*}	Fenótipo ²
<i>Oryza sativa</i>	41,19 c	1366833,33a	41778,66 a	273,37 a	S (controle)
<i>O. glumaepatula</i>	50,81 c	11705,33 c	353,43 c	2,34 d	R
<i>O. grandiglumis</i>	70,19 b	9416,67 d	138,91 c	1,88 d	R
<i>O. glaberrima</i>	23,86 d	90714,29 b	3461,19 b	18,14 c	R
<i>O. longistaminata</i>	111,00 a	268750,00 b	3445,01 b	58,75 b	PR
<i>O. alta</i>	79,44 b	44500,00 b	553,42 b	8,9 c	R
CV%	32,63	22,00	26,81	44,38	-
Ensaio 2 (Jun/Jul/Ago/Set)					
Genótipo	Peso fresco da raiz (g)	Total de ovos*	Ovos/g de raiz*	Fator de Reprodução ^{1*}	Fenótipo ²
<i>Oryza sativa</i>	51,38 a	963791,67 a	19627,09 a	192,76 a	S (control)
<i>O. glumaepatula</i>	34,43 b	63523,81 b	2025,14 b	2,70 b	R
<i>O. grandiglumis</i>	49,13 a	6750,00 d	156,51 d	1,35 d	R
<i>O. glaberrima</i>	17,44 c	19750,00 c	1322,70 c	3,95 c	R
<i>O. longistaminata</i>	31,10 b	43533,33 b	1366,20 b	8,71 b	R
<i>O. alta</i>	40,31 a	22125,00 c	586,02 c	4,43 c	R
CV%	35,16	24,61	24,87	34,02	-

* Médias (8 repetições) transformados em $[\log_{10}(x+1)]$. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott ($P < 0,05$)

¹Fator de produção = População final/5000 ovos

² S - suscetível; PR- pouco resistente, MR - moderadamente resistente; R - resistente; AR - altamente resistente

DISCUSSÃO

Meloidogyne graminicola é uma espécie de nematoide importante em arroz irrigado, com reprodução partenogenética meiótica e relatado em muitos países produtores de arroz. Segundo a literatura, essa espécie apresenta alta variabilidade genética, biológica e enzimática (Bellafiore *et al.*, 2015; Mattos *et al.*, 2017).

A região ITS (Internal Transcribed Spacer) foi amplamente estudada para *M. graminicola* e a presença de polimorfismos nesta região foi usada para determinar as relações filogenéticas entre isolados dos EUA, Índia e Bangladesh (Pokharel *et al.*, 2007). Estudos com isolados de *M. graminicola* de diferentes países revelaram variabilidade entre as populações asiáticas e norte-americana. Foi observada a formação de dois grupos distintos na árvore filogenética (ITS) gerada, além de apresentarem diferentes graus de agressividade, inclusive para variedades de *O. sativa* (Pokharel *et al.*, 2007).

Bellafiore *et al.* (2015) estudaram a variabilidade intraespecífica de 21 isolados de *M. graminicola* do Vietnã, e detectaram alta variabilidade genética, cerca de 4 haplótipos diferentes usando a região ITS e dois patótipos em testes com genótipos diferentes de *O. sativa*.

No presente estudo foi observado alta variabilidade genética (83,76%) para nove populações de *M. graminicola* (G1, G2 e G3), com diferentes fenótipos de esterase (Est VS1, R2 e R3) do Brasil, através de marcadores AFLP e RAPD. Este é o primeiro estudo de variabilidade genética com marcadores neutros considerando os três fenótipos enzimáticos. Anteriormente, Mattos *et al.* (2019) encontraram alta variabilidade (72,5%) entre seis populações de *M. graminicola* (todas Est VS1).

Meloidogyne chitwoodi Golden, O'Bannon, Santo & Finley, 1980, outra espécie de NG que se reproduz por partenogênese meiótica e possui ampla gama de hospedeiras, também mostrou uma variabilidade intraespecífica significativa para o DNA mitocondrial em um

estudo com quatro populações dos EUA (Humphreys-Pereira & Elling, 2013). *Meloidogyne chitwoodi* é conhecido por ter quatro raças fisiológicas e dois patótipos e uma alta variabilidade genética também detectada através de marcadores neutros (AFLP e RAPD) (Schmitz *et al.*, 1998; Fargette *et al.*, 2005; Devran *et al.*, 2009).

Devran *et al.* (2009) detectaram alto polimorfismo de fragmentos de RAPD (35 primers testados) entre doze populações meióticas de *M. chitwoodi*. No entanto, todas as populações foram agrupadas com bootstrap alto, separando-se de outras espécies de *Meloidogyne*, e subdividindo-se em cinco pequenos grupos, relacionados com a origem geográfica. De maneira semelhante, pode-se observar no presente estudo que todas as populações de *M. graminicola* foram agrupadas com bootstrap alto e separadas de outras espécies de *Meloidogyne* (*M. salasi* e *M. ottersoni*, *M. enterolobii*).

Meloidogyne exigua, outra espécie partenogênica meiótica, apresentou alta variabilidade genética (59,6%) entre 15 isolados provenientes de café no Brasil, Bolívia e Costa Rica (Muniz *et al.*, 2008), mas todas as populações se agruparam com 100% de confiabilidade de bootstrap. Além disso, quatro perfis de esterase (E1, E2, E2a e E3) e três de malato desidrogenase (N1, N1a, N2) relatados para *M. exigua* foram detectados. Uma população de *M. exigua* de Bom Jesus de Itabapoana (RJ) mostrou-se virulenta em uma cultivar de café resistente (IAPAR 59), que carrega o gene de resistência *Mex-1*, mostrando que a alta variabilidade genética de um patógeno pode estar relacionada com a quebra de resistência (Muniz *et al.*, 2009).

Este é o primeiro estudo com marcadores neutros para acessar a diversidade genética de *M. ottersoni*, que apresentou 18 cromossomos (capítulo 2), reprodução por partenogênese meiótica e variabilidade intraespecífica alta (41,14%), representada por quatro populações dessa espécie. Estes estudos são importantes para futuros programas de melhoramento que visem incorporar resistência em arroz cultivado a espécies de *Meloidogyne*.

Por outro lado, os dois isolados de *M. oryzae*, uma espécie mitótica partenogenética, apresentaram baixa variabilidade genética (17,85%), semelhante a outras espécies com o mesmo modo de reprodução, como *M. incognita* e *M. javanica* (Santos *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014; Mattos *et al.*, 2016) e confirmando resultados anteriores de Mattos *et al.* (2019a), que observaram uma variabilidade de 12,9% nesta espécie.

Santos *et al.* (2012) estudaram 12 populações de *M. incognita*, com três diferentes perfis de esterase (I1, I2 e S2) e observaram um polimorfismo de 33% entre as populações. O polimorfismo detectado entre populações com o mesmo perfil enzimático, apresentaram valores baixos, entre 13-15,4%. Silva *et al.* (2013) e Mattos *et al.* (2016) relataram aproximadamente 2,7% e 15,4% de polimorfismo, quando estudaram populações de *M. incognita* de algodão e soja, respectivamente, de áreas nativas do Cerrado.

A espécie *M. oryzae* apresentou-se bem distinta de *M. graminicola* em aspectos morfológicos e enzimáticos (Mattos *et al.*, 2018), apesar da proximidade com as variantes de *M. graminicola*, como apresentado no dendograma deste trabalho. Essa proximidade genética pode estar relacionada com a recente especiação dessas espécies adaptadas ao arroz irrigado e às origens geográficas próximas as das populações estudadas (Besnard *et al.*, 2019). Entretanto, usando marcador ITS, essa espécie se separou perfeitamente de *M. graminicola* (Negretti *et al.*, 2017), se agrupando com as espécies partenogenéticas meióticas. Estudos adicionais de variabilidade com um maior número de populações de *M. oryzae* se fazem necessários.

A população de *M. salasi* mostrou-se geneticamente distante das outras espécies de *Meloidogyne* incluídas neste estudo. Não há informações na literatura sobre a diversidade genética desse nematoide. Atualmente, esta espécie é encontrada na Costa Rica, Panamá e Venezuela (López, 1985; Medina *et al.*, 2005). Alguns estudos relataram alta incidência e reprodutibilidade desta espécie em cultivos de arroz (Sancho & Salazar, 1987; Medina *et al.*,

2011); também foi observada alta agressividade da população de *M. salasi* durante este estudo na cultivar BR-IRGA 410 (arroz irrigado) em condições de casa de vegetação em comparação com as populações de *M. graminicola* e *M. oryzae*, (Vanessa Mattos, comunicação pessoal). Faz-se necessário o aprofundamento dos estudos citogenéticos, bioquímicos e moleculares para esta espécie, que não ocorre no Brasil.

Neste estudo, *O. glumaepatula* foi considerado altamente resistente ou resistente em todos os ensaios para todas as espécies de *Meloidogyne*. Da mesma forma, Mattos *et al.* (2019b) relataram que *O. glumaepatula* teve a capacidade de impedir a reprodução do nematoide, mostrando baixos valores de FR.

Entre as três espécies selvagens brasileiras do gênero *Oryza*, apenas *O. glumaepatula* pertence ao mesmo grupo genético que *O. sativa*, diploide e genoma AA (Brondani *et al.*, 2003), sendo possível transferir genes de *O. glumaepatula* para *O. sativa*, a fim de melhorar a resistência a estresses abiótico e biótico (Brondani *et al.*, 2005). Estudo anterior revelou que os acessos de *O. glumaepatula* têm níveis elevados de proteínas totais como albumina e glutelina, e alguns aminoácidos como lisina, que são importantes para a digestibilidade e de valor nutricional (Santos *et al.*, 2013). Várias pesquisas indicam que *O. glumaepatula* é uma espécie de arroz autógama formando linhas puras dentro das populações e aumentando as diferenças entre populações (Ge *et al.*, 1999; Karasawa *et al.*, 2007). Vários estudos tentaram desenvolver algum uso prático da variação genética dentro do *O. glumaepatula* (Ikeda *et al.*, 1999; Sobriza *et al.*, 2000). No entanto, outros estudos sobre a resistência do *O. glumaepatula* se fazem necessários. Mattos *et al.* (2019b) demonstraram que *O. glumaepatula* apresenta alta resistência a *M. graminicola* (Est VS1), em dois ensaios e o estudo atual confirma a multiresistência desse arroz selvagem a três espécies do nematoide das galhas, confirmando que *O. glumaepatula* constitui uma nova fonte de resistência para incorporação de genes em programas de melhoramento genético de *O. sativa* (Brondani *et al.*, 2002).

Zhan *et al.* (2018) avaliaram a reação de 136 variedades de *O. sativa* a *M. graminicola* na China e identificaram variação significativa no nível de agressividade em diferentes subpopulações. Esses autores relataram como um grande achado a alta resistência apresentada pelos híbridos Aus Shenliangyou 1 e híbridos indica Cliangyou 4418 e, principalmente, a variedade Aus Zhonghua 11. Análises das raízes infectadas de Zhonghua 11 revelaram penetração reduzida de nematoides, sugerindo uma prevenção ou um atraso na penetração dos juvenis, resultando em $FR < 1$ (Dimkpa *et al.*, 2016; Zhan *et al.*, 2018). Resposta similar foi exibida por *O. glumaepatula* que apresentou valores de FR inferiores a 1 em todos os ensaios para todas as espécies de NG estudadas, com exceção de *M. graminicola* G3 (apesar de ser considerada resistente), que foi considerada a população mais agressiva.

Oryza alta e *O. grandiglumis* são espécies tetraploides (CCDD) e pertencem ao complexo *O. officinalis* (Tateoka, 1963; Vaughan *et al.*, 2003). Neste estudo, *O. alta* mostrou alta resistência (AR) a *M. ottersoni*, *M. oryzae* e *M. graminicola* G2, apenas a *M. graminicola* G3 foi considerada apenas resistente (R). *Oryza grandiglumis* foi resistente a *M. ottersoni* e *M. graminicola* G2 e G3, e a *M. oryzae* mostrou alta resistência, provavelmente devido à baixa agressividade de *M. oryzae* demonstrada neste estudo, além da distribuição restrita (Negretti *et al.*, 2017; Mattos *et al.*, 2018). Mattos *et al.* (2019b) relataram *O. alta* e *O. grandiglumis* como moderadamente resistente e suscetível a *M. graminicola* (pool Est VS1), respectivamente. A literatura é carente de estudos sobre a reação de espécies de *Oryza* ao grupo de nematoides das galhas do arroz. Esse grupo de espécies é importante para esclarecer o processo de evolução e especiação do gênero *Meloidogyne* (Vaughan *et al.*, 2003; Rangel, 2008) em que a poliploidia é um mecanismo de especiação, resultante da combinação de duas espécies diploides (Ge *et al.*, 1999).

Agrupados no complexo *O. sativa*, o arroz africano *O. glaberrima* e *O. longistaminata* também têm o genoma AA (Rangel, 2008). Neste estudo, *O. longistaminata* se comportou

como pouco resistente, moderadamente resistente e resistente às espécies de nematoides avaliadas, variando também para ambas as populações de *M. graminicola* (MR/R para G2 e PR/R para G3). Resultados similares mostraram *O. longistaminata* como suscetível a *M. graminicola*, atingindo valores de cerca de metade aos obtidos para *O. sativa* (Mattos *et al.*, 2019b). Pesquisas anteriores relataram que *O. longistaminata* abriga resistência a vírus (Thottapilly & Rossel, 1993), bactérias (Zhang *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1996) e ao nematoide *M. graminicola* (Soriano *et al.*, 1999). Nesse trabalho os autores avaliaram quatro acessos de *O. longistaminata* e caracterizaram dois como sendo resistentes, um moderadamente resistente e um suscetível. Esses resultados se assemelham muito aos obtidos por Mattos *et al.* (2019b) e podem ser explicados por possíveis introgressões naturais ocorridas com *O. sativa* (Soriano *et al.*, 1999)

Além do mais, *O. longistaminata* é uma espécie alógama que apresenta características típicas: alta diversidade genética, alta frequência de heterozigose e grande número de alelos raros, introduzidos naturalmente, como endopeptidase e shikimato desidrogenase, frequentes em *O. sativa* (Ghesquière, 1988; Reuscher *et al.*, 2018). Esse fato poderia explicar a variabilidade observada nesta espécie. Entre as espécies com genoma AA, *O. longistaminata* assim como *O. barthii* A. Chev. e *O. meridionalis* N. Q. Ng., são grandes reservatórios de alelos inexplorados (Ghesquière, 1988; Reuscher *et al.*, 2018).

Oryza glaberrima é uma espécie de arroz nativo de importância econômica na África Ocidental que, apesar da baixa produtividade, tem muitas características agrícolas interessantes, tais como resistência a estresse biótico e abiótico (Linares, 2002). No presente estudo, *O. glaberrima* mostrou-se altamente resistente ou resistente a *M. ottersoni*, *M. oryzae*, *M. graminicola* G2 e mesmo para *M. graminicola* G3. Resultados similares mostraram dois genótipos de *O. glaberrima* como moderadamente resistentes ao pool de *M. graminicola* Est

VS1 (Mattos *et al.*, 2019b), confirmando os resultados deste estudo com *M. graminicola* G3, a população que apresentou maior agressividade.

Alguns acessos de *O. glaberrima*, como TOG5674 e TOG5675, apresentaram resistência a *M. graminicola* caracterizada por uma menor penetração e desenvolvimento do nematoide (Plowright *et al.*, 1999; Soriano *et al.*, 1999; Cabasan *et al.*, 2012; 2013). Cabasan *et al.* (2016) afirmaram que o aumento da temperatura afetou a eficácia da resistência em três acessos de *O. glaberrima*. Este fato foi mais pronunciado em TOG5674 e TOG5675 do que em CG14 a 31/34 °C. Plowright *et al.* (1999) mostraram que *O. glaberrima* fornece um alto nível de multiresistência a nematoides endoparasitas sedentários como *M. incognita*, *M. graminicola* e *Heterodera sacchari* Luc & Merni, 1963 e esta característica pode ser transferida para híbridos melhorados com *O. sativa*.

Os resultados obtidos neste estudo enfatizam um possível processo de especiação que essas populações de nematoides do arroz estão vivenciando, em condições naturais na região Sul do Brasil, pois misturas delas, exceto *M. ottersoni*, estão ocorrendo a campo (Negretti *et al.*, 2017). Além disso, o alto grau de resistência genética presente em *Oryza* spp. garante a possibilidade de busca e introgressão de genes de espécies parentais em *O. sativa*, para a obtenção de variedades comerciais com resistência múltipla a *Meloidogyne* spp., em programas de melhoramento a serem desenvolvidos pela EMBRAPA.

CONCLUSÕES

O estudo de diversidade mostrou alto nível de polimorfismo em espécies meióticas: *M. graminicola* e *M. ottersoni*.

Todos os nematoides se reproduziram bem na espécie de arroz suscetível *O. sativa*.

Oryza glumaepatula, *O. glaberrima*, *O. grandiglumis* e *O. alta* apresentaram resistência a todas as espécies e populações de nematoides avaliadas.

Oryza longistaminata apresentou maior variação fenotípica na resistência por ser alógama e apresentar introgressão com *O. sativa*.

Oryza glumaepatula e *O. glaberrima* são consideradas boas fontes doadoras de genes para *O. sativa*, pelo alto nível de resistência apresentado e por pertencerem ao mesmo grupo genômico de *O. sativa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELLAFIORE, S., JOUGLA, C., CHAPUIS, E., BESNARD, G., SUONG, M., VU, P. N., DEWAELE, D., GANTET, P., THI, X. N. 2015. Intraspecific variability of the facultative meiotic parthenogenetic root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) from rice fields in Vietnam. *Comptes Rendus Biologies*, 338(7):471-483.
- BESNARD, G., THI-PHAN, N., HO-BICH, H., DEREPPER, A., TRANG NGUYEN, H., QUÉNÉHERVÉ, P., ARIBI, J., BELLAFIORE, S. 2019. On the Close Relatedness of Two Rice-Parasitic Root-Knot Nematode Species and the Recent Expansion of *Meloidogyne graminicola* in Southeast Asia. *Genes*, 10(2):175.
- 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.
- BRIDGE, J., PLOWRIGHT, R.A., PENG, D. 2005. Nematodes parasites of rice. In: Luc, M., Sikora, R.A., Bridge, J. (Eds.). *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CABI, Wallingford. P. 87-130.
- BRONDANI, C., RANGEL P, BRONDANI R, FERREIRA M. 2002. QTL mapping and introgression of yield related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 104:1192–1203.
- BRONDANI, R. P. V., RANGEL, P. H. N., ZUCCHI, M. I., MAGALHAES, M. R., BORBA, T. C. O., VENCOVSKY, R., BRONDANI, C. 2003. Estrutura genética de populações silvestres de *Oryza glumaepatula* em três biomas brasileiros utilizando marcadores microssatélites. *Embrapa Arroz e Feijão. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. 28p.
- BRONDANI, R. P. V., ZUCCHI, M. I., BRONDANI, C., RANGEL, P. H. N., BORBA, T. C. D. O., RANGEL P. N., MAGALHÃES M. R., VENCOVSKY R. 2005. Genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* populations in three Brazilian biomes using microsatellite markers. *Genetica*, 125:115–123.

- CABASAN, M. T. N., BELLAFFIORE, S., KUMAR, A., DE WAELE, D. 2016. The effect of temperature on resistance in African rice (*Oryza glaberrima* Steud.) genotypes to the rice root-knot nematode *Meloidogyne graminicola*. *Nematropica*, 46(2):221-228.
- CABASAN, M. T. N., KUMAR, A., DE WAELE, D. 2012. Comparison of migration, penetration, development and reproduction of *Meloidogyne graminicola* on susceptible and resistant rice genotypes. *Nematology*, 14(4), 405-415.
- CABASAN, M. T. N., KUMAR, A., BELLAFFIORE, S., DE WAELE, D. 2013. Histopathology of the rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*, on *Oryza sativa* and *O. glaberrima*. *Nematology*, 16(1), 73-81.
- 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.; ALMEIDA, M. R. A.; QUÉNÉHERVÉ, P. 2000. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology*, 2:645-654.
- 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, New York, p.87–122.
- 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.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; MASUTTI, F. V.; LEROY, F. 1994. Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers. *Genome*, 37:904-909.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2018 <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253.pdf> Grãos: Safra 2017/2018. 09 de janeiro de 2020.

- CORREA, V. R., DOS 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. izalcoensis*. *European Journal of Plant Pathology*, 137(2):305-313.
- DE WAELE, D., ELSEN, A. 2007. Challenges in tropical plant nematology. *Annual Review of Phytopathology*, 45: 457-485.
- DEVTRAN, Z., MUTLU, N., OZARSLANDAN, A., ELEKCIOGLU, I. H. 2009. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne chitwoodi* in potato production areas of Turkey. p. 75-83.
- DIMKPA, S. O. N., LAHARI, Z, SHRESTHA. R., DOUGLAS. A., GHEYSEN. G., PRICE, A. 2016. A genome-wide association study of a global rice panel reveals resistance in *Oryza sativa* to root-knot nematodes. *Journal of Experimental Botany*, 67:1191–1200.
- DOUCET, M. E., PINOCHET, J. 1992. Occurrence of *Meloidogyne* spp. in Argentina. *Journal of Nematology*, 24(4S):765.
- DUTTA, T. K., GANGULY, A. K., GAUR, H. S. 2012. Global status of rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*. *African Journal of Microbiology Research*, 6(31):6016-6021.
- FANELLI, E., COTRONEO, A., CARISIO, L., TROCCOLI, A., GROSSO, S., BOERO, C., DE LUCA, F. 2017. Detection and molecular characterization of the rice root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 149:467-476. doi:10.1007/s10658-017-1196-7.
- FARGETTE, M., LOLLIER, V., PHILLIPS, M., BLOK, V., FRUTOS, R. 2005. AFLP analysis of the genetic diversity of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*, major agricultural pests. *Comptes Rendus Biologies*, 328(5):455-462.
- GE, S., OLIVEIRA, G. C., SCHAAL, B. A., GAO, L. Z., HONG, D. Y. 1999. RAPD variation within and between natural populations of the wild rice *Oryza rufipogon* from China and Brazil. *Heredity*, 82(6), 638-644.

- GHESQUIERE, A. 1988. Diversité génétique de l'espèce sauvage de riz, *Oryza longistaminata* A. Chev. & Roehr, et dynamique des flux géniques au sein du groupe *Sativa* en Afrique. Tese de Doutorado. Université de Paris-SUD, Paris, França.
- GILCES, C. T., SANTILLAN, D. N., VELASCO, L. 2016. Plant-parasitic nematodes associated with rice in Ecuador. *Nematropica*, 46(1), 45-53.
- HUELSENBECK, J. P., BULL, J. J., CUNNINGHAM, C. W. 1996. Combining data in phylogenetic analysis. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(4):152-158.
- HUMPHREYS-PEREIRA, D. A., ELLING, A. A. 2013. Intraspecific variability and genetic structure in *Meloidogyne chitwoodi* from the USA. *Nematology*, 15(3), 315-327.
- HUSSEY, R. S., BARKER, K. R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 75:1025–1028.
- HUSSEY, R. S., JANSSEN, G. J. W. 2002. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. Plant resistance to parasitic nematodes, 43-70.
- IKEDA, K.; SOBRIZAL, H.; SANCHEZ, P. L.; YASUI, H., YOSHIMURA, A. 1999. Hybrid weakness restoration gene (Rhw) for *Oryza glumaepatula* cytoplasm. *Rice Genetics Newsletter*, 16:62-64.
- JAIN, R. K., KHAN, M. R., KUMAR, V. 2012. Rice root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) infestation in rice. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45(6), 635-645.
- JENA, R.N.; RAO, Y.S. 1976. Nature of root-knot (*Meloidogyne graminicola*) resistance in rice (*Oryza sativa*). Isolation of resistant varieties. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences*, 83:177–184.
- KARASAWA, M. M., VENCOVSKY, R., SILVA, C. M., ZUCCHI, M. I., OLIVEIRA, G. C., VEASEY, E. A. 2007. Genetic structure of Brazilian wild rice (*Oryza glumaepatula* Steud., Poaceae) populations analyzed using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, 30(2), 400-410.
- KLEYNHANS, K. P. N. 1991. The root-knot nematodes of South Africa (No. 231)

- KYNDT, T., FERNANDEZ, D., GHEYSEN, G. 2014. Plant-parasitic nematode infections in rice: molecular and cellular insights. *Annual Review of Phytopathology*, 52: 135-153.
- LINARES, O. F. 2002. African rice (*Oryza glaberrima*): history and future potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 16360-16365.
- LÓPEZ, R. 1985. Variación de la densidad poblacional de segundos estadios juveniles de *Meloidogyne salasi* y *M. incognita* en el sureste de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 9(2), 115-119.
- LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. B. 2005. *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CABI Publications, 2:86-172.
- MAAS, P. W. T., SANDERS, H., DEDE, J. 1978. *Meloidogyne oryzae* n. sp. (Nematoda, Meloidogynidae) infesting irrigated rice in Surinam (South America). *Nematologica*, 24:305-361.
- MATTOS, V. S., CARES, J. E., GOMES, C. B., GOMES, A. C. M. M., MONTEIRO, J. M. S., GOMEZ, G. M., CASTAGNONE-SERENO, P., CARNEIRO, R. M. D. G. 2018. Integrative taxonomy of *Meloidogyne oryzae* (Nematoda: Meloidogyninae) parasitizing rice crops in Southern Brazil. *European Journal Plant Pathology*, 151:649-662. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1400-9>.
- MATTOS, V. S., FURLANETTO, C., SILVA, J. G., DOS SANTOS, D. F., ALMEIDA, M. R. A., CORREA, V. R., MOITA, A. W., CASTAGNONE-SERENO, P., CARNEIRO, R. M. 2016. *Meloidogyne* spp. populations from native Cerrado and soybean cultivated areas: genetic variability and aggressiveness. *Nematology*, 18(5), 505-515.
- MATTOS, V. S., LEITE, R. R., CARES, J. E., GOMES, A. C. M., MOITA, A. W., LOBO, V. L., CARNEIRO, R. M. 2019a. *Oryza glumaepatula*, a new source of resistance to *Meloidogyne graminicola* and histological characterization of its defense mechanisms. *Phytopathology*, 109(11), 1941-1948.
- MATTOS, S. V., MULET, K., CARES, J. E., GOMES, C. B., FERNANDEZ, D., SÁ, M. F. G., CARNEIRO, R. M. D. G., CASTAGNONE-SERENO, P. 2019b. Development of diagnostic SCAR markers for *Meloidogyne graminicola*, *M. oryzae*, and *M. salasi* associated with irrigated rice fields in Americas. *Plant disease*, 103(1):83-88.

- MATTOS, V. S., SOARES, M. R. C., GOMES, A. C. M. M., ARIEIRA, C. R. D., GOMES, C. B. CARNEIRO, R. M. D. G. 2017. Caracterização de um complexo de espécies do nematoide das galhas parasitando arroz irrigado na região sul do Brasil. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 331, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 28p.
- MEDINA, A., CROZZOLI, R., PERICHI, G. 2005. *Meloidogyne salasi* (Nematoda: Meloidogynidae) asociado con el cultivo del arroz en Venezuela. Fitopatologia Venezuelana, 18:66 (Resumen).
- MEDINA, A., CROZZOLI, R., PERICHI, G., JÁUREGUI, D. 2011. *Meloidogyne salasi* (NEMATODA: Meloidogynidae) en arroz en venezuela. Fitopatologia Venezuelana, 24:46-53.
- 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.
- MUNIZ, M. D. F. S., CAMPOS, V. P., MOITA, A. W., GONÇALVES, W., ALMEIDA, M. R. A., SOUSA, F. R. D., CARNEIRO, R. M. D. 2009. Reaction of coffee genotypes to different populations of *Meloidogyne* spp.: detection of a naturally virulent *M. exigua* population. Tropical Plant Pathology, 34(6), 370-378.
- NEGRETTI, R. R. R. D., GOMES, C. B., MATTOS, V. S., SOMAVILLA, L., MANICA-BERTO, R., AGOSTINETTO, D., CASTAGNONE-SERENO, P., CARNEIRO, R. M. G. 2017. Characterisation of a *Meloidogyne* species complex parasitising rice in Southern Brazil. Nematology, 19(4): 403-412.
- OOSTENBRINK, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. p. 8-10.
- PADGHAM, J. L., DUXBURY, J. M., MAZID, A. M., ABAWI, G. S., HOSSAIN, M. 2004. Yield loss caused by *Meloidogyne graminicola* on lowland rainfed rice in Bangladesh. Journal of Nematology, 36:42-48.

- PENG, D.; GAUR, H. S.; BRIDGE, J. 2018. Nematode parasites of Rice. In: Sikora, R. A., Coyne, D., Hallman, J., Timper, P. (Eds). Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CAB International, Wallingford, England, p. 120-162.
- PHAN, N. T., DE WAELE, D., LORIEUX, M., XIONG, L., BELLAFFIORE, S. 2018. A hypersensitivity-like response to *Meloidogyne graminicola* in rice (*Oryza sativa*). *Phytopathology*, 108(4):521-528.
- PLOWRIGHT, R. A., COYNE, D. L., NASH, P., JONES, M. P. 1999. Resistance to the rice nematodes *Heterodera sacchari*, *Meloidogyne graminicola* and *M. incognita* in *Oryza glaberrima* and *O. glaberrima* × *O. sativa* interspecific hybrids. *Nematology*, 1(7/8), 745-751.
- POKHAREL, R. R.; GEORGE, S. A., ZHANG, N., DUXBURY.: SMART, C. D. 2007. Characterization of isolates of *Meloidogyne* from rice-wheat production fields in Nepal. *Journal of Nematology*, 39(3):221-230.
- PRASAD, J. S., VIJAYAKUMAR, C. H. M., SANKAR, M., VARAPRASAD, K. S., SRINIVASA PRASAD, M., KONDALA RAO, Y. 2006. Root-knot nematode resistance in advanced backcross populations of rice developed for water stress conditions [*Oryza sativa* L.]. *Nematologia Mediterranea*, 34(1):3-8.
- 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.
- RANGEL, P. N. 2008. Utilização da espécie silvestre *Oryza glumaepatula* como doadora de alelos para aumento da produção e da tolerância à seca do arroz (*Oryza sativa*) via análise de AB-QTLs. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Goiás. Goiás, Brasil.
- REUSCHER, S., FURUTA, T., BESSHO-UEHARA, K., COSI, M., JENA, K. K., TOYODA, A., FUJIYAMA, A., KURATA, N., ASHIKARI, M. 2018. Assembling the genome of the African wild rice *Oryza longistaminata* by exploiting synteny in closely related *Oryza* species. *Communications Biology*, 1(1):1-10.

- ROBERTS, P. A. 2002 Concepts and consequences of resistance. In: Starr, J. L., Cook, R., Bridge, J. (Eds.) Plant resistance to parasitic nematodes. CAB International, Wallingford, p. 23–41.
- SAITOU, N., NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4):406-425.
- SANCHEZ, E., ESPINOZA, A. M. 2005. Ultrastructure of *Oryza glumaepatula*, a wild rice species endemic of tropical America. *Revista de Biología Tropical*, 53(1-2):15–22.
- SANCHO, C., SALAZAR, L., LOPEZ, R. 1987. Efecto de la densidad inicial del inóculo sobre la patogenicidad de *Meloidogyne salasi* en tres cultivares de arroz. *Agronomía Costarricense*, 11(2):233-238.
- SANTOS, A. V. E.; GOMES, C. B. 2011. Reação de cultivares de mamona a *Meloidogyne* spp. e efeito dos exsudatos radiculares sobre *Meloidogyne enterolobii* e *M. graminicola*. *Nematologia Brasileira*, 35:1-8.
- SANTOS, K. F., SILVEIRA, R. D. D., MARTIN-DIDONET, C. C. G., BRONDANI, C. 2013. Storage protein profile and amino acid content in wild rice *Oryza glumaepatula*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(1), 66-72.
- SANTOS, M. F. A.; FURLANETTO, C.; 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.
- 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.
- 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, E. H. da; MATTOS, V. da S.; FURLANETO, C.; GIBAND, M.; BARROSO, P. A. V.; MOITA, A. W.; JORGE JUNIOR, A.; CORREA, V. R.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R. M. D. G. 2014. Genetic variability and virulence of *Meloidogyne incognita* populations from Brazil to resistant cotton genotypes. *European Journal of Plant Pathology*, 139(1):195-204.
- SOBRIZAL, A., MATSUZAKI, Y., SANCHEZ, P. L., IKEDA, K., YOSHIMURA, A. 2000. Identification of a gene for male abortion in backcross progeny of *Oryza sativa* and *Oryza glumaepatula*. *Rice Genetics Newsletter*, 17:59-61.
- SORIANO, I.R., BRAR, D., REVERSAT, G., SCHMIT, V., PROT, J. C. 1999. Resistance to rice root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* identified in *Oryza longistaminata* and *O. glaberrima*. *Nematology*, 1(4), 395-398.
- SORIANO, I. R., REVERSAT, G. 2003. Management of *Meloidogyne graminicola* and yield of upland rice in South-Luzon, Philippines. *Nematology* 5: 879-884.
- SOSBAI: Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. 2018. Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil. Santa Maria, Brazil, SOSBAI.
- SUAZO, A., HALL, H. G. 1999. Modification of the AFLP protocol applied to honey bee (*Apis mellifera* L.) DNA. *Biotechniques*, 26(4), 704-709.
- SWOFFORD, D. L. (2002). PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 b10.
- TATEOKA, T. 1963. Taxonomic studies of *Oryza* III. Key to the species and their enumeration. *Botanical Magazine Tokio*, 76:165-173.
- THORNE, G. 1969. *Hypsoperine ottersoni* sp. n. (Nemata, Heteroderidae) infesting canary grass, *Phalaris arundinacea* (L.) reed in Wisconsin. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 36:98-102.
- THOTTAPILLY, G., ROSSEL, H. W. 1993. Evaluation of resistance to rice yellow mottle virus in *Oryza* species. *Indian Journal of Virology*, 9:6573.
- VAUGHAN, D. A., MORISHIMA, H., KADOWAKI, K. 2003. Diversity in the *Oryza* genus. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(2), 139-146.

ZHAN, L. P., DING, Z., PENG, D. L., HUAN, P. E. N. G., KONG, L. A., LIU, S. M., LIU, Y., LI, Z. C., HUAG, W. K. 2018. Evaluation of Chinese rice varieties resistant to the root-knot nematode *Meloidogyne graminicola*. Journal of Integrative Agriculture, 17(3):621-630.

ZHANG, Q., WANG, C. L., SHI, A. N., BAI, J. F., LING, S. C., LI, D. Y., CHEN, C. B., PANG, H. H. 1994. Evaluation of resistance to bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) in wild rice species. Scientia Agricola Sinica, 27:1-9.

Capítulo 4

HISTOPATOLOGIA COMPARADA DE *Oryza sativa* E *O. glumaepatula* QUANDO INFECTADAS COM *Meloidogyne graminicola*

HISTOPATOLOGIA COMPARADA DE *Oryza sativa* E *O. glumaepatula* QUANDO INFECTADAS COM *Meloidogyne graminicola*.

*Artigo publicado no periódico Phytopathology 2019. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-19-0044-R>. “*Oryza glumaepatula*, a new source of resistance to *Meloidogyne graminicola* and histological characterization of its defense mechanism.”

RESUMO

Meloidogyne graminicola causa danos significativos à cultura do arroz em todo o mundo. Fontes de resistência a *M. graminicola* registradas em *Oryza sativa* são limitadas. Resistência a esta espécie foi encontrada em outras espécies de *Oryza*, tais como *O. glaberrima* e *O. longistaminata*. Este estudo teve como objetivo determinar o mecanismo de resistência em *O. glumaepatula* a *M. graminicola*. Resultados de observações histológicas da interação de *O. glumaepatula* (resistente) quando inoculada com *M. graminicola* mostraram penetração reduzida de juvenis de segundo estágio (J₂) quando o acesso selvagem resistente foi comparado a *O. sativa* (suscetível). Uma intensa reação de hipersensibilidade (HR) ocorreu dois dias após a inoculação (DAI) no córtex radicular do acesso resistente. Poucos J₂s foram capazes de se estabelecer no cilindro central e raras células gigantes foram observadas colapsadas e rodeadas por fêmeas degeneradas. Microscopia de fluorescência em *O. glumaepatula* revelou células gigantes e o corpo das fêmeas exibindo acúmulo de compostos fenólicos. Pode-se distinguir 3 tipos de respostas de defesa na espécie selvagem: a) resistência pré-infectiva; b) resistência pós-infectiva precoce, com uma HR no córtex radicular; e c) uma resposta tardia apresentada pelo acúmulo de compostos fenólicos nas células gigantes e nas fêmeas. Esse estudo sugere que acessos selvagens de arroz, especialmente dos genótipos AA, tais como *O. glumaepatula*, são de grande interesse para usos futuros em programas de melhoramento de *Oryza* spp.

Palavras-chave: arroz, espécies selvagens de arroz, nematoide das galhas, reação de hipersensibilidade.

ABSTRACT

Meloidogyne graminicola causes significant damage to rice fields worldwide. Sources of resistance to *M. graminicola* reported in *Oryza sativa* are limited. Resistance to this species was found in other *Oryza* species, such as *O. glaberrima* and *O. longistaminata*. The objective of this study was to determine the resistance mechanism in *O. glumeapatula* to *M. graminicola*. Results of histological observations on the interaction of *O. glumeapatula* (resistant accession) inoculated with *M. graminicola* showed reduced penetration of second-stage juveniles (J2s) when compared this resistant wild accession to *O. sativa* (susceptible accession). An intense hypersensitivity response (HR)-like reaction occurred at 2 days after inoculation (DAI) in the root cortex of the resistant accession. Few J2s were able to establish themselves in the central cylinder, and rare collapsed giant cells were observed surrounded by degenerate females. Fluorescence microscopy in *O. glumeapatula* showed giant cells and female body presumably exhibiting accumulation of phenolic compounds. Three types of resistance mechanisms are distinguished: a) pre-infection resistance; b) early post-infection resistance, with a HR-like reaction in root cortex; and c) a later response due to accumulation of phenolic compounds in giant cells and female body. This study suggests that wild rice accessions, especially from the AA genotype, such as *O. glumeapatula*, are of great interest for use in future breeding programs with *Oryza* spp.

Keywords: hypersensitive response, rice, root-knot nematode, wild rice species.

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais importantes mundialmente e um alimento básico em muitos países, especialmente na Ásia e América Latina (Seck *et al.*, 2012; Kyndt *et al.*, 2014a; Negretti *et al.*, 2017). Fitonematoides de muitos gêneros estão associados ao arroz, dentre eles os mais importantes são as espécies de nematoides das galhas (NG) (Bridge *et al.*, 2005).

O nematoide das galhas do arroz, *M. graminicola* Golden and Birchfield, 1965, tem se tornado o nematoide parasita de arroz mais disseminado no mundo tanto em regiões tropicais como subtropicais. Esse nematoide causa perdas nos campos em larga escala (em torno de 11 a 80%) em sistemas de arroz irrigado na Ásia e nas Américas (Plowright & Bridge, 1990; Soriano *et al.*, 2000; Soriano & Reversat, 2003; De Waele & Elsen, 2007), e recentemente foi detectado no norte da Itália (Fanelli *et al.*, 2017), Madagascar (Chapuis *et al.*, 2016) e na China (Tian *et al.*, 2017).

Resistência genética é amplamente recomendada para o controle dos nematoides das galhas. Embora hajam níveis de suscetibilidade descritos em diferentes genótipos de arroz, apenas um número limitado de genótipos de *O. sativa* apresenta algum tipo de resistência genética a esse nematoide (Bridge *et al.*, 2005; Cabasan *et al.*, 2012; Dimkpa *et al.*, 2015; Mhatre *et al.*, 2017; Phan *et al.*, 2018). Resistência em campo a *M. graminicola* tem sido registrada apenas nas espécies africanas *O. longistaminata* A. Chev. & Roehrich e *O. glaberrima* Steud (Plowright *et al.*, 1999; Soriano *et al.*, 1999; Bimpong *et al.*, 2010).

O gênero *Oryza* é pequeno, incluindo apenas 23 espécies, mas é notável em diversas adaptações ecológicas de sua espécie (Kellogg, 2001). No Brasil, existem 4 espécies de parentes selvagens do arroz: *O. glumaepatula* Steud, *O. alta* Swallen, *O. grandiglumis* (Doell) Prod. e *O. latifolia* Desv. (Morishima, 1994).

Oryzae glumaepatula é a única espécie de arroz diploide (AA) nativa das Américas, frequentemente encontrada ao longo de extensas bacias hidrográficas dos biomas Amazônia e Pantanal (Oliveira, 1994; Brondani *et al.*, 2005) e pertence ao complexo de espécies de *O. sativa* (genoma AA) (Vaughan *et al.*, 2003).

Oryza glumaepatula hibridiza com *O. sativa* e os genes relacionados ao perfilhamento e tamanho de panícula tem tido sucesso no cruzamento de arroz comercial (Brondani *et al.*, 2002; Sanchez & Espinoza, 2005), o que suporta seu potencial como uma nova fonte de variabilidade genética que pode ser usada para melhorar variedades comerciais em futuros programas de melhoramento.

Resistência de plantas a nematoides parasitas se expressa via pré ou pós-penetração (Huang, 1985; Trudgill, 1991). Mecanismos de penetração incluem a produção de exudatos radiculares que interferem na atração do nematoide e barreiras morfológicas pré-existentes na planta (Huang, 1985). Mecanismos de pós-penetração estão relacionados a ativação de processos fisiológicos, moleculares e genéticos na planta hospedeira, prevenindo ou atrasando o desenvolvimento do juvenil de segundo estágio (J2) e inibindo a formação de sítios de alimentação e/ou limitando a reprodução da fêmea (Huang, 1985; Trudgill, 1991).

Estudos recentes da resistência de genótipos de *O. glaberrima* e de *O. sativa* Zhonghua 11 tem revelado três mecanismos de resistência independentes à infecção por *M. graminicola* nesses genótipos (Cabasan *et al.* 2012, 2014; Goverse & Smant, 2014; Kyndt *et al.*, 2014a, b; Petitot *et al.*, 2017; Phan *et al.*, 2018): i) os juvenis de segundo estágio, fase infectiva de *M. graminicola*, podem penetrar as raízes mas, uma vez dentro, seu desenvolvimento é retardado; ii) uma rápida reação de hipersensibilidade (HR) é frequentemente observada prevenindo a formação da célula gigante e conseguinte desenvolvimento do nematoide, resultando, assim, na morte do nematoide; e iii) degradação da célula gigante em estágios tardios da infecção por *M. graminicola*, sugerindo uma resposta

de resistência tardia.

Os resultados da investigação da reação de quatro espécies diferentes de *Oryza* selvagens à populações de *M. graminicola* (Mattos *et al.*, 2019), permitiu a identificação de uma nova fonte com alto nível de resistência, *O. glumaepatula*. O presente estudo permitiu a caracterização histopatológica do acesso mais resistente de *O. glumaepatula* (Mattos *et al.*, 2019) e mostrou que a resistência pode resultar de três respostas distintas que atuam de forma isolada ou conjunta para suprimir a formação de galhas e a reprodução do nematoide.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécies de *Oryza*

Sementes de arroz foram cedidas pelo Banco de Germoplasma de Arroz da Embrapa Arroz e Feijão (Goiás, GO). As espécies testadas neste trabalho foram a selvagem *O. glumaepatula*, e a cultivada *O. sativa* cv. BR-IRGA 410, como planta suscetível.

Inóculo do nematoide

Uma mistura de populações puras de *M. graminicola* coletadas em campos de arroz no Sul do Brasil (Negretti *et al.*, 2017) foram reproduzidas em plantas da cultivar suscetível de *O. sativa* (BR-IRGA 410) em condições de casa-de-vegetação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e usada como inóculo para os ensaios de histopatologia. A confirmação da identidade da espécie do nematoide foi feita através do perfil de esterase, de acordo com Carneiro & Almeida (2001). Para condução dos ensaios de histopatologia, ovos de *M. graminicola* foram extraídos de raízes infectadas usando 0,5% de NaClO e processados em liquidificador por 30 segundos, de acordo com metodologia proposta por Hussey & Barker (1973), modificada por Bonetti & Ferraz (1981). Para obtenção de juvenis de segundo estágio, os ovos extraídos foram mantidos em funil de Baerman modificado (Flegg, 1967)

para a eclosão de juvenis. Os juvenis eram coletados a cada 48h e mantidos sob refrigeração. Após 15 dias de coleta, os juvenis foram quantificados e a concentração determinada em lâmina de Peter ao microscópio ótico.

Estudos histopatológicos da resistência

De acordo com os resultados obtidos em estudo prévio (Mattos, 2019b) com espécies de *Oryza* inoculadas com *M. graminicola* (Tabela 1), foram escolhidas *O. glumaepatula* BGA 014179 como espécie altamente resistente e *O. sativa* BR-IRGA 410 como espécie suscetível. Para investigar os mecanismos de resistência, *O. glumaepatula* (BGA 014179) e o *O. sativa* foram semeados em copos plásticos de 50 ml contendo areia lavada e esterilizada. Inocularam-se as plantas 15 dias após o semeio, quando estavam em estágio V2 (estádio vegetativo com duas folhas verdadeiras) com 10.000 J2s de um pool de *M. graminicola* obtidos de acordo com metodologia de Flegg (1967) (Counce *et al.*, 2000). As plantas foram adubadas semanalmente. Duas plantas de cada genótipo, resistente e suscetível, foram cuidadosamente removidas dos copos em: 18 HAI (horas após a inoculação) e 2, 4, 6, 8, 9, 12, 15, 17, 18, 19, 24, 27, 31 e 33 DAI (dias após a inoculação) e tiveram suas raízes lavadas em um béquer com água e a parte aérea descartada. Uma raiz de cada planta foi colorida com fucsina ácida para observar a penetração dos J2s, localização e subsequente desenvolvimento dos nematoides dentro das raízes como descrito por Byrd *et al.* (1983): raízes lavadas em água foram imersas em uma solução de hipoclorito de sódio a 5,25% durante 5 minutos. Em seguida lavadas em água corrente e mergulhadas em um béquer com água por 15 minutos. Retiradas da água, as raízes foram imersas em uma solução de fucsina ácida (1,25g de fucsina ácida, 125ml de ácido acético glacial e 375 ml de água destilada) diluída em água numa proporção 2:40, e esta solução com as raízes foi fervida por 1 minuto em microondas. Após fervura, as raízes foram lavadas em água corrente e transferidas para um béquer contendo

glicerina. As raízes que continham o nematoide foram observadas em microscópio estereoscópico e, os segmentos em que apareciam os nematoides no interior da raiz, foram montados em lâmina para observação e fotodocumentação em microscópio ótico (Axiophoto Zeiss).

As outras raízes de cada genótipo foram fixadas e emblocadas em resina para posterior corte em seções finas. Fragmentos de raízes de 3mm com sintomas (galhas e engrossamentos no genótipo suscetível) e sem sintomas (genótipo resistente) foram cortados com bisturi sob microscópio estereoscópico. Esses fragmentos foram fixados em solução 1% de formaldeído e 4% de glutaraldeído em 100mM de tampão fosfato pH 7,2, à temperatura ambiente em eppendorfs de 1,5 ml. Esse material foi mantido em agitação overnight. Depois de fixados, os fragmentos foram lavados duas vezes com tampão fosfato 50mM pH 7,2 em intervalos de 30 minutos, em seguida desidratados, em uma série alcóolica crescente (10, 30, 50, 70, 90 e 100% de etanol) por duas vezes sob agitação. Os fragmentos foram embebidos em resina Technovit 7100 (Kulzer Friedrichsdorf) segundo metodologia de Pegard *et al.* (2005) e recomendação do fabricante, também sob agitação a 4 °C. Os fragmentos de raízes emblocados em resina foram cortados em seções finas de 3,5µm e montados sobre gota de água em lâmina de vidro e postas para secar overnight. As seções de raízes do genótipo resistente, ainda não coloridas, foram submetidas à luz ultravioleta (UV) para observação de fluorescência. Subsequentemente, seções de raízes dos genótipos suscetíveis e resistentes foram coradas com corante azul de toluidina 0,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 5,5, e levadas para observação e fotodocumentação em microscópio ótico.

Tabela 1. Reação de nove acessos de *Oryza* spp. a *Meloidogyne graminicola*, 90 dias após a inoculação (Mattos, 2019b).

Ensaio de Verão (Dez/Jan/Fev)					
Genótipos	Grupo genômico¹	Peso fresco de raiz (g)	Ovos/g de raiz²	FR²	Fenótipo³
<i>O. alta</i>	CCDD	291,75c	63,81d	3,49c	MR
<i>O. glaberrima</i>	AA	201,58c	111,89c	2,93c	MR
<i>O. glaberrima</i> BGA 005566	AA	612,33b	64,92d	6,35c	MR
<i>O. glumaepatula</i> BGA 013954	AA	233,33c	7,89e	0,36e	AR
<i>O. glumaepatula</i> BGA 014179	AA	246,8c	7,87e	0,37e	AR
<i>O. glumaepatula</i> BGA 014210	AA	285,42c	21,38e	1,1d	R
<i>O. grandiglumis</i>	CCDD	372b	42,33d	2,17c	MR
<i>O. longistaminata</i>	AA	793,6a	254,43	27,81b	S
<i>O. sativa</i> BR-IRGA 410	AA	168,71c	22811,76a	643,32a	AS
CV%		38,2	33	28,1	
Ensaio de Inverno (Jun/Jul/Ago)					
Genótipos	Grupo genômico	Peso fresco de raiz (g)	Ovos/g de raiz	FR	Fenótipo
<i>O. alta</i>	CCDD	86,4c	268,58cd	4,55d	MR
<i>O. glaberrima</i>	AA	75d	256,9c	3,41d	MR
<i>O. glaberrima</i> BGA 005566	AA	90c	329,44cd	5,75d	MR
<i>O. glumaepatula</i> BGA 013954	AA	159c	71,3e	2,3e	R
<i>O. glumaepatula</i> BGA 014179	AA	197,6c	27,34e	1,2e	R
<i>O. glumaepatula</i> BGA 014210	AA	156,8c	25,83 e	0,81f	AR
<i>O. grandiglumis</i>	CCDD	188b	405,78cd	14,77c	S
<i>O. longistaminata</i>	AA	331,83a	401,99b	23,46b	S
<i>O. sativa</i> BR-IRGA 410	AA	62c	4814,80a	58,14a	AS
CV%		21,59	37,37	20,26	

¹Grupos genômicos de acordo com Tateoka *et al.* (1963).

²Média dos valores transformadas para log (x+1). Médias seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knot (P<0,05).

³AS – altamente suscetível; S – suscetível; AR – altamente resistente; MR – moderadamente resistente; R – resistente.

RESULTADOS

Histopatologia comparada de *Oryza sativa* e *Oryza glumaepatula* inoculadas com *M. graminicola*

Meloidogyne graminicola foi de fácil detecção em *O. sativa* BR-IRGA 410, por causar engrossamento e galhas em todo o sistema radicular com as pontas das raízes em formato de gancho (Fig. 1A), um sintoma característico dos nematoides das galhas do arroz. Nenhum sintoma específico foi observado no genótipo resistente *O. glumaepatula* (BGA 014179). A coleta de raízes infectadas de *O. glumaepatula* para estudos de histopatologia foi dificultada pela ausência de sintomas.



Figura 1. Raízes de arroz 90 dias após a inoculação com *Meloidogyne graminicola*. A) *Oryza sativa* apresentando galhas terminais em formato de foice (setas – GL); B) *Oryza glumaepatula* sem sintomas de galhas (Mattos, 2017).

A cultivar suscetível de arroz, *O. sativa* BR-IRGA 410 foi escolhida para observações histopatológicas da reação compatível. Observações das raízes coradas com fucsina ácida e das raízes seccionadas coradas com azul de toluidina mostram que vários J2s conseguiram penetrar a ponta das raízes (meristema subapical) e migrar ao longo dos elementos de tubo crivado às 18 HAI e 2-4 DAI (Fig. 2A); os J2s se desenvolveram normalmente após o início da diferenciação do sítio de alimentação aos 6 DAI (Fig. 2B). Até esse momento, muitos J2s foram vistos dentro do cilindro central. Os J2s mostravam-se dilatados, indicando que estavam se alimentando ativamente (Fig. 2B). Aos 14-18 DAI nematoides nos estádios J3/J4/fêmeas jovens foram observados ao redor de quatro a seis células gigantes no cilindro

vascular, contendo núcleos, citoplasma densamente corado, pequenos vacúolos, e grossas paredes celulares (Fig. 2C e D). Aos 14-18 DAI, as fêmeas que tiveram sucesso, alcançando o estágio adulto, ovipositaram dentro das raízes (Fig. 2E), somente no aerênquima de raízes de arroz suscetível (Fig. 2F).

O genótipo *O. glumaepatula* (BGA 014179), altamente resistente, foi usado para observar a reação histopatológica de resistência. Exames microscópicos de raízes coradas com fucsina ácida e de seções coloridas com azul de toluidina, mostraram que os J2s foram capazes de penetrar a epiderme, córtex e o cilindro central (Fig. 3A, B). Nesse genótipo selvagem, poucos J2 penetraram as raízes (Fig. 3A, B) aos 2-6 DAI quando comparado à *O. sativa* (Fig. 2A) aos 2-4 DAI. A presença de uma quantidade significativa de pelos radiculares em *O. glumaepatula* pode ter prevenido a penetração dos J2 no genótipo resistente (Fig. 3A, B). No genótipo resistente, a invasão e penetração de J2 foram menores do que o observado no genótipo suscetível (Fig. 2A, B e 3A, B, C).

Uma diferença na penetração de J2 entre 2 e 4 DAI foi medida por contagem do número de J2s em todo o sistema radicular de três plantas. Nesse período, em média 132 e 17 J2s foram observados em *O. sativa* e *O. glumaepatula*, respectivamente, correspondendo a 87% de redução da penetração nas plantas resistentes em comparação com o genótipo suscetível. A contagem após 4 DAI foi imprecisa na planta suscetível como resultado da sobreposição de estádios J2, J3 e J4.

Aos 2-4 DAI, regiões azuis-escuros foram observadas em *O. glumaepatula*, indicando uma maior alteração celular (morte celular) onde houve contato com o nematoide quando este penetrou a epiderme e migrou através do córtex ou quando alcançou o cilindro central (Fig. 3B, C, E).

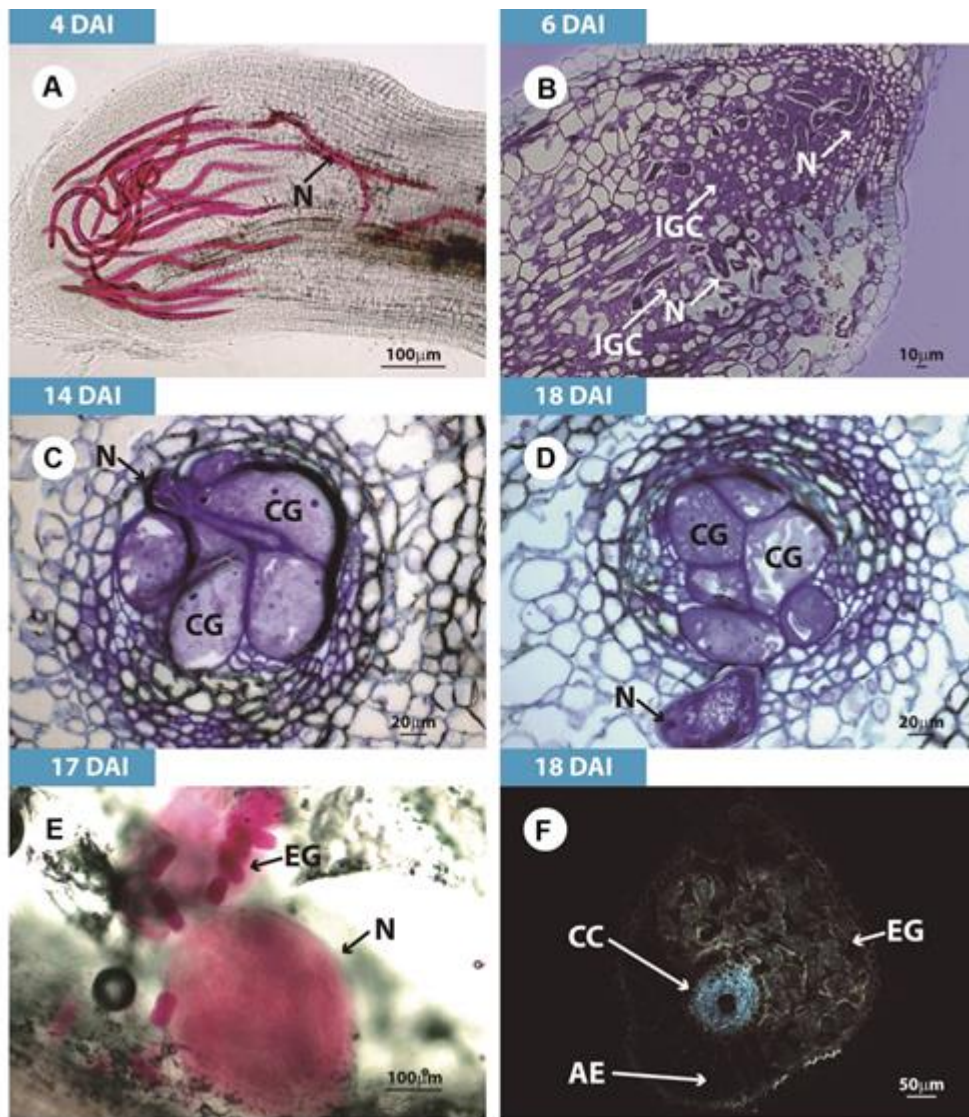


Figura 2. Interação de suscetibilidade. Raízes de *Oryza sativa* BR-IRGA 410 (controle) infectada com *Meloidogyne graminicola*. Observação, em microscópio ótico, de fragmentos de raízes corados com fucsina ácida (A e E) e com azul de toluidina (B, C e D). Fluorescência, sob microscópio ótico, de seções não coradas (F). A) Juvenis de segundo estágio (J2s) dentro de ponta de raiz; B) J2s nos espaços intercelulares do parênquima vascular apresentando sítios de alimentação (início de células gigantes); C e D) J3, J4 ou fêmea e células gigantes no cilindro central apresentando citoplasma denso, parede celular fina, com núcleos corados em azul escuro; E) fêmeas com ovos; F) massa de ovos dentro de células do aerênquima do arroz. N-nematoide, IGC-célula gigante no início da formação, GC-células gigantes, EM-massas de ovos, CC-cilindro central, AE-aerênquima.

Observações microscópicas de *O. glumaepatula*, coloridas com toluidina e sob luz UV, mostraram baixo número de J2 que conseguiram alcançar o córtex radicular e migraram intercelularmente, causando morte celular (Fig. 3C). As seções de raízes de *O. glumaepatula* observadas sob luz UV aos 2 DAI apresentaram uma autofluorescência azul-esbranquiçada, indicando a presença de compostos fenólicos (reação de hipersensibilidade - HR) no citoplasma e nas paredes das células ao redor do nematoide (Fig. 3D). Estes compostos fenólicos, provavelmente, levam a morte das células corticais adjacentes, prevenindo a migração dos juvenis até o cilindro central para estabelecimento de células gigantes. Poucas células, em divisão inicial, foram observadas no cilindro central das plantas resistentes aos 4 DAI (Fig. 3E). Algumas raras células gigantes colapsadas foram observadas, aos 24 DAI sob luz UV, circundadas por fêmeas degeneradas. A fluorescência revelada nas células gigantes de *O. glumaepatula* e nas fêmeas (regiões anterior e posterior), exibiam acúmulo de compostos fenólicos. Aos 33 DAI, poucos ovos foram observados no aerênquima das raízes de plantas resistentes.

Durante as observações histológicas conduzidas no período de 1-33 DAI, 3 tipos de respostas de defesas puderam ser distinguidas em *O. glumaepatula*: a) resistência de pré-infecção ocorrida antes da penetração do nematoide na superfície da raiz e, provavelmente, está associada com barreiras físicas que dificultaram a invasão das raízes pelos J2; b) resistência pós-infecção precoce, consistindo de uma reação de HR, observada no córtex radicular; e c) uma resposta tardia à pós-infecção, exibindo acúmulo de compostos fenólicos dentro das células gigantes e, também, das fêmeas.

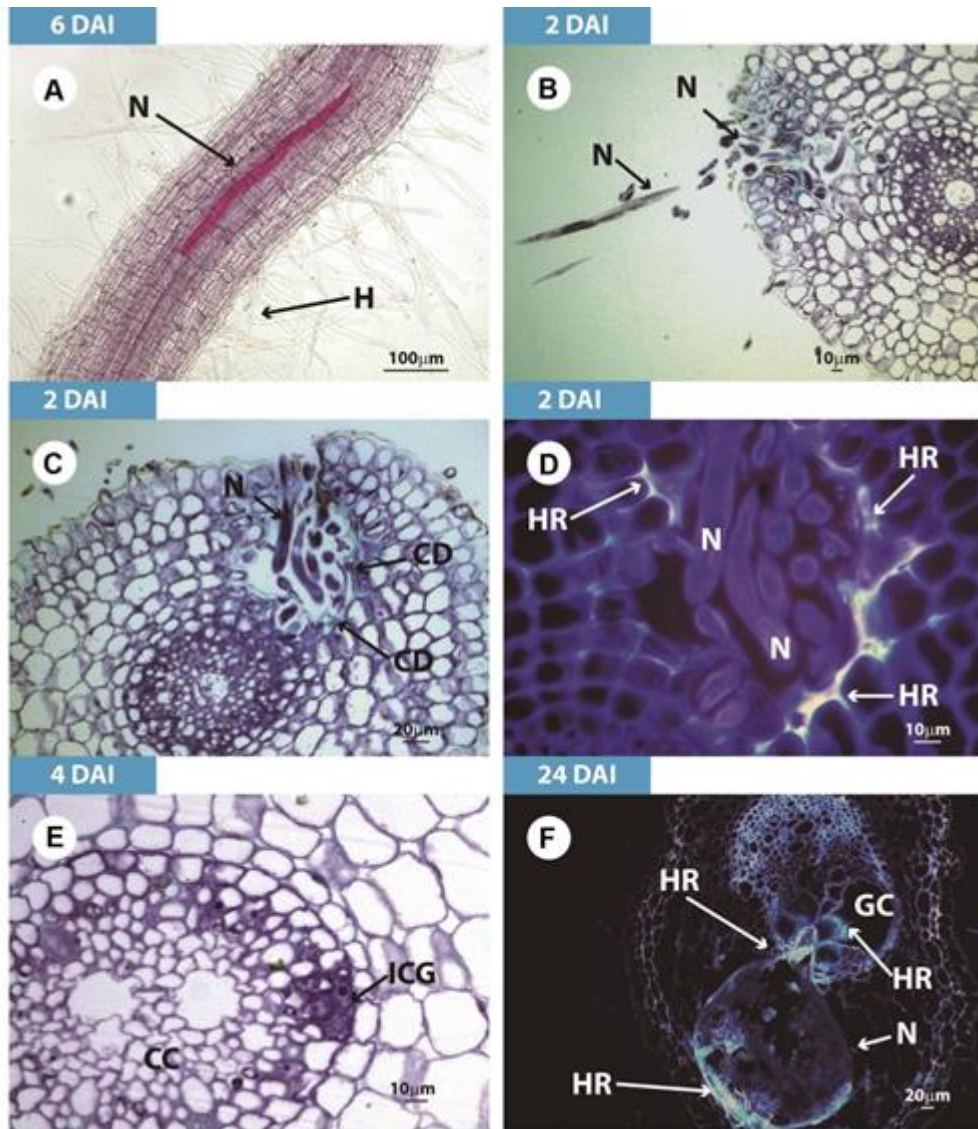


Figura 3. Interação de resistência. Raízes de *Oryza glumaepatula* BGA014179 infectadas com *Meloidogyne graminicola*. Observação em microscópio ótico de fragmentos de raiz corados com fucsina ácida (A), seções coradas com azul de toluidina (B, C e E) e fluorescência, sob microscópio ótico, de seções não coradas (D, F). Presença de J2 e J3 no córtex radicular (B, C e D) e cilindro vascular (A e E). Células próximas ao nematoide emitindo autofluorescência azul (D), Células do parênquima próximas aos juvenis mostrando coloração escura, sugerindo alteração severa ou morte celular (C e E), Célula gigante colapsada cercada por uma fêmea degenerada no cilindro central apresentando autofluorescência tanto na célula gigante quanto dentro do corpo da fêmea (F). N-nematoide, H-pelos radiculares, HR-reação de hipersensibilidade, CC-cilindro central, CD-morte celular, IGC-início de célula gigante, GC-célular gigante.

DISCUSSÃO

O genótipo BGA 014179 de *O. glumaepatula*, deste estudo, foi altamente resistente a *M. graminicola* (Mattos, 2017). Essa espécie de arroz selvagem se caracteriza por ser diploide (AA), nativa das Américas (Tateoka *et al.*, 1963) e crescer em áreas inundadas, pântanos, rios e áreas alagadas de solo argiloso ou siltoso. É uma gramínea perene, que perfilha, com colmos frágeis próximos à base da planta. Os colmos podem ser destacados e replantados, gerando novas populações. A floração ocorre entre outubro e novembro e, é imediatamente seguida por um breve episódio de frutificação, com duração de 2-3 semanas. Essa espécie é, comumente, polinizada pelo vento (anemofilia), entretanto registros anteriores (Ge *et al.*, 1999; Karasawa *et al.*, 2007) sugeriam polinização por autogamia.

Estudos preliminares de *O. glumaepatula* mostraram que possui altos níveis de proteínas totais, albumina e frações de glutelina, que se assemelha favoravelmente com as cultivares comerciais de *O. sativa*. *Oryza glumaepatula* pode ser uma fonte de novos genes para serem incorporados às espécies cultivadas em programas de melhoramento (Brondani *et al.* 2002; Sanchez & Espinoza, 2005), e tem sido usada, com sucesso, como doadora de genes para *O. sativa* (Sobrizal *et al.*, 1999; Brondani *et al.*, 2002).

No Brasil, uma rede de pesquisadores foi estabelecida e tem sido consolidada para a conservação e uso do germoplasma *O. glumaepatula* para cruzamentos com o arroz comercial e, agora, para incorporar resistência ao nematoide das galhas do arroz. Até o momento, mais de 130 populações já foram mapeadas e armazenadas no banco de genes da Embrapa (Rangel *et al.*, 2006 a, b). A diversidade genética de *O. glumaepatula* tem sido acessada por diversos autores através de marcadores moleculares (Akimoto *et al.*, 1998; Buso *et al.*, 1998; Brondani *et al.*, 2005; Karasawa *et al.*, 2007). Estes estudos têm concluído que há um alto nível de endogamia e uma diversidade relativamente baixa dentro dessas populações, mas a variabilidade genética entre essas populações é alta.

Diversos estudos têm tentado fazer uso prático dessa variação genética dentro de *O. glumaepatula*. Recíprocas linhas de introgressão entre *O. glumaepatula* e *O. sativa* têm sido desenvolvidas (Sobrizal *et al.*, 1999). Estas linhas de introgressão têm sido desenvolvidas para que a maioria das partes do genoma de *O. glumaepatula* seja representada em linhas com ambos citoplasmas, de *O. sativa* e de *O. glumaepatula*. Essas linhas estão levando à identificação de novos genes, tais como o *Rhw* para a restauração da fraqueza híbrida do citoplasma de *O. glumaepatula* (Ikeda *et al.*, 1999) e *S22* para a semiesterilidade/hibrido-esterilidade do pólen de *O. glumaepatula* (Sobrizal *et al.*, 2000).

Marcadores microssatélites têm sido desenvolvidos para uma biblioteca genômica de *O. glumaepatula*, e usada com outros marcadores para arroz visando um mapa de cruzamento interespecífico entre *O. glumaepatula* e *O. sativa* (Brondani *et al.*, 2001). Esse cruzamento interespecífico tem ampliado a base genética brasileira de cultivares de arroz e identificado traços úteis de *O. glumaepatula*, em um fundo genético do arroz. Locais de traços quantitativos (QTL's) úteis tem sido encontrados associados a perfilhos e número de panículas (Brondani *et al.*, 2002).

Oryza glumaepatula é diploide (AA) e foi estudada pela primeira vez quanto à resistência a *M. graminicola* por Mattos *et al.* (2019). Este estudo mostrou características de alta resistência e de potencial uso em cruzamentos com *O. sativa*.

Observações em microscopia de fluorescência e em microscopia de luz dos tecidos radiculares da cultivar Zhonghua 11 revelaram que as células adjacentes ao nematoide apresentavam uma reação de hipersensibilidade com células necróticas nos estágios iniciais de infecção quando os nematoides migravam no córtex da raiz. Um acúmulo de possíveis compostos fenólicos nas células radiculares vizinhas ao nematoide, também foram observadas. Além disso, em um estágio tardio da infecção não apenas poucos sítios de alimentação foram observados, como também células gigantes subdesenvolvidas, enfatizando

a incompatibilidade da interação (Phan *et al.*, 2018). Um mecanismo de resistência similar ao observado neste estudo foi o descrito em genótipos de *O. glaberrima* (Cabasan *et al.*, 2014) e *O. sativa* (Jena & Rao, 1977; Phan *et al.*, 2018) como linhagens resistentes e parcialmente resistentes (RILs) (Galeng-Lawilao *et al.*, 2019), sugerindo, que esse mecanismo de resistência pós-infeccional à *M. graminicola* pode ser comum no germoplasma de arroz (Galeng-Lawilao *et al.*, 2019). Mecanismo semelhante está bem caracterizado em dois outros patossistemas: algodão *Gossypium barbadensis* L. CIR1348 e *M. incognita* (Mota *et al.*, 2013), *G. hirsutum* CNPA 17-26 B2RF e *M. incognita* (Lopes *et al.*, 2020) e café *Coffea canephora* Pierre ex Froehner ‘Clone 14’ e *M. paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes, Santos & Almeida, 1996 (Lima *et al.*, 2015).

O insucesso na penetração dos J2 na espécie resistente *O. glumaepatula*, indica a ocorrência de barreiras físicas como pelos radiculares e/ou químicas. Tais barreiras já foram descritas para porta-enxerto resistente de uva (Anwar & McKenry, 2000), algodão (Mota *et al.*, 2013), pimenta (Pegard *et al.*, 2005) e café (Lima *et al.*, 2015). Penetração reduzida de *M. graminicola* J2 nas raízes também foi observada em estudos com *O. glaberrima* (Cabasan *et al.*, 2014) e *O. sativa* RILs (Galeng-Lawilao *et al.*, 2019). No entanto, Jena & Rao (1977) e Phan *et al.* (2018) relataram penetração semelhante aos J2s de *M. graminicola* em genótipos de *O. sativa* suscetíveis e resistentes.

A HR em células radiculares do arroz *O. glumaepatula* desencadeada pela infecção por *M. graminicola*, é um indicativo de uma interação gene-a-gene específica. Isso sugere que a resistência nas espécies de arroz para *Meloidogyne* spp., provavelmente, é controlada por mais de um gene de resistência, que podem ser usados no melhoramento para novas cultivares de arroz resistentes ao RKN. Atualmente, as populações segregantes são construídas por mapeamento e investigações mais profundas dos genes de resistência que controlam as interações em *O. glumaepatula*. O melhoramento do arroz para alcançar resistência ao RKN é

crucial para a maioria dos países produtores de arroz e pode ser ainda mais urgente num futuro próximo, dado o impacto negativo das mudanças climáticas nas áreas de cultivo de arroz onde é crescente a escassez de água, como na Ásia (De Waele *et al.*, 2013).

Os resultados deste estudo mostraram a existência de respostas de resistência a *M. graminicola* em *O. glumaepatula*, espécie selvagem de arroz brasileiro, que mostrou um alto grau de resistência, portanto com potencial para uso futuro em programas de melhoramento genético pela Embrapa.

CONCLUSÕES

Oryza glumaepatula mostrou alto grau de resistência a *M. graminicola*.

Meloidogyne graminicola se desenvolveu normalmente na cultivar suscetível de arroz BR-IRGA 410, sendo possível visualizar os J2s 18h após a penetração e fêmeas com massas de ovos aos 14-18 DAI.

Na espécie resistente, *O. glumaepatula*, houve um atraso e redução na penetração, bem como a presença de reação de hipersensibilidade precoce aos 2 DAI.

Observou-se acúmulo de compostos fenólicos dentro da fêmea e no sítio de alimentação de *M. graminicola* em *O. glumaepatula* aos 24 DAI (reação tardia).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNOUN, Y., SIÉ, M., DJEDATIN, G., DRAMÉ, K. N., TOULOU, B., OGUNBAYO, S. A., NDJIONDJOP, M. N., 2012. Molecular profiling of interspecific lowland rice progenies resulting from crosses between TOG5681 and TOG5674 (*Oryza glaberrima*) and IR64 (*Oryza sativa*). *International Journal of Biology*, 4:19–28.
- AJILA, C. M., BRAR, S. K., VERMA, M., TYAGIL, R. D., GODBOUT, S., VALERO, J. R. 2011. Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31:227-249.
- AKIMOTO, M., SHIMAMOTO, Y., MORISHIMA, H. 1998. Population genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* distributed in the Amazon flood area influenced by its life-history traits. *Molecular Ecology*, 7:1371-1381.
- ANWAR, S.A., MCKENRRY, M.V. 2000. Penetration, development and reproduction of *Meloidogyne arenaria* on two new resistant *Vitis* spp. *Nematropica*, 3:9-17.
- BIMPONG, I.K., CARPENA, A.L., MENDIORO, M.S., FERNANDEZ, L., RAMOS, J. 2010. Evaluation of *Oryza sativa* × *O. glaberrima* derived progenies for resistance to root-knot nematode and identification of introgressed alien chromosome segments using SSR markers. *African Journal of Biotechnology*, 9:3988-3997.
- BONETTI, J., FERRAZ, J. B. S. 1981. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6(3):553.
- BRIDGE, J., PLOWRIGHT, R.A., PENG, D. 2005. Nematodes parasites of rice. In: Luc, M., Sikora, R.A., Bridge, J., (Eds). *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CABI, Wallingford. p. 87-130.
- BRONDANI, C., PEREIRA, R., BRONDANI, V., RANGEL, P.H.N., FERREIRA, M.E. 2001. Development and mapping of *Oryza glumaepatula*-derived microsatellite markers in the interspecific cross *Oryza glumaepatula* X *O. sativa*. *Hereditas*, 134:59-71.
- BRONDANI, C., RANGEL, P., BRONDANI, R., FERREIRA, M. 2002. QTL mapping and introgression of yield related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza*

sativa) using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 1192-1203.

BRONDANI, R.P.V., ZUCCHI, M.I., BRONDANI, C., RANGEL, P.H.N., BORBA, T.C.D.O., RANGEL, P.N., MAGALHÃES, M.R., VENCOVSKY, R. 2005. Genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* populations in three Brazilian biomes using microsatellite markers. *Genetica*, 125: 115–123.

BUSO, G.S.C., RANGEL, P.H.N., FERREIRA, M.E. 1998. Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) using isozymes and RAPD markers. *Molecular Ecology*, 7: 107-117.

BYRD JR, D.W., KIRKPATRICK, T., BARKER, K.R. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, 15: 142.

CABASAN, M.T.N., DE WAELE, D., KUMAR, A. 2012. Comparison of migration, penetration, development and reproduction of *Meloidogyne graminicola* on susceptible and resistant rice genotypes. *Nematology*, 14: 405–415.

CABASAN, M.T.N., KUMAR, A., BELLAFFIORE, S., DE WAELE, D. 2014. Histopathology of the rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*, on *Oryza sativa* and *O. glaberrima*. *Nematology*, 16: 73–81.

CARNEIRO, R. M. D. G., ALMEIDA, M. R. A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides das galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira*, 25:35-44.

CHAPUIS, E., BESNARD, G., ANDRIANASETRA, S., RAKOTOMALALA, M., NGUYEN, H.T., BELLAFFIORE, S. 2016. First report of the root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) in Madagascar rice fields. *Australasian Plant Disease Notes*, 11: 32.

COUNCE, P. A., KEISLING, T. C., MITCHELL, A. J. 2000. A uniform objective, and adaptative system for expressing rice development. *Crop Science*, 40:436-443.

DE WAELE, D., ELSEN, A. 2007. Challenges in tropical plant nematology. *Annual Review of Phytopathology*, 45: 457-485.

- DE WAELE, D., DAS, K., ZHAO, D., TIWARI, R.K.S., SHRIVASTAVA, D.K., VERA-CRUZ, C., KUMAR, A. 2013. Host response of rice genotypes to the rice root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) under aerobic soil conditions. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46: 670-681.
- DIMKPA, S.O.N., LAHARI, Z., SHRESTHA, R., DOUGLAS, A., GHEYSEN, G., PRICE, A.H. 2015. A genome-wide association study of a global rice panel reveals resistance in *Oryza sativa* to root-knot nematodes. *Journal of Experimental Botany*, 37: 1191–1200.
- FANELLI, E., COTRONEO, A., CARISIO, L., TROCCOLI, A., GROSSO, S., BOERO, C., DE LUCA, F. 2017. Detection and molecular characterization of the rice root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 149(2). doi:10.1007/s10658-017-1196-7.
- FLEG, J. J. M. 1967. Extraction of *Xiphinema* and *Longidorus* species from soil by a modification of Cobb's decanting and sieving technique. *Annals of Applied Biology*, 60:429-437.
- GALENG-LAWILAO, J., KUMAR, A., CABASAN, M. T. N., DE WAELE, D. 2019. Comparison of the penetration, development and reproduction of *Meloidogyne graminicola*, and analysis of lignin and total phenolic content in partially resistant and resistance recombination inbred lines of *Oryza sativa*. *Tropical Plant Pathology*, 44:171-182.
- GE, S., OLIVEIRA, G.C.X., SCHAAL, B.A., GAO, L.Z., HONG, D.Y. 1999. RAPD variation within and between natural populations of the wild rice *Oryza rufipogon* from China and Brazil. *Heredity*, 82: 638-644.
- GOVERSE, A., SMANT, G. 2014. The activation and suppression of plant innate immunity by parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 52: 243-265.
- HUANG, J. S. 1985. Mechanisms to resistance to root-knot nematodes. In: Sasser, C. C., Carter, J. N. (Eds.). *An Advantage Treatise of Meloidogyne*. Volume I: Biology and Control. North Carolina State University Graphics, Raleigh. P. 165-174.
- HUSSEY, R. S., JANSSEN, G. J. W. 2002. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: Starr, J. L., Cook, R., Bridge, J. (Eds.). *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. CABI, Wallingford. p. 43-70.

- HUSSEY, R.S., BARKER, K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease*, 57: 1025-1028.
- IKEDA, K., SOBRIZAL, H., SANCHEZ, P.L., YASUI, H., YOSHIMURA, A. 1999. Hybrid weakness restoration gene (Rhw) for *Oryza glumaepatula* cytoplasm. *Rice Genetics Newsletter*, 16: 62-64.
- JENA, R. N., RAO, Y. S. 1977. Nature of resistance in rice (*Oryza sativa* L) to the root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) II. Mechanism of resistance. *Proceedings of the Indiana Academy of Science*, 86:31-38.
- KARASAWA, M. M., VENCOVSKY, R., SILVA, C. M., ZUCCHI, M. I., OLIVEIRA, G. C., VEASEY, E. A. 2007. Mating system of Brazilian *Oryza glumaepatula* populations studied with microsatellite markers. *Annals of Botany*, 99(2): 245-253.
- KELLOGG, E.A. 2001. Evolutionary history of grasses. *Plant Physiology*, 125: 1198-1205.
- KYNDT, T., VIEIRA, P., GHEYSEN, G., DE ALMEIDA-ENGLER, J., 2014a. Nematode feeding sites: unique organs in plant roots. *Planta*, 238: 807–818.
- KYNDT, T., FERNANDEZ. D., GHEYSEN, G. 2014b. Plant-parasitic nematode infections in rice: molecular and cellular insights. *Annual Review of Phytopathology*, 52: 135-153.
- LINARES, O. F. 2002. African rice (*Oryza glaberrima*): history and future potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 16360-16365.
- LIMA, E.A., FURLANETTO, C., NICOLE, M., GOMES, A.C.M.M., ALMEIDA, M.R.A., JORGE-JÚNIOR, 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 hypersensitive-like response in *Coffea canephora*. *Phytopathology*, 105: 805-814.
- LOPES, C.M.L.; SUASSUNA, N.D.; CARES, J. E.; GOMES, A.C.M.M.; PERINA, F.J.; NASCIMENTO, G.F.; CARNEIRO, R.M.D.G. 2020. Marker-assisted selection in *Gossypium* spp. for *Meloidogyne incognita* resistance and histopathological characterization of a near immune line. *Euphytica*, 216(2):1-15.

MATTOS, V. S. 2017. Caracterização e identificação de populações de *Meloidogyne* spp. do arroz, estabelecimento de marcadores SCAR e seleção de novas fontes de resistência em *Oryza* spp. a *M. graminicola*. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil. 177p.

MATTOS, V. S., LEITE, R. R., CARES, J. E., GOMES, A. C. M., MOITA, A. W., LOBO, V. L., CARNEIRO, R. M. 2019. *Oryza glumaepatula*, a new source of resistance to *Meloidogyne graminicola* and histological characterization of its defense mechanisms. *Phytopathology*, 109(11):1941-1948.

MHATRE, P.H., PANKAJ, A.S., SINGH, A.K., ELLUR, R.K., KUMAR, P. 2017. Molecular mapping of rice root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) resistance gene in Asian rice (*O. sativa* L.) using STMS markers. *Indian Journal of Genetics*, 77:163-165.

MOTA, F. C., ALVES, G. C. S., GIBAND, M., GOMES, A. C. M. M., SOUSA, F. R., MATTOS, V. S., BARBOSA, V. H. S., BARROSO, P. A. V., MICHEL, N., PEIXOTO, J. R., ROCHA, M. R., CARNEIRO, R. M. D. G. 2013. New sources of resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in wild cotton accessions and histological characterization of the defense mechanisms. *Plant Pathology*, 62:1173-1183.

MORISHIMA, H. 1994. Background information about *Oryza* species in tropical America. In: Investigations of plant genetic resources in the American basin with emphasis on the genus *Oryza*: Report of 1992/93 Amazon Project: Monbusho International Scientific Res. Prog.

NDJIONDJOP, M. N., SEMAGN, K., SIE, M., CISSOKO, M., FATONDJI, B., JONES, M., 2008. Molecular profiling of interspecific lowland rice populations derived from IR64 (*Oryza sativa*) and TOG5681 (*Oryza glaberrima*). *African Journal of Biotechnology*, 7:4219–4229.

NEGRETTI, R. R., GOMES, C. B., MATTOS, V. S., SOMAVILLA, L., MANICA-BERTO, R., AGOSTINETTO, D., CARNEIRO, R. M., 2017. Characterisation of a *Meloidogyne* species complex parasitising rice in southern Brazil. *Nematology*, 19:403-412.

OLIVEIRA, G. C. X. 1994. Geographic distribution of wild *Oryza* species in Brazil. In: Morishima, H., Martins, P. S. (Eds.). Investigations of plant genetic resources in the Amazon basin with emphasis on the genus *Oryza*: Report of 1992/93 Amazon Project. The Monbusho

International Scientific Research Program Japan and Brazil (FAPESP). p. 10-15.

PEGARD, A., BRIZZARD, G., FAZARI, A., SOUCAZE, O., ABAD, P., DJIAN-CAPORALINO, C. 2005. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology*, 95: 158-165.

PETITOT, A. S., KYNDT, T., HAIDAR, R., DEREPPER, A., COLLIN, M., DE ALMEIDA, E. J., GHEYSEN, G., FERNANDEZ, D. 2017. Transcriptomic and histological responses of African rice (*Oryza glaberrima*) to *Meloidogyne graminicola* provide new insights into root-knot nematode resistance in monocots. *Annals of Botany*, 119: 885-899.

PHAN, N. T., DE WAELE, D., LORIEUX, M., XIONG, L., BELLAFFIORE, S., 2018. A hypersensitivity-like response to *Meloidogyne graminicola* in rice (*Oryza sativa*). *Phytopathology*, 108: 521-528.

PLOWRIGHT, R. A., BRIDGE, J., 1990. Effect of *Meloidogyne graminicola* (Nematoda) on the establishment, growth and yield of rice cv. IR36. *Nematologica*, 36: 81–89.

PLOWRIGHT, R. A., COYNE, D. L., NASH, P., JONES, M. P., 1999. Resistance to the rice nematodes *Heterodera sacchari*, *Meloidogyne graminicola* and *M. incognita* in *Oryza glaberrima* and *O. glaberrima* × *O. sativa* interspecific hybrids. *Nematology*, 1: 745–51.

RANGEL, P. H. N., BRONDANI, C., FERREIRA, M. E., RANGEL, P. N., & BRONDANI, R. P. V. 2006a. Utilização de espécies silvestres *Oryza glumaepatula* no pré-melhoramento de arroz. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1: 94-98.

RANGEL, P. H. N., BRONDANI, C., FONSECA, J. R., SILVA, S. C., RABELO, R. R., PEREIRA, J. A., KAMINSKI, P. E., 2006b. Mapeamento da distribuição geográfica das espécies brasileiras de *Oryza*, com vistas à conservação dos parentes silvestres e das variedades crioulas de arroz (*O. sativa* L.). In: Coradin L. (Coord.). *Parentes silvestres das espécies de plantas cultivadas*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, Brasil. p.16-19.

SANCHEZ, E., ESPINOZA, A. M., 2005. Ultrastructure of *Oryza glumaepatula*, a wild rice species endemic of tropical America. *Revista de Biologia Tropical*, 53: 15–22.

- SECK, P. A., DIAGNE, A., MOHANTY, S., WOPEREIS, M. C., 2012. Crops that feed the world 7: Rice. *Food Security*, 4: 7-24.
- SOBRIZAL, A., IKEDA, K., SANCHEZ, P. L., DOI, K., ANGELES, E. R., KHUSH, G. S., YOSHIMURA, A., 1999. Development of *Oryza glumaepatula* introgression lines in rice, *O. sativa* L. *Rice Genetics Newsletter*, 16: 107-108
- SOBRIZAL, A., MATSUZAKI, Y., SANCHEZ, P. L., IKEDA, K., YOSHIMURA, A. 2000. Identification of a gene for male abortion in backcross progeny of *Oryza sativa* and *Oryza glumaepatula*. *Rice Genetics Newsletter*, 17: 59-61.
- SORIANO, I. R., REVERSAT, G. 2003. Management of *Meloidogyne graminicola* and yield of upland rice in South-Luzon, Philippines. *Nematology*, 5: 879-884.
- SORIANO, I. R., SCHMIT, V., BRAR, D. S., PROT, J. C., REVERSAT, G. 1999. Resistance to rice root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* identified in *Oryza longistaminata* and *O. glaberrima*. *Nematology*, 1:395–398.
- SORIANO, I. R. S., PROT, J. C., MATIAS, D. M. 2000. Expression of tolerance for *Meloidogyne graminicola* in rice cultivars as affected by soil type and flooding. *Journal of Nematology*, 32: 309–317.
- TATEOKA, T. 1963. Taxonomic studies of *Oryza* III. Key to the species and their enumeration. *Botanical Magazine*, 76: 165-173.
- TIAN, Z. L., BARSALOTE, E. M., LI, X. L., CAI, R. H., ZHENG, J. W. 2017. First report of root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*, on rice in Zhejiang, Eastern China. *Plant Disease*, 101: 2152.
- TRUDGILL, D. L. 1991. Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. *Annual Review of Phytopathology*, 29:167-192.
- VAUGHAN, D. A., MORISHIMA, H. 2003. Biosystematics of the genus *Oryza*. In: Wayne, S. C., Dilday, R. H., Hoboken, N. J. (Eds.). *Origin, History, Technology and Production*. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey. p. 27-65.

CONCLUSÕES GERAIS

A espécie críptica *Meloidogyne* sp.0 foi identificada como *M. ottersoni* por meio de Taxonomia Integrativa.

Características morfológicas e morfométricas da população estudada se assemelharam à da descrição original da espécie *M. ottersoni*.

Os estudos citológicos confirmaram o número de $n = 18$ cromossomos e forma de reprodução por partenogênese meiótica já estudada anteriormente.

Este é a primeira detecção de *M. ottersoni* no Brasil na cultura do arroz e a segunda na América do Sul.

Meloidogyne ottersoni é uma espécie que possui alta capacidade reprodutiva no arroz, em condições favoráveis, e tem se mostrado de ocorrência isolada, em áreas produtoras de arroz no Sul do país.

O estudo de diversidade mostrou alto nível de polimorfismo em espécies meióticas: *M. graminicola* e *M. ottersoni*.

Todos os nematoides se reproduziram bem na espécie de arroz suscetível *O. sativa*.

Oryza glumaepatula, *O. glaberrima*, *O. grandiglumis* e *O. alta* apresentaram resistência a todas as espécies e populações de nematoides avaliadas.

Oryza longistaminata apresentou maior variação fenotípica na resistência por ser alógama e apresentar introgressão com *O. sativa*.

Oryza glumaepatula e *O. glaberrima* são consideradas boas fontes doadoras de genes para *O. sativa*, pelo alto nível de resistência apresentado e por pertencerem ao mesmo grupo genômico de *O. sativa*.

Oryza glumaepatula mostrou alto grau de resistência a *M. graminicola*.

Meloidogyne graminicola se desenvolveu normalmente na cultivar suscetível de arroz BR-IRGA 410, sendo possível visualizar os J2s 18h após a penetração e fêmeas com massas de ovos aos 14-18 DAI.

Na espécie resistente, *O. glumaepatula*, houve um atraso e redução na penetração, bem como a presença de reação de hipersensibilidade precoce aos 2 DAI.

Observou-se acúmulo de compostos fenólicos dentro da fêmea e no sítio de alimentação de *M. graminicola* em *O. glumaepatula* aos 24 DAI (reação tardia).