



Universidade de Brasília
Instituto De Ciências Biológicas
Departamento De Fitopatologia
Programa De Pós-Graduação Em Fitopatologia

**IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA E VARIABILIDADE DE ISOLADOS
DE *Meloidogyne* spp.**

FRANCISCO DE ASSIS DOS SANTOS DINIZ

Brasília-DF

2022

FRANCISCO DE ASSIS DOS SANTOS DINIZ

**IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA E VARIABILIDADE DE ISOLADOS
DE *Meloidogyne* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

Orientadora: Thaís Ribeiro Santiago

Brasília - DF

2022

DEDICATÓRIA

*A minha Raimunda, por todo amor,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela fidelidade, pois até aqui me ajudou o Senhor.

Aos meus pais e irmãos pelos ensinamentos, apoio, carinho e compreensão pelos momentos de ausência.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório pelos momentos e risadas, os quais sempre levarei em minha memória. Em especial à Camila, Leila, Thaís, Gustavo, Karen, Lucas, Ricardo, Jefferson, Letícia e Thalisson, pelo companheirismo e auxílio em diversas etapas da realização do meu trabalho.

À Dra. Thaís Ribeiro Santiago pela orientação, paciência, amizade e apoio em todo o período do mestrado.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da UnB que contribuíram para minha formação. À Universidade de Brasília pela oportunidade.

À banca examinadora, Prof. Eduardo Mizubuti, Prof. Juvenil Cares e Prof. Robert Neil Gerard Miller, por aceitarem este convite.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos recursos concedidos e pela bolsa de mestrado.

A todos os demais envolvidos que contribuíram para este momento.

Trabalho realizado no Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da Profa. Thaís Ribeiro Santiago, com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA E VARIABILIDADE DE ISOLADOS
DE *Meloidogyne* spp.**

FRANCISCO DE ASSIS DOS SANTOS DINIZ

DISSERTAÇÃO APROVADA em 25/02/2022 por:



Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
Universidade Federal de Viçosa (Examinador Externo)



Prof. Robert Neil Gerard Miller
Universidade de Brasília (Examinador Interno)



Profa. Thaís Ribeiro Santiago
Universidade de Brasília (Orientadora – Presidente)

Brasília-DF

2022

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	25
GENERAL ABSTRACT.....	27
1. INTRODUÇÃO GERAL	15
2. OBJETIVOS.....	18
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO 1: IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>Meloidogyne</i> spp. EM SOJA DE MATO GROSSO E GOIÁS	24
RESUMO	24
INTRODUÇÃO.....	25
MATERIAL E MÉTODOS	28
Origem e coleta de amostras.....	28
Obtenção do inóculo e multiplicação de populações puras	28
Extração e amplificação de DNA de <i>Meloidogyne</i> spp.....	29
Identificação bioquímica das populações puras de <i>Meloidogyne</i> spp.	29
Identificação molecular de espécies de <i>Meloidogyne</i>	30
Análise da diversidade genética do gene COI e NADH5 de <i>M. incognita</i>	31
RESULTADOS	32
Identificação com primers espécie-específico de populações de campo.....	32
Identificação Bioquímica.....	33
Identificação molecular e filogenia	33
Diversidade genética com base em genes mtDNA.....	34
DISCUSSÃO.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
TABELAS E FIGURAS.....	48
CAPÍTULO 2: IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES de <i>Meloidogyne</i> POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF.....	56
RESUMO	56
INTRODUÇÃO.....	58
MATERIAL E MÉTODOS.....	60
Origem e multiplicação das amostras de <i>Meloidogyne</i>	60

Identificação bioquímica e molecular de isolados de <i>Meloidogyne</i>	60
Ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo	61
Preparação de amostra	61
Aquisição de espectros de massa, avaliação dos dados adquiridos e análise de agrupamento dos dados de MALDI-TOF MS	62
RESULTADOS	62
Confirmação das espécies de <i>Meloidogyne</i> por métodos bioquímicos	62
DISCUSSÃO	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
TABELAS E FIGURAS	70

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Local de amostragem de isolados de *Meloidogyne* em campos de cultivo de soja nos estados de Mato Grosso e Goiás, destacados na área verde e amarela do mapa, respectivamente. Os pontos pretos representam os municípios em que se observou a presença de espécies de *Meloidogyne*. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2. Árvore filogenética com o gene NADH desidrogenase subunidade 5 (NADH5) obtida por Inferência Bayesiana de isolados de *Meloidogyne* coletados nos estados do Mato Grosso (UnBMT) e Goiás (UnBGO) Tabela 1. Os valores de probabilidade a posteriori são indicados nos ramos. As barras indicam a taxa de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com *Bursaphelenchus xylophilus*. Os exemplares deste estudo estão destacados em negrito e as demais amostras em parênteses foram retiradas do Genbank e seus números de acesso estão descritos na Tabela suplementar 1.49

Figura 3. (A) Distribuição dos haplótipos de *M. incognita* nos estados de Mato Grosso e Goiás (B) Rede de haplótipos do gene NADH desidrogenase subunidade 5 (NADH5) construída com base no método *median-joining haplotype network* no programa PopART. Os haplótipos são representados por círculos cujos tamanhos são proporcionais ao número de indivíduos. Cores diferentes representam distintos haplótipos. Mutações que diferenciam os haplótipos são indicadas por um traço..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura Suplementar 1. Perfil de esterase de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* identificadas de amostras oriundas dos estados de Mato Grosso e Goiás. O perfil de esterase I1 de *M. incognita* (Rm: 1,00) e J3 de *M. javanica* (Rm: 1,00; 1,25; 1,4) foram observados nas amostras..... **Erro!**

Indicador não definido.

Figura Suplementar 2. Árvore filogenética com o gene citocromo oxidase I (COI) obtida por Inferência Bayesiana de isolados de *Meloidogyne* coletados nos estados Mato Grosso e Goiás. Os valores de probabilidade a posteriori são indicados nos ramos. As barras indicam a taxa de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com *Bursaphelenchus xylophilus*. Os exemplares deste estudo estão destacados em negrito e as demais amostras em parênteses

foram retiradas do Genbank e seus números de acesso estão descritos na Tabela 1..... **Erro!**
Indicador não definido.

Capítulo 2

Figura 1. (A) Árvore filogenética do gene NADH desidrogenase subunidade 5 (NADH5) obtida por Inferência Bayesiana de isolados de *Meloidogyne* spp. coletados em cana-de-açúcar, soja e pimenta-do-reino nos estados de Mato Grosso, Goiás e São Paulo. As sequências de isolados deste estudo estão destacadas em negrito; as outras sequências foram retiradas do Genbank e seus números de acesso estão descritos na Tabela 1. (B) Dendograma derivado dos espectros específicos de MALDI-TOF MS dos isolados de *Meloidogyne* spp. Os valores de distância são relativos e normalizados para um valor máximo de 300.....70

Figura Suplementar 1. Perfil de esterase de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*. O perfil de esterase I1 de *M. incognita* (Rm: 1,00), J3 de *M. javanica* (Rm: 1,00; 1,25; 1,40), A2 de *M. arenaria* (Rm: 1,20; 1,30) foram observados nas amostras.....71

LISTA DE TABELA

Capítulo 1

Tabela 1. Identificação de isolados de *Meloidogyne* coletados em campos de cultivo de soja nos estados de Mato Grosso e Goiás por meio da técnica de *Sequence Characterized Amplified Regions* (SCAR)-PCR e perfil de esterase. A designação de haplótipos foi determinada com base na variação do gene NADH desidrogenase subunidade 5 (NADH5) ..53

Tabela Suplementar 1. Isolados de *Meloidogyne* utilizados no estudo filogenético, bem como a sua origem e números de acesso do NCBI dos genes NADH desidrogenase subunidade 5 (NADH5) e citocromo oxidase I (COI). A lista inclui a espécie *Bursaphelenchus xylophilus* que foi usada como *outgroup*.....54

Capítulo 2

Tabela 1. Origem e identificação dos isolados de *Meloidogyne* utilizados para geração de espectros de massa por meio da técnica de ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo (MALDI-TOF MS). A identificação prévia das espécies de *Meloidogyne* foi realizada pela técnica isoenzimática por perfil de esterase.72

RESUMO GERAL

DINIZ, Francisco de Assis dos Santos. **IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA E VARIABILIDADE DE ISOLADOS DE *Meloidogyne* spp.** 2022. p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

As espécies de *Meloidogyne* (Nematoide das Galhas NG) são responsáveis por muitos danos na agricultura em todo o mundo. Apesar de sua ampla distribuição mundial, as epidemias causadas pelos NGs são mais intensas nas regiões tropicais. *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, o grupo *M. incognita* ou grupo MIG, estão amplamente distribuídas nessa região e causam danos em uma elevada gama de hospedeiros. As principais limitações para o controle eficiente dessas espécies são: (i) a dificuldade de identificação das espécies em campo e (ii) a falta de conhecimento sobre a variabilidade genética destas espécies. Por isso, este estudo teve como objetivo identificar, por meio de uma abordagem polifásica, as espécies de *Meloidogyne* predominantes nos campos de cultivo de soja na região Centro-Oeste do Brasil, bem como estudar a variabilidade genética de isolados de *M. incognita*. Além disso, avaliou-se a possibilidade de identificação das espécies do grupo MIG por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF (matriz assistida por dessorção e ionização por tempo de voo, do inglês *matrix-assisted desorption/ionization time-of-flight*). A coleta foi realizada em 49 campos de soja com o histórico da ocorrência de espécies de *Meloidogyne*, localizados em cinco municípios do estado de Mato Grosso (MT) e 10 de Goiás (GO). A identificação dos isolados foi realizada com marcadores moleculares do tipo *Sequence Characterized Amplified Regions* (SCAR)-PCR, perfil isoenzimático de esterase e sequenciamento da região mitocondrial citocromo oxidase I (COI) e NADH desidrogenase subunidade 5 (NADH5). A presença de isolados de *Meloidogyne* foi detectada em 18 amostras. *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii* foram detectadas e observou-se a presença de populações mistas em 50% das amostras. A análise filogenética do gene NADH5 apresentou resolução suficiente para separar os isolados de *M. javanica* e *M. incognita* a nível de espécie. A análise da variabilidade de *M. incognita* indica tratar-se de uma população clonal com um reduzido número de haplótipos e com baixa diversidade haplotípica e nucleotídica. Este estudo demonstrou que *M. incognita* é a principal espécie encontrada na cultura da soja, podendo

ocorrer em associação com *M. javanica* e/ou *M. enterolobii*. A avaliação do uso da espectrometria do tipo MALDI-TOF para a identificação taxonômica dos fitonematoides do grupo MIG foi realizada com 18 isolados de *M. incognita*, 20 isolados de *M. javanica* e cinco isolados de *M. arenaria*. Os isolados foram identificados previamente por perfil de esterase e os espectros foram obtidos de proteínas extraídas de cinco fêmeas maceradas em solução de acetonitrila: água Milli Q (50:50). A ionização das proteínas foi realizada em matriz de α -ciano-4-hidroxicinâmica (CHCA). Após a geração de dendrograma, observou-se que a técnica MALDI-TOF MS tem sensibilidade para separar isolados de *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* em grupos distintos, o que possibilita seu uso para a identificação das espécies do grupo MIG.

Palavras-chave: *Meloidogyne incognita*, identificação polifásica, grupo MIG, MALDI-TOF.

GENERAL ABSTRACT

DINIZ, Francisco de Assis dos Santos. **POLYPHASIC IDENTIFICATION AND VARIABILITY OF ISOLATES OF *Meloidogyne* spp.** 2022. p. Dissertation (Master's Degree in Plant Pathology) Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Species of *Meloidogyne* species (Root-Knot Nematode – RKN) are responsible for much damage to agriculture worldwide. Despite their wide worldwide distribution, epidemics caused by RKN are more intense in tropical regions. *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, and *M. arenaria*, the *M. incognita* group or MIG group, are widely distributed in this region and cause damage in a wide range of hosts. The main limitations for the efficient control of these species are: (i) the difficulty of identifying the species in the field, and (ii) the lack of knowledge on the genetic variability of these species. Therefore, this study aimed to identify, through a polyphasic approach, which *Meloidogyne* species are predominant in soybean fields in the Midwest region of Brazil, as well as to study the genetic variability of *M. incognita*. In addition, the possibility of identifying the species of the MIG group was evaluated by Matrix-assisted desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The sample collection was carried out in 49 soybean fields with a history of the occurrence of *Meloidogyne* species located in five municipalities in the states of Mato Grosso (MT) and 10 of Goiás (GO). The identification of the isolates was performed with molecular markers such as *Sequence Characterized Amplified Regions* (SCAR)-PCR, with an isoenzymatic profile of esterase and sequencing of the mitochondrial region cytochrome oxidase I (COI) and NADH dehydrogenase subunit 5 (NADH5). The presence of *Meloidogyne* isolates was detected in 18 samples. *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, and *M. enterolobii* were detected, and the presence of mixed populations was observed in 50% of the samples. Phylogenetic analysis of the NADH5 gene showed sufficient resolution to separate *M. javanica* and *M. incognita* isolates into individual groups at the species level. The variability analysis of *M. incognita* indicates that it is a clonal population, with a reduced number of haplotypes with low haplotypic and nucleotide diversity. This work demonstrated that *M. incognita* is the main species found in soybean and may occur in association with *M. javanica* and/or *M. enterolobii*. The evaluation of the use of MALDI-TOF MS for taxonomic identification of phytonematodes of the MIG group was carried out with 18 isolates of *M. incognita*, 20 isolates of *M. javanica*, and five isolates of *M. arenaria*. The isolates were previously

identified by esterase profile and the spectra were obtained from proteins extracted from five females macerated in a solution of acetonitrile: Milli Q water (50:50). Protein ionization was performed in an α -cyano-4-hydroxycinnamic (CHCA) matrix. After generation of the dendrogram, it was observed that the MALDI-TOF MS technique is sensitive to separate isolates of *M. javanica*, *M. incognita*, and *M. arenaria* into distinct groups, which allows its use for the identification of species of the MIG group.

Keywords: *Meloidogyne incognita*, polyphasic identification, MIG group, MALDI-TOF.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A soja é uma das culturas agrícolas de maior importância em todo mundo. A produção mundial dessa leguminosa na safra de 2021/22 foi de 363,3 milhões de toneladas, sendo o Brasil, os Estados Unidos, a Argentina e a China os maiores produtores mundiais (CONAB, 2022). No Brasil, a produção dessa cultura equivale a 137 milhões de toneladas/ano, sendo 60,2% exportada principalmente para a China e União Europeia (CONAB, 2022b; EMBRAPA, 2022). A exportação brasileira de soja representa 32,5% da receita bruta nacional, o que classifica essa cultura como a principal *commodity* brasileira (MAPA, 2022).

O cultivo da soja em território brasileiro teve início no estado da Bahia no ano de 1882, mas foi nos anos de 1970 que a soja teve seu cultivo expandido para as áreas de Cerrado no Centro-Oeste (CO) (SILVA, 2001). Atualmente, o CO é a principal região produtora do país, concentrando 46% da produção desse grão, com destaque para os estados de Mato Grosso e Goiás (CONAB, 2022b; EMBRAPA, 2022). Na safra de 2020/2021, essa região alcançou uma produção média de 62,8 milhões de toneladas em uma área equivalente a 17,6 milhões de hectares (PEINE et al., 2021). As previsões para a safra de 2021/2022 são ainda mais animadoras. Isso porque, estima-se um aumento na produtividade de três milhões de toneladas, entretanto, tal valor poderia ser superior se não fossem as perdas por fatores de natureza biótica e abiótica (HAMAWAKI et al., 2019; CONAB, 2022a; CONAB, 2022b).

Dentre os principais fatores de natureza biótica que acometem a cultura da soja estão os fitonematoides. Os principais fitonematoides da cultura da soja são *Heterodera* (Ichinohe, 1952), e *Meloidogyne* (Göldi, 1887), felizmente a gama de hospedeiro restrita de *Heterodera* spp. possibilita controlar de forma eficiente esse grupo de nematoides com práticas como a rotação de cultura com plantas não hospedeiras e uso de cultivares resistentes (GARCIA et al., 1999). Já as espécies pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, também conhecido como os nematoides das galhas, vem aumentando sua importância nas áreas de cultivo de soja (MAZZETTI, et al., 2019). Estima-se que os fitopatógenos do gênero *Meloidogyne* podem levar a uma redução da produção na ordem de 10 a 15% (LIMA et al., 2017). Esse grupo caracteriza-se por organismos endoparasitas sedentários causadores de galhas no sistema radicular, bem como por possuírem hábito polífago, sendo capazes de infectar uma vasta gama de plantas cultiváveis e não cultiváveis (CASTRO et al., 2003; BELLÉ et al., 2017; SOARES & NASCIMENTO, 2022).

Meloidogyne incognita (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949), *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 e *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949, ou simplesmente “grupo MIG”, são as espécies que acometem maiores danos econômicos à cultura da soja. O controle das principais espécies de *Meloidogyne* em cultivo de soja deve ser realizado de preferência pela integração de diferentes estratégias de manejo, como rotação de culturas com plantas não hospedeiras, cultivo de plantas antagonistas, controle químico, controle biológico, controle genético e por medidas culturais como alqueive e vasio sanitário (INOMOTO, 2009; NUNES et al., 2010). No entanto, o controle desses fitonematoides é realizado principalmente com o uso de cultivares resistentes (MACHADO et al., 2019). O uso de cultivares resistentes é uma medida barata, eficaz e de menor impacto ao meio ambiente (MAZZETTI et al., 2019). Atualmente, mais de 100 cultivares de soja resistentes à *M. incognita* e/ou *M. javanica* estão disponíveis para o plantio no Brasil e possuem características genéticas herdadas principalmente da cultivar parental “Bragg” (SILVA, 2001; DIAS et al., 2010). No entanto, muitas cultivares apresentam baixo nível de resistência (DIAS et al., 2010) ou apresentam resistência a apenas uma espécie, o que vem favorecendo o aumento populacional de espécies de *Meloidogyne* na região do CO (MOENS et al., 2010; CATTELAN & DALLÁGNOL, 2018; VINHOLES et al., 2021). Dessa forma, uma vez detectada a presença do nematoide das galhas na área é fundamental a realização de uma identificação precisa para um manejo mais eficiente.

A identificação taxonômica das espécies de *Meloidogyne* é dependente de uma abordagem bioquímica e molecular, uma vez que a caracterização morfológica e perfil perineal de fêmeas adultas apresentam grandes incongruências (HUNT & HANDOO, 2009; ONKEDI et al., 2014). As técnicas de eletroforese de isoenzimas e de marcadores SCAR são muito eficientes e precisas para a identificação de algumas, mas nem todas as espécies do gênero *Meloidogyne*. Contudo, o uso de eletroforese de isoenzimas tem como desvantagens a necessidade de nematoides em estágio específico de vida, para algumas espécies a identificação só é possível com uso de duas enzimas, além da existência de perfil atípicos para algumas espécies (MOLINARI et al., 2005). Os resultados com marcadores SCAR não são reproduzidos em alguns laboratórios, podem gerar bandas de baixa intensidade e necessitam de DNA em boa quantidade (ONKEDI et al., 2014). Para a maioria das espécies do gênero, as regiões D2/D3 do 28S, 18S e *Internal Transcribed Spacer* (ITS) são frequentemente utilizadas na taxonomia molecular (YE et al., 2015; ÁLVAREZ-ORTEGA et al., 2019), entretanto, nas espécies que se multiplicam por partenogênese, a identificação por meio destes

marcadores moleculares é complexa. As principais dificuldades são a ocorrência da hibridização e a recente especiação de algumas espécies (LUNT et al., 2008; LUNT et al., 2014). Os *Meloidogyne* partenogênicas, por exemplo, apresentam em um mesmo indivíduo sequências de espaçadores transcritos internos (ITSs) divergentes, resultante possivelmente da mistura de genômas de diferentes parentais durante processos de hibridização (HUGALL, et al., 1999; LUNT et al., 2014). Os genes 18S e 28S rDNA, por outro lado, não apresentam variação nucleotídica suficientes para diferenciar as espécies intimamente relacionadas como os *Meloidogyne* do grupo MIG (LANDA et al., 2008). Portanto, genes mitocondriais (COXII-16S, citocromo oxidase I - COI e NADH desidrogenase subunidade 5 - NADH5) têm sido utilizados na identificação taxonômica e para a compreensão da variabilidade genética das populações de espécies do gênero *Meloidogyne* (JANSSEN et al., 2016; POWERS et al., 2018; RASHIDIFARD et al., 2019; SOARES et al., 2020; SHAO et al., 2020), pois apresentam herança uniparental e taxas de mutações duas vezes superiores a dos genes ribossomais, devido a presença a sistemas de reparo menos eficiente e um ambiente local mais mutagênico (GISSI et al., 2008; BLOK & POWERS, 2009; PAGAN et al., 2015; WANEKA et al., 2021).

Rashidifard et al. (2019) demonstraram que a região do COI foi eficiente para identificar com segurança *M. enterolobii* Yang & Eisenback, 1983, mas apenas o gene NADH5 apresentou resolução suficiente para separar todas as espécies de *Meloidogyne* que se reproduzem por apomixia, incluindo *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. incognita*. Shao et al. (2020) estudaram a variabilidade genética e estruturação da população de *M. enterolobii* na China. O estudo encontrou um total de 11 haplótipos em 19 populações coletadas nas províncias de Guangdong, Guangxi e Hunan. No entanto, vários estudos de taxonomia, sistemática, filogeografia e variabilidade genética de organismos que se reproduzem por partenogênese têm sido realizados utilizando dois ou mais genes mitocondriais, na tentativa de obter resultados mais detalhados. Por exemplo, a estruturação da população, a variação genética e a investigação da distribuição geográfica dos haplótipos do ectoparasita *Gyrodactylus thymalli* Žitňan, 1960 (Monogenea) foram analisadas por meio da análise do gene NADH5 e COI (PETTERSEN et al., 2015).

Novas metodologias e análises mais robustas de identificação e de variabilidade também podem auxiliar na precisão dos resultados, como a que utiliza a técnica de Espectrometria de Massa (EM) do tipo MALDI-TOF (matriz assistida por dessorção e ionização por tempo de voo, do inglês *matrix-assisted desorption/ionization time-of-flight*)

(PERERA et al., 2005; AHMAD et al., 2012). Dentre as vantagens de se utilizar a técnica de tipo MALDI-TOF estão a sensibilidade, a facilidade na preparação das amostras biológicas, a rapidez para se obter os resultados e a capacidade de compartilhar informações por meio de bancos de dados acessíveis, passíveis de atualizações e que possibilitem a identificação de diferentes organismos biológicos (MURUGAIYAN & ROESLER, 2017). Resumidamente, essa técnica consiste na aplicação de raios lasers que irradiam a amostra biológica em uma matriz polimérica, o que faz com as moléculas sofram uma vaporização e ionização branda. Essas moléculas são direcionadas a um detector que mede o tempo da chegada do material a este dispositivo. Cada amostra é a razão média de massa para carga (m/z), intensidades de pico e frequências de pico massa/carga (m/z) (CARBONNELLE et al., 2011). O resultado, em forma de gráficos e pico, é analisado por meio de um software que compara e interpreta esse padrão gerado com um banco de dados existente. A identificação de nematoides do grupo MIG pela técnica de EM do tipo MALDI-TOF ainda é pouco explorada, sendo ausente o perfil proteico contendo o padrão informativo e picos específicos em bancos de dados capazes de separar *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, o que impede o uso dessa ferramenta para a identificação do grupo (MURUGAIYAN et al., 2017).

2. OBJETIVOS

Objetivo deste estudo: (i) identificar e determinar a variabilidade de espécies de *Meloidogyne* presentes em campos de cultivo de soja por métodos bioquímicos e moleculares e (ii) estabelecer bases de dados para a construção de uma biblioteca de perfis proteicos capazes de diferenciar e de identificar isolados do grupo MIG por espectrometria de massa.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, F.; GOPAL, J.; WU, Hui-Fen. 2012. Rapid and highly sensitive detection of single nematode via direct MALDI Mass Spectrometry. *Talanta*, 93(-), 182-185.

ÁLVAREZ-ORTEGA, S.; BRITO, J.A.; SUBBOTIN, S. 2019. Multigene phylogeny of root-knot nematodes and molecular characterization of *Meloidogyne nataliei* Golden, Rose & Bird, 1981 (Nematoda: Tylenchida). *Scientific Reports*, 9 (1), 1-11.

BELLÉ, C.; BRUM, D.; GROTH, M.Z.; BARROS, D.R.; KASPARY, T.E.; SCHAFER, J.T.; GOMES, C.B. 2016. First report of *Meloidogyne luci* parasitizing *Glycine max* in Brazil.

Plant Disease, 100(10), 2174-2174.

BLOK, V.C.; POWERS, T.O. 2009. Biochemical and molecular identification. *In: Perry, R.N Moens, M.; JL Starr, J.L. eds. Root-knot Nematodes*. Wallingford, UK: CAB International, 98-118.

CARBONNELLE, E.; MESQUITA, C.; BILLE, E.; DAY, N.; DAUPHIN, B.; BERETTI, J.L. & NASSIF, X. 2011. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry*, 44(1), 104-109.

CASTRO, J.M.C.; D'ARC DE LIMA, R.; GOMES, C.R. 2003 Variabilidade isoenzimática de populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de regiões brasileiras produtoras de soja. *Nematologia Brasileira*, 27 (1), 1-12.

CATTELAN, A.J.; DALL'AGNOL, A. 2018. The rapid soybean growth in Brazil. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, 25 (1), D102.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). 2022a. Safra Brasileira de Grãos. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos> (last consult: 2022).

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). 2022b. Safra Brasileira de Grãos. <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-eextrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-soja> (last consult: 2022).

DIAS, W.P.; GARCIA, A.; SILVA, J.F.V.; CARNEIRO, G.E.S. 2010. Nematóides em soja: identificação e controle. Londrina: Embrapa Soja, 8. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 76).

GARCIA, A.; SILVA, J.F.V.; PEREIRA, J.E.; DIAS, W.P. 1999. Rotação de culturas e manejo do solo para controle do nematoide de cisto da soja. In: Sociedade Brasileira de Nematologia (ed). O Nematóide de Cisto da Soja: A experiência Brasileira. Artsigner Editores, Jaboticabal (SP), 55-70.

GISSI, C.; IANNELLI, F.; PESOLE, G. 2008. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*, 101 (4), 301-320.

- HAMAWAKI, O.T.; HAMAWAKI, R.L.; NOGUEIRA, A.P.O.; GLASENAPP, J.S. HAMAWAKI, C.D.L.; SILVA, C.O.D. 2019. Evaluation of soybean breeding lineages to new sources of root-knot nematode resistance. *Ciência e Agrotecnologia*, 43. 01-24
- HUGALL, A.; STANTON, J.; MORITZ, C. 1999. Reticulate evolution and the origins of ribosomal internal transcribed spacer diversity in apomictic *Meloidogyne*. *Molecular Biology and Evolution*, 16(2), 157-164.
- HUNT D.; HANDOO, Z.A. 2009. Taxonomy, identification and principal species. In: Perry, R.N.; Moens, M.; Starr, L.J (Eds). Root- knot Nematodes. Wallingford, UK: CABI Publishing: 55–97.
- JANSSEN, T.; KARSSSEN, G.; VERHAEVEN, M.; COYNE, D.; BERT, W. 2016. Mitochondrial coding genome analysis of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne*) supports haplotype based diagnostics and reveals evidence of recent reticulate evolution. *Scientific Reports*, 6(1), 1-13.
- LANDA, B.B.; RIUS, J.E.P.; VOVLAS, N.; CARNEIRO, R.M.; MALEITA, C.M.O.; ABRANTES, I.M.; CASTILLO, P. 2008. Molecular characterization of *Meloidogyne hispanica* (Nematoda, Meloidogynidae) by phylogenetic analysis of genes within the rDNA in *Meloidogyne* spp. *Plant Disease*, 92(7), 1104-1110.
- LIMA, F.S.; CORREA, V.R.; NOGUEIRA, S.R.; SANTOS, P.R. 2017. Nematodes affecting soybean and sustainable practices for their management. *Soybean-The Basis of Yield, Biomass and Productivity*, 3, 95-110.
- LUNT, D.H. 2008. Genetic tests of ancient asexuality in Root Knot Nematodes reveal recent hybrid origins. *BMC Evolutionary Biology*, 8 (1) 1-16.
- LUNT, D.H.; KUMAR, S.; KOUTSOVOULOS, G.; BLAXTER, M.L. 2014. The complex hybrid origins of the root knot nematodes revealed through comparative genomics. *PeerJ*. 2, e356.
- MACHADO, A.C.Z.; AMARO, P.M.; SILVA, S.A. 2019. Two novel potential pathogens for soybean. *PloS One*, 14 (8), e0221416.
- MAZZETTI, V.C.G.; VISINTIN, G.L.; VALÉRIO, I.P.; CAMERA, J.N.; DEUNER, C.C.;

- SOARES, P.L.M. 2019. Reaction of soybean cultivars to *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita*. *Revista Ceres*, 66 (3), 220-225
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). 2022. Valor bruto da produção agropecuária (VBP). <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/valor-bruto-da-producao-agropecuaria-vbp> (last consult: 2021).
- MOLINARI, S.; LAMBERTI, F.; CROZZOLI, R.; SHARMA, S.B.; PORTALES, L.S. 2005. Isozyme patterns of exotic *Meloidogyne* spp. populations. *Nematologia mediterranea*. 33(1), 61–65.
- MURUGAIYAN, J.; ROESLER, U. 2017. MALDI-TOF MS profiling-advances in species identification of pests, parasites, and vectors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 184.
- NUNES, H.T.; MONTEIRO, A.C.; POMELA, A.W.V. 2010. Use of microbial and chemical agents to control *Meloidogyne incognita* in soybean. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 32(3), 403-409.
- ONKENDI, E.M.; KARIUKI, G.M.; MARAIS, M.; MOLELEKI, L.N. 2014. The threat of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Africa: a review. *Plant pathology*, 63(4), 727-737.
- ONKENDI, E.M.; KARIUKI, G.M.; MARAIS, M.; MOLELEKI, L.N. 2014. The threat of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Africa: a review. *Plant Pathology*, 63 (4), 727-737.
- 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.
- PEINE, E.K. 2021. Chinese investment in the Brazilian soybean sector: Navigating relations of private governance. *Journal of Agrarian Change*, 21(1),71-89.
- PERERA, M.R.; VANSTONE, V.A.; JONES, M.G.K. 2005. A novel approach to identify plant-parasitic nematodes using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 1454–1460.

- PETTERSEN, R.A.; MO, T.A.; HANSEN, H.; VØLLESTAD, L.A. 2015. Genetic population structure of *Gyrodactylus thymalli* (Monogenea) in a large Norwegian river system. *Parasitology*, 142(14), 1693-1702.
- POWERS, T.; HARRIS, T.; HIGGINS, R.; MULLIN, P.; POWERS, K. 2018. Discovery and identification of *Meloidogyne* species using COI DNA barcoding. *Journal of Nematology*, 50, (6), 399.
- RASHIDIFARD, M.; MARAIS, M.; DANEEL, M.S.; MIENIE, C.; FOURIE, H. 2019. Molecular characterization of *Meloidogyne enterolobii* and other *Meloidogyne* spp. from South Africa. *Tropical Plant Pathology*, 44 (3), 213-224.
- SHAO, H.; ZHANG, P.; YOU, C.; LI, C.; FENG, Y.; XIE, Z. 2020. Genetic Diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* in Mulberry based on the mitochondrial COI Gene. *Ecology and Evolution*, 10(12), 5391-5401.
- SILVA, J. F. V. 2001. Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja. Londrina: *Embrapa Soja*, 127.
- SOARES, P.L.M.; NASCIMENTO, D.D. 2022. 15 Integrated nematode management of root lesion and root-knot nematodes in soybean in Brazil. https://www.researchgate.net/profile/Daniel-Do-Nascimento/publication/356515756_Integrated_nematode_management_of_root_lesion_and_root_knot_nematodes_in_soybean_in_Brazil/links/61a6207f85c5ea51abbd2e12/Integrated-nematode-management-of-root-lesion-and-root-knot-nematodes-in-soybean-in-Brazil.pdf. (last consult: 2021)
- VINHOLES, P.; ROSADO, R.D.; BORÉM, A.; SCHUSTER, I.; ROBERTS, P. 2021. Single nucleotide polymorphism-based haplotypes associated with *Meloidogyne javanica* resistance in Brazilian soybean germplasm. *Agronomy Journal*, 113 (2), 1008-1019.
- WANEKA, G.; SVENDSEN, J.M.; HAVIRD, J.C.; SLOAN, D.B. 2021. Mutações mitocondriais em *Caenorhabditis elegans* mostram assinaturas de dano oxidativo e um viés AT. *Genetics*, 219(2), iyab116
- YE, W.; ZENG, Y.; KERNS, J. 2015. Molecular characterisation and diagnosis of root-knot

nematodes (*Meloidogyne* spp.) from turfgrasses in North Carolina, USA. *PLoS One*, 10 (11), e0143556.

Capítulo 1

CAPÍTULO 1: IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Meloidogyne* spp. EM SOJA DE MATO GROSSO E GOIÁS

RESUMO

A doença causada por espécies de *Meloidogyne* (nematoide das galhas – NG) em soja é de extrema importância para a agricultura brasileira. Os principais fatores que limitam o manejo eficiente desta doença são a falta de conhecimento sobre as espécies presentes nos campos de cultivo e a sua variabilidade genética. Para responder a esta demanda urgente de informação, foi realizado um estudo, em um total de 49 lavouras de soja com histórico da ocorrência dos NG em cinco municípios do estado de Mato Grosso (MT) e 10 de Goiás (GO). A identificação dos isolados foi realizada a partir da análise de três métodos: marcador molecular *Sequence Characterized Amplified Regions* (SCAR)-PCR, perfil isoenzimático de esterase (Est) e pelo sequenciamento da região mitocondrial citocromo oxidase I (COI) e NADH desidrogenase subunidade 5 (NADH5). As análises detectaram a presença dos NG em um total de 18 amostras coletadas em três municípios do estado do MT e cinco municípios do estado de GO. Foram detectadas a presença de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii* em campos de soja. Populações mistas foram identificadas em 50% das amostras. A análise filogenética do gene NADH5 apresentou resolução suficiente para separar isolados de *M. javanica* e *M. incognita* a nível de espécie. A análise de diversidade de *M. incognita* revelou uma população clonal contendo cinco haplótipos com baixa diversidade haplotípica e nucleotídica. Apenas um haplótipo foi amplamente distribuído em todas as regiões. Destarte, este estudo demonstrou que atualmente *M. incognita* é a principal espécie encontrada na cultura da soja, podendo ocorrer em associação com *M. javanica* e/ou *M. enterolobii*. A ocorrência de infestações mistas na cultura da soja ainda não havia sido reportada e merece uma investigação detalhada sobre os seus impactos na produtividade e na suplantação da resistência.

Palavras-chaves: nematoide das galhas, Centro-Oeste, SCAR, população clonal, NADH5.

INTRODUÇÃO

Dentre os nematoides das galhas, o gênero *Meloidogyne* é composto por aproximadamente 100 espécies (HUNT & HANDOO, 2009). No Brasil, *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 e *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 são as espécies responsáveis pelos principais danos em campos de cultivos de soja, sendo encontradas em 65% das áreas de cultivo (CARNEIRO et al., 1996; CARNEIRO et al., 2000; DIAS et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017). Além de *M. incognita* e *M. javanica*, outras espécies foram reportadas em soja no Brasil, tais como: *M. Paranaensis* Carneiro, Abrantes, Santos & Almeida, 1996, *M. enterolobii* Yang & Eisenback, 1983, *M. ethiopica* Whitehead, 1968, *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949, *M. morocciensis* Rammah & Hirschmann, 1990 e, por último, *M. Luci* Carneiro, Correa, Almeida, Gomes, Deimi, Castagnone-sereno & Karssen, 1996, (CASTRO et al., 2003; ALMEIDA et al., 2008; LIMA et al., 2009; CARNEIRO et al., 2014; KIRSCH et al., 2016; MATTOS et al., 2016; BELLÉ et al., 2016; GERIČ STARE et al., 2017).

Em áreas com presença de espécies de *Meloidogyne* observam-se, geralmente, manchas em reboleira, em que as plantas apresentam porte reduzido e amarelecimento, e a formação de galhas de tamanho e formas variáveis no sistema radicular (EMBRAPA, 2005; BRIDA et al., 2016). Estes sintomas são intensificados durante a ocorrência de veranicos, o que pode levar a uma redução de até 30% na produção da soja (VALIENTE et al., 1990; FAVORETO et al., 2019). Assim, para evitar elevadas perdas na produtividade e a disseminação dos nematoides na área faz-se necessário o controle. O manejo desse grupo de nematoides ocorre por meio da realização da rotação de culturas com uso de plantas não hospedeiras e pelo uso de cultivares resistentes (SILVA, 2001; ARAÚJO et al., 2012). Apesar do gênero *Meloidogyne* ser conhecido por apresentar espécies altamente polífagas, capazes de infectar uma ampla gama de hospedeiros, espécies agrícolas não hospedeiras podem ser utilizadas em rotação com a soja (EMBRAPA, 2005; INOMOTO, 2009). Em geral, o algodão, o amendoim, o sorgo e o milho não são bons hospedeiros de *M. javanica*, de maneira que frequentemente são utilizados em rotação com a soja em áreas infestadas por essa espécie. Já para a redução da população de *M. incognita* em campos de soja, a rotação de cultura com amendoim é a mais recomendada (EMBRAPA, 2005; INOMOTO, 2009).

Atualmente, estão disponíveis mais de 100 cultivares de soja resistentes a *M. javanica* e *M. incognita* (DIAS, 2010). Dentre as cultivares disponíveis no mercado, algumas

cultivares apresentam resistência a uma ou às duas espécies de *Meloidogyne* prevalentes nos campos de cultivo de soja (FUNDAÇÃO CERRADOS, 2022). Logo, independentemente de qual seja a estratégia utilizada no controle de *Meloidogyne*, a identificação correta das espécies distribuídas em nível local, regional ou nacional é uma etapa crucial para um eficiente manejo desses nematoides (EMBRAPA, 2005; CARNEIRO et al., 2005; SANTOS et al., 2012). Entretanto, embora o patossistema soja *versus* nematoides das galhas seja de extrema importância para a agricultura brasileira, até o momento apenas dois estudos sobre levantamento de espécies de *Meloidogyne* em soja foram realizados no Brasil (CASTRO et al., 2003, OLIVEIRA et al., 2017).

No primeiro estudo, foram coletados um total de 78 isolados de *Meloidogyne* spp. em nível nacional no ano de 1998 a 2000, sendo 40 isolados coletados na região Sul (Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina), 28 isolados na região Centro-Oeste (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás), oito isolados na região Sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e dois isolados na região Nordeste (Bahia e Maranhão) (CASTRO et al., 2003). Essas coletas foram realizadas em áreas de produção de soja. Pela análise do perfil enzimático de esterase e malato desidrogenase, foi possível observar a ocorrência de *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. paranaensis*, sendo *M. javanica* predominante em todos os estados (CASTRO et al., 2003). O segundo trabalho (OLIVEIRA et al., 2017) relata o uso de marcadores bioquímicos e moleculares para caracterizar 26 populações de *Meloidogyne* coletadas nos estados da Bahia, Mato Grosso, Goiás e Minas Gerais no ano de 2013. Neste levantamento, foi possível observar apenas a presença de *M. javanica* e *M. incognita* (OLIVEIRA et al., 2017). Populações mistas de espécies do gênero *Meloidogyne* não foram detectadas em nenhum destes estudos. Embora Castro e colaboradores (2003) tenham utilizado apenas marcadores bioquímicos para a determinação da espécie, atualmente o uso de perfis de isoenzimas é usado associado a técnicas de identificação baseadas em DNA, como marcadores *Sequence Characterized Amplified Regions* (SCAR) e análises filogenéticas de genes ribossomais (18S, *Internal Transcribed Spacer* - ITS, segmento D2/D3 do 28S) e mitocondriais (citocromo oxidase I COI e NADH desidrogenase subunidade 5 - NADH5) (CARNEIRO et al., 2004; ONKENDI & MOLELEKI, 2013). Isso se deve principalmente ao fato da inexistência de perfis isoenzimáticos típicos para todas as espécies do gênero *Meloidogyne* (FREITAS et al., 2016).

Os estudos de variabilidade de isolados de *Meloidogyne* coletados em soja são ainda mais raros do que os estudos de identificação. Um único trabalho desenvolvido por Mattos et

al., (2016) relata um número reduzido de isolados de *M. javanica* coletados principalmente no Distrito Federal. Os autores observaram uma baixa variabilidade genética entre os isolados utilizando os marcadores moleculares *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) e *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLP). Apesar de serem simples e de baixo custo, o uso dos marcadores AFLP e RAPD não geram muita informação genética por loco, o que pode explicar a baixa variabilidade genética gerada por esses marcadores. Logo, nesse momento, quase nada se conhece sobre a variabilidade intraespecífica de isolados de *Meloidogyne* presentes em campos de soja do Brasil. Outros marcadores moleculares neutros vêm sendo usados para estudo da variabilidade intraespecífica do gênero *Meloidogyne*, como os *Simple Sequence Repeats* (SSR) e, mais recentemente, o gene mitocondrial COI, que tem auxiliado na identificação e na investigação da variabilidade genética de populações de *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952 e *M. enterolobii* (WANG et al., 2015; JANSSEN et al., 2016; SHAO et al., 2020). Devido às suas taxas evolutivas mais rápidas em comparação aos genes de rDNA ribossomal, os genes codificadores de proteínas mitocondriais, COI e NADH5, são considerados marcadores poderosos para análise de diversidade genética em níveis categóricos mais baixos, incluindo famílias, gêneros e espécies (JANSSEN et al., 2016).

Dessa forma, estudos abordando a identificação de espécies de *Meloidogyne* presentes em campos de soja no Brasil precisam ser realizados, principalmente na região Centro-Oeste, maior região produtora e exportadora de soja do Brasil. Além disso, uma maior amplitude amostral e realização de estudos populacionais precisam ser realizados para uma melhor compreensão da estrutura genética e variabilidade dos isolados presentes nesses campos. A compreensão da distribuição da variação genética entre indivíduos pode contribuir para subsidiar estratégias de controle em programas de melhoramento vegetal visando resistência a doenças (SILVA et al., 2014). Portanto, este estudo tem como objetivo: (i) realizar uma identificação integrativa em nível de espécie por meio de técnicas bioquímicas e moleculares de amostras coletadas nos estados de Mato Grosso e Goiás; (ii) investigar a incidência e a distribuição das espécies de *Meloidogyne* nos dois estados; e (iii) avaliar o potencial dos genes COI e NADH5 para o estudo da variabilidade e estruturação genética intraespecífica de *M. incognita*.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem e coleta de amostras

Todas as amostras coletadas apresentavam imperfeições nas raízes, galhas, protuberâncias, murchas e/ou redução do crescimento da parte aérea. Um total de 49 amostras de solo e de raízes de soja foi coletado em áreas produtoras de soja com histórico da ocorrência do nematoide das galhas em cinco municípios do estado de Mato Grosso (MT) e 10 do estado de Goiás (GO), durante os meses de janeiro a março de 2021. As amostras estudadas de MT foram oriundas dos municípios de Nova Mutum (cinco amostras), Lucas do Rio Verde (cinco amostras), Nova Ubiratã (quatro amostras), Tabaporã (quatro amostras), Paranatinga (três amostras) e as de GO de Montividiu (duas amostras), Bom Jesus (três amostras), Acreúna (duas amostras), Mineiros (quatro amostras), Caiapônia (três amostras), São Miguel do Passa Quatro (três amostras), Abadiânia (duas amostras), Ceres (quatro amostras), Barro Alto (quatro amostras) e Porangatu (duas amostras) (**Figura 1**). Cada amostra consistiu na junção de três amostras simples (subamostras) coletadas em uma profundidade de zero a 15 cm na região da rizosfera das plantas por fazenda. Em seguida, a amostra composta foi formada adicionando em um único saco de polietileno as subamostras, contendo ao final cerca de 300 g de solo e 300 g de raiz. As amostras foram homogeneizadas, identificadas e enviadas para o Laboratório de Epidemiologia e Controle de Fitopatógenos do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, DF, Brasil.

Obtenção do inóculo e multiplicação de populações puras

No laboratório, as amostras de solo e raízes de soja foram individualmente acondicionadas em vasos plásticos com capacidade de três litros contendo uma mistura de solo, areia e substrato comercial (marca BIOPLANT®) na proporção 1:1:1, previamente autoclavado. Após a adição do solo ao vaso, uma muda de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L., grupo Santa Cruz cv. ‘Santa Clara’) foi transplantada por vaso para a multiplicação do nematoide. As plantas de tomate foram mantidas em casa-de-vegetação com temperatura de $25 \pm 5^\circ\text{C}$ por um período de dois meses para a formação de galhas e produção de ovos. O inóculo gerado foi identificado com primers tipo SCAR e utilizado para a obtenção das populações puras de *Meloidogyne*.

Para a obtenção das populações puras, uma massa de ovos foi removida de uma única fêmea e, posteriormente, inoculada em uma muda de tomate recém- transplantada. A coleta

das massas de ovos foi realizada após imersão das raízes, devidamente lavadas em água corrente, em solução com corante de Floxina B (0,1 a 0,15 g de Floxina B para quatro litros de água) por 20 minutos. Após a inoculação da massa de ovos, as plantas de tomate foram mantidas em casa-de-vegetação, nas mesmas condições descritas anteriormente, onde seguiram para extração de ovos, identificação e posterior análise de variabilidade dos isolados.

Extração e amplificação de DNA de *Meloidogyne* spp.

O DNA genômico total de isolados de *Meloidogyne* foi extraído partindo de uma suspensão aquosa contendo aproximadamente 1000 ovos obtidos de inóculos de campo multiplicados em plantas de tomate ou das populações puras. Para extração dos ovos, raízes com galhas foram previamente trituradas em liquidificador doméstico com solução de NaClO (1,25%) e os ovos recuperados em peneiras metálicas com malhas de 45, 150 e 500 mesh sobrepostas (CARNEIRO et al., 2004). A extração do DNA teve início com a maceração dos ovos em nitrogênio líquido. Posteriormente, para a extração do DNA, seguiu-se o protocolo descrito por Randig et al., (2002). O DNA foi ressuscitado em tampão 30 µl de TE (10 mM Tris HCl pH 8; 50 mM EDTA) e armazenado a - 20 °C até sua utilização.

Identificação bioquímica das populações puras de *Meloidogyne* spp.

Foi realizada a identificação bioquímica das populações puras obtidas a partir das populações de campo. Uma vez observada a formação de galhas, cinco fêmeas adultas em estágio leitoso foram extraídas das raízes de plantas com população pura. A identificação prévia das espécies foi realizada com base em perfil de esterase (Est) observado em gel de poliacrilamida de acordo com a metodologia descrita por Carneiro & Almeida (2001). As fêmeas extraídas foram colocadas em uma solução contendo 5 µl da solução extratora e 2 µl de azul de bromofenol (0,01%). As fêmeas foram maceradas com auxílio de um pistilo e a suspensão adicionada em poço do gel de poliacrilamida na concentração de 7%. A corrida de eletroforese vertical ocorreu por aproximadamente 1 h e 10 min., a 200 V e 30 A em câmara fria a 4 °C. Como marcador, cinco fêmeas extraídas de uma população pura previamente identificada como *M. javanica* de perfil J3 foram utilizadas.

Identificação molecular de espécies de *Meloidogyne*

A identificação molecular de espécies de *Meloidogyne* foi realizada por meio da técnica de amplificação de regiões genômicas consideradas como marcadores moleculares espécie-específicos do tipo SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) e sequenciamento de genes mitocondriais e ribossomais de *Meloidogyne* spp. Para todas as reações, a amplificação do DNA genômico foi ajustada para um volume final de 12,5 µL, 2 µL de DNA genômico na concentração de 30 ng de DNA, 6,25 µL DreamTaq PCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific Fermentas Ltd), 0,3 µL de oligonucleotídeo iniciadores em uma concentração de 10 ng e água ultra pura estéril para completar o volume da reação. Os primers usados para a amplificação dos marcadores do tipo SCAR foram: (i) Far/Rar, usados para a detecção de espécies de *M. arenaria* (Zijlstra et al., 2000), (ii) Finc/Rinc para *M. incognita* (Zijlstra et al., 2000), Fjav/Rjav para *M. javanica* (Zijlstra et al., 2000), (iii) par-C09-F/par-C09-R para *M. paranaense* (Randig et al., 2004), (iv) MK77F/MK7R para *M. enterolobii* (Tigano et al., 2010) e (v) met-F/met-R para *M. ethiopica* (Correa et al., 2014).

Para as análises filogenéticas, as reações de PCR foram realizadas com os primers NADH5F/NADH5R para a amplificação do segmento do NADH5 (JANSSEN et al., 2016) e os primers JB3/JB4 para a amplificação da região do COI (BOWLES et al., 1992). Todas as reações foram realizadas no termociclador T100 (Bio-Rad®) e os fragmentos de DNA amplificados conforme protocolo previamente descrito nos artigos base (BOWLES et al., 1992; ZIJLSTRA et al., 2000; RANDIG et al., 2004; TIGANO et al., 2010; CORREA et al., 2014; JANSSEN et al., 2016). Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em tampão TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM de ácido acético e 1 mM EDTA), utilizando géis de agarose a 1%, contendo GelRed (Biotium®). O marcador "DNA ladder" de 1 kb (Invitrogen, CA, USA) foi utilizado como padrão de tamanho molecular e a visualização dos fragmentos foi realizada sob luz ultravioleta utilizando um equipamento de fotodocumentação.

Após a confirmação da amplificação dos fragmentos do gene NADH5 e COI, esses produtos de PCR foram quantificados por meio do NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop One Microvolume UV-Vis) e purificados utilizando a solução de ExoSap-IT® (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA). Os fragmentos de DNA, juntamente com seus primers, foram enviados para o sequenciamento das duas fitas (forward e reverse) na empresa ACTGene (Nova Alvorada, RS, Brasil). A verificação da qualidade e a edição das sequências de nucleotídeos recebidas foram realizadas manualmente para a obtenção da sequência consenso

utilizando o software BioEdit (HALL, 2013). As sequências consenso dos genes NADH5 e COI foram alinhadas separadamente, juntamente com sequências do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), usando o programa de alinhamento de múltiplas sequências MUSCLE® (EDGAR, 2004), presente no software MEGA v. 7.0 (KUMAR et al., 2016).

Uma análise foi realizada com intuito de comparar a identidade entre os contigs obtidos e as sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o algoritmo BLAST (Basic Locus Alignment Search Tool). Para essa análise foi utilizada a opção BLASTn e observou-se a similaridade e a identidade das sequências. As análises filogenéticas foram realizadas utilizando a abordagem de inferência Bayesiana (IB) com o emprego do método de Markov Chain Monte Carlo (MCMC). O modelo de substituição de nucleotídeos apropriado para cada região genômica foi determinado utilizando o programa Mr.ModelTest v.2.3 (POSADA & CRANDALL, 1998) e selecionado de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC) (DARRIBA et al., 2012). A análise filogenética foi realizada usando o software MrBayes v.3.2.3 e executado no portal CIPRES (MILLER et al., 2010). As árvores iniciaram de forma aleatória até 10.000.000 gerações e foram amostradas a cada 1.000 gerações, resultando em um total de 10.000 árvores. Dessas 10.000 árvores, as primeiras 2.500 árvores foram descartadas da análise. Os valores de probabilidade posteriores foram determinados pela árvore de mais consenso das 7.500 árvores remanescentes (RANNALA & YANG, 1996). As árvores foram visualizadas no FigTree v.1.4.3 (RAMBAUT, 2016). Como *outgroup* utilizou-se sequências do gene NADH5 e COI de *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner, 1934) Nickle, 1970.

Análise da diversidade genética do gene COI e NADH5 de *M. incognita*

A diversidade genética de isolados de *M. incognita* oriundos do estado de Mato Grosso e Goiás foi estimada por meio do cálculo do número de haplótipos, diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica do gene COI e NADH5. Testes de neutralidade, como Tajima's D (TAJIMA, 1989) e Fu and Li D* e F (FU & LI, 1993) foram feitos para avaliar a adaptação seletiva, ou seja, a ocorrência de seleção na população. As análises foram realizadas com o programa DnaSP versão 6.0 (LIBRADO & ROZAS, 2009). Somado a isso, uma rede de haplótipos foi desenhada pelo software *Population Analysis with Reticulate Tree* (PopART), com base no método *median-joining haplotype network* (LEIGH & BRYANT,

2015), para entender o relacionamento dos haplótipos, bem como sua distribuição e número de mutações entre haplótipos.

RESULTADOS

De um total de 49 áreas amostradas, detectou-se a presença de galhas no sistema radicular de tomate em amostras provenientes de 18 campos de cultivo de soja. Embora as coletas tenham sido direcionadas, em áreas com histórico do nematoide das galhas, o baixo número de amostras em que se detectou a presença de fitonematoides pode estar relacionado aos equívocos na avaliação da sintomatologia das plantas, visto que algumas das áreas estavam sob a influência de veranicos no período da coleta. As amostras infestadas por espécies de gênero *Meloidogyne* foram provenientes de três municípios do estado de Mato Grosso: Nova Mutum (quatro amostras), Lucas do Rio Verde (quatro amostras) e Toporã (uma amostra) e de cinco municípios no estado de Goiás: Bom Jesus (duas amostras), Acreúna (duas amostras), Ceres (uma amostra), Barro Alto (três amostras) e Porangatu (uma amostra). As amostras foram nomeadas de UnBMT01 a UnBMT09 e UnBGO01 a UnBGO09, respectivamente. Dentre os municípios amostrados, Nova Mutum e Lucas do Rio Verde foram as áreas com maior incidência de *Meloidogyne*, sendo que 80% das amostras provenientes desses dois municípios apresentavam sintomas e sinais da infecção causada por espécies de *Meloidogyne* (**Tabela 1**).

Identificação com primers espécie-específico de populações de campo

A princípio, a identificação das espécies de *Meloidogyne* provenientes das 49 amostras de campos foi realizada por meio do teste SCAR devido à maior sensibilidade do método. A utilização de primers espécie-específicos revelou a presença de produtos de PCR com fragmentos de 1200, entre 650-850 e 520 pb quando se utilizou os primers Finc/Rinc, Fjav/Rjav e MK77F/MK7R desenvolvidos para detecção de isolados de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii*, respectivamente (**Figura 1**). As reações de PCRs realizadas com os primers Far/Rar para *M. arenaria*, par-C09-F/par-C09-R para *M. paranaense* e met-F/met-R para *M. ethiopica* não amplificaram o fragmento de DNA para nenhuma amostra. *Meloidogyne incognita* foi a espécie predominante sendo detectada em todos os municípios amostrados do estado de Mato Grosso (9/9) e Goiás (9/9). *Meloidogyne javanica* estava presente em oito campos de cultivo de soja, sendo seis amostras localizadas em Mato Grosso (6/8), quatro campos no município de Nova Mutum (4/8) e dois em Lucas do Rio Verde (2/8)

e, dois campos no estado de Goiás, município de Acreúna (2/8). Em um total de duas amostras de Mato Grosso foi detectada a presença de *M. enterolobii*, uma no município de Nova Mutum e outra em Lucas do Rio Verde. Uma vez detectada a presença de *M. javanica* e *M. enterolobii*, observou-se sempre a presença de populações mistas, sendo que essas espécies ocorriam em mistura com a espécie de *M. incognita*. Em um campo no município de Nova Mutum observou-se a ocorrência de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii*. Nas demais amostras, apenas a presença de *M. incognita* foi confirmada (**Tabela 1**). Para a confirmação das espécies de *Meloidogyne* detectadas em amostras de campo por SCAR-PCR e a identificação das populações puras, realizaram-se as análises bioquímicas e filogenéticas do gene COI e NADH5.

Identificação Bioquímica

Por meio das análises bioquímicas foram identificadas as espécies de *Meloidogyne* pela visualização e comparação do perfil de esterase (Est) observado nas populações puras. Das 18 amostras com a presença de *Meloidogyne* spp., apenas uma foi identificada com *M. javanica*, de modo que, em relação às demais, tratava-se da espécie *M. incognita*. A amostra identificada como *M. javanica* foi originada de um campo do município de Nova Mutum - MT (**Tabela 1**). As amostras com *M. incognita* apresentaram o perfil Est II (Rm: 1,00), enquanto na amostra de *M. javanica* observou-se um padrão de bandas similar ao marcador, sendo identificado como o perfil Est J3 (Rm: 1,00; 1,25 e 1,40) (**Figura S1**). A partir desse resultado de identificação das populações puras pelo perfil Est, especula-se que, embora *M. javanica*, *M. enterolobii* e *M. incognita* estejam em mistura em algumas áreas, aparentemente a concentração de inóculo de *M. incognita* é superior em todas as áreas.

Identificação molecular e filogenia

Estudos filogenéticos foram realizados utilizando as sequências individuais dos genes mitocondriais (mtDNA) COI e NADH5. Um total de 14 populações puras de *Meloidogyne* foram analisadas para inferir sobre as espécies de *Meloidogyne* presentes em campos de soja dos estados de Mato Grosso e Goiás. Os produtos do sequenciamento das regiões genômicas apresentaram alta similaridade (>97%) com sequências de *M. arenaria*, *M. incognita* e *M. javanica* depositadas no banco de dados do GenBank. De um total de 362 sítios analisados do gene COI, 262 foram variáveis e 34 continham informações parcimoniosas. O gene NADH5 apresentou 299 sítios conservados, 115 variáveis e 71 são informativos para a parcimônia.

Os modelos evolutivos HKY e GTR foram selecionados pelo programa Mr.ModelTest para a análise IB dos genes COI e NADH5, respectivamente. Dentre as duas regiões utilizadas para o estudo filogenético, apenas na região do NADH5 foram observados polimorfismos capazes de diferenciar as espécies *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (**Figura 2**). A filogenia construída a partir do gene COI agrupou em um único clado (*posterior probability*, PP >0,84) todas as sequências de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, separado dos outros dois clados formados por espécimes de *M. hapla* e *M. enterolobii* (**Figura S2**). O resultado da análise IB para o gene NADH5 mostrou que 14 sequências obtidas deste estudo foram classificadas como *M. incognita* (UnBMT2, UnBMT3, UnBMT4, UnBMT5, UnBMT7, UnBMT8, UnBMT9, UnBGO1, UnBGO2, UnBGO3, UnBGO5, UnBGO6, UnBGO8, UnBGO9) e uma como *M. javanica* (UnBMT1), em concordância com os testes bioquímicos e moleculares. A árvore gerada com esse marcador revelou que os isolados pertencentes à espécie *M. incognita* apresentaram maior diversidade e se distribuem em dois grupos. O primeiro grupo mais basal composto por 12 isolados (UnBMT2, UnBMT3, UnBMT4, UnBMT5, UnBMT7, UnBMT8, UnBMT9, UnBGO1, UnBGO3, UnBGO6, UnBGO8, UnBGO9) coletados nos estados de Mato Grosso e Goiás e cinco sequências de *M. incognita* obtidas do Genbank (**Tabela S1**). O segundo grupo foi formado por isolados coletados no estado de Goiás (UnBGO2 e UnBGO5). Como esperado, o isolado UnBMT1 agrupou-se com as sequências de *M. javanica* (PP = 0,92). Apesar das análises filogenéticas separarem *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* em grupos distintos, essas não resultaram na ocorrência de clados monofiléticos.

Diversidade genética com base em genes mtDNA

Análises da diversidade genética de 14 isolados de *M. incognita* foram realizadas utilizando apenas os genes COI e NADH5. Não foi possível observar sítios polimórficos na região do COI entre as sequências analisadas. As sequências dos produtos de PCR amplicados do gene NADH5 apresentaram número médio de diferenças nucleotídicas (k) de 1,14, uma diversidade nucleotídica (π) equivalente a 0,002 e diversidade haplotípica (HD) igual a 0,50. O teste de neutralidade Tajima e F_s de Fu apresentou valores negativos de -2,05 e -2,66, significativos com $P < 0,05$, respectivamente. Este resultado sugere que as populações de *M. incognita* do estado de Mato Grosso e Goiás estejam em processo de expansão populacional. Um total de cinco haplótipos foi observado nas populações, sendo que 10 isolados coletados no estado de Mato Grosso e Goiás pertencem ao mesmo haplótipo (Hap2) e os demais

haplótipos composto por um único isolado (**Figura 3**). O haplótipo 2 (Hap2) foi composto por um isolado coletado no município de Nova Mutum (MT), três isolados em Lucas do Rio Verde (MT), um isolado em Toporã (MT), dois isolados em Bom Jesus (GO), um isolado em Ceres (GO), um em Barro Alto (GO) e um em Porangatu (GO). Os Hap1 e Hap4 foram originalmente coletados no município de Nova Mutum (MT) e Lucas do Rio Verde (MT), enquanto o Hap3 e Hap5 foram amostrados na cidade de Acreúna (GO) e Barro Alto de Goiás (GO), respectivamente.

DISCUSSÃO

A identificação e o estudo da variabilidade genética de espécies de *Meloidogyne* são imprescindíveis para o estabelecimento de estratégias de controle eficientes em áreas de cultivo de soja, principalmente para a geração de informação básica para programas de melhoramento e a escolha apropriada de cultivares e/ou cultura de sucessão a ser implementada na área. Neste estudo, um total de 49 campos de soja com histórico da ocorrência de *Meloidogyne* foi amostrado em cinco municípios do estado de Mato Grosso (MT) e 10 de Goiás (GO). Das amostras coletadas, apenas em 18 detectou-se a presença de espécies de *Meloidogyne* e a espécie predominante em todos os campos de cultivo foi *M. incognita*. Além disso, foi possível identificar a presença dessa espécie em infestações mistas com *M. javanica* e/ou *M. enterolobii*. O conjunto de populações de *M. incognita* apresentou uma estrutura clonal com um reduzido número de haplótipos, sendo um deles amplamente distribuído nos dois estados.

A predominância de *M. incognita* em lavouras de soja do Centro-Oeste já havia sido reportada anteriormente. Em coletas realizadas no ano de 2013, observou-se uma predominância de *M. incognita* em campos de soja, embora também tenham detectado a presença de *M. javanica* em um reduzido número de amostras (OLIVEIRA et al., 2017). Contudo, um estudo realizado no início da década de 2000 demonstrou que *M. javanica* era prevalente nos estados de Mato Grosso e Goiás (CASTRO et al., 2003). Considerando estes resultados, é possível concluir que, ao longo das últimas duas décadas, houve uma mudança na predominância das espécies de *Meloidogyne* nesta região. Este fato pode ser explicado por dois diferentes fatores, isolados ou em associação: (i) a pressão de seleção impulsionada pelo uso de cultivares resistentes em ampla escala e (ii) as alterações no manejo da cultura, como por exemplo, a rotação soja/milho e o plantio direto.

Até o fim da década de 1990, apenas sete cultivares de soja disponíveis no mercado eram consideradas resistentes à *M. Javanica*. Em contrapartida, mais de 30 cultivares eram resistentes a *M. incognita* (EMBRAPA, 1996). As cultivares mais utilizadas até o ano 2000 “FT cristalina” e “Ocepar 4” - eram classificadas como suscetíveis a *M. javanica* (SHARMA et al., 1999; TERASAWA et al., 2017; BONATO & BONATO, 2002; CARNEIRO et al., 2002; DIAS-ARIEIRA et al., 2002). Portanto, o uso destas variedades pode ter favorecido a maior ocorrência de *M. javanica* até o começo dos anos 2000. Vários híbridos de milho apresentam resistência a *M. javanica*. Consequentemente, a rotação dessa cultura com a soja leva à redução do inóculo de *M. javanica* na área, sem interferir na taxa reprodutiva de *M. Incognita* (RIBEIRO et al., 2002; INOMOTO et al., 2009). A introdução de outras culturas, como o algodão nas áreas de cerrado, também pode ter impedido a expansão de *M. javanica* e contribuído para o aumento populacional de *M. incognita* (CASTRO et al., 2003).

A prática de rotação de culturas, juntamente com a cobertura permanente e o mínimo revolvimento do solo, possibilita melhorias nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. A temperatura do solo é crucial para a prevalência de uma espécie de nematoide (LACEY & GEORGIS, 2012). A infestação e a multiplicação de *M. javanica*, por exemplo, é máxima em solos com temperaturas entre 28-32 °C e temperaturas inferiores podem reduzir o crescimento populacional do nematoide (INOMOTO et al., 2009; CAMPOS et al., 2011). Logo, a diminuição da temperatura do solo provocada pelas práticas de plantio direto pode ter contribuído para a redução da incidência de *M. javanica* nas áreas de cultivo. Isso porque, as áreas com o plantio convencional apresentam uma maior variação na temperatura do solo, podendo atingir valores absolutos de até 35 °C. No plantio direto, uma prática implementada em grande parte das áreas de cultivo, ocorre uma redução nas variações da temperatura do solo com temperatura máxima de 28 °C (COELHO, et al., 2013). Freire et al., (2007) demonstraram que a infestação e a multiplicação de *M. incognita* é superior em temperaturas abaixo de 28 °C. De fato, neste estudo, quando se detectou a presença de populações mistas, foi possível observar a predominância de inóculo de *M. incognita* em campos com cultivo sucessivos de soja/milho e plantio direto. Isso pode ser comprovado pela dificuldade de se conseguirem populações puras de *M. javanica* nas amostras de campo (**Tabela 1**).

A ocorrência de populações mistas de espécies de *Meloidogyne* em uma mesma área é comumente observada em campos comerciais de cana-de-açúcar (NORONHA et al., 2016), no entanto, nunca foi reportado na cultura da soja. Neste estudo, detectou-se a presença

de mais de uma espécie de *Meloidogyne* em 50% das amostras analisadas, especialmente a coexistência de *M. incognita* e *M. javanica* na mesma área (**Tabela 1**). A detecção da ocorrência de populações mistas em campo foi possível devido à maior sensibilidade da técnica de SCAR-PCR, comparada com a abordagem bioquímica. Diferente do perfil de esterase, em que são necessárias cinco fêmeas adultas de coloração branco-leitosa para que ocorra a identificação da espécie, as técnicas de PCR são capazes de identificar indivíduos em todos os estágios de vida e com sensibilidade próxima a 10 pg/ μ l de DNA (WALIULLAH et al., 2020). Logo, a técnica de SCAR-PCR parece ser mais apropriada para realizar um estudo de levantamento de espécies de *Meloidogyne* em uma área devido à maior sensibilidade e capacidade de detecção simultânea de múltiplas espécies. A ocorrência frequente de infestações múltiplas pode impactar nos programas de melhoramento, interferir na escolha da variedade utilizada na região e favorecer a suplantação da resistência. Entretanto, este fenômeno ainda precisa ser investigado experimentalmente.

A ocorrência de *M. enterolobii* em associação com *M. incognita* foi observada em duas amostras coletadas no estado de Mato Grosso (Nova Mutum e Lucas do Rio Verde). *Meloidogyne enterolobii* no Brasil foi relatado um única vez na cultura da soja no município de Ituverava no estado de São Paulo (ALMEIDA et al., 2008). Nos Estados Unidos, o *M. Enterolobii* foi relatado na cultura da soja em 2013 no estado da North Carolina (Ye et al., 2013). *M. enterolobii* em campos de cultivo de soja é preocupante, uma vez que se trata de um organismo com grande capacidade infectiva, capaz de apresentar alta densidade populacional e não se conhece cultivares de soja resistente ao fitopatógeno (CASTAGNONE-SERENO, 2012; MIN et al., 2012; SILVA et al., 2021). No entanto, uma reanálise e novas coletas no local amostrado precisam ser realizadas para a confirmação da ocorrência de *M. enterolobii* na cultura da soja no estado do Mato Grosso.

Somado à escolha de metodologias mais sensíveis e uma correta identificação das espécies de *Meloidogyne*, o conhecimento da variabilidade desses isolados é essencial para um efetivo controle e desenvolvimento direcionado de cultivares resistentes (CASTAGNONE-SERENO, 2002; HUMPHREYS-PEREIRA & ELLING, 2013). A variabilidade das populações puras foi avaliada por meio da avaliação do perfil de esterase e análise das sequências mitocondriais. Os resultados de perfil de esterase mostraram a ocorrência do perfil Est I1 em todos os isolados de *M. incognita* e Est J3 no isolado de *M. javanica*. OLIVEIRA et al., (2017) mostraram predominância do perfil I1 de *M. incognita*,

embora também observaram a presença das variantes J2 e J3 de *M. javanica*, enquanto CASTRO et al., (2003) reportou o fenótipo de Est I1 e I2, de *M. incognita*, e J2 e J3 de *M. javanica*. Uma menor variação no fenótipo de esterase foi observada nos isolados de *Meloidogyne* descritos neste trabalho, provavelmente devido ao número reduzido de amostras. Com relação aos genes mitocondriais COI e NADH5, foi possível observar diferentes haplótipos. No entanto, a população apresentou índices de diversidade reduzidos ($\pi = 0,002$ e $HD = 0,50$). Ao contrário do observado por Shao et al., (2020) em populações de *M. enterolobii*, nesse estudo não foi observado variações genéticas no gene COI e uma baixa variabilidade foi observada no gene NADH5.

Embora não se saiba se *M. incognita* é nativa ou foi introduzida no Brasil, a ampla distribuição de um único haplótipo e a baixa variabilidade genética podem ser explicadas pelo seu tipo de reprodução. De acordo com o modelo de uso geral, (do inglês, general-purpose genotype) proposto por Hewitt (2004), acredita-se que a persistência de organismos apomíticos em larga extensão, seja devido à seleção de um número reduzido de clones com ampla adaptabilidade e tolerância ambiental que parece ser o caso do haplótipo 2 de *M. incognita*. A população de *M. incognita* estudada apresentou uma estruturação de uma população clonal, com baixa diversidade nucleotídica e haplotípica. O padrão observado foi o mesmo detectado em outros estudos que comparam populações de *M. incognita* de diferentes regiões e continentes, bem como utilizar marcadores moleculares de menor e maior resolução.

Quando se avaliou a variabilidade de cinco isolados coletados em raízes de algodão de quatro diferentes estados do Brasil (Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Bahia), pertencentes a duas raças (raça 3 e raça 4) e dois fenótipos de esterase (I1 e I2), por meio do marcador RAPD e AFLP, apenas 2,7% de variação foi observada (SILVA et al., 2014). Estudando a variabilidade de isolados com origem na América e África utilizando o marcador RAPD, também se observou 30% de bandas polimórficas em isolados de *M. incognita* (SANTOS et al., 2012; KOUTSOVOULOS et al., 2019). As análises genômicas confirmaram estes resultados e demonstraram baixa variabilidade (KOUTSOVOULOS et al., 2019).

Embora populações clonais apresentem uma maior facilidade no controle devido a implementação de cultivares resistentes, o controle de *M. incognita* ainda é complexo. Esse fitonematoide apresenta vantagem na multiplicação e colonização, uma vez que esses indivíduos não necessitam encontrar outro organismo para geração de descendentes (CASTAGNONE- SERENO, 2006).

Assim, este trabalho demonstrou que atualmente *M. incognita* é a principal espécie encontrada na cultura da soja, podendo ocorrer em associação com *M. javanica* e/ou *M. enterolobii*. A ocorrência de infestações mista na cultura da soja nos estados do Mato Grosso e Goiás é um fato que merece uma investigação detalhada sobre os seus impactos na produtividade e suplantação da resistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E.J.; SOARES, P.L.; DA SILVA, A.R.; DOS SANTOS, J.M. 2008. Novos registros sobre *Meloidogyne mayaguensis* no Brasil e estudo morfológico comparativo com *M. incognita*. *Nematologia Brasileira*, 32(3), 236-241.

ARAUJO, F.F.D.; BRAGANTE, R.J.; BRAGANTE, C.E. 2012. Controle genético, químico e biológico de meloidoginose na cultura da soja. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 42(2), 220-224.

BELLÉ, C.; BRUM, D.; GROTH, M.Z.; BARROS, D.R.; KASPARY, T.E.; SCHAFER, J.T. GOMES, C.B. 2016. First report of *Meloidogyne luci* parasitizing *Glycine max* in Brazil. *Plant Disease*, 100 (10), 2174-2174.

BONATO, E.R.; BONATO, A.L.V. 2002. Cultivares que fizeram a história da soja no Rio Grande do Sul. Embrapa Gado de Corte, 106.

BOWLES, J.; BLAIR, D.; MCMANUS, D.P. 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 54(2), 165-173.

BRIDA, A.L.D.; GABIA, A.A.; PEZZONI FILHO, J.C.; MORAES, D.A.D.C.; WILCKEN, S.R.S. 2016. Variabilidade espacial de *Meloidogyne javanica* em soja. *Summa Phytopathologica*, 42 (2), 175-179.

CAMPOS, H.D.; SILVA, J.R.C.; CAMPOS, V.P.; SILVA, L.H.C.P.D.; COSTA, L. S.A.S.; SILVA, W.J.R.D. 2011. Efeito da temperatura do solo na infectividade e reprodução de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines* em cultivares de soja. *Ciência e Agrotecnologia*, 35 (5), 900-907.

CARNEIRO, R.G.; MAZZAFERA, P.; FERRAZ, L.C.C.; MURAOKA, T.; TRIVELIN, P.C.O. 2002. Uptake and translocation of nitrogen, phosphorus and calcium in soybean

infected with *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. *Fitopatologia Brasileira*, 27(2), 141-150.

CARNEIRO, R.M.; ALMEIDA, M.R.; QUÉNÉHERVÉ, P. 2000. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology*, 2 (6), 645-654.

CARNEIRO, R.M.; CORREA, V.R.; ALMEIDA, M.R.A.; GOMES, A.C.M.; DEIMI, A.M.; CASTAGNONE-SERENO, P. KARSSSEN, G. 2014. *Meloidogyne luci* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising different crops in Brazil, Chile and Iran. *Nematology*, 16 (3), 289-301.

CARNEIRO, R.M.D.G. & ALMEIDA, M.R.A. 2001. Electrophoretic technique used in the study of root-knot nematode enzymes for species identification. *Nematologia Brasileira* 25(1), 35-44.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, A.R.A.; CARNEIRO, R.G. 1996. Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. *Fundamental and Applied Nematology*, 19 (6), 555-560.

CARNEIRO, R.M.D.G.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A.; GONÇALVES, W. 2005. Identification and characterization of *Meloidogyne* species on coffee from São Paulo and Minas Gerais States of Brazil using esterase phenotypes and SCAR-PCR multiplex. *Nematologia Brasileira*, 29 (2), 233–241.

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 (2), 287- 298.

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. 2002. Genetic variability in parthenogenetic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., and their ability to overcome plant resistance genes. *Nematology*, 4(5), 605-608.

CASTAGNONE-SERENO, P. 2006. Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. *Heredity*, 96(4), 282-289.

- CASTAGNONE-SERENO, P. 2012. *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*): profile of an emerging, highly pathogenic, root-knot nematode species. *Nematology*, 14(2), 133-138.
- CASTRO, J.M.C.; D'ARC DE LIMA, R.; GOMES, C.R. 2003 Variabilidade isoenzimática de populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de regiões brasileiras produtoras de soja. *Nematologia Brasileira*, 27(1), 1-12.
- CATTELAN, A.J.; DALL'AGNOL, A. 2018. The rapid soybean growth in Brazil. Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado. *Oilseeds Fats Crops Lipids (OCL)*, 25(1), D102.
- COELHO, M.E.H.; FREITAS, F.D.; CUNHA, J.L.X.L.; SILVA, K.S.; GRANGEIRO, L.C.; OLIVEIRA, J.B. 2013. Coberturas do solo sobre a amplitude térmica e a produtividade de pimentão. *Planta daninha*, 31(2), 369-378.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). 2022b. Safra Brasileira de Grãos. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-soja>. Consultado em: 2022.
- 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.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772-772.
- DIAS, W. P.. 2010. Nematóides em soja: identificação e controle. Londrina: EMBRAPA, 8.
- DIAS, W.P.; MORAES, L.A.C.; DE CARVALHO, C.G.P.; DE OLIVEIRA, M.C.N.; ORSINI, I.P.; DE LEITE, R.M.V.B.C. 2016. Resistance to *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus brachyurus* in sunflower cultivars adapted to the tropical region of Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 41(5), 325-330.
- DIAS-ARIEIRA, C.R.; FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; MIZOBUTS, H. 2002. Penetração e desenvolvimento de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Heterodera glycines* em quatro gramíneas forrageiras. *Nematologia Brasileira*, 26(1), 35-41.

EDGAR, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 1996. Recomendações técnicas para a cultura da soja na região central do Brasil 1996/97. Londrina, EMBRAPA. CNPSo. Documentos, 96.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 2005. Sistemas de Produção: Tecnologias de Produção de Soja na Região Central do Brasil, Embrapa Soja, Londrina, Embrapa Cerrados, Planaltina, Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, 239.

FAVORETO, L.; MEYER, M.C.; DIAS-ARIEIRA, C.R.; MACHADO, A.C.Z.; SANTIAGO, D.C.; RIBEIRO, N.R. 2019. Diagnose e manejo de fitonematoides na cultura da soja. *Informe Agropecuário*, 40(306), 18-29.

FREIRE, E.S.; CAMPOS, V.P.; DUTRA, M.R.; ROCHA, F.D.S.; SILVA, J.R.C.D.; POZZA, E.A. 2007. Infectividade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em tomateiro após privação alimentar em solo e água em diferentes condições. *Summa Phytopathologica*, 33(3), 270-274.

FREITAS, L.G.; NEVES, W.S.; OLIVEIRA, R.D.L. 2016. Métodos em nematologia vegetal. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. Métodos em fitopatologia. Viçosa: Editora UFV, 11, 257-296.

FU, Y.X.; LI, W.H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133(3), 693-709. FUNDAÇÃO CERRADOS. Cultivares de soja. Disponível em: <<http://fundacaocerrados.com.br/cultivares-de-soja/>>. Acessado em: 2022.

GERIČ STARE, B.; STRAJNAR, P.; SUSIČ, N.; UREK, G.; ŠIRCA, S. 2017. Reported populations of *Meloidogyne ethiopica* in Europe identified as *Meloidogyne luci*. *Plant Disease*, 101(9), 1627-1632.

HALL, T. 2013. BioEdit: Biological sequence alignment editor for Win 95/98/NT/2K/XP/7, version 7.1.9

HEWITT, G.M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *PhilTrans Roy Soc London B Biol Sci*, 359 (1442), 183–195.

- HUMPHREYS-PEREIRA, D.A. & ELLING, A.A. 2013. Intraspecific variability and genetic structure in *Meloidogyne chitwoodi* from the USA. *Nematology*, 15(3), 315-327.
- HUNT D.; HANDOO, Z.A. 2009. Taxonomy, identification and principal species. In: PERRY, R.N.; MOENS, M.; STARR, J.L. (Eds). Root- knot Nematodes CABI Publishing: 55–97.
- INOMOTO, M.M.; ASMUS, G.L. 2009. Culturas de cobertura e de rotação devem ser plantas não hospedeiras de nematoides. *Visão Agrícola*, 1,112-116.
- JANSSEN, T.; KARSSSEN, G.; VERHAEVEN, M.; COYNE, D.; BERT, W. 2016. Mitochondrial coding genome analysis of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne*) supports haplotype based diagnostics and reveals evidence of recent reticulate evolution. *Scientific Reports*, 6(1), 1-13.
- KIRSCH, V.G.; KULCZYNSKI, S.M.; GOMES, C.B.; BISOGNIN, A.C.; GABRIEL, M.; BELLÉ, C. LIMA-MEDINA, I. 2016. Characterization of *Meloidogyne* and *Helicotylenchus* species associated with soybean in Rio Grande do Sul State. *Nematropica*, 46(2), 197-208.
- KOUTSOVOULOS, G.D.; MARQUES, E.; ARGUEL, M.J.; DURET, L.; MACHADO, A.C.; CARNEIRO, R.M.; DANCHIN, E.G. 2019. Population genomics supports clonal reproduction and multiple independent gains and losses of parasitic abilities in the most devastating nematode pest. *Evolutionary Applications*, 13(2), 442-457.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- LACEY, L.A. & GEORGIS, R. 2012. Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. *Journal of Nematology*, 44(2), 218.
- LEIGH, J.W. & BRYANT, D. 2015. POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110-1116.
- LIBRADO, P. & ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.

- LIMA, E.A.; MATTOS, J.K.; MOITA, A.W.; CARNEIRO, R.G.; CARNEIRO, R.M. 2009. Host status of different crops for *Meloidogyne ethiopica* control. *Tropical Plant Pathology*, 34 (3),152-157.
- MACHADO, A.C.Z.; AMARO, P.M.; SILVA, S.A. 2019. Two novel potential pathogens for soybean. *PloS One*, 14(8), e0221416.
- MATTOS, V.S.; FURLANETTO, C.; SILVA, J.G.; SANTOS, D.F.; ALMEIDA, M.R.A.; CORREA, V.R.; CARNEIRO, R.M. 2016. *Meloidogyne* spp. populations from native Cerrado and soybean cultivated areas: genetic variability and aggressiveness. *Nematology*, 18 (5), 505- 515.
- MILLER, M.A., PFEIFFER, W. & SCHWARTZ, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA. pp 1-8.
- NORONHA, M.D.A.; MUNIZ, M.D.F.S.; CRUZ, M.D.M.; ASSUNÇÃO, M.C.; CASTRO, J.M.D.C.; OLIVEIRA, E.R.L.D.; MACHADO, A.C.Z. 2016. *Meloidogyne* and *Pratylenchus* species in sugarcane fields in the state of Alagoas, Brazil. *Ciência Rural*, 47(2), 1-3.
- OLIVEIRA, C.M.D.; SOUZA, I.T.; ARAÚJO, J.V.D.; FREITAS, M.A.D.; ROCHA, M.R.D.; PETROFEZA, S. 2017. Morphological, biochemical, and molecular characterization of *Meloidogyne* spp. populations from Brazilian soybean production regions. *Ciência Rural*,47(5), e20160634.
- ONKENDI, E.M.; KARIUKI, G.M.; MARAIS, M.; MOLELEKI, L.N. 2014. The threat of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Africa: a review. *Plant pathology*, 63(4), 727-737.
- POSADA, D. & CRANDALL, K. A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14(9), 817-818.
- RAMBAUT, A.; LAM, T. T.; MAX CARVALHO, L.; PYBUS, O. G. 2016. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus evolution*, 2(1), vew007.

- 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(5), 862-870.
- RANDIG, O.; BONGIOVANNI, M.; CARNEIRO, R.M.; 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(5), 862-870.
- RANDIG, O.; CARNEIRO, R.M.D.G.; CASTAGNONE-SERENO, P. 2004. Identification of Brazilian coffee-damaging species of *Meloidogyne* using SCAR-coffee markers in multiplex-PCR. *Nematologia Brasileira*, 28(1), 1-10.
- RANNALA, B. & YANG, Z. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*, 43(3), 304-311.
- RIBEIRO, N.R.; CRAVEIRO, A.G.; SILVA, J.F.V.; FRANCISCO, A.; GOMES, J.; MEIRELLES, W.F. 2002. Avaliação de genótipos de milho (*Zea mays*) aos nematoides *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* raça 3. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 24., 2002, Florianópolis. Anais Florianópolis: Embrapa, 1-5.
- SANTOS, M.F.A.; FURLANETTO, C.; ALMEIDA, M.R.A.; CARNEIRO, M.D.G.; MOTA, F.C.; GOMES, A.C. M.M.; 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(4), 671-684.
- SHAO, H.; ZHANG, P.; YOU, C.; LI, C.; FENG, Y.; XIE, Z. 2020. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* in Mulberry based on the mitochondrial COI gene. *Ecology and Evolution*, 10(12), 5391-5401.
- SHARMA, R.D.; VIVALDI, L.J. 1999. Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pasteuria penetrans*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34(11), 2065-2069.
- SILVA, E.H.; DA SILVA MATTOS, V.; FURLANETO, C.; GIBAND, M.; BARROSO, P.A.V.; MOITA, A.W.; 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.

- SILVA, J.D.O.; OLIVEIRA, C.M.; CARNEIRO, R.G.D.S.; ROCHA, M.R. 2021. *Meloidogyne enterolobii* development and reproduction in tomato plants treated with resistance inducers. *Nematology*, 1(aop), 1-6.
- TAJIMA, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.
- TERASAWA, F.; TERASAWA, J.M.; TERASAWA, M.M. 2017. FT Sementes and the expansion of soybeans in Brazil. In: LOPES DA SILVA F.; BORÉM A.; SEDIYAMA T.; LUDKE W. (eds) Soybean Breeding. *Springer, Cham.* (16), 17-27.
- 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.
- VALIENTE, A.R.; ALVAREZ, E.; SANTANDER, V.M. 1990. Assessment of yield losses due to root-knot nematode species in soybean. *International Nematology Network Newsletter*, Raleigh, 7, (1) 42-43.
- WALIULLAH, S.; BELL, J.; JAGDALE, G.; STACKHOUSE, T.; HAJIHASSANI, A.; BRENNEMAN, T.; ALI, M.E. 2020. Rapid detection of pecan root-knot nematode, *Meloidogyne partityla*, in laboratory and field conditions using loop-mediated isothermal amplification. *PloS One*, 15(6), e0228123.
- WANG, Y.; WANG, X.; Q., XIE, Y.; DONG, Y.; HU, X.Q.; YANG, Z.X. 2015. First report of *Meloidogyne enterolobii* on hot pepper in China. *Plant Disease*, 99(4), 557-557.
- Ye, W. M., Koenning, S. R., Zhuo, K., & Liao, J. L. (2013). First report of *Meloidogyne enterolobii* on cotton and soybean in North Carolina, United States. *Plant Disease*, 97(9), 1262-1262.
- YE, W.; ZENG, Y.; KERNS, J. 2015. Molecular characterisation and diagnosis of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from turfgrasses in North Carolina, USA. *PLoS One*, 10, (11) e0143556.

YE, W.M.; KOENNING, S.R.; ZHUO, K.; LIAO, J.L.; 2013. First report of *Meloidogyne enterolobii* on cotton and soybean in North Carolina, United States. *Plant Disease*, 97(9), 1262-1262.

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), 847-85

TABELAS E FIGURAS

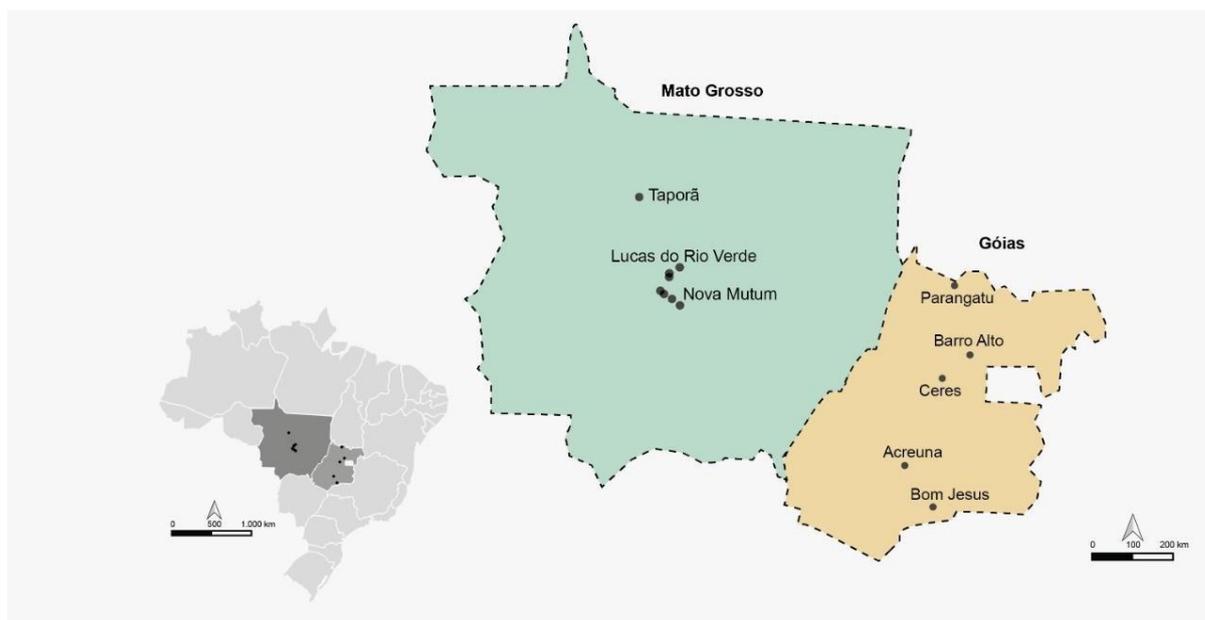


Figura 1. Local de amostragem de isolados de *Meloidogyne* em campos de cultivo de soja nos estados de Mato Grosso e Goiás, destacados na área verde e amarela do mapa, respectivamente. Os pontos pretos representam os municípios em que se observou a presença de espécies de *Meloidogyne*.

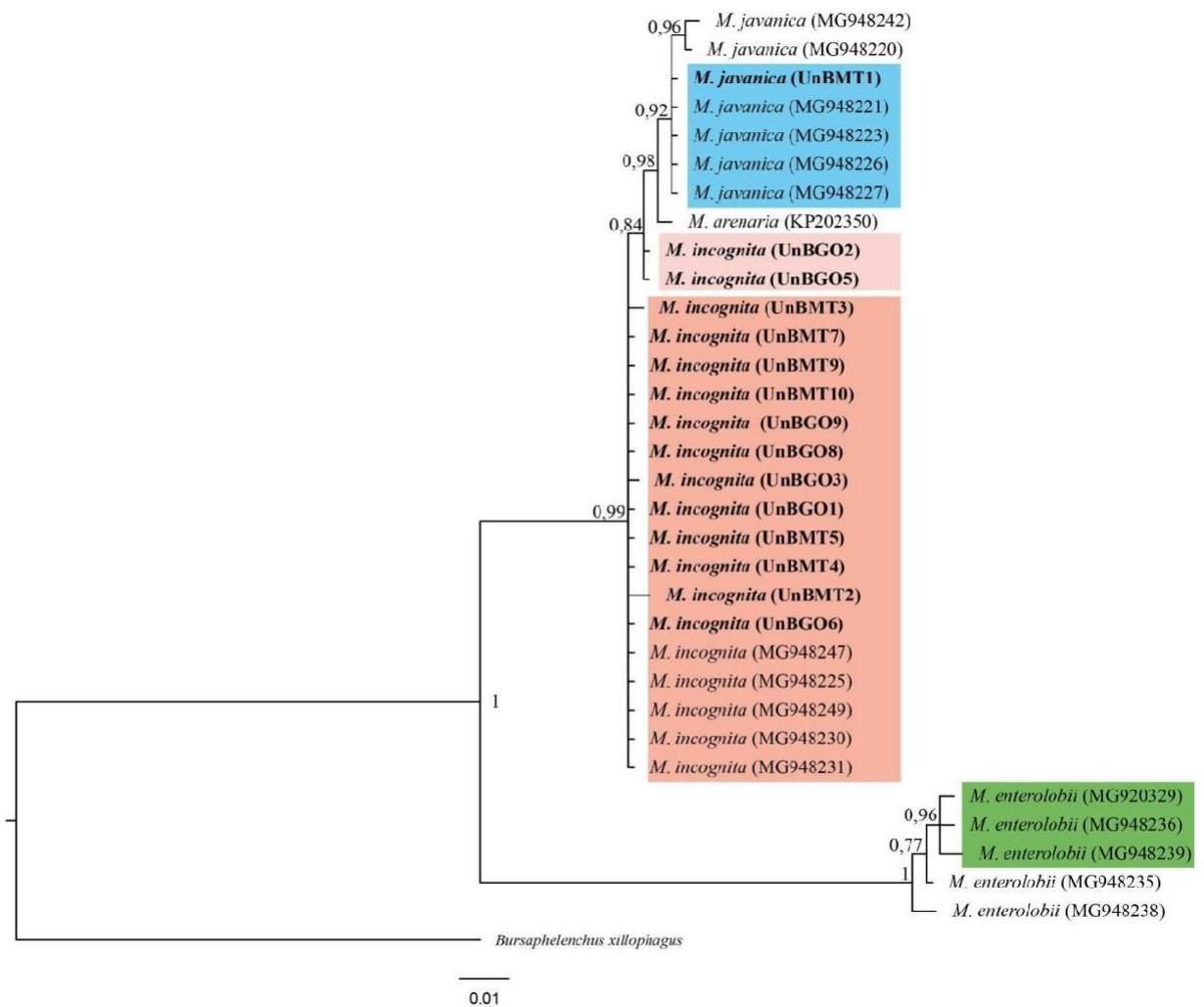


Figura 2. Árvore filogenética com o gene NADH desidrogenase subunidade 5 (NADH5) obtida por Inferência Bayesiana de isolados de *Meloidogyne* coletados nos estados de Mato Grosso (UnBMT) e Goiás (UnBGO) Tabela 1. Os valores de probabilidade a posteriori são indicados nos ramos. As barras indicam a taxa de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com *Bursaphelenchus xylophilus*. Os exemplares deste estudo estão destacados em negrito e as demais amostras em parênteses foram retiradas do Genbank e seus números de acesso estão descritos na Tabela suplementar 1.

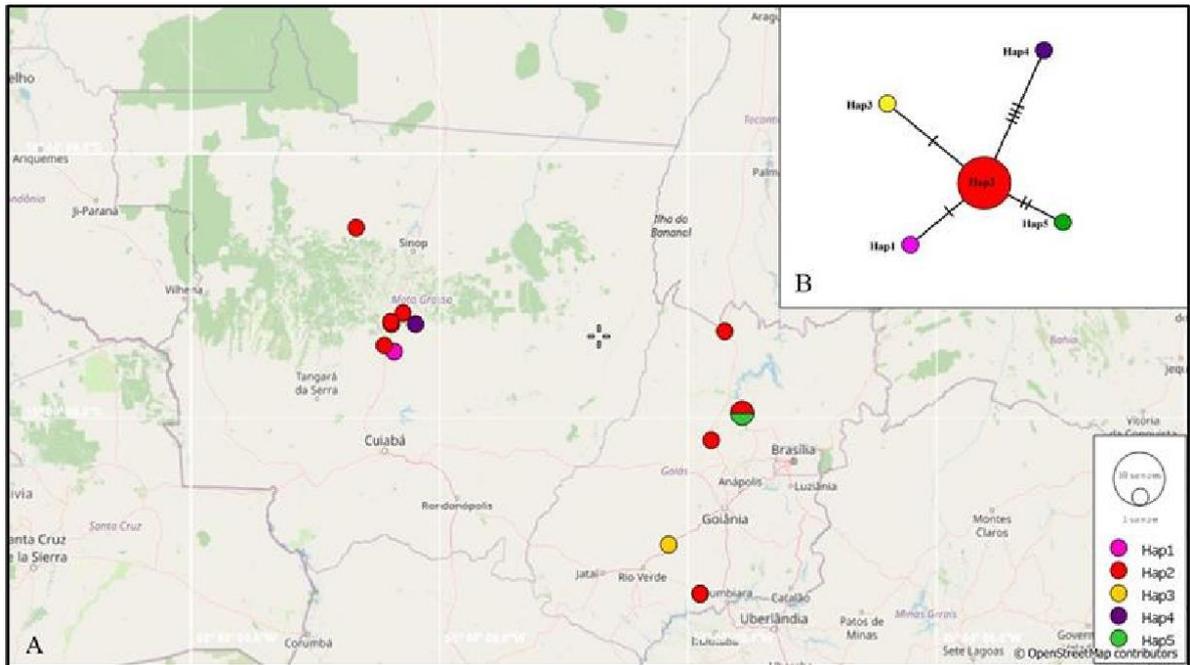


Figura 3. (A) Distribuição dos haplótipos de *Meloidogyne incognita* nos estados de Mato Grosso e Goiás (B) Rede de haplótipos do gene NADH desidrogenase subunidade 5 (NADH5) construída com base no método *median-joining haplotype network* no programa PopART. Os haplótipos são representados por círculos cujos tamanhos são proporcionais ao número de indivíduos. Cores diferentes representam distintos haplótipos. Mutações que diferenciam os haplótipos são indicadas por um traço.

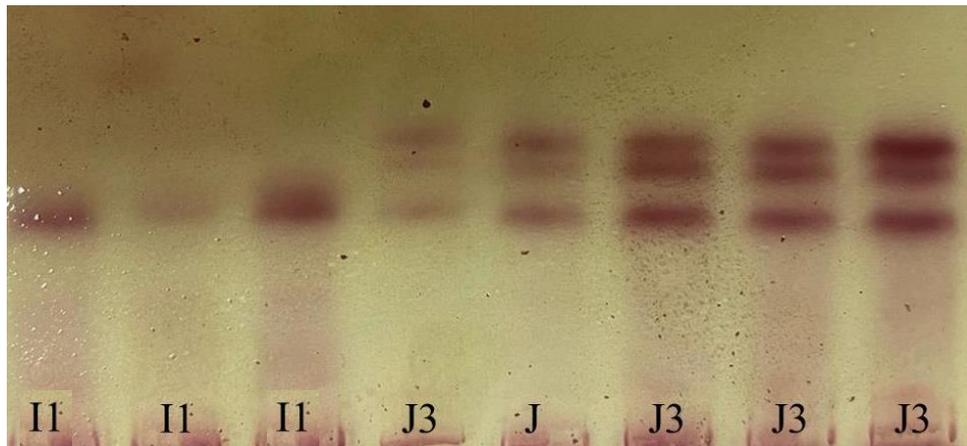


Figura Suplementar 1. Perfil de esterase de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* identificadas de amostras oriundas dos estados de Mato Grosso e Goiás. O perfil de esterase II de *M. incognita* (Rm: 1,00) e J3 de *M. javanica* (Rm: 1,00; 1,25; 1,4) foram observados nas amostras.

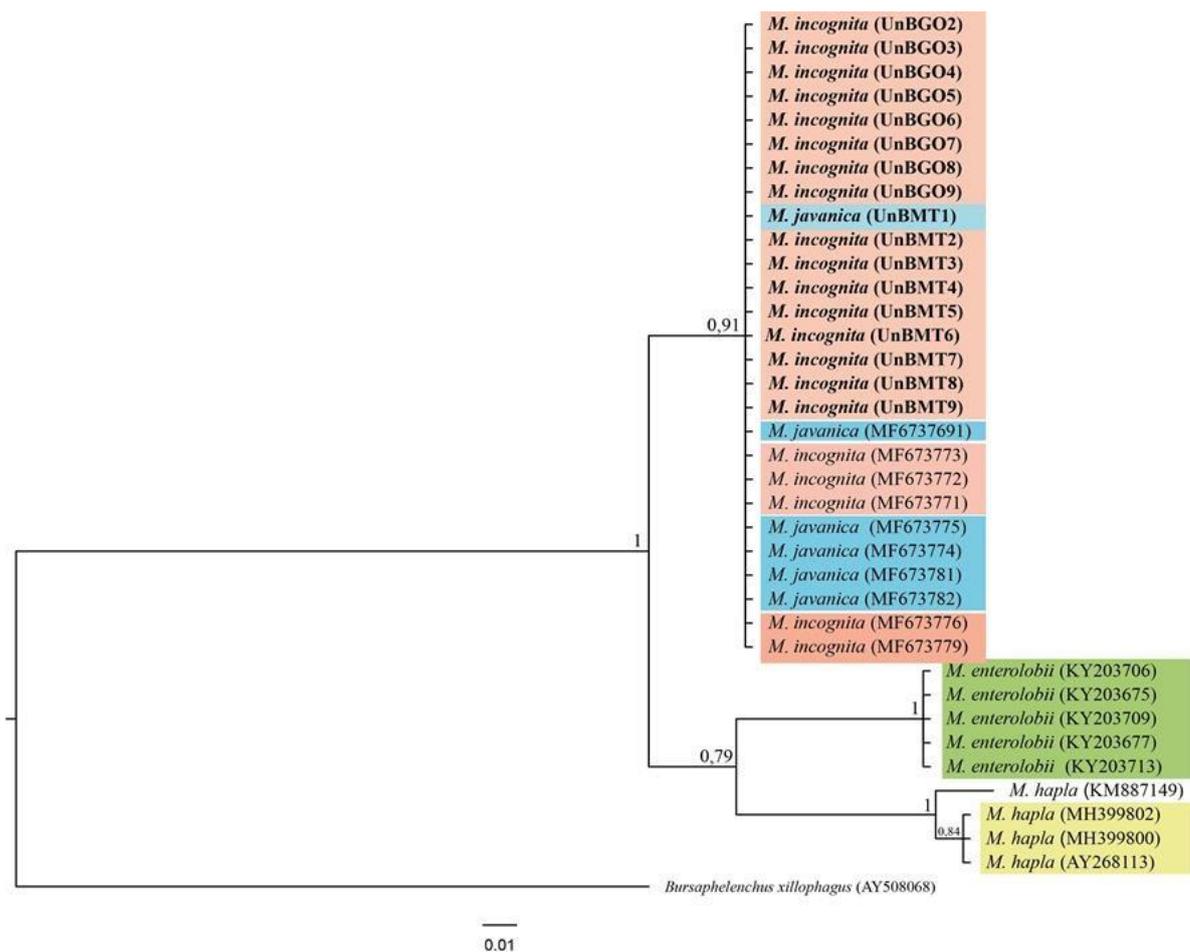


Figura Suplementar 2. Árvore filogenética com o gene citocromo oxidase I (COI) obtida por Inferência Bayesiana de isolados de *Meloidogyne* coletados nos estados de Mato Grosso (UnBMT) e Goiás (UnBGO) Tabela 1. Os valores de probabilidade a posteriori são indicados nos ramos. As barras indicam a taxa de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com *Bursaphelenchus xylophilus*. Os exemplares deste estudo estão destacados em negrito e as demais amostras em parênteses foram retiradas do Genbank e seus números de acesso estão descritos na Tabela Suplementar 1.

Tabela 1. Identificação de isolados de *Meloidogyne* coletados em campos de cultivo de soja nos estados de Mato Grosso (MT) e Goiás (GO) por meio da técnica de *Sequence Characterized Amplified Regions* (SCAR)-PCR e perfil de esterase. A designação de haplótipos foi determinada com base na variação do gene NADH desidrogenase subunidade 5 (NADH5).

Amostra	Origem	Identificação por SCAR-PCR	Identificação por Esterase	Perfil de Esterase	Haplótipos
UnBMT1	Nova Mutum	<i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>	J3	-
UnBMT2	Lucas do Rio Verde	<i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i>	<i>M. incognita</i>	I1	Hap4
UnBMT3	Nova Mutum	<i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i>	<i>M. incognita</i>	I1	Hap1
UnBMT4	Nova Mutum	<i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i>	<i>M. incognita</i>	I1	Hap2
UnBMT5	Lucas do Rio Verde	<i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i>	<i>M. incognita</i>	I1	Hap2
UnBMT6	Nova Mutum	<i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> e <i>M. enterolobii</i>	<i>M. incognita</i>	I1	-
UnBMT7	Lucas do Rio Verde	<i>M. incognita</i> e <i>M. enterolobii</i>	<i>M. incognita</i>	I1	Hap2
UnBMT8	Lucas do Rio Verde	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>	I1	Hap2
UnBMT9	Toporã	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>	I1	Hap2
UnBGO1	Bom Jesus	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>	I1	Hap2
UnBGO2	Bom Jesus	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>	I1	Hap2
UnBGO3	Acreuna	<i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i>	<i>M. incognita</i>	I1	Hap3
UnBGO4	Acreuna	<i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i>	<i>M. incognita</i>	I1	-

UnBGO5	Ceres	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>	I1	Hap2
UnBGO6	Barro Alto	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>	I1	Hap5
UnBGO7	Barro Alto	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>	I1	-
UnBGO8	Barro Alto	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>	I1	Hap2
UnBGO9	Porangatu	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>	I1	Hap2

(-) Ausência de sequência do gene NAD; I1 = *Meloidogyne incognita*; J3 = *M. javanica*

Tabela Suplementar 1. Isolados de *Meloidogyne* utilizados no estudo filogenético, bem como a sua origem e números de acesso do NCBI dos genes NADH desidrogenase subunidade 5 (NADH5) e citocromo oxidase I (COI). A lista inclui a espécie *Bursaphelenchus xylophilus* que foi usada como *outgroup*.

Espécie	NADH5	COI
<i>M. enterolobii</i>	MG920325	KY203706
<i>M. enterolobii</i>	MG920329	KY203675
<i>M. enterolobii</i>	MG920335	KY203709
<i>M. enterolobii</i>	MG948235	KY203706
<i>M. enterolobii</i>	MG948236	KY203677
<i>M. enterolobii</i>	MG948238	KY203713
<i>M. enterolobii</i>	MG948239	-
<i>M. incognita</i>	MG948247	MF673773
<i>M. incognita</i>	MG948225	MF673772
<i>M. incognita</i>	MG948249	MF673771
<i>M. incognita</i>	MG948230	MF673776

<i>M. incognita</i>	MG948231	MF673779
<i>M. javanica</i>	MG948242	MF6737691
<i>M. javanica</i>	MG948220	MF673775
<i>M. javanica</i>	MG948221	MF673774
<i>M. javanica</i>	MG948223	MF673781
<i>M. javanica</i>	MG948226	MF673782
<i>M. javanica</i>	MG948227	MF673778
<i>M. arenaria</i>	KP202350	-
<i>M. hapla</i>	-	KM887149
<i>M. hapla</i>	-	MH399802
<i>M. hapla</i>	-	MH399800
<i>M. hapla</i>	-	AY268113
<i>B. xylophilus</i>	JQ514067	AY508068

Capítulo 2

CAPÍTULO 2: IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES de *Meloidogyne* POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF

RESUMO

Os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp) são considerados os principais fitonematoides na agricultura. As espécies *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, também conhecidas como grupo “MIGs”, são as mais frequentes nas regiões tropicais. O diagnóstico preciso dessas espécies é essencial para o emprego de estratégias eficientes de controle. A observação de perfil isoenzimático, o uso de marcadores *Sequence Characterized Amplified Regions* (SCAR) e a análise filogenia de genes mitocondriais (mtDNA) são os principais métodos de identificação. Contudo, a baixa sensibilidade, a necessidade de fêmeas em estágio adulto, além da incapacidade de detecção e separação de algumas espécies, torna necessário o desenvolvimento de novas metodologias de identificação. Atualmente, a ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo (do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* - MALDI-TOF MS) vem sendo usada para gerar perfis proteicos de diferentes organismos como leveduras, fungos e bactéria, mas ainda pouco utilizada para a identificação de fitonematoides. Por isso, este trabalho avaliou o desempenho do MALDI-TOF MS na identificação taxonômica dos fitonematoides do grupo MIG. Para as análises, utilizaram-se 18 isolados de *M. incognita*, 20 isolados de *M. javanica* e cinco isolados de *M. arenaria*. Todos os isolados foram identificados previamente por perfil de esterase. Previamente, a extração das proteínas foi realizada por meio da maceração de cinco fêmeas em solução de acetonitrila:água Milli Q (50:50). Após a extração, as proteínas foram suspensas na matriz de α -ciano-4-hidroxicinâmica (CHCA). A avaliação dos espectros foi realizada pelo software FlexControl, sendo os espectros de baixa qualidade descartados. A análise de agrupamento dos espectros foi realizada no software Bionumerics 7.6 (Applied Maths®). Este trabalho evidencia a sensibilidade da técnica MALDI-TOF MS em separar os isolados de *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* em grupos distintos, o que possibilita seu uso para a identificação das espécies do grupo MIG.

Palavras-chaves: grupo MIG, nematoide das galhas, *M. incognita*, Biotyper.

INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Meloidogyne* Göldi, 1887 (Tylenchida, Meloidogynidae), também conhecidos como os nematoides das galhas (NGs), são responsáveis por causar perdas de mais de 157 bilhões de dólares na agricultura anualmente (AGRIOS, 2005; ABAD et al. 2008). Esses fitonematoides apresentam alta capacidade adaptativa e infectam mais de 3.000 espécies hospedeiras (HUSSEY & JANSSEN, 2002; MOENS & PERRY, 2009). Apesar de sua ampla distribuição mundial, as epidemias causadas pelos NGs são mais intensas nas regiões tropicais (REGMI & DESAEGER, 2020). *M. arenaria* (Neal, 1889; Chitwood, 1949), *M. incognita* (Kofoid and White, 1919; Chitwood, 1949) e *M. javanica* (Treub, 1885; Chitwood, 1949), um grupo de espécies crípticas denominados *M. incognita* ou simplesmente “grupo MIG”, são as espécies predominantes nas regiões tropicais, representando cerca de 95% de todas as infestações nessas áreas agrícolas (BRITO et al. 2008).

Devido a importância das espécies do grupo MIG, o diagnóstico preciso é essencial para o emprego de estratégias eficientes de manejo, principalmente na escolha de variedades de plantas resistentes. No entanto, em decorrência da estreita relação genética entre essas espécies, a identificação inequívoca continua sendo um grande desafio (RASHIDIFARD et al. 2019). A princípio, a identificação de espécies do grupo MIG era realizada com base nas características morfológicas e morfométricas de juvenis (J2) e fêmeas adultas, nas quais o padrão perineal também é avaliado (HUNT & HANDOO, 2009). Contudo, a plasticidade fenotípica intraespecífica e interespecífica de isolados de *Meloidogyne*, bem como a subjetividade na avaliação e variações do padrão perineal dentro da espécie, ocasionam erros na identificação a nível de espécie (CARNEIRO et al. 1998; HUNT & HANDOO, 2009; LIMA-MEDINA et al. 2013). Um exemplo que frequentemente ocasiona erros na diagnose é a alta similaridade entre os perfis perineal de fêmeas adultas de *M. incognita* e *M. enterolobii* (ELLING, 2013).

Como alternativa para a identificação das espécies de *Meloidogyne*, a observação e comparação do perfil isoenzimático de esterase e malato desidrogenase das espécies de *Meloidogyne* foi desenvolvida na tentativa de obter uma diagnose mais acurada (ESBENSHADE & TRIANTAPHYLLO, 1985, 1987). Após mais de 30 anos, este método bioquímico continua sendo amplamente utilizado, sendo possível identificar diversas espécies de maior e menor importância agrícola, inclusive diferenciando as espécies do grupo MIG. Entretanto, existem algumas dificuldades para a utilização da técnica, como por exemplo: (i) a

inexistência de um perfil enzimático para todas as espécies, (ii) a limitação da análise para apenas de fêmeas adultas e (iii) a ocorrência de perfis atípicos até mesmo em espécies com padrões isoenzimáticos já bem definidos (JANSSEN et al. 2016). *M. arenaria*, por exemplo, apresenta três perfis de esterase bem conhecidos - perfil isoenzimático A1, A2 e A3; todavia, já foram reportados em alguns laboratórios perfis atípicos para esta espécie (ESBENSHADE et al. 1985).

Com o advento das técnicas moleculares, amplas possibilidades na identificação de fitonematoides foram viabilizadas, principalmente com o uso de marcadores *Sequence Characterized Amplified Regions* (SCAR) e análises filogenéticas dos genes 18S, segmento D2/D3 do gene 28S, espaçador interno transcrito (ITS) e citocromo oxidase I (COI). Trata-se de técnicas acuradas e que possibilitam a identificação da espécie em qualquer estágio de desenvolvimento do organismo. No entanto, a baixa reprodutibilidade e sensibilidade de alguns primers SCAR e o desconhecimento de genes capazes de separar as espécies do grupo MIG em clados monofiléticos, por meio das análises filogenéticas, limitam a utilização de técnicas moleculares. Essa dificuldade pode estar relacionada a um possível processo de especiação por hibridização que originou essas espécies (JANSSEN et al. 2016). Portanto, uma abordagem polifásica que combine análises bioquímicas e moleculares é atualmente o padrão para a identificação de espécies do gênero *Meloidogyne*, principalmente do grupo MIG, o que inviabiliza a análise pela maioria dos laboratórios de diagnose, pois estas metodologias são demoradas e necessitam de mão-de-obra qualificada (ONKENDI et al. 2014).

Nos últimos anos, vem crescendo o número de trabalhos utilizando o perfil proteico gerado pela ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo (do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* - MALDI-TOF MS) para identificação taxonômica a nível de gênero, espécie, e por vezes a subespécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (MURUGAIYAN & ROESLER, 2017). O aumento do uso desta tecnologia é devido à sua robustez, facilidade de execução, velocidade de obtenção dos resultados, facilidade na automação, precisão similar aos métodos moleculares e um bom custo-benefício.

O custo de aquisição do equipamento e a ausência de bancos de dados de fingerprints de proteínas de espécies que não possuem interesse médico ainda é um entrave para a utilização de maneira mais ampla desta tecnologia (DHIMAN et al. 2011; NEVILLE et al. 2011; TRAN et al. 2015; XU et al. 2016). Portanto, a produção de espectros MALDI-TOF MS

de diferentes indivíduos de uma mesma espécie é fundamental para determinação de um padrão informativo e picos específicos da espécie.

Alguns trabalhos já mostraram a eficiência do MALDI-TOF MS na identificação de espécies de patógenos de plantas (AHMAD AND BABALOLA, 2014; KARGER, 2016; SINGHAL et al. 2016; YSSOUF et al., 2016). Picos específicos e diagnósticos já foram relatados para extratos simples de três nematóides de plantas, *Anguina tritici* e *A. funesta* e *M. Javanica* (PERERA et al., 2005). Portanto, esta técnica tem potencial para a diferenciação de espécies do grupo MIG. Logo, este trabalho tem como objetivo avaliar o desempenho do MALDI-TOF MS na identificação taxonômica dos fitonematoides do grupo MIG.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem e multiplicação das amostras de *Meloidogyne*

Todas as populações analisadas pertencem a Coleção de Nematoides do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brasil e do Laboratório de Nematologia do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), Linhares, ES, Brasil. Um total de quarenta e três populações puras pertencentes a três espécies de *Meloidogyne* foram analisadas, sendo 18 isolados de *M. incognita*, 20 isolados de *M. javanica* e cinco isolados de *M. arenaria*. Os isolados foram originalmente amostrados no estado do Mato Grosso, Goiás, São Paulo e Espírito Santo (**Tabela 1**).

Identificação bioquímica e molecular de isolados de *Meloidogyne*

Os isolados de *M. incognita* e *M. javanica* coletados na cultura de soja e cana-de-açúcar foram previamente identificados por técnicas bioquímicas e moleculares, que incluem avaliação do perfil isoenzimático de esterase, amplificação de fragmentos SCARs e análise da relação filogenética dos genes NADH5 e COI (Furtado, dados não publicados; Diniz, dados não publicados). As populações puras de *M. arenaria* pertencem ao Laboratório Nematologia do INCAPER e foram coletadas em cultivo de pimenta-do-reino no estado do Espírito Santo (**Tabela 1**). Para todas as amostras analisadas, o solo infectado com inóculo do nematoide foi adicionado a vasos e uma planta de tomate transplantada (*Solanum lycopersicum*, grupo Santa Cruz cv. Santa Clara) e mantida em casa-de-vegetação por aproximadamente 45 dias. Após esse período, as fêmeas de *Meloidogyne* foram extraídas com auxílio de uma agulha e tiveram sua identificação confirmada por métodos bioquímicos. A avaliação do perfil de isoenzima foi executada de acordo com a metodologia descrita por Carneiro & Almeida (2001). O isolado

de *M. javanica*, previamente identificado como perfil de esterase J3, foi usado como marcador no ensaio.

Com relação aos testes moleculares, todas as sequências do gene NADH5 utilizadas no estudo foram alinhadas utilizando o programa MEGA 7.0, por meio da função Muscle (Kumar et al. 2016). A análise Bayesiana foi realizada com o programa Mr. Bayes 3.2.3 (Posada & Crandall, 1998), com base na cadeia de Markov Monte Carlo, em 10.000.000 de gerações para um modelo que foi selecionado pelo critério AIC no programa Mr.ModelTest v.2.3 (Darriba et al. 2012). Aproximadamente 25% das primeiras árvores foram removidas para o cálculo de probabilidade posterior. A partir da árvore gerada foi analisado o agrupamento e então a espécie foi determinada baseada no agrupamento com outras sequências retiradas do GenBank da NCBI.

Ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo

Preparação de amostra

Para as análises de espectrometria de massa, realizou-se a extração de proteína total. Um total de cinco fêmeas adultas foram extraídas de raízes de tomate com auxílio de uma agulha e um microscópio óptico de luz (Leica EZ4). As fêmeas extraídas foram transferidas para um microtubo de polipropileno contendo 7,5 µL de água ultrapura. Após a extração das fêmeas e adição das mesmas no tubo, um total de 7,5 µL de acetonitrila (ACN) foi adicionado. As fêmeas foram maceradas com auxílio de pistilo para microtubos (Scientific Specialties Incorporated, EUA). As amostras permaneceram sob repouso por 40 min em temperatura ambiente (~25 °C). Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 5200×g por 1 min e o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo. Uma vez no novo tubo, a amostra foi seca com auxílio do concentrador de DNA Eppendorf Concentrator Plus em temperatura ambiente. As proteínas extraídas foram ressuspensas adicionando 10 µL da matriz α -ciano-4-hidroxicinâmica (CHCA, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) com uma concentração final de 10 mg mL⁻¹ presente em uma solução de acetonitrila/água/ácido trifluoroacético a 3% (50:40:10). A solução contendo a mistura da matriz e proteínas dos nematoides foram transferidas para uma placa alvo MALDI de aço inoxidável de 384 poços. Uma alíquota final de 1 µL foi aplicada em cada poço e secado em temperatura ambiente por ~10 min. Cada amostra foi realizada em triplicatas biológicas com seis réplicas técnicas, totalizando 18 poços isolados.

Aquisição de espectros de massa, avaliação dos dados adquiridos e análise de agrupamento dos dados de MALDI-TOF MS

A aquisição dos espectros de massa foi realizada no Espectrômetro de massa MicroFlex (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), operando em modo linear positivo em uma frequência de laser de 60 Hz dentro de uma faixa de massa-carga de 1.200 a 20.000 m/z. A calibração do equipamento foi realizada com Protein Calibration Standard I (Insulina [M+H]⁺, Ubiquitina I [M+H]⁺, Citocromo C [M+H]⁺, Mioglobina [M+H]⁺, Citocromo C [M+2H]²⁺ e Mioglobina [M+2H]²⁺) da empresa Bruker Daltonics® contém uma extensão de massa de ~5000 a 17500 Da. O calibrante foi aplicado nos dois primeiros pontos na placa alvo para MALDI. Os espectros foram adquiridos no modo manual, sendo que para cada espectro, um total de 8 a 10 disparos de laser foi aplicado aleatoriamente em cada ponto alvo para a geração de um espectro composto. A verificação da qualidade e intensidade dos espectros de massa adquiridos em cada poço foi avaliada pelo software de controle FlexControl. Amostras que não obtiveram espectros com resolução adequada foram descartadas pelo software MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Além disso, o software foi usado para inspeção visual e processamento de espectros de massa para suavização, normalização, subtração de linha de base e seleção de pico para posterior obtenção do espectro médio (EM). Análises de *cluster* multivariadas de EMs foram usadas para agrupamento dos espectros com o software Bionumerics 7.6 (Applied Maths®). A partir de testes interativos foram determinados os métodos que permitiram um melhor agrupamento. A qualidade dos ramos de todos os *clusters* foi definida por correlação cofenética.

RESULTADOS

Confirmação das espécies de *Meloidogyne* por métodos bioquímicos

Os isolados de *Meloidogyne* utilizados para a geração dos EMs foram novamente identificados por meio da análise do perfil isoenzimático de esterase e análise filogenética do gene NADH5. Ao total, 43 isolados de *Meloidogyne* sp. tiveram sua identificação bioquímica confirmada, sendo 18 isolados identificados como *M. incognita*, 20 como *M. javanica* e 5 isolados como *M. arenaria*. As variantes fenotípicas de esterase observados foram: o I1 (Rm: 1.00) de *M. incognita*, o J3 (Rm: 1.00; 1.25; 1.40) de *M. javanica* e o A2 (Rm: 1.20; 1.30) de *M. arenaria* (**Tabela 1 e Figura Suplementar 1**).

A análise filogenética do gene NADH5 utilizou-se três sequências de *M. javanica* de isolados do Estado de São Paulo (UnBMj8, UnBMj18 e UnBMj23) e cinco de *M. incognita* dos estados de Goiás e Mato Grosso (UnBMT4, UnBMT8, UnBMT9, UnBGO5 e UnBGO8) analisadas neste trabalho, juntamente com três sequências de *M. arenaria* (MT135545, KU372355 e KU372354) obtidas do GenBank (**Tabela 1 e Figura 1A**). A árvore filogenética do gene NADH5 foi gerada para comparar e confirmar a autenticidade do resultado obtido com o dendograma de EMs. Os amplicons do gene NADH5 com 340 pb apresentaram 246 sítios conservados e três sítios informativos para parcimônia. Uma vez as sequências alinhadas, o modelo de substituição GTR foi escolhido e os dados submetidos à Inferência Bayesiana (IB). Um total de três clados monofiléticos foi observado na árvore filogenética gerada pela análise de IB. O clado I foi composto exclusivamente por isolados previamente identificados pelos testes bioquímicos como *M. incognita* (UnBMT3, UnBMT4, UnBMT8, UnBMT9, UnBGO5 e UnBGO8), o clado II com isolados de *M. javanica* (UnBMj8, UnBMj18 e UnBMj23) e o clado III como *M. arenaria* (KU372355 e KU372354 e MT135545) (**Figura 1A**).

Não foi possível obter espectros de boa qualidade para todos os isolados. Logo, esses isolados não foram usados para geração do dendograma. Este foi analisado com 14 espectros de *M. incognita*, 16 espectros de *M. javanica* e dois de *M. arenaria*. O número de espectros obtidos para cada isolado variou de 7 a 10, sendo que picos mais abundantes ocorreram na faixa de 1200 a 20000 m/z em todas as espécies. Os espectros da *M. javanica* tiveram uma melhor qualidade, com uma menor quantidade de ruído e picos de maior abundância. Todos os indivíduos de uma mesma espécie apresentaram perfis semelhantes e agrupam-se em um mesmo *cluster*. Entretanto, um isolado de *M. javanica* (UnBMj25) e os isolados de *M. incognita* apresentaram-se distribuídos em diferentes *clusters*. Não foi possível observar correlação de agrupamento com relação à localização geográfica (**Figura 1B**).

DISCUSSÃO

A técnica de MALDI-TOF MS abriu um novo horizonte para a identificação de diferentes organismos, como bactérias (MELLMANN et al. 2009; TANIGAWA et al. 2010; AHMAD et al. 2012), fungos (PAN et al. 2011; CHALUPOVÁ et al. 2014), protozoários (SINGHAL et al. 2016) e insetos (SINGHAL et al. 2016; MURUGAIYAN & ROESLER, 2017). No entanto, a técnica ainda é muito pouco utilizada para a identificação de nematoides, em especial os parasitas de plantas (MURUGAIYAN & ROESLER, 2017). De forma inédita,

este estudo mostrou a evidência de que essa técnica pode vir a ser utilizada para identificação de espécies do grupo MIG.

A identificação das espécies do grupo MIG é complexa, uma vez que compartilham uma série de características em comum como: (i) uma alta similaridade genética; (ii) a reprodução do tipo partenogenética mitótica; e a (iii) recém especiação por hibridação interespecífica (LUNT et al. 2014). O desenvolvimento de técnicas simples, práticas e reprodutíveis torna-se necessário para a identificação do grupo MIG em diferentes circunstâncias. Apesar dos altos custos de implementação, a identificação por meio da técnica de MALDI-TOF pode ser uma alternativa às técnicas atuais.

As análises de agrupamento dos EM, composto principalmente por proteínas ribossomais, forneceram delimitação de espécies do grupo MIG de forma satisfatória para maioria dos isolados avaliados no presente trabalho em concordância com as análises bioquímicas e moleculares. Entretanto, o isolado UnBMj25 (classificado como *M. javanica* por métodos bioquímicos e moleculares) apresentou perfil compatível com isolados de *M. incognita*. Uma reanálise minuciosa deve ser realizada para inferir a real identificação da espécie de *Meloidogyne* na amostra e se a população analisada é pura, uma vez que esse isolado foi proveniente de campos de cana-de-açúcar, os quais possuíam populações mistas de *M. javanica* e *M. incognita*.

Além disso, foi possível observar que os isolados de *M. incognita* apresentaram-se distribuídos em diferentes grupos. Este fato poderia ser explicado em razão da variabilidade intraespecífica dos isolados de *M. incognita*. Diversos trabalhos comprovam a eficiência da técnica não apenas para a identificação de espécies, mas também na identificação da variabilidade intraespecífica (POSTERARO et al. 2012; WOLTERS et al. 2011; QUERÓ et al. 2020). Por exemplo, Queró et al. (2020) demonstrou alta concordância entre a análise de dados espectrais e genéticos, sendo uma técnica interessante para a diferenciação de espécies *Aspergillus* e a tipagem das linhagens de *Penicillium roqueforti*. No entanto, uma análise de variabilidade mais robusta deve ser realizada para comprovação desta hipótese, visto que não observamos variabilidade entre os isolados de *M. incognita* oriundos da soja com o marcador NADH5 (dados não publicados).

Alternativamente, a variação observada entre espectros da *M. incognita* poderia ser explicada pela baixa qualidade dos espectros e pela presença de proteínas contaminantes na superfície das fêmeas adultas. Segundo AHMAD et al. (2012), juvenis e adultos de *M. javanica* pré-tratados com uma lavagem em água apresentaram picos de massa mais intensos

se comparados com os indivíduos não lavados em água. Neste trabalho, os espectros de massa foram obtidos de uma extração proteica de fêmeas de *Meloidogyne* não lavadas.

Embora atualmente seja possível o uso de um único indivíduo intacto ou macerado para a identificação de *Meloidogyne* por meio da técnica de MALDI-TOF MS (PERERA et al. 2005; AHMAD et al. 2012), um reduzido número de picos foi identificado quando se realizou as duas metodologias (dados não mostrados). Uma melhor qualidade dos picos foi possível macerando previamente cinco fêmeas, seguido por sua adição em acetonitrila:água (50:50). A maceração é recomendada para organismos que apresentam cutículas mais espessas e rígidas, como fêmeas ou ovos de *Meloidogyne* (PERERA et al. 2005). Em bactérias do gênero *Staphylococcus*, SMOLE et al. (2002) concluíram que a ruptura física da camada de peptidoglicano realizada pelo laser e a ionização da amostra durante o processo por MALDI não foram suficientes para ionizar uma série de proteínas ligadas à parede celular. No entanto, a necessidade de utilização de cinco fêmeas pode inviabilizar a praticidade da técnica. Uma alternativa futura será a adição de ácido trifluoroacético (TFA) na solução de extração. O TFA auxilia na extração de proteínas da parede celular, o que aumenta a eficiência na intensidade dos sinais, deixando os espectros mais informativos (LAY, 2000). Vargha et al. (2006) observaram melhor relação sinal:ruído e, conseqüentemente, picos mais intensos e representativos nas amostras tratadas com solução solvente composta de acetonitrila:água (70:30) e acidificação da solução solvente com TFA. Portanto, o aperfeiçoamento da metodologia é essencial para a obtenção de espectros de massa com maior qualidade e futuros experimentos deverão incluir uma etapa de pré-lavagem dos isolados e adição de TFA na solução extratora.

Mesmo que alguns dos espectros usados na elaboração do dendrograma tenham apresentado baixa qualidade, foi possível observar que indivíduos de uma mesma espécie apresentaram perfis semelhantes e se agrupam em *clusters* distintos, evidenciando o potencial da espectrometria de massa por MALDI-TOF para identificação de *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria*. No futuro, espectrômetros de massa portáteis poderão ser levados para os campos, o que viabilizará a identificação de espécies de *Meloidogyne* de forma eficiente e rápida, como já vem sendo feito para identificação de patógenos humanos (GARZA et al. 2021).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, P.; GOUZY, J.; AURY, J.M.; CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E.G.; DELEURY, E.; WINCKER, P. 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature biotechnology*, 26(8), 909-915.

AGRIOS G.N. 2005. 'Plant pathology.' 5th edn. (Elsevier Academic Press: San Diego, CA).

AHMAD, F.; BABALOLA, O.O. 2014. Application of mass spectrometry as rapid detection tool in plant nematology. *Applied Spectroscopy Reviews*, 49(1), 1-10.

AHMAD, F.; SIDDIQUI, M.A.; BABALOLA, O.O.; WU, H.F. 2012. Biofunctionalization of nanoparticle assisted mass spectrometry as biosensors for rapid detection of plant associated bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*, 35(1), 235-242.

BRITO, J.A.; KAUR, R.; CETINTAS, R.; STANLEY, J.D.; MENDES, M.L.; MCAVOY, E.J.; DICKSON, D.W. 2008. Identification and isozyme characterisation of *Meloidogyne* spp. infecting horticultural and agronomic crops, and weed plants in Florida. *Nematology*, 10(5), 757-766.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. 2001. Electrophoresis technique used in the study of root-knot nematode enzymes to identify species. *Nematologia Brasileira*, 25(1), 35-44.

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*, 21(4) 319-326.

CHALUPOVÁ, J.; RAUS, M.; SEDLÁŘOVÁ, M.; ŠEBELA, M. 2014. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology advances*, 32(1), 230-241.

DHIMAN, N.; HALL, L.; WOHLFIEL, S.L.; BUCKWALTER, S.P.; WENGENACK, N.L. 2011. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *Journal of clinical microbiology*, 49(4), 1614-1616.

ELLING, A.A. 2013. Major emerging problems with minor *Meloidogyne* species. *Phytopathology*, 103(11), 1092-1102.

- ESBENSHADE, P.R.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. *Journal of nematology*, 17(1), 6.
- GARZA, K. Y.; SILVA, A.A.R.; ROSA, J.R.; KEATING, M.F.; POVILAITIS, S.C.; SPRADLIN, M.; PORCARI, A.M. 2021. Rapid screening of COVID-19 directly from clinical nasopharyngeal swabs using the MasSpec Pen. *Analytical chemistry*, 93(37), 12582-12593.
- 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, Wallingford, 1, 55–97.
- HUSSEY R.S.; JANSSEN, G.J.W. 2002. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: Starr, J.L.; Cook, R.; Bridge, J. editors. *Plant resistance to plant parasitic nematodes*. Wallingford: CABI Publishing, 43–70.
- JANSSEN, T.; KARSSSEN, G.; VERHAEVEN, M.; COYNE, D.; BERT, W. 2016. Mitochondrial coding genome analysis of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne*) supports haplotype based diagnostics and reveals evidence of recent reticulate evolution. *Scientific reports*, 6(1), 1-13.
- LAY JR, J.O. 2000. MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19(8), 507-516.
- LIMA-MEDINA, I.; SOMAVILLA, L.; CARNEIRO, R.M.D.G.; GOMES, C.B. Espécies de *Meloidogyne* em figueira (*Ficus carica*) e em plantas infestantes. *Nematropica*, Gainesville, 43(1), 56-62, 2013.
- MELLMANN, A.; BIMET, F.; BIZET, C.; BOROVSKEYA, A.D.; DRAKE, R.R.; EIGNER, U.; HARMSSEN, D. 2009. High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria. *Journal of clinical microbiology*, 47(11), 3732-3734.
- MURUGAIYAN, J. & ROESLER, U. 2017. MALDI-TOF MS profiling-advances in species identification of pests, parasites, and vectors. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 184.
- NEVILLE, S.A.; LECORDIER, A.; ZIOCHOS, H.; CHATER, M.J.; GOSBELL, I.B.; MALEY, M.W.; VAN HAL, S.J. 2011. Utility of matrix-assisted laser desorption ionization–

time of flight mass spectrometry following introduction for routine laboratory bacterial identification. *Journal of clinical microbiology*, 49(8), 2980-2984.

ONKENDI, E.M.; KARIUKI, G.M.; MARAIS, M.; MOLELEKI, L. N. 2014. The threat of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Africa: a review. *Plant pathology*, 63(4), 727-737.

PAN, Y.L.; CHOW, N.H.; CHANG, T.C.; CHANG, H.C. 2011. Identification of lethal *Aspergillus* at early growth stages based on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 70(3), 344-354.

PERERA, M.R.; VANSTONE, V.A.; JONES, M.G.K. 2005. A novel approach to identify plant parasitic nematodes using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 1454–1460.

PERRY, R.N.; MOENS, M.; STARR, J.L. (eds.) 2009. Root-Knot Nematodes. CAB International, Wallingford, UK

POSTERARO, B.; DE CAROLIS, E.; VELLA, A.; SANGUINETTI, M. 2013. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert review of proteomics*, 10(2), 151-164.

QUÉRO, L.; COURAULT, P.; CELLIÈRE, B.; LORBER, S.; JANY, J.L.; PUEL, O.; MOUNIER, J. 2020. Application of MALDI-TOF MS to species complex differentiation and strain typing of food related fungi: Case studies with *Aspergillus* section Flavi species and *Penicillium roqueforti* isolates. *Food microbiology*, 86, 103311.

RASHIDIFARD, M.; MARAIS, M.; DANEEL, M.S.; MIENIE, C.; FOURIE, H. 2019. Molecular characterisation of *Meloidogyne enterolobii* and other *Meloidogyne* spp. from South Africa. *Tropical Plant Pathology*, 44, 3, 213-224.

REGMI, H.; DESAEGER, J. 2020. Integrated management of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) in Florida tomatoes combining host resistance and nematicides. *Crop Protection*, 134, 105170.

SINGHAL, N.; KUMAR, M.; VIRDI, J.S. 2016. MALDI-TOF MS in clinical parasitology: applications, constraints and prospects. *Parasitology*, 143(12), 1491-1500.

- SMOLE, S.C.; KING, L.A.; LEOPOLD, P.E.; ARBEIT, R.D. 2002. Sample preparation of Gram-positive bacteria for identification by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight. *Journal of microbiological methods*, 48(2-3), 107-115.
- TANIGAWA, K.; KAWABATA, H.; WATANABE, K. 2010. Identification and typing of *Lactococcus lactis* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and environmental microbiology*, 76(12), 4055-4062.
- TRAN, A.; ALBY, K.; KERR, A.; JONES, M.; GILLIGAN, P.H. 2015. Cost savings realized by implementation of routine microbiological identification by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(8), 2473-2479.
- VARGHA, M.; TAKÁTS, Z.; KONOPKA, A.; NAKATSU, C.H. 2006. Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates. *Journal of microbiological methods*, 66(3), 399-409.
- WOLTERS, M.; ROHDE, H.; MAIER, T.; BELMAR-CAMPOS, C.; FRANKE, G.; SCHERPE, S.; CHRISTNER, M. 2011. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(1), 64-68.
- XU, L.; GE, J.; HUO, X.; ZHANG, Y.; LAU, A.T.; XU, X. 2016. Differential proteomic expression of human placenta and fetal development following e-waste lead and cadmium exposure in utero. *Science of the Total Environment*, 550, 1163-1170.
- YSSOUF, A.; ALMERAS, L.; RAOULT, D.; PAROLA, P. 2016. Emerging tools for identification of arthropod vectors. *Future Microbiology*, 11(4), 549-566.

FIGURAS E TABELAS

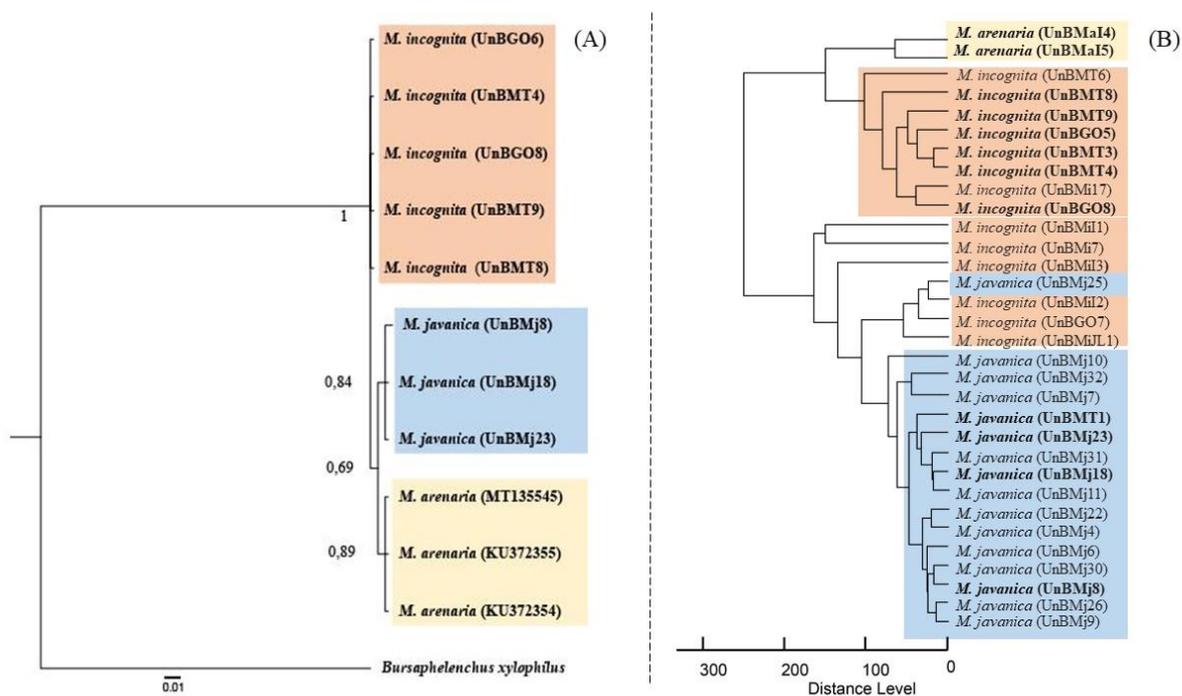


Figura 1. (A) Árvore filogenética do gene NADH desidrogenase subunidade 5 (NADH5) obtida por Inferência Bayesiana de amostras de *Meloidogyne* spp coletados em cana-de-açúcar, soja nos estados de Mato Grosso, Goiás e São Paulo. As sequências de isolados deste estudo estão destacadas em negrito; as outras sequências foram retiradas do Genbank e seus números de acesso estão descritos na Tabela 1. (B) Dendrograma derivado dos espectros específicos de MALDI-TOF MS dos isolados de *Meloidogyne* spp. Os valores de distância são relativos e normalizados para um valor máximo de 300.

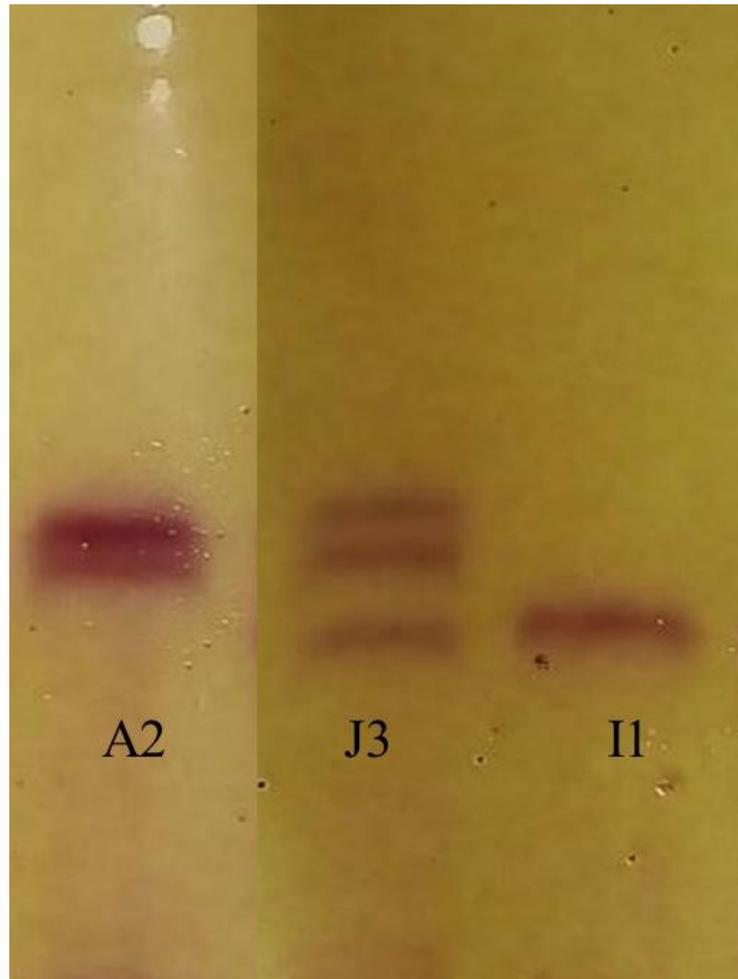


Figura Suplementar 1. Perfil de esterase de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*. O perfil de esterase I1 de *M. incognita* (Rm: 1.00), J3 de *M. javanica* (Rm: 1.; 1.25; 1.40), A2 de *M. arenaria* (Rm: 1,20; 1,30) foram observados nas amostras.

Tabela 1. Origem e identificação dos isolados de *Meloidogyne* utilizados para geração de espectros de massa por meio da técnica de ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo (MALDI-TOF MS). A identificação prévia das espécies de *Meloidogyne* foi realizada pela técnica isoenzimática por perfil de esterase.

Amostra	Origem	Hospedeiro	Identificação o Esterase	Perfil de Esterase
UnBMT1	Nova Mutum	Soja	<i>M. javanica</i>	J3
UnBMT3	Nova Mutum	Soja	<i>M. incognita</i>	I1
UnBMT4	Nova Mutum	Soja	<i>M. incognita</i>	I1
UnBMT6	Nova Mutum	Soja	<i>M. incognita</i>	I1
UnBMT9	Lucas do Rio Verde	Soja	<i>M. incognita</i>	I1
UnBMT10	Toporã	Soja	<i>M. incognita</i>	I1
UnBGO43	Ceres	Soja	<i>M. incognita</i>	I1
UnBGO46	Barro Alto	Soja	<i>M. incognita</i>	I1
UnBGO47	Barro Alto	Soja	<i>M. incognita</i>	I1
UnBMj4	Serrana	Cana-de-açúcar	<i>M. javanica</i>	J3
UnBMj6	Serrana	Cana-de-açúcar	<i>M. javanica</i>	J3
UnBMi7	Brotas	Cana-de-açúcar	<i>M. incognita</i>	I1
UnBMj7	Brotas	Cana-de-açúcar	<i>M. javanica</i>	J3
UnBMj8	Brotas	Cana-de-açúcar	<i>M. javanica</i>	J3
UnBMj9	Brotas	Cana-de-açúcar	<i>M. javanica</i>	J3

UnBmi17	São Carlos	Cana-de-açúcar	<i>M. incognita</i>	I1
UnBMj18	São Carlos	Cana-de-açúcar	<i>M. javanica</i>	J3
UnBMj22	Barretos	Cana-de-açúcar	<i>M. javanica</i>	J3
UnBMj23	Barretos	Cana-de-açúcar	<i>M. javanica</i>	J3
UnBMj25	Guapiaçu	Cana-de-açúcar	<i>M. javanica</i>	J3
UnBMj26	Guapiaçu	Cana-de-açúcar	<i>M. javanica</i>	J3
UnBMj30	Pirassununga	Cana-de-açúcar	<i>M. javanica</i>	J3
UnBMj31	Analândia	Cana-de-açúcar	<i>M. javanica</i>	J3
UnBMj32	Analândia	Cana-de-açúcar	<i>M. javanica</i>	J3
UnBMj11	Brotas	Cana-de-açúcar	<i>M. javanica</i>	J3
UnBmiJL1	Espírito Santos	Feijão-Caupi	<i>M. incognita</i>	I1
UnBmiI1	Espírito Santos	Pimenta	<i>M. incognita</i>	I1
UnBmiI2	Espírito Santos	Pimenta	<i>M. incognita</i>	I1
UnBmiI3	Espírito Santos	Pimenta	<i>M. incognita</i>	I1
UnBmaI4	Espírito Santos	Pimenta	<i>M. arenaria</i>	A2
UnBmaI5	Espírito Santos	Pimenta	<i>M. arenaria</i>	A2
