



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

**Caracterização e identificação de populações de *Meloidogyne* spp. do
arroz, estabelecimento de marcadores SCAR e seleção de novas fontes de
resistência em *Oryza* spp. a *M. graminicola***

VANESSA DA SILVA MATTOS

Brasília – DF

2017

VANESSA DA SILVA MATTOS

Caracterização e identificação de populações de *Meloidogyne* spp. do arroz, estabelecimento de marcadores SCAR e seleção de novas fontes de resistência em *Oryza* spp. a *M. graminicola*

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

Orientador

Prof. Juvenil Enrique Cares

Coorientadora

Dra. Regina M. D. G. Carneiro

BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL – BRASIL
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Mattos, Vanessa da Silva.

Caracterização e identificação de populações de *Meloidogyne* spp. do arroz, estabelecimento de marcadores SCAR e seleção de novas fontes de resistência em *Oryza* spp. a *M. graminicola* /Vanessa da Silva Mattos.

Brasília, 2017. Número de páginas p.: 177 il.

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

1. Fitopatologia – Nematologia

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Caracterização e identificação de populações brasileiras de *Meloidogyne* spp. provenientes da cultura do arroz e estabelecimento de marcadores SCAR para sua identificação e seleção de novas fontes em *Oryza* spp. com resistência a *M. graminicola*

Ao meu avô Sebastião Matos Sobrinho, dedico.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros votos de agradecimento:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Juvenil Enrique Cares, pelas contribuições a este trabalho e pelas lições em Nematologia.

À minha orientadora, Dra. Regina Carneiro, pela dedicação e orientação, por todos os ensinamentos ao longo desses nove anos. Por acreditar no meu potencial e ser um Norte nos caminhos do meu crescimento profissional, agradeço com muito carinho por tudo.

Aos meus colegas de laboratório: Jessica Monteiro, Marcilene Fernandes, Carina Lopes, Valdir Correa, Ritta Almeida, Guillermo Marcelo, Ana Cristina Gomes, Amanda Colares, Daniela Souza, Caio Augusto, Jório Saraiva, Guilherme Feitosa, Edriana Araújo, pela ajuda, paciência e amizade: Ciência não se faz sozinha.

Aos colaboradores deste trabalho, Dr. César Bauer e sua equipe da Embrapa Clima Temperado pelo material e parceria profissional neste projeto.

À Dra. Diana Fernandez, pelos aprendizados, pelo apoio e pelas oportunidades profissionais oferecidas. À Dra. Fátima Grossi pela oportunidade oferecida por seu projeto para meus estudos na França.

Ao Dr. Philippe Castagnone-Sereno, por me receber em seu laboratório, pela orientação e dedicação neste trabalho, agradeço muito.

À equipe do laboratório 'Casta', em Sophia-Antipolis- França (Chantal Castagnone, Karine Mullet e Natalie Marteau), por me receberem de portas abertas com muito carinho, pelas lições da 'langue française' e pela ajuda e orientação nas execuções dos experimentos.

Ao Dr. Paulo Hideo pelas fotografias das espécies selvagens e a Dra. Valácia Lemes Silva-Lobo pelo apoio e envio das sementes.

A minha família, aos meus amigos e ao meu 'petit copain' David Camayor, pela paciência, carinho e incentivo durante este período.

Ao CNPq pelo financiamento da minha bolsa durante esses quatro anos do doutorado.

A Universidade de Brasília e seus professores pelos ensinamentos ao longo dos 4 anos de doutorado.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (DF), Embrapa Arroz e Feijão (GO), FAP-DF, IRD e INRA pelo suporte e recursos oferecidos a essa pesquisa.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Prof. **Juvenil Enrique Cares** e coorientação da **Dra. Regina M.D.G. Carneiro** com apoio institucional e financeiro da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Caracterização e identificação de populações de *Meloidogyne* spp. do arroz, estabelecimento de marcadores SCAR e seleção de novas fontes de resistência em *Oryza* spp. a *M. graminicola*

VANESSA DA SILVA MATTOS

TESE APROVADA em 26/06/2017 por:

Prof. Juvenil Enrique Cares
Orientador (Presidente da Banca - UnB)

Dr. Jansen Rodrigo Pereira Santos
(Universidade de Brasília)
Examinador (membro interno)

Dr. Valdir Ribeiro Corrêa
(Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins)
Examinador (membro externo)

Dr. Diana Fernandez
(IRD, França)
Examinador (membro externo)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2017

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO GERAL | ix |
| General Abstract | xi |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 13 |
| OBJETIVOS..... | 16 |
| REVISÃO DE LITERATURA | 17 |
| Aspectos socioeconômicos da produção de arroz irrigado no Brasil e no mundo | 17 |
| Importância e diversidade no gênero <i>Oryza</i> | 20 |
| O gênero <i>Meloidogyne</i> | 27 |
| Biologia e ciclo de vida de <i>Meloidogyne</i> spp. | 29 |
| Métodos de identificação de espécies de <i>Meloidogyne</i> | 32 |
| Caracterização morfológica e morfométrica..... | 32 |
| Configuração perineal..... | 33 |
| Características das fêmeas | 34 |
| Características dos machos | 35 |
| Características dos juvenis de segundo estágio (J2s)..... | 36 |
| Raças fisiológicas | 37 |
| Citogenética e modo de reprodução..... | 38 |
| Identificação bioquímica e molecular | 41 |
| Espécies de <i>Meloidogyne</i> patogênicas a <i>Oryza sativa</i> | 47 |
| Caracterização das espécies de <i>Meloidogyne</i> no Sul do Brasil..... | 54 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 59 |

CAPÍTULO 1. TAXONOMIA INTEGRATIVA DE *Meloidogyne oryzae*

(NEMATODA: MELOIDOGYNIDAE) PARASITANDO ARROZ IRRIGADO NO

SUL DO BRASIL Erro! Indicador não definido.

RESUMO.....Erro! Indicador não definido.

ABSTRACT:Erro! Indicador não definido.

INTRODUÇÃOErro! Indicador não definido.

MATERIAL E MÉTODOSErro! Indicador não definido.

RESULTADOSErro! Indicador não definido.

DISCUSSÃOErro! Indicador não definido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....Erro! Indicador não definido.

CAPÍTULO 2- Variabilidade intraespecífica de isolados de *Meloidogyne spp.* do

arroz e marcadores SCAR para identificação de três espécies: *M. graminicola*, *M.*

oryzae* e *M. salasi..... Erro! Indicador não definido.

RESUMO.....Erro! Indicador não definido.

ABSTRACTErro! Indicador não definido.

INTRODUÇÃOErro! Indicador não definido.

MATERIAL E MÉTODOSErro! Indicador não definido.

RESULTADOSErro! Indicador não definido.

DISCUSSÃOErro! Indicador não definido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....Erro! Indicador não definido.

CAPÍTULO 3 - SELEÇÃO DE NOVAS FONTES DE RESISTÊNCIA EM

Oryza spp.* A *Meloidogyne graminicola Erro! Indicador não definido.

| | |
|---|-------------------------------|
| RESUMO | Erro! Indicador não definido. |
| ABSTRACT | Erro! Indicador não definido. |
| INTRODUÇÃO | Erro! Indicador não definido. |
| MATERIAL E MÉTODOS | Erro! Indicador não definido. |
| RESULTADOS | Erro! Indicador não definido. |
| DISCUSSÃO | Erro! Indicador não definido. |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | Erro! Indicador não definido. |

RESUMO GERAL

O arroz é um dos cereais mais produzidos no mundo, e o Brasil destaca-se no mercado orizícola como nono maior produtor e oitavo exportador mundial. Recentemente, um complexo de espécies do nematoide das galhas (NG), do gênero *Meloidogyne*, foi detectado nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, causando danos às plantações de arroz irrigado. Dentre as espécies destacam-se *M. graminicola*, *M. javanica* e outras três espécies com perfil de esterase atípico. A correta identificação e caracterização dessas espécies de *Meloidogyne* são imprescindíveis para estudos futuros visando o manejo adequado em áreas de arroz irrigado. As espécies desse gênero relatadas no arroz são de difícil identificação, especialmente pelas semelhanças morfológicas. O uso de cultivares resistentes ainda é o método de controle mais eficiente para os nematoides das galhas e, infelizmente, as fontes de resistência na espécie *Oryza sativa* são muito restritas. Neste estudo, foi relatado pela primeira vez no Brasil a presença da espécie *M. oryzae*, no estado de Santa Catarina, parasitando o arroz irrigado. Estudos morfológicos mostraram características típicas da espécie como a morfologia do estilete de machos e fêmeas e o formato e comprimento da cauda do juvenil de segundo estágio e o perfil de esterase espécie-específico (O1, Rm: 1,2), caracterizado para a espécie. Também foram conduzidos estudos citogenéticos e moleculares que ajudaram a esclarecer a posição filogenética dessa espécie de reprodução partenogenética mitótica, diferindo completamente de *M. graminicola*, por exemplo, uma espécie com reprodução partenogenética meiótica facultativa. Foram apresentados dados sobre a variabilidade genética das populações de *Meloidogyne* encontradas em arroz, através dos marcadores neutros AFLP e RAPD. *Meloidogyne graminicola* apresentou uma alta percentagem de polimorfismo (75,2%) e *M. oryzae* apresentou uma menor variabilidade (12,9%), resultados esperados, considerando

os modos de reprodução diferentes para as duas espécies. Nas análises filogenéticas, todas as espécies analisadas agruparam-se com 100% de bootstrap e *M. salasi*, uma importante espécie do arroz na Costa Rica e Venezuela, mostrou-se geneticamente distante das demais espécies. Fragmentos de RAPD-PCR específicos foram utilizados para a construção de primers SCAR espécie-específicos para as principais espécies do arroz detectadas nas Américas: *M. graminicola*, *M. oryzae* e *M. salasi*. A amplificação dos primers desenvolvidos produziram fragmentos específicos de 230 pb, 130 pb e 190 pb para *M. graminicola*, *M. oryzae* e *M. salasi*, respectivamente. A reação de cinco espécies selvagens de *Oryza* a uma mistura de populações de *M. graminicola* foram avaliados em casa de vegetação. Diferentes níveis de resistência foram encontrados nas espécies *O. alta* e *O. grandiglumis*. A espécie silvestre *O. glumaepatula* mostrou-se resistente ao NG. Essa espécie pertence ao complexo de genoma AA do arroz, o mesmo da espécie cultivada *O. sativa*, portanto, com o potencial de ser incorporada em programas de melhoramento genético.

GENERAL ABSTRACT

Rice is one of the most produced cereals, and Brazil is the ninth largest producer and the eighth exporter in the world. Recently, a complex of root-knot nematodes (RKN) (Genus: *Meloidogyne*) species was detected in the states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul, causing damages to irrigated rice plantations. Among the species found, *M. graminicola*, *M. javanica* and three others unknown species were detected. The correct identification and characterization of these *Meloidogyne* species of rice are essential for future studies and their management. *Meloidogyne* spp. reported in rice are difficult to identify, especially due to the morphological similarities. The use of resistant cultivars is still the most efficient control measure for RKN nematodes, but unfortunately, the sources of resistance in *Oryza sativa* are still extremely restricted. In this study, *M. oryzae* was detected for the first time in Brazil, in the state of Santa Catarina, parasitizing irrigated rice. Morphological studies showed typical characteristics for the species. The species-specific esterase profile (O1, Rm: 1.2) was characterized for the species, and cytological and molecular studies helped to clarify the phylogenetic position of this mitotic parthenogenetic species, differing from *M. graminicola*, a species with facultative parthenogenetic reproduction. In addition, the genetic variability of the populations of *Meloidogyne* populations found in rice was investigated with neutral markers AFLP and RAPD. *Meloidogyne graminicola* showed a high percentage of polymorphism (75.2%), while *M. oryzae* showed a lower variability (12.9%); these results were expected, considering the different modes of reproduction for both species. Phylogenetic analyzes showed that all species were grouped with 100% bootstrap, and *M. salasi*, an important rice nematode in Costa Rica and Venezuela, was genetically distant from the other species. Specific RAPD-PCR fragments were used for the design of species-specific SCAR primers

for the main rice species detected in the American continent: *M. graminicola*, *M. oryzae* and *M. salasi*. PCR amplification with SCAR primers produced specific fragments of 230 bp, 130 bp and 190 bp for *M. graminicola*, *M. oryzae* and *M. salasi*, respectively. Finally, the reaction of five wild species of *Oryza* to a pool of *M. graminicola* populations was evaluated in greenhouse conditions. Different levels of resistance were found in the wild species *O. alta* and *O. grandiglumis*. The wild species *O. glumaepatula* was resistant to *M. graminicola*. This species belongs to the same complex of the domesticated species *O. sativa* (genome AA), therefore with the potential to be incorporated into breeding programs.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil cultiva uma área de aproximadamente 2,1 milhões de hectares de arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado e destaca-se como o nono maior produtor mundial, com produção de 12,1 milhões de toneladas (CONAB, 2017). O Rio Grande do Sul (RS) é o maior produtor nacional, responsável por 65% da produção de arroz, seguido pelo estado de Santa Catarina que detém 7,3% da produção nacional (CONAB, 2017).

A produção de arroz pode ser limitada por vários agentes fitopatogênicos, dentre eles, os nematoides das galhas (*Meloidogyne* Göldi, 1887). Dentre as mais importantes espécies de *Meloidogyne* relatadas no arroz está *M. graminicola* Golden & Birchfield, 1965, detectada no Brasil desde a década de 1990 (Sperandio & Monteiro, 1991). A perda de produção pode chegar a 70% em solos infestados com *M. graminicola* (Bridge *et al.*, 2005). Outras espécies como *M. hainanensis* Liao & Feng, 1995, *M. lini* Yang, Hu & Xu, 1988, *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949, *M. oryzae* Maas, Sanders & Dede, 1978, *M. salasi* López, 1984, *M. sasseri* Handoo Handoo, Huettel and Golden, 1995 e *M. triticoryzae* Gaur, Saha and Khan, 1993 foram relatadas também parasitando raízes de arroz no mundo (Bridge *et al.*, 2005).

Em levantamento recente realizado por Negretti *et al.* (2017), foi relatada a presença das espécies *M. graminicola* e *M. javanica*, além de outros nematoides com três fenótipos de esterase atípicos de *Meloidogyne* spp., em regiões orizícolas do RS e SC, provocando danos às plantações. A identificação dessas espécies de *Meloidogyne* por meio de características morfológicas, bioquímicas e moleculares seria a primeira etapa para a implementação de técnicas de manejo, como o uso da resistência genética e da rotação de

culturas, que são imprescindíveis para a manutenção ou aumento da produção orizícola nacional.

A identificação precisa das espécies de *Meloidogyne* é difícil e, às vezes é baseada em caracteres subjetivos. Além disso, a diagnose é dificultada pelo elevado número de espécies descritas, muitas vezes com diagnoses duvidosas, presença de espécies crípticas e pela existência de variabilidade intraespecífica. Além do mais, existe o problema do conceito de espécie para organismos predominantemente partenogéticos, que são considerados híbridos entre espécies anfimíticas e partenogética meióticas (Triantaphyllou, 1985; Trudgill, 1991; Castagnone-Sereno *et al.*, 1993; Roberts, 1995; Hunt & Handoo, 2009).

Os métodos mais utilizados na diagnose de *Meloidogyne* spp. são a configuração da região perineal de fêmeas, a morfologia da região anterior e do estilete de machos, fêmeas e juvenis de segundo estágio (J2), características citogenéticas e sobretudo identificação bioquímica e molecular (Eisenback & Hunt, 2009). Embora a caracterização por meio do polimorfismo das esterases seja uma técnica prática para a identificação de algumas espécies do gênero, não existem padrões para todas elas (Carneiro & Cofcewicz, 2008).

O desenvolvimento de técnicas moleculares, então, abriu novas perspectivas quanto à identificação de espécies e estudos da variabilidade intraespecífica dos nematoides de galhas (NG). A técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), baseada na PCR, é utilizada atualmente para os estudos genéticos e para a diferenciação de várias espécies de *Meloidogyne*, a partir de perfis gerados com o auxílio de *primers* aleatórios (Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997; Semblat *et al.*, 1998; Randig *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2004, 2008; Fargette *et al.*, 2005; Muniz *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2012). A conversão de marcadores RAPD em marcadores espécie específicos (SCAR) tem sido realizada para espécies de *Meloidogyne*, e cerca de nove das 20 espécies detectadas no Brasil já podem

ser identificada através dessa ferramenta (Carneiro *et al.*, 2016). Para as espécies de NG do arroz, dois marcadores espécie-específicos foram desenvolvidos para a identificação de *M. graminicola* (Bellafiore *et al.*, 2015; Htay *et al.*, 2016), porém a especificidade desses marcadores não foi confirmada (Negretti *et al.*, 2017).

Atualmente as medidas de controle mais eficientes para *Meloidogyne* spp. são a resistência genética e a rotação/sucessão com culturas não hospedeiras ou más hospedeiras. As opções para o controle de *M. graminicola* são limitadas. Embora tenha sido encontrada variabilidade na suscetibilidade de variedades de *O. sativa*, apenas uma resistência parcial foi relatada nessa espécie (Jena & Rao, 1976; Bridge *et al.*, 2005; Prasad *et al.*, 2006; Cabasan *et al.*, 2012; Dimpka *et al.* 2015).

O gênero *Oryza* L. é composto por duas espécies cultivadas e 21 espécies selvagens (Khush, 1997), que podem ser classificadas em vários complexos de espécies de acordo com os seus grupos de genoma. As espécies cultivadas de arroz asiáticas (*O. sativa*) e africanas (*O. glaberrima* Steud.) e outras seis espécies selvagens (*O. rufipogon* Griff., *O. nivara* Sharma & Shastri, *O. barthii* A. Chev, *O. longistaminata* A. Chev. & Roehr., *O. glumaepatula* Steud. e *O. meridionalis* Ng) são categorizadas como espécies de genoma AA. Vários estudos têm sido realizados para desenvolver e explorar os recursos genéticos de espécies selvagens de genoma AA e alguns genes úteis foram introduzidos em arroz cultivado através de hibridação interespecífica (Khush, 1997).

Genótipos de arroz resistentes a *M. graminicola* têm sido encontrados em *O. longistaminata* e *O. glaberrima*, duas espécies selvagens de arroz originárias da África (Plowright *et al.*, 1999; Soriano *et al.*, 1999). *Oryza glaberrima* tem grande importância econômica no continente africano (Second, 1984). Algumas progênies interespecíficas provindas do cruzamento de *O. glaberrima* e *O. sativa* foram menos susceptíveis a *M. graminicola* que o progenitor *O. sativa* (Plowright *et al.*, 1999). A identificação de genes

de resistência a nematoides e o mapeamento será facilitado pelo sequenciamento do genoma *O. glaberrima* (Sakai *et al.*, 2011). Além disso, as linhagens produzidas pelo programa NERICA (New Rice for Africa), possuem bom rendimento e capacidade de adaptação aos ecossistemas das terras baixas. Algumas dessas linhagens foram derivadas do cruzamento de *O. sativa* com o genótipo TOG5681 (*O. glaberrima*) e linhas resistentes a nematoides estão sendo caracterizadas (Agnoun *et al.*, 2012; Ndjiondjop *et al.*, 2008).

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

OBJETIVOS

Esta tese teve como objetivos: caracterizar morfológica, morfométrica, bioquímica e molecularmente uma população atípica de *Meloidogyne* sp. (Est R1) proveniente de área orizícola no estado de Santa Catarina e confirmar a sua identidade taxonômica (Capítulo 1); estudar a variabilidade genética das populações de *Meloidogyne* spp. coletadas em áreas orizícolas por meio de marcadores RAPD e AFLP e estabelecer marcadores SCAR para as espécies parasitas do arroz encontradas no continente americano: *M. graminicola*, *M. oryzae* e *M. salasi* (Capítulo 2); avaliar a reação de diferentes genótipos selvagens brasileiros de *Oryza* spp. a uma mistura de diferentes populações de *M. graminicola* (Capítulo 3).

REVISÃO DE LITERATURA

Aspectos socioeconômicos da produção de arroz irrigado no Brasil e no mundo

O arroz é um dos cereais mais produzidos no mundo, a produção mundial de arroz atinge cerca de 751 milhões de toneladas, em área cultivada de 165 milhões de hectares (FAO, 2017).

O consumo médio mundial por pessoa chega a 60 kg/ano. Na América latina consomem-se em média 30 kg/ano, destacando-se o Brasil como grande consumidor (45 kg/pessoa/ano) (Figura 1). Em países asiáticos essa média aumenta para 100 a 150 kg/ano, cerca de até 50% do suprimento calórico e uma parte substancial da ingestão de proteína é fornecido por esse alimento para mais de 520 milhões de pessoas que vivem em situação de pobreza na Ásia (IRRI, 2014). O arroz é também a principal fonte de renda e emprego para mais de 200 milhões de pessoas em países em desenvolvimento (FAO, 2014).

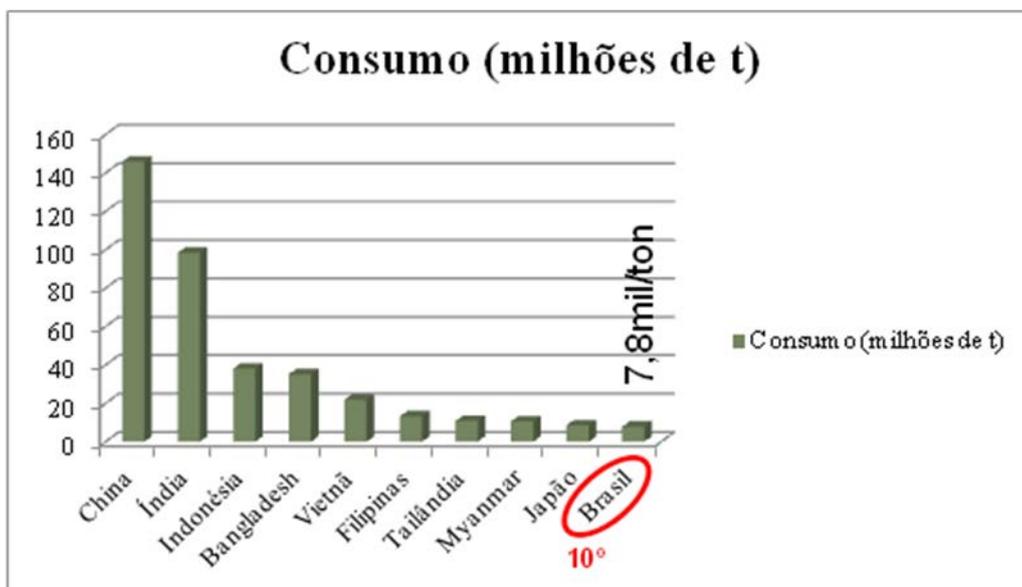


Figura 1: Consumo mundial de arroz com casca nos principais países. Dados compilados, FAO-FAOSTAT (<http://www.fao.org/faostat/>), USDA (<https://apps.fas.usda.gov/>) e Statista (<https://www.statista.com/topics/1443/rice/>) em 21/03/2017.

Atualmente, o arroz é cultivado em mais de uma centena de países, sendo a China o maior produtor (197 milhões de toneladas), seguido pela Índia (144 milhões de toneladas) e Indonésia (66 milhões de toneladas) (IRRI, 2014; USDA, 2015). China e Índia juntos são responsáveis por aproximadamente 50% da produção de arroz cultivado. Juntamente com a Indonésia, Bangladesh, Vietnã, Myanmar, Tailândia, Filipinas, Japão, Paquistão, Camboja, República da Coreia, Nepal e Sri Lanka, os países asiáticos respondem por 90% da produção mundial de arroz. Outros países produtores de arroz como o Brasil, Estados Unidos, Egito, Madagáscar e Nigéria, em conjunto, representam 5% do arroz produzido a nível mundial (FAO, 2014) (Figura 2).

O Brasil cultiva uma área de aproximadamente 2,8 milhões de hectares de arroz irrigado e destaca-se como o nono maior produtor mundial (Figura 2), com produção de 8,4 milhões de toneladas (USDA, 2015). O Rio Grande do Sul (RS) é o maior produtor nacional, responsável por 65% da produção de arroz, seguido pelo estado de Santa Catarina que detém 7,3% da produção nacional (CONAB, 2014).



Figura 2: Produção mundial de arroz com casca nos principais países. Dados compilados, FAO-FAOSTAT (<http://www.fao.org/faostat/>), USDA (<https://apps.fas.usda.gov/>) e Statista (<https://www.statista.com/topics/1443/rice/>) em 21/03/2017.

A demanda de arroz nos principais países consumidores é pouco sensível à variação dos preços, não havendo nenhum país que se destaque como regulador de preço através de seus estoques, como é o caso dos Estados Unidos para o mercado do milho e do trigo (Azambuja *et al.*, 2004).

Apesar de grande parte da produção do arroz ser destinado a atender o mercado interno, o Brasil está entre os dez maiores exportadores mundiais de arroz, com participação de 1,7% no mercado (Figura 3). Dentre os principais importadores de arroz beneficiado estão a Arábia Saudita e a China (Figura 4)

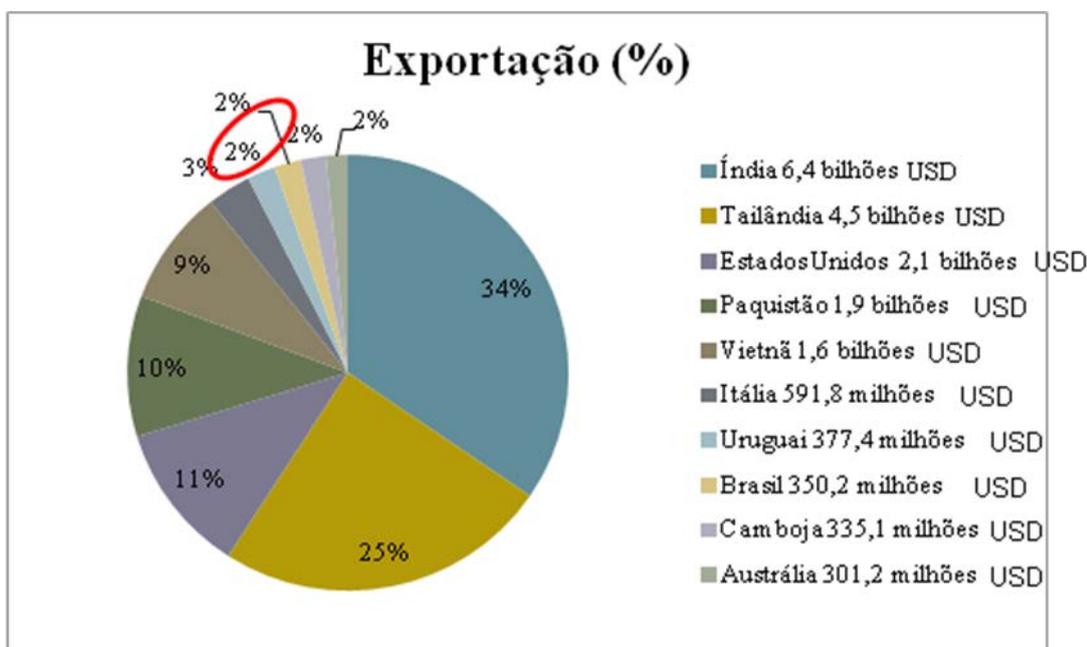


Figura 3: Principais exportadores de arroz beneficiado em 2016. Dados compilados, FAO-FAOSTAT (<http://www.fao.org/faostat/>), USDA (<https://apps.fas.usda.gov/>) e Statista (<https://www.statista.com/topics/1443/rice/>) em 21/03/2017.

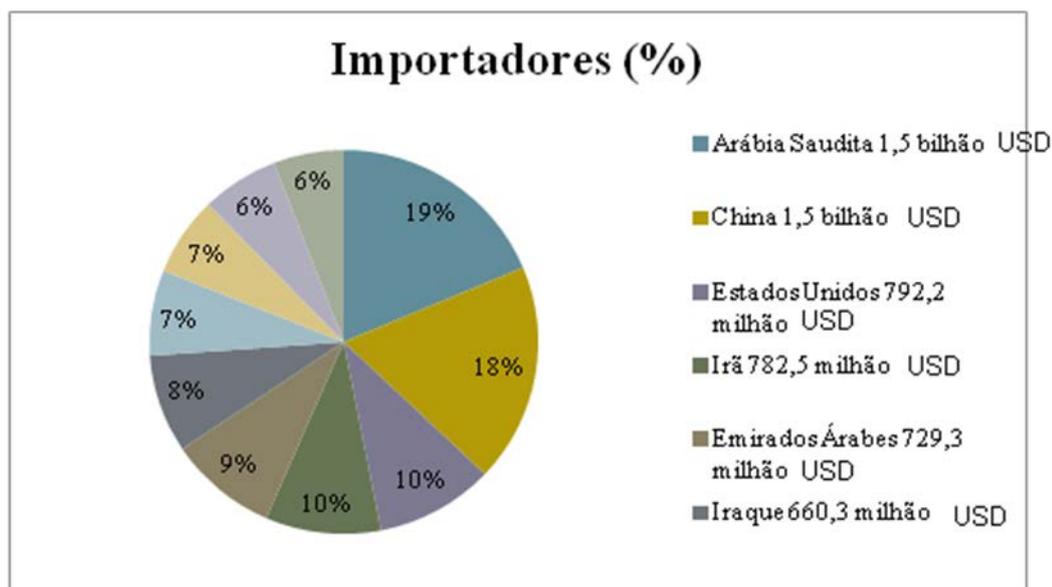


Figura 4: Principais importadores de arroz beneficiado em 2016. Dados compilados, FAO-FAOSTAT (<http://www.fao.org/faostat/>), USDA (<https://apps.fas.usda.gov/>) e Statista (<https://www.statista.com/topics/1443/rice/>) em 21/03/2017.

Importância e diversidade no gênero *Oryza*

O gênero *Oryza* nomeado por Linnaeus em 1753 é pequeno, incluindo apenas cerca de 23 espécies, mas é notável a diversidade existente em relação a adaptações ecológicas entre suas espécies (Vaughan *et al.*, 2003). Esse gênero pertence à tribo de gramíneas Oryzaceae. Outros gêneros taxonomicamente próximo a *Oryza* são *Zizania* L. e *Zizaniopsis* Doll & Asch, conhecidos como ‘wild rice’ pelos norte-americanos e cultivados em regiões alagadiças dos EUA e da China sem grande expressão alimentar no mundo (Magalhães Junior *et al.*, 2004).

Duas das 23 espécies do gênero *Oryza* são domesticadas: *Oryza sativa* L. (arroz asiático) e *Oryza glaberrima* Steud. (arroz africano) ambas com histórias de domesticação únicas (Sweeney *et al.*, 2007). Acredita-se que a domesticação de *O. glaberrima* ocorreu a partir de seu ancestral selvagem *Oryza barthii* A. Chev por pessoas que viveram nas planícies aluviais do rio Níger na África há cerca de 3.000 anos (Portéres, 1962; Sweeney

et al., 2007). Há muito debate sobre a origem específica de *O. sativa* (Normile, 2004; Sweeney *et al.*, 2007), e recentemente um estudo aprofundado através do genoma de espécies selvagens e cultivadas de arroz realizado por Huang *et al.* (2012) demonstrou que a espécie *O. sativa* foi primeira domesticada de uma população específica de *O. rufipogon* na região do Rio Pearl no sul da China.

O gênero *Oryza* é dividido em quatro complexos de espécies (*O. sativa*, *O. officinalis* Wall & Watt, *O. ridelyi* Hook e *O. granulata* Nees & Am ex Watt), sugerido por Tateoka (1963) e apresentado na Tabela 3. Todos os membros do gênero *Oryza* têm $n = 12$ cromossomos e embora seja possível cruzamento interespecífico dentro de cada complexo, é difícil recuperar descendência fértil de cruzamentos entre complexos (Vaughan *et al.*, 2003).

O complexo *O. sativa*, além de conter as duas espécies domesticadas, há cinco ou seis espécies selvagens: *O. rufipogon* Griff., *O. nivara* Sharma & Shastri (também considerada ecotipo de *O. rufipogon*), *O. barthii*, *O. longistaminata* A. Chev. et Roehr, *O. meridionalis* Ng e *O. glumaepatula* L., todas elas diploides. *Oryza sativa* é distribuída globalmente com uma alta concentração na Ásia, enquanto *O. glaberrima* é cultivada na África Ocidental. *Oryza rufipogon* pode ser encontrado em toda a Ásia e Oceania. *Oryza barthii* e *O. longistaminata* são espécies africanas, *O. barthii* é endêmica na África Ocidental e *O. longistaminata* é encontrada em toda a África. *Oryza meridionalis* é nativa da Austrália e *O. glumaepatula* é endêmica na América Central e do Sul.

A espécie *O. sativa* apresenta grande variabilidade intraespecífica, já observada antes mesmo do período da Dinastia Han na China (206 A.C) (Matsuo *et al.*, 1997). Métodos moleculares modernos têm confirmado as antigas observações sobre as divisões dentro *O. sativa*. A espécie é dividida em cinco subpopulações principais, diferenciadas enzimática (Second, 1982; Glaszmann, 1987) e geneticamente (Garris *et al.*, 2005; McNally *et al.*,

2009): *aus*, *indica*, *japonica* temperada, *japonica* tropical e arroz aromático. Evidências sugerem que *O. sativa japonica* foi primeiramente domesticada a partir de *O. rufipogon* e que *O. sativa indica* foi subsequentemente desenvolvida através dos cruzamentos de *japonica* e outras espécies de arroz selvagem no sul e sudoeste da Ásia (Huang *et al.*, 2012). *Oryza sativa indica* é mais comumente encontrada em várzeas, enquanto que *O. sativa japonica* é cultivada em planaltos e terras altas no sul e sudeste da Ásia (Garris *et al.*, 2005).

Tabela 1: Espécies de *Oryza* e o respectivo agrupamento em complexos proposto por Tateoka (1963), número de cromossomos, grupo genômico e habitat comum.

| Espécies de <i>Oryza</i> e complexos | Nº de cromossomos | Grupo genômico | Habitat |
|---|-------------------|----------------|---|
| Complexo <i>Oryza sativa</i> | | | |
| <i>Oryza sativa</i> L. | 24 | AA | Terras altas a várzeas |
| <i>O. rufipogon sensu lato</i> (Sin: <i>O. nivara</i>) | 24 | AA | Terras altas a várzeas |
| <i>O. glaberrima</i> Steud. | 24 | AA | Terras altas a várzeas |
| <i>O. barthii</i> A. Chev. | 24 | AA | Terras altas |
| <i>O. longistaminata</i> Chev. & Roehr | 24 | AA | Terras altas a várzeas |
| <i>O. meridionalis</i> Ng | 24 | AA | Terras altas |
| <i>O. glumaepatula</i> Steud. | 24 | AA | áreas inundadas com seca sazonal |
| Complexo <i>O. officinalis</i> | | | |
| <i>O. officinalis</i> Wall & Watt | 24 | CC | Terras altas |
| <i>O. minuta</i> JS Presl. Ex CB Prel. | 48 | BBCC | Margens de rios |
| <i>O. rhizomatis</i> Vaughan | 24 | CC | Terras altas |
| <i>O. eichingeri</i> Peter | 24 | CC | margens de rios, florestas, áreas semi-sombreadas |
| <i>O. malapuzhaensis</i> Krishnaswamy & Chandrasakaran | 48 | BBCC | áreas húmidas e florestais |
| <i>O. punctata</i> Kotschy ex Steud | 24 | BB | Terras altas |
| | 48 | BBCC | florestas, áreas semi-sombreadas |
| <i>O. latifolia</i> Desv. | 48 | CCDD | Terras altas |
| <i>O. alta</i> Swallen | 48 | CCDD | Terras inundadas |
| <i>O. grandiglumis</i> (Doell.) Prod. | 48 | CCDD | Terras inundadas |
| <i>O. australiensis</i> Domin | 24 | EE | Terras altas |
| Complexo <i>O. ridleyi</i> | | | |
| <i>O. ridleyi</i> Hook. | 48 | HHJJ | áreas inundadas florestais sombreadas |
| <i>O. longiglumis</i> Jansen | 48 | HHJJ | áreas inundadas florestais sombreadas |
| Complexo <i>O. granulata</i> | | | |
| <i>O. granulata</i> Nees & Am ex Watt | 24 | GG | áreas florestais sombreadas |
| <i>O. meyeriana</i> (Zoll. & Mor. Ex Steud.) Baill. | 24 | GG | áreas florestais sombreadas |
| Ridleyanae Tateoka | | | |
| <i>O. schlechteri</i> Pilger | 48 | Desconhecido | margens de rios |
| Brachyantha B.R. Lu | | | |
| <i>O. brachyantha</i> Chev. & Roehr. | 24 | FF | piscinas naturais |

Fonte: Vaughan *et al.*, 2003

A espécie de arroz cultivada *O. glaberrima* apresenta várias características importantes, tais como alta competitividade em campo e tolerância à seca. Já foi relatada sua resistência a fitopatógenos (Plowright *et al.*, 1999; Soriano *et al.*, 1999; Sarla & Swamy, 2005), inclusive a *M. graminicola* Golden & Birchfield, 1965 (Bimpong *et al.*, 2010).

Espécies silvestres de *Oryza* foram inicialmente utilizadas em cruzamentos interespecíficos devido à necessidade de introdução de novos caracteres em variedades de arroz cultivado (Brar & Khush, 1997). No entanto, a capacidade de introduzir QTL de germoplasma selvagem de *Oryza* em largos cruzamentos que poderiam melhorar as características quantitativas, como o rendimento (Xiao *et al.*, 1998) e o desejo de ampliar a base genética das cultivares de arroz (Brondani *et al.*, 2001), recentemente resultaram no desenvolvimento de programas de hibridização em vários países (Vaughan *et al.*, 2003).

No Brasil, existem quatro espécies selvagens de arroz: *O. glumaepatula*, *O. alta* Swallen, *O. grandiglumis* (Doell.) Prod. e *O. latifolia* Desv., todas elas restritas à América Central e do Sul (Morishima, 1994). *Oryza glumaepatula*, uma espécie diploide, faz parte do mesmo complexo de *O. sativa*, enquanto as outras espécies são tetraploides e são parte de outros complexos. *Oryza glumaepatula* pode ser uma fonte de novos genes a serem incorporados nas espécies cultivadas em programas de melhoramento de plantas (Brondani *et al.*, 2002; Sánchez & Espinoza, 2005).

No Brasil, as populações de *O. glumaepatula* são encontradas nas extensas bacias hidrográficas dos biomas Amazônia e Pantanal e nas bacias hidrográficas menores nos estados de Goiás, Tocantins e Roraima (Oliveira, 1994; Brondani *et al.*, 2005), sendo raramente encontradas em locais fora da água. Cresce às margens dos rios e lagos e sua presença está relacionada com a incidência direta de luz. Vulgarmente esta espécie é

conhecida como arroz flutuante (Buso et al, 1998). Em resposta à elevação do nível da água dos rios, ocorre um rápido alongamento dos seus entrenós, chegando as plantas a atingir uma altura de 7 metros e, ao se quebrarem, formam grandes populações flutuantes (Buso *et al.*, 1998) (Figura 5).



Figura 5: *Oryza glumaepatula* em uma vereda no Estado de Goiás. Fonte: Rangel *et al.* (2013), foto: Dr. Paulo Hideo.

Uma rede de pesquisa consolidada foi estabelecida no país, para a conservação e uso do germoplasma de *O. glumaepatula* em programas de melhoramento genético. Desde 1992, foram realizadas expedições em áreas dos estados brasileiros do Amazonas, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e Roraima, onde foram identificadas populações naturais de *O. glumaepatula* no Brasil. Até o momento, mais de 130 populações foram mapeadas e armazenadas no banco de germoplasma da Embrapa (Rangel *et al.*, 2006).

Oryza grandiglumis é encontrada no oeste da Amazônia, nas bacias hidrográficas dos rios Solimões, Negro, Japurá, Purus e Madeira (Figura 6). Sua presença está relacionada, principalmente, a locais sombreados nas proximidades ou dentro dos sub-bosques da floresta, iniciando seu crescimento através das brotações de órgãos vegetativos, como colmos, seguindo-se o alongamento dos entrenós, à semelhança do *O. glumaepatula*, com a diferença de que a planta permanece presa ao solo até o final do ciclo.



Figura 6: Populações de *Oryza grandiglumis* no Rio Negro (AM). Fonte: Rangel *et al.* (2013), foto: Dr. Paulo Hideo.

Oryza latifolia está restrita à bacia do Rio Paraguai, no Pantanal Mato-grossense (Figura 7), enquanto que *O. alta* tem uma ampla distribuição no Brasil, incluindo a Bacia Amazônica, Região Nordeste (Maranhão) e Região Sudeste (Floresta Tropical Atlântica) (Figura 8).



Figura 7: Plantas de *Oryza glumaepatula* e *O. latifolia* coexistindo na mesma área, na Baía do Tamengo, Rio Paraguai, no Estado de Mato Grosso. Fonte: Rangel *et al.* (2013), foto: Dr. Paulo Hideo.



Figura 8: População de *Oryza alta* no Rio Javé na Ilha do Bananal, no Estado de Tocantins. Fonte: Rangel *et al.* (2013), foto: Dr. Paulo Hideo.

O gênero *Meloidogyne*

As espécies do gênero *Meloidogyne* Göldi, 1887 constituem uma pequena parte do Filo Nematoda, que compreende os nematoides em geral, incluindo os parasitas do homem, dos animais e das plantas, além de espécies de vida livre no solo, água doce e no mar (Maggenti, 1981). O gênero *Meloidogyne* faz parte da classe Chromadorea, ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Infraordem Tylenchomorpha, Superfamília Tylenchoidea e família Meloidogynidae (De Ley & Blaxter, 2002; Karssen & Moens, 2006).

Entre os fitonematoides, os do gênero *Meloidogyne*, também conhecidos como nematoides das galhas (NG), são os mais economicamente importantes. Amplamente distribuídos no mundo e parasitas obrigatórios de raízes, tubérculos e cormos de milhares de espécies de plantas, resultando em efeitos adversos devastadores sobre a qualidade e rendimento das culturas. São dominantes em regiões temperadas e tropicais quentes onde predominam os sistemas agrícolas de subsistência. Assim, os nematoides das galhas causam importantes impactos financeiros e sociais e têm sido objeto de extensas pesquisas,

incluindo estudos sobre taxonomia, biologia, interações entre plantas e nematoides e, especialmente, estratégias de controle (Moens *et al.*, 2009).

Devido à alta toxicidade e aos efeitos colaterais ao meio ambiente e à saúde humana atribuídos aos nematicidas, a maioria dos produtos não estão mais disponíveis no mercado. Métodos alternativos de controle de fitonematoides, em um sistema de cultivo sustentável, incluem o uso de cultivares resistentes, rotação de culturas e o controle biológico (Nyczepir & Thomas, 2009). Nesse caso, a identificação rápida e precisa desses nematoides em nível de espécie é essencial não só para o sucesso na escolha de uma estratégia de manejo adequada, mas também, para evitar a disseminação de espécies exóticas de patógenos quarentenários (Powers, 2004; Blok, 2005; Skantar & Carta, 2005; Blok & Powers, 2009; Castagnone-Sereno *et al.*, 2011).

Atualmente, há mais de 100 espécies válidas pertencentes ao gênero *Meloidogyne* (Hunt & Handoo, 2009). A identificação de espécies de nematoides das galhas é repleta de dificuldades: morfologia conservada, morfometria variável, efeitos do hospedeiro, variação intraespecífica, a reprodução partenogenética, existência de espécies crípticas, e o número cada vez maior de espécies descritas, cujo diagnóstico e as relações de muitas, variam de pouco ideal a duvidosa, servem para ofuscar os limites interespecíficos (Hunt & Handoo, 2009). Para complicar ainda mais, existe o problema não negligenciável do conceito de espécie para organismos predominantemente partenogenéticos (Trudgill, 1991; Hunt & Handoo, 2009).

A verificação de populações mistas e/ou detecção de novas espécies, requer outras técnicas de identificação que incluem o teste de hospedeiras diferenciadoras, a morfologia (padrão perineal de fêmeas adultas, características do macho e fêmea, forma da região labial do J2, morfologia do estilete, comprimento e forma da cauda do J2), e as metodologias bioquímicas e/ou moleculares (Hunt & Handoo, 2009).

Biologia e ciclo de vida de *Meloidogyne* spp.

Os nematoides das galhas são endoparasitas sedentários, cuja fêmea produz em média 400 a 500 ovos em matriz gelatinosa denominada massa de ovos, na maioria das vezes, externamente à raiz, podendo também ocorrer internamente no parênquima cortical. A matriz gelatinosa mantém os ovos unidos e protegidos contra condições ambientais adversas e predação, além de apresentar propriedades antimicrobianas (Orion & Kritzman, 1991).

No interior dos ovos, o desenvolvimento embrionário resulta no juvenil de primeiro estágio (J1) que passa por uma ecdise, dando origem ao juvenil de segundo estágio (J2). De maneira geral, o J2 eclode quando há condições ambientais favoráveis à sua sobrevivência, tais como temperatura apropriada, disponibilidade de oxigênio e níveis de umidade do solo adequados e ausência de barreiras fisiológicas, como, por exemplo, a diapausa (Curtis *et al.*, 2009). Esse estágio móvel, vermiforme, infectante migra através do solo atraído por substâncias que emanam das plantas, penetrando nas raízes da hospedeira. Há evidências de que quando presentes ambas raízes de plantas resistentes e suscetíveis, as suscetíveis são mais atraentes (Curtis *et al.*, 2009).

Os J2s movem-se por entre as células dos tecidos da planta perfurando-as com o estilete, migrando até a zona de alongação da raiz, na periferia do cilindro central, onde estabelecem seus sítios de alimentação no parênquima vascular iniciando um complexo relacionamento com a planta. O início da alimentação do J2 em células do protoxilema e profloema induz a diferenciação dessas células em células especializadas, chamadas células gigantes (Taylor & Sasser, 1978). Uma vez que as células gigantes são iniciadas, o nematoide torna-se sedentário e ocorre então a segunda (J2 > J3), a terceira (J3 > J4) e a quarta ecdises (J4 > fêmea jovem) (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). O tempo de duração dos estádios J3 e J4 é muito mais curto do que do J2 ou do adulto, tipicamente 4-6

dias. Os estádios J3 e J4 carecem de um estilete funcional e não se alimentam. Logo após a última ecdise, a fêmea jovem começa a se alimentar, permanecendo ali o restante de sua vida. Ocorre a hipertrofia e a hiperplasia das células comprometidas, resultando via de regra, na formação da galha radicular (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Ao contrário do sincício (sítio de alimentação também relacionado aos fitonematoides), cada célula gigante desenvolve-se a partir de uma célula inicial simples ao invés da coalescência de várias células adjacentes. As células gigantes não são apenas multinucleadas, contendo até 80 núcleos cada, mas os núcleos individuais dentro de cada célula gigante também são poliploides, alguns com até oito vezes mais o número de cromossomos (Huang & Maggenti, 1969; Wiggers *et al.*, 1990). Vários estudos documentaram os efeitos da infecção por nematoides na expressão gênica, com uma grande variedade de genes sendo supregulados ('upregulated') (Gheysen & Jones, 2006; Schaff *et al.*, 2007) e provavelmente infraregulados ('downregulated') também (Schaff *et al.*, 2007). Alguns estudos sobre a expressão gênica em células gigantes relataram que o RNAm correspondente a alguns genes podem estar presentes em células gigantes em níveis muito maiores que em células radiculares não infectadas (Ramsay *et al.*, 2004).

Recentemente, foi relatado uma repressão generalizada na expressão de genes em células gigantes em estágio precoce de desenvolvimento (Schaff *et al.*, 2007; Caillaud *et al.*, 2008; Barcala *et al.*, 2010; Portillo *et al.*, 2013) e genes relacionados à defesa da planta foram especialmente suprimidos (Smant & Jones, 2011; Hewezi & Baum, 2015). Estes dados demonstram que as células gigantes induzidas por *Meloidogyne* spp. são exemplos únicos de como os parasitas podem afetar o desenvolvimento normal de uma hospedeira.

Os machos, quando presentes, são vermiformes e não há evidências que se alimentam (Moens *et al.*, 2009). A mudança de forma nos machos (piriforme para adulto vermiforme) ocorre durante o quarto estágio juvenil (J4) (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

As espécies de nematoides das galhas radiculares diferem-se na sua proporção entre machos e fêmeas, dependendo do tipo de reprodução. As espécies anfimíticas, tais como *M. carolinensis* Eisenback, 1982 e *M. spartinae* (Rau & Fassuliotis, 1965) Whitehead, 1968, normalmente têm uma proporção 1:1. Espécies que se reproduzem por partenogênese facultativa ou obrigatória, como *M. hapla* Chitwood, 1949 e *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, têm razões sexuais variáveis.

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

A formação de galhas radiculares pode variar entre as espécies de *Meloidogyne* e as plantas hospedeiras. *Meloidogyne hapla*, por exemplo, é particularmente conhecida pela incidência elevada de raízes adventícias que se desenvolvem a partir das galhas radiculares (Sasser, 1954 apud Moens *et al.*, 2009). Em algumas hospedeiras, as galhas podem ser pequenas ou indistintas, resultando muitas vezes na não identificação do parasitismo (Moens *et al.*, 2009). *Meloidogyne trifoliophila* Bernard & Eisenback, 1997, em trevo, produz galhas que são nitidamente alongadas, e as massas de ovos são mais tipicamente dentro das galhas (Mercer *et al.*, 1997). Outras espécies têm uma tendência para produzir galhas na extremidade das raízes. *Meloidogyne graminicola*, por exemplo, é conhecida pela formação de galhas em raízes de arroz em formato de gancho (*hook-like galls*) (Golden & Birchfield, 1965).

A maioria das plantas com raízes fibrosas ou lenhosas apresentam pequenas ou indistintas galhas, especialmente no início da infecção ou quando as densidades populacionais de nematoides são baixas. Gramíneas infectadas raramente formam galhas (Moens *et al.*, 2009).

A duração do ciclo de vida do nematoide das galhas é fortemente afetada pela temperatura, umidade e planta hospedeira. As fêmeas produzem ovos por três semanas, depois cessam a produção, podendo viver um pouco mais. Os machos vivem semanas e os J2 podem viver de poucos dias a meses (Taylor & Sasser, 1978).

Métodos de identificação de espécies de *Meloidogyne*

Caracterização morfológica e morfométrica

A morfologia até o momento é a base da taxonomia e da classificação de *Meloidogyne* spp. (Eisenback & Hunt, 2009). Os caracteres morfométricos e morfológicos tendem a variar sob a influência de condições geográficas e ecológicas que resultam em ecotipos e populações hospedeiro-específicas. Por isso, é importante que se conheça a amplitude da variabilidade de um caráter em particular sob diferentes condições. Esses ecotipos e populações hospedeiro-específicas são algumas vezes, descritas como espécies novas, embora as diferenças entre elas sejam variações intraespecíficas (Hunt & Handoo, 2009).

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

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

Descrição dos caracteres diagnósticos

Configuração perineal

A região perineal, que está localizada na região posterior do corpo de fêmeas adultas., compreende a área da vulva e ânus (períneo), término da cauda, fasmídios, linhas laterais e estrias cuticulares circundantes. A primeira descrição e ilustração de padrão perineal foi feito por Müller *et al.* (1884) apud Karssen & Van Aelst (2001). A preparação da região perineal para observação e identificação de *Meloidogyne* spp., foi descrita por Franklin (1965), Sasser & Carter (1982), Eisenback (1985a), Hartman & Sasser (1985), Hirschmann (1985) e Taylor *et al.* (1995).

A configuração perineal de fêmeas maduras era uma das principais técnicas utilizadas na identificação de *Meloidogyne* spp. (Ferraz & Monteiro, 1995). Porém, essa técnica tem sido criticada, devido à ocorrência de variações nas configurações perineais mesmo em populações oriundas de uma mesma massa de ovos (Moura, 1996). *Meloidogyne graminicola* e *M. oryzae* Maas, Sanders & Dede, 1978, ambas espécies parasitas do arroz, possuem padrões perineais muito próximos, levando muitas vezes a uma errônea identificação das espécies (Jepson, 1987). As configurações perineais, porém, são úteis como métodos complementares a serem utilizados juntamente com a caracterização enzimática e/ou molecular (Carneiro *et al.*, 2004; Carneiro & Cofcewicz, 2008).

Características das fêmeas

Geralmente, as fêmeas adultas sedentárias do gênero *Meloidogyne* apresentam coloração esbranquiçada, corpo piriforme e comprimento médio entre 0,44-1,30 mm e largura de 0,325-0,700 mm (Eisenback, 1985b). Em várias espécies, o corpo é simétrico com pescoço e região perineal (vulva-ânus) em linha reta. Mas em algumas espécies, o pescoço pode projetar-se formando um ângulo que varia de 15-90° com relação ao eixo do corpo (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Algumas fêmeas possuem uma protuberância na região posterior do corpo ou até mesmo uma cauda remanescente, como é o caso de *M. graminis* Sledge and Golden, 1964 e *M. naasi* Franklin, 1965 e a maioria das espécies de *Meloidogyne* patogênicas ao arroz (Esser *et al.*, 1976).

Estilete: O estomatoestilete de fêmeas de *Meloidogyne* consiste de um cone, que em várias espécies é pouco curvado dorsalmente, a haste reta e três bulbos basais de altura, largura e disposições variáveis (Hunt & Handoo, 2009). Em muitos casos, a morfologia do estilete ao MEV pode ser espécie-específica (Jepson, 1987; Eisenback & Triantaphyllou, 1991). De acordo com Jepson (1987), essa característica, especialmente o formato dos bulbos do estilete da fêmea ao MEV, pode ser importante para separar as espécies que parasitam o arroz: *M. graminicola*, *M. graminis*, *M. marylandi* Jepson & Golden, 1987 e *M. oryzae*.

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

Sistema reprodutor: As fêmeas são didélficas e as duas gônadas são longas ocupando a maior parte do interior do corpo. Cada gônada é composta de um ovário com zona germinativa e zona de crescimento, um oviduto, espermateca globular e útero longo. O número de células no oviduto é constante para todas as espécies (8 células), enquanto que

as células da espermateca diferem entre as espécies e podem ser usadas como caracteres para diagnóstico de espécies (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Seis glândulas retais secretam material gelatinoso, em que os ovos não retidos no corpo são depositados (Hunt & Handoo, 2009).

Características dos machos

Os machos são vermiformes, não sedentários e muito variáveis no comprimento do corpo que vai de 700 a 2000 μm . Isso se deve à variação nas condições ambientais durante o seu desenvolvimento (Eisenback, 1985a). Características morfométricas tais como, comprimento do corpo, do esôfago, da cauda e largura do corpo têm pouco valor taxonômico, porém, a morfologia da região anterior e do estilete são importantes fontes de caracteres morfológicos (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

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

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

Estilete: O comprimento do estilete varia de 13 a 30 μm , mas, em muitas espécies a variação média é de 18-24 μm . Isso representa uma característica diferencial entre as

espécies. Tamanho e forma do cone do estilete, da haste e dos bulbos ao MEV são importantes componentes na identificação dos machos, auxiliam, por exemplo, na separação das espécies *M. graminicola*, *M. oryzae* e *M. graminis* (Jepson, 1987).

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

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

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

Linhas dos Campos Laterais: o número de linhas laterais pode variar entre as espécies de *Meloidogyne*. E algumas vezes, pode ser uma característica específica, como o caso de *M. decalineata* Whitehead, 1968 que possui 10 linhas no campo lateral (Whitehead, 1968; Lordello & Fazuoli, 1980).

Região posterior: A posterior é torcida em 90°, a cauda é muito curta, abruptamente arredondada e sem bursa. Pequenos fasmídeos estão posicionados próximos à cloaca.

Características dos Juvenis de Segundo estágio (J2s)

Os J2s, fase infectiva, são vermiformes, anelados com tamanho que varia de 250-600 µm (Karssen & Moens, 2006). Várias espécies se sobrepõem quanto ao comprimento do corpo, portanto essa característica é inadequada na identificação de espécies.

Devido ao tamanho pequeno dos J2, é difícil discernir a morfologia da região cefálica. Os J2 têm características similares aos machos, as quais somente podem ser visualizadas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). Em geral, a morfologia da região labial é similar entre as espécies. Algumas espécies, entretanto, diferem na forma do disco labial, dos lábios medianos e laterais, nas papilas cefálicas e na ocorrência de anelações na região labial. Os J2s possuem estilete delicado de tamanho variado em média de 8 a 18 μm de comprimento (Eisenback, 1985c)

A distância do DEGO aos nódulos do estilete varia de 2 a 8 μm , assim como a posição do hemizonídeo posterior ao poro excretor, são fontes de caracteres que também auxiliam na identificação das espécies (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

As características dos J2 mais utilizadas na identificação de espécies têm sido a morfometria e a morfologia da cauda, cujo comprimento varia de 15 a 100 μm , o que constitui parâmetros importantes na diferenciação clara de algumas espécies, inclusive as espécies de NG do arroz (Jepson, 1987).

Raças fisiológicas

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

O conhecimento das raças é de suma importância para caracterização da resistência nos programas de melhoramento genético (Fassuliotis, 1985). Segundo Lordello & Lordello (1996), a identificação de raças em *Meloidogyne* spp., é essencial para o manejo em áreas infestadas, principalmente na recomendação de sistemas de rotação de culturas. A identificação de raças permite também conhecer a distribuição das mesmas e a importância

de cada uma para a agricultura local, bem como fornece populações para a avaliação de genótipos e progênies em programas de melhoramento.

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

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

Citogenética e modo de reprodução

O modo de reprodução dos nematoides das galhas varia consideravelmente entre as espécies, desde a anfimixia clássica até a partenogênese mitótica obrigatória (Triantaphyllou, 1985).

Poucas espécies de *Meloidogyne* são anfimíticas e produzem ovos a partir de reprodução cruzada. Nesse caso, o material genético masculino e feminino é fundido e a recombinação cria variação genética (nova combinação de genes) em cada geração. No entanto, estas espécies anfimíticas (incluindo *M. carolinensis*, *M. megatyla* Baldwin & Sasser, 1979, *M. microtyla* Mulvey, Townshend & Potter, 1975 e *M. pini* Eisenback, Yang & Hartman, 1985) são consideradas como espécies de NG secundárias devido à sua restrita distribuição, estreita gama de hospedeiros e baixo impacto econômico (Jepson, 1987). De fato, a maioria das espécies de *Meloidogyne* se reproduzem por partenogênese, com muitas variações. Algumas espécies (por exemplo, *M. chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley, 1980, *M. exigua* Göldi, 1887, *M. fallax* Karssen, 1996, a maioria das populações de *M. hapla* e *M. graminicola*) podem se reproduzir tanto pela fertilização cruzada como pela

partenogênese meiótica (automítica). Quando os machos estão presentes, o acasalamento ocorre livremente, e a reprodução é através da fertilização cruzada. Quando os machos não estão presentes, o óvulo sofre redução do número de cromossomos através da meiose e o número de cromossomos somáticos é restabelecido após a fusão do segundo núcleo polar com o pronúcleo do ovo (Triantaphyllou, 1966; Dalmasso & Bergé, 1978; Van der Beek *et al.*, 1998). O terceiro modo de reprodução é a partenogênese mitótica (apomítica) obrigatória, encontrada nas espécies mais importantes em termos de distribuição geográfica e impacto agrônômico, isto é, *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949, *M. incognita* e *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. Neste caso, não há redução nem fusão de núcleos, e o ovo se desenvolve diretamente em um embrião. Quando os machos estão presentes, eles podem inseminar as fêmeas, mas o núcleo do espermatozoide se degenera e não participa da fertilização (Triantaphyllou, 1962, 1963 e 1981).

Os organismos eucarióticos pluricelulares que se reproduzem exclusivamente por partenogênese são extremamente raros e, muitas vezes, distribuídos em ambientes marginais, perturbados ou com recursos naturais limitados, esse fato é conhecido como "partenogênese geográfica" (Peck *et al.*, 1998; Kearney, 2003). Além disso, devido aos benefícios da reprodução cruzada a longo prazo, ou seja, o maior nível de diversidade genética proporcionado pela reprodução sexual, as linhagens assexuadas são geralmente consideradas como um fim evolutivo (Maynard Smith, 1978; Kondrashov, 1993).

A partir de todos esses pontos de vista, as espécies partenogênicas mitóticas de NG aparecem como uma excepcional exceção. Primeiro, elas são onipresentes na superfície da Terra. Por exemplo, *Meloidogyne incognita*, a espécie de NG mais difundida, é encontrada desde regiões temperadas a tropicais (Sasser *et al.*, 1983). Em segundo lugar, esses parasitas biotróficos têm uma gama de hospedeiros extremamente ampla abrangendo a maioria das plantas superiores (Trudgill, 1997). Assim, a distribuição das espécies de NG

vai muito além dos nichos ecológicos restritos e altamente especializados, supostamente habitados por organismos assexuados sob a hipótese da partenogênese geográfica. E terceiro, as espécies partenogenéticas de NG exibem uma alta capacidade de resposta à seleção ambiental, por exemplo, sua capacidade de superar genes de resistência de plantas (Castagnone-Sereno, 2002). Em conjunto, todas estas características biológicas explicam o sucesso extremo desses nematoides clonais como parasitas (Trudgill & Blok, 2001).

Os nematoides das galhas também são altamente variáveis em relação ao número cromossômico. É geralmente admitido que o número haploide do gênero seja $n=18$, mas a maioria das populações tem o número de cromossomos somáticos variando entre 30 a 50, e, portanto, são considerados diploides e triploides (Triantaphyllou, 1985). De fato, os números de cromossomos somáticos que são múltiplos perfeitos de 18 não são frequentemente observados no gênero *Meloidogyne*, sugerindo uma taxa frequente de aneuploidia ou polissomia extensa e rearranjos estruturais tais como deleções, duplicações e translocações. Esses eventos podem ter sido frequentes, em parte porque, como a maioria dos nematoides, os NGs possuem um centrômero difuso, ou seja, não há atividade cinetocórica (Triantaphyllou, 1983). As espécies anfimíticas dos NGs são exclusivamente diploides, enquanto que diploidias, triploidias e raras formas de tetraploidias são encontradas em espécies partenogenéticas.

Uma das principais espécies do arroz, *M. graminicola*, apresenta reprodução partenogenética meiótica e 18 cromossomos, sendo considerada haploide. *Meloidogyne salasi* López, 1984, importante patógeno do arroz na Costa Rica (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985), possui 36 cromossomos (diploide) e uma possível reprodução partenogenética mitótica, assim como a espécie também descrita no arroz *M. oryzae* que possui 51-55 cromossomos, e é considerada uma forma poliploide (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985). A pluralidade no número de cromossomos apresentada em espécies

descritas em uma mesma hospedeira, demonstra a complexidade e também a importância do estudo da citogenética para entendimento da biologia e evolução das espécies de NGs.

Identificação bioquímica e molecular

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

Estudos enzimáticos extensivos, com cerca de 800 populações originárias de diferentes países demonstraram que as espécies de *Meloidogyne* podem ser diferenciadas por meio de marcadores enzimáticos, sobretudo as esterases (EST) e malato desidrogenases (MDH) (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Carneiro *et al.*, 2000). Infelizmente, ainda não existem padrões enzimáticos para todas as espécies descritas e esses perfis não fornecem informações suficientes para estudos de variabilidade intraespecífica como os de raças fisiológicas. A variabilidade intraespecífica a nível enzimático é geralmente muito baixa. Isso pode ser explicado pelo fato das enzimas serem produzidas, através da expressão de genes altamente conservados e representarem apenas uma fração muito pequena do genoma, enquanto as regiões não codantes são mais abundantes e submetidas a extensivas mudanças evolutivas (McLain *et al.*, 1987).

Um dos primeiros exemplos do uso de fenótipos de isoenzimas para distinguir *Meloidogyne* spp. foi publicado por Esbenshade & Triantaphyllou (1985), que relataram padrões de esterase de 16 espécies de *Meloidogyne*, sendo os fenótipos mais comuns A2 e A3 (*M. arenaria*), H1 (*M. hapla*), I1 (*M. incognita*) e J3 (*M. javanica*). Em 1990, Esbenshade & Triantaphyllou usaram isoenzimas em sua pesquisa histórica envolvendo aproximadamente 300 populações originárias de 65 países e vários continentes. Em pesquisas posteriores, Carneiro *et al.* (2000) encontraram 18 fenótipos de esterase entre

111 populações de *Meloidogyne* spp. no Brasil e em outros países da América do Sul, e Xu *et al.* (2004) examinaram 46 populações de 14 províncias da China e encontraram cinco fenótipos de esterase. As isoenzimas continuam a ser amplamente utilizadas para estudos de *Meloidogyne* apesar de algumas de suas limitações, fenótipos de isoenzimas para um grande número de espécies foram publicados. Diagramas esquemáticos de padrões de isoenzimas baseados em levantamentos, incluindo aqueles conduzidos no projeto internacional *Meloidogyne*, foram publicados (Dalmasso & Bergé, 1978; Janati *et al.*, 1982; Esbenshade & Triantaphyllou, 1985, 1990; Fargette, 1987; Carneiro *et al.*, 2000, Hernandez *et al.*, 2004) e fornecem referências importantes. Recentemente, Carneiro *et al.* (2016) publicaram um diagrama com todos os 20 fenótipos de esterases encontrados em espécies de *Meloidogyne* no Brasil.

Padrões enzimáticos são geralmente comparados com um padrão conhecido, frequentemente o de *M. javanica*, que é incluído na eletroforese para determinar distâncias de migração das bandas. Para a técnica de isoenzimas, são utilizadas principalmente fêmeas no estágio adulto (Dalmasso & Bergé, 1978). A ocorrência de variantes intra-específicas, como é o caso de *M. incognita* (fenótipos Est: I1, I2, S2, Santos *et al.*, 2012), *M. javanica* (fenótipos Est: J2a e J2b, Cofcewicz *et al.*, 2004), *M. arenaria* (fenótipos Est: A2 e A1, Carneiro *et al.*, 2008), *M. exigua* (fenótipos Est: E1, E2 e E3, Muniz *et al.*, 2008) e *M. paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes, Santos & Almeida, 1996 (fenótipos Est: P1 e P2, Carneiro *et al.*, 2004) pode trazer certas complicações à técnica. Casos raros como, o mesmo fenótipo de esterase para duas espécies diferentes, por exemplo, as esterases de *M. exigua* e *M. naasi*, exige a utilização de mais de um sistema enzimático (Mdh) para confirmar a identidade dessas espécies (Esbenshade & Triantaphyllou, 1990). A intensidade de concentração das esterases também pode exigir a utilização de várias fêmeas, como é o caso de *M. exigua* (Carneiro *et al.*, 2000; Muniz *et al.*, 2008). Ou até

mesmo, dificuldade na leitura de gel, como o caso de *M. graminicola* (G1) e *M. graminis* (Mg1) que além de possuírem o fenótipo de esterase similar, possuem alta atividade enzimática, visualizada em gel como um arraste e não uma banda definida (Esbenshade & Triantaphyllou, 1990; Carneiro *et al.*, 2000; Brito *et al.*, 2010).

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

Posteriormente, com o advento da PCR, novos métodos de diagnose para o nematoide das galhas foram desenvolvidos, tendo como base principalmente regiões alvos do DNA dos nematoides utilizando primers espécie-específicos. Primers para diagnóstico de espécies de *Meloidogyne* foram desenvolvidos baseados em regiões conservadas no DNAr (ITS 1 e 2; IGS 1 e 2 e ETS) (Perry *et al.*, 2007).

A técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), baseada na PCR é utilizada atualmente para os estudos genéticos e para a diferenciação de várias espécies de *Meloidogyne*, a partir de perfis gerados com o auxílio de *primers* aleatórios (Cenis, 1993; Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997; Randig *et al.*, 2002). A análise de RAPD, além de utilizar pequenas quantidades de material genético (6 - 30 ng DNA), não necessita do conhecimento prévio do genoma a ser estudado, pois se utilizam *primers* de sequência aleatória (Williams *et al.*, 1990). A técnica é considerada simples, rápida e de baixo custo quando comparada à RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). A

principal limitação dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informação genética por loco. Apenas um alelo é detectado, o segmento que é amplificado, enquanto que as demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como um alelo nulo. Os marcadores RAPD, portanto, comportam-se como marcadores dominantes: os dados têm natureza binária (presença ou ausência de fragmentos). Genótipos heterozigotos não podem ser diretamente discriminados dos homozigotos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A conversão dos marcadores RAPD em SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), termo cunhado por Paran & Michelmore (1993) para definir marcadores RAPD cuja sequência interna tenha sido determinada, permitindo compor *primers* mais longos, ricos em GC (guanina-citosina) e de sequência específica tem sido utilizada para a identificação de espécies. Entre as vantagens dos marcadores SCAR, em relação aos marcadores RAPD, destaca-se a maior reprodutibilidade, pois a técnica RAPD, quando executada sob diferentes condições, tais como qualidade e quantidade do DNA, marcas de enzima e de termociclador, pode apresentar variação no perfil amplificado (Jones *et al.*, 1997). Os marcadores SCAR podem ser utilizados como pontos de referência física do genoma, servindo para mapeamento, ou como marcadores genéticos, quando estão associados a algum genótipo ou fenótipo de interesse (Mienie *et al.*, 2002; Noir *et al.*, 2003).

Nos nematoides das galhas, marcadores SCAR já foram desenvolvidos para identificar duas espécies quarentenárias, *M. chitwoodi* e *M. fallax*, ou ainda, para separar as três espécies: *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, presentes principalmente em regiões tropicais e subtropicais ou em plantios em sistema protegido (Zijlstra, 2000; Zijlstra *et al.*, 2000; Fourie *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2004). Marcadores SCAR espécie-específicos foram definidos para as três principais espécies de *Meloidogyne* do cafeeiro: *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* (Randig *et al.*, 2002). Recentemente, também foram

desenvolvidos *primers* para as espécies *M. izalkoensis* Carneiro, Almeida, Gomes & Hernández, 2005 e *M. arabicida* López & Salazar, 1989 (Correa *et al.*, 2013) e *M. ethiopica* Whitehead, 1968 (Correa *et al.*, 2014). Marcadores espécie-específicos foram propostos para *M. graminicola* (Bellafiore *et al.*, 2015; Htay *et al.*, 2016), porém a especificidade desses marcadores não têm sido confirmada, como demonstrado por Negretti *et al.* (2017) em seu estudo.

Adam *et al.* (2007) desenvolveram uma chave baseada em técnicas moleculares de identificação para diagnóstico das espécies: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. enterolobii*, *M. hapla*, *M. chitwoodi*, *M. fallax* usando uma combinação dos marcadores IGS, SCAR e perfis de RAPD.

Outras regiões do DNA também foram exploradas para o diagnóstico dos nematoides das galhas, entre elas estão a região do DNA mitocondrial (DNAMt) e DNA satélite (DNAsat). Os genomas mitocondriais são geralmente pequenos variando entre 12-20kb (Brown, 1985; Castagnone-Sereno *et al.*, 2011). Divergências em sequências no DNAMt devido a inserções, deleções ou a maiores taxas de mutação comparadas com o DNA nuclear (Castagnone-Sereno *et al.*, 2011) proporcionaram o estudo de regiões-alvo para a distinção de *Meloidogyne* spp. (Powers & Harris, 1993; Jeyaprakash *et al.*, 2006). A região do DNA ribossomal (DNAr) tem sido muito utilizada também para estudos das relações filogenéticas entre as espécies de *Meloidogyne* (Castagnone-Sereno *et al.*, 2011). McClure *et al.* (2012) propuseram um novo método de identificação que permite separar *M. graminis* e *M. marylandi*, e outras espécies relacionadas a gramíneas baseado no RFLP do amplificado da região mtDNA.

Da mesma forma, DNAsats são organizados de forma repetitiva e em tandem no genoma, com sequências curtas variando de 70 a 2000bp. Polimorfismo de sequências, do

número de cópias e do tamanho no satDNA têm sido explorado para identificar marcadores espécie-específicos (Blok & Powers, 2009; Castagnone-Sereno *et al.*, 2011). Alguns marcadores específicos utilizando esta região foram propostos por Castagnone-Sereno *et al.* (1995) e por Randig *et al.* (2009).

Recentemente, uma nova técnica molecular tem sido adaptada da patologia humana para auxiliar na identificação de fitonematoides. A amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP), originalmente desenvolvida por Notomi *et al.* (2000), é um método simples e rápido que permite a amplificação do DNA sob condições isotérmicas. O ensaio LAMP não requer muita habilidade técnica, mas sim apenas um termociclador. Além disso, o produto LAMP pode ser visto a olho nu quando adicionando SYBR Green I, de acordo com a mudança de cor e a vareta de fluxo lateral (LFD), semelhante a um teste de gravidez. Por ser altamente eficiente e não necessitar de instalações laboratoriais especiais, essa técnica mostrou-se promissora na detecção específica e rápida de patógenos clínicos (Polley *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015) e agrícolas (Abd-Elsalam *et al.*, 2011; Tsai *et al.*, 2012). No entanto, para nematoides parasitas de plantas, apenas *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhner, 1934 (Kikuchi *et al.*, 2009), *M. enterolobii* Yang & Eisenback, 1983 (Niu *et al.*, 2012), *M. incognita* (Niu *et al.*, 2011), *M. hapla* (Peng *et al.*, 2017), *Radopholus similis* (Cobb) Thorne, 1949 (Peng *et al.*, 2012) e *Tylenchulus semipenetrans* Cobb, 1913 (Lin *et al.*, 2016) foram detectados por LAMP.

Embora as técnicas bioquímicas e moleculares para identificação de nematoides das galhas têm sido amplamente utilizadas, ainda não são capazes de identificar todas as espécies de *Meloidogyne*, mas já podem identificar cerca de 40 espécies. Um entendimento claro sobre os limites de espécie para esse gênero, assim como mais estudos a partir de

coletas de populações de espécies bem identificadas ao redor do mundo ainda são necessários (Blok & Powers, 2009).

Recomenda-se, atualmente, uma diagnose para os NGs baseada em mais de um método (morfológico, bioquímico, molecular).

Espécies de *Meloidogyne* patogênicas a *Oryza sativa*

Aproximadamente 29 espécies de nematoides estão associadas a perdas em arroz irrigado (Bridge *et al.*, 2005). Entre elas, espécies de nematoides formadores de cistos *Heterodera elachista* Ohshima, 1974, *H. oryzicola* Rao & Jayaprakash, 1978, *H. oryzae* Luc & Berdon, 1961, e *H. sacchari* Luc & Merni, 1963 (Barker *et al.*, 1998; Luc & Merni, 1963). Apesar da distribuição geográfica dessas espécies ser restrita, perda em rendimento de grãos de até 42% foi registrada para *H. oryzicola* (Ushakumari & Kuriyan, 1982). Perdas similares de rendimento foram relatadas após a infecção por *H. sacchari*, com perdas mais severas em condições de sequeiro que irrigada (Babatola, 1983; Coyne & Plowright, 2000).

Hirschmanniella oryzae Luc&Goodey,1964, fitonematoide parasita migratório de raízes do arroz, é conhecido por causar redução na formação de panícula em até 60% (Hollis & Keoboornueng, 1984; Bridge *et al.*, 2005). Nematoides do gênero *Pratylenchus* spp. são relatados principalmente em terras altas em arrozais na África, na América do Sul e no Sudeste Asiático (Bridge *et al.*, 2005).

O patógeno foliar *Aphelenchoides besseyi* Christie 1942, conhecido por causar a doença da ponta branca de arroz, é amplamente distribuído em sistemas de cultivo de arroz em todo o mundo. O impacto econômico deste nematoide transmitido por sementes varia entre regiões, países e localidades (Bridge *et al.*, 2005). O ectoparasita, *Ditylenchus angustus* (Butler, 1913) Filipjev, 1936, pode provocar danos expressivos a arrozais,

especialmente se mudas contaminadas forem transplantadas para uma área de produção (Bridge *et al.*, 2005).

Nove espécies do nematoide das galhas foram relatadas, na literatura, parasitando o arroz irrigado, são elas: *M. graminicola*, *M. hainanensis* Liao and Feng, 1995, *M. lini* Yang, Hu and Xu, 1988, *M. salasi*, *M. tritricoryzae*, *M. sasseri* Handoo Handoo, Huettel and Golden, 1995, *M. oryzae*, *M. incognita* e *M. javanica* (Bridge *et al.*, 2005). E outras duas espécies, *M. marylandi* e *M. graminis*, apesar de não terem sido reportadas parasitando arroz em campo, foram testadas e mostraram-se capazes de reproduzir em *O. sativa* (Pokharel *et al.*, 2007; Faske & Starr, 2009).

Essas espécies de NG parasitas do arroz, em sua maioria, possuem descrições pouco detalhadas e até mesmo, não traduzidas como é o caso de *M. hainanensis*, cuja descrição não foi traduzida do chinês. Todavia, alguns trabalhos posteriores com MEV, elucidaram e complementaram a taxonomia de algumas das principais espécies (Jepson, 1987; Eisenback & Triantaphyllou., 1991; Oka *et al.*, 2003). Jepson (1987), em seu estudo sobre a identificação de NG, classificou quase todas as espécies do arroz no grupo-*graminis*. Considerado um grupo de difícil diagnose pelas semelhanças morfológicas e morfométricas entre as espécies.

O grupo-*graminis* engloba espécies que tem preferência por hospedeiras das famílias Poaceae e Cyperaceae. As fêmeas, frequentemente, apresentam vulva situada em protuberância posterior, provocam galhas pequenas, especialmente em gramíneas. São, em sua maioria, espécies partenogênicas meióticas ou anfimíticas, exceções *M. oryzae* e *M. salasi* (apomíticas). Características morfológicas como formato e comprimento da cauda e, especificamente da porção hialina do J2; morfologia do estilete e bulbos do estilete de machos e fêmeas podem ser utilizadas para separar espécies no grupo (Jepson, 1987).

Meloidogyne graminicola (Mg) é a espécie mais prejudicial nas diferentes partes do globo (Bridge *et al.*, 2005). Em países asiáticos, os produtores de arroz irrigado quantificam os prejuízos causados pelo ataque de *M. graminicola*, na produtividade da cultura, entre 11 e 80% (Soriano & Reversat, 2003; De Waele & Elsen, 2007).

A presença de *M. graminicola* em lavouras de arroz irrigado foi constatada inicialmente nos Estados Unidos em raízes de plantas daninhas (Golden & Birchfield, 1965), sendo posteriormente encontrado no sistema radicular de plantas de arroz (Golden & Birchfield, 1968). Devido ao fato de ser um organismo bem adaptado à sobrevivência e multiplicação em áreas inundadas (Prot & Matias, 1995), a sua ocorrência foi extensamente relatada nas décadas de 1990 e 2000 nas lavouras de arroz irrigado em vários países asiáticos (Padgham *et al.*, 2004; Sobita & Anamika, 2011), além de países norte e sul americanos (Soriano & Reversat, 2003; Xu *et al.*, 2004). A presença deste nematoide é restrita no continente africano, apenas um relatório técnico menciona a presença de *M. graminicola* na África do Sul (Kleynhans, 1991). Recentemente, a espécie foi relatada pela primeira vez no continente europeu, na Itália (Fanelli *et al.*, 2017).

No Brasil, existem relatos da ocorrência do nematoide das galhas em arroz irrigado desde a década de 1980 (Ribeiro *et al.*, 1984). Quanto à espécie, somente nos anos 1990 foi reportada a presença de *M. graminicola* na cultura (Sperandio & Monteiro, 1991). O primeiro levantamento do nematoide das galhas em arroz irrigado foi realizado no Estado do Rio Grande do Sul (Steffen *et al.*, 2007). Nesse estudo, os autores, detectaram a ocorrência generalizada de *M. graminicola* (Est. VS1) em lavouras da depressão central do Estado. Posteriormente, Gomes *et al.* (2009) relataram a presença de *M. graminicola* em arroz irrigado em Santa Catarina.

Além de espécies de *Oryza*, *M. graminicola* também parasita *Alopecurus* L., *Avena sativa* L., *Beta vulgaris* L., *Brachiaria mutica* Stapf, *Brassica juncea* (L.) Vassiliï

Matveievitch Czernajew, *B. oleracea* L., *Colocasia esculenta* (L.) Schott, *Cyperus procerus* Rottb., *C. pulcherrimus* Willd. ex. Kunth, *C. rotundus* L., *Echinochloa colona* L., *Eleusine indica* L., *Fimbristylis miliacea* (L.) Vahl, *Fuirena* Rottb., *Glycine Max* (L.) Merr., *Lactuca sativa* L., *Monochoria vaginalis* (Burm.f.) C.Presl ex Kunth, *Panicum miliaceum* L., *P. repens* L., *Paspalum scrobiculatum* L., *Pennisetum typhoides* (L.)R.Br., *Phaseolus vulgaris* L., *Poa annua* L., *Ranunculus* L., *Saccharum officinarum* L., *Sorghum bicolor* (L.) Moench, *Sphaeranthus* L., *Sphenoclea zeylanica* Gaertn., *Spinacia oleracea* L., *Triticum aestivum* L., e *Vicia faba* L. (MacGowan & Langdon, 1989).

Meloidogyne graminicola é igualmente prevalente em arroz de terras altas (sequeiro) ou de várzea (irrigado). Em condições de sequeiro, perdas de rendimento provocadas por *M. graminicola* variaram de 20 a 80% (Plowright & Brigde, 1990).

Há uma grande variabilidade na suscetibilidade à infecção por *M. graminicola* entre genótipos de arroz irrigado, mas até apenas uma resistência genética parcial foi encontrada em acessos de *O. sativa* (Jena & Rao, 1976; Bridge *et al.*, 2005; Prasad *et al.*, 2006; Cabasan *et al.*, 2012; Dimpka *et al.*, 2015).

Resistência em campo para nematoide das galhas *M. graminicola*, até agora, tem sido registrada apenas nas espécies africanas *O. longistaminata* e *O. glaberrima* (Plowright *et al.*, 1999; Soriano *et al.*, 1999; Bimpong *et al.*, 2010). Embora, alguns acessos de *O. glaberrima* permitam uma reprodução residual de *M. graminicola* (Soriano *et al.*, 1999; Bimpong *et al.*, 2010).

Meloidogyne graminicola provoca no arroz o sintoma de galhas em formato de gancho e massas de ovos internas nas raízes. A postura incomum dos ovos é uma vantagem quando o hospedeiro está em condições inundadas. *Meloidogyne graminicola* é uma espécie partenogênica meiótica facultativa na qual a anfimixia pode ocorrer em baixa frequência (aproximadamente 0,5%) (Triantaphyllou, 1969).

Em estudo recente, várias populações de *M. graminicola* foram isoladas e examinadas quanto a diferenças de morfologia, sequência de DNA, virulência e agressividade em cultivares de arroz. Caracteres quantitativos, como o comprimento do corpo e o estilete, foram utilizados para revelar a diversidade intraspecífica entre populações isoladas do Vietnã (Bellafiore *et al.*, 2015), Nepal, Índia, Bangladesh, Tailândia e EUA (Jepson, 1987; Pokharel *et al.*, 2010). Curiosamente, a agressividade, avaliada em condições controladas, revelou diferenças significativas entre as populações, sugerindo novamente a diversidade intraespecífica (Pokharel *et al.*, 2007). Além das diferenças "quantitativas", observou-se uma diferença "qualitativa" entre populações isoladas da América do Norte e da Ásia, pois, apesar de uma gama similar de hospedeiros, a população americana de *M. graminicola* não se propagou em várias cultivares de arroz em comparação com as populações asiáticas (Pokharel *et al.*, 2010).

Outros estudos de patogenicidade independentes em uma variedade de hospedeiros sugerem que *M. graminicola* consiste em mais de uma raça. Por exemplo, as populações dessa espécie apresentam uma capacidade variável de parasitar o tomate e o milho (Yik & Birchfield, 1979; Pokharel *et al.*, 2010; Bellafiore *et al.*, 2015). A compatibilidade observada entre *M. graminicola* e seus hospedeiros é dependente das cultivares. Estes dados são consistentes com a existência de diferentes raças de *M. graminicola* e com o conceito de que algumas cultivares em uma espécie vegetal são resistentes a algumas populações dessa espécie.

Outra explicação para a diferença aparente na virulência de algumas populações de *M. graminicola* na mesma espécie de planta poderia ser a existência de um complexo de espécies do nematoide (Negretti *et al.*, 2017). As espécies de *Meloidogyne* do arroz são de difícil identificação, com caracteres morfológicos muito vezes sobrepostos e até

mesmo fenótipos de enzimas próximos ou mesmo iguais. Isso demonstra a importância do desenvolvimento de métodos confiáveis de identificação para os NG do arroz.

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

Dentre os nematoides reportados causando danos a plantações de arroz no continente americano, além de *M. graminicola*, estão *M. oryzae* e *M. salasi*.

A espécie *M. salasi* (*Ms*), descrita em 1984, foi relatada em áreas de produção de arroz na Costa Rica, Panamá (López, 1984) e na Venezuela, provocando graves perdas nas lavouras e apresentando altas taxas de reprodução em campo (Sancho & Salazar, 1985; Medina *et al.*, 2009, 2011). O perfil de esterase de *M. salasi* é descrito na literatura como VS1, é uma espécie partenogenética mitótica relatada com 36 cromossomos (Esbenshade & Triantaphyllou 1985). Até o momento, não há marcadores moleculares para identificação dessa espécie.

Meloidogyne oryzae (*Mo*) foi detectada pela primeira vez em 1971 no Suriname, causando danos a plantas de arroz (Maas *et al.*, 1978). Esta espécie foi novamente detectada no Suriname e na Guiana Francesa após a sua descrição por Carneiro *et al.* (2000), utilizando apenas fenótipo de esterase (VS1). A presença da espécie nesses locais é questionável, uma vez que a identidade taxonômica dos isolados não foi confirmada (Carneiro *et al.*, 2000; Negretti *et al.*, 2017).

Segeren & Sanchit (1984) ao realizarem um experimento em casa de vegetação com várias cultivares de *O. sativa*, verificaram que todas foram suscetíveis a *M. oryzae*, como também, uma redução de 10 a 15 por cento de rendimento. *Fimbristylis miliaceae* e *Echinochloa crusgavonis* (Kunth) Schult. são descritas como excelentes hospedeiras desse nematoide, assim como *E. colonum* (L.) Link, *Hymenachne amplexicaulis* L., *Eleocharis* R.Br., sorgo e tomate, em contraste com *M. graminicola* que não se multiplica em nenhuma das cultivares de tomateiro testadas (Manser, 1971; Maas *et al.*, 1978). *Mo* tem 51-54 cromossomos e um modo de reprodução apomítico (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985). Não há um método molecular específico desenvolvido para o diagnóstico de *M. oryzae*.

Meloidogyne triticoryzae foi descrito pela primeira vez na Índia, onde foi encontrado infectando trigo e arroz (Gaur *et al.*, 1993). As ervas daninhas conhecidas como boas hospedeiras deste nematoide são *C. rotundus*, *E. colonum*, *E. crusgalli* (L.) P. Beauv, *Leptochloa coloniculus* P. Beauv. e *Phalaris minor* Retz. (Gaur & Sharma, 1998). Além disso, assim como *M. graminicola*, essa espécie também infecta o trigo. Não há descrição na literatura dos perfis enzimáticos para esta espécie. Gaur *et al.* (2000) mostraram que fêmeas de *M. triticoryzae* da Índia produziam três tipos de ovos: os que possuem J2 que eclodem na água, os que eclodem nos exsudatos da raiz do hospedeiro e os que não eclodem mesmo na presença de exsudato. A proporção destes três tipos varia com a geração, constituindo um excelente mecanismo de sobrevivência em solo, pois a geração final produzida em plantas senescentes possui uma grande proporção de juvenis não eclodidos do terceiro tipo (diapausa). A diferença entre gerações na eclosão de J2 a partir de massas de ovos produzidas em diferentes estádios de crescimento da planta ilustra a influência da planta sobre o desenvolvimento e posterior incubação. Isso reflete uma mudança de prioridade para a espécie durante a estação de crescimento da planta

hospedeira, desde a reinfecção rápida de plantas jovens até a sobrevivência após a senescência da hospedeira (Curtis *et al.*, 2009). Além disso, assim como *M. graminicola* e *M. oryzae*, *M. triticoryzae* também se mostra bem adaptada a sistema de plantio irrigado (Segeren & Sanchit, 1984; Kinh *et al.*, 1982; Gaur *et al.*, 2000)

As espécies *M. hainanensis* e *M. lini* foram ambas descritas na China provocando danos em campos de arroz, nas províncias de Hainan (1995) e Guangxi (1988), respectivamente. Não há muitos estudos na literatura e até onde se sabe não há relato da presença dessas espécies fora do território chinês, sendo as descrições das espécies muito limitadas (Yang *et al.*, 1988; Liao & Feng, 1995).

As espécies *M. marylandi* e *M. graminis* não foram relatadas diretamente no arroz, porém em estudos de hospedeiros, mostraram-se parasitas a *O. sativa*, especialmente *M. marylandi* (Pokharel *et al.*, 2007; Faske & Starr, 2009). Ambas espécies foram descritas nos Estados Unidos, *M. marylandi* já se encontra distribuída por mais de cinco países e *M. graminis* foi recentemente relatada no Brasil, causando danos a campos de golfe no estado de São Paulo (Oliveira, 2015). Durante vários anos, *M. marylandi* foi erroneamente identificada como *M. graminis*, que foi originalmente descrita como uma espécie de *Hypsoperine* (*H. graminis* Sledge & Golden, 1964) em uma Poaceae no estado da Flórida. Atualmente, essas duas espécies podem ser diferenciadas através da digestão com enzimas de restrição da região mitocondrial do DNAr (McClure *et al.*, 2012).

Caracterização das espécies de *Meloidogyne* no Sul do Brasil

O nematoide das galhas tem sido relatado no arroz irrigado no Brasil desde os anos 1980 (Ribeiro *et al.*, 1984). No entanto, apenas 30 anos mais tarde, a primeira pesquisa acerca do controle deste nematoide e da suscetibilidade de cultivares brasileiras foi realizada por Steffen *et al.* (2007). Neste estudo, os autores detectaram ocorrência generalizada de *M. graminicola* (Est.VS1) na região da depressão central do Estado do RS.

Apesar dos relatos de ocorrência de NG em arroz irrigado no sul do Brasil (Sperandio & Monteiro, 1991; Steffen *et al.*, 2007), até o momento existe pouca informação sobre a diversidade de espécies de *Meloidogyne* no arroz irrigado nessa importante região produtora.

Recentemente, Negretti *et al.* (2017) realizaram um levantamento em campos de arroz irrigado nos estados RS e SC, utilizando ferramentas de caracterização bioquímica e molecular. Trinta e seis populações de *Meloidogyne* foram caracterizadas bioquimicamente. De acordo com os resultados apresentados pelos autores, dois fenótipos conhecidos corresponderam a *M. graminicola* (fenótipo Est VS1, Rm: 0,70 prolongado a partir de Rm: 0,68-0,72) e *M. javanica* (fenótipo Est J3, Rm: 1,00, 1,20, 1,35); *M. graminicola* foi a espécie predominante em ambos os estados. Três fenótipos atípicos de esterase apresentando bandas em arraste e alta atividade enzimática também foram detectados nas populações de NG de arroz: *Meloidogyne* sp. 1 (Est R1, Rm 1,02, que se estende desde Rm: 1,0-1,04), *Meloidogyne* sp. 2 (Est. R2, Rm: 0,85, 0,91, que se estende de 0,91 a 1,0) e *Meloidogyne* sp. 3 (Est R3, Rm: 0,74, 0,80 que se estende de 0,74 a 0,82) (Figura 9).

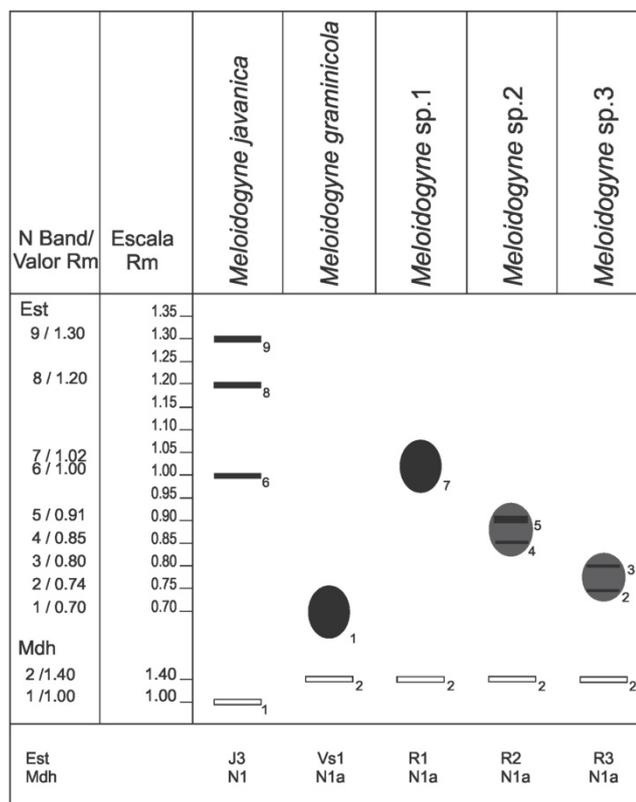


Figura 9: Esquema apresentando os fenótipos de esterase (Est) e malato desidrogenase (Mdh) observados em 56 populações de *Meloidogyne* spp. coletadas em arrozais irrigados do sul do Brasil: *M. javanica* (J3N1), *M. graminicola* (VS1N1a), *Meloidogyne* sp.1 (R1N1a), *Meloidogyne* sp.2 (R2N1a) e *Meloidogyne* sp.3 (R3N1a). Rm: ‘Ratio of migration’ – proporção de migração das bandas; N Band: número da banda. Fonte: Negretti *et al.*, 2017.

Populações mistas de *Meloidogyne* spp. foram detectados em ambos os estados em cerca de 44% dos plantios de arroz amostrados pelos autores. Com frequência de ocorrência de diferentes espécies de *Meloidogyne* para o estado de Santa Catarina: *M. graminicola* aprox. 79%, *M. javanica* aprox. 7%, *Meloidogyne* sp. 1 aprox. 12%, *Meloidogyne* sp. 2 aprox. 0,6% e *Meloidogyne* sp. 3 cerca de 0,7%. Para o estado do Rio Grande do Sul: *M. graminicola* aprox. 55%, *Meloidogyne* sp. 2 aprox. 35% e *Meloidogyne* sp. 3 aprox. 10%. O predomínio de *Meloidogyne* sp. 2 e *Meloidogyne* sp. 3 e a ocorrência restrita de *M. graminicola* foram observados em levantamento recente em áreas orizícolas do estado do Paraná (Cesar B. Gomes, comunicação pessoal).

Análises moleculares complementares e alguns estudos morfológicos preliminares levaram os autores deste trabalho a relatar a existência de um complexo de espécies de *Meloidogyne* em arroz irrigado no Sul do país.

Chamaram a atenção os resultados obtidos pelos autores através da análise filogenética da região ITS, a qual mostrou que todas as populações de *M. graminicola* pertenciam a um único agrupamento. *Meloidogyne* sp. 2 e *Meloidogyne* sp. 3 agruparam-se com as populações de *M. graminicola*, sugerindo que elas estão intimamente relacionadas e que provavelmente são espécies com partenogênese meiótica facultativa no arroz (Castagnone-Sereno *et al.*, 2013). Duas populações de *Meloidogyne* sp. 1 agruparam-se em conjunto com as populações partenogênicas mitóticas obrigatórias, sugerindo que *Meloidogyne* sp. 1 pode reproduzir-se por partenogênese mitótica como *M. oryzae* (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985). Neste trabalho, os autores também ressaltaram a possibilidade de uma classificação errônea da população de *M. oryzae* do Suriname, estudada primeiramente por Carneiro *et al.* (2000) e Tigano *et al.* (2005), uma vez que essa população apresentou o mesmo número de cromossomos (aprox. 18) como *M. graminicola* (VS1) e um fenótipo de esterase semelhante (Regina M.D.G. Carneiro comunicação pessoal).

Negretti *et al.* (2017) testaram marcadores moleculares específicos para *M. graminicola* (Bellafiore *et al.*, 2015; Htay *et al.*, 2016) nas populações purificadas e houve amplificação positiva para as demais espécies e não somente para as populações de *M. graminicola*, sugerindo a não especificidade dos marcadores disponíveis.

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

das espécies, definição taxonômica e novas ferramentas para identificação e diagnóstico fazem-se necessárias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-ELSALAM, K., BAHKALI, A., MOSLEM, M., AMIN, O.E. & NIESSEN, L. 2011. An optimized protocol for dna extraction from wheat seeds and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) to detect *Fusarium graminearum* contamination of wheat grain. *International Journal of Molecular Science* 12:3459-3472.
- ADAM, M.A.M., PHILLIPS, M.S. & BLOK, V.C. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology* 56(1):190-197
- AGNOUN, Y., SIE, M., DJEDATIN, G., DRAME, K. N., TOULOU, B., OGUNBAYO, S., *et al.* 2012. Molecular profiling of interspecific lowland rice progenies resulting from crosses between TOG5681 and TOG5674 (*Oryza glaberrima*) and IR64 (*Oryza sativa*). *International Journal of Biology* 4:19–28.
- AZAMBUJA, I.H.V., VERNETII JR, F.J. & MAGALHAES JR, A.M. 2004. Aspectos socioeconômicos da produção do arroz. In: Gomes, A. S. & Magalhães Jr, A.M. (eds). *Arroz irrigado no Sul do Brasil*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, Brasil. p.23-44
- BABATOLA, J.O. 1983. Pathogenicity of *Heterodera sacchari* on rice. *Nematologia Mediterranea*. 11:21–25.
- BARCALA, M., GARCIA, A., CABRERA, J., CASSON, S., LINDSEY, K., FAVERY, B., GARCIA-CASADO, G., SOLANO, R., FENOLL, C., ESCOBAR, C. 2010. Early transcriptomic events in microdissected *Arabidopsis* nematode-induced giant cells. *Plant Journal* 61: 698–712.
- BARKER, K.R., PEDERSON, G., WINDHAM, G.L. 1998. *Plant and Nematode Interactions*. Madison, WI: American Society of Agronomy 66.
- BELLAFFIORE, S., JOUGLA, C., CHAPUIS, E., BESNARD, G., SUONG, M., VU, P.N., DE WHALE, D., GANTET, P. & THI, X.N. 2015. Intraspecific variability of the facultative meiotic parthenogenetic root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) from rice fields in Vietnam. *Comptes Rendus Biologies* 338: 471-483.

- BESNARD, G., JÜHLING, F., CHAPUIS, É., ZEDANE, L., LHUILLIER, É., MATEILLE, T. & BELLAFIORE, S. 2014. Fast assembly of the mitochondrial genome of a plant parasitic nematode (*Meloidogyne graminicola*) using next generation sequencing. *Comptes Rendus Biologies* 337(5):295-301.
- BIMPONG, I.K., CARPENA, A.L., MENDIORO, M.S., FERNANDEZ, L. & RAMOS, J. 2010. Evaluation of *Oryza sativa* × *O. glaberrima* derived progenies for resistance to root-knot nematode and identification of introgressed alien chromosome segments using SSR markers. *African Journal of Biotechnology* 9:3988–3997.
- BLOK, V.C. & POWERS, O. 2009. Biochemical and molecular identification. In: Perry, R., Moens, M., & Starr, J.L. (eds). *Root-knot Nematodes*. CABI, Cambridge, UK. p.98-118.
- BLOK, V.C. 2005. Achievements in and future prospects for molecular diagnostics of plant-parasitic nematodes. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27:76-185.
- BLOK, V.C., PHILLIPS, M.S., MCNICOL, J.W. & FARGETTE, M. 1997. Genetic variation in tropical *Meloidogyne* spp. as shown by RAPDs. *Fundamental and Applied Nematology* 20:127-133.
- BRAR, D.S. & KHUSH, G.S. 1997. Alien introgression in rice. In: Moore, G. & Sasaki, T. *Oryza: From Molecule to Plant*. Springer, Netherlands. p. 35-47.
- BRIDGE, J., PLOWRIGHT, R.A. & PENG, D. 2005. Nematode parasites of rice. In: Luc, M., Sikora, R.A., & Bridge, J. (eds). *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CAB International, Wallingford, UK. p. 87–128.
- BRITO, J.A., KAUR, R., CETINTAS, R., STANLEY, J.D., MENDES, M.L.; POWERS, T.O. & DICKSON, D.W. 2010. *Meloidogyne* spp. infecting ornamental plants in Florida. *Nematropica* 40(1):87-104.
- BRONDANI, C., RANGEL, P.H.N., BRONDANI, R.P.V. & FERREIRA, M.E. 2002. QTL mapping and introgression of yield related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 104:1192-1203.

- BRONDANI, C.; PEREIRA, R.; BRONDANI, V.; RANGEL, P.H.N. & FERREIRA, M.E. 2001. Development and mapping of *Oryza glumaepatula*-derived microsatellite markers in the interspecific cross *Oryza glumaepatula* X *O. sativa*. *Hereditas* 134:59-71.
- BRONDANI, R.P.V., ZUCCHI, M.I., BRONDANI, C., RANGEL, P.H.N., BORBA, T.C.O., RANGEL, P.N., MAGALHÃES, M.R. & VENCOVSKY, R. 2005. Genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* populations in three Brazilian biomes using microsatellite markers. *Genetica* 125:115-123
- BROWN, W.M. 1985. The mitochondrial genome of animals. In: MacIntyre, R.H. *Molecular Evolutionary Genetics*. Plenum Press, New York, USA. p.95–130.
- BUSO, G. S. C., RANGEL, P. H., & FERREIRA, M. E. 1998. Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. *Molecular Ecology*, 7(1): 107-117.
- CABASAN, M.T.N., DE WAELE, D. & KUMAR, A. 2012. Comparison of migration, penetration, development and reproduction of *Meloidogyne graminicola* on susceptible and resistant rice genotypes. *Nematology* 14:405–415.
- CAILLAUD MC, DUBREUIL G, QUENTIN M, PERFUS-BARBEOCH L, LECOMTE P, DE ALMEIDA ENGLER J, ABAD P, ROSSO MN, FAVERY B. 2008. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology* 165: 104–113.
- CARNEIRO, R.M., DOS SANTOS, M.F., ALMEIDA, M.R.A., MOTA, F.C., GOMES, A.C.M. & TIGANO, M.S. 2008. Diversity of *Meloidogyne arenaria* using morphological, cytological and molecular approaches. *Nematology* 10(6): 819-834.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & COFCEWICZ, E.T. 2008. Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In: Souza, R.M. (ed). *Plant parasitic nematodes of coffee*. Springer, Holland. p.87-122.
- CARNEIRO, R.M.D.G., ALMEIDA, M.R.A. & QUÉNÉHERVÉ, P. 2000. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology* 2:645-654.

- CARNEIRO, R.M.D.G., MONTEIRO, J.M.S., SILVA, U.C. & GOMES, G. 2016. Gênero *Meloidogyne*: diagnose através de eletroforese de isoenzimas e marcadores SCAR. In: Oliveira, C.M., Dos Santos, M.A., & Castro, L.H.S. Diagnose de Fitonematoides. Millennium, Campinas, Brasil. p.71-93.
- CARNEIRO, R.M.D.G., TIGANO, M.S., RANDIG, O., ALMEIDA, M.R.A. & SARAH, J.L. 2004. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology* 6:287-298.
- CASTAGNONE-SERENO, P. 2002. Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes? *Euphytica* 124(2):193-199.
- CASTAGNONE-SERENO, P., BONGIOVANNI, M., & DALMASSO, A. 1993. Stable virulence against the tomato resistance Mi gene in the parthenogenetic root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology*, 83(8): 803-812.
- CASTAGNONE-SERENO, P., DANCHIN, E. G., PERFUS-BARBEOCH, L., & ABAD, P. 2013. Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: new insights from the genomic era. *Annual Review of Phytopathology*, 51: 203-220.
- CASTAGNONE-SERENO, P., ESPARRAGO, G., ABAD, P., LEROY, F. & BONGIOVANNI, M. 1995. Satellite DNA as a target for PCR-specific detection of the plant-parasitic nematodes *Meloidogyne hapla*. *Current Genetics* 28:566-570.
- CASTAGNONE-SERENO, P., PIOTTE, C., ABAD, P., BONGIOVANNI, M. & DALMASSO, A. 1991. Isolation of a repeated DNA probe showing polymorphism among *Meloidogyne incognita* populations. *Journal of Nematology* 23:316-320.
- CASTAGNONE-SERENO, P., SKANTAR, A. & ROBERTSON, L. 2011. Molecular tools for diagnostics. In: Jones, J., Gheysen, G. & Fenoll, C. (eds). *Genomics and Molecular Genetics of Plant Nematode-Interactions*. Springer, London, UK. p.443-464.
- CASTAGNONE-SERENO, P., VANLERBERGHE-MASUTTI, F. & LEROY, F. 1994. Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers. *Genome* 37:904-909.

- CENIS, J.L. 1993. Identification of four major *Meloidogyne* spp. by Random Amplified Polymorphic DNA (TAPD-PCR). *Phytopathology* 83:76-78.
- COFCEWICZ, E.T., CARNEIRO, R.M.D.G., CASTAGNONE-SERENO, P. & QUÉNÉHERVÉ, P. 2004. Enzyme phenotypes and genetic diversity of root-knot nematodes parasitizing *Musa* in Brazil. *Nematology* 6:85-95.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. 2014 http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_08_07_08_59_54_boletim_graos_agosto_2014. Consultado em 20/03/2017.
- CORREA, V.R., DOS SANTOS, M.F.A., ALMEIDA, M.R.A., PEIXOTO, J.R., CASTAGNONE-SERENO, P. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2013. Species-specific DNA markers for identification of two root-knot nematodes of coffee: *Meloidogyne arabicida* and *M. izalcoensis*. *European Journal of Plant Pathology* 137(2):305-313.
- CORREA, V.R., MATTOS, V.S., ALMEIDA, M.R.A., SANTOS, M.F.A., TIGANO, M.S., CASTAGNONE-SERENO, P. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2014. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* and development of a species-specific SCAR marker for its diagnosis. *Plant Pathology* 63(2):476-483.
- COYNE, D.L. & PLOWRIGHT, R.A. 2000. *Heterodera sacchari*: field population dynamics and damage to upland rice in Cote d'Ivoire. *Nematology* 2:541-50
- CURRAN, J. & WEBSTER, J.M. 1987. Identification of nematodes using restriction fragment length differences and species-specific DNA probes. *Canadian Journal of Plant Pathology* 9:162-166.
- CURRAN, J., BAILLIE, D.L. & WEBSTER, J.M. 1985. Use of restriction fragment length differences in genomic DNA to identify nematode species. *Parasitology* 90:137-144.
- CURRAN, J., MACCLURE, M.A. & WEBSTER, J.M. 1986. Genotypic differentiation of *Meloidogyne* populations by detection of restriction fragment length difference in total DNA. *Journal of Nematology* 18:83-86.

- CURTIS, R.H., ROBINSON, A.F. & PERRY, R.N. 2009. Hatch and host location. In: Perry, R.N., Moens, M., Starr, J.L. Root-knot nematodes. CAB International, Wallingford, UK. p.139-162.
- DALMASSO, A. & BERGÉ, J.B. 1978. Molecular polymorphism and phylogenetic relationship in some *Meloidogyne* spp.: Application to the taxonomy of *Meloidogyne*. *Journal of Nematology* 10:323.
- DE LEY, P. & BLAXTER, M. 2002. Systematic position and phylogeny. In: Lee, D.L. The biology of nematodes. CRC Press, Boca Raton, USA. pp.1-30.
- DE WAELE, D. & ELSEN, A. 2007. Challenges in tropical plant nematology. *Annual Review of Phytopathology* 45:457-485.
- DIMKPA, S.O.N., LAHARI, Z., SHRESTHA, R., DOUGLAS, A., GHEYSEN, G. & PRICE, A.H. 2015. A genome-wide association study of a global rice panel reveals resistance in *Oryza sativa* to root-knot nematodes. *Journal of Experimental Botany* 37:1191–1200.
- EISENBACK, J.D. & HUNT, D.J. 2009. General morphology. In: Perry, R.N., Moens, N., & Starr, J.L. (eds). Root-knot Nematodes. CABI, Cambridge, USA. p.18-54.
- EISENBACK, J.D. & TRIANTAPHYLLOU, H.H. 1991. Root-knot nematode: *Meloidogyne* sp. and races. In: Nickle, W. R. (ed.) *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker. New York, USA. p.191-274.
- EISENBACK, J.D. 1985a. Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: Sasser, J.N., & Carter, C.C. (eds). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. v.1: Biology and Control. North Carolina State University Graphics. Raleigh, USA. p.95–112.
- EISENBACK, J.D. 1985b. Detailed morphology and anatomy of second-stage juveniles, males and females of the genus *Meloidogyne* (root-knot nematodes). In: Carter, C.C., & Sasser, J.N.(eds). *An advanced treatise on Meloidogyne*. v.1. Biology and Control, North Carolina State University Graphics. Raleigh. USA.p. 47-77.

- EISENBACK, J.D. 1985c. Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. In: Carter, C.C., & Sasser, J.N. (eds). An advanced treatise on *Meloidogyne*. v.2. Methodology, North Carolina State University Graphics. Raleigh, USA. p.79-105.
- ESBENSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida). *Journal of Nematology* 17:6-20.
- ESBENSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 22:10-15.
- ESSER, R.P., PERRY, V.G. & TAYLOR, A.L. 1976. "A diagnostic compendium of the genus *Meloidogyne* (Nematoda: Heteroderidae). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 43:138-150.
- FANELLI, E., COTRONEO, A., CARISIO, L., TROCCOLI, A., GROSSO, S., BOERO, C. & DE LUCA, F. 2017. Detection and molecular characterization of the rice root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, doi:10.1007/s10658-017-1196-7.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014. Database. <http://www.fao.org/faostat/>. Consultado em 20/03/2017.
- FARGETTE, M. 1987. Use of the esterase phenotype in the taxonomy of the genus *Meloidogyne*. 2. Esterase phenotypes observed in West African populations and their characterization. *Revue de Nématologie* 10:45-55.
- FARGETTE, M., LOLLIER, V., PHILLIPS, M., BLOK, V., & FRUTOS, R. 2005. AFLP analysis of the genetic diversity of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*, major agricultural pests. *Comptes Rendus Biologies*, 328(5): 455-462.
- FASKE, T.R. & STARR, J.L. 2009. Reproduction of *Meloidogyne marylandi* and *M. incognita* on several Poaceae. *Journal of Nematology* 41(1):2.
- FASSULIOTIS, G. 1985. "The role of the nematologist in the development of resistant cultivars". In: Sasser, J.N., & Carter, C.C. (eds.). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*,

Vol. I. Biology and Control. North Carolina State University Graphics, Raleigh, USA. p.233–240.

FERRAZ, L.C.C.B. & MONTEIRO, A.R. 1995. Nematoides. In: Bergamim Filho, A., Kimati, H., & Amorim, L. (eds.). Manual de Fitopatologia, v.1. 3ª ed. Princípios e conceitos. Editora Agronômica, Ceres, Brasil p.168-201.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª edição. Embrapa-Cenargen, Brasília, Brasil. 220p.

FOURIE, H., ZIJLSTRA, C. & MCDONALD, H. 2001. Identification of root-knot nematode species occurring in South Africa using the SCAR-PCR technique. *Nematology* 3:675-680.

FRANKLIN, M.T. 1965. A root-knot nematode, *Meloidogyne naasi* n. sp., on field crops in England and Wales. *Nematologica* 11:79–86.

FREITAS, L.G., OLIVEIRA, R.D.L. & FERRAZ, S. 2006. Introdução à Nematologia. 3ª ed. UFV, Viçosa, Brasil. 83p.

GARRIS, A.J., TAI, T.H., COBURN, J., KRESOVICH, S. & MCCOUCH, S. 2005. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics* 169:1631–1638.

GAUR, H.S., & SHARMA, S.N. 1998. Studies on the host range of the root-knot nematode, *Meloidogyne triticoryzae*, among cultivated crops and weeds. *Annals of Plant Protection Sciences* 6(1):41-47.

GAUR, H.S., BEANE, J. & PERRY, R.N. 2000. The influence of root diffusate, host age and water regimes on hatching of the root-knot nematode, *Meloidogyne triticoryzae*. *Nematology* 2(2):191-199.

GAUR, H.S., SAHA, M. & KHAN, E. 1993. *Meloidogyne triticoryzae* sp. n. (Nematoda: Meloidogynidae) a root-knot nematode damaging wheat and rice in India. *Annals of Plant Protection Sciences* 1(1):18-26.

GHEYSEN, G., & JONES, J. T. 2006. Molecular aspects of plant-nematode interactions. In: Perry, R.N. & Moens, M. *Plant Nematology*. CABI, Wallingford. p. 234-254.

- GLASZMANN, J.C. 1987. Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theoretical and Applied Genetics* 74:21–30.
- GOLDEN, A.M. & BIRCHFIELD, W. 1965. *Meloidogyne graminicola* (Heteroderidae), a new species of root-knot nematode from grass. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 32:228-231.
- GOLDEN, A.M. & BIRCHFIELD, W. 1968. Rice root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* as a new pest of rice. *Plant Disease Reporter* 52:423.
- GOMES, C.B., STEFFEN, R.B. & ANTONIOLLI, Z.I. 2009. Levantamento do nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em arroz irrigado na região Sul do Brasil. (Embrapa Clima Temperado. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 87). Pelotas: Embrapa Clima Temperado p.15.
- HARTMAN, K.M. & SASSER, J.N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: Barker, K.R., Carter, C.C. & Sasser, J.N. (eds). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. v.2.: Methodology. North Carolina State University Graphics. Raleigh. NC. U.S.A. p. 69–77.
- HERNANDEZ, A., FARGETTE, M. & SARAH, J.L. 2004. Characterisation of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) from coffee plantations in Central America and Brazil. *Nematology* 6(2):193-204.
- HEWEZI, T. & BAUM, T.J. 2015. Gene silencing in nematode feeding sites. In: Escobar, C & Fenoll, C. ((eds). *Advances in botanical research: plant nematode onteractions*, vol. 73. Elsevier, Oxford, UK. p.221–239.
- HIATT, E.E., GEORGIT, L., HUSTON, S., HARSHMAN, D.C., LEWIS, S.A. & ABBOTT, A.G. 1995. Intra- and inter- population genome variation in *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology* 27:143-152.
- HIRSCHMANN, H. 1985. The genus *Meloidogyne* and morphological characters differentiating its species. In: Sasser, J.N., & Carter, C.C. (eds). *An advanced treatise on Meloidogyne*, v. 1. *Biology and Control*. North Carolina State University Graphics, Raleigh, USA. p.79-93.

- HOLLIS, J.P., KEOBOONRUENG S. 1984. Nematode parasites of rice. In: Plant and Insect Nematodes, Dekker, New York, USA. pp. 95–145
- HTAY, C., PENG, H., HUANG, W., KONG, L., HE, W., HOLGADO, R. & PENG, D. 2016. The development and molecular characterization of a rapid detection method for rice root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*). European Journal of Plant Pathology 146(2):281-291.
- HUANG, C.S. & MAGGENTI, A.R. 1969. Mitotic aberrations and nuclear changes of developing giant cells in *Vicia faba* caused by root knot nematode *Meloidogyne javanica*. Phytopathology 59(4):447.
- HUANG, X., KURATA, N., WANG, Z. X., WANG, A., ZHAO, Q., ZHAO, Y *et al.* (2012). A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice. Nature 490(7421):497.
- HUNT, D.J. & HANDOO, Z.A. 2009. Taxonomy, identification and principal species. In: Perry, R.N., Moens, N., & Starr, J.L. (eds). Root-knot Nematodes. CABI, Cambridge, USA. p.55-97.
- IRRI: International Rice Research Institute (IRRI). 2014. World Rice Statistics Online <http://ricestat.irri.org>. Consultado em 20/03/2017.
- JANATI, A.A., BERGÉ, A., TRIANTAPHYLLOU, A.C. & DALMASSO, A. 1982. Nouvelles données sur l'utilisation des isoestérases pour l'identification des *Meloidogyne*. Revue de Nématologie 5:147-154.
- JENA, R.N. & RAO, Y.S. 1976. Nature of root-knot (*Meloidogyne graminicola*) resistance in rice (*Oryza sativa*). Isolation of resistant varieties. Proceedings of the Indian Academy of Sciences. 83:177–184.
- JEPSON, S.B. 1987. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). CABI, Wallingford, UK. p.265
- JEYAPRAKASH, A., TIGANO, M.S., BRITO, J., CARNEIRO, R.M.D.G. & DICKSON, D.W. 2006. Differentiation of *Meloidogyne floridensis* from *M. arenaria* using high-fidelity PCR amplified mitochondrial AT-rich sequences. Nematropica 36:1-12.

- JONES, C.J., EDWARDS, K.J., CASTGNONE-SERENO, P., WINFIELD, M.O., SALA, F., VAN DE WIEL, C., BREDEMEIJER, G., VOSMAN, B., MATTHES M., BRETTSCHEIDER, A., BETTINI, R., BUIATTI, M., MAESTRI, E., MALCEVSCHI, A., MARMIROL, I.N., AERT, R., VOLCKAERT, G., RUEDA, J., LINACERO, R., VAZQUEZ, A. & KARP, A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3:381-390.
- KARSSSEN, G. & MOENS, M. 2009. Root-knot nematodes. In: Perry, R.L., & Moens, M. (eds). *Plant Nematology*. CABI North America Office. Cambridge. MA. p.59-90.
- KARSSSEN, G. & VAN AELST, A.C. 2001. Root-knot nematode perineal pattern development: a reconsideration. *Nematology*, 3(2):95-111.
- KEARNEY, M.R. 2003. Why is sex so unpopular in the Australian desert? *Trends in Ecology & Evolution* 18:605–607.
- KHUSH, G.S. 1997. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. In: Sasaki, T. & Moore, G (eds). *Oryza: From molecule to plant*. Springer. The Netherlands. p. 25-34.
- KIKUCHI, T., AIKAWA, T., OEDA, Y., KARIM, N. & KANZAKI, N. 2009. A rapid and precise diagnostic method for detecting the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathology* 99:1365–1369. doi: 10.1094/ phyto-99-12-1365.
- KINH, D.N., HUONG, N.M. & UT, N.V. 1982. Root-knot disease of rice in the Mekong Delta, Vietnam. *International Rice Research Newsletter* 7(4).
- KLEYNHANS, K.P.N. 1991. The root-knot nematodes of South Africa. Department of Agricultural Development, Pretoria, South Africa. p. 61
- KONDRASHOV, A.S. 1993. Classification of hypothesis on the advantages of amphimixis. *Journal of Heredity* 84:372–387.
- LEE, D. *et al.* 2015. Clinical evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid. *PLoS One* 10, e0122922. doi: 10.1371/journal.pone.0122922.

- LIAO, J., & FENG, Z. 1995. A root-knot nematode *Meloidogyne hainanensis* sp. nov.(Nematoda: Meloidogynidae) parasitizing rice in Hainan, China. *Journal of South China Agricultural University*, 16(3), 34-39.
- LIN, B., WANG, H., ZHUO, K. & LIAO, J. 2016. Loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Tylenchulus semipenetrans* in Soil. *Plant Disease* 100:877–883. doi: 10.1094/PDIS-07-15-0801-RE
- LÓPEZ, R. 1984. *Meloidogyne salasi* sp. n. (Nematoda: Meloidogynidae), a new parasite of rice (*Oryza sativa* L.) from Costa Rica and Panama. *Turrialba*, 34(3), 275-286
- LORDELLO, A.I.L. & LORDELLO, R.R.A. 1996. Identificação de raças de *Meloidogyne incognita* associada a algumas plantas. *Summa Phytopathologica* 22:43-45
- LORDELLO, R.R.A. & FAZUOLI, L.C. 1980. *Meloidogyne decalineata* in coffee roots from São Tomé Island (Africa). *Revista de Agricultura* 55(4).
- LUC, M & MERNY, G. 1963. *Heterodera sacchari* n. sp. (Nematoda:Tylenchoidea) parasite de la canne sucre au Congo-Brazzaville. *Nematologica* 9:31–37.
- MAAS, P.T., SANDERS, H. & DEDE, J. 1978. *Meloidogyne oryzae* n. sp. (Nematoda, Meloidogynidae) infesting irrigated rice in Surinam (South America). *Nematologica* 24(3):305-311.
- MACGOWAN, J.B. & LANGDON, K.R. 1989. Hosts of the rice root-knot nematode *Meloidogyne graminicola*. *Nematology Circular* 172, Florida Dept of Agriculture & Consumer Services.
- MAGALHÃES JR, A.M., TERRES, A.L., FAGUNDES, P.R., FRANCO, D.F. & ANDRES, A. 2004. Capítulo 6: Aspectos genéticos, morfológicos e de desenvolvimento de plantas de arroz irrigado. In: Gomes, A. da S., & Magalhães Jr., A.M. de (eds). *Arroz irrigado no Sul do Brasil*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, Brasil. p.899.
- MAGGENTI, A.R. 1981. "Nematodes: development as plant parasites." *Annual Reviews in Microbiology* 35(1):135-154.

- MANSER, P.D. 1971. Notes on the rice root-knot nematode in Laos. *FAO Plant Protection Bulletin* 19(6): 138-139.
- MATSUO, T., FUTSUHARA, Y., KIKUCHI, F. & YAMAGUCHI, H. 1997. *Science of the rice plant*. Food and Agriculture Policy Research Center. Tokyo.
- MAYNARD SMITH, J. 1978. *The evolution of sex*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- MCCLURE, M.A., NISCHWITZ, C., SKANTAR, A.M., SCHMITT, M.E. & SUBBOTIN, S.A. 2012. Root-knot nematodes in golf course greens of the western United States. *Plant Disease* 96(5):635-647.
- MCLAIN, D.K.O., RAI, K.S. & FRASER, J.M. 1987. Intraespecific and interspecific variation in the sequence and abundance of highly repeated DNA among mosquitoes of the *Aedes albopictus* subgroup. *Heredity* 58:373-381.
- MCNALLY, K.L., CHILDS, K.L., BOHNERT, R., DAVIDSON, R.M., ZHAO, K. *et al.* 2009. Genomewide SNP variation reveals relationships among landraces and modern varieties of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:12273–12278.
- MEDINA A., CROZZOLI, R., PERICHI, G. & JÁUREGUI, D. 2011. *Meloidogyne salasi*. (Nematoda: Meloidogynidae) on rice in Venezuela. *Fitopatología Venezolana*. 24: 46-53.
- MEDINA, A., CROZZOLI, R. & PERICHI, G. 2009. Nematodos fitoparásitos asociados a los arrozales en Venezuela. *Nematologia Mediterranea* 37(1): 59-66.
- MENG, Q.P., LONG, H. & XU, J.H. 2004. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. *Acta Phytopathologica Sinica* 34:204–210.
- MERCER, C.F., STARR, J.L. & MILLER, K.J. 1997. Host-parasite relationships of *Meloidogyne trifoliophila* isolates from New Zealand. *Journal of Nematology* 29(1):55.
- MIENIE, C.M.S., FOURIE, H., SMIT, M.A., VAN STADEN, J. & BOTHA, F.C. 2002. Identification of AFLP markers in soybean linked to resistance to *Meloidogyne javanica*

and conversion to sequence characterized amplified regions (SCARs). *Plant Growth Regulation* 37:157-166.

- MOENS, M., PERRY, R.N. & STARR, J.L. 2009. *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: Perry, R.N., Moens, M. & Starr, J.L. (eds). Root-knot nematodes. CABI, Cambridge, USA. p. 1-17.
- MORISHIMA, H. 1994. Investigations of plant genetic resources in the Amazon basin with the emphasis on the genus *Oryza*. Monbusho International Scientific Research Program/FAPESP.
- MOURA, R.M. 1996. Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. Revisão Anual de Patologia de Plantas 4:209-245.
- MUNIZ, M.F.S., CAMPOS, V.P., CASTAGNONE-SERENO, P., CASTRO, J.M.C., ALMEIDA, M.R.A. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2008. Diversity of *Meloidogyne exigua* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations from coffee and rubber tree. *Nematology* 10(6):897-910.
- NDJIONDJOP, M. N., SEMAGN, K., SIE, M., CISSOKO, M., FATONDI, B., & JONES, M. 2008. Molecular profiling of interspecific lowland rice populations derived from IR64 (*Oryza sativa*) and Tog5681 (*Oryza glaberrima*). *African Journal of Biotechnology* 7: 4219–4229.
- NEGRETTI, R. R., GOMES, C. B., MATTOS, V. S., SOMAVILLA, L., MANICA-BERTO, R., AGOSTINETTO, D., CASTAGNONE-SERENO, P., & CARNEIRO, R.M.D.G. 2017. Characterization of a *Meloidogyne* species complex parasitizing rice in southern Brazil. *Nematology*, 19(4), 403-412
- NIU, J.H. et al. 2011. Rapid detection of *Meloidogyne* spp. by LAMP assay in soil and roots. *Crop Protection* 30:1063–1069. doi: 10.1016/j. Cropro.2011.03.028
- NIU, J.H., JIAN, H., GUO, Q.X. & GUO Y.D. 2012. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays based on 5S rDNAIGS2 regions for detecting *Meloidogyne enterolobii*. *Plant Pathology* 61, 809–819, doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02562.x

- NOIR, S., ANTHONY, F., BERTRAND, B. & COMBES, M.C. 2003. Identification of a major gene (Mex-1) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. *Plant Pathology* 52:97-103.
- NORMILE, D. 2004. Yangtze seen as earliest rice site. *Science* 275:309.
- NOTOMI, T., OKAYAMA, H., MASUBUCHI, H., YONEKAWA, T., WATANABE, K., AMINO, N., & HASE, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), e63-e63.
- NYCZEPIR, A.P. & THOMAS, S.H. 2009. Current and future management strategies in intensive crop production systems. In: Perry, R.N., Moens, M. & Starr, J.L. (eds). *Root-knot nematodes*. CABI, Cambridge, p. 412-435.
- OKA, Y., KARSSSEN, G. & MOR, M. 2003. Identification, host range and infection process of *Meloidogyne marylandi* from turf grass in Israel. *Nematology* 5(5):727-734.
- OLIVEIRA, G.C.X. 1994. Geographic distribution of wild *Oryza* species in Brazil. In: Morishima, H., & Martins, P.S. (eds). *Investigations of plant genetic resources in the Amazon basin with emphasis on the genus Oryza: Report of 1992/93 Amazon Project*. The Monbusho International Scientific Research Program. Japan. and FAPESP. Brazil. p.10–15.
- OLIVEIRA, S.A. 2015. Ocorrência de *Meloidogyne graminis* em grama no Estado de São Paulo / Samara Azevedo de Oliveira. – Botucatu : [s.n.]
- ORION, D. & KRITZMAN, G. 1991. Antimicrobial activity of *Meloidogyne javanica* gelatinous matrix. *Revue de Nématologie* 14(4):481-483.
- PADGHAM, J.L., DUXBURY, J.M., MAZID, A.M., ABAWI, G.S. & HOSSAIN, M. 2004. Yield loss caused by *Meloidogyne graminicola* on lowland rainfed rice in Bangladesh. *Journal of Nematology* 36:42-48.
- PARAN, I. & MICHELMORE, R.W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85:985-993.

- PECK, J.R., YEARSLEY, J.M. & WAXMAN, D. 1998. Explaining the geographic distribution of sexual and asexual populations. *Nature* 391:889–892.
- PENG, H. *et al.* 2012. Loop-mediated isothermal amplification for rapid and precise detection of the burrowing nematode, *Radopholus similis*, directly from diseased plant tissues. *Nematology* 14:977–986. doi: 10.1163/156854112X638415
- PENG, H. *et al.* 2017. Rapid, simple and direct detection of *Meloidogyne hapla* from infected root galls using loop-mediated isothermal amplification combined with FTA technology. *Scientific Reports*, 7
- PERRY, R.N., SUBBOTIN, S.A. & MOENS, M. 2007. Molecular diagnostics of plant-parasitic nematodes. In: Punja, Z., De Boer, S.H. & Sanfaçon, H. (eds). *Biotechnology and Plant Disease Management*. CABI, Wallingford, UK. p.195-226.
- PLOWRIGHT, R. & BRIDGE, J. 1990. Effect of *Meloidogyne graminicola* (Nematoda) on the establishment, growth and yield of rice cv IR36. *Nematologica*, 36(1):81-89.
- PLOWRIGHT, R.A., COYNE, D.L., NASH, P. & JONES, M.P. 1999. Resistance to the rice nematodes *Heterodera sacchari*, *Meloidogyne graminicola* and *M. incognita* in *Oryza glaberrima* and *O. glaberrima* × *O. sativa* interspecific hybrids. *Nematology* 1:745–751.
- POKHAREL, R.R., ABAWI, G.S., DUXBURY, J.M., SMAT, C.D., WANG, X. & BRITO, J.A. 2010. Variability and the recognition of two races in *Meloidogyne graminicola*. *Australasian Plant Pathology* 39(4):326-333.
- POKHAREL, R.R., ABAWI, G.S., ZHANG, N., DUXBURY, J.M. & SMART, C.D. 2007. Characterization of isolates of *Meloidogyne* from rice-wheat production fields in Nepal. *Journal of Nematology* 39(3):221-230.
- POLLEY, S.D. *et al.* 2013. Clinical evaluation of a LAMP test kit for diagnosis of imported malaria. *The Journal of infectious diseases*, 208(4), 637-644.
- PORTÈRES, R. 1976. African cereals: *Eleusine*, fonio, black fonio, teff, *Brachiaria*, *Paspalum*, *Pennisetum*, and African rice. In: Harlan, J.R., De Wet, J.M.J. & Stemler, A.B.L. (eds). *Origins of African plant domestication*. Mouton Press. The Hague. p.409–452.

- PORTILLO, M., CABRERA, J., LINDSEY, K., TOPPING, J., ANDRES, M.F., EMILIOZZI, M., OLIVEROS, J.C., GARCIA-CASADO, G., SOLANO, R., KOLTAI, H. *et al.* 2013. Distinct and conserved transcriptomic changes during nematode-induced giant cell development in tomato compared with *Arabidopsis*: a functional role for gene repression. *New Phytologist* 197: 1276–1290.
- POWERS, T. 2004. Nematode molecular diagnostic. *Annual Review of Phytopathology* 42:367-383.
- POWERS, T.O. & HARRIS, T.S. 1993. A polymerase chain reaction method for the identification of five major *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 25:1–6.
- PRASAD, J.S., VIJAYAKUMAR, C.H.M., SANKAR, M., VARAPRASAD, K.S., PRASAD, M.S. & RAO, Y.K. 2006. Root-knot nematode resistance in advanced back cross populations of rice developed for water stress conditions. *Nematologia Mediterranea* 34:3–8.
- PROT, J.C. & MATIAS, D.M. 1995. Effects of water regime on the distribution of *Meloidogyne graminicola* and other root-parasitic nematodes in a rice field toposequence and pathogenicity of *M. graminicola* on rice cultivar UPL R15. *Nematologica* 41:219-228.
- RAMSAY, K., WANG, Z. & JONES, M.G. 2004. Using laser capture microdissection to study gene expression in early stages of giant cells induced by root-knot nematodes. *Molecular Plant Pathology* 5(6):587-592.
- RANDIG, O., BONGIOVANNI, M., CARNEIRO, R.M.D.G. & CASTAGNONE-SERENO, P. 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome* 45:862-870.
- RANDIG, O., DEAU, F., DOS SANTOS, M.F., TIGANO, M.S., CARNEIRO, R.M. & CASTAGNONE-SERENO, P. 2009. A novel species-specific satellite DNA family in the invasive root-knot nematode *Meloidogyne mayaguensis* and its potential use for diagnostics. *European Journal of Plant Pathology* 125(3):485-495.

- RANGEL *et al.* 2013. Banco Ativo de Germoplasma de Arroz e Feijão : passado, presente e futuro - Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 68 p. : il. - (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9644 , 288)
- RANGEL, P.H.N. BRONDANI, C., FERREIRA, M. E., RANGEL, P. N., BRONDANI, R. P. V. 2006. Utilização de espécies silvestres *Oryza glumaepatula* no pré-melhoramento de arroz. In: LOPES, M. A., FÁVERO, A. P., FERREIRA, M. A. J. da F., FALEIRO, F. G. (eds.). Curso internacional de pré-melhoramento de plantas. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil. pp. 94-98.
- RIBEIRO, A.S., SPERANDIO, G.A.D. & SELISTRE, J.F.D. 1984. Novo nematoide ataca o arroz no RS. Revista Lavoura Arrozeira 37:6-7.
- ROBERTS, P.A. 1995. Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance. Annual Review of Phytopathology 33:199.
- SAKAI, H., IKAWA, H., TANAKA, T., NUMA, H., MINAMI, H., FUJISAWA, M., *et al.* 2011. Distinct evolutionary patterns of *Oryza glaberrima* deciphered by genome sequencing and comparative analysis. Plant Journal 66:796–805.
- SÁNCHEZ, E. & ESPINOZA, A.M. 2005. Ultrastructure of *Oryza glumaepatula*, a wild rice species endemic of tropical America. Revista de Biología Tropical 53(1-2):15-22.
- SANCHO, C. & SALAZAR, L. 1985. Nematodos parásitos del arroz (*Oriza sativa* L.) en el sureste de Costa Rica. Agronomía Costarricense 9(2):161-163.
- SANTOS, M.F.A., FURLANETTO, C., CARNEIRO, M.D.G., ALMEIDA, M.R.A., MOTA, F.C., GOMES, A.C.M.M., SILVEIRA, N.O.R., SILVA, J.G.P., CASTAGNONE-SERENO, P., TIGANO, M.S. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2012. Biometrical, biological, biochemical and molecular characteristics of *Meloidogyne incognita* isolates and related species. European Journal of Plant Pathology 134:671–684.
- SARLA, N. & SWAMY, B.M. 2005. *Oryza glaberrima*: a source for the improvement of *Oryza sativa*. Current Science-Bangalore 89(6):955.
- SASSER, J.N. & CARTER, C.C. 1982. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.): identification, morphological and physiological variation, host-range, ecology, and control.

In: Riggs, R.D. (ed). Nematology in the Southern Region of the United States. Southern Cooperative Series Bulletin 276. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville. USA. p.21–32.

SASSER, J.N., EISENBACK, J.D. & CARTER, C.C. 1983. The International *Meloidogyne* Project – its goals and achievements. *Annu Review of Phytopathology* 21:271–288.

SCHAFF, J.E., NIELSEN, D.M., SMITH, C.P., SCHOLL, E.H. & BIRD, D.M. 2007. Comprehensive transcriptome profiling in tomato reveals a role for glycosyltransferase in Mi-mediated nematode resistance. *Plant Physiology* 144(2):1079-1092.

SCHAFF, J.E., NIELSEN, D.M., SMITH, C.P., SCHOLL, E.H., BIRD, D.M. 2007. Comprehensive transcriptome profiling in tomato reveals a role for glycosyltransferase in Mi-mediated nematode resistance. *Plant Physiology* 144: 1079–1092.

SECOND, G. 1982. Origin of the genic diversity of cultivated rice (*Oryza* spp.): study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. *Japanese Journal of Genetics* 57:25–57.

SECOND, G. 1984. Relations, evolutives chez le genre *Oryza* et processus de domestication des riz. Etude Set Theses, ORSTOM, Paris, France.

SEGEREN, H.A. & SANCHIT, M.L. 1984. Observations on *Meloidogyne oryzae* Maas, Sanders and Dede 1978 in irrigated rice in Suriname. *Surinaamse Landbouw* 32(2):51-59.

SEMBLAT, J.P., WAJNBERG, E., DALMASSO, A., ABAD, P. & CASTAGNONE-SERENO, P. 1998. High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis. *Molecular Ecology* 7:119-125.

SILVA, E. H. da, MATTOS, V. da S., FURLANETO, C., GIBAND, M., BARROSO, P. A. V., MOITA, A. W., JORGE JUNIOR, A., CORREA, V. R., CASTAGNONE-SERENO, P., CARNEIRO, R. M. D. G. 2014. Genetic variability and virulence of *Meloidogyne incognita* populations from Brazil to resistant cotton genotypes. *European Journal of Plant Pathology* 139(1):195-204.

- SKANTAR, A.M. & CARTA, L.K. 2005. Multiple displacement amplification (MDA) of total genomic DNA from *Meloidogyne* spp. and comparison to crude DNA extracts in PCR of ITS1, 28S D2-D3 rDNA and Hsp90. *Nematology* 7(2): 285-293
- SMANT, G. & JONES, J. 2011. Suppression of plant defences by nematodes. In: Jones,, J., Gheysen,, G., Fenoll,, C.((eds). *Genomics and molecular genetics of plant–nematode interactions*. Springer, Dordrecht, the Netherlands. p. 273–286.
- SOBITA, S. & ANAMIKA, A. 2011. Management of root knot disease in rice caused by *Meloidogyne graminicola* through nematophagous fungi. *Journal of Agricultural Science* 3 (1): 3122-3127.
- SORIANO, I.R., SCHMIT, V., BRAR, D.S., PROT, J.C. & REVERSAT, G. 1999. Resistance to rice root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* identified in *Oryza longistaminata* and *O. glaberrima*. *Nematology* 1:395–398.
- SORIANO, I.R.S. & REVERSAT, G. 2003. Management of *Meloidogyne graminicola* and yield of upland rice in South-Luzon, Philippines. *Nematology* 5:879-884.
- SPERANDIO, C.A. & MONTEIRO, A.R. 1991. Ocorrência de *Meloidogyne graminicola* em arroz irrigado no Rio Grande do Sul. *Nematologia Brasileira* 15:24.
- STEFFEN, R.B., ANTONIOLLI, Z.I., KIST, G.P., LUPATINI, M. & GOMES, C.B. 2007. Caracterização bioquímica do nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em lavouras de arroz irrigado na região central do Rio Grande do Sul. *Ciência e Natura* 29:37-46. <https://periodicos.ufsm.br/cienciaenatura/article/view/9746/5839>
- SUN, L., ZHUO, K., LIN, B., WANG, H. & LIAO, J. 2014. The complete mitochondrial genome of *Meloidogyne graminicola* (Tylenchina): a unique gene arrangement and its phylogenetic implications. *Plos One* 9(6), e98558.
- SWEENEY, M. & MCCOUCH, S. 2007. The complex history of the domestication of rice. *Annals of Botany* 100(5):951-957.
- TATEOKA, T. 1963. Taxonomic studies of *Oryza* III. Key to the species and their enumeration. *The Botanical Magazine* 76:165-173.

- TAYLOR, A.L. & SASSER, J.N. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Coop. Publ. Dept. Plant Pathology. North Carolina State University Graphics, Raleigh, USA. p.111.
- TAYLOR, A.L., DROPKIN, V.H. & MARTIN, G.C. 1995. Perineal patterns of root-knot nematodes. *Phytopathology* 45:26–34.
- TIGANO, M.S., CARNEIRO, R.M., JEYAPRAKASH, A., DICKSON, D.W. & ADAMS, B. J. 2005. Phylogeny of *Meloidogyne* spp. based on 18S rDNA and the intergenic region of mitochondrial DNA sequences. *Nematology* 7(6):851-862.
- TRIANANTAPHYLLOU, A.C. 1962. Oogenesis in the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematologica* 7:105–113.
- TRIANANTAPHYLLOU, A.C. 1963. Polyploidy and parthenogenesis in the root-knot nematode *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Morphology* 113:489–500.
- TRIANANTAPHYLLOU, A.C. 1966. Polyploidy and reproductive patterns in the root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. *Journal of Morphology* 118(3):403-413.
- TRIANANTAPHYLLOU, A.C. 1969. Gametogenesis and the chromosomes of two root-knot nematodes, *Meloidogyne graminicola* and *M. naasi*. *Journal of Nematology* 1(1):62.
- TRIANANTAPHYLLOU, A.C. 1981. Oogenesis and the chromosomes of the parthenogenetic root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 13:95–104.
- TRIANANTAPHYLLOU, A.C. 1983. Cytogenetic aspects of nematode evolution. In: Stone, A.R., Platt, H.M., & Khalil, L.F. (eds). *Concepts in Nematode Systematics*. Academic Press. London. p.55–71.
- TRIANANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Cytogenetics, cititaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. In: Carter, C.C., & Sasser, J.N. (eds.). *An advanced treatise on Meloidogyne*, vol. 1, Biology and control. North Carolina State University Graphics, Raleigh, USA. p.113–126.

- TRUDGILL, D.L. & BLOK, V.C. 2001. Apomictic, polyphagous rootknotnematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 39:53–77.
- TRUDGILL, D.L. 1991. Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. *Annual Review of Phytopathology* 29:167.
- TRUDGILL, D.L. 1997. Parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.), how can these biotrophic endoparasites have such an enormous host range? *Plant Pathology* 46(1):26-32.
- TSAI, S.M. ET AL. 2012. Rapid and sensitive detection of infectious bursal disease virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Journal of Virological Methods* 181:117–124, doi: 10.1016/j.jviromet.2011.09.002
- USDA U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. 2015. USDA Data base <https://apps.fas.usda.gov/>. Consultado em 20/03/2017.
- USHAKUMARI, A & KURIYAN, A.J. 1982. Cyst nematode *Heterodera oryzae* on rice in Kerala: estimation of losses. *Indian Journal Nematology* 11:106.
- VAN DER BEEK, J.G., LOS, J.A. & PIJNACKER, L.R. 1998. Cytology of parthenogenesis of five *Meloidogyne* species. *Fundamental and Applied Nematology* 21 (4):393-399.
- VAUGHAN, D.A., MORISHIMA, H. & KADOWAKI, K. 2003. Diversity in the *Oryza* genus. *Current Opinion in Plant Molecular Biology* 6:139–146.
- WHITEHEAD, A.G. 1968. Taxonomy of *Meloidogyne* (Nematoda: Heteroderidae) with descriptions of four new species. *Transactions of the Zoological Society of London* 31: 263–401.
- WIGGERS, R.J., STARR, J.L. & PRICE, H.J. 1990. DNA content and variation in chromosome number in plant cells affected by *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Phytopathology* 80 (12):1391-1395.

- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.
- XU, J., LIU, P., MENG, Q. & LONG, H. 2004. Characterisation of *Meloidogyne* species from China using isozyme phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. *European Journal of Plant Pathology* 110(3):309-315.
- YANG, B., HU, B. & XU, K. 1988. "A new species of root-knot nematode *Meloidogyne lini* n. sp. parasitizing rice [J]." *Journal of Yunnan Agricultural University* 1:002.
- YIK, C.P. & BIRCHFIELD, W. 1979. Host studies and reactions of cultivars to *Meloidogyne graminicola*. *Journal of Phytopathology* 69:497-499.
- ZIJLSTRA, C. 2000. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. *European Journal of Plant Pathology* 106:283-290.
- ZIJLSTRA, C., DONKERS-VENNE, D.T.H.M. & FARGETTE, M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified regions (SCAR) based PCR assays. *Nematology* 2:847-853.

