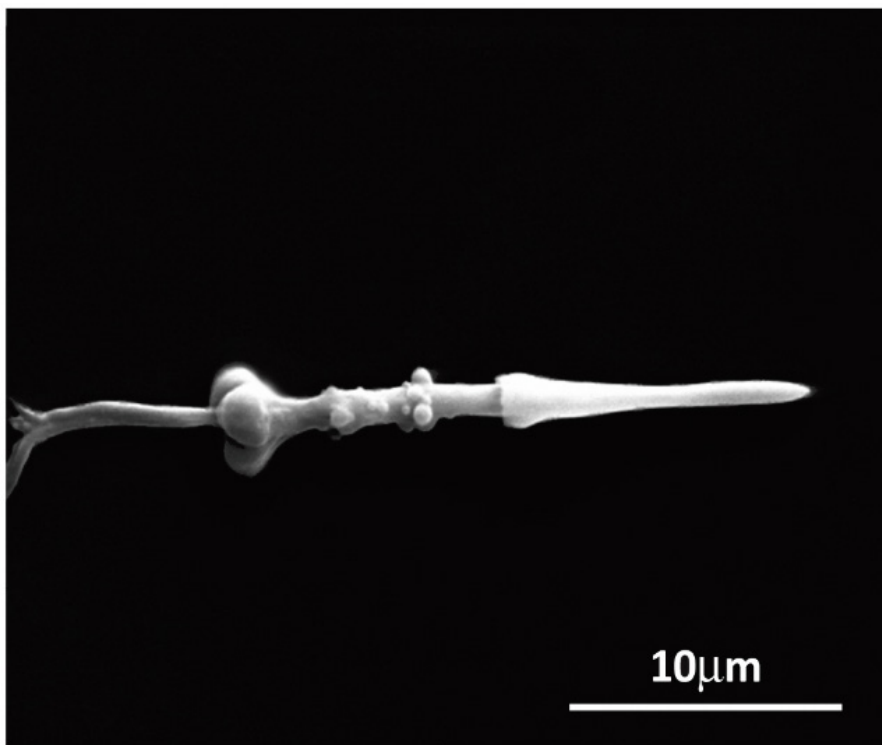


Primeira Detecção de *Meloidogyne konaensis* Parasitando Diferentes Culturas no Brasil, e Informações Adicionais Acerca da Espécie

Foto: Jessica M. S. Monteiro e Ana C. M. M. Gomes



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 320

Primeira Detecção de *Meloidogyne konaensis* Parasitando Diferentes Culturas no Brasil, e Informações Adicionais Acerca da Espécie

Jessica da Mata dos Santos Monteiro
Juvenil Enrique Cares
Ana Cristina Meneses Mendes Gomes
Vanessa da Silva Mattos
Marcilene Fernandes Almeida dos Santos
Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2016

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica – PqEB – Av. W5 Norte
Caixa Postal 02372 – Brasília, DF – Brasil – CEP: 70770-917
Fone: (61) 3448-4700 / Fax: (61) 3340-3624
Home page: <http://www.cenargen.embrapa.br/>
E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: Maria Isabela Lourenço Barbirato
Secretário-Executivo: Thales Lima Rocha
Membros: Daniela Aguiar de Souza Kols
 Lígia Sardinha Fortes
 Lucas Machado de Souza
 Márcio Martinelli Sanches
 Rosamares Rocha Galvão
Suplentes: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes
 João Batista Tavares da Silva

Revisão de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães
Normalização bibliográfica: Ana Flávia do N. Dias Côrtes
Edição eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães

1ª edição (online)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Primeira detecção de *Meloidogyne konaensis* parasitando diferentes culturas no Brasil, e informações adicionais acerca da espécie / Jessica da Mata dos Santos Monteiro... [et al.] – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2016. 40 p. : il. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 320).

1. Caracterização. 2. *Meloidogyne konaensis*. I. Monteiro, Jessica da Mata dos Santos. II. Cares, Juvenil Enrique. III. Gomes, Ana Cristina Meneses Mendes. IV. Mattos, Vanessa da Silva. V. Santos, Marcilene Fernandes Almeida dos. VI. Carneiro, Regina Maria Dechechi Gomes VII. Série.

632.65 – CDD 21

© Embrapa 2016

Sumário

Resumo	05
Abstract	07
Introdução	09
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	17
Conclusões	33
Referências Bibliográficas	34

Primeira Detecção de *Meloidogyne konaensis* Parasitando Diferentes Culturas no Brasil, e Informações Adicionais Acerca da Espécie

*Jessica da Mata dos Santos Monteiro*¹

*Juvenil Enrique Cares*²

*Ana Cristina Meneses Mendes Gomes*³

*Vanessa da Silva Mattos*⁴

*Marcilene Fernandes Almeida dos Santos*⁵

*Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro*⁶

Resumo

Em um levantamento de *Meloidogyne* spp. em diferentes culturas de 11 municípios do estado do Ceará, por meio do método de eletroforese de isoenzimas, caracterizaram-se quatro populações atípicas de *Meloidogyne*, originárias de plantas de repolho, mamão, noni e canapum, que apresentaram um perfil de esterase diferente de todos já detectados no Brasil. Estudos morfológicos mostraram características típicas de *M. konaensis*. Os padrões perineais das fêmeas são semelhantes aos de *M. arenaria* e *M. incognita*, o comprimento dos estiletos de 14-20 μm , bulbos que se fundem gradualmente com a haste do estilete, e DEGO medindo 4-7 μm , são algumas características das fêmeas. Embora os machos sejam raros, a presença de 6-12 grandes projeções na haste do estilete é o caráter mais usual na identificação dessa espécie. O padrão de esterase K3 é único e específico da espécie, com três bandas principais (Rm: 1,0, 1,17, 1,27) e uma banda secundária (Rm: 1,10). Alguns

equivocos a respeito da verdadeira identidade dessa espécie foram esclarecidos neste estudo, inclusive as suas diferenças em relação a *M. paranaensis*. Um marcador SCAR espécie-específico desenvolvido para *M. paranaensis* foi testado em *M. konaensis* e não foi observada amplificação de nenhum fragmento. Em análise Neighbour-Joining nas árvores das sequências (ITS1-ITS2 e D2-D3) do rDNA, *M. konaensis* do Ceará apareceu claramente separado de *M. paranaensis*. Testes de hospedeiras mostraram que cafeeiro (*Coffea arabica* L.) não é hospedeiro de *M. konaensis*, como foi relatado na descrição original da espécie.

Palavras-chave: gama de hospedeiros, identificação de espécie, *M. konaensis*, morfologia, taxonomia.

¹ Engenheira-agrônoma, Ph.D em Fitopatologia, bolsista pós-doc da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Engenheiro-agrônomo, Ph.D em Fitopatologia, professor titular da Universidade de Brasília.

³ Bióloga, M.Sc. em Ciências Agrárias, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁴ Engenheira-agrônoma, doutoranda em Fitopatologia da Universidade de Brasília.

⁵ Bióloga, Ph.D em Agronomia, bolsista pós-doc da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁶ Engenheira-agrônoma, Ph.D em Parasitologia, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

First Detection of *Meloidogyne konaensis* Parasiting Different Crops in Brazil, and Additional Information About the Species

Abstract

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

separated from *M. paranaensis*. Pathogenicity tests indicated that coffee is not a host of *M. konaensis* as previously reported in the original description of this species.

Keywords: host-range, *M. konaensis*, morphology, species identification, taxonomy.

Introdução

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

A identificação precisa e acurada de espécies de *Meloidogyne* baseia-se na combinação de vários métodos, como análises da morfologia e morfometria, preferência de hospedeiras (EISENBACK et al., 1981), número de cromossomos, assim como as técnicas bioquímicas e moleculares. Todas essas técnicas são muito importantes para a completa caracterização de espécies (BLOK; POWERS, 2009). Apesar de numerosos estudos acerca da sua taxonomia, a identificação de *Meloidogyne* spp. ao nível de espécie é muito difícil, até mesmo para os taxonomistas mais experientes e especializados no gênero (CARNEIRO et al., 2000; BLOK; POWERS, 2009), sendo na maioria das vezes devido a sutis variações intra e interespecíficas (JEPSON, 1987; HUNT; HANDOO, 2009).

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

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

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

Tem sido relatado que *M. konaensis* do Havaí apresenta três diferentes fenótipos de esterase Est F1 (= Est P1), Est I1 (= *M. incognita*) e Est F1I1, dependendo do hospedeiro (SIPES et al., 2005). De acordo com esses autores, apenas o isolado que apresenta o fenótipo Est F1 (= Est P1 de *M. paranaensis*) parasita café. Nessa publicação,

as comparações da morfologia entre os isolados dos três diferentes fenótipos Est F1, Est I1 e Est F1I1 (todas consideradas *M. konaensis*) são muito pobres, e não foi possível visualizar no microscópio eletrônico de varredura (MEV) a principal característica de *M. konaensis*, que é a presença de 6-12 grandes projeções em volta da haste do estilete.

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

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

Material e Métodos

População do nematoide

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

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

Estudos morfológicos e morfométricos

Os padrões perineais foram obtidos de fêmeas jovens e vivas, que foram cortadas em ácido láctico 45% e montados em glicerina (TAYLOR; NETSCHER, 1974). Fêmeas, machos, J2s e estiletos dos machos e das fêmeas foram preparados para visualização em MEV, de acordo com os métodos previamente descritos por Eisenback et al. (1986). Os espécimes já extraídos foram fixados a 4°C em glutaraldeído 2% diluído em tampão de cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7,4, por 24 h. Posteriormente, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (2%) durante 2 h. Após esse período, os espécimes foram submetidos a desidratação em série com etanol (10, 30, 50, 70, 90 e 100%), com intervalos de 15 minutos. Logo após, foram submetidos a secagem em ponto crítico para a completa eliminação do álcool. Os espécimes foram montados apoiados em fios de cabelo, dispostos previamente em *stubs* revestidos por fita-crepe dupla face.

Estudos biométricos foram conduzidos em fêmeas, machos e J2s. Machos e J2s foram mortos em formaldeído 2% resfriado (5 °C) e imediatamente medidos diretamente no microscópio óptico (MO). Estudos morfométricos foram feitos utilizando-se as medições sugeridas por Eisenback e Hunt (2009).

Para a excisão dos estiletos de fêmeas e machos, seguiu-se a metodologia descrita por Eisenback (1985a), pela qual os espécimes coletados foram colocados em lamínulas contendo ácido láctico 45%. Posteriormente foi feito um corte na região posterior ao bulbo mediano, com o auxílio de um estilete, e logo em seguida, sob microscópio invertido e auxílio de um alfinete entomológico 00, foram realizadas várias pulsões até a excisão do estilete. Após esse processo, o excesso de ácido láctico foi removido com formalina 2%. Foi inserida uma seta de papel indicando a localização do estilete a ser visualizado no MEV.

Após a metalização com 35 nm de ouro, os espécimes foram visualizados e fotografados no MEV Zeiss DSM-962. Trinta espécimes fêmeas, 30 J2s e 30 machos foram estudados com base na observação da morfologia das seguintes estruturas: região anterior (macho, fêmea e J2), cauda (J2 e macho), campo lateral e estiletos excisados (macho e fêmea) (Eisenback, 1985b). Posteriormente os estiletos excisados de machos e fêmeas foram montados nos *stubs*, metalizados com 35 nm de ouro e examinados no MEV Zeiss DSM-962.

As observações morfológicas foram realizadas também em microscopia óptica de luz em cerca de 20 espécimes de cada estágio e nos padrões perineais, montados em lâminas com glicerina.

Estudos bioquímicos e biológicos

A caracterização de isoenzimas foi feita para esterase (Est) e malato desidrogenase (Mdh) utilizando-se gel de poli(acrilamida) 7%, de acordo com Carneiro e Almeida (2001). Extratos proteicos de fêmeas de *M.*

javanica (TREUB, 1885) Chitwood, 1949, jovens e leitosas foram incluídos em cada gel como fenótipo padrão para a caracterização de esterase e malato desidrogenase. Os fenótipos de esterase foram designados pela letra sugestiva do nome da espécie do nematoide, acompanhada de um número que indica o número de bandas (ESBENSHADE; TRIANTAPHYLLOU, 1985, 1990). Estudos citológicos foram realizados com o método de coloração com Orceína-propionica, conforme descrito por Triantaphyllou (1985).

O teste de hospedeiros diferenciadores foi realizado com as seguintes plantas: algodão cv. Deltapine 61, fumo cv. NC95, pimentão cv. Early California Wonder, melancia cv. Charleston Gray, amendoim cv. Florunner e tomate cv. Rutgers (HARTMAN; SASSER, 1985). Seis plantas de café cv. Mundo Novo suscetível a *M. incognita*, *M. exigua* e *M. paranaensis* foram incluídas no teste. Cada planta foi inoculada com 5000 J2s de *Meloidogyne* sp. do Ceará ou *M. paranaensis* do Brasil, e mantidas sob condições de casa de vegetação a 25-30°C, com irrigação e adubação necessárias. Oito meses após a inoculação (para plantas de café) e três meses depois (para outras plantas), o sistema radicular foi lavado com água corrente, e os ovos foram extraídos com o emprego de uma solução de NaOCl 1% (HARTMAN; SASSER, 1985) e quantificados sob microscópio de luz utilizando-se lâminas de Peters. O fator de reprodução (FR) foi calculado como $FR = PF/PI$, onde PF = população final e PI = população inicial (PI = 5000). Foram consideradas hospedeiras susceptíveis as plantas que apresentaram $FR \geq 1$ com nota maior que 2 (mais de 11 galhas ou massas de ovos), e resistentes aquelas que apresentaram $FR \leq 1$ e nota ≤ 2 (0-10 número de galhas ou massa de ovos) (TAYLOR; SASSER, 1978).

Análises moleculares

Ovos de *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. paranaensis* e *Meloidogyne* sp. do Ceará foram extraídos de raízes de tomateiros infectadas e armazenados a -80°C até o momento do uso. Para cada população de nematoides, o DNA genômico foi extraído e purificado de alíquotas

de 200-300 μL de ovos, seguindo o procedimento clássico fenol-clorofórmio (RANDIG et al., 2002). Os ovos foram macerados em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido e recuperados em tubo Eppendorf de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 500 μL de NIB (0,1 M NaCl; 30 mM Tris pH 8; 10 mM EDTA; 0,7 mM β -mercaptoetanol; 5 mM Triton - NPHO). Após a homogeneização, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por dois minutos, e o sobrenadante foi descartado. Esta etapa foi repetida duas vezes. Em seguida, foram acrescentados 800 μL de tampão de homogeneização (0,1 M NaCl; 0,2 M sacarose; 10 mM EDTA) e 200 μL do tampão de lise (0,125 M EDTA; 0,5 M Tris pH 9,2; 2,3% SDS), os tubos foram homogeneizados e incubados em banho-maria a 55°C por 30 minutos, seguido de 10 minutos sob temperatura ambiente. A purificação foi realizada adicionando-se 1 V de fenol (1 mL), seguindo-se a homogeneização e centrifugação a 14.000 rpm por três minutos. O sobrenadante foi recuperado e depois misturado a $\frac{1}{2}$ V de fenol (0,5 mL) + $\frac{1}{2}$ V de clorofórmio (0,5 mL) e centrifugado a 14.000 rpm por três minutos. O sobrenadante foi recuperado em novo tubo, adicionando-se 200 μL de éter, e centrifugando a 14.000 rpm por três minutos. O éter foi eliminado com o auxílio de uma pipeta. Para precipitação do DNA, foi adicionado ao tubo 1 mL de etanol absoluto, seguido de homogeneização e observação do *pellet* formado. O tubo foi então deixado a -80°C durante 30 minutos. Em seguida, efetuou-se uma centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e adicionou-se etanol 70%. Após a centrifugação a 14.000 rpm por cinco minutos, eliminou-se o etanol. O precipitado foi seco sob temperatura ambiente, e recuperado em volume de 10 a 20 μL de água esterilizada (Milli-Q) e o DNA foi armazenado a -20°C.

Considerando a ambiguidade na identificação de *M. konaensis*, ensaios de PCR foram realizados utilizando-se marcadores SCAR desenvolvidos para *M. incognita*, o par de *primers* incK14 [F: 5'- GGGATGTGTAAATGCTCCTG-3', R: 3'-CCCGCTACACCCTCAACTTC-5'], *M. paranaensis*, Par-09 [F: 5'- FGCCCGACTCCATTTGACGGA-3', R: 3'-

CCGTCCAGATCCATCGAAGTC-5'] (RANDIG et al., 2002) e *M. arenaria*, Far/Rar [F: 5'-TCGGCGATAGAGGTAAATGAC-3', R: 3'-TCGGCGATAGACACTACAAC-5'] (ZIJLSTRA et al., 2000).

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

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

Os produtos da PCR foram limpos utilizando-se o kit Wizard[®] SV Gel/PCR Clean Up System (Promega) e clonados no vetor pGem-T[®] Easy Vector (Promega), seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento do inserto foi feito em dois clones independentes pela MacroGen. O alinhamento foi feito com sequências de duas populações

de *M. paranaensis*, duas de *M. incognita*, uma de *M. konaensis* (Brasil) e outras sequências de *Meloidogyne* spp. retiradas do banco de dados do NCBI (*M. arenaria* KJ572384.1, AY438554.1, AF435803.1, KJ598135.1 e *M. konaensis* AF435797.1 – Havaí).

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

Resultados e Discussão

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

Estudos morfológicos e morfométricos

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

A morfologia da fêmea é apresentada nas Figuras 1 e 2. Os padrões perineais são variáveis em formato, similares a *M. incognita*, com arco dorsal alto e quadrangular (Figura 1a), e a *M. arenaria*, com o arco dorsal baixo e arredondado (Figura 1 - b, c e d). As estrias são grossas, em alguns casos suavemente contínuas a onduladas, algumas vezes com linhas laterais. Pequenos fasmídios estão localizados em ambos os lados na altura do ânus (Figura 1b).

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

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

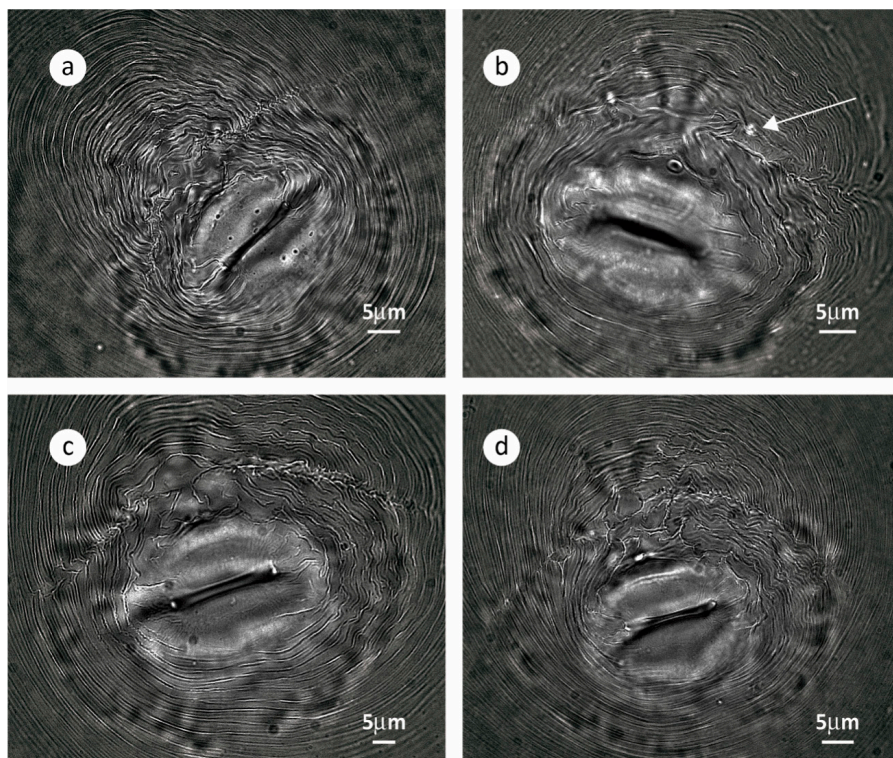


Figura 1. Padrões perineais de *Meloidogyne konaensis* dos Brasil. A-D: Microscopia Óptica (MO) mostrando as variações típicas da espécie. A seta indica os fasmídios.

O padrão perineal não é característico para essa espécie, uma vez que é altamente variável, portanto não é utilizado para identificação da espécie. O corpo tem o formato de pera, variável no tamanho, coloração branca translúcida, na maioria das vezes, com o pescoço longo e proeminente (Figura 2c) e curvado para vários ângulos do corpo. O disco labial é geralmente retangular, algumas vezes divididos em pares de lábio distintos, os lábios laterais grandes e triangulares (Figura 2, a e b). O esqueleto cefálico é fraco, e o poro excretor se localiza a 2-3 comprimentos do estilete, posteriormente à base do estilete (Figura 2d). O estilete é forte, com o cone curvado dorsalmente, haste alargada com algumas projeções pequenas, e três bulbos que se fundem gradualmente com a haste (Figura 2, e, f). A

abertura da glândula esofagiana dorsal (DEGO) situa-se no intervalo de 4-7 μm da base do estilete.

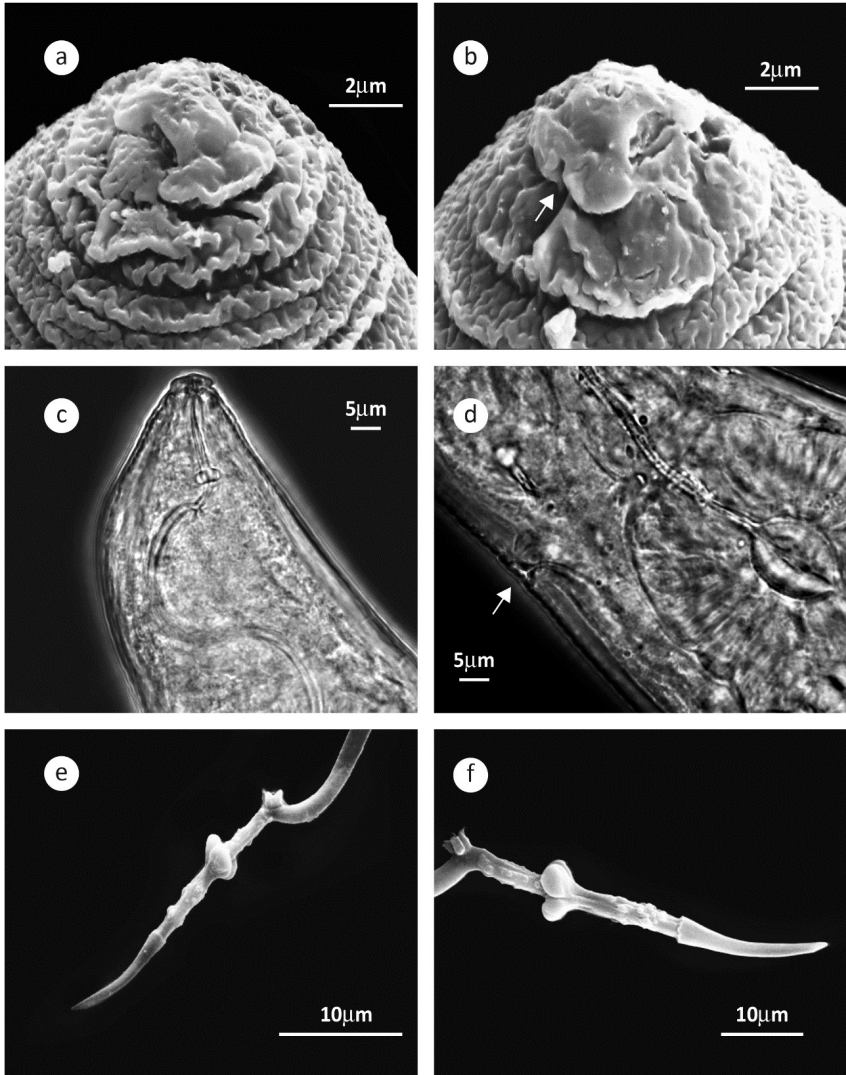


Figura 2. Fêmeas de *Meloidogyne konaensis* do Brasil. A-B: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da região anterior. Seta indica a constrição do lábio mediano; C-D: Microscopia Óptica (MO) da região anterior, mostrando o poro excretor. Seta indica o poro excretor; E-F: MEV de estiletos excisados.

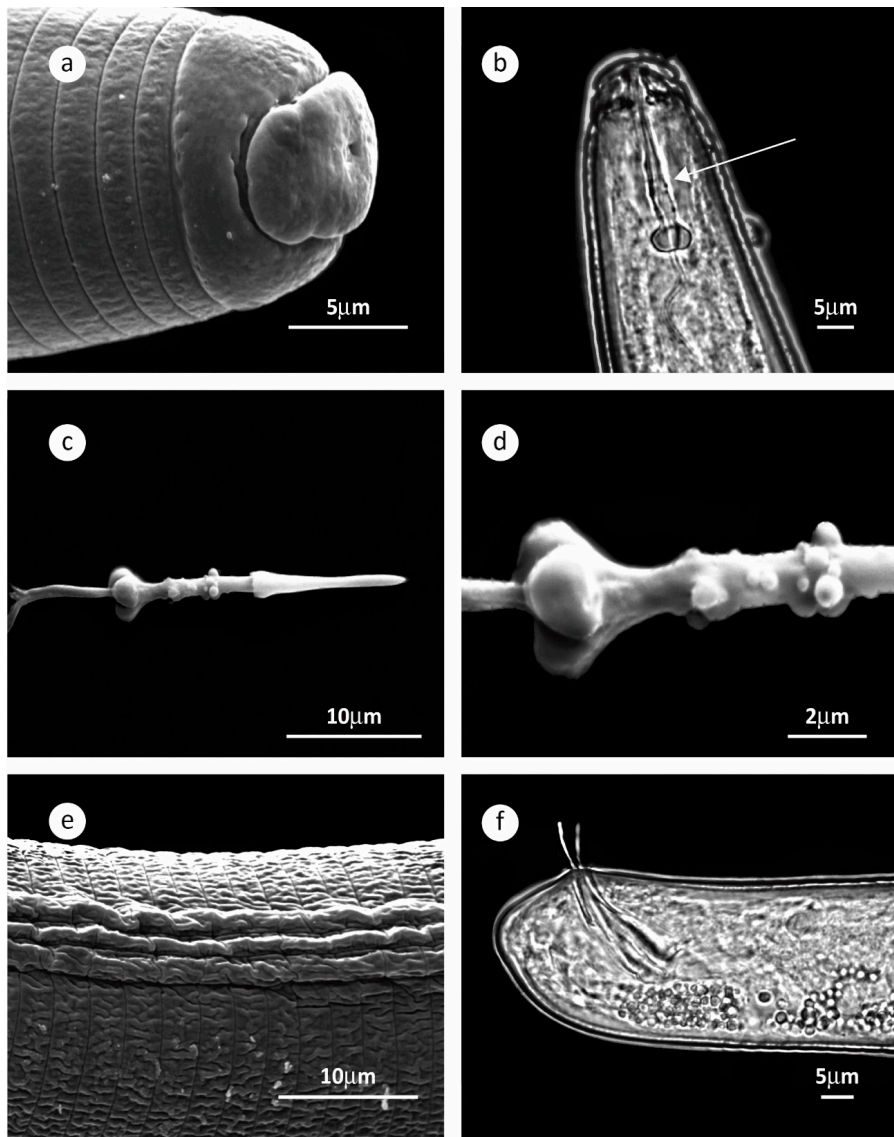


Figura 3. Machos de *Meloidogyne konaensis* do Brasil. A: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da região anterior; B: Microscopia Óptica (MO) da região anterior e vista lateral, com a haste do estilete mostrando de 6-12 grandes projeções (seta); C-D: MEV do estilete excisado, mostrando as grandes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

Os machos (Figura 3) não são frequentes. O corpo é vermiforme, abruptamente arredondado posteriormente (Figura 3f). A região labial é alta e arredondada, e a região anterior, sem anelações, é bem distinta do primeiro anel do corpo (Figura 3a). A morfologia do estilete é bem distinta, com cone reto e pontiagudo, com o seu diâmetro aumentando gradualmente na parte posterior (Figura 3c); a haste é cilíndrica, ligeiramente mais larga na região central, com 6-12 grandes projeções, bulbos amplamente alongados, fundindo com a haste, arredondado posteriormente (Figura 3 c, d). O forte estilete com grandes projeções na haste é o carácter diagnóstico mais utilizado para identificar *M. konaensis* (Figura 3, c, d). Em Microscopia óptica (MO), o esqueleto cefálico é moderadamente desenvolvido, e é possível visualizar as projeções emergindo da haste do estilete (Figura 3b). O campo lateral tem quatro incisuras (Figura 3e). A cauda é curta, com espículos arqueados e gubernáculo distinto (Figura 3f).

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

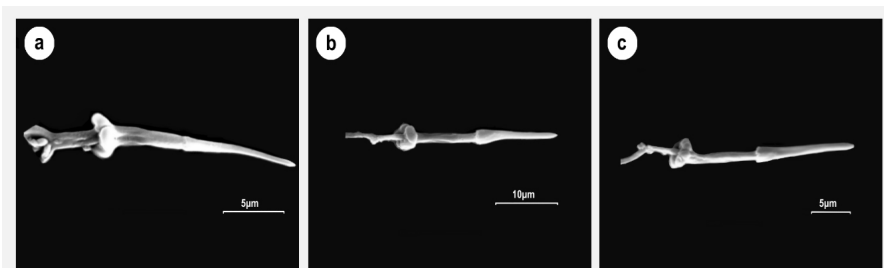


Figura 4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos estiletos excisados de *Meloidogyne paranaensis*. A: fêmea; B: macho de uma população (Est P1) de Rolândia, PR; C: macho de uma população (Est P2) da Herculândia, SP.

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

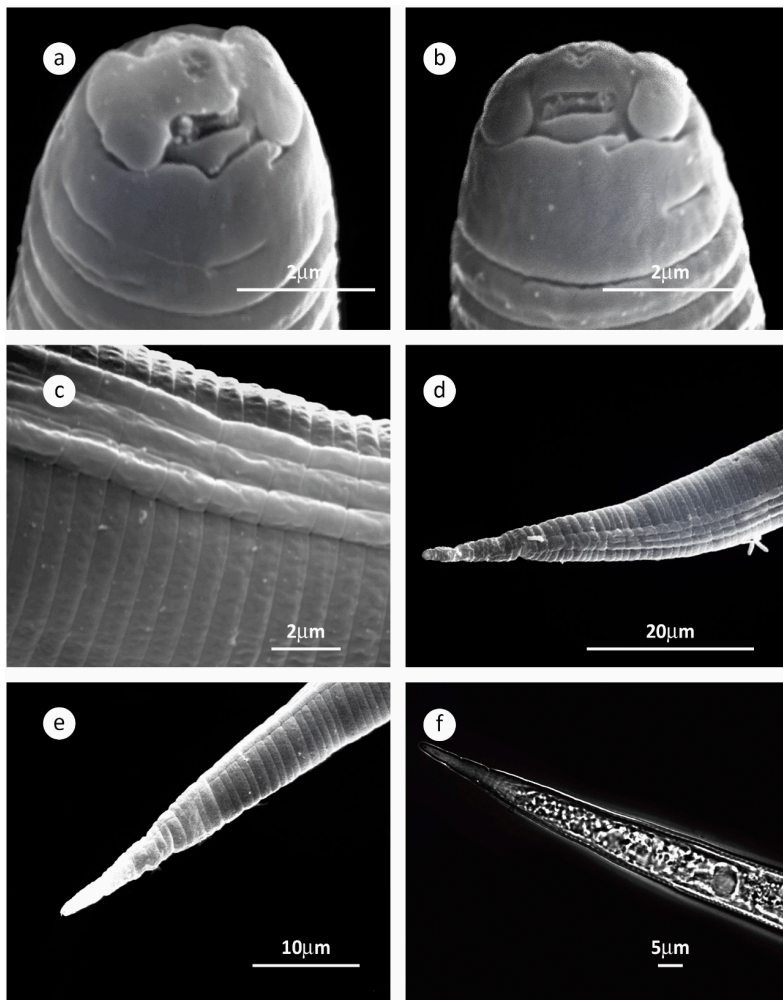


Figura 5. Juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne konaensis* do Brasil. A-B: MEV da região anterior; C: MEV do campo lateral; D-E: MEV das caudas de J2; F: Microscopia Óptica da cauda.

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

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

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

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

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

Estudos bioquímicos e biológicos

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

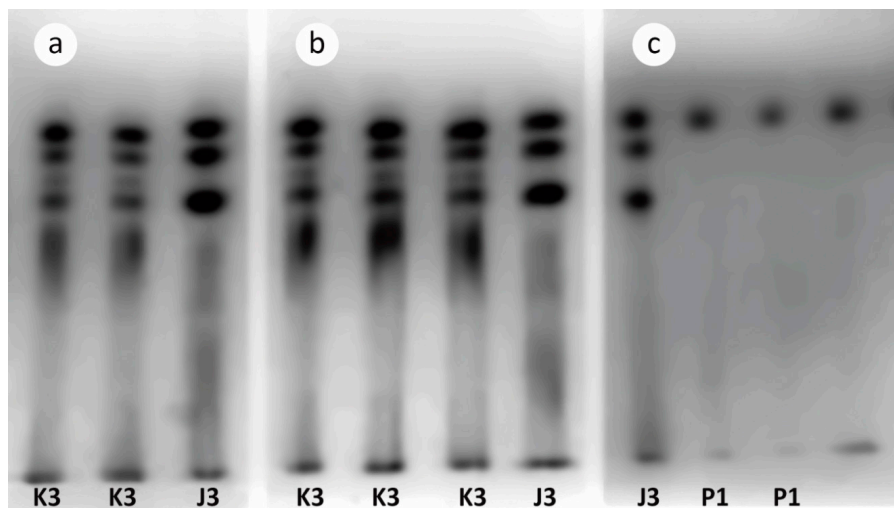


Figura 6. Fenótipos de Esterase de *Meloidogyne konaensis*. A: do Brasil (Est K3); B: do Havaí (Est K3); C: *M. paranaensis* do Brasil e do Havaí (Est P1). *Meloidogyne javanica* (Est J3) foi incluída como referência.

No teste de hospedeiros diferenciadores, a população de *M. konaensis* do Brasil se reproduziu em tomate cv. Rutgers (FR = 84,8), fumo cv. NC95 (FR = 384,6) e em melancia cv. Charleston Gray (FR = 88,9). Não houve reprodução em pimentão cv. Early California Wonder (FR = 0), algodão cv. Deltapine 61 (FR = 0,3), nem em amendoim cv. Florunner (FR = 0). Adicionalmente, não houve reprodução em café suscetível a *M. paranaensis*, *M. incognita* e *M. exigua* cv. Mundo Novo (FR = 0), contrastando com *M. paranaensis* (Est P1), que se reproduziu no café com FR = 28,5.

Análises moleculares

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

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

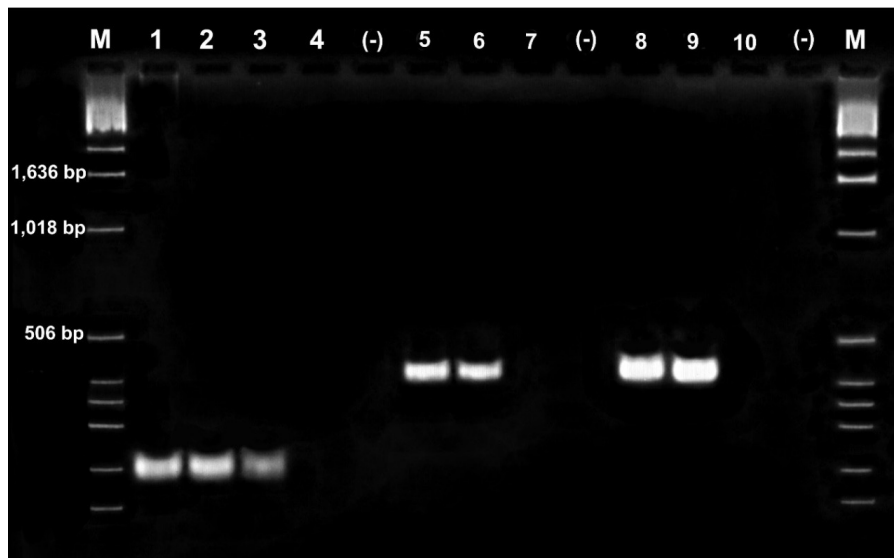
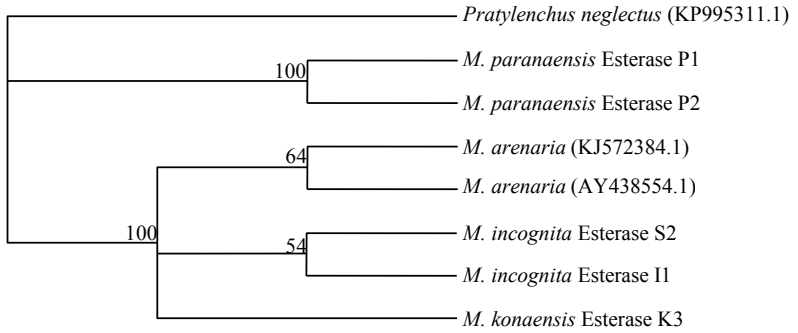


Figura 7. Padrões de amplificação de PCR-SCAR para *Meloidogyne konaensis* e outras espécies de nematoide-das-galhas gerados com os *primers*: Par-09 F/R para *M. paranaensis* (Randig et al., 2002) [códigos 1-4 (1 - *M. paranaensis* P1, 2 - *M. paranaensis* P2, 3 - *M. konaensis* do Havai, e 4 - *M.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

A



B

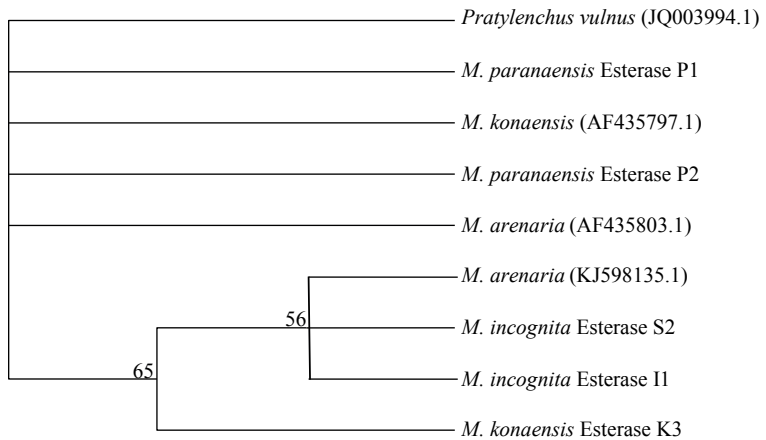


Figura 8. Árvore elaborada com base em análise Neighbour-Joining mostrando as relações filogenéticas de *Meloidogyne konaensis* do Brasil com espécies relacionadas com base em sequências ITS1-5.8S-ITS2 rRNA (A), e nas sequências D2-D3 do gene 28S rRNA (B). Números à esquerda dos braços são os valores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

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

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

O carácter morfológico mais útil para distinguir essa espécie é o estilete dos machos, com 6-12 grandes projeções salientes a partir da haste do estilete (EISENBACK et al. , 1994). Essas projeções são bem visíveis no microscópio óptico, ao contrário das projeções pequenas dos estiletos das fêmeas, que só são visíveis no MEV.

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

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

do cafeeiro como não hospedeiro de *M. konaensis* foi semelhante à resposta a *M. javanica* no Brasil, ou seja, ambas as espécies ocorrem nas entrelinhas dos cafeeiros, em plantas daninhas e são muitas vezes confundidas com as espécies de *Meloidogyne* do cafeeiro quando reproduzidas em tomateiros (CARNEIRO; COFCEWICZ, 2008).

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

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

Na árvore Neighbour-Joining obtida com estas sequências, *M. konaensis* do Brasil, conforme esperado, apareceu completamente separada de *M. paranaensis*. Assim, a sequência de *M. konaensis* disponível no NCBI (AF435797.1), obtida a partir de uma população do Havaí, é de fato pertencente a *M. paranaensis*. Portanto, já era de se esperar que os estudos filogenéticos destas populações resultassem em um agrupamento com populações de *M. paranaensis* na mesma *clade*, conforme observado no presente estudo. Outra evidência para esta espécie é o agrupamento de *M. paranaensis* com *M. konaensis* do Havaí, na árvore NJ obtida por Tomalova et al. (2012), quando analisaram filogeneticamente espécies de nematoides-das-galhas comparando as sequências SSU do rDNA. Além disso, no presente estudo testou-se o marcador SCAR desenvolvido especificamente

para *M. paranaensis*, com DNA isolado a partir de *M. konaensis* (= *M. paranaensis* do Havaí), e um produto de amplificação típica de 208 pb foi obtido, mostrando que eles são de fato da mesma espécie.

Análises filogenéticas com base nestas duas sequências corroboraram os dados obtidos a partir de outras abordagens de diagnóstico utilizados neste estudo, incluindo fenótipo de esterase, morfologia e análise SCAR, e confirmaram que o isolado de *M. konaensis* do cafeeiro (Havaí) é de fato *M. paranaensis* (CARNEIRO; COFCEWICZ, 2008).

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

Considerando os resultados deste estudo, a espécie de nematoide que infecta café no Havaí deve ser considerada como *M. paranaensis* (CARNEIRO et al., 2004; CARNEIRO; COFCEWICZ, 2008; VILAIN et al., 2013). Outras espécies vegetais (tomate, tabaco, melancia, couve, mamão, noni e canapum) também são bons hospedeiros de *M. konaensis*. O *status* polífago dessa espécie pode ser confirmada por meio de testes com diferentes hospedeiros. Considerando-se várias pesquisas feitas no Brasil, *M. konaensis* parece ser uma espécie

de importância secundária, ao contrário de *M. paranaensis*, que é considerado uma grande ameaça para a cultura do café no Brasil (CARNEIRO et al., 2005).

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

A distribuição irregular de *M. paranaensis* na América do Sul, América Central, nas Ilhas Caribenhas e Havaianas, está provavelmente ligada ao transporte de plantas de café (VILLAIN et al., 2013). No Havaí, o café é relatado como introduzido em várias ocasiões. A primeira introdução bem-sucedida foi feita em 1825, com 30 plantas de café 'in vivo' provenientes do estado do Rio de Janeiro, Brasil (GOTO, 1982). É possível que *M. paranaensis* tenha sido introduzido na Ilha de Kona partindo do Brasil.

Uma caracterização precisa das espécies de nematoides e populações

que ocorrem em cafeeiros é essencial para o desenvolvimento eficiente e sustentável de programas de manejo, especialmente aqueles baseados na resistência da planta (LIMA et al., 2015). Uma avaliação da diversidade de nematoides-das-galhas patogênicos ao cafeeiro no Brasil e em outros países foi realizada por Carneiro et al. (2004). Porém, mais estudos são necessários para uma triagem ampla da gama de genótipos de cafeeiros em relação a diferentes espécies de nematoides-das-galhas e suas variantes.

É importante ressaltar a grande relevância deste trabalho, pois, além de assinalar o primeiro relato da espécie *M. konaensis* Eisenback et al. (1994) no Brasil, traz uma grande contribuição na elucidação de um grande equívoco que perdurou durante 20 anos no Havaí, ou seja, a incorreta identificação de *M. konaensis*, em vez de *M. paranaensis*, espécie completamente negligenciada nesse país.

Conclusões

Os estudos de morfologia, morfometria, marcadores bioquímicos e moleculares realizados para a espécie críptica que parasitava culturas e plantas daninhas no estado do Ceará culminaram com o primeiro registro de *M. konaensis* (EISENBACK et al., 1994) no Brasil e esclareceram os equívocos com relação a *M. paranaensis*, mostrando as diferenças entre as duas espécies.

Referências

BLOK, V. C.; POWERS, O. Biochemical and molecular identification. In: PERRY, R.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Eds). **Root-knot nematodes**. Cambridge, MA, USA, CABI International, p. 98-118, 2009.

CARNEIRO, R. M. D. G.; CARNEIRO, R. G.; ABRANTES, I. M. O.; SANTOS, M. S. N. A.; ALMEIDA, M. R. A. *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. **Journal of Nematology**, v. 28, p. 177-189, 1996b.

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

CARNEIRO, R. M. D. G.; COFCEWICZ, E. T. Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In: SOUZA, R. M. (Ed). **Plant parasitic nematodes of coffee**. Springer, Holand, p. 87-122, 2008.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; CARNEIRO, R. G. Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 3, p. 555-560, 1996a.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. **Nematology**, v.

2, n. 6, p. 645-654, 2000.

CARNEIRO, R. M. D. G.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M. R. A.; GONÇALVES, W. Identificação e caracterização de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiro nos estados de São Paulo e Minas Gerais através dos fenótipos de esterase e SCAR – Multiplex – PCR.

Nematologia Brasileira, v. 29, p. 233-242, 2005.

CARNEIRO, R. M. D. G.; TIGANO, M.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M. R. A.; SARAH, J. L. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. **Nematology**, v. 6, p. 287-298, 2004.

DE LEY, P.; FELIX, M. A.; FRISSE, L. M.; NADLER, S. A.; STEMBER, P. W.; THOMAS, W. K. Molecular and morphological characterization of two reproductive species with mirrorimage anatomy (Nematoda: Cephalobidae). **Nematology**, v.1, p. 591-612, 1999.

EISENBACK, J. D. 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. I. Biology and control, North Carolina State University. Graphics, Raleigh, 1985b.

EISENBACK, J. D. Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. In: CARTER, C. C.; SASSER, J. N. (Eds). **An advanced treatise on *Meloidogyne***. Raleigh: North Carolina State University Graphics, v. 2, p. 79-105, 1985c.

EISENBACK, J. D.; BERNARD, E. C.; SCHMITT, D. P. Description of the Kona coffee root- knot nematode, *Meloidogyne konaensis* n. sp. **Journal of Nematology**, v. 26, p. 363-374, 1994.

EISENBACK, J. D.; HIRSCHMANN, H.; SASSER, J. N.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. **A guide to the four most common species of**

root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.): with a pictorial key. Raleigh, N. C., USA, North Carolina State University Graphics, 48 p. 1981.

EISENBACK, J. D.; STROMBERG, E. L.; MCCOY, M. S. First report of the Columbia root-knot nematode (*Meloidogyne chitwoodi*) in Virginia. **Plant Disease**, v. 70, p. 801, 1986.

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

GOTO, B. Ethnic groups and the coffee industry in Hawaii. **Hawaiian Journal of History**, v. 16, p. 112-124, 1982.

HARTMAN, K. M.; SASSER, J. N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: BARKER, K. R.; CARTER, C. C.; SASSER, J. N. (Eds). **An Advanced Treatise on *Meloidogyne***. v. 2. North Carolina, Methodology, p. 69-77, 1985.

HUNT, D. J.; HANDOO, Z. A. Taxonomy, identification and principal species. In: PERRY, R. N.; MOENS, N.; STARR, J. L. (Eds). **Root-knot nematodes**. Cambridge, MA, USA, CABI North America Office, p. 55-97, 2009.

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

KARSSSEN, G.; WESEMAEL, W.; MOENS, M. Root-knot nematodes. In: PERRY, R. N.; MOENS, M. (Eds). **Plant Nematology**. 2. ed. CABI International, Wallingford, UK, p. 73-108, 2013.

LIMA, E. A.; FURLANETTO, C.; NICOLE, M.; GOMES, A. C. M. M.; ALMEIDA, M. R. A.; JORGE-JUNIOR, A.; CORREA, V. R.; SALGADO, S. M.; FERRÃO, M. A. G.; CARNEIRO, R. M. D. G. The multi-resistant

reaction of drought tolerant coffee 'Conilon clone 14' to *Meloidogyne* spp. and late hypersensitivelike response in *Coffea canephora*.

Phytopathology, v. 105, p. 805-814, 2015.

MOENS, M.; PERRY, R. N.; STARR J. L. *Meloidogyne* species: a diverse group of novel and important plant parasites. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Eds). **Root-knot nematodes**. Cambridge, MA, USA, CABI North America Office, p. 1-17, 2009.

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

RANDIG, O.; CARNEIRO, R. M. D. G.; CASTAGNONE-SERENO, P. Identificação das principais espécies de *Meloidogyne* parasitas do cafeeiro no Brasil com marcadores SCAR-café em Multiplex-PCR, **Nematologia Brasileira**, v. 28, p. 1-10, 2004.

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

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

SASSER, J. N.; CARTER, C. C. 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**, v. 276, p. 21-32, 1982.

SILVA, M. C. L.; SANTOS, C. D. G. Identificação de espécies de *Meloidogyne* ocorrendo naturalmente em culturas no estado do Ceará

por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 37, supl., 2012. Edição dos Resumos do 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Manaus, 2012.

SILVA, M. C. L. **Identificação e caracterização de espécies de *Meloidogyne* em áreas agrícolas e dispersão de *M. enterolobii* em pomares de goiabeira no estado do Ceará.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2014. 108 f.

SIPES, B. S.; SCHMITT, D. P.; XU, K.; SERRACIN, M. Esterase polymorphism in *Meloidogyne konaensis*. **Journal of Nematology**, v. 37, n. 4, p. 438-443, 2005.

SUBBOTIN, S. A.; WAEYENBERGE, L.; MOENS, M. Identification of cyst forming nematodes of the genus Heterodera (Nematoda: Heteroderidae) based on the ribosomal DNA-RFLP. **Nematology**, v. 2, p. 153-164, 2000.

SCHMITZ, F. J.; STEIERT, M.; TICHY, H. V.; HOFMANN, B.; VERHOEF, J.; HEINZ, H. P.; KÖHRER, K.; JONES, M. E. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Düsseldorf by six genotypic methods. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, p. 341-351, 1998.

SWOFFORD, D. L. PAUP*: **Phylogenetic Analysis Using Parsimony** (*and Other Methods), version 4. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, 2002.

TAYLOR, D. P.; NETSCHER, C. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Nematologica** 20:268-269, 1974.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. **Biology, identification and control of rootknot nematodes (*Meloidogyne* spp.)**. North Carolina: North Carolina State University: USAID, 1978. 111 p.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAC, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The ClustalX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

TOMALOVA, I.; IACHIA, C.; MULET, K.; CASTAGNONE-SERENO, P. The map-1 gene family in root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp.: a set of taxonomically restricted genes specific to clonal species. **Plus One**, v. 7, n. 6, 2012

TRIANANTAPHYLLOU, A. C. Cytological methods for the study of oogenesis and reproduction of root-knot nematodes. In: BARKER, K. R.; CARTER, C. C.; SASSER, J. N. (Eds). **An Advanced treatise on *Meloidogyne***. v. 2. Raleigh, NC, North Carolina State University Graphics, p. 107-114, 1985.

VILLAIN, L.; SARAH, J. L.; HERNÁNDEZ, A.; BERTRAND, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P.; CHARMETANT, P.; ANZUETO, F.; FIGUEROA, P.; CARNEIRO, R. M. D. G. Diversity of root-knot nematodes associated with coffee orchards in Central America. **Nematropica**, v. 43, p. 194-206, 2013.

WHITEHEAD, G. A.; HEMMING, J. R. A comparasion of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. **Annals of Applied Biology**, v. 55, p. 25-38, 1965.

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



***Recursos Genéticos e
Biotecnologia***

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

