

Taxonomia integrativa de *Meloidogyne oryzae* (Nematoda: Meloidogynidae) parasitando arroz irrigado no sul do Brasil



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

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
363**

**Taxonomia integrativa de  
*Meloidogyne oryzae* (Nematoda:  
Meloidogynidae) parasitando  
arroz irrigado no sul do Brasil**

*Vanessa da Silva Mattos  
Juvenil Enrique Cares  
César Bauer Gomes  
Ana Cristina Meneses Mendes Gomes  
Jessica da Mata dos Santos Monteiro  
Philippe Castagnone-Sereno  
Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Parque Estação Biológica  
PqEB, Av. W5 Norte (final)  
70970-717, Brasília, DF  
Fone: +55 (61) 3448-4700  
Fax: +55 (61) 3340-3624  
www.embrapa.br  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações  
da Unidade Responsável

Presidente  
*Wagner Alexandre Lucena*

Secretária-Executiva  
*Ana Flávia do N. Dias Côrtes*

Membros  
*Bruno Machado Teles Walter; Daniela Aguiar de Souza; Eudes de Arruda Carvalho; Luiz Joaquim Castelo Branco Carvalho; Marcos Aparecido Gimenes; Solange Carvalho Barrios Roveri Jose; Márcio Martinello Sanchez; Sérgio Eustáquio de Noronha*

Supervisão editorial  
*Ana Flávia do N. Dias Côrtes*

Revisão de texto  
*Regina Carneiro*

Normalização bibliográfica  
*Rosameres Rocha Galvão - CRB (1/2122)*

Tratamento das ilustrações  
*Adilson Werneck*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Adilson Werneck*

Foto da capa  
*Rafael Negretti (Lavoura infestada por *Meloidogyne* spp. em Camburiú -SC)*

**1ª edição**  
1ª impressão (ano): tiragem

**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

---

Taxonomia integrativa de *Meloidogyne oryzae* (Nematoda: Meloidogynidae) parasitando arroz irrigado no sul do Brasil / Vanessa da Silva Mattos... [et al.] – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020.

34 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 363).

ISSN 0102-0110

1. Arroz irrigado 2. *Oryza sativa* L. 3. *Meloidogyne oryzae* Mass 4. Sul do Brasil I. Mattos, V. da S. II. Série

## Sumário

---

Resumo .....	5
Abstract .....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos .....	9
Resultados.....	13
Discussão .....	24
Conclusão.....	27
Referência Bibliográfica.....	27



# Taxonomia integrativa de *Meloidogyne oryzae* (Nematoda: Meloidogynidae) parasitando arroz irrigado no sul do Brasil

Vanessa da Silva Mattos<sup>1</sup>

Juvenil Enrique Cares<sup>2</sup>

César Bauer Gomes<sup>3</sup>

Ana Cristina Meneses Mendes Gomes<sup>4</sup>

Jessica da Mata dos Santos Monteiro<sup>5</sup>

Philippe Castagnone-Sereno<sup>6</sup>

Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro<sup>7</sup>

**Resumo** – Uma espécie de nematoide das galhas parasitando o arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) no estado de Santa Catarina (Brasil) foi identificada como *Meloidogyne oryzae* Maas, Sanders e Dede, 1978, através de diferentes abordagens. A espécie foi estudada a partir dessa população brasileira e comparada com a descrição de *M. oryzae* do Suriname, com caracterizações morfológicas, bioquímicas e moleculares. A fêmea apresentou estilete mais longo (15,0 µm) que o de *M. graminicola* Golden; Birchfield (1965) (11,2 µm) com bulbos irregulares, vulva ‘off-set’ e a presença de ligeira protuberância na região posterior. A anelação pós-labial foi distinta do primeiro anel do corpo, o disco labial e os lábios medianos fundiram-se em uma estrutura em forma de âncora. Padrões perineais foram semelhantes aos de *M. graminicola*. Os machos apresentaram região labial alta e a presença de algumas linhas curtas e irregulares na região anterior, lábios medianos divididos, não

---

<sup>1</sup> Engenheira agrônoma, doutora em Fitopatologia, bolsista, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

<sup>2</sup> Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, professor da Universidade de Brasília.

<sup>3</sup> Agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa, pesquisador da Embrapa Clima Temperado.

<sup>4</sup> Bióloga, mestre em Ciências Agrárias, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Agrônoma, doutora em fitopatologia, nematologista na Empresa JCO Bioprodutos.

<sup>6</sup> Engenheiro-agrônomo, doutor em Ciências, pesquisador do Institut Sophia Agrobiotech, Sophia Antipolis, France.

<sup>7</sup> Engenheira agrônoma, doutora em em Parasitologia, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

fundidos com disco labial, e estilete (18,2  $\mu\text{m}$ ) maior que em *M. graminicola* (16,8  $\mu\text{m}$ ). A cauda do juvenil de segundo estádio (J2) (75,8  $\mu\text{m}$ ) foi maior que a de *M. graminicola* (70,9  $\mu\text{m}$ ), com porção hialina estreita e muito longa (22  $\mu\text{m}$  em *M. oryzae* e 17,9  $\mu\text{m}$  em *M. graminicola*). Bioquimicamente, *M. oryzae* apresentou um perfil de esterase distinto (Est O1), que permitiu diferenciá-la de *M. graminicola* (Est VS1). O número de cromossomos foi  $3n = 50-56$ , e em árvore filogenética de sequências de DNA da região ITS1-5.8S-ITS2 rNAr, as duas populações de *M. oryzae* agruparam-se com outras espécies partenogenéticas mitóticas, diferenciando-se de *M. graminicola*, que apresentou  $n = 18$  cromossomos e suas populações agruparam-se com outras espécies partenogenéticas meióticas. Este estudo relatou a primeira detecção de *M. oryzae* no Brasil e a segunda no mundo, após a descrição da espécie.

**Termos para indexação:** *Meloidogyne oryzae*, caracterização morfológica, enzimática e molecular.

### **Integrative Taxonomy of *Meloidogyne oryzae* (Nematoda: Meloidogynidae) parasitizing irrigated rice in Southern Brazil.**

**Abstract** – A root-knot nematode parasitizing rice (*Oryza sativa* L.) in Santa Catarina state (Brazil) is identified as *Meloidogyne oryzae* Maas, Sanders and Dede, 1978 using different approaches. The specimens studied from this Brazilian population were compared with the type description of *M. oryzae* from Suriname, with additional morphological, biochemical and molecular characterization. The female has a longer stylet (15.0  $\mu\text{m}$ ) when compared with *M. graminicola* Golden; Birchfield (1965) (11.2  $\mu\text{m}$ ) with irregularly shaped knobs, vulva offset and slightly protruding in posterior region. Annules in the lip region are distinct from first body annule, labial disc and the medial lips form an anchor-shaped structure. Perineal patterns similar to *M. graminicola*. The male has a lip region offset and the presence of few short, irregular lines in head region, medial lips divided, not fused with labial disc and stylet (18.2  $\mu\text{m}$ ) longer than in *M. graminicola* (16.8  $\mu\text{m}$ ). Second-stage juvenile (J2) tail (75.8  $\mu\text{m}$ ) is longer than in *M. graminicola* (70.9  $\mu\text{m}$ ) with a very long narrow hyaline portion (22  $\mu\text{m}$  in *M. oryzae* and 17.9  $\mu\text{m}$  in *M. graminicola*). Biochemically, presents a distinct esterase profile (Est O1) for differentiating it from *M. graminicola* (Est VS1). The number of chromosomes is  $3n=50-56$  and in DNA sequences of ITS1-5.8S-ITS2 rRNA the two populations of *M. oryzae* clustered together with other mitotic parthenogenetic species, differentiating them from *M. graminicola* with  $n=18$  chromosomes, and clustered with meiotic

species. This study represents the first detection of *M. oryzae* in Brazil and the second in the world after the species description.

**Index terms:** *Meloidogyne oryzae*, morphological, enzymatic and molecular characterization.

## Introdução

---

Um recente levantamento no sul do Brasil detectou *Meloidogyne graminicola* Golden; Birchfield (1965), *M. javanica* (Treub 1885) Chitwood, 1949 e outros nematoides das galhas, com quatro fenótipos de esterase atípicos de *Meloidogyne* spp, em campos de arroz do Rio Grande do Sul (RS) e de Santa Catarina (SC), causando danos (Negretti et al., 2017; Mattos et al., 2017). Neste estudo, a análise enzimática e molecular revelou a existência de um “complexo de espécies” parasitando o arroz na região Sul do Brasil.

O nematoide das galhas (NG), *M. graminicola*, é considerado o mais disseminado em arrozais no Brasil (Negretti et al., 2017) e no mundo, sendo comum tanto nos subtropicais como nos trópicos. Essa espécie é considerada uma grande ameaça para a cultura do arroz, particularmente na Ásia, onde mudanças nas práticas agrícolas, em resposta às mudanças climáticas e condições socioeconômicas, levaram a um aumento dramático nas populações de *M. graminicola* (De Waele; Elsen, 2007).

*Meloidogyne oryzae* Maas, Sanders e Dede, 1978 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 o fenótipo de esterase. Embora haja informações valiosas na descrição (Maas et al., 1978), a ausência de dados de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e caracterização molecular refletiram em uma descrição limitada da espécie. No entanto, Jepson (1987) fez outros estudos usando MEV, incluindo informações relevantes para a caracterização de *M. oryzae*, espécie pouco estudada por vários anos.

Quase todas as espécies descritas no arroz pertencem ao grupo-



*graminis*, sendo morfológicamente semelhantes (Jepson, 1987), e com a caracterização enzimática bastante difícil, devido às bandas em arraste e a alta atividade enzimática revelada nos géis (Esbenshade; Triantaphyllou, 1985). Diante dessas similaridades, algumas espécies podem ser identificadas erroneamente, sendo confundidas com outras espécies de *Meloidogyne* parasitas do arroz, especialmente com *M. graminicola* (Negretti et al., 2017).

Dois perfis de esterase semelhantes já foram atribuídos a *M. oryzae*: VS1 (Esbenshade; Triantaphyllou, 1985) e O1 (Carneiro et al., 2000). Um novo perfil de malato desidrogenase (MDH) O3 (Rm 1,4; 1,6; 1,8) foi detectado pelos últimos autores. Embora a última caracterização tenha sido realizada utilizando uma população do Suriname coletada 20 anos após a descrição da espécie, a identidade espécie-específica dessa população não foi confirmada por abordagens morfológicas, conforme informado por Regina Carneiro (comunicação pessoal, 22/11/2018). A mesma população foi estudada recentemente por Tigano et al. (2005), usando sequências de RNAr e agrupadas com as espécies partenogênicas meióticas, contrariando o fato de que *M. oryzae* possui 51-55 cromossomos, e um modo de reprodução partenogênético mitótico (Esbenshade; Triantaphyllou, 1985). Posteriormente, essa população do Suriname foi estudada e apresentou um número de cromossomos ( $n = 18$ ) e um fenótipo de esterase semelhante ao de *M. graminicola* (Carneiro et al., 2000), confirmando a suspeita de uma identificação errônea (Negretti et al., 2017). Considerando essa informação adicional, *M. oryzae* só foi detectada uma vez no mundo, no Suriname (1971), descrita por Maas et al. (1978) e estudada mais tarde por Esbenshade e Triantaphyllou (1985) e Jepson (1987).

Com base em diferenças morfológicas, morfométricas e moleculares, em relação a *M. graminicola* e outras espécies de *Meloidogyne* do arroz, o objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar a espécie atípica *Meloidogyne* sp.1, encontrada em campos de arroz no estado de Santa Catarina, como *M. oryzae*, e relatar sua primeira ocorrência na região Sul do Brasil, e sua segunda detecção no mundo após a descrição da espécie.

## Material e Métodos

---

### Populações de nematoides

Culturas puras de populações de *Meloidogyne* sp.1 coletadas em áreas orizícolas de Santa Catarina (Tabela 1) foram mantidas em plantas de arroz (*Oryza sativa* - BR-IRGA 410), em casa de vegetação (25-28 °C). Todos os estudos morfológicos e bioquímicos foram feitos a partir dessas culturas. Massas de ovos e fêmeas foram recuperadas manualmente, a partir de raízes de arroz infectadas e os juvenis de segundo estágio (J2s) foram obtidos a partir de ovos em câmaras de eclosão, através da técnica de funil de Baermann modificado (Whitehead; Hemming, 1965). Os machos foram obtidos colocando-se o sistema radicular do arroz, contendo galhas e massas de ovos em água, oxigenando-o com uma bomba de aquário e coletando, periodicamente, os espécimes presentes na água, com peneiras de abertura 0,0025mm (500 mesh) (Carneiro et al., 1998). Os ovos para análises de DNA foram extraídos de raízes infectadas, conforme metodologia descrita por Carneiro et al. (2004).

Tabela 1: Lista dos isolados de *Meloidogyne* sp. utilizados no estudo, código da população e origem.

Código da População	Espécie	Origem (Município/Estado/País)
Mg G2	<i>Meloidogyne graminicola</i>	Guaramirim/SC/Brasil
Mg G4	<i>M. graminicola</i>	Camburiú/SC/Brasil
Mg G6	<i>M. graminicola</i>	Camburiú/SC/Brasil
Mg G8	<i>M. graminicola</i>	Capão do Leão/RS/Brasil
Mg G12	<i>M. graminicola</i>	Capão do Leão/RS/Brasil
Mg G13	<i>M. graminicola</i>	Rio do Sul/SC/Brasil
Mg P <sup>1</sup>	<i>M. graminicola</i>	<u>Filipinas</u> <sup>1</sup>
Mo 1	<i>Meloidogyne</i> sp.1	Ilhota/SC/Brasil
Mo 2	<i>Meloidogyne</i> sp.1	Camboriú/SC/Brasil
Msp 2	<i>Meloidogyne</i> sp.2	Uruguaiana/RS/Brasil
Msp 3	<i>Meloidogyne</i> sp.3	Uruguaiana/RS/Brasil
Ms <sup>2</sup>	<i>M. salasi</i>	<u>San José/Costa Rica</u> <sup>2</sup>

<sup>1</sup> A população de *M. graminicola* das Filipinas foi cedida por Dr. Gerrit Karssen (Universidade de Wageningen, Holanda)

<sup>2</sup> A população de *M. salasi* foi cedida por M.Sc. Lorena Flores (Universid de San José, Costa Rica)

### Estudos morfológicos e morfométricos

Estudos biométricos foram conduzidos em fêmeas, machos e J2s. Os machos e J2s foram mortos em formaldeído frio (5°C) a 2%, e medidos imediatamente sob microscopia óptica. Estudos morfométricos foram realizados utilizando-se as medições sugeridas por Eisenback; Hunt (2009).

As regiões perineais foram cortadas de fêmeas jovens, 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 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), de acordo com os métodos previamente descritos por Eisenback (1986). Os espécimes já extraídos foram fixados a 5 °C, em glutaraldeído 2% diluído em tampão de cacodilato

de sódio 0,1 M e pH 7,4, por 24h. Posteriormente, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (2%), durante 2h. Após esse período, os espécimes foram submetidos à desidratação em série etanólica (10, 30, 50, 70, 90 e 100%), com intervalos de 15 minutos. Logo após, foram submetidos à secagem em ponto crítico. Os espécimes foram montados apoiados sobre fios de cabelo, dispostos previamente em “stubs” revestidos por fita-cola dupla-face.

Para a excisão dos estiletos de fêmeas e machos, seguiu-se a metodologia descrita por Eisenback (1985b), pela qual os espécimes coletados foram colocados em lamínulas contendo ácido láctico 45%. Posteriormente, foram feitos cortes na região posterior ao bulbo mediano, com auxílio de um estilete e logo em seguida, sob microscópio invertido e auxílio de um alfinete entomológico 00, foram realizadas várias pulsões até a excisão do estilete. Após esse processo, o excesso de ácido láctico foi removido com formaldeído 2%. Foi inserida uma seta de papel indicando a localização exata do estilete, a ser visualizado ao MEV.

A seguir as amostras de trinta espécimes de cada (fêmea, macho e J2) foram estudadas e fotodocumentadas nas regiões: anterior (macho, fêmea e J2), cauda (J2 e macho), campo lateral e estiletos excisados (macho e fêmea) (Eisenback, 1985a). Essas regiões foram metalizadas com 35 nm de ouro, em metalizador Baltech, e observadas e foto documentadas ao MEV Zeiss DSM-962. Vários espécimes de cada estágio e cortes perineais foram também analisados e foto documentados em microscopia de luz.

### **Estudos bioquímicos e citológicos**

A eletroforese de duas populações de *Meloidogyne* sp.1 do arroz foi realizada em gel de poliácridamida a 7%, no sistema de eletroforese horizontal, como descrito por Carneiro; Almeida (2001). Reação para ambas enzimas, esterase (EST) e malato desidrogenase (MDH) foram analisadas, sendo incluída uma população de *M. graminicola* para comparação nas análises enzimáticas e *Meloidogyne javanica* (EST J3, MDH N1) como referência.

Estudos citológicos foram realizados com o método de coloração com orceína-propiónica descrito por Triantaphyllou (1985), com algumas modificações (Mattos et al., 2018)

### Estudos moleculares

O DNA genômico das duas populações de *Meloidogyne* foi extraído de 100 a 150 µl de ovos, de acordo com o método descrito por Randig et al. (2002).

Para os estudos de filogenia, as regiões ITS1-5.8S-ITS2 do RNAr (sequências do *primer* = F: 5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3' e R: 5'-CCTCCGCTAAATGATATG-3' (Schmitz et al., 1998), e o fragmento D2-D3 do gene 28S rRNA (sequências do *primer* = F: 5' - ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3, 5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3) (De Ley et al., 1999) foram amplificadas usando as condições de PCR descritas por Subbotin et al. (2000). Os produtos da PCR foram então 'cortados do gel' e limpos usando o kit Wizard® SV Gel/PCR Clean Up System (Promega) e clonados no vetor pGem-T® Easy Vector (Promega), seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento do inserto foi feito em dois clones independentes pela Macrogen. Os alinhamentos de sequências foram realizados utilizando a versão MEGA 5.03 com parâmetros padrão (Tamura et al., 2011), com sequências de *Meloidogyne* spp. do arroz (Tabela 1), e também sequências de outras espécies de *Meloidogyne* recuperadas da base de dados do NCBI (GenBank).

O software ClustalX versão 1.83 foi executado com parâmetros predefinidos por Thompson et al. (1997) e as árvores foram geradas usando o Neighbour-Joining (NJ) (Saitou; Nei, 1987) com o software PAUP\*, versão 4b10 (Swofford, 2002). Sequências de *Pratylenchus pinguicaudatus* (Rensch, 1924) Filipjev and Schuurmans Stekhoven, 1941 (KP995311.1) e *P. vulnus* Allen and Jensen, 1951 (JX047009.1) foram usadas como *outgroups*. Para o teste do suporte dos nós das árvores geradas, 1000 repetições de bootstrap foram executadas, e apenas valores acima de 50 % foram considerados.

## Resultados

---

### Estudos morfológicos e morfométricos

Os dados da morfologia e da morfometria das populações de *Meloidogyne* sp.1 do Brasil foram congruentes com a descrição original de *M. oryzae*, com pequenas variações esperadas, uma vez que são frequentes no gênero *Meloidogyne*. As medidas são apresentadas na Tabela 2.

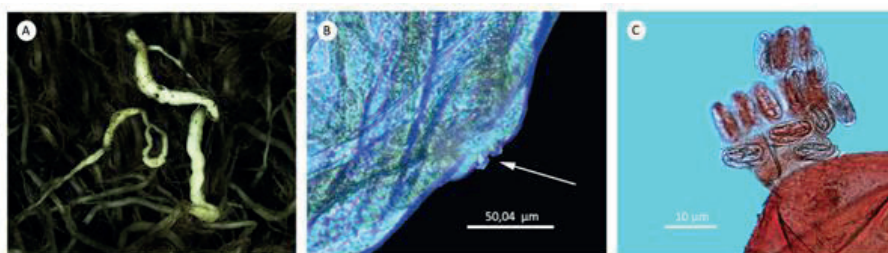
Tabela 2. Parâmetros morfométricos avaliados nas populações de *Meloidogyne* sp. 1 oriundas do Brasil, em comparação a *M. oryzae* do Suriname. As medidas são em  $\mu\text{m}$  (micrômetros): média  $\pm$  s.d.; (intervalo) e coeficiente de variação. Valores do Suriname obtidos na descrição da espécie ou em Jepson 1987(\*).

Mensurações	Fêmea		Macho		J2	
	Brasil	Suriname	Brasil	Suriname	Brasil	Suriname
n	30	7/25*	20	22	30	60
Comprimento do corpo (L)	490 $\pm$ 11,77 (420-630) 7,6	625 475-750	1226 $\pm$ 24,21 (1100-1520) 11,7	1667 1195-1915	444 $\pm$ 4,09 (420-500) 19,8	545 (500-615)
L/ comprimento da cauda (a)	1,6 $\pm$ 0,1 (1,2-2,1) 4,31	1,7	41,4 $\pm$ 1,02 (33-63,3) 6,83	56 44-68	27,6 $\pm$ 0,62 (23-41) 8,07	37 (30-45)
L/ comp. da cauda (c)	-	-	108 $\pm$ 3,07 (84,6-125) 7,85	-	5,9 $\pm$ 0,1 (5,3-6,5) 14,3	7,0 (6,8-8,6)
Diâmetro max. do corpo.	317 $\pm$ 12,27 (220-422) 4,73	361 250-432	31 $\pm$ 1,89 (27-40) 4,9	30 24-43	16 $\pm$ 0,36 (11-20) 8,19	15 (12-17)
Comprimento do pescoço	119 $\pm$ 3,18 (100-170) 6,85	107 80-136	-	-	-	-
Comprimento do estilete	15 $\pm$ 0,2 (14-18) 13,14	15 14-18/ 14,7*	18,2 $\pm$ 0,35 (18-20) 11,4	19 19-20/18-20*	12,5 $\pm$ 0,15 (11-14) 14,49	14,2 14-15
Altura do bulbo do estilete	1,9 $\pm$ 0,1 (1-2) 6,32	-	3,1 $\pm$ 0,1 (3-4) 8,6	-	1,60,1 (1-2) 3,35	-
Largura do bulbo do estilete	3,5 $\pm$ 0,1 (3-4) 6,88	-	3,9 $\pm$ 0,1 (3-4) 10,5	-	2,6 $\pm$ 0,1 (2-3) 5,17	-
DEGO	4,4 $\pm$ 0,1 (4-6) 7,09	7	4,5 $\pm$ 0,1 (4-6) 8,77	4-5/5,2* 4,5-6,3*	3,7 $\pm$ 0,1 (3-5) 6,9	-
Distância do poro excretor ao término	29 $\pm$ 0,6 (21-35) 8,03	-	132 $\pm$ 0,1 (128-140) 30,3	-	70,5 $\pm$ 1,08 (66-76) 11,9	-
Comprimento da fenda vulvar	27 $\pm$ 0,3 (25-30) 15,9	33 29-42	-	-	-	-
Distância ânus-vulva	19 $\pm$ 0,3 (15-21) 11,4	20 13-28	-	-	-	-
Distância interfasmidial	18 $\pm$ 0,3 (16-23) 9,22	21 15-29	-	-	-	-
Comp. espículo	-	-	30 $\pm$ 0,24 (29-32) 27,8	31 25-34	-	-
Gubernáculo	-	-	8,5 $\pm$ 0,21 (6-9) 9,04	8-10	-	-
Comprimento da cauda	-	-	11,9 $\pm$ 0,27 (10-13) 9,67	-	75,8 $\pm$ 0,8 (66-85) 17,1	79,0/75,4 (70-90) 70,2-81,9
Término hialino da cauda	-	-	-	-	22 $\pm$ 0,33 (19-24) 12,13	21/22,9 (14-26) 19,8-27,9

*Meloidogyne* sp.1 (= *M. oryzae*) induz galhas alongadas em raízes de plantas de arroz, muitas vezes na ponta da raiz, com formato de gancho, semelhante a *M. graminicola* (Figura 1A). As fêmeas se caracterizam por ficarem completamente embebidas no tecido radicular, onde os ovos são colocados, sendo as massas de ovos internas. Os machos não são muito frequentes, mas quando presentes são encontrados, na maioria das vezes, dentro da raiz junto com as fêmeas e os juvenis de segundo-estádio. No tomateiro, pequenas galhas são observadas, geralmente localizadas logo antes da ponta da raiz e as massas de ovos são também internas.

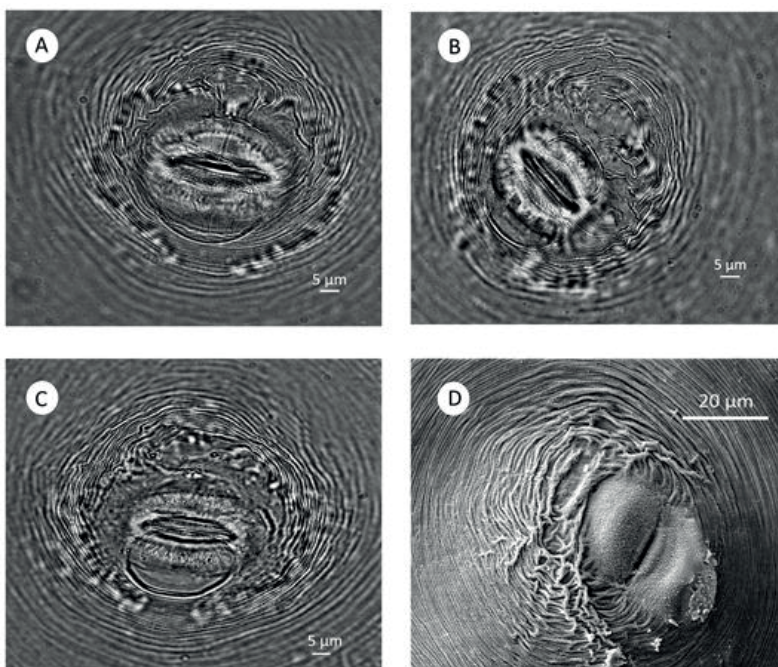
**Fêmeas:** o formato do corpo é alongado e piriforme com um pescoço 'off-set' e anelação grossa próxima ao pescoço, a vulva está localizada sobre uma ligeira protuberância posterior, formada especialmente pelos lábios da vulva, observada na maioria dos espécimes (Figura 1B). A extremidade anterior do corpo está, geralmente, alinhada com a extremidade posterior. Os padrões perineais são arredondados a ovóides, o arco dorsal é suavemente arredondado, sem incisões laterais ou lacunas observadas (Figura 2). Os fasmídeos são pequenos (nem sempre visíveis). Estrias, na região dorsal, formam linhas irregulares onduladas, quebradas ou intactas, ao redor e entre os fasmídeos. Estrias são bastante grossas, mas ausentes no lábio vulvar. A área perivulval geralmente é livre de estrias. Uma estria protuberante cobre o ânus dorsalmente, enquanto na maioria dos espécimes, a parte ventral é marcada por uma dobra distinta bastante espessa ou pelo menos uma linha regular óbvia (Figura 2). A região da cabeça é baixa e os lábios ligeiramente proeminentes. Ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), é possível visualizar que a anelação pós-labial é distinta do primeiro anel do corpo, o disco labial e os lábios medianos formam uma estrutura em forma de âncora e os lábios laterais não são protuberantes. Primeiro anel do corpo é aparentemente mais espesso do que os subsequentes (Figura 3). O poro excretor está situado 2-3 vezes o comprimento do estilete, posteriormente ao ápice da região labial e anterior ao bulbo mediano. O cone do estilete é reto e, às vezes, ligeiramente curvado dorsalmente (Figura 3 D-E). O comprimento do estilete varia entre 14-18  $\mu\text{m}$  ( $15 \pm 0,2$ ), os bulbos são geralmente 'off set' e, por vezes, apresentam forma irregular. A distância do DEGO à base do

estilete é de 4-6  $\mu\text{m}$  para *M. oryzae*. (Figura 3 A, D-F) (Tabela 2). Ovos em diferentes estádios embrionários (incluindo J1 e J2) foram observados dentro dos corpos das fêmeas (Figura 1C).



Fotos:Mattos et al. (2018)

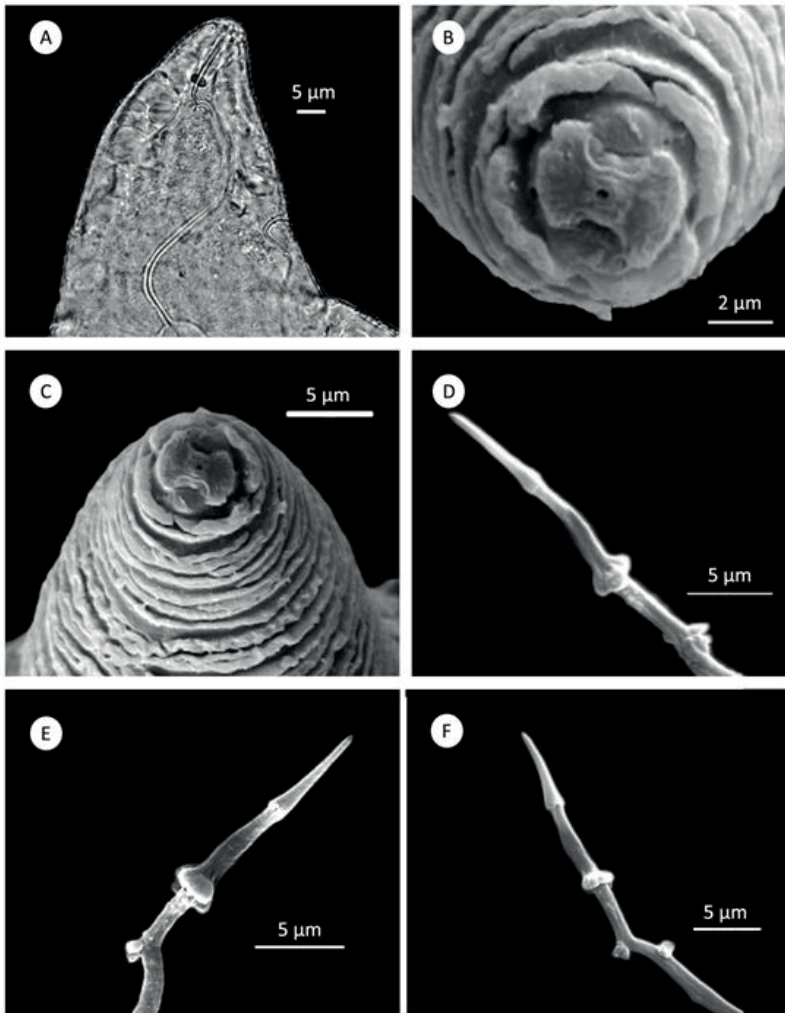
Figura 1: Micrografias de *Meloidogyne oryzae*. A- galhas induzidas por *M. oryzae* em raízes de arroz. B- Fêmea de *M. oryzae* apresentando vulva protuberante. C- Fêmea de *M. oryzae* com ovos contendo J1 e J2 retidos dentro do corpo.



Fotos:Mattos et al. (2018)

Figura 2: Padrões perineais de *Meloidogyne oryzae* do Brasil. A-C: Micrografias de microscopia de luz, mostrando variação típica para esta espécie; D:Micrografia ao MEV.



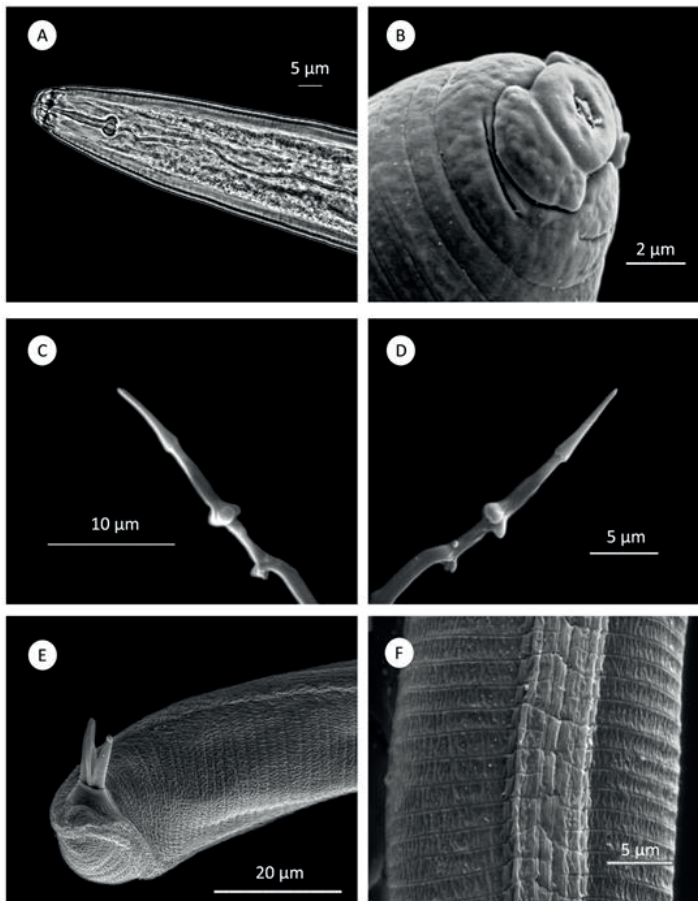


Fotos: Mattos et al. (2018)

Figura 3: Fêmeas de *Meloidogyne oryzae* do Brasil. A: Micrografia de microscopia de luz da região anterior; B e C: Micrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da região anterior; D, E e F: micrografias MEV do estilete.

**Machos:** Corpo vermiforme, região labial proeminente (Figura 4). Presença de estrias curtas e irregulares na região labial (Figura 4 B). Em MEV, o disco labial e os lábios medianos são fundidos, os lábios medianos possuem forma de âncora e são separados do disco labial por uma depressão

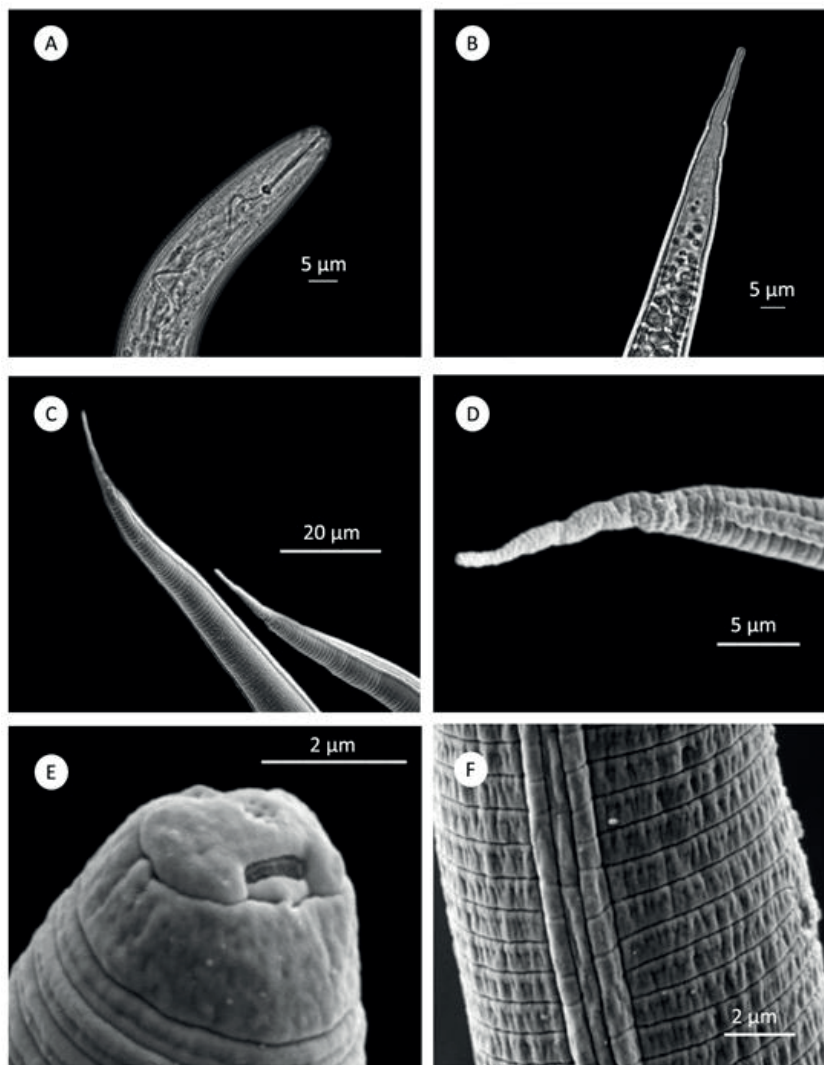
rasa, na maioria dos espécimes. Ausência de lábios laterais. O estilete é bem desenvolvido com bulbos pequenos, fundidos com a haste e arredondados posteriormente e, a parte anterior (cone) sendo um pouco menor do que a parte posterior (haste). O comprimento do estilete varia de 18-20  $\mu\text{m}$  e DEGO de 4-6  $\mu\text{m}$  para *M. oryzae*. O campo lateral ocupa cerca de 1/3 da largura corporal e consiste em 4-8 incisuras areoladas no meio do corpo, sendo mais estreitas nas partes anterior e posterior do corpo, até o final da cauda. Ao MEV é possível observar linhas não contínuas ou incisuras quebradas no campo lateral. A cauda é arredondada bruscamente com um término não estriado. Gubernáculo com comprimento de 6-9  $\mu\text{m}$ . Fasmídeos não visíveis (Figura 4 A-F).



Fotos: Mattos et al. (2018)

Figura 4: Machos de *Meloidogyne oryzae* do Brasil. A: microscopia de luz (ML) da região anterior em vista lateral; B: micrografia ao (MEV) da região anterior; C e D: micrografias ao MEV do estilete excisado; E: micrografia ao MEV da região posterior; F: Micrografia ao MEV do campo lateral.

**Juvenil de segundo estágio:** O corpo é delicado, vermiforme, afinando-se gradualmente até o final e claramente anelado (Figura 5). A região cefálica é truncada, não 'offset' e sem anelações. Disco labial e lábios medianos são fundidos, em forma de halteres. O estilete é muito fino com bulbos pequenos e ligeiramente caídos. O estilete apresenta 11-14  $\mu\text{m}$  de comprimento e o DEGO de 3-5  $\mu\text{m}$ , medidas maiores que as apresentadas para *M. graminicola*: 11-12  $\mu\text{m}$  e 2,8-3,4  $\mu\text{m}$ , respectivamente. O campo lateral consiste de quatro incisões areoladas. A cauda é muito longa, conoide e fina, afinando-se em uma porção hialina longa e estreita, com frequência, ligeiramente clavada, com região terminal claramente não estriada e duas ou três constrições cuticulares. Fasmídeos posteriores ao ânus muito pequenos, localizados em incisuras centrais dos campos laterais. O comprimento da cauda de *M. oryzae* é de 66-85  $\mu\text{m}$  e o término hialino é de 19-24  $\mu\text{m}$ . O reto é dilatado na maioria dos espécimes de *M. oryzae* (Figuras 5 A-F).



Fotos: Mattos et al. (2018)

Figura 5: Juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne oryzae* do Brasil. A: Micrografia de microscopia de luz (ML) da região anterior; B: micrografia de ML da cauda; C e D: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da cauda; E: micrografia ao MEV da região anterior; F: micrografia ao MEV do campo lateral.

## Estudos bioquímicos

As duas espécies (*M. graminicola* e *M. oryzae*) apresentaram fenótipos de esterase espécie-específicos (Figura 6), formando bandas largas com ligeiro arraste e alta atividade enzimática. *Meloidogyne graminicola* apresentou fenótipo de esterase G1 (= VS1),  $R_m = 0,70$ , estendendo-se de 0,65 a 0,75 e *M. oryzae* Est O1 ( $R_m = 1,02$ ), também se estendendo de 1,0 a 1,4, confirmando os resultados publicados por Negretti et al. (2017). O perfil N1a ( $R_m = 1,4$ ) da malato desidrogenase foi detectado em *M. graminicola* e *M. oryzae*.

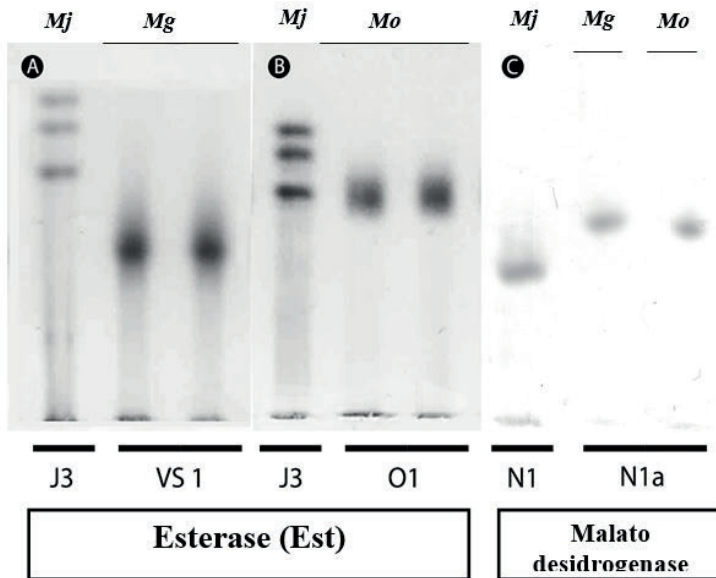


Figura 6: Fenótipos de esterase (Est) e malato desidrogenase (Mdh) observados nas populações *Meloidogyne* spp. estudadas: A: *M. graminicola* (Mg) (EstVS1 Mdh N1a); B: *M. oryzae* (Mo) (Est O1, Mdh N1a) e C: fenótipos de Mdh de *M. javanica* (N1) e *M. graminicola* e *M. oryzae* (N1a). Padrão utilizado: *M. javanica* (Mj) (Est J3, Mdh N1).

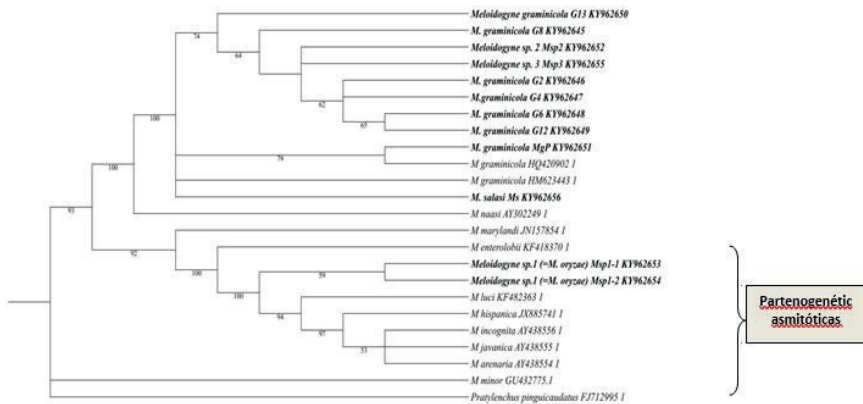
## Estudos citogenéticos

A população de *M. oryzae* do Brasil apresentou a forma triploide ( $3n = 50-56$  cromossomos), indicando um modo de reprodução partenogenético mitótico.

## Estudos moleculares

Análises filogenéticas foram utilizadas para validar os resultados obtidos com as abordagens morfológicas e isoenzimáticas, e comparando as sequências do segmento de RNAr da região ITS1-5.8S-ITS2, e o fragmento D2-D3 da 28S RNAr de espécies estreitamente relacionadas, e sequências de outras espécies de *Meloidogyne* spp., obtidas a partir do GenBank. A análise filogenética obtida para o segmento ITS1-5.8S-ITS2rRNA (Figura 7A), mostrou que as duas populações de *M. oryzae* agrupam-se em conjunto com outras espécies mitóticas obrigatórias. *Meloidogyne salasi* López, 1984 agrupou-se com populações de *M. graminicola*, *Meloidogyne* sp.2 e *Meloidogyne* sp. 3 do arroz. As espécies pertencentes ao grupo-*graminis* (*M. graminicola*, *Meloidogyne* sp.2, *Meloidogyne* sp.3, *M. salasi* e *M. naasi* Franklin, 1965) agruparam-se e separaram-se de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*. A análise para o fragmento D2-D3 do RNAr 28S (Figura 7B) apresentou uma árvore filogenética com menor variabilidade.

A



B

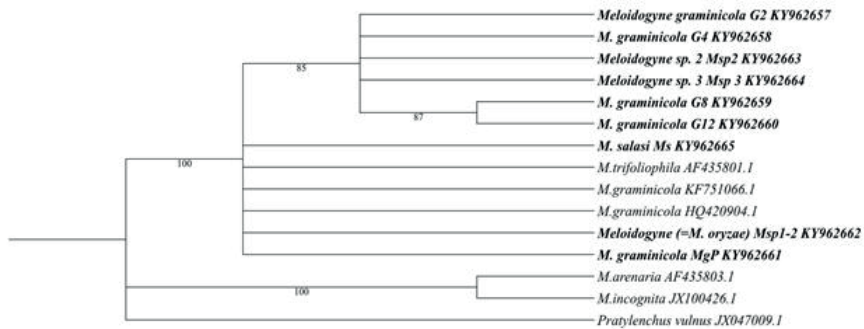


Figura 7: Árvores filogenéticas (Neighbour-joining -NJ) mostram as relações entre *Meloidogyne* spp. do arroz e outras espécies estreitamente relacionadas, com base nas sequências de RNAr de ITS1-5.8S-ITS2 (A) e sequências D2-D3 de RNAr de 28S (B). Os números ao lado esquerdo dos ramos são valores de bootstrap (em%) para 1000 repetições. As espécies em negrito correspondem às estudadas neste trabalho. *Pratylenchus pinguicaudatus* (Rensch, 1924) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 (KP995311.1) e *P. vulnus* Allen & Jensen, 1951 (JX047009.1) foram usadas como outgroups. Todas as sequências geradas neste trabalho foram depositadas no GenBank.

## Diagnóstico

Em geral, a morfologia e os dados morfométricos da população de *M. oryzae* (*Mo*) do Brasil foram semelhantes aos da descrição original dessa espécie (Maas et al., 1978), com variações frequentes e esperadas dentro do gênero *Meloidogyne*. A população do Brasil apresentou menor comprimento do J2 e do macho em comparação com a população do Suriname, mas as outras medidas encontram-se nos intervalos descritos para *M. oryzae* (Tabela 2). Os bulbos do estilete dos isolados do Brasil são semelhantes à descrição de Jepson (1987) para o isolado do Suriname. A região cefálica da fêmea de *M. oryzae* é distintamente 'off-set' e com a presença de anelação bem visível e saliente, presentes nas populações do Brasil e do Suriname (Maas et al., 1978). Em vista lateral dos machos, pode-se observar um a três anéis na região pós-labial cefálica em ambas as populações (Maas et al., 1978). O estilete de machos apresenta bulbos 'set-off' e formato arredondado a

transversalmente ovoide, em populações do Brasil e do Suriname (Jepson, 1987). Campo lateral dos machos com 4 a 8 incisuras areoladas e quebradas, no meio do corpo, em ambas as populações (Maas et al., 1978). Em juvenis de segundo estágio (J2) de *M. oryzae*, observou-se reto dilatado, em populações do Brasil e do Suriname (Maas et al., 1978). Juvenis de segundo estágio apresentam cauda longa e a porção hialina da cauda muito estreita e alongada. Essa é a característica mais importante para caracterizar *M. oryzae* (Maas et al., 1978; Jepson, 1987). Ambas as populações apresentaram também  $3n = 51-55$  cromossomos, sugerindo um modo partenogenético obrigatório de reprodução como foi reportado para a população do Suriname (Eisenback; Triantaphyllou, 1991). Além disso, embora presentes, os machos não foram frequentes. O fenótipo de esterase (Est O1) foi caracterizado para a população do Brasil (Figura 5), e não claramente para a população do Suriname (Esbenshade; Triantaphyllou, 1985; Carneiro et al., 2000). Dúvidas sobre o estado taxonômico da população *M. oryzae* do Suriname estudada por Carneiro et al. (2000) foram discutidos por Negretti et al., 2017.

## Discussão

---

As espécies de NG encontradas no arroz têm sido geralmente consideradas como *M. graminicola* com base, em grande parte, nos sintomas (galhas em forma de gancho produzidas em raízes de arroz) e na capacidade dessa espécie parasitar arroz irrigado. Contudo, ainda não existem informações detalhadas sobre a identidade e a variabilidade dos nematoides das galhas nessa cultura. A identificação precisa de nematoides é importante e essencial para a compreensão das relações hospedeiro-parasita, e a implementação de métodos de manejo apropriados. Os métodos tradicionais de identificação de NG associados ao arroz baseiam-se na morfologia (Eisenback; Triantaphyllou, 1991; Jepson, 1987) e nos fenótipos de esterase (Esbenshade; Triantaphyllou, 1985; Carneiro et al., 2000) ou



em marcadores moleculares (Bellafiore et al., 2015). No entanto, estes três métodos isoladamente não são suficientes para identificar espécies de NG do arroz, especialmente, se um complexo de espécies está ocorrendo em um mesmo campo de cultivo (Negretti et al., 2017).

A morfologia da cauda do J2 de *M. oryzae* coloca a espécie no Grupo 11 de classificação, de acordo com Jepson (1987), que inclui atualmente nove espécies que parasitam o arroz e apresentam comprimento diferencial da porção hialina da cauda: *M. graminicola* (17,9 µm), *M. graminis* (Sledge; Golden, 1964) Whitehead, 1968 (18,5 µm), *M. hainanensis* Liao e Feng, 1995 (15,3 µm), *M. lini* Yang, Hu e Xu, 1988 (~ 14,0 µm), *M. salasi* (19,7 µm), *M. marylandi* Jepson e Golden, 1987 (11,8 µm) e, finalmente, a mais longa em *M. oryzae* (22,0 µm). A maioria dessas espécies do arroz foi descrita de maneira incompleta e inadequadamente caracterizada (citogenética, enzimática e molecularmente), com exceção de *M. graminicola*, *M. graminis* e *M. marylandi*. Alguns caracteres morfológicos e biológicos são comuns nessas espécies, como: corpo da fêmea alongado, vulva, por vezes, situada numa protuberância posterior, associação com um modo de reprodução anfimítico ou partenogenético meiótico, semi-endoparasitismo, com machos abundantes, ou partenogênese mitótica, com machos raros e fêmeas embebidas nas raízes da hospedeira como é o caso único de *M. oryzae* (Jepson, 1987).

As espécies de *Meloidogyne* com uma região perineal elevada e vulva protuberante, como *M. oryzae*, foram previamente incluídas no gênero *Hypsoperine*. Esse gênero foi proposto por Sledge e Golden em 1964 (Coetzee, 1956) para *Hypsoperine graminis*, como espécie-tipo e para *H. acronea* Coetzee, 1956 (Araki, 1992). Estes autores e Page (1985) acreditavam que o novo gênero *Hypsoperine* ocupava uma posição entre *Heterodera* e *Meloidogyne* e apresentava fêmeas com ovos, contendo J1, J2 e J2 eclodido dentro dos corpos, confirmando nossas observações para fêmeas de *M. oryzae*. No entanto, a posição taxonômica do gênero esteve incerta por muitos anos. Siddiqi (2000) sinonimizou *Hypsoperine* com *Meloidogyne*. Recentemente, estudos filogenéticos da região 18S colocaram *M. spartinae* (= *H. spartinae*) dentro do gênero *Meloidogyne*, o que mostrou que *Hypsoperine* é um sinônimo júnior de *Meloidogyne* (Plantard et al., 2007).

Em pesquisa recente no sul do Brasil, cinquenta e seis populações de *Meloidogyne* spp. foram detectadas em 48% das amostras de arroz, *Meloidogyne* sp. 1 (= *M. oryzae*) ocorreu em 62,5% das amostras, frequentemente em mistura com outras espécies (Negretti et al., 2017), e *M. graminicola* foi a mais distribuída. Neste estudo, foram realizadas análises filogenéticas, com sequências da região do RNAr (ITS) para inferir a relação filogenética dessas populações de espécies atípicas de *Meloidogyne* spp. As populações de *M. oryzae* agruparam-se com as espécies partenogênicas mitóticas, enquanto *M. graminicola* agrupou-se com outras espécies partenogênicas meióticas, confirmando os resultados obtidos por Negretti et al. (2017).

Em geral, a morfologia e os dados morfométricos da população de *M. oryzae* do Brasil foram semelhantes aos da descrição original de *M. oryzae* (Maas et al., 1978; Jepson, 1987), com variações esperadas frequentes no gênero *Meloidogyne*. A população do Brasil apresentou menores J2 e machos em comparação com a população-tipo do Suriname. Essa variação no comprimento do corpo pode ocorrer em populações da mesma espécie. Handoo et al. (1993) observaram uma variação no comprimento da cauda e também no tamanho dos J2, entre populações de *M. sasserii*. Alguns autores consideram que características morfológicas são muito mais relevantes na caracterização de espécies do que caracteres morfométricos (Eisenback; Triantaphyllou, 1991). Considerando estes aspectos, a população de *M. oryzae* coletada no Brasil mostrou-se muito próxima da população de *M. oryzae* detectada no Suriname.

Bioquimicamente, *M. oryzae* e *M. graminicola* do Brasil apresentam perfis de esterase distintos, ambas com grande concentração da enzima, mas em posições diferentes. Este fenótipo parece ser novo e específico para *M. oryzae*, que nunca foi caracterizado precisamente (Esbenshade; Triantaphyllou; 1985, Carneiro et al., 2000). Estes autores relataram anteriormente uma alta atividade enzimática nos fenótipos de *M. oryzae* e *M. graminicola*, mas mostrando uma posição de migração próxima.

*Meloidogyne oryzae* é bem adaptada ao sistema de arroz irrigado e reproduz-se também em tomate (incluindo a população do Brasil), diferente de *M. graminicola* (Golden; Birchfield 1965). Há evidências de que as populações

de *M. oryzae* estudadas neste trabalho reproduzem-se por partenogênese mitótica, apresentam 50-56 cromossomos e agruparam-se com populações mitóticas na árvore filogenética de ITS, confirmando os resultados obtidos por Esbenshade e Triantaphyllou (1985) e Negretti et al. (2017) e corroborando a contradição entre filogenia e partenogênese mitótica observada em *M. oryzae* por Castagnone-Sereno et al. (2013).

A árvore de filogenética utilizando a região D2D3 mostra uma baixa variabilidade entre as espécies comparadas. Essa região é conhecida por ser mais conservada do que a ITS como previamente relatada em outros trabalhos com *Meloidogyne* spp. (Castillo et al., 2003; Tenente et al., 2004).

## Conclusão

---

Os resultados do presente estudo deixam clara a posição taxonômica de *M. oryzae*. Foram realizados estudos morfológicos, morfométricos, citológicos e moleculares (Taxonomia Integrativa) para caracterizar corretamente esse nematoide, encontrado em campos de arroz no sul do Brasil. A identificação precisa de espécies de nematoides é importante para uma melhor concepção das estratégias de controle. Outros estudos devem ser realizados para elucidar aspectos agrônômicos relacionados à importância e ao manejo de *M. oryzae* na região sul do Brasil.

## Referência Bibliográfica

---

ARAKI, M. Description of *Meloidogyne ichinohei* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae) from *Iris laevigata*. **Japanese Journal of Nematology**, v. 22, p. 11-20, 1992.

BELLAFIORE, S.; JOUGLA, C.; CHAPUIS, E.; BESNARD, G.; SUONG, M.; VU, P. N.; DE WHALE, D.; GANTET, P.; THI, X. N. Intraspecific variability of the facultative meiotic parthenogenetic root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) from rice fields in Vietnam. **Comptes Rendus Biologies**, v. 338, p. 471-483, 2015.

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.; ALMEIDA, M. R. A.; QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. **Nematology**, v. 2, p. 645-654, 2000.

CARNEIRO, R. M. D. G.; CASTAGNONE-SERENO, P.; DICKSON, D. W. Variability among four populations of *Meloidogyne javanica* from Brazil. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 21, p. 319-326, 1998.

CARNEIRO, R. M. D. G.; TIGANO, M. S.; 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.

CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E. G.; PERFUS-BARBEOCH, L.; ABAD, P. Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: new insights from the genomic era. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 203-220, 2013.

CASTILLO, P.; VOVLAS, N.; SUBBOTIN, S.; TROCCOLI, A. A new root-knot nematode, *Meloidogyne baetica* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae), parasitizing wild olive in southern Spain. **Phytopathology**, v. 93, p. 1093-1102, 2003.

COETZEE, V. *Meloidogyne acronea*, a new species of root-knot nematode. **Nature**, v. 177, n. 4515, p. 899-900, 1956.

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 mirror image anatomy (Nematoda: Cephalobidae). **Nematology**, v. 1, p. 591-612, 1999.

DE WAELE, D.; ELSSEN, A. Challenges in tropical plant nematology. **Annual Review of Phytopathology**, v. 45, p. 457-485, 2007.

EISENBACK, J. D. A comparison of techniques useful for preparing nematodes for scanning electron microscopy. **Journal of Nematology**, v. 18, n. 4, p. 479-487, 1986.

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. (Ed.). **Biology and control**. Raleigh: North Carolina State University, 1985a. (An Advanced Treatise on *Meloidogyne*, 1). p. 47-77.

EISENBACK, J. D. Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. In: BARKER, K. R.; CARTER, C. C.; SASSER, J. N. (Ed.). **Methodology**. Raleigh: North Carolina State University, 1985b. (An Advanced Treatise on *Meloidogyne*, 2). p. 79-105.

EISENBACK, J. D.; HUNT, D. J. General morphology. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Ed.). **Root-knot nematodes**. Cambridge: CABI, 2009. p. 18-54.

EISENBACK, J. D.; TRIANTAPHYLLOU, H. H. Root-knot nematode: *Meloidogyne* spp. and races. In: NICKLE, W. R. (Ed.). **Manual of agricultural nematology**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 191-274.

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

GOLDEN, A. M.; BIRCHFIELD, W. *Meloidogyne graminicola* (Heteroderidae), a new species of root-knot nematode from grass. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 32, p. 228-231, 1965.

HANDOO, Z. A.; HUETTEL, R. N.; GOLDEN, A. M. Description and SEM observations of *Meloidogyne sasseri* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), parasitizing beachgrasses. **Journal of Nematology**, v. 25, p. 628-641, 1993.

JEPSON, S. B. **Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species)**. Wallingford: CABI, 1987.

MAAS, P. W. T.; SANDERS, H.; DEDE, J. *Meloidogyne oryzae* n. sp. (Nematoda, Meloidogynidae) infesting irrigated rice in Surinam (South America). **Nematologica**, v. 24, p. 305-311, 1978.

MATTOS, V. da S.; SOARES, M. R. S.; GOMES, A. C. M. M.; ARIEIRA,

C. R. D.; GOMES, C. B.; CARNEIRO, R. M. D. G. **Caracterização de um complexo de espécies do nematoide das galhas parasitando arroz irrigado na Região Sul do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2017. 30 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 331).

MATTOS, V. S. da; CARES, J. E.; GOMES, C. B.; GOMES, A. C. M. M.; MONTEIRO, J. da M. dos S.; GOMEZ, G. M.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R. M. D. G. Integrative taxonomy of *Meloidogyne oryzae* (Nematoda: Meloidogyninae) parasitizing rice crops in Southern Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 151, n. 3, p. 649-662, 2018.

NEGRETTI, R. R. R. D.; GOMES, C. B.; MATTOS, V. S.; SOMAVILLA, L.; MANICA-BERTA, R.; AGOSTINETTO, D.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R. M. D. G. Characterisation of a *Meloidogyne* species complex parasitising rice in Southern Brazil. **Nematology**, v. 20, n. 4, p. 403-412, 2017.

PAGE, S. L. J. *Meloidogyne acronea*. In: **CIH descriptions of plant-parasitic nematodes**. Farnham Royal, UK: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1985. Set 8, No.114.

PLANTARD, O.; VALETTE, S.; GROSS, M. F. The root-knot nematode producing galls on *Spartina alterniflora* belongs to the genus *Meloidogyne*: rejection of *Hypsoperine* and *Spartonema* spp. **Journal of Nematology**, v. 39, p. 127-132, 2007.

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.

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.

SCHMITZ, B.; BURGERMEISTER, W.; BRAASCH, H. Molecular genetic classification of Central European *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax* populations. **Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes**, v. 50, p. 310-317, 1998.

SIDDIQI, M. R. **Tylenchida: parasites of plants and insects**. Wallingford: CABI, 2000.

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

SWOFFORD, D. L. **PAUP**: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Sinauer Associates, Massachusetts, 2002. Version 4b10.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

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

TENENTE, G. C. M. V.; DE LEY, P.; DE LEY, I. T.; KARSSSEN, G.; VANFLETEREN, J. R. Sequence analysis of the D2/D3 region of the large subunit rDNA from different *Meloidogyne* isolates. **Nematopica**, v. 34, p. 1-12, 2004.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIK, 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.

TIGANO, M. S.; CARNEIRO, R. M.; JEYAPRAKASH, A.; DICKSON, D. W.; ADAMS, B. J. Phylogeny of *Meloidogyne* spp. based on 18S rDNA and the intergenic region of mitochondrial DNA sequences. **Nematology**, v. 7, n. 6, p. 851-862, 2005.

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. (Ed.). **Methodology**. Raleigh: North Carolina State University, 1985. (An Advanced Treatise on Meloidogyne, 2). p. 107-114.

WHITEHEAD, A. G.; HEMMING, J. R. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. **Annals of Applied Biology**, v. 55, n. 1, p. 25-38, 1965.



---

*Recursos Genéticos e  
Biotecnologia*

MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA  
**BRASIL**  
GOVERNO FEDERAL