

Taxonomia integrativa de *Meloidogyne
ottersoni* (Thorne, 1969) Franklin,
1971 (Nematoda: Meloidogynidae)
parasitando arroz irrigado no Brasil



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

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
372**

**Taxonomia integrativa de *Meloidogyne
ottersoni* (Thorne, 1969) Franklin,
1971 (Nematoda: Meloidogynidae)
parasitando arroz irrigado no Brasil**

*Raycenne Rosa Leite
Vanessa da Silva Mattos
Ana Cristina Meneses Mendes Gomes
Daniela Aguiar de Souza
Leandro Grimaldi Py
Juvenil Enrique Cares
Philippe Castagnone-Sereno
Regina Maria Dechechi Giovannetti Dechechi*

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2021**

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 Sanches; Sérgio Eustáquio de Noronha

Supervisão editorial
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Revisão de texto
Regina M. D. G. Dechechi

Normalização bibliográfica
Rosameres Rocha Galvão - (CRB/MG 2122)

Tratamento das ilustrações
Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Adilson Werneck

Foto da capa
Leandro Py

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 ottersoni* (THORNE, 1969) FRANKLIN, 1971 (Nematoda: Meloidogynidae) parasitando arroz irrigado no Brasil / Raycenne Rosa Leite et al. ... – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2021.

43p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 372).

ISSN: 0102-0110

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader Modo de

Acesso: World Wide Web

1. Fenótipo de esterase. 2. Nematóide das galhas. 3. *Oryza* 4. D2D3 I. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. IX. Série.

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	9
Resultados.....	13
Discussão	28
Conclusão.....	33
Referência Bibliográfica.....	34

Taxonomia integrativa de *Meloidogyne ottersoni* (Thorne, 1969) Franklin, 1971 (Nematoda: Meloidogynidae) parasitando arroz irrigado no Brasil)

Raycenne Rosa Leite¹

Vanessa da Silva Mattos²

Ana Cristina Meneses Mendes Gomes³

Daniela Aguiar de Souza⁴

Leandro Grimaldi Py⁵

Juvenil Enrique Cares⁶

Philippe Castagnone-Sereno⁷

Regina Maria Dechechi Giovannetti Dechechi⁸

Resumo – O presente estudo identificou como *Meloidogyne ottersoni* (Thorne, 1969) Franklin, 1971 uma espécie críptica de nematoide das galhas (NG) parasitando arroz (*Oryza sativa*) e causando danos e perdas de produção nos estados brasileiros de Santa Catarina (SC), Rio Grande do Sul (RS) e Paraná (PR). A espécie foi redescrita usando a população brasileira de Meleiro (Santa Catarina) e comparada com a descrição de *M. ottersoni* de Wind Lake (Wisconsin, EUA), com adição de caracterização morfológica, bioquímica e molecular. As fêmeas e os machos possuem estiletos menores: 9-13 µm, 14-16 µm, respectivamente, quando comparados com *M. graminicola*: 12-14 µm, 16-18 µm e *M. oryzae*: 14-16 µm, 18-20 µm. *Meloidogyne ottersoni* apresenta

¹ Engenheira agrônoma, doutora em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

² Engenheira agrônoma, doutora em Fitopatologia, pesquisadora em Nematologia da Empresa Scientia Terrae, Sint-Katelijne-Waver, Bélgica.

³ Bióloga, mestre em Produção Vegetal, analista da Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília..

⁴ Bióloga, doutorado em Ciências, analista da Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília.

⁵ Engenheiro Agrônomo, representante técnico comercial da FMC Química do Brasil, Uberaba, MG.

⁶ Engenheiro Agrônomo, doutor em Fitopatologia, Professor pela Universidade de Brasília Brasília, DF

⁷ Engenheiro Agrônomo, PhD em Fitopatologia, pesquisador sênior - INRA, Sophia Antipolis, FR.

⁸ Engenheira Agrônoma, doutora em Parasitologia, pesquisadora da Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília.

padrões perineais localizados ao redor de uma ligeira protuberância na porção terminal do corpo. As estrias são em sua maioria contínuas, nunca cortadas por estrias transversais irregulares, como frequentemente observado em *M. graminicola* e *M. oryzae*. *Meloidogyne ottersoni* pertence ao grupo 11 dos NG descrito por Jepson (1987), a reprodução é por partenogênese meiótica e o número somático de cromossomos é 18. A cauda dos juvenis de segundo estágio é muito longa e fina, e se afunila em um longo e estreito término hialino irregular (*M. ottersoni*, 20,5 µm vs. *M. graminicola*, 17,9 µm e *M. oryzae*, 22,0 µm, respectivamente). A capacidade da população brasileira de *M. ottersoni* de parasitar alpiste vermelho, *Phalaris arundinacea* (hospedeiro tipo) e capim-arroz, *Echinochloa crus-galli* foi confirmada. Bioquimicamente, o perfil de esterase de *M. ottersoni* não possui banda (Est Ot0, Rm = 0), o que o diferencia de *M. graminicola* e *M. oryzae* (Est VS1, Rm=0,70 e Est O1, Rm=1,02, respectivamente). Na análise de máxima verossimilhança das sequências de ITS, D2D3 rDNA e COXII mtDNA, as quatro populações de *M. ottersoni* (= *Meloidogyne* sp.0) dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina se agruparam e foram separadas de outras espécies de *Meloidogyne*, confirmando que todas as populações estudadas são muito semelhantes e conspécificas.

Termos para indexação: COXII, D2D3, fenótipo de esterase, ITS, morfologia, nematoide das galhas, *Oryza*.

Integrative taxonomy of *Meloidogyne ottersoni* (Thorne, 1969) franklin 1971 (Nematoda: meloidogynidae) parasitizing irrigated rice in Brazils

Abstract – An atypical root-knot nematode species (RKN) parasitizing and causing damage to rice (*Oryza sativa*) in Santa Catarina (SC), Rio Grande do Sul (RS) and Paraná (PR) states (Brazil) was identified as *Meloidogyne ottersoni* (Thorne, 1969) Franklin, 1971, a cryptic root-knot nematode (RKN) species. The species was redescribed from specimens collected in Brazilian rice field (Meleiro-SC) and compared with the original description of *M. ottersoni* (Wind Lake, WI, USA) with additional morphological, biochemical and molecular data. The female and male bear smaller stylets: 9-13 µm, 14-16 µm, respectively, when compared with *M. graminicola*: 12-14 µm, 16-18 µm,

and *M. oryzae*: 14-16 μm , 18-20 μm . *Meloidogyne ottersoni* presents perineal patterns located on the contour of a slight protuberance at the body end. Striae are mostly continuous, never raised by transverse irregular striae, as frequently observed in *M. graminicola* and *M. oryzae*. *Meloidogyne ottersoni* belongs to the RKN group 11 described by Jepson (1987), it reproduction by meiotic parthenogenesis, with $n=18$ somatic chromosomes. The tail of second-stage juveniles is very long and thin, and tapers to a long, narrow, irregular hyaline terminus (*M. ottersoni*, 20.5 μm vs. *M. graminicola*, 17.9 μm and *M. oryzae*, 22.0 μm , respectively). *Meloidogyne ottersoni* from Brazil was able to parasitize canary grass, *Phalaris arundinacea* (type host) and barnyard grass: *Echinochloa crus-galli*. Biochemically, the esterase profile of *M. ottersoni* lacks any band (Est Ot0, Rm=0), which differentiates it from *M. graminicola* and *M. oryzae* (Est VS1, Rm=0.70 and Est O1, Rm=1.02, respectively). In the analysis of maximum likelihood of the sequences of ITS, D2D3 rDNA and COXII mtDNA, the four populations of *M. ottersoni* (*Meloidogyne* sp. 0) from the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina were grouped and were separated from other species of *Meloidogyne*, confirming that all populations studied are very similar and conspecific.

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

Introdução

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

Vários fatores podem interferir no rendimento da cultura de arroz, incluindo nematoides. Cerca de 35 gêneros de nematoides foram observados parasitando plantas de arroz, mas poucas espécies foram descritas como capazes de causar danos significativos (Khan, 2015). Em particular, o sistema

de arroz irrigado determina a comunidade de nematoides fitoparasitas, selecionando os mais adaptados, e vários autores relataram a predominância de *Meloidogyne graminicola* Golden & Birchfield, 1965 nesse sistema de cultivo (De Waele; Elsen, 2007; Khan, 2015).

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

Na pesquisa realizada por Mattos et al. (2017), outra espécie críptica denominada provisoriamente de *Meloidogyne* sp.0, foi detectada e caracterizou-se pela ausência de bandas de esterase, provavelmente devido a fraca concentração da enzima. Nesse mesmo trabalho, essa espécie foi detectada em quatro municípios de três estados do sul do Brasil: Capão do Leão (RS), Meleiro (SC), Nova Veneza (SC) e Santa Cruz de Monte Castelo (PR) (Mattos et al., 2017). A identificação de espécies crípticas de *Meloidogyne* não é uma tarefa fácil, considerando o grande número de espécies pertencentes ao gênero, sua distribuição mundial e sua ampla gama de hospedeiros. A semelhança morfológica entre as espécies também é um fator que dificulta a identificação, pois as diferenças interespecíficas e intraespecíficas são muito sutis (Jepson, 1987; Karssen; Moens, 2006; Moens et al., 2009). Por outro lado, métodos moleculares têm contribuído

para o sucesso na identificação de espécies de *Meloidogyne*. Em particular, para *M. graminicola*, sequências de DNA ribossômico nuclear (rDNA) e mitocondrial (mtDNA) têm sido amplamente aplicadas (Pokharel et al., 2007, 2010; McClure et al., 2012; Bellafiore et al., 2015; Htay et al., 2016) para diagnosticar essa espécie. Recentemente, dois marcadores SCAR foram propostos para diagnose de *M. graminicola* (Bellafiore et al., 2015; Mattos et al., 2019) e também para *M. oryzae* e *M. salasi* Lopez, 1984 (Mattos et al., 2019).

Considerando a frequente ocorrência da espécie críptica *Meloidogyne* sp.0 em Santa Catarina (Mattos et al., 2017), em condições de campo, foi objetivo deste estudo identificar e caracterizar essa espécie desconhecida usando uma abordagem taxonômica integrativa, com base nas diferenças morfológicas, morfométricas, citogenética e moleculares em comparação com outras espécies de *Meloidogyne* do 'grupo *graminis*'. Dessa maneira, identificou-se *Meloidogyne* sp.0 como *M. ottersoni* (Thorne, 1969) Franklin, 1971, sendo relatada sua primeira ocorrência no Brasil, em arroz irrigado na região sul.

Material e Métodos

Quatro populações puras de NG (Capão do Leão-RS (Ot 1); Nova Veneza-SC (Ot 2 e Ot 3) e Meleiro-SC (Ot 4) exibindo fenótipo de esterese sem banda (*Meloidogyne* sp.0, Rm = 0) coletadas em arrozais dos estados do RS e SC foram multiplicadas em plantas de arroz, *O. sativa* (IRGA-410 e IRGA-424), em casa de vegetação, com temperatura média diária de 15 a 28 °C. Todos os estudos bioquímicos e moleculares foram realizados usando essas quatro culturas puras (Tabela 1). Estudos morfológicos, morfométricos, citogenéticos e os ensaios em casa-de-vegetação foram realizados com a população de Meleiro, SC. Massas de ovos e fêmeas foram obtidas diretamente das raízes de arroz infectadas. Os juvenis do segundo estágio (J2) foram eclodidos em funil de Baerman adaptado (Baerman, 1917). Os machos foram obtidos colocando-se as raízes de arroz infectadas em água sob aeração usando uma bomba de aquário. Os espécimes foram coletados periodicamente da água (a cada 24 horas para J2 e 48 horas para machos)

(Carneiro et al., 1998).

Tabela 1: Populações de *Meloidogyne* sp. 0 estudados neste trabalho.

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

^a Código de populações usado no estudo.

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

^c Est: fenótipo de esterase.

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

* População utilizada nos estudos morfológicos e citogenéticos.

Estudos bioquímicos e citogenéticos

A caracterização bioquímica das quatro populações de NG foi realizada por isoenzimas em gel de poliacrilamida a 7%, em sistema de eletroforese horizontal, de acordo com Carneiro e Almeida (2001). *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 (EST J3, MDH N1) foi usado como referência. Ambas enzimas, esterase (EST) e malato desidrogenase (MDH) foram utilizadas. Os estudos citogenéticos foram realizados apenas com a população de Meleiro (SC) (Ot 4), usando o método de coloração com orceína propiônica (Triantaphyllou, 1985).

Estudos morfológicos e morfométricos

Estudos morfológicos e morfométricos foram realizados com a população de Meleiro (SC) (Ot 4) com um mínimo de 30 espécimes de cada estágio de desenvolvimento. Machos e J2 foram mortos em formaldeído a

2% gelado (5 °C), medidos e fotografados imediatamente ao microscópio óptico. Os estudos morfométricos foram realizados utilizando as medições recomendadas por Eisenback e Hunt (2009). Os estudos biométricos foram realizados com fêmeas adultas, cortadas em ácido láctico a 45% e a região cefálica montada com formaldeído a 2% à temperatura ambiente. Os cortes perineais foram montados em glicerina (Taylor; Netscher, 1974). As micrografias e medidas foram realizadas em microscópio Zeiss - Axiophot sob luz branca. Fêmeas, machos, J2 e os estiletos (de fêmeas e machos) foram preparados para microscopia eletrônica de varredura (MEV), de acordo com os métodos propostos por Eisenback (1985). As amostras foram visualizadas e fotografadas com um microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM-7001F.

Análise filogenética

Para as análises filogenéticas, duas sequências de rDNA e uma de mtDNA das quatro populações de *Meloidogyne* sp.0 de arroz, originárias do Brasil foram amplificadas pela região ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA [conjunto de primers: forward 5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3' e reverse 5'-TCCTCCGCTAAATGATATG-3'; Schmitz et al. (1998)]; o fragmento D2-D3 do gene 28S rRNA [conjunto de primers: forward 5'-ACAAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3' e reverse 5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'; De Ley et al. (1999)]; e a porção 3' de COXII e a 5' de 16S rRNA da região mitocondrial de 16S rRNA [conjunto de primers: forward 5'-GGTCAATGTTCAGAAATTTGGG-3' e reverse 5'-TACCTTTGACCAATCACGCT-3'; Powers e Harris, (1993)], usando as condições de PCR descritas por Subbotin et al. (2000). Os produtos de PCR foram purificados usando o kit Wizard® SV Gel / PCR (Promega) e clonados no pGem-T® Easy Vector (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Dois fragmentos independentes foram clonados e sequenciados pela Macrogen, Coreia do Sul.

As sequências clonadas foram alinhadas usando o ClustalW no Mega 5.0.3 (Tamura et al., 2011) e comparadas com outras sequências recuperadas do banco de dados NCBI. O programa MrModeltest (Nylander, 2004) implementado no PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony; v.4.0 b10)

foi usado para identificar os melhores modelos de cada análise. As árvores filogenéticas foram geradas com base na análise de máxima verossimilhança (ML) em IQtree (Trifinopoulos et al., 2016). A confiabilidade dos nós da árvore filogenética foi checada via bootstrap com 1.000 simulações e apenas valores de suporte acima de 50% foram considerados.

Análises filogenéticas foram conduzidas para validar os resultados obtidos com abordagens morfológicas e enzimáticas, através de comparação de sequências ITS1-5.8S-ITS2 rRNA, região D2-D3 28S do rRNA e a sequência parcial da região mitocondrial entre os genes COXII e 16S rRNA das populações de *Meloidogyne* sp.0 (Ot 1, Ot 2, Ot 3 e Ot 4) com sequências homólogas de outras espécies de *Meloidogyne* obtidas do GenBank.

Teste na hospedeira tipo

Com o objetivo de verificar a hospedabilidade de alpiste vermelho (*Phalaris arundinacea* L.) a *Meloidogyne* sp.0 (Ot 4) (= *M. orttersoni*); sementes desta planta obtidas da Cobase – Embrapa Cenargen foram germinadas em vasos de 3 litros. Mudas de 5 cm de comprimento foram inoculadas com 5.000 ovos de *Meloidogyne* sp.0 (Ot 4) (Meleiro – SC) e mantidas em casa de vegetação, a uma temperatura média de 15 e 25 °C, com irrigação e adubação, conforme necessário. Cinquenta dias após a inoculação (DAI), as raízes foram lavadas cuidadosamente com água corrente, coradas com fucsina ácida (Byrd et al., 1983) e observadas em microscópio estereoscópico para documentar a penetração de J2, o desenvolvimento de fêmeas e massas de ovos dentro das raízes. Não houve delineamento estatístico, pois, foi apenas uma observação direcionada ao parasitismo da espécie em questão sobre a hospedeira tipo, alpiste.

Hospedabilidade de outras plantas

A hospedabilidade de *Meloidogyne* sp.0 (= *M. orttersoni*) foi avaliada em outras plantas: milho, trigo, milheto, braquiária, feijão caupi, aveia branca, aveia preta, cevada, azevém italiano, soja, capim-mombaça, capim-arroz, arroz de selva, alpiste vermelho, tomate e na cultivar de arroz IRGA 424 (controle positivo). As sementes foram germinadas em vasos de 3 litros. Todas

as plantas (5/tratamento) foram inoculadas com 10.000 ovos de *Meloidogyne* sp.0 (Meleiro – SC) e mantidas em casa de vegetação por 60 dias, à temperatura média diária de 25 a 30 °C, com irrigação e adubação, conforme necessário. O delineamento estatístico adotado foi inteiramente casualizado com cinco repetições. Após o período de multiplicação dos nematoides, os sistemas radiculares foram enxaguados em água corrente, pesados e os ovos dos nematoides extraídos usando 1% de NaClO de acordo com metodologia de Hussey; Barker (1973), usando liquidificador por 30 segundos. O número total de ovos por planta foi determinado sob microscópio ótico, em lâmina de Peter.

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

Resultados

Estudos bioquímicos e citológicos

As análises enzimáticas (Tabela 1) revelaram a ausência de banda de esterase ($R_m = 0$) para as quatro populações de *Meloidogyne* sp. 0. Essa observação foi reforçada usando o macerado de mais de 20 fêmeas em cada análise individual (Fig. 1). Para a enzima Mdh, o fenótipo obtido foi N1a ($R_m = 1,4$), o mesmo das espécies *M. graminicola*, *M. oryzae* e *M. naasi* (Esbenshade, 1985). A reprodução de *Meloidogyne* sp.0 é por partenogênese meiótica e o número de cromossomos somáticos é 18 (Fig. 2).

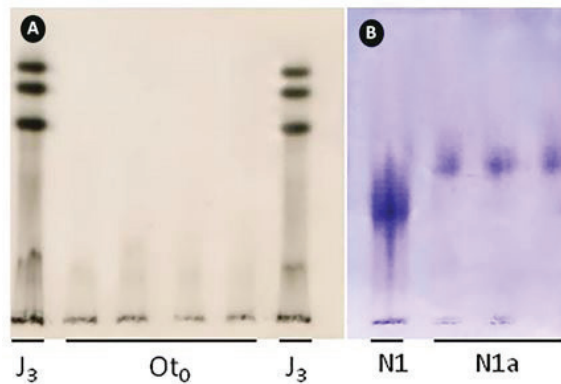


Figura 1. Fenótipos de esterase (a) e malato desidrogenase (b) de *Meloidogyne ottersoni* (Ot0, N1A). *Meloidogyne javanica* (J3, N1) foi utilizado como referência.

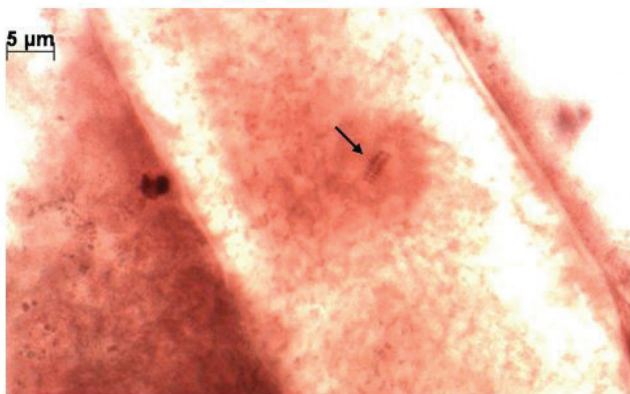


Figura 2. Micrografia ótica dos cromossomos de *Meloidogyne ottersoni* corados com orceína (seta).

Estudos morfológicos e morfométricos

Fêmeas. As medidas de 30 fêmeas são apresentadas na Tabela 2. O corpo é variável em forma e tamanho (668,9 μm, variando entre 410-960 μm), geralmente em formato oval, de pera ou alongada, branco translúcido, comprimento de pescoço variável (92,2 μm, variando 78-118 μm) projetando-se em diferentes ângulos, região vulvar e ânus geralmente com protuberância leve (Fig. 3 a, b), embora as vezes essa elevação não esteja

presente. Padrões perineais arredondados/ovais dorsoventralmente, com estrias predominantemente contínuas e sem marcas de linhas laterais (Fig. 3 a-f), estrias grossas, arco dorsal baixo e arredondado. Região perivulvar geralmente livre de estrias e nenhuma estria acima do ânus. Nenhuma pontuação observada. Término da cauda e campos laterais não claramente definidos e fasmídeos distintos. Região ventral arredondada. Poro excretor localizado a dois estiletos de distância ou menos abaixo da extremidade da região cefálica (26,88 μm) (Fig. 4 a, f). Ao MEV (Fig. 4 b, c), disco labial fundido com os lábios medianos, formando uma região cefálica contínua. Lábios laterais distintos e triangulares. Anfídeos levemente ovais, localizados sobre os lábios laterais, as vezes contínuos com o primeiro anel claramente demarcado (Fig. 4 b, c). Estilete robusto (11,4 μm , 9-13 μm), cone reto ou ligeiramente curvado dorsalmente e aumentando gradualmente o diâmetro na parte posterior. A haste se alarga gradualmente na parte posterior próximo a junção com os bulbos do estilete, que são arredondados e destacados da haste (Fig. 4 d, e). O orifício da glândula dorsal (DGO) está 4,4 μm (3-6 μm) da base do estilete.

Tabela 1. Dados morfométricos de fêmeas, machos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* sp. 0 (Ot 4)(= *M. ottersoni*) do Brasil. Todas as medidas estão em μm ; média \pm , desvio padrão, valor mínimo e máximo entre parênteses, coeficiente de variação em %.

Característica	Fêmea	Macho	J2
N	30	30	30
Comprimento do corpo (L)	668,9 \pm 134,77 (410-960) 20,15	1188,62 \pm 195,90 (760-1430) 16,48	474,20 \pm 45,66 (400-550) 9,63
Diâmetro do corpo	503,06 \pm 95,22 (230-700) 21,70	43,76 \pm 7,20 (30-60) 16,45	19,94 \pm 0,36 (19-21) 1,80
Comprimento do pescoço	92,23 \pm 9,67 (78-118) 10,48	-	-
Comprimento / Diam. (a)	1,35 \pm 0,21 (0,95-1,78) 15,42	27,81 \pm 6,21 (15,33-42,33) 22,32	23,83 \pm 2,27 (20,5-27,9) 9,51
Comprimento do corpo / comprimento da cauda (c)	-	129,97 \pm 31,82 (66,67-197,14) 24,48	6,94 \pm 0,70 (5,71-8,33) 10,15

Comprimento do estilete	11,40 ±1,37 (9-13) 12,03	15,91 ±1,41 (13-19) 8,89	10,74 ±0,93 (9-13) 8,66
Altura do bulbo do estilete	2,1 ±0,28 (2-3) 13,48	2,4 ±0,49 (2-3) 20,40	1,82 ±0,38 (1-2) 20,71
Largura do bulbo do estilete	3,43 ±0,50 (3-4) 14,70	4,17 ±0,66 (3-5) 15,78	2,24 ±0,43 (2-3) 18,99
DEGO	4,36 ±0,78 (3-6) 17,90	4,38 ±0,78 (3-6) 17,70	3,87 ±0,88 (2-5) 22,86
Distância do poro excretor à extremidade anterior	26,88 ±3,17 (21-32) 11,78	92,55 ±13,88 (51-114) 15,00	73,19 ±5,19 (63-80) 7,09
Fenda da vulva	24,07 ±1,62 (21-28) 6,71	-	-
Distância vulva - ânus	16,96 ±1,81 (15-20) 10,66	-	-
Distância interfasmídeos	17,09 ±3,32 (12-24) 19,44	-	-
Comprimento da cauda	-	9,45 ±1,82 (7-14) 19,31	69,04 ±3,3 (62-76) 4,78
Região hialina da cauda	-	-	20,52 ±2,42 (15-26) 11,79
Comprimento do espículo	-	25,41 ±3,94 (16-30) 15,52	-
Gubernáculo	-	7,1 ±1,0 (5-9) 14,03	-

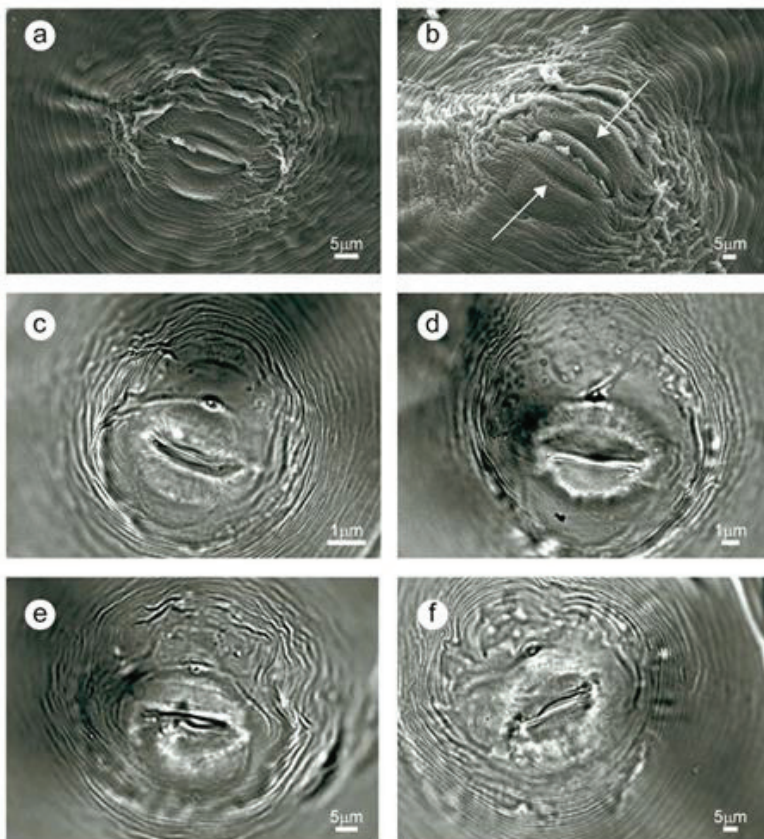


Figura 3. Micrografias óticas (MO) e eletrônicas (MEV) de padrões perineais de fêmeas de *Meloidogyne* sp. 0 (= *M. orttersoni*) a, b: Micrografia eletrônica de varredura (MEV); c-f: Micrografia ótica. Setas mostrando ligeira protuberância da região vulvar.

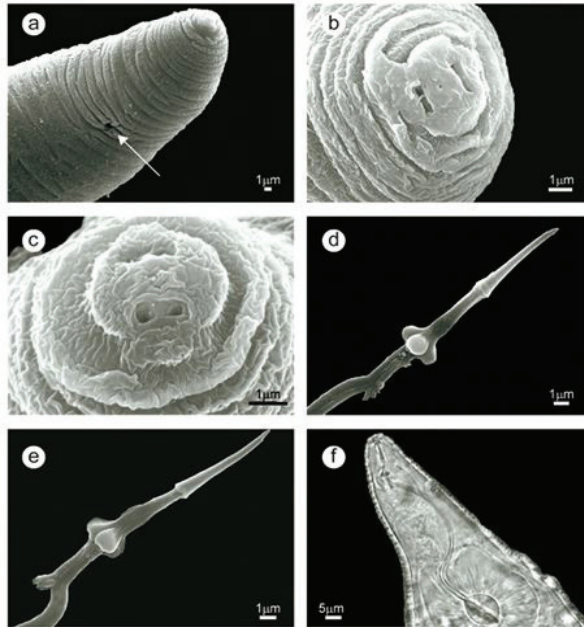


Figura 4. Micrografias óticas (MO) e eletrônicas (ME) de fêmeas de *Meloidogyne* sp. 0 (= *M. orttersoni*). a-e: Micrografia eletrônica de varredura (MEV) da região anterior (a-c) e estiletes (d, e). Micrografia ótica (MO) da região anterior (f). Seta mostrando o poro excretor da fêmea.

Machos. As medidas de 30 machos são mostradas na Tabela 1. Corpo vermiforme, de tamanho variável (1.188,6 μm , variando entre 760-1.430 μm), afinando na região cefálica, forma da cauda variável, às vezes com uma expansão (Fig. 5 f), geralmente com uma torção em um ângulo de 90°. As anulações cuticulares são grosseiras (Fig. 5 a-c). Região cefálica alta, arredondada, em forma de cúpula; região cefálica distinta do primeiro anel do corpo, sem (Fig. 5 a, d) ou com algumas anelações fracas (Fig. 5 b, c) ao MEV. Disco labial e lábios medianos fundidos formando uma região cefálica suave e contínua (Fig. 5 a-d). Disco labial ligeiramente elevado acima dos lábios medianos. Lábios laterais marcados ou não na região anterior (Fig. 5 a-d). Aberturas anfidiais formando fendas alongadas (Fig. 5 a-d). Estilete robusto (15,9 μm , variando entre 13-19 μm), cone apontado para a ponta, alargando na junção com a haste, que é cilíndrica. Bulbos do estilete de formato redondos a oval, inclinados para trás (Fig. 5 h, i). Canal excretor proeminente com torção irregularmente visível até o final da projeção da

glândula. A distância do orifício da glândula dorsal até a base do estilete (DEGO) é de $4,4 \mu\text{m}$ ($3-6 \mu\text{m}$). Campo lateral variável, composto de diferentes formas e números de incisuras (4-7). Espículos e gubernáculo arqueados, fasmídeos quase terminais.

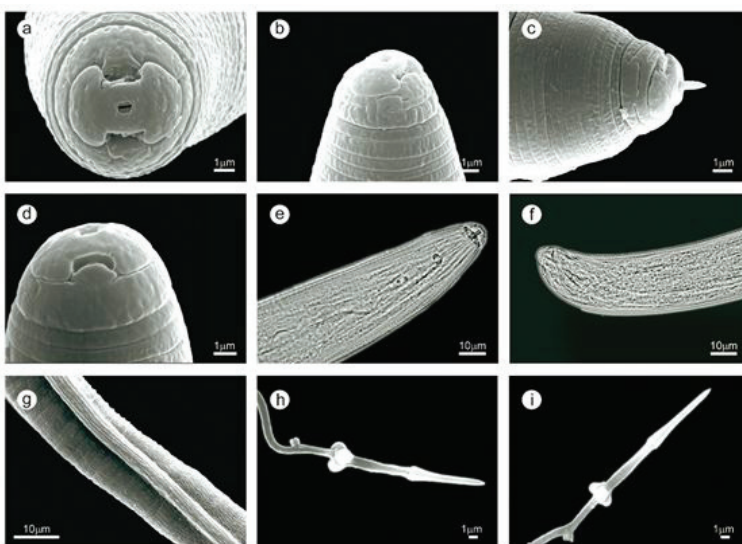


Figura 5. Micrografias óticas (MO) e eletrônicas (MEV) de machos de *Meloidogyne* sp. 0 (= *M. orttersoni*). a-d: Micrografia eletrônica de varredura (MEV) da região anterior. e, f: Micrografia ótica (MO) da região anterior (e) cauda final (f). g: Micrografia em MEV dos campos laterais; h, i: Fotografia em MEV de estiletos excisados.

Juvenis de segundo estágio (J2). As medidas de 30 J2 são apresentadas na Tabela 1. Corpo cilíndrico e vermiforme afunilando para uma cauda alongada. Cabeça com estruturas cefálicas delicadas não destacadas do corpo e sem anulações labiais (Fig. 6 a, b). Estilete delicado ($10,7 \mu\text{m}$, $9-13 \mu\text{m}$), bulbos do estilete arredondados. Orifício da glândula dorsal até a base do estilete ($3,7 \mu\text{m}$, $2-5 \mu\text{m}$). Metacorpo amplamente oval, válvula grande e fortemente esclerotizada (Fig. 6 c). Poro excretor abaixo do anel nervoso. Abertura anal não bem determinada. No MEV, o disco labial e os lábios mediais se fundiram formando uma região cefálica lisa e contínua, em forma de gravata de borboleta. Seis sensilas deprimidas cercaram o pré-estoma (Fig. 6 a, b). Aberturas da glândula anfídial grandes como fendas. Lábios laterais alongados (Fig. 6 a, b). Poro excretor imediatamente posterior

ao hemizonídeo. Campos laterais variáveis geralmente com 4 incisuras. Reto não inflado. Cauda conoide alongada (69,2 μm , 62-76 μm). Região hialina da cauda longa, geralmente sem anelacção regular (20,5 μm , 15-26 μm), constrição em um, dois ou três pontos da cauda, afinando-se para uma ponta digitiforme terminal e delgada (Fig. 6 e-i).

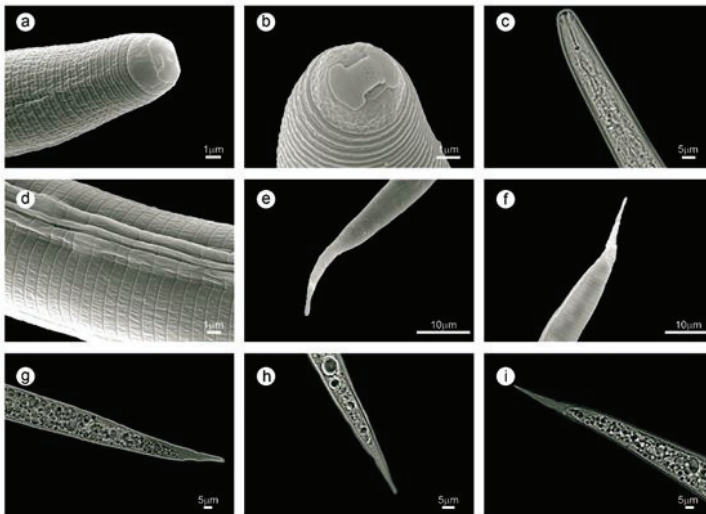


Figura 6. Micrografias óticas (MO) e eletrônicas (MEV) de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne* sp. 0 (= *M. orttersoni*). a, b: Micrografia eletrônica de varredura (MEV) da região anterior. c: Micrografia ótica (MO) da região anterior; d: Micrografia ao MEV dos campos laterais; e, f: Micrografia ao MEV das caudas nas vistas lateral e ventral, g-i: Micrografia em MO das caudas nas vistas ventral e lateral

Análise filogenética

As árvores individuais de máxima verossimilhança (ML) obtidas para todas as sequências foram semelhantes e mostraram que as quatro populações de *Meloidogyne* sp.0 (= *M. orttersoni*) do Brasil foram agrupados em um único cluster (com valores de 99-100% de bootstrap), como mostram as Figuras 7, 8 e 9, sugerindo fortemente que eles pertencem à mesma espécie.

Foi observada variabilidade intraespecífica entre as quatro populações de *Meloidogyne* sp.0, de 1 a 4 nucleotídeos (em um total de 755 nucleotídeos)

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

Meloidogyne ottersoni está intimamente relacionada a espécies meióticas como *M. graminicola*, *M. salasi*, *M. naasi* Franklin, 1965, *M. trifoliophila* Bernard e Eisenback, (1997) e outras espécies pertencentes ao grupo 11 segundo classificação de Jepson (1987). Por outro lado, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. minor* Karsen, Bolk, van Aelst, van den Beld, Kox, Korthals, Molendijk, Zijlstra, van Hoof; Cook, 2004 estão geneticamente distantes dessa espécie, como demonstrado nas árvores filogenéticas geradas. *Meloidogyne oryzae* esteve intimamente relacionado a *M. ottersoni* nas árvores D2D3 e COXII de máxima verossimilhança (MV) (Fig. 8 e 9). No entanto, na análise ITS, esta espécie apareceu próxima a espécies partenogenéticas obrigatórias mitóticas, como *M. incognita* e *M. javanica* (Fig. 7).

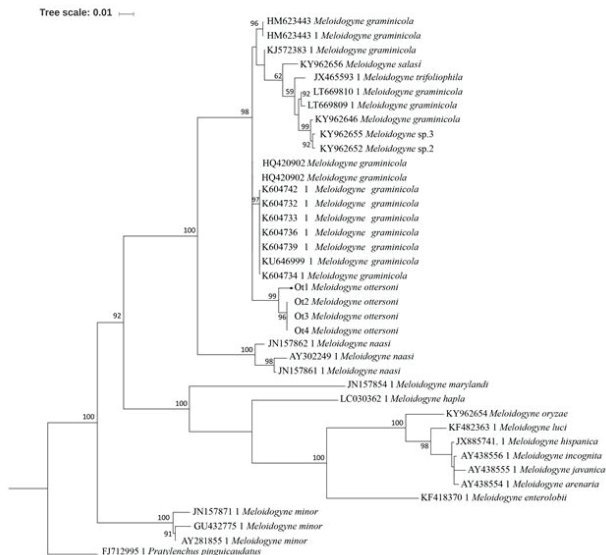


Figura 7. Análise de máxima verossimilhança (MV) das relações filogenéticas de *Meloidogyne*

sp. 0 (= *M. orttersoni*) e outras populações de *Meloidogyne* spp. baseadas na sequência ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA. Números a esquerda dos braços são os valores de bootstrap de 1000 réplicas. Números de acesso do GenBank estão listados antes dos nomes das espécies.

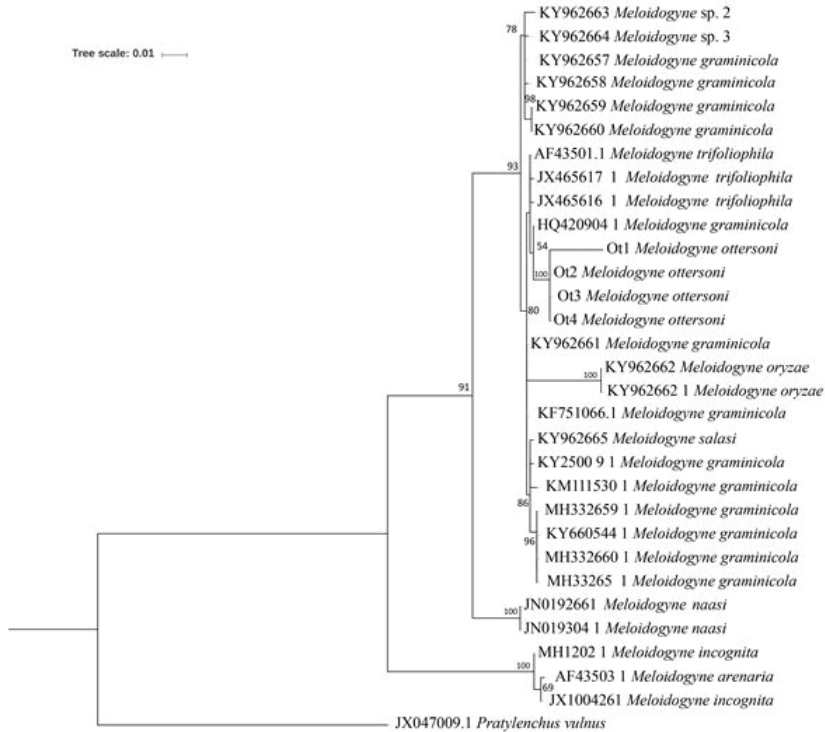


Figura 8. Análise de máxima verossimilhança (MV) das relações filogenéticas de *Meloidogyne* sp. 0 (= *M. orttersoni*) e outras populações de *Meloidogyne* spp. baseadas no fragmento D2-D3 da sequência 28S do rRNA. Números a esquerda dos braços são os valores de bootstrap de 1000 réplicas. Números de acesso do GenBank estão listados antes dos nomes das espécies.

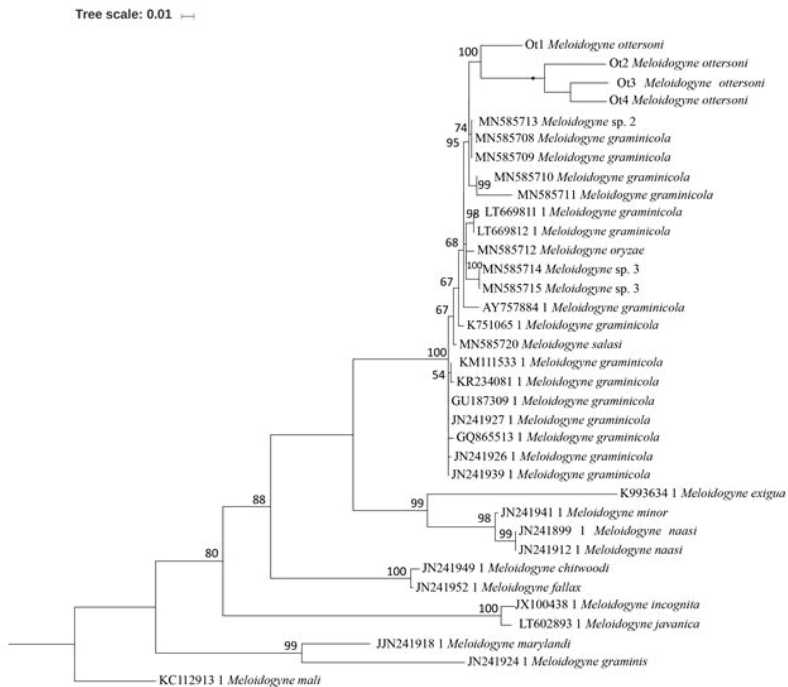


Figura 9. Análise de máxima verossimilhança (MV) das relações filogenéticas de *Meloidogyne* sp. 0 (= *M. ottersoni*) e outras populações de *Meloidogyne* spp. baseadas na sequência da região mitocondrial COXII. Números a esquerda dos braços são os valores de bootstrap de 1000 réplicas. Números de acesso do GenBank estão listados antes dos nomes das espécies.

Diagnóstico e Relações

Com base nos resultados aqui obtidos, concluímos que as quatro populações brasileiras de *Meloidogyne* sp.0 (Ot 1, Ot 2, Ot 3 e Ot 4) caracterizadas neste estudo pertencem, de fato à espécie *M. ottersoni* (Thorne, 1969) Franklin, 1971 (Tabela 2).

Tabela 2: Populações de *Meloidogyne* sp. 0 estudadas neste trabalho.

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

^a Código de populações usado no estudo.

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

^c Est: fenótipo de esterase.

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

* População utilizada nos estudos morfológicos e citogenéticos.

A identificação correta de *M. ottersoni* requer um estudo detalhado das características morfológicas distintas das fêmeas, machos e J2. Infelizmente, o material tipo não estava disponível nas coleções dos EUA (Jepson, 1987), nem populações vivas (Jonathan Eisenback ¹e Zafar Handoo²: informações pessoais). Comparando as populações do Brasil com a descrição feita por Thorne (1969) e Jepson (1987), foi possível observar que elas apresentam características morfológicas e morfométricas semelhantes, bem como os caracteres comuns abaixo descritos para a população de *M. ottersoni* de Wisconsin, EUA. As fêmeas são alongadas, em forma de limão, quase

contorno da protuberância, variando de arredondados a ovais; arco dorsal hemisférico com estrias levemente espaçadas; as estrias são principalmente contínuas (Fig. 3), nunca cruzadas por estrias transversais irregulares, como frequentemente observadas em *M. graminicola* e *M. oryzae*. Diferenças mensuráveis entre as espécies pertencentes ao grupo 11 da Jepson são reduzidas, mas *M. ottersoni* mostra um estilete de fêmea pequeno (9-13 µm), diferente de outras espécies: *M. graminicola*, 12-14 µm e *M. oryzae*, 14-16 µm (Jepson, 1987; Mattos et al., 2018). Os bulbos do

estilete também podem diferenciar essas três espécies: em *M. graminicola* (Eisenback; Triantaphyllou, 1991) os bulbos são grandes e transversalmente alongados, em *M. ottersoni* arredondados e se destacam claramente da haste e em *M. oryzae* menores e menos destacados (Mattos et al., 2018). Considerando o tamanho do cone em relação a haste, o cone é maior em *M. graminicola*, menor em *M. oryzae* e do mesmo tamanho ou maior em *M. ottersoni* (Jepson, 1987; Eisenback; Triantaphyllou, 1991; Mattos et al., 2018). Os intervalos de comprimentos do estilete dos machos também são diferentes entre as três espécies: 13-19 μm para *M. ottersoni*, 16-18 μm para *M. graminicola* e 18-20 μm para *M. oryzae* (Jepson, 1987). A cauda do J2 das três espécies é muito longa e fina e afunila em um término hialino irregular longo e estreito (*M. ottersoni*: 20,5 μm , *M. graminicola*: 17,9 μm e *M. oryzae*: 22,0 μm), terminando em uma ponta clavada (Fig. 6 e-i). As populações de *M. ottersoni* mostram fenótipo de esterase sem bandas ou atividade enzimática (Rm = 0, Est Ot0), completamente diferente de *M. graminicola* (Est VS1) e *M. oryzae* (Est O1) com uma extensa área de atividade enzimática (Mattos et al., 2018). O fenótipo de esterase é, portanto, uma ótima ferramenta para diferenciar *M. ottersoni* (Est Ot0) de outras espécies de *Meloidogyne* do arroz (Fig. 1). Considerando os marcadores SCAR desenvolvidos por Belafiore et al. (2015), Htay et al. (2016) e Mattos et al. (2018), infelizmente, não foram espécie-específicos para *M. graminicola*, pois também amplificaram para *M. oryzae* e algumas populações de *M. ottersoni*, respectivamente. No entanto, *M. ottersoni* possui sequências específicas de ITS, D2-D3 e parciais da região mitocondrial COXII-16S rRNA (Figs. 7, 8, 9).

Meloidogyne ottersoni do arroz também se reproduziu na planta hospedeira tipo alpiste vermelho – *P. arundinacea*, mostrando J2 e fêmeas com massa de ovos dentro das raízes, 50 dias após a inoculação (Fig. 1), confirmando os postulados de Koch.

Sintomas em plantas de arroz e alpiste vermelho

A infecção causada por *Meloidogyne* sp.0 (Ot 4) (Meleiro – SC) em arroz levou a formação de uma galha alongada e arqueada e, em seguida, se desenvolveram uma série de galhas semelhantes, contendo algumas fêmeas completamente fixadas no interior da raiz, onde os ovos foram depositados. Massas de ovos foram encontradas no interior da raiz ou no exterior das galhas. Os machos foram frequentes e geralmente encontrados nas raízes

com as fêmeas e os J2. A população de *Meloidogyne* sp.0 de Meleiro-SC também se reproduziu em alpine vermelho, *P. arundinacea* (hospedeiro tipo), exibindo os mesmos sintomas observados em arroz, mostrando J2 dentro das raízes e fêmeas com massa de ovos aos 50 dias após a inoculação (Fig. 10).

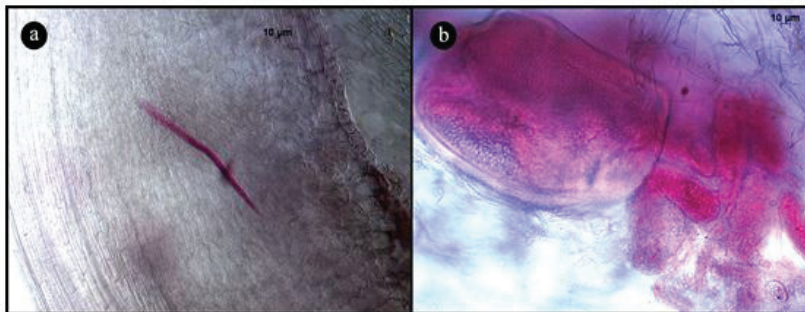


Figura 10. Micrografia ótica de *Meloidogyne ottersoni* parasitando alpine vermelho (*Phalaris arundinacea*), 50 dias após a inoculação com 5.000 ovos. a: juvenis de segundo estágio dentro da raiz; b: fêmeas e ovos dentro da raiz.

Plantas hospedeiras

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

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

Espécies botânicas	Peso da raiz	Total de ovos	Ovos/g raiz	FR*	Fenótipo
Arroz <i>Oryza sativa</i> L. Var. IRGA 424	50,00 b	2389200 a	8283,26 b	238,92 a	Controle suscetível
Trigo <i>Triticum aestivum</i> L. Var. Torsik	5,20 d	1353 b	314,04 c	0,14 b	Não-hospedeira
Trigo <i>Triticum aestivum</i> L. Var. Sonik	2,40 e	773 b	410,67 c	0,08 b	Não-hospedeira
Capim-braquiária <i>Brachiaria decumbens</i> Stapf Variedade desconhecida	41,80 b	807 b	21,12 d	0,08 b	Não-hospedeira
Feijão caupi <i>Vigna unguiculata</i> L. Walp Variedade desconhecida	6,88 d	900 b	122,14 d	0,09 b	Não-hospedeira
Aveia preta <i>Avena strigosa</i> Schreb Variedade desconhecida	17,80 c	1080 b	60,09 d	0,11 b	Não-hospedeira
Aveia branca <i>Avena sativa</i> L. Var. Estampa	6,40 d	59020 b	4245,67 c	5,90 b	Má hospedeira
Tomate <i>Solanum lycopersicum</i> L. Var. Santa Clara	55,75 b	2417 b	48,57 d	0,24 b	Não-hospedeira
Milheto pérola <i>Pennisetum glaucum</i> L. Var. ADR905	144,40 a	3467 b	21,94 d	0,35 b	Não-hospedeira
Milheto pérola <i>Pennisetum glaucum</i> Var. ADR500	160,70 a	3467 b	20,38 d	0,35 b	Não-hospedeira
Azevém-italiano <i>Lolium multiflorum</i> Lam Variedade desconhecida	21,80 c	4207 b	189,08 c	0,42 b	Não-hospedeira
Soja <i>Glycine max</i> (L.) Mer. Var. Potência	16,67 c	4778 b	326,79 c	0,48 b	Não-hospedeira
Soja <i>Glycine max</i> Var. Vini M8210	8,50 d	350 b	53,13 d	0,04 b	Não-hospedeira

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

O número de repetições foi de 5 plantas por tratamento.

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

Discussão

Os métodos tradicionais de identificação de NG são baseados em morfologia (Jepson, 1987; Eisenback; Triantaphyllou, 1991; Hunt; Handoo, 2009), fenótipos de esterase (Esbenshade; Triantaphyllou, 1985; Carneiro et al., 2000) e marcadores moleculares (Blok; Powers, 2009). A identificação de espécies de *Meloidogyne* do arroz (grupo 11) tem sido um desafio diante

da complexidade taxonômica do grupo, como a morfologia conservada, e os limites pouco claros entre as espécies do grupo (Jepson, 1987), além da falta de marcadores SCAR para várias espécies (Belafiore et al., 2015; Mattos et al., 2018) o que dificulta o diagnóstico.

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

Meloidogyne ottersoni do Wind Lake, Wisconsin, EUA é uma espécie bem adaptada às condições de inundação e se reproduz bem em alpinete vermelho, *P. arundinacea*. Esta planta é uma gramínea perene que geralmente forma extensas moitas ao longo das margens de lagos e córregos e em áreas abertas úmidas, com ampla distribuição na Europa, Ásia, norte da África e América do Norte (Thorne, 1969).

No Brasil, *M. ottersoni* (= *Meloidogyne* sp.0) foi detectado em regiões de arroz em solo inundado, com baixa capacidade de drenagem, onde a temperatura média é de 19,5 °C, variando de 10 °C a 25 °C no verão e de 10 °C a 18 °C no inverno. A inundação do arroz na região de Meleiro – SC ocorre por canais de irrigação e a água vem do rio local Aranguará e seus afluentes. Essa região cobre cerca de 9.500 ha de arroz cultivado por pelo menos 320 famílias e é caracterizada por inundações prolongadas nas áreas de cultivo. Durante a estação de entressafra, os solos com pouca drenagem natural permanecem inundados durante o inverno, onde algumas ervas daninhas

como capim-boiador, *Leersia hexandra* Sw., que contribuem para manter ou proliferar populações de nematoides durante esta estação. Na Argentina (Tucumã), *M. ottersoni* foi detectado em capim-arroz, *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. por Doucet e Pinochet (1992) usando apenas o padrão perineal típico descrito por Thorne (1969) e Jepson (1987). Nossos resultados confirmam a identificação correta de *M. ottersoni* por esses autores, considerando que *E. crus-galli* também foi um bom hospedeiro para a população brasileira dessa espécie de NG.

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

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

Na descrição de *M. ottersoni* feita por Thorne (1969) e um número muito pequeno de espécimes foi obtido e medido: fêmeas (10), machos (7) e J2 (10), colhidos diretamente de raízes de alpeixe vermelho coletadas em campo. No presente estudo, as populações de *M. ottersoni* foram multiplicadas em arroz em casa de vegetação por vários meses. Em geral, os dados morfológicos e morfométricos das populações desta espécie no Brasil foram semelhantes aos da descrição original (Thorne, 1969; Jepson, 1987), com variações esperadas frequentes para o gênero *Meloidogyne*. As populações

do Brasil apresentaram fêmeas, machos e J2 maiores em comparação com a população tipo dos EUA. Essa variação no comprimento do corpo pode ocorrer em populações da mesma espécie e em hospedeiros diferentes (Handoo et al., 1993). Os estiletos de fêmeas e machos foram semelhantes em comprimento, mas a população dos EUA apresentou J2 com estilete mais longo. Alguns autores consideram os aspectos morfológicos mais relevantes na caracterização das espécies do que os caracteres morfométricos (Jepson, 1987; Eisenback; Triantaphyllou, 1991). Considerando esses aspectos, as populações de *M. ottersoni* coletadas no Brasil foram muito próximas da população descrita nos EUA e parasitam a mesma planta hospedeira tipo *P. arundinaceae*, corroborando os postulados de Koch. Considerando a estreita gama de hospedeiros registrada para *M. ottersoni*, algumas espécies botânicas podem ser utilizadas na rotação de culturas com arroz: soja, aveia preta, aveia, cevada, entre outras apresentadas na Tabela 3. Mais estudos são necessários para confirmar os resultados deste estudo, incluindo mais culturas e cultivares.

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

Oogênese e espermatogênese da população de *M. ottersoni* de Wisconsin, EUA, foram descritas como do tipo meiótico ($n = 18$). Quando os machos foram abundantes, a reprodução foi por anfimixia. Considerando os estudos citogenéticos, *M. ottersoni* está intimamente relacionado a *M. graminicola*, *M. graminis* e *M. naasi* (Triantaphyllou, 1973). A população de

M. ottersoni de Meleiro-SC aqui estudada, reproduziu-se por partenogênese meiótica e apresentou 18 cromossomos, sendo semelhante à população tipo de *M. ottersoni* e *M. graminicola* e completamente diferente de *M. oryzae* ($3n = 50-56$ cromossomos) (Esbenshade; Tryantaphyllou, 1985; Mattos et al., 2018).

Meloidogyne oryzae é a única espécie triploide relacionada ao arroz e, como estudado anteriormente (Mattos et al., 2018), agrupa-se com outras espécies apomíticas em árvores filogenéticas baseadas em ITS (Negretti et al., 2017). Os resultados moleculares para esta região confirmaram que *M. oryzae* foi mais próxima de outras espécies partenogenéticas mitóticas, enquanto *M. ottersoni* agrupou-se com espécies partenogenéticas meióticas. Espécies com cerca de 51 a 56 cromossomos foram provavelmente derivadas após a hibridação de formas partenogenéticas meióticas como *M. graminicola*, envolvendo a fertilização de um ovo não reduzido com 36 ($18 + 18$) cromossomos, com um espermatozoide com 18 cromossomos (Triantaphyllou, 1985). Um provável processo de especiação pode estar ocorrendo com essas espécies de NG associadas ao arroz, conforme sugerido por Negretti et al. (2017) e Mattos et al. (2018).

Análises filogenéticas foram conduzidas para validar os resultados obtidos com abordagens morfológicas e enzimáticas, através de comparação de sequências ITS1-5.8S-ITS2 rRNA, região D2-D3 28S do rRNA e a sequência parcial da região mitocondrial entre os genes COXII e 16S rRNA das populações de *Meloidogyne* sp.0 (Ot 1, Ot 2, Ot 3 e Ot 4) com sequências homólogas de outras espécies de *Meloidogyne* obtidas do GenBank.

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

Do ponto de vista da identificação, o genoma mitocondrial oferece uma fonte rica de marcadores genéticos (Rubinoff; Holland, 2005; Hu; Gasser, 2006; Blok; Power, 2009). Essa região possui uma taxa de evolução mais rápida que os genes nucleares correspondentes (Hugall et al., 1994; Blok;

Powers, 2009). De fato, a região mitocondrial codante já é considerada uma região potencialmente melhor para desenvolver um 'barcode' para alguns grupos de espécies de *Meloidogyne*, uma vez que regiões intergênicas mostraram repetições de AT que parecem não se correlacionar com eventos de especiação (Hugall et al., 1997; Pagan et al., 2015). *Meloidogyne ottersoni* apresenta uma sequência COII única, com baixa variabilidade intraespecífica, que pode ser útil na identificação de espécies e em estudos filogenéticos futuros.

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

Conclusões

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

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

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

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

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

Referência Bibliográfica

ADAM, M. A. M.; PHILLIPS, M. S.; BLOK, V. C. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). **Plant Pathology**, v. 56, n. 1, p. 190-197, 2007.

BAERMANN, G. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) larven in Erdproben. **Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch Indië**, v. 57, p. 131-137, 1917.

BELLAFIORE, S.; JOUGLA, C.; CHAPUIS, E.; BESNARD, G.; SUONG, M.; VU, P. N.; 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, n. 7, p. 471-483, 2015.

BERNARD, E. C.; EISENBACK, J. D. *Meloidogyne trifoliophila* n.sp. (Nemata: Meloidogynidae), a parasite of clover from Tennessee. **Journal of Nematology**, v. 29, n. 1, p. 43-54, 1997.

BESNARD, G.; THI-PHAN, N.; HO-BICH, H.; DEREEPER, A.; TRANG NGUYEN, H.; QUÉNÉHERVÉ, P.; BELLAFIORE, S. On the close relatedness of two rice-parasitic root-knot nematode species and the recent expansion of *Meloidogyne graminicola* in Southeast Asia. **Genes**, v. 10, n. 2, 175, 2019.

BLOK, V. C.; POWERS, T. O. Biochemical and molecular identification. In:

PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (ed.). **Root-knot nematodes**. Wallingford: CABI Publishing, 2009. p. 98-118.

BYRD JR, D. W.; KIRKPATRICK, T.; BARKER, K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology**, v. 15, n. 1, p. 142-143, 1983.

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. 4, n. 21, p. 319-326, 1998.

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.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 35-44, 2001.

CHAUHAN, B. S.; JABRAN, K.; MAHAJAN, G. Rice production worldwide. In: PRASAD, R.; SHIVAY, Y. S.; KUMAR, D. (ed.). **Current status, challenges, and opportunities in rice production**. Basel: Springer International Publishing, 2017. p. 1-15.

CONAB - (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, v. 7, n. 5, p. 51-60, 2018.

DE LEY, P.; FELIX, M. A.; FRISSE, L. M.; NADLER, S. A.; STEMBER, P. W.; THOMAS, W. K. Molecular and morphological characterisation of two reproductive species with mirror image anatomy (Nematoda: Cephalobidae). **Nematology**, v. 1, n. 6, p. 591-612, 1999.

DE WAELE, D.; ELSEN, A. Challenges in tropical plant nematology. **Annual**

Review of Phytopathology, v. 45, n. 1, p. 457-485, 2007.

DOUCET, M. E.; PINOCHET, J. Occurrence of *Meloidogyne* spp. in Argentina. **Journal of Nematology**, Suppl., v. 24, n. 4S, p. 765-770, 1992.

EISENBACK, J. D. Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. In: BARKER, K. R.; CARTER, C. C.; SASSER, J. N. (ed.). **An advanced treatise on Meloidogyne**. Raleigh: North Carolina States University, 1985. v. 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**. Wallingford: CABI Publishing, 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: Macel Deccker, 1991. p. 191-274.

ESBENSHADE, P. R.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida). **Journal of Nematology**, v. 17, n. 1, p. 6-20, 1985.

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, n. 4, p. 628-641, 1993.

HTAY, C.; PENG, H.; HUANG, W.; KONG, L.; HE, W.; HOLGADO, R.; PENG, D. The development and molecular characterization of a rapid detection method for rice root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*). **European Journal of Plant Pathology**, v. 146, n. 2, p. 281-291, 2016.

HU, M.; GASSER, R. B. Mitochondrial genomes of parasitic nematodes:

progress and perspectives. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 2, p. 78-84, 2006.

HUGALL, A.; MORITZ, C.; STANTON, J.; WOLSTENHOLME, D. R. Low, but strongly structured mitochondrial DNA diversity in root knot nematodes (*Meloidogyne*). **Genetics**, v. 136, n. 3, p. 903-912, 1994.

HUGALL, A.; STANTON, J.; MORITZ, C. Evolution of the AT-rich mitochondrial DNA of the root knot nematode, *Meloidogyne hapla*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, n. 1, p. 40-48, 1997.

HUNT, D. J.; HANDOO, Z. A. Taxonomy, identification and principal species. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (ed.). **Root-knot nematodes**. Wallingford: CABI Publishing, 2009. p. 55-97.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 75, p.1025–1028, 1973.

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

KARSSSEN, G.; MOENS, M. Root-knot nematodes. In: PERRY, R. N.; MOENS, M. (ed.). **Plant nematology**. Wallingford: CABI, 2006. p. 59-90.

KHAN, M. R. Nematode diseases of crop in India. In: AWASTHI, L. P. (ed). **Recent advances in the diagnosis and management of plant diseases**. New Delhi: Springer, 2015. p. 183-224.

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.; CARES, J. E.; GOMES, C. B.; GOMES, A. C. M. M.; MONTEIRO, J. D. M. S.; GOMEZ, G. M.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R. M. D. G. 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.

MATTOS, S. V.; MULET, K.; CARES, J. E.; GOMES, C. B.; FERNANDEZ, D.; SÁ, M. F. G.; CARNEIRO, R. M. D. G.; CASTAGNONE-SERENO, P. Development of diagnostic SCAR markers for *Meloidogyne graminicola*, *M. oryzae*, and *M. salasi* associated with irrigated rice fields in Americas. **Plant Disease**, v. 103, n. 1, p. 83-88, 2019.

MCCLURE, M. A.; NISCHWITZ, C.; SKANTAR, A. M.; SCHMITT, M. E.; SUBBOTIN, S. A. Root-knot nematodes in golf course greens of the western United States. **Plant Disease**, v. 96, n. 5, p. 635-647, 2012.

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. (ed.). **Root-knot nematodes**. Wallingford: CABI Publishing, 2009. p. 1-17.

NEGRETTI, R. R.; GOMES, C. B.; MATTOS, V. S.; SOMAVILLA, L.; MANICABERTO, R.; AGOSTINETTO, D.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R. M. D. G. Characterisation of a *Meloidogyne* species complex parasitising rice in southern Brazil. **Nematology**, v. 19, n. 4, p. 403-412, 2017.

NYLANDER, J. A. A. **MrModelTest**. Uppsala University, 2004. v. 2 - Evolutionary Biology Centre. Program distributed by the author.

OOSTENBRINK, M. **Major characteristics of the relation between nematodes and plants**, 1966. 48 p.

PADIAL, J. M.; MIRALLES, A.; DE LA RIVA, I.; VENCES, M. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology**, v. 7, 16, 2010.

PAGAN, C.; COYNE, D.; CARNEIRO, R.; KARIUKI, G.; LUAMBANO, N.; AFFOKPON, A.; WILLIAMSON, V. M. Mitochondrial haplotype-based identification of ethanol-preserved root-knot nematodes from Africa. **Phytopathology**, v. 105, n. 3, p. 350-357, 2015.

PANTE, E.; ABDELKRIM, J.; VIRICEL, A.; GEY, D.; FRANCE, S. C.; BOISSELIER, M. C.; SAMADI, S. Use of RAD sequencing for delimiting species. **Heredity**, v. 114, n. 5, p. 450-459, 2015.

POKHAREL, R. R.; ABAWI, G. S.; DUXBURY, J. M.; SMAT, C. D.; WANG, X.; BRITO, J. A. Variability and the recognition of two races in *Meloidogyne graminicola*. **Australasian Plant Pathology**, v. 39, n. 4, p. 326-333, 2010.

POKHAREL, R. R.; ABAWI, G. S.; ZHANG, N.; DUXBURY, J. M.; SMART, C. D. Characterization of isolates of *Meloidogyne* from rice-wheat production fields in Nepal. **Journal of Nematology**, v. 39, n. 3, p. 221-230, 2007.

POWERS, T. O.; HARRIS, T. S. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, v. 25, n. 1, p. 1-6, 1993.

RUBINOFF, D.; HOLLAND, B. S. Between two extremes: mitochondrial DNA is neither the panacea nor the nemesis of phylogenetic and taxonomic inference. **Systematic Biology**, v. 54, n. 6, p. 952-961, 2005.

SALALIA, R.; WALIA, R. N.; SOMVANSHI, V. S.; KUMAR, P.; KUMAR, A. Morphological, morphometric and molecular characterization of intraspecific variation within Indian populations of *Meloidogyne graminicola*. **Journal of Nematology**, v. 49, n. 3, p. 254-267, 2017.

SCHMITZ, B.; BURGERMEISTER, W.; BRAASCH, H. Molecular genetic classification of Central European *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax* populations. **Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes**, v. 50, n. 12, p. 310-317, 1998.

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, n. 2, p. 153-164, 2000.

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, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TAYLOR, D. P.; NETSCHER, C. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Nematologica**, v. 20, n. 2, p. 268-269, 1974.

THORNE, G. *Hypsoperine ottersoni* sp. n. (Nemata, Heteroderidae) infesting canary grass, *Phalaris arundinacea* (L.) reed in Wisconsin. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 36, p. 98-102, 1969.

TRIANAPHYLLOU, A. C. Gametogenesis and reproduction of *Meloidogyne graminis* and *M. ottersoni* (Nematoda: Heteroderidae). **Journal of Nematology**, v. 5, n. 2, p. 84-87, 1973.

TRIANAPHYLLOU, 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.). **An advanced treatise on Meloidogyne**. Raleigh: North Carolina States University, 1985. v. 2, p. 107-114.

TRIFINOPOULOS, J.; NGUYEN, L. T.; VON HAESLER, A.; MINH, B. Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis.

Nucleic Acids Research, v. 44, n. 1, p. W232-W235, 2016.

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



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL