

AVANÇOS NA DIAGNOSE DE FITONEMATOIDES DO GÊNERO *MELOIDOGYNE* EM ARROZ IRRIGADO

Regina M.D.G. Carneiro e Vanessa S. Mattos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP. 02372 Brasília DF 70849-970

O arroz é um dos cereais mais produzidos no mundo e o Brasil destaca-se no mercado orizícola como nono maior produtor e oitavo exportador mundial. O Brasil cultiva uma área de aproximadamente 2,1 milhões de hectares de arroz (*Oryza sativa* L.), com produção de 12,1 milhões de toneladas (CONAB, 2017). O Rio Grande do Sul (RS) é o maior produtor nacional, responsável por 65% da produção de arroz, seguido pelo estado de Santa Catarina que detém 7,3% da produção nacional (CONAB, 2017).

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

Em levantamento recente realizado por Negretti *et al.* (2017), foi relatada a presença das espécies *M. graminicola* e *M. javanica*, além de três outros nematoides com fenótipos de esterase atípicos, em regiões orizícolas do RS e SC, provocando danos às plantações. No Paraná, um complexo de espécies também foi detectado, predominando *Meloidogyne* sp.3, *M. graminicola*, *Meloidogyne* sp.2 e uma população sem perfil de enzima, *Meloidogyne* sp.0 (Soares, 2017). Mais recentemente, algumas populações de *Meloidogyne* sp.0 foram enviadas para o laboratório de Nematologia do Cenargen, provenientes de outras regiões de Santa Catarina e todas apresentaram perfis sem bandas de esterase (Mattos *et al.*, 2017b). A identificação dessas espécies de *Meloidogyne* por meio de características morfológicas, bioquímicas e moleculares seria a primeira etapa para a implementação futura de técnicas de manejo, como o uso da resistência genética e da rotação de culturas, que são imprescindíveis para a manutenção ou aumento da produção orizícola nacional.

A identificação precisa das espécies de *Meloidogyne* é difícil e, às vezes é baseada em caracteres subjetivos. Além disso, a diagnose é dificultada pelo elevado número de espécies descritas, muitas vezes com descrições duvidosas (como é o caso das espécies do arroz), presença de espécies crípticas e pela existência de alta variabilidade intraespecífica (*M. graminicola*). Além do mais, existe o problema do conceito de espécie para organismos predominantemente partenogenéticos, que são considerados híbridos entre espécies anfimíticas e partenogenética meióticas (Triantaphyllou, 1985; Castagnone-Sereno *et al.*, 1993; Roberts, 1995; Hunt & Handoo, 2009). Isso pode ser visto no arroz em *M. graminicola* (n =18), *M. salasi* (2n=36) e *M. oryzae* (3n=52-54).

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

O desenvolvimento de técnicas moleculares abriu novas perspectivas quanto à identificação de espécies e estudos da variabilidade intraespecífica dos nematoides de

galhas (NG). A técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), baseada na PCR, é utilizada atualmente para os estudos genéticos e para a diferenciação de várias espécies de *Meloidogyne*, a partir de perfis gerados com o auxílio de *primers* aleatórios (Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997; Semblat *et al.*, 1998; Randig *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2004, 2008; Fargette *et al.*, 2005; Muniz *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2012). A conversão de marcadores RAPD em marcadores espécie específicos (SCAR) tem sido realizada para espécies de *Meloidogyne*, e cerca de nove das 20 espécies detectadas no Brasil já podem ser identificadas através dessa ferramenta (Carneiro *et al.*, 2016). Para as espécies de NG do arroz, dois marcadores espécie-específicos foram desenvolvidos para a identificação de *M. graminicola* (Bellafiore *et al.*, 2015; Htay *et al.*, 2016), porém a especificidade desses marcadores não foi confirmada (Negretti *et al.*, 2017). Recentemente, Mattos *et al.* 2018 desenvolveram três marcadores do tipo SCAR para *M. graminicola*, *M. oryzae* e *M. salasi*.

Foi relatado pela primeira vez no Brasil a presença da espécie *M. oryzae*, no estado de Santa Catarina, parasitando o arroz irrigado. Estudos morfológicos mostraram características típicas da espécie como a morfologia do estilete de machos e fêmeas e o formato e comprimento da cauda do juvenil de segundo estágio e o perfil de esterase espécie-específico (O1, Rm: 1,2), caracterizado para a espécie. Também foram conduzidos estudos citogenéticos e moleculares que ajudaram a esclarecer a posição filogenética dessa espécie de reprodução partenogenética mitótica, diferindo completamente de *M. graminicola*, por exemplo, uma espécie com reprodução partenogenética meiótica facultativa (Mattos *et al.*, 2017).

Foram apresentados dados sobre a variabilidade genética das populações de *Meloidogyne* encontradas em arroz, através dos marcadores neutros AFLP e RAPD. *Meloidogyne graminicola* apresentou uma alta percentagem de polimorfismo (75,2%) e *M. oryzae* apresentou uma menor variabilidade (12,9%), resultados esperados, considerando os modos de reprodução diferentes para as duas espécies. Nas análises filogenéticas, todas as espécies analisadas agruparam-se com 100% de bootstrap e *M. salasi*, uma importante espécie do arroz na Costa Rica e Venezuela, mostrou-se geneticamente distante das demais espécies. Fragmentos de RAPD-PCR específicos foram utilizados para a construção de primers SCAR espécie-específicos para as principais espécies do arroz detectadas nas Américas: *M. graminicola*, *M. oryzae* e *M. salasi*. A amplificação dos primers desenvolvidos produziram fragmentos específicos de 230 pb, 130 pb e 190 pb para *M. graminicola*, *M. oryzae* e *M. salasi*, respectivamente (Mattos *et al.* 2018). Devido à alta variabilidade observada em *M. graminicola* (PCR-RAPD) marcadores mais conservados como os mitocondriais poderiam ser desenvolvidos para o complexo de espécies de *Meloidogyne*, ocorrentes no Brasil e no mundo.

Nos próximos anos, uma ênfase especial será dada à identificação ou descrição das espécies atípicas: *Meloidogyne* sp.0, *Meloidogyne* sp.2 e *Meloidogyne* sp.3.

Referencias

- BELLAFIGLIORE, S., JOUGLA, C., CHAPUIS, E., BESNARD, G., SUONG, M., VU, P.N., DE WHALE, D., GANTET, P. & THI, X.N. 2015. Intraspecific variability of the facultative meiotic parthenogenetic root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) from rice fields in Vietnam. *Comptes Rendus Biologies* 338: 471-483.
- BLOK, V.C., PHILLIPS, M.S., MCNICOL, J.W. & FARGETTE, M. 1997. Genetic variation in tropical *Meloidogyne* spp. as shown by RAPDs. *Fundamental and Applied Nematology* 20:127-133.
- BRIDGE, J., PLOWRIGHT, R.A. & PENG, D. 2005. Nematode parasites of rice. In: Luc, M., Sikora, R.A., & Bridge, J. (eds). *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CAB International, Wallingford, UK. p. 87–128.

- CARNEIRO, R.M.D.G., TIGANO, M.S., RANDIG, O., ALMEIDA, M.R.A. & SARAH, J.L. 2004. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology* 6:287-298.
- CARNEIRO, R.M., DOS SANTOS, M.F., ALMEIDA, M.R.A., MOTA, F.C., GOMES, A.C.M. & TIGANO, M.S. 2008. Diversity of *Meloidogyne arenaria* using morphological, cytological and molecular approaches. *Nematology* 10(6): 819-834.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & COFCEWICZ, E.T. 2008. Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In: Souza, R.M. (ed). Plant parasitic nematodes of coffee. Springer, Holland. p.87-122.
- CARNEIRO, R.M.D.G., MONTEIRO, J.M.S., SILVA, U.C. & GOMES, G. 2016. Gênero *Meloidogyne*: diagnose através de eletroforese de isoenzimas e marcadores SCAR. In: Oliveira, C.M., Dos Santos, M.A., & Castro, L.H.S. Diagnose de Fitonematoides. Millennium, Campinas, Brasil. p.71-93.
- CASTAGNONE-SERENO, P., BONGIOVANNI, M., & DALMASSO, A. 1993. Stable virulence against the tomato resistance Mi gene in the parthenogenetic root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology*, 83(8): 803-812.
- CASTAGNONE-SERENO, P., VANLERBERGHE-MASUTTI, F. & LEROY, F. 1994. Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers. *Genome* 37:904-909.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento 2017.
<file:///C:/Users/Vanessa/Downloads/BoletimZGraosZdezembroZ2017.pdf>. Consultado em 20/03/2018
- EISENBACK, J.D. & HUNT, D.J. 2009. General morphology. In: Perry, R.N., Moens, N., & Starr, J.L. (eds). Root-knot Nematodes. CABI, Cambridge, USA. p.18-54.
- FARGETTE, M., LOLLIER, V., PHILLIPS, M., BLOK, V., & FRUTOS, R. 2005. AFLP analysis of the genetic diversity of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*, major agricultural pests. *Comptes Rendus Biologies*, 328(5): 455-462.
- HTAY, C., PENG, H., HUANG, W., KONG, L., HE, W., HOLGADO, R. & PENG, D. 2016. The development and molecular characterization of a rapid detection method for rice root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*). *European Journal of Plant Pathology* 146(2):281-291.
- HUNT, D.J. & HANDOO, Z.A. 2009. Taxonomy, identification and principal species. In: Perry, R.N., Moens, N., & Starr, J.L. (eds). Root-knot Nematodes. CABI, Cambridge, USA. p.55-97.
- MATTOS, V.S., CARES, J.E., GOMES, C.B., GOMES, A.C.M.M., MONTEIRO, JMS, GOMEZ, G.M., CASTAGNONE-SERENO, P. & CARNEIRO, R. M. D. G. 2017. Integrative Taxonomy of *Meloidogyne oryzae* (Nematoda: Meloidogyninae) parasitizing rice crop in Southern Brazil. *European Journal of Plant Pathology* (<https://doi.org/10.1007/s10658-017-1400-9>).
- MATTOS V.S., MULET K, CARES J.E., GOMES, C.B., FERNANDEZ, D., GROSSI DE SÁ, M.F. CARNEIRO, RM.D.G. & CASTAGNONE-SERENO, P. 2018. Development of Diagnostic SCAR Markers for *Meloidogyne graminicola*, *M. oryzae* and *M. salasi* Associated to Irrigated Rice Fields in Americas. *Plant Disease* (no prelo).
- MATTOS, V. D. S., SOARE, R., GOMES, A., ARIEIRA, C., GOMES, C., & CARNEIRO, R. 2017b. Caracterização de um Complexo de Espécies do Nematóide das Galhas Parasitando Arroz Irrigado na Região Sul do Brasil. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E).
- MUNIZ, M.F.S., CAMPOS, V.P., CASTAGNONE-SERENO, P., CASTRO, J.M.C., ALMEIDA, M.R.A. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2008. Diversity of *Meloidogyne exigua* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations from coffee and rubber tree. *Nematology* 10(6):897-910.
- NEGRETTI, R. R., GOMES, C. B., MATTOS, V. S., SOMAVILLA, L., MANICA-BERTO, R., AGOSTINETTO, D., CASTAGNONE-SERENO, P., & CARNEIRO, R.M.D.G. 2017.

- Characterization of a *Meloidogyne* species complex parasitizing rice in southern Brazil. *Nematology*, 19(4), 403-412.
- RANDIG, O., BONGIOVANNI, M., CARNEIRO, R.M.D.G. & CASTAGNONE-SERENO, P. 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome* 45:862-870.
- ROBERTS, P.A. 1995. Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance. *Annual Review of Phytopathology* 33:199.
- SANTOS, M.F.A., FURLANETTO, C., CARNEIRO, M.D.G., ALMEIDA, M.R.A., MOTA, F.C., GOMES, A.C.M.M., SILVEIRA, N.O.R., SILVA, J.G.P., CASTAGNONE-SERENO, P., TIGANO, M.S. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2012. Biometrical, biological, biochemical and molecular characteristics of *Meloidogyne incognita* isolates and related species. *European Journal of Plant Pathology* 134:671–684.
- SEMBLAT, J.P., WAJNBERG, E., DALMASSO, A., ABAD, P. & CASTAGNONE-SERENO, P. 1998. High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis. *Molecular Ecology* 7:119-125.
- SOARES, M.R.C., 2017. Caracterização isoenzimática de *Meloidogyne* spp. em arroz irrigado no Noroeste do Paraná e tratamento de semente no controle do nematoide. Dissertação de Mestrado, Curso de Agronomia. Universidade Estadual de Maringá, PR. 64 pp.
- SPERANDIO, C.A. & MONTEIRO, A.R. 1991. Ocorrência de *Meloidogyne graminicola* em arroz irrigado no Rio Grande do Sul. *Nematologia Brasileira* 15:24.
- TRIANANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Cytogenetics, cititaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. In: Carter, C.C., & Sasser, J.N. (eds.). *An advanced treatise on Meloidogyne*, vol. 1, Biology and control. North Carolina State University Graphics, Raleigh, USA. p.113–126.

