

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE TRÊS ESPÉCIES DO COMPLEXO DE NEMATOIDES DE GALHAS PARASITAS DO ARROZ IRRIGADO NO SUL DO BRASIL

Vanessa Silva Mattos ¹, Cesar Bauer Gomes ² & Regina M.D.G. Carneiro ³

Palavras-chave: *Meloidogyne* spp., Taxonomia Integrativa, *Oryza sativa*

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo cereal mais cultivado no mundo. O Brasil desponta como principal produtor dentre os países ocidentais, ocupando a nona posição no ranking mundial. Um complexo de espécies de nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) foi detectado na região sul do Brasil, causando danos ao cultivo de arroz irrigado (NEGRETTI et al., 2017). Dentre as espécies encontradas, além de *Meloidogyne graminicola* (esterase Est VS1, Rm: 0,70), outros quatro isolados com perfis de esterase atípicos foram detectados, a saber: Est R1 (Rm:1,02), Est R2 (Rm: 0,85, 0,91), Est R3 (Rm: 0,74, 0,80, 0,82) e Est R0 (ausência de banda de esterase) (NEGRETTI et al., 2017, MATTOS et al., 2017). A correta identificação e caracterização dos nematoides de galhas (NG) é imprescindível para o manejo adequado em áreas orizícolas.

A identificação precisa das espécies de *Meloidogyne* é difícil e, às vezes, é baseada em caracteres subjetivos. Além disso, a diagnose é dificultada pelo elevado número de espécies descritas, muitas vezes com diagnoses duvidosas, presença de espécies crípticas e pela existência de variabilidade intraespecífica. Além do mais, existe o problema do conceito de espécie para organismos predominantemente partenogenéticos, que são considerados híbridos entre espécies anfimíticas e partenogenética meióticas (HUNT; HANDOO, 2009).

As espécies de *Meloidogyne* do grupo que parasitam o arroz são de difícil identificação, principalmente usando-se características morfológicas e morfométricas, pois são muito próximas e pertencem ao grupo-*graminis* ou grupo 11 de Jepson (1987). A maioria das espécies de neamtoides de galhas (NG) do arroz e outras gramíneas foram mal descritas e/ou muito mal caracterizadas morfológica, enzimática e molecularmente. Alguns caracteres morfológicos e biológicos são comuns nestas espécies: corpo da fêmea alongado, vulva em geral situada em uma protuberância posterior, associação com um modo de reprodução anfimítico ou partenogênese meiótica, semi-endoparasitismo, com machos abundantes; e pouco frequentes partenogenética mitótica, com machos raros e fêmeas profundamente enraizados no hospedeiro como é o caso de *M.oryzae* (JEPSON, 1987).

Para a caracterização e identificação corretas dessas espécies, um minucioso estudo usando Taxonomia Integrativa (morfologia e morfometria, padrões enzimáticos e estudos moleculares) foi realizado. Neste estudo foi feita uma compilação desses caracteres que permitem a separação das três espécies do complexo com certa facilidade: *M. graminicola*, *M. oryzae* e *M. ottersoni*.

Engenheira Agrônoma, Dra., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 02372, Brasília, DF 70849-970, Brasil, nessimha.agro@gmail.com

Endereço atual: Scientia Terrae, Fortsesteenweg 30 A, 2860 Sint-Katelijne-Waver, Belgica.

² Engenheiro Agrônomo, DR., EMBRAPA Clima Temperado, C.P. 403, 96001-970 Pelotas-RS, Brasil, cesar.gomes@embrapa.br

³ Engenheira Agrônoma, Dara., EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 02372, Brasília, DF 70849-970, Brasil, regina.carneiro@embrapa.br

MATERIAL E MÉTODOS

Várias lavouras de arroz irrigado localizadas em vários municípios dos estados do Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e Paraná (PR) foram levantadas e a ocorrência e caracterização de NGs foram analisadas e as populações purificadas, utilizando a técnica de isoenzimas descrita por Carneiro; Almeida, 2001. Para a caracterização dos perfis de enzima foi feito o cálculo da mobilidade relativa (Rm), em relação à primeira banda de *M. javanica* (ESBENSHADE; TRIANTAPHYLLOU, 1985; CARNEIRO et al., 2000). Uma vez que essas espécies foram identificadas, os fenótipos de esterase foram referidos por uma letra e um número que correspondem, respectivamente, a inicial do nome da espécie identificada, juntamente com o número de bandas (ESBENSHADE; TRIANTAPHYLLOU, 1985). Para os estudos moleculares, o DNA genômico de várias populações de *Meloidogyne* spp. (previamente purificadas) foi extraído a partir de 200 a 300 µl de ovos extraídos de raízes infectadas (RANDIG et al., 2002). Todos os estudos de taxonomia clássica, citogenética e análises moleculares foram realizados de acordo com as técnicas mencionadas por Soares et al. (2021). Os estudos para identificação das espécies, enfatizando Taxonomia Integrativa reuniram todas as informações geradas com as diferentes ferramentas e foram comparados aos resultados obtidos com a descrição das espécies, sobretudo àquelas pertencentes ao grupo *graminis* (JEPSON, 1987, EISENBACK; TRIANTAPHYLLOU, 1991, HUNT; HANDOO, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com uma abordagem de Taxonomia Integrativa permitiram identificar três tipos de *M. graminicola*: Est G1=VS1, Rm=0,70, Est G2=R2, Rm: 0,85, 0,91 e Est G3=R3, Rm: 0,74, 0,80, 0,82 e características morfológicas muito próximas à redescrição da espécie realizada por Eisenback & Triantaphyllou (1991). Com base na caracterização molecular, as populações G1, G2 e G3 foram amplificadas com sucesso por marcadores SCAR de *M. graminicola* (BELAFFIORE et al., 2015). Em todas as árvores filogenéticas de máxima verossimilhança de ITS, rRNA D2-D3 e COXII-16S sequências de rRNA, todas as populações de *M. graminicola* de diferentes fenótipos de esterase se agruparam com outros isolados de *M. graminicola*, confirmando assim que esses fenótipos de enzimas (G1, G2 e G3) estão relacionados com a mesma espécie. Um alto nível de variabilidade intraespecífica foi detectada entre todas as populações, mas não ocorreu correlação entre variabilidade genética e origens geográficas. Todas as populações apresentaram número de cromossomos $n=18$ (SOARES et al., 2021).

Outro NG (Est O1=R1, Rm: 1,02), detectado em Santa Catarina parasitando o arroz, foi identificado como *Meloidogyne oryzae*, usando-se Taxonomia Integrativa (MATTOS et al., 2018). Esse isolado brasileiro foi comparado com a descrição de *M. oryzae* do Suriname, com caracterização morfológica, bioquímica e molecular. Juvenis de segundo estágio (J2s) apresentaram cauda longa (75,8 μm), bem mais longa do que em *M. graminicola* (70,9 μm) com afilada porção hialina (22 μm em *M. oryzae* e 17,9 μm em *M. graminicola*). Bioquimicamente, apresentou um perfil de esterase diverso (Est O1), diferenciando-se de *M. graminicola* (Est VS1). O número de cromossomos foi $3n = 50-56$, e em sequências de DNA de ITS1-5.8S- ITS2 rRNA as duas populações de *M. oryzae* agruparam-se juntamente com outras espécies partenogênicas mitóticas, diferenciando-as de *M. graminicola* com $n = 18$ cromossomos e agrupadas com espécies meióticas. Análise filogenética usando marcadores neutros (AFLP e RAPD) mostrou que ambas as populações de *M. oryzae* formaram um grupo coeso, cluster intimamente relacionado e separados de *M. graminicola*. Um marcador molecular do tipo SCAR foi estabelecido para *M. oryzae* (MATTOS et al., 2019). Este estudo representou a primeira detecção de *M. oryzae* no Brasil e o segunda no mundo depois a descrição da espécie em 1971 (MATTOS et al., 2018).

Um terceiro NG parasitando arroz e causando danos nos estados de Santa Catarina (SC), Rio Grande do Sul (RS) e Paraná (PR) foi identificado como *M. ottersoni* através de Taxonomia Integrativa. A espécie foi redescrita a partir da população brasileira de Meleiro (SC) e comparada com a descrição de *M. ottersoni* de Wind Lake (Wisconsin, EUA) com caracterização morfológica, bioquímica e molecular (LEITE et al, 2020). *M. ottersoni* apresenta padrões perineais localizados no contorno de uma ligeira protuberância. As estrias são em sua maioria contínuas, nunca cortadas por estrias transversais irregulares, como em *M. graminicola* e *M. oryzae*. A reprodução é por partenogênese meiótica e o número de cromossomos é 18. A cauda do juvenis de segundo estágio é muito longa e fina, e afunila para um terminal hialino longo, estreito e irregular e é intermediária entre as outras duas espécies (*M. ottersoni*, 20,5 μm em comparação com *M. graminicola*, 17,9 μm e *M. oryzae*, 22,0 μm). Bioquimicamente, o perfil de esterase de *M. ottersoni* não apresenta nenhuma banda (Est Ot0, Rm=0), o que a diferencia de *M. graminicola* e *M. oryzae* (Est VS1, Rm=0,70 e Est O1, Rm=1,02, respectivamente). Na análise de máxima verossimilhança de ITS, D2D3 e COXII-16S rRNA, as populações de *M. ottersoni* de diferentes estados do Brasil se agruparam e foram separados de outras espécies de *Meloidogyne*, confirmando assim que todas as quatro populações são muito semelhantes e coespecíficas.; porem, não existem marcadores moleculares estabelecidos para a sua identificação (LEITE et al, 2020).

CONCLUSÃO

As três espécies de *Meloidogyne* presentes em lavouras de arroz irrigado da região sul do Brasil podem ser identificadas através dos perfis de esterase Est G1, G2 e G3 para *M. graminicola*, Est O1 para *M. oryzae* e Est Ot0 (ausência de bandas) para *M. ottersoni*. Como a concentração da enzima esterase é alta para essas espécies, a análise pode ser feita através de fêmeas individualizadas (NEGRETTI et al., 2017). Existem marcadores moleculares do tipo SCAR para *M. graminicola* e *M. oryzae*. Os caracteres morfológicos podem ser usados, mas devem ser interpretados por Nematologistas e são em geral muito mais trabalhosos para serem usados em uma diagnose de rotina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELLAFIORE, S.; JOUGLA, C.; CHAPUIS, E.; BESNARD, G.; SUONG, M.; VU, P.N.; DE WAELE, 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.

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

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; QUÉNÉHERVÉ, P. (2000). Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology* 2, 645-654.

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

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

HUNT, D.J.; HANDOO, Z.A. (2009). Taxonomy, identification and principal species. In: Perry, R.N., Moens, M. & Starr, J.L. (Eds). *Root-knot nematodes*. Wallingford, UK, CABI, pp. 55-97.

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

LEITE, R.R.; MATTOS, V.S.; GOMES, A.C.M.M.; PY, L.G.; SOUZA, D.A.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARES, J.E. ; CARNEIRO, R.M.D.G. (2020). Integrative taxonomy of *Meloidogyne ottersoni* (Thorne, 1969) Franklin, 1971 (Nematoda: Meloidogynidae) parasitizing flooded rice in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 157, 943-959.

MATTOS, V.S.; SOARES, M.R.C.; GOMES, A.C.M.M.; DIAS-ARIEIRA, C.R.; GOMES, C.B. ; CARNEIRO, R.M.D.G. (2017). Caracterização de um complexo de espécies do nematoide das galhas parasitando arroz irrigado na região sul do Brasil. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 331. Brasília, Embrapa Cenargen, pp. 1-28.

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. (2018). Integrative taxonomy of *Meloidogyne oryzae* (Nematoda: Meloidogyninae) parasitizing rice crops in southern Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 151, 649-662.

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

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). Characterisation of a *Meloidogyne* species complex parasitising rice in southern Brazil. *Nematology* 19, 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.

SOARES, M.R.C.; MATTOS, V.S.; LEITE, R.R. ; GOMES, A.C.M.M.; GOMES, C.B., PHILIPPE

