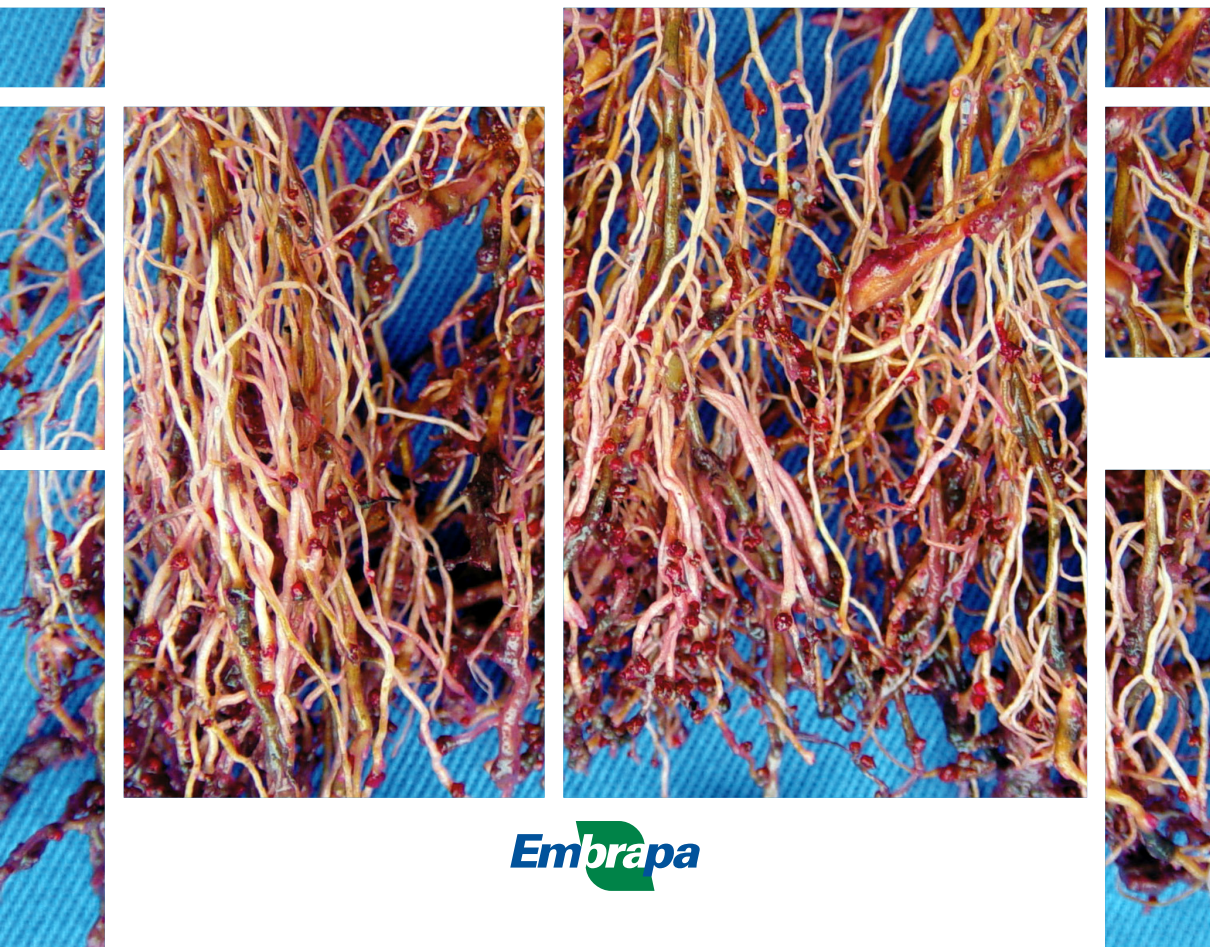


Levantamento do nematoide-das-galhas
(*Meloidogyne* spp.) em cafeeiros
no Triângulo Mineiro-MG, Brasil:
ocorrência restrita de *M. izarcoensis*



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

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
378**

**Levantamento do nematoide-das-galhas
(*Meloidogyne* spp.) em cafeeiros
no Triângulo Mineiro-MG, Brasil:
ocorrência restrita de *M. izarcoensis***

*Sheila Freitas de Almeida
Daniela Rossato Stefanelo
Marcilene Fernandes Almeida dos Santos
Gleiciane Pinheiro Sousa
Yuri Medeiros Maia
Juvenil Enrique Cares
Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro*

Esta publicação encontra-se disponível gratuitamente no link: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/?initQuery=t> (Digite o título e clique em "Pesquisar")

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica – PqEB
Av. W5 Norte (final)
CEP: 70770-917 Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4700/(61) 3448-4739
www.embrapa.br
<https://embrapa.br/fale-conosco/sac>

Comitê Local de Publicações da Unidade

Presidente
Marcelo Lopes da Silva

Secretária executiva
Ana Flávia do Nascimento Dias

Membros
Andrielle Câmara Amaral Lopes;
Bruno Machado Teles Walter;
Débora Pires Paula; Edson Junqueira Leite;
Marcos Aparecido Gimenes;
Solange Carvalho Barrios Roveri José

Revisão de texto
Jackcelia Costa da Silva

Normalização bibliográfica
Rosamares Rocha Galvão (CRB 1/2122)

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Wellington Cavalcanti

Foto da capa
Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro

1ª edição
PDF (2022)

A REDAÇÃO DO CONTEÚDO É DE INTEIRA
RESPONSABILIDADE DOS AUTORES

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

L655 Levantamento do nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) em cafeeiros no Triângulo Mineiro-MG, Brasil: ocorrência restrita de *M. izaalcoensis* / Sheila Freitas de Almeida... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2022.

23 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 378).
(PDF)

1. Marcadores SCAR. 2. Praga. 3. Endoparasita. I. Almeida, S. F. de A. II. Série.

CDD (22 ed.) 633.193

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	9
Resultados.....	13
Discussão	18
Conclusão.....	20
Agradecimentos.....	20
Referências	20

Levantamento do nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) em cafeeiros no Triângulo Mineiro-MG, Brasil: ocorrência restrita de *M. izarcoensis*

Sheila Freitas de Almeida¹; Daniela Rossato Stefanelo²; Marcilene Fernandes Almeida dos Santos³; Gleiciane Pinheiro Sousa⁴; Yuri Medeiros Maia⁵; Juvenil Enrique Cares⁶; Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro⁷

Resumo – Os nematoides-das-galhas (NGs), *Meloidogyne* spp., são considerados importantes patógenos da cultura do café que podem limitar a produção e causar perdas econômicas. *Meloidogyne izarcoensis* foi recentemente detectada no Brasil parasitando cafeeiros no Triângulo Mineiro, MG. Com objetivo de determinar a distribuição desses nematoides nessa região, foi realizado um levantamento em cafezais nos municípios de Araguari e Indianópolis, próximo à região da primeira detecção de *M. izarcoensis* na cultura no país. No início das identificações das espécies, o perfil de esterases foi usado, no entanto, o emprego da técnica eletroforese com a referida isoenzima foi limitante na detecção de *M. exigua*, pela frequente ausência de bandas em amostras com sintomas radiculares típicos dessa espécie. Assim, optou-se pelo uso dos marcadores SCAR-café, os quais possibilitaram a detecção de todas as espécies em multiplex. Com base nas esterases e nos marcadores SCAR, os NGs foram detectados em 79,17% do total de amostras, sendo que *M. exigua* (562 pb), *M. incognita* (399 pb), *M. paranaensis* (208 pb) e *M. izarcoensis* (670 pb) estiveram presentes em 41,67%, 33,33%, 20,83% e 4,17% das amostras, respectivamente. Misturas de populações foram observadas em 20,83%, ou seja, *M. paranaensis* + *M. exigua* (8,33%) e *M. incognita* + *M. exigua* (12,5%). Verificou-se que *M. exigua* foi a espécie prevalente, *M. izarcoensis* ainda possui ocorrência restrita na região onde foi inicialmente detectada, e confirmou-se a ocorrência das demais espécies do cafeeiro no estado de Minas Gerais.

Termos para indexação: cafeeiro, esterases, marcadores SCAR, *Meloidogyne* spp., nematoide-das-galhas.

¹ Engenheira agrônoma, doutoranda em Fitopatologia, bolsista, Consórcio Pesquisa Café, Brasília, DF.

² Engenheira agrônoma, doutora em Fitopatologia, professora na Universidade do Estado da Bahia, Salvador, BA.

³ Bióloga, doutora em Agronomia, bolsista, INCT-Café/CNPq na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

⁴ Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, mestra em Biotecnologia, bolsista, Consórcio Pesquisa Café, Brasília, DF.

⁵ Graduando em Agronomia, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

⁶ Engenheiro agrônomo, doutor em Fitopatologia, professor da Universidade de Brasília, Brasília, DF.

⁷ Engenheira agrônoma, doutora em Parasitologia, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Survey of *Meloidogyne* spp. on coffee in Triângulo Mineiro region of Brazil: restricted occurrence of *M. izarcoensis*

Abstract – Root-knot nematodes (RKNs), *Meloidogyne* spp. are considered important pathogens of coffee crop, limiting production and causing economic losses. *Meloidogyne izarcoensis* was recently detected in the Triângulo Mineiro (MG) region of Brazil, parasitizing coffee plants. To study the distribution of this nematode species in this region, a survey of *Meloidogyne* spp. on coffee plantations was carried out in Araguari and Indianópolis counties, in the Triângulo Mineiro region of Minas Gerais state. At the beginning of the survey, the esterase profile was used, but with this technique the detection of *M. exigua* was restricted with the non-detection of bands in some samples with typical root symptoms of this species. Considering that, SCAR-coffee makers were used, this kit can detect all species from Brazil in multiplex. Based on esterase phenotypes and SCAR markers, RKNs were detected in 79.17% of the total samples. The species *M. exigua* (562 bp), *M. incognita* (399 bp), *M. paranaensis* (208 bp), and *M. izarcoensis* (670 bp), were detected in 41.67%, 33.33%, 20.83% and 4.17% of samples, respectively. Mixed populations were observed also in 20.83%, i.e. *M. paranaensis* + *M. exigua* (8.33%) or *M. incognita* + *M. exigua* (12.5%). *Meloidogyne exigua* was the prevalent species, occurring in most samples. This survey confirmed that *M. izarcoensis* has a restricted occurrence in the region, where it was initially detected and confirmed the occurrence of other coffee *Meloidogyne* species in the state of Minas Gerais.

Index terms: coffee plants, esterases, SCAR markers, *Meloidogyne* spp., root-knot nematodes.

Introdução

O Brasil é considerado o maior produtor e exportador mundial de café (*Coffea arabica* L. e *C. canephora* Pierre), e também o segundo maior consumidor do produto (Coorpecam, 2020). Na safra 2020, o país atingiu um volume total de 63,08 milhões de sacas, e a região do Cerrado mineiro (Triângulo Mineiro, Alto Parnaíba e Noroeste), localizada no estado de Minas Gerais, foi responsável pela produção de 6 milhões de sacas (Conab, 2020).

A cultura do café está sujeita ao ataque de pragas e doenças que podem limitar a produção e causar perdas econômicas. Espécies pertencentes ao gênero *Meloidogyne* Göldi, 1887, comumente conhecidas como nematoides-das-galhas (NGs), são consideradas os patógenos mais importantes dessa cultura, podendo ser responsáveis por perdas de produtividade de aproximadamente 36% em todo o mundo (Hein; Gatzweiler, 2006; Lima et al., 2015; Villain et al., 2018). Até o momento, dezenove espécies de *Meloidogyne* foram relatadas parasitando cafeeiros, incluindo *M. izarcoensis* Carneiro, Almeida, Gomes & Hernandez, 2005 (Carneiro; Cofcewicz, 2008), que recentemente teve seu primeiro relato no Brasil, parasitando cafeeiros no município de Indianópolis, na região do Triângulo Mineiro, Minas Gerais (Stefanelo et al., 2019), onde a cafeicultura tem relevante importância social e econômica.

Nos cafezais brasileiros, dentre as principais espécies do gênero *Meloidogyne* que causam danos à cultura, *M. exigua* Göldi, 1887 é a espécie mais frequente (endêmica), seguida por *M. incognita* (Kofoid; White, 1919) Chitwood, 1949 e *M. paranaensis* (Carneiro et al., 1996; Villain et al., 2018). No entanto, as espécies *M. paranaensis* e *M. incognita* são consideradas as mais prejudiciais devido à sua agressividade, alta persistência no solo e grande número de hospedeiros (Campos; Villain, 2005; Salgado et al., 2021). Os sintomas causados por NGs em raízes de café podem diferir entre as espécies. Por exemplo, *M. exigua* causa numerosas galhas pequenas a grandes, arredondadas ou alongadas, principalmente em raízes novas e esbranquiçadas, enquanto *M. paranaensis* e *M. incognita* causam pequenas galhas alongadas e inchaços nas raízes mais jovens, descamação e rachadura da superfície da raiz devido à hipertrofia de tecidos infectados, rupturas do córtex e da epiderme causadas por massas de ovos, o que pode resultar na

destruição completa do sistema radicular (Carneiro; Cofcewicz, 2008; López-Lima et al., 2015; Villain et al., 2018). Já os sintomas radiculares causados por *M. izalcoensis* são completamente diferentes daqueles causados por *M. paranaensis*, *M. incognita*, *M. arabicida* Lopez; Salazar, 1989 e *M. exigua*. Essa espécie causa pequenas galhas típicas, principalmente nas extremidades de raízes novas com tecido necrótico, e produz massas de ovos externas às raízes (Figura capa), em grande quantidade (Carneiro et al., 2005a; Stefanelo et al., 2019).

Para evitar a disseminação desses nematoides para novas áreas, é necessário conhecer a distribuição atual das espécies de NGs e adotar medidas para conter os focos da doença (Santos et al., 2018). A correta identificação das espécies de nematoides é um aspecto muito importante para a escolha de medidas de controle e para a realização de testes de resistência em programas de melhoramento de plantas (Randig et al., 2002; Correa et al., 2013). Métodos bioquímicos, como eletroforese de isoenzimas, principalmente esterases e marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) são ferramentas importantes e têm sido utilizadas na identificação de espécies de *Meloidogyne* (Carneiro et al., 2016).

A análise de isoenzimas por eletroforese apresenta diferentes vantagens, como baixo custo, reprodutibilidade, rapidez e detecção de misturas de espécies de NGs (Carneiro et al., 2000; Ito et al., 2019). No entanto, esta técnica exige o uso de fêmeas intactas, o que se torna um fator limitante na cultura do café, visto que por se tratar de uma planta perene, as amostras de raízes muitas vezes são enviadas aos laboratórios em condições ruins, inviabilizando a retirada de fêmeas em bom estado para uso empregando-se essa metodologia. Além disso, outra limitação desta técnica está relacionada à detecção de *M. exigua*, uma vez que as fêmeas dessa espécie possuem tamanho pequeno e baixa concentração de esterase (Santos et al., 2021). Os marcadores SCAR espécie-específicos foram estabelecidos por Randig et al. (2002) para sanar esse problema e identificar as três principais espécies de NGs do café que ocorrem no Brasil (*M. exigua*, *M. paranaensis* e *M. incognita*). Esses primers estão incluídos no kit diagnóstico SCAR-café, que mais recentemente foi estendido às espécies presentes nas Américas: *M. arabicida* e *M. izalcoensis* (Correa et al., 2013). Essa técnica pode ser utilizada na reação

de multiplex-PCR com vários primers juntos, o que possibilita a identificação de espécies, detecção em misturas e diagnóstico rápido (Randig et al., 2002; Correa et al., 2013).

Considerando a importância do estado de Minas Gerais como maior produtor de café do Brasil e o recente relato de *M. izalcoensis* na região do Triângulo Mineiro, o objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência e distribuição de *Meloidogyne* spp. em cafezais dessa região, dando ênfase a *M. izalcoensis*, por meio de eletroforese de isoenzimas, quando possível, e marcadores moleculares específicos, estabelecidos para as espécies do nematoide-das-galhas do cafeeiro (SCAR-PCR-café).

Material e Métodos

Dois levantamentos foram realizados em cafezais localizados nos municípios de Araguari e Indianópolis, ambos pertencentes à região do Triângulo Mineiro, no estado de Minas Gerais. Em cada talhão do café amostrado, foi coletada uma amostra composta por raízes (aprox. 500g) e solo (aprox. 2000 cm³), a uma profundidade que variou de 0-60 cm conforme Tabelas 1 e 2. As coordenadas geográficas e a altitude foram registradas com auxílio de um GPS de Navegação, e ao final de cada coleta, foi realizada a limpeza dos instrumentos utilizados para evitar a disseminação de nematoides entre áreas e propriedades, e a contaminação das amostras. Sempre foram coletadas amostras de cafeeiros com sintomas de meloidoginose, sendo que no primeiro levantamento foram coletadas amostras com raízes mais novas, e no segundo, coletando todo sistema radicular de cafeeiros de diferentes idades.

O primeiro levantamento foi realizado em novembro de 2018 e o segundo em novembro de 2021, devido à pandemia da COVID-19. No primeiro, foram coletadas nove amostras de raízes em nove cafezais (Tabela 1), e entre elas, raízes de soja 'BRS Favorita RR1', na mesma área anteriormente plantada com café em 2017, e onde havia sido detectada anteriormente *M. izalcoensis*. No segundo, quinze amostras de raízes em quinze cafezais foram coletadas (Tabela 2). Essas amostras foram levadas ao Laboratório de Nematologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Tabela 1. Identificação das áreas de coleta de amostras de raízes de cafeeiros nos municípios de Araguari e Indianópolis, região do Triângulo Mineiro, MG coletadas em 2018.

Área	Irrigado ou Sequeiro	Cultivar	Área (ha)	Idade (anos)	Coordenadas geográficas		Elevação (m)	Município
					S	W		
A1	Irrigado	Catuai	16	-	18°38'19"	48°15'16"	909	Araguari
A2	Sequeiro	Acauã	1	3	18°46'07"	48°00'55"	941	Araguari
A3	Irrigado	Mundo Novo	11	15	18°46'11"	48°00'59"	934	Araguari
A4	Sequeiro	IBC 12	12	8	19°00'05"	47°53'36"	923	Indianópolis
A5	Irrigado	Catuai 99	28	12	18°54'17"	47°54'33"	951	Indianópolis
A6	Sequeiro	Catuai 99 e Topázio	25	20	18°47'35"	48°02'24"	909	Araguari
A7	Irrigado	Mundo Novo	6	20	18°31'17"	48°14'49"	922	Araguari
A8	Irrigado	Catuai 99	9	15	18°31'36"	48°14'45"	932	Araguari
A9*	Sequeiro	Mundo Novo e IAC 125 RN	-	-	18°53'52.84"	47°54'21"	968	Indianópolis

*População estudada por Stefanelo et al., 2019 e mantida em casa de vegetação na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; área plantada com soja BRS Favorita RR1 amostrada por ocasião do primeiro levantamento em 2017.

Tabela 2. Identificação das áreas de coleta de amostras de raízes de cafeeiros nos municípios de Araguari e Indianópolis, região do Triângulo Mineiro, MG coletadas em 2021.

Área	Irrigado ou Sequeiro	Cultivar	Área (ha)	Idade (anos)	Coordenadas geográficas		Elevação (m)	Município
					S	W		
A10	Irrigado	Mundo Novo	12	3	18°38'04,9"	48°14'41,5"	948	Araguari
A11	Irrigado	Mundo Novo	7	3	18°31'07,0"	48°26'56,03"	891	Araguari
A12	Irrigado	Mundo Novo	6,5	8	18°31'07,6"	48°26'54,5"	894	Araguari
A13	Irrigado	Catuaí 144	2	5	18°36'27,7"	48°12'49,9"	938	Araguari
A14	Irrigado	Mundo Novo	3,6	17	18°36'15,3"	48°12'50,3"	934	Araguari
A15	Irrigado	Catuaí 62	1,2	5	18°36'13,1"	48°12'51,6"	933	Araguari
A16	Irrigado	Mundo Novo	16	25	18°33'49,7"	48°12'24"	940	Araguari
A17	Irrigado	Mundo Novo	3	2	18°32'39,2"	48°12'49,7"	954	Araguari
A18	Irrigado	Mundo Novo	18	8	18°39'56,1"	48°08'18,5"	918	Araguari
A19	Irrigado	Mundo Novo	4,5	3	18°47'58,3"	48°02'37,7"	902	Araguari
A20	Irrigado	Mundo Novo	4,5	2	18°48'08,8"	48°02'41,1"	872	Araguari
A21	Irrigado	Catuaí 62	3,3	4	18°31'37,0"	48°14'45,6"	944	Araguari
A22	Irrigado	Catuaí 144	10	20	18°31'37,4"	48°14'47,2"	947	Araguari
A23	Irrigado	Catuaí 62	8,5	15	18°54,02'5"	47°55'31,2"	924	Indianópolis
A24	Irrigado	Mundo Novo	12	15	18°54'09,9"	47°55'54,3"	911	Indianópolis

Quando possível, as fêmeas foram extraídas das raízes e submetidas à técnica de eletroforese de isoenzimas, segundo Carneiro e Almeida (2001). Em seguida, cada amostra foi processada separadamente para extração dos ovos de *Meloidogyne* spp., pelo método modificado de Hussey e Barker (1973), que ao invés de agitação manual, consistiu no uso de um liquidificador de alta rotação com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5%, por 80 segundos, dividido em dois intervalos de tempo. A suspensão de ovos obtida de cada amostra foi colocada em funil de Baermann modificado para eclosão e obtenção de juvenis de segundo estágio (J2s), de acordo com Whitehead e Hemming (1965). As coletas dos J2s foram realizadas a cada dois dias por um período de 8 semanas. O DNA genômico dos J2s foi extraído de acordo com o método descrito por Randig et al. (2002), e testes de amplificação foram realizados com quatro pares de primers espécie-específicos do tipo SCAR (Tabela 3), descritos para a identificação das espécies *M. paranaensis*, *M. incognita*, *M. exigua* e *M. izalcoensis* (Randig et al., 2002; Correa et al., 2013).

Tabela 3. Características dos marcadores moleculares SCAR desenvolvidos para as espécies de *Meloidogyne* associadas ao cafeeiro.

Espécies	Primers SCAR	Sequências (5'→3')	Tamanho SCAR (pb)	Referência
<i>M. paranaensis</i>	par-C09F par-C09R	GCCCGACTCCATTTGACGGA CCGTCCAGATCCATCGAAGTC	208	Randig et al. (2002)
<i>M. incognita</i>	inc-K14F inc-K14R	GGGATGTGTAAATGCTCCTG CCCCTACACCCTCAACTTC	399	Randig et al. (2002)
<i>M. exigua</i>	ex-D15F ex-D15R	CATCCGTGCTGTAGCTGCGAG CTCCGTGGGAAGAAAGACTG	562	Randig et al. (2002)
<i>M. izalcoensis</i>	iz-AB2F iz-AB2R	GGAAACCCCTAATTAGGATACAC CGCTTGATTTGAGCAGTAGG	670	Correa et al. (2013)

No primeiro levantamento em 2018, as plantas de café das áreas amostradas apresentavam sintomas mais leves de meloidoginose e as raízes coletadas foram mais novas, permitindo a análise das esterases e marcadores SCAR. No local da detecção anterior de *M. izalcoensis* em 2017 (Stefanelo et al., 2019), o produtor havia arrancado os cafeeiros e plantado soja cv. BRS Favorita RR1 (Tabela 1). No segundo levantamento, em 2021, as raízes

das plantas amostradas estavam mais danificadas, impossibilitando a análise usando as esterases. Dessa maneira, as raízes foram analisadas apenas usando o kit SCAR café em multiplex (Randig et al., 2002; Correa et al., 2013). No caso dos nematoides do cafeeiro, várias populações de *M. exigua* não parasitam o tomateiro, sendo a reprodução do nematoide nessa planta não recomendada para confirmação das espécies dos levantamentos.

Resultados

O nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) foi detectado em 79,17% dos 24 cafezais inspecionados em Minas Gerais (Figura 1). Dentre as espécies identificadas, observou-se que *M. exigua* foi a mais frequente nas amostras analisadas. Essa espécie foi encontrada em 41,67% do total de amostras analisadas, enquanto *M. incognita* foi encontrada em 33,33%, *M. paranaensis* em 20,83% e *M. izalcoensis* em 4,17%. Os nematoides-das-galhas também foram detectados em misturas (20,83% das amostras), incluindo *M. incognita* + *M. exigua* em 12,5%, e *M. paranaensis* + *M. exigua* em 8,33% das amostras examinadas.

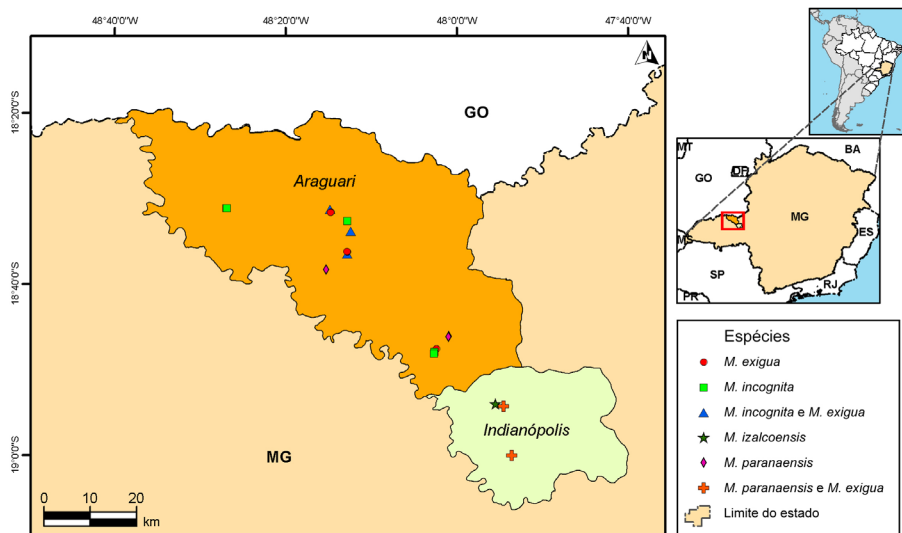


Figura 1. Distribuição espacial de *Meloidogyne* spp. em cafeeiros nos municípios de Araguari e Indianópolis na região do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brasil.

Elaborado por Sergio Eustáquio de Noronha – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

No primeiro levantamento, do total de nove áreas amostradas, cinco apresentaram as espécies *M. paranaensis* e *M. exigua*, e em uma foi detectada *M. incognita* (Tabela 4). A espécie *M. izarcoensis* foi encontrada apenas na detecção anterior de 2017 feita por Stefanelo et al. (2019) (A9). A amostragem realizada na soja em 2018 não detectou nenhuma espécie de *Meloidogyne* nessa cultura, e isso abre a suspeita que essa planta seja má hospedeira de *M. izarcoensis*, ou que, a cultivar BRS Favorita RR1 seja resistente a essa espécie. Misturas de espécies foram detectadas em três áreas amostradas (A4, A5 e A7), duas com *M. paranaensis* e *M. exigua* (A4 e A5), e uma área com *M. incognita* e *M. exigua* (A7).

Tabela 4. Espécies de *Meloidogyne* parasitando cafeeiros nos municípios de Araguari e Indianópolis-MG, detectadas por esterase e marcadores SCAR-PCR.

Áreas	Município	Espécies	
		Esterase (EST)	SCAR – PCR
A1	Araguari	<i>M. paranaensis</i>	<i>M. paranaensis</i>
A2	Araguari	-	<i>M. paranaensis</i>
A3	Araguari	<i>M. paranaensis</i>	<i>M. paranaensis</i>
A4	Indianópolis	<i>M. paranaensis</i> e <i>M. exigua</i>	<i>M. exigua</i>
A5	Indianópolis	<i>M. paranaensis</i> e <i>M. exigua</i>	<i>M. paranaensis</i> e <i>M. exigua</i>
A6	Araguari	<i>M. exigua</i>	<i>M. exigua</i>
A7	Araguari	<i>M. incognita</i> e <i>M. exigua</i>	<i>M. incognita</i> e <i>M. exigua</i>
A8	Araguari	<i>M. exigua</i>	<i>M. exigua</i>
A9*	Indianópolis	<i>M. izarcoensis</i>	<i>M. izarcoensis</i>

*População estudada por Stefanelo et al., 2019 e mantida em casa de vegetação na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A identificação das espécies no primeiro levantamento foi possível devido ao uso combinado de eletroforese de isoenzimas revelando a α esterase (Est) e marcadores moleculares espécie-específicos (SCAR-PCR). O fenótipo Est E2 (Rm 1,1 e 1,9) foi detectado em todas as populações de *M. exigua* (Figura 2A). As populações de *M. paranaensis* apresentaram o fenótipo Est P1 (Rm: 1,32) (Figura 2B). Uma população de *M. incognita* com fenótipo Est I1 (Rm:1,0) foi detectada (Figura 2C). Apenas em uma das amostras (A2) não foi possível realizar a identificação por esterase devido à destruição das raízes, decorrente do parasitismo por *Meloidogyne* spp.

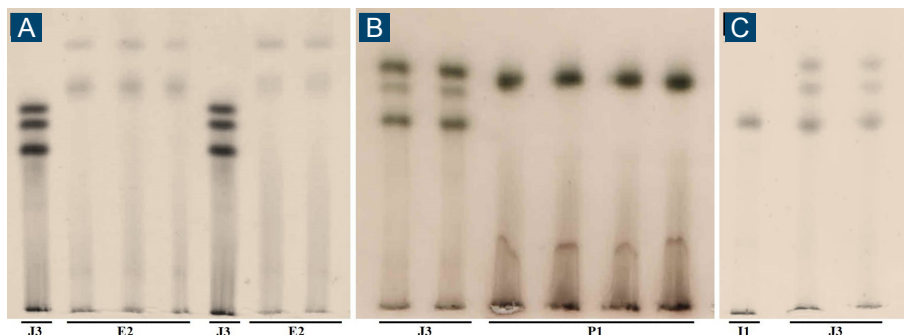


Figura 2. Fenótipos de esterase (Est) de diferentes populações de *Meloidogyne* spp. do Triângulo Mineiro. A) *M. exigua* fenótipo de esterase (Est E2); B) *M. paranaensis* fenótipo de esterase (Est P1). C) *M. incognita* fenótipo de esterase (Est I1); *M. javanica* (Est J3) foi usado como padrão de referência.

A análise de marcadores espécie-específicos do tipo SCAR desenvolvidos para as espécies de nematoides do café: *M. incognita*, *M. paranaensis* e *M. exigua*, um único fragmento de 208 pb foi obtido para as quatro populações de *M. paranaensis*; um fragmento de 399 pb foi obtido para uma população de *M. incognita*; e um fragmento de 562 pb foi amplificado para as cinco populações de *M. exigua* (Figura 3). Esses dados confirmaram a identificação dessas espécies de acordo com perfis de esterase.

Os resultados obtidos neste estudo relacionados à identificação da espécie *M. izarcoensis* foram publicados por Stefanelo et al. (2019) e confirmados através da população mantida em casa de vegetação na Embrapa Cenargen. O fenótipo de esterase Est I4 (Rm: 0,86; 0,96; 1,24; 1,30) foi confirmado (Carneiro et al., 2005a), e a PCR usando primers SCAR, amplificou um fragmento específico de tamanho esperado (670 bp) (Correa et al., 2013).

Na segunda amostragem, do total de quinze amostras coletadas em quinze talhões, em sete (46,66%) foi detectada a presença de *M. incognita*, e em cinco (33,33%) foi detectada *M. exigua* (Tabela 5; Figura 4). A mistura de espécies foi detectada em duas áreas amostradas (A13 e A16), com *M. incognita* e *M. exigua*. No entanto, neste levantamento não foi detectada a presença de *M. paranaensis* e *M. izarcoensis* nas áreas amostradas.

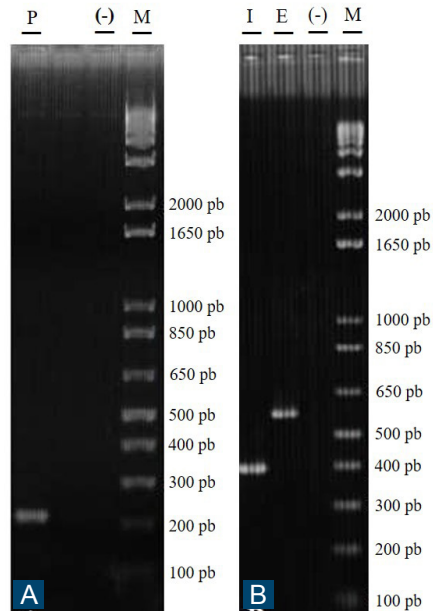


Figura 3. Amplificações SCAR-PCR para *Meloidogyne* spp. parasitas do cafeeiro nos municípios de Araguari e Indianópolis, MG. A) *M. paranaensis* (208 pb); B) *M. incognita* (399 pb), *M. exigua* (562 pb). (-) DNA: controle negativo; M: marcador 1kb DNA Plus; pb: pares de base.

Tabela 5. Espécies de *Meloidogyne* parasitando cafeeiros no município de Araguari-MG, detectadas por marcadores SCAR-PCR.

Áreas	Município	Espécies SCAR – PCR
A11	Araguari	<i>M. incognita</i>
A12	Araguari	<i>M. incognita</i>
A13	Araguari	<i>M. incognita</i> e <i>M. exigua</i>
A14	Araguari	<i>M. exigua</i>
A15	Araguari	<i>M. exigua</i>
A16	Araguari	<i>M. incognita</i> e <i>M. exigua</i>
A17	Araguari	<i>M. incognita</i>
A19	Araguari	<i>M. incognita</i>
A20	Araguari	<i>M. incognita</i>
A22	Araguari	<i>M. exigua</i>

O uso combinado de eletroforese de isoenzimas e marcadores moleculares espécie-específicos (PCR-SCAR) não foi possível devido aos sintomas de meloidoginose em alto grau e raízes mais velhas. Embora nesse levantamento apenas uma amostra (A22) tenha sido submetida à eletroforese de isoenzimas, essa técnica não revelou nenhuma banda de esterase, impossibilitando a identificação da espécie. As demais não foram submetidas a esta técnica porque as fêmeas estavam em péssimas condições de conservação. Na análise com marcadores espécie-específicos do tipo SCAR desenvolvidos para as espécies de nematoides do café: *M. incognita*, *M. paranaensis*, *M. exigua* e *M. izalcoensis*, foi obtido um fragmento de 399 pb para sete populações de *M. incognita* e um fragmento de 562 pb foi amplificado para as cinco populações de *M. exigua*, incluindo amostras da área A22 (Figura 4).

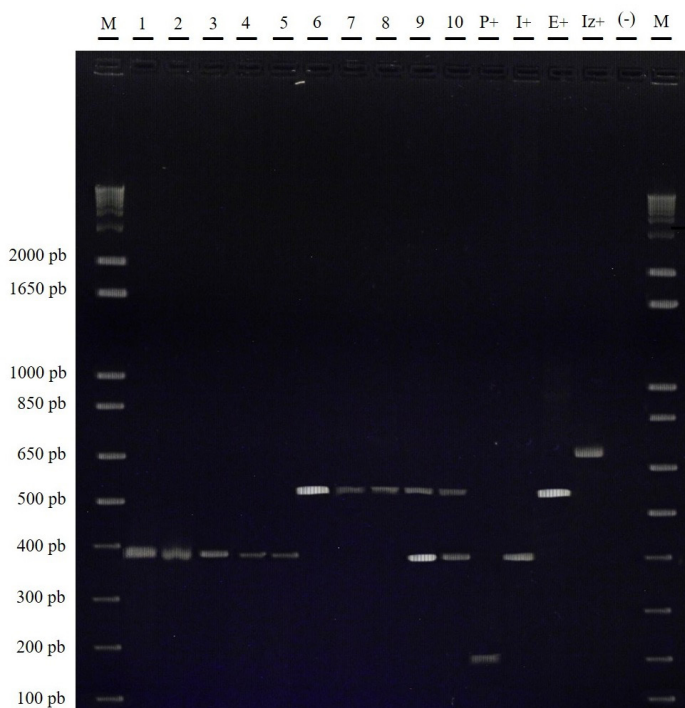


Figura 4. Amplificações SCAR-PCR para *Meloidogyne* spp. parasitas do cafeeiro nos municípios de Araguari e Indianópolis, MG. 1, 2, 3, 4 e 5) *M. incognita* (399 pb); 6, 7 e 8) *M. exigua* (562 pb); 9 e 10) *M. incognita* (399 pb) e *M. exigua* (562 pb). Abreviações dos padrões, P+: *M. paranaensis*, I+: *M. incognita*, E+: *M. exigua*, Iz+: *M. izalcoensis*; (-) DNA: controle negativo; M: marcador 1kb DNA Ladder; pb: pares de base.

Discussão

O presente estudo incluiu a identificação e caracterização de 24 populações de NGs parasitando cafeeiros no Triângulo Mineiro, Brasil. Como resultado, este estudo forneceu informações sobre a distribuição das espécies de *Meloidogyne* nos municípios de Araguari e Indianópolis, indicando a predominância de *M. exigua*, e confirmando-a como uma das principais espécies de NGs associadas ao cafeeiro em áreas produtoras de café do estado de MG. Além disso, esse levantamento evidenciou a presença de *M. incognita* e *M. paranaensis*, e confirmou que *M. izalcoensis* é um nematoide de ocorrência restrita nos cafezais dessa região.

Conforme demonstrado neste estudo, em outras pesquisas conduzidas em cafezais no país, também foi relatada a predominância das três espécies de NGs: *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*, bem como a mistura entre elas. Salgado et al. (2015) constataram a presença de *M. exigua* em 92,95%, *M. paranaensis* em 4,22%, respectivamente; e a mistura de *M. exigua* e *M. paranaensis* em 2,81% das detecções nas 165 amostras coletadas em cafezais na região sul de Minas Gerais. Em levantamento realizado por Carneiro (2014) em 18 cafezais no município de Araguari-MG, as espécies *M. incognita*, *M. exigua* e *M. paranaensis* foram detectadas em 50%, 28% e 17% das amostras, respectivamente, com o auxílio de caracteres morfológicos e de eletroforese de isoenzimas. Carneiro et al. (2005b) estudaram 54 populações de NGs originadas de diferentes cafezais nos estados de São Paulo e Minas Gerais, e observaram a predominância de *M. incognita* em 42,9%, seguido de *M. paranaensis* em 33,3% e *M. exigua* em 21,4%, mas também identificaram misturas de *Meloidogyne* spp. em 24% delas, com a prevalência de *M. incognita* e *M. paranaensis*. Vale ressaltar que a alta suscetibilidade e intolerância das cultivares de *Coffea arabica* a *M. paranaensis* e *M. incognita* é um fator limitante na implantação de novos cafezais em áreas infestadas e na manutenção de cafezais já contaminados (Gonçalves; Silvarolla, 2001).

Este estudo confirmou que a identificação correta de *M. exigua* requer principalmente o uso de marcadores moleculares espécie-específicos (SCAR-PCR), tendo em vista que esta espécie possui tamanho pequeno e baixa concentração de esterase, características que contribuem para a não eficácia da técnica eletroforese de isoenzimas para essa espécie (Santos et

al., 2021). Além disso, nem sempre as fêmeas de *Meloidogyne* spp. nas raízes de cafeeiro estão em condições adequadas para o estudo isoenzimático, pois o sistema radicular pode estar em processo de degradação causado pelos nematoides, ou as raízes podem estar muito velhas ou secas, devido à deficiência hídrica (Salgado et al., 2015).

No estudo realizado por Santos et al. (2018) no Brasil, confirmou-se que a espécie *M. exigua* esteve amplamente distribuída na região sul de Minas Gerais (31,1% das amostras), *M. paranaensis* foi restrita ao município de Três Pontas, e a presença de *M. incognita* ocorreu em três municípios mineiros (Três Pontas, Coqueiral e Aguanil), sendo este o primeiro relato de *M. incognita* parasitando café na região sul desse estado. No entanto, atualmente sabe-se que o Brasil possui ampla distribuição de *M. incognita* em café, devido às inúmeras identificações confiáveis baseadas em marcadores SCAR espécie-específicos e/ou fenótipos de esterase (Campos; Villain, 2005; Carneiro; Cofcewicz, 2008; Villain et al., 2018). A presença dessa espécie foi confirmada em outros países, como Nicarágua (Herrera et al., 2011), Costa Rica e Guatemala, com distribuição confirmada (Villain et al., 2013; Villain et al., 2018) e Vietnã com ampla distribuição (Thrinh et al., 2013).

Meloidogyne paranaensis é tida como amplamente disseminada nos estados do Paraná e São Paulo (Carneiro et al., 1996; Campos; Villain, 2005), embora não existam publicações recentes. Essa espécie já foi detectada na Guatemala, Estados Unidos (Havai) (Carneiro et al., 2004) e México (Lopez-Lima et al., 2015). Ultimamente, vários relatos têm ocorrido na região norte do estado de São Paulo e em várias localidades de Minas Gerais (Castro; Campos, 2004; Souza et al., 2014; Salgado et al., 2015; Villain et al., 2018). O recente levantamento realizado por Bell et al. (2018) em seis cafezais no estado de Minas Gerais confirmou a presença de *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 e *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann, 1898) Goodey, 1959 em 37% e 7% das amostras, respectivamente, e também das espécies *M. exigua*, *M. paranaensis* e *M. incognita* em 35%, 27% e 17% das amostras, respectivamente.

No Brasil, em um cafezal amostrado no município de Araguari, Carneiro (2014) detectou a presença de uma espécie de *Meloidogyne* em Melão-de-São Caetano (*Momordica charantia* L.), que apresentou o fenótipo esterase (Est S4). Esta espécie foi posteriormente identificada neste levanta-

mento como *M. izardoensis*, conforme descrito por Stefanelo et al. (2019). *Meloidogyne izardoensis* foi relatada pela primeira vez em El Salvador, onde causa severa destruição de raízes de cafeeiro, frequentemente ocasionando a morte das plantas (Carneiro et al., 2005a). Essa mesma espécie foi também detectada na África sem informações de danos, no Quênia (Kabete) e na Tanzânia (Mufindi) em cafeeiro, em Tindini em tomateiro, Kianga em pimentão e no Benin (Cotonou) em repolho e *Salvia dorrii* (Kellogg) Abrams (Jorge Júnior et al., 2016; Santos et al., 2019). *Meloidogyne izardoensis* caracteriza-se por diferir molecularmente, bioquimicamente e quanto aos sintomas causados de outros NGs parasitas do cafeeiro que ocorrem no Brasil e nas Américas (Carneiro et al., 2005a).

Conclusão

O presente estudo confirmou que a ocorrência de *M. izardoensis* no Brasil ainda é considerada restrita na região onde essa espécie foi inicialmente detectada. Além disso, os resultados deste levantamento são relevantes para a agricultura mineira porque mostram a importância da adoção de medidas para evitar a disseminação de espécies muito agressivas ao cafeeiro (*M. incognita* e *M. paranaensis*) para outras áreas no estado de Minas Gerais onde elas não ocorrem.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Consórcio Brasileiro de Pesquisas do Café, Embrapa Café, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos recursos e bolsas alocados neste projeto.

Referências

- BELL, C. A.; ATKINSON, H. J.; ANDRADE, A. C.; NGUYEN, H. X.; SWIBAWA, I. G.; LILLEY, C. J.; MCCARTHY, J.; URWIN, P. E. A high-throughput molecular pipeline reveals the diversity in prevalence and abundance of *Pratylenchus* and *Meloidogyne* species in coffee plantations. **Phytopathology**, v.108, p. 641-650, 2018.
- CAMPOS, V. P.; VILLAIN, L. Nematodes parasites of coffee and cocoa. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Eds.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford, UK: CAB International, 2005. p. 529-579.

CARNEIRO, F. A. **Espécies de *Meloidogyne* Goeldi em cafeeiro no município de Araguari, MG.** 2014. 42 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; GOMES, A. C. M. M.; HERNANDEZ, A. *Meloidogyne izalcoensis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising coffee in El Salvador. **Nematology**, v. 7, p. 819-832, 2005a.

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

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

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

CARNEIRO, R. M. D. G.; COFCEWICZ, E. T. Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In: Souza, R. M. (Ed.) **Plant-parasitic nematodes of coffee**. New York, NY, USA: APS Press & Springer, 2008. p. 87-122.

CARNEIRO, R. M. D. G.; MONTEIRO, J. M. S.; SILVA, U. C.; GOMES, G. O gênero *Meloidogyne*: Diagnose através da eletroforese de isoenzimas e marcadores SCAR. In: OLIVERIA, C. M. G.; Dos SANTOS, M. A.; CASTRO, L. H. S. (Eds.). **Diagnose de fitonematoides**. Campinas, SP: Millennium, 2016. p. 46-70.

CARNEIRO, R. M. D. G.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M. R. A.; GONÇALVES, W. Identificação e caracterização de *Meloidogyne* em cafeeiro nos Estados de São Paulo e Minas Gerais através dos fenótipos das esterases e Scar-Multiplex-PCR. **Nematologia Brasileira**, v. 29, p. 233-241, 2005b.

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

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento safra brasileira: café.** Safra 2020. Quarto levantamento. v.5. n.6. Brasília, DF, 2020, p. 1-45.

COOPERCAM. Disponível em: <http://coopercam.com.br/noticias/selecionada/brasil_maior_exportador_cafe>. Acesso em: 10 jan 2020.

CASTRO, J. M. C.; CAMPOS, V. P. Detecção de *Meloidogyne paranaensis* em cafeeiros do Sul de Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, v. 30, p. 507, 2004.

CORREA, V. R.; SANTOS, M.F.A.; ALMEIDA, M. R. A.; PEIXOTO, J. R.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R. M. D. G. Species-specific DNA markers for identification of two root-knot nematodes of coffee: *Meloidogyne arabicida* and *M. izalcoensis*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 137, p. 305-313, 2013.

HEIN, L.; GATZWEILER, F. The economic value of coffee (*Coffea arabica*) genetic resources. **Ecological Economics**, v. 60, p. 176-185, 2006.

HERRERA, I.; BRYNGELSSON, T.; MONZÓN, A.; GELETA, M. Identification of coffee root-knot nematodes based on perineal pattern, SCAR markers and nuclear ribosomal DNA sequences. **Nematologia Mediterranea**, v. 39, p. 101-110, 2011.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A. Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, p. 1025-1028, 1973.

ITO, D. S.; MATUNAGA, D. S.; SILVA, A. G.; DORIGO, O. F.; MACHADO, A. C. Z.; CARNEIRO, M. D. G. C. Identificação Bioquímica de *Meloidogyne* spp. In: Machado, A. C. Z.; Silva, S. A.; Ferraz, L. C. C. B. (Eds.). **Métodos em nematologia agrícola**. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Nematologia, 2019. p. 71-93.

JORGE JÚNIOR, A. S.; CARES, J. E.; MATTOS, V. S.; SANTOS, M. F. A.; COYNE, D. L.; CARNEIRO, R. M. D. G. First report of *Meloidogyne izardoensis* (Nematoda: Meloidogynidae) on coffee, cabbage and other crops in Africa. **Plant Disease**, v. 100, p. 2173-2173, 2016.

GONÇALVES, W.; SILVAROLLA, M. B. NEMATÓIDES PARASITAS DO CAFEEIRO. IN: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Tecnologias de produção de café com qualidade**. Viçosa: Editora UFV, 2001. p. 199-268.

LIMA, E. A.; FURLANETTO, C.; NICOLE, M.; GOMES, A. C. M. M.; ALMEIDA, M. R. A.; JORGE-JÚNIOR, A.; CORREA, V. R.; SALGADO, S. M.; FERRÃO, M. A. G.; CARNEIRO, M. D. G. The multi-resistant reaction of drought-tolerant coffee 'Conilon Clone 14' to *Meloidogyne* spp. and late hypersensitive-like response in *Coffea canephora*. **Phytopathology**, v. 105, p. 805-814, 2015.

LOPEZ-LIMA, D.; SÁNCHEZ-NAVA, P.; CARRION, G.; MONTEROS, A. E.; VILLAIN, L. Corky-root symptoms for coffee in central Veracruz are linked to the root-knot nematode *Meloidogyne paranaensis*, a new report Mexico. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, p. 623-629, 2015.

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

SALGADO, S. M. L.; FATOBENE, B. J. dos R.; TERRA, W. C.; CARNEIRO, R. M. D. G. **Nematoides parasitas do cafeeiro**: aspectos gerais e controle. Boletim Técnico 111. Belo Horizonte: EPAMIG, 2021.56 p.

SALGADO, S. M. L.; GUIMARÃES, N. M. R. B.; BOTELHO, C. E.; TASSONE, G. A. T.; MARCELO, A. L.; SOUZA, S. R.; OLIVEIRA, R. D. L.; FERREIRA, D. F. *Meloidogyne paranaensis* e *Meloidogyne exigua* em lavouras cafeeiras na região Sul de Minas. **Coffee Science** v. 10, p. 475-481, 2015.

SANTOS, M. F. A.; MATTOS, V. S.; MONTEIRO, J. M. S.; ALMEIDA, M. R. A.; JORGE JR, A. S.; CARES, J. E.; CASTAGNONE-SERENO, P.; COYNE, D.; CARNEIRO, M. R. D. G. Diversity of *Meloidogyne* spp. from peri-urban areas of sub-Saharan Africa and their genetic similarity with populations from the Latin America. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 105, p. 110-118, 2019.

SANTOS, M. F. A.; SALGADO, S. M. L.; SILVA, J. G. P.; CORREA, V. R.; CARNEIRO, R. M. D. G. *Meloidogyne incognita* parasitizing coffee plants in southern Minas Gerais, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, p. 95-98, 2018.

SANTOS, M. F. A.; SOUSA, G. P.; ALMEIDA, S. F.; MAIA, Y. M.; SALGADO, S. M. L.; VILELA, D. J. M.; CARNEIRO, R. M. D. G. **Deteção de *Meloidogyne exigua* em cultivares de cafeeiro resistentes usando marcadores moleculares e a influência de mecanismos tardios nos sintomas e na resistência ao nematoide**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2021. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / Comunicado Técnico, 211).

SOUZA, S. R.; SALGADO, S. M. L.; SILVA, A. P.; BARROS, A. F.; SANTOS, M. A.; TASSONE, G. A. T. **Ocorrência de *Meloidogyne paranaensis* em lavouras cafeeiras da Região Sul de Minas Gerais**. Circular técnica, n.191. Minas Gerais: EPAMIG, 2014. p. 2p.

STEFANELO, D. R.; SANTOS, M. F. A.; MATTOS, V. S.; BRAGHINI, M. T.; MENDONÇA, J. S. F.; CARES, J. E.; CARNEIRO, R.M.D.G. *Meloidogyne izarcoensis* parasitizing coffee in Minas Gerais state: the first record in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, p. 209-212, 2019.

TRINH, P. Q.; PHAM, K. D.; NGUYEN, N. C. Emerging *Meloidogyne* species (root-knot nematodes) threats to coffee in the Western Highlands in Vietnam. Proceedings of the second VAST-KAST work-shop on biodiversity and bio-active compounds. VAST-KAST, Hanoi, p. 313-319, 2013.

VILLAIN, L.; SALGADO, S. M. L.; TRINH, P. Q. Nematodes parasites of coffee and cocoa. In: Sikora, R. A.; Coyne, D. L.; Hallman, J.; Timper, P. (Eds.) **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford, UK: CABI, 2018. p. 536-583.

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

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



*Recursos Genéticos
e Biotecnologia*

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL