



COMUNICADO
TÉCNICO

211

Brasília, DF
Novembro, 2021

Embrapa

Detecção de *Meloidogyne exigua* em cultivares de cafeeiro resistentes, usando marcadores moleculares e a influência de mecanismos tardios nos sintomas e na resistência ao nematoide

Marcilene F. A. Santos
Gleiciane P. Sousa
Sheila F. Almeida
Yuri M. Maia
Sônia M. L. Salgado
Diego J. M. Vilela
Regina M.D.G. Carneiro

Detecção de *Meloidogyne exigua* em cultivares de café resistente, usando marcadores moleculares e a influência de mecanismos tardios nos sintomas e na resistência ao nematoide

Marcilene F. A. SANTOS¹, Gleiciane P. SOUSA¹, Sheila F. ALMEIDA¹, Yuri M. MAIA¹, Sônia M. L. SALGADO²,
Diego J. M. VILELA³ e Regina M.D.G. CARNEIRO¹

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372, 70849-979 Brasília-DF, Brasil; ² EPAMIG Sul, Campus da UFLA, CP.176, 37200-000 Lavras, MG, Brasil. ³EPAMIG Oeste Campo Experimental de Patrocínio, Estrada da Lagoa Seca, C.P.171, CEP 38740-970. Patrocínio, MG.

Meloidogyne spp. estão entre os nematoides mais amplamente distribuídos ao nível global e provavelmente os mais nocivos ao café, especialmente na América Latina (Villain et al., 2018). Até o momento, 19 espécies de nematoide das galhas (NG) foram relatadas parasitando o café. No Brasil podem ser classificadas como espécies primárias, amplamente distribuídas: *Meloidogyne exigua*, *M. paranaensis* e *M. incognita*; e secundárias, de ocorrência restrita: *M. coffeicola* e *M. izarcoensis*. De acordo com Campos; Villain (2005) dentre as espécies que provocam prejuízos ao café, *M. exigua* é a mais disseminada e endêmica nas áreas produtoras de café no Brasil, ao lado de *M. paranaensis* e *M. incognita*, as mais agressivas.

Meloidogyne exigua engloba populações geneticamente variáveis, devido à reprodução por partenogênese meiótica, com diversidade genética variando de 26 a 60%, obtida através de marcadores moleculares (Muniz et al., 2008). Essa variabilidade genética inclui populações extremamente virulentas, como é o caso da população de Bom Jesus de Itabapoana, RJ, que quebrou a resistência da cultivar IAPAR 59, portadora do gene Mex-1 (Muniz et al., 2009).

A identificação de *M. exigua* pode ser realizada baseando-se nos fenótipos das α esterases detectados em gel de poliácridamida (Carneiro; Almeida, 2001). Entretanto, a utilização desse método é dificultada para essa espécie devido ao reduzido tamanho desse nematoide e a baixa concentração dessa enzima. Dessa maneira, Randig et al. (2002) desenvolveram os marcadores SCAR espécie-específicos que permitem a identificação das principais espécies de NG que ocorrem no café no Brasil (*M. exigua*, *M. paranaensis* e *M. incognita*), usando ovos ou juvenis de segundo estágio (J2) extraídos ou eclodidos a partir do macerado de raízes. Mais recentemente, com a detecção

de *M. izardoensis* no Triângulo Mineiro (Stefanelo et al., 2019), mais essa espécie foi incorporada ao Kit SCAR-café, ampliado para as espécies de NG das Américas por Correa et al. (2013), o que facilita a diferenciação também dessa espécie, que apresenta sintomas na raiz, semelhantes aos de *M. exigua*, com a formação de pequenas galhas no sistema radicular, necroses e massas de ovos (Stefanelo et al., 2019).

Em geral, as amostras de raízes de café chegam em condições precárias aos laboratórios para retirada de fêmeas intactas exigidas para a análise das isoenzimas. Dessa maneira, os marcadores SCAR-café são muito mais adequados, pois permitem a análise a partir de ovos e/ou juvenis de segundo estágio (J2s, garantindo uma melhor limpeza do material para posterior extração do DNA de melhor qualidade. O material a ser analisado deve compreender um bom número de indivíduos, o que permite a análise em reação multiplex (vários primers), capaz de detectar espécies misturadas, muito comum em levantamentos realizados no Brasil (Carneiro et al., 2005).

Devido à ocorrência de galhas em cultivares resistentes, convém enfatizar que alguns estudos foram realizados esclarecendo os mecanismos de resistência de cafeeiros ao NG. O 'INCAPER clone 14' de *Coffea canephora* e o genótipo '16-6-1', de *C. arabica*, por exemplo, apresentaram reação de hipersensibilidade (RH) a *Meloidogyne* spp., que impediu inicialmente a penetração dos J2s até o cilindro central da raiz. Alguns J2s, entretanto, conseguiram estabelecer sítios de alimentação junto aos vasos condutores, com células gigantes que se mostraram malformadas com fêmeas com poucos ovos ou nenhuma reprodução (Anthony et al., 2005; Lima et al., 2015; Alves et al., 2019). Isso mostra que o mecanismo de resistência tardio não impediu a formação de galhas, mas diminuiu drasticamente a reprodução do nematoide, o que é sem dúvida um mecanismo de resistência.

Duas amostras de raízes de cafeeiro arábica foram enviadas ao Laboratório de Nematologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia para identificação das espécies de NG. Essas amostras foram retiradas de cafeeiros provenientes do Município de Patrocínio (19°01'08.4"S47°01'57.3"W, Minas Gerais, e enviadas para análise nematológica devido à presença de galhas no sistema radicular, embora sem sintomas de meloidoginose na parte aérea dos cafeeiros (Capa). Essas lavouras são altamente tecnificadas e foram plantadas com as cultivares IAC 125 RN e

MGS Catiguá 3, consideradas resistentes a *M. exigua* (Fatobene et al., 2020). Primeiramente, foram extraídas fêmeas das raízes submetidas à eletroforese de enzimas, de acordo com Carneiro; Almeida (2001).

Como essa metodologia não revelou nenhuma banda de esterase impossibilitando a identificação da espécie, foi feita a extração dos ovos das duas amostras, separadamente, utilizando o método modificado de Hussey; Barker (1973). Foi utilizado um liquidificador de alta rotação ao invés de agitação manual, por 40 segundos. Em seguida, a suspensão de nematoides foi quantificada em lâminas de Peter e colocada em um funil de Baermann modificado para eclosão de juvenis de segundo estágio (J2s), de acordo com Whitehead; Hemming (1965). As coletas foram realizadas a cada dois dias, por um período de 4 semanas, pois a quantidade de ovos extraída foi pequena. Após a coleta dos juvenis das amostras, foi extraído o DNA de acordo com Randig et al. (2002) e testes de amplificação foram realizados com quatro pares de primers espécie-específicos do tipo SCAR (Tabela 1), descritos para a identificação das principais espécies de nematoides que parasitam o cafeeiro no Brasil: *M. paranaensis* (par C09 F/R), *M. incognita* (inc K14 F/R), *M. exigua* (ex D15 F/R) e *M. izardoensis* (iz AB2 F/r), segundo as metodologias descritas por Randig et al. (2002) e Correa et al. (2013), a fim de identificar as espécies presentes nas amostras.

Tabela 1: Características dos marcadores moleculares SCAR desenvolvidos para as espécies de *Meloidogyne* associadas ao cafeeiro.

Espécies	Primers SCAR	Sequências (5'→3')	Tamanho SCAR (pb)	Referências
<i>M. paranaensis</i>	par-C09F	GCCCGA CTCCATTTGA CGGA	208	Randig et al. (2002)
	par-C09R	CCGTCCAGATCCATCGAAGTC		
<i>M. incognita</i>	inc-K14F	GGGATGTGTAAATGCTCCTG	399	Randig et al. (2002)
	inc-K14R	CCCCTACACCCTCAACTTC		
<i>M. exigua</i>	ex-D15F	CATCCGTGCTGTAGCTGCGAG	562	Randig et al. (2002)
	ex-D15R	CTCCGTGGGAAGAAAGACTG		
<i>M. izardoensis</i>	iz-AB2F	GGAAACCCCTAATTAGGATA-CAC	670	Correa et al. (2013)
	iz-AB2R	CGCTTGATTGAGCAGTAGG		

A caracterização da espécie de nematoide pelo fenótipo da α esterase (Carneiro; Almeida, 2001) não permitiu a identificação devido ao não aparecimento de bandas no gel, o que é frequente no caso de *M. exigua* (Carneiro et al., 1996). Já na análise molecular, ocorreu a amplificação da banda de *M. exigua* (562 bp) para as duas populações (Figura 1). Embora tenha ocorrido a formação de galhas típicas de *M. exigua*, as populações detectadas foram baixas, de 22,6 ovos/g de raiz na cultivar IAC 125 RN e 32,1 ovos/g de raiz para MSG Catiguá 3, confirmando a resistência dessas cultivares.

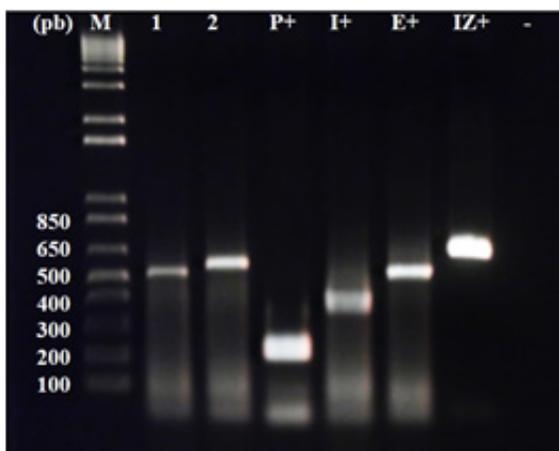


Figura 1. Identificação de *Meloidogyne exigua* nas amostras provenientes do Município de Patrocínio, Minas Gerais, usando SCAR-PCR. Amostras: 1 nematoide proveniente da cultivar IAC 125 e 2 da cultivar Catiguá MG3. Abreviações dos padrões, P+: *M. paranaensis*, I+: *M. incognita*, E+: *M. exigua*, IZ: *M. izalcoensis*; - controle negativo, M pb, marcador do peso molecular.

A hipótese dos produtores e extensionistas em cafeicultura do município de Patrocínio, MG é que as populações coletadas são virulentas às cultivares resistentes plantadas no local. Estudos com populações avirulenta e virulenta de *M. exigua* foram desenvolvidos por Muniz et al. (2009). Considerando os resultados obtidos por esses autores (17.770,5 ovos/g de raiz para *M. exigua* virulenta e 20,6 ovos/g de raiz para o não virulenta) no cafeeiro resistente IAPAR 59. Dessa maneira, devido ao reduzido número de ovos quantificados nas populações de Patrocínio, nota-se que há indícios de resistência nas cultivares coletadas a campo (IAC 125 RN e Catiguá MG3), confirmados pela ausência de sintomas de desnutrição e desfolha na parte aérea das plantas. Foram também observadas, fêmeas malformadas, sem ovos e muitas formas jovens, salsichoides, o que deve estar relacionado a um mecanismo de resistência tardio, já descrito por alguns autores em cafeeiros resistentes como os: 'IAPAR 59', genótipo '16-6-1' e 'INCAPER Clone 14' (Antony et al., 2005; Alves et al., 2019 e Lima et al., 2015) para *M. exigua* e *M. paranaensis*.

Entretanto, esses valores de ovos por grama de raiz só foram quantificados, em duas amostras das cultivares IAC 125 e Catiguá MG3. Para comprovar com segurança a não virulência dessas duas populações de NG, ensaios em casa de vegetação, em condições controladas deveriam ser realizados.

De maneira geral, a espécie de nematoide identificada neste trabalho foi *M. exigua* e os produtores não devem se preocupar com a presença de algumas galhas no sistema radicular, em cultivares de café resistentes a *M. exigua*, devido à existência de um mecanismo de resistência tardio, que embora permita a ocorrência de sintomas, diminui drasticamente a população do nematoide. Esses resultados não podem ser estendidos às outras espécies de NGs dos cafeeiros ocorrentes no Brasil, *M. paranaensis* e *M. incognita*.

Referências

- ALVES, P. S.; FATOBENE, B. J. D. R.; SALGADO, S. M. D. L.; GOMES, A. C.; CAMPOS, V. P.; CARNEIRO, R. M.; DE SOUZA, J. T. Early and late responses characterize the resistance derived from Ethiopian wild germplasm 'Amphillo' of *Coffea arabica* to *Meloidogyne paranaensis*. **Nematology**, v. 21, n. 8, p. 793-804, 2019. doi: <https://doi.org/10.1163/15685411-00003254>.
- ANTHONY, F.; TOPART, P.; MARTINEZ, A.; SILVA, M.; NICOLE, M. Hypersensitive-like reaction conferred by the *Mex-1* resistance gene against *Meloidogyne exigua* in coffee. **Plant Pathology**, v. 54, p. 476 - 482, 2005.
- CAMPOS, V. P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee and cocoa. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (ed.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. 2.ed. Wallingford: CABI Publishing, 2005. p. 529 - 580.
- 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.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M. R. A.; GONÇALVES, W. Identificação e caracterização de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiro nos estados de São Paulo e Minas Gerais através dos fenótipos de esterase e SCAR-Multiplex-PCR. **Nematologia Brasileira**, v. 29, p. 233 - 241, 2005.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; CARNEIRO, R. G. Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. **Fundamental & Applied Nematology**, v. 19, p. 555-560, 1996.
- CORREA, V. R.; DOS 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.
- FATOBENE, B. J. R.; SALGADO, S. M. L.; FERREIRA, F. R. C.; TERRA, W. C. **Cultivares de café resistentes aos nematoides-das-galhas no Brasil**. Circular Técnica, EPAMIG, Minas Gerais, v. 312, p.1-3, 2020.
- HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A. Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease**, v. 57, p. 1025 -1028, 1973.

LIMA, E. A.; FURLANETTO, C.; NICOLE, M.; GOMES, A. C. M. M., ALMEIDA, M. R. A.; JORGE-JUNIOR, A.; CORREA, V. R.; SALGADO, S. M.; FERRÃO, M. A. G.; CARNEIRO, R. 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, 015.

MUNIZ, M. F. S.; CAMPOS, V. P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CASTRO, J. M.; ALMEIDA, M. R.; CARNEIRO, R. M. D. G. Diversity of *Meloidogyne exigua* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations from coffee and rubber tree. **Nematology**, v. 10, p. 897- 910, 2008.

MUNIZ, M. de F. S.; CAMPOS, V. P.; MOITA, A. W.; GONÇALVES, W.; ALMEIDA, M. R. A.; SOUSA, F. R. de; CARNEIRO, R. M. D. G. Reaction of coffee genotypes to different populations of *Meloidogyne* spp.: detection of a naturally virulent *M. exigua* population. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 34, n. 6, p. 370-378, Nov./Dec. 2009.

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.

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**. Wallingfor, UK: CABI. 3ed., 2018. p. 536-583.

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.

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.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

9 a V f Ud U F Y W f g c g ; Y b f i W t g Y
6] c h V b c c [] U U ¯ A ¯ c ¯ e [A ¯ q] 5 ¯ a ¯ e ¯
P q E B , A ¯ í A ¯ o r t e (- ¯ a ¯) ¯ A ¯
7 0 9 7 0 - 7 1 7 , Ó ¯ a ¯ ¯ a ¯ d ¯ o ¯
Fone: +55 (61)3448-4700 Fax: +55
(61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

1ª impressão (GEF):
tiragem



Presidente
Wagner Alexandre Lucena

Secretária-Executiva
Daniela Aguiar de Souza

Membros
Bruno Machado Teles Walter; Daniela Aguiar
de Souza; Marcos Aparecido Gimenes;
Solange Carvalho Barrios Roveri Jose; Márcio
Martinello Sanches; Debora Pires Paula; Ana
Flávia do Nascimento Dias Côrtes; Edson
Junqueira Leite; Andrielle Camara Amaral
Lopes

Supervisão editorial
Daniela Aguiar de Souza

Revisão de texto
Jakcelia Costa da Silva

Normalização bibliográfica
Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes

Tratamento das ilustrações
Marcus Vinicius Pereira e Souza

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Marcus Vinicius Pereira e Souza

Foto da capa
Cultivar Catigua (esquerda) e Cultivar IAC 125
(direita). Giovanni B. Volta, 2021.