

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. izalcoensis* (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	Sequência	Tamanho SCAR SE	Referência
<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. izalcoensis</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.

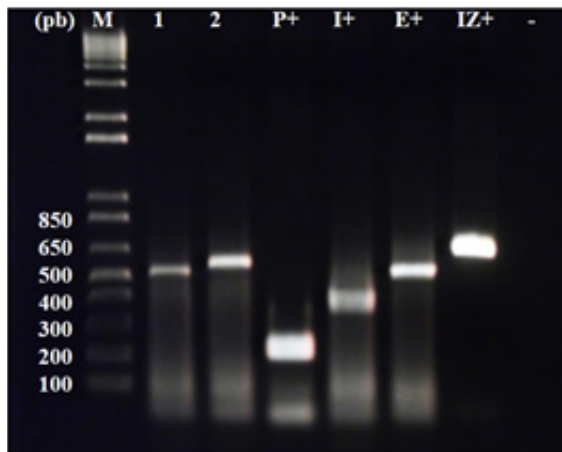


Figura 1. Identificação de *Meloidogyne exigua* nas amostras provenientes do Município de Patrocínio, Minas Gerais, usando SCAR-PCR. Amostras: 1 nematoide proveniente da cultivar IAC 125 e 2 da cultivar Catiguá MG3. Abreviações dos padrões, P+: *M. paranaensis*, I+: *M. incognita*, E+: *M. exigua*, IZ: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

