



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE ISOLADOS DE *Meloidogyne* spp. EM
PIMENTA DO REINO COLETADOS NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO**

THALISSON ROSA DE ARAUJO

BRASÍLIA-DF

MAIO DE 2022

THALISSON ROSA DE ARAUJO

**IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE ISOLADOS DE *Meloidogyne* spp. EM
PIMENTA DO REINO COLETADOS NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO**

Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como parte das exigências do curso de Graduação em Agronomia, para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof^a. Dr^a. Thaís Ribeiro Santiago

BRASÍLIA-DF

MAIO DE 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ARAUJO, T. R. IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE ISOLADOS DE *Meloidogyne* spp. EM PIMENTA-DO-REINO COLETADOS NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2022, (27) páginas. Monografia.

CESSÃO DE DIREITOS

Nome do Autor: THALISSON ROSA DE ARAUJO

Título da Monografia de Conclusão de Curso: IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE ISOLADOS DE *Meloidogyne* spp. EM PIMENTA-DO-REINO COLETADOS NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO

Ano: 2022

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias deste relatório e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva - se a outros direitos de publicação, e nenhuma parte deste relatório pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

THALISSON ROSA DE ARAUJO

**IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE ISOLADOS DE *Meloidogyne* spp. EM
PIMENTA DO REINO COLETADOS NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO**

Monografia apresentada à Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília, como parte das
exigências do curso de Graduação em
Agronomia, para a obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Prof^a. Thaís Ribeiro Santiago

Prof^a Thaís Ribeiro Santiago

Instituto Biológico – Universidade de Brasília
Orientadora / Email: thais.santiago@unb.br

Leila Lourenço Furtado

Doutoranda, Universidade de Brasília – UnB
Examinadora

Francisco de Assis dos Santos Diniz

Doutorando, Universidade Federal de Viçosa - UFV
Examinador

*Dedico este trabalho a Deus, pai do Senhor Jesus Cristo:
Meus pais, João e Maria e meus Irmãos.*

AGRADECIMENTOS

Graças te dou ó Deus, por me haveres ouvido, dando-me ânimo, cingindo-me de força e alegria, tendo o Senhor como a minha esperança, permitindo a mim, chegar até aqui.

Agradeço aos meus pais, João Batista e Maria das Dores por todo trabalho duro de sol a sol para que eu pudesse estudar e por todo amor, carinho, apoio e dedicação que me deram ao longo da vida. Aos meus irmãos, Thiago e Thais que sempre estiveram ao meu lado, ajudando a enfrentar as dificuldades e tristezas, tornando-lhes momentos mais alegres. Aos meus segundos pais, João de Matos e Maria dos Remédios que me cederam moradia todos esses anos.

Agradeço aos meus colegas de laboratório Leticia, Leila, Karen, Thais, Ricardo, Fabiano e Francisco pelos bons momentos juntos, por tudo que me ensinaram e pelos momentos descontraídos. A Rafanny por toda ajuda.

A Prof^a. Dra^a. Thaís Ribeiro Santiago por todos os ensinamentos, apoio e incentivo. E por ter me ajudado nos momentos difíceis.

*Ora, a fé é o firme fundamento das coisas
que se esperam, e a prova das coisas que
se não vêem.
(Hebreus 11:1)*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa dos municípios do estado do Espírito Santo coletados e com histórico da ocorrência do nematoide das galhas em plantações comerciais de pimenta-do-reino. Pontos em azul no mapa indicam os municípios de (1) São Mateus, (2) Sooretama, (3) Jaguaré, (4) Vila Valério, (5) Conceição da Barra e (6) Nova Venécia.

Figura 2. Perfil de esterase de *Meloidogyne arenaria* perfil A2 (Rm: 1,20 e 1,30), *M. incognita* perfil I1 (Rm: 1,00) e *M. javanica* perfil J3 (Rm: 1,00, 1,25 e 1,40) observados em campos comerciais de pimenta-do-reino.

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Total de amostras coletadas e analisadas com suas respectivas numerações, municípios, perfil de esterase identificados e o georeferenciamento.

Tabela 2. Identificação e distribuição a nível de município das espécies de *Meloidogyne* coletadas em campos comerciais do Estado do Espírito Santo.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELA.....	10
RESUMO.....	12
INTRODUÇÃO.....	13
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
Pimenta-do-reino.....	14
Fitonematoides.....	15
Gênero Meloidogyne.....	16
OBJETIVO.....	18
MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
Coleta do material.....	18
Multiplicação de Meloidogyne spp.....	18
Caracterização isoenzimática de Meloidogyne spp.....	19
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	20
CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

RESUMO

A pimenta-do-reino é uma planta trepadeira originária do sul da Índia, que produz um dos condimentos mais valorizados e consumidos em todo o mundo. O seu cultivo iniciou no Brasil na década de 1930 no estado do Pará, através dos imigrantes japoneses. E nos dias atuais a produção concentra-se nos estados do Pará e Espírito Santo. No entanto, a produção sofre decréscimos por causa dos nematoides das galhas. Visto isso, amostras de raízes sintomáticas e solo rizosférico de plantas de pimenta-do-reino no estado do Espírito Santo foram coletadas com o objetivo de identificar isolados de *Meloidogynes* spp. pelo método de eletroforese vertical. Com base no perfil de esterase foi confirmado a presença de *M. incognita* (I1), *M. arenaria* (A2) e *M. javanica* (J3). De acordo com nossos achados, esse é o primeiro relato da ocorrência da *M. javanica* perfil EST J3 infectando raízes de pimenta-do-reino no Brasil.

Palavras-chave: *Piper nigrum*, Eletroforese, Isoenzimas, Ocorrência, *M. javanica*.

INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), planta trepadeira originária do sul da Índia, produz um dos condimentos mais valorizados e consumidos em todo o mundo (GENTRY 1955). O produto comercial da planta vem sendo utilizado na indústria de carne, embutidos, perfumes e temperos na forma de pimenta preta, branca, verde, salmoura, em pó e misturada a outros condimentos. Além disso, essa pimenta pode ser processada para obtenção de óleos, subprodutos com maior valor agregado (ALBUQUERQUE, 1989; DUARTE et al., 2006; NAIR, 2011).

O cultivo da pimenta-do-reino iniciou-se no Brasil na década de 1930 no estado do Pará, em virtude da introdução da planta por imigrantes japoneses. Visto o potencial e adaptabilidade da cultura no país, a área plantada foi expandida para diferentes estados do Brasil ao longo dos anos (HOMMA, 2004). Conseqüentemente, com os avanços da área plantada e aumento da produção, a cultura apresenta grande importância na rentabilidade do produtor, visto que essa é, em sua maioria, conduzida pelo modo de produção de agricultura familiar (MOREIRA et al., 2006). No momento, o Brasil destaca-se como o segundo maior exportador de pimenta-do-reino, atrás apenas do Vietnã (VIDAL, 2020). Segundo o IBGE (2020), o país detém uma produção de 114.749 mil toneladas, distribuídos em uma área superior a 37 mil hectares. O estado do Espírito Santo é o principal produtor brasileiro com uma produção de 67.594 mil toneladas, seguido pelo Pará com 36.156 mil toneladas. Contrariando o relato dos anos anteriores em que o Pará detinha a maior produção do país. No entanto, a produção brasileira poderia ser maior, visto que é notório que fitonematoides estão amplamente disseminados em solos agrícolas e interferem de forma direta e/ou indireta na produção mundial.

De acordo com a Sociedade Brasileira de Nematologia, as perdas na agricultura brasileira devido a esses patógenos são estimadas em R\$ 35 bilhões por ano, sendo as perdas intensificadas em virtude da monocultura e longo período de cultivo. Ademais, os malefícios por fitonematoides também são intensificados quando esses se associam a outros fitopatógenos (SINGH et al. 2015; FERRAZ e BROWN 2016). Dentre o fitonematoide de maior importância que acomete a pimenta-do-reino destaca-se as espécies do gênero *Meloidogyne*, também conhecido como nematoide das galhas, devido a dificuldade no manejo dessa

doença, ampla distribuição e gama de hospedeiros (EMBRAPA 2016; FERRAZ e BROWN 2016).

No Brasil, o nematoide das galhas, mais especificamente *M. arenaria* (Neal 1889) Chitwood, 1949, foi relatado pela primeira associada à pimenta-do-reino no município de Caraguatatuba, São Paulo (Carvalho, 1965). Posteriormente, estudos mostraram a ocorrência de *M. incognita* (Kofoid & White 1919) Chitwood, 1949 no estado do Pará (LORDELLO e SILVA 1974; ICHINOCHE, 1976; FREIRE e MONTEIRO 1978). Mais recentemente, a ocorrência de *M. arenaria* foi novamente detectada no Sul da Bahia (DE SOUZA et al., 2021). Todavia, investigações das espécies de *Meloidogyne* em associação com a pimenta-do-reino ainda são raras no Brasil.

Considerando que o sucesso da estratégia de controle de nematoides depende, inicialmente, do conhecimento das espécies presentes nas áreas, um maior número de estudos precisam ser realizado para o conhecimento das espécies de *Meloidogyne* associada a pimenta-do-reino para desenvolvimento e adoção de estratégias apropriadas no manejo da doença no principal estado produtor da cultura no Brasil. Assim, em decorrência da importância do patossistema *Meloidogyne* spp. x pimenta-do-reino e a ausência de informações consistentes sobre a distribuição e espécies de *Meloidogyne* no Estado do Espírito Santo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Pimenta-do-reino

A pimenta-do-reino ou pimenta da Índia é uma planta trepadeira, perene, pertencente à família *Piperaceae* com origem no sudoeste da Índia (GENTRY 1955). No Brasil, essa planta foi introduzida pelos portugueses no período colonial, mas foi através dos colonos japoneses que ganhou importância econômica sendo primeiramente cultivada no município de Tomé-Açu, Pará. A planta apresenta adaptação aos climas tropicais e subtropicais, requer clima quente e úmido para seu bom desenvolvimento, com temperaturas ideal variando de 23° a 28°C e pode ser cultivada em regiões que atendam o mínimo de 1500 mm/ano de precipitação pluviométrica. Para seu cultivo, deve-se levar em consideração locais com eficiência na drenagem, evitando o acúmulo de água no sistema radicular, e solo que retenha

umidade para suprir a planta em períodos mais secos e críticos por ser uma cultura sensível ao estresse hídrico (ALBUQUERQUE e CONDURÚ, 1971). Além disso, a planta não suporta temperaturas elevadas, tal fator pode acarretar em perda na turgescência, interrupção de gradientes de potencial hídrico e implicará no aparecimento de novas brotações (LIMA et al., 2010; EMBRAPA, 2004).

Atualmente, a planta está difundida na região Norte e Sudeste, de modo que no presente, os estados do Pará e Espírito Santo destacam-se pelas maiores produções no país (EMBRAPA, 2004; LIMA et al., 2010). As cultivares adotadas no sistema produtivo brasileira são diversas: Apra, Bragantina, Cingapura, Guajarina, laçará-1 (DUARTE et al, 2006). Contudo, são várias as doenças que infestam esta cultura no país, como vírus, fungos e os nematóides que se destacam como os agentes etiológicos mais relevantes para a cultura (AMORIM, 2016).

Fitonematoides

Os fitonematoides são organismos que atuam como importantes parasitas de tecidos vegetais (AMORIM et al, 2018). Trata-se de organismos microscópicos, filiformes e algumas espécies apresentam dimorfismo sexual. Apresentam comprimento entre 0,2 mm a 3,0 mm o que dificulta sua correta identificação e controle a campo, mesmo em altas densidades, pois se trata de patógenos que em sua maioria não são visíveis a olho nu. Desprovidos de sistemas respiratórios e circulatórios, suas trocas gasosas ocorrem por difusão pelo exoesqueleto ou tegumento. Os nematoides fitoparasitas são dotados de estruturas, denominada estilete, que é fundamental para o processo de parasitismo. Há dois tipos principais, o *estomatoestilete* encontrado, principalmente, nos gêneros parasitas de plantas como *Meloidogynes* e *Pratylenchus*, cuja estrutura é mais robusta e adaptada ao fitoparasitismo, ele é formado por uma ponta cônica, uma região intermediária alongada conhecida como haste e, três nódulos basais de formato variável, que se ligam aos músculos responsáveis por expor o estilete. Já o *odontoestilete*, etimologicamente chamado por apresentar características de um dente, o qual consiste em uma estrutura canaliculada, alongada e reta, com corte em bisel na extremidade anterior, do lado dorsal, encontrado nas formas predadoras, micofagos e em poucos gêneros fitoparasitas como *Longidorus* e *Xiphenemas*. Há ainda um terceiro tipo de estilete, o *onquioestilete*, encontrado na subclasse Enoplea,

distinguindo-se dos demais por não ser canaliculado, ou seja, maciço, e tipicamente mais curto, delicado e recurvado pelo lado dorsal (FERRAZ e BROWN 2016; AMORIM et al, 2018).

O dimorfismo sexual é encontrado nos chamados nematóides sedentários, que são caracterizados pelo crescimento exagerado no diâmetro do corpo ao estabelecerem seu sítio de alimentação e, conseqüentemente, perdendo sua locomoção. Já aqueles que permanecem filiformes, são denominados migradores, por se locomoverem ao parasitar a planta hospedeira. As regiões do corpo do nematoide é arbitrariamente separado em três partes: (i) esofagiana - engloba a cavidade bucal e o esofago; (ii) intermediária - compreende o intestino e as estruturas reprodutivas; e (iii) a caudal - que entende-se como o final do corpo do nematoide (AMORIM et al, 2018).

No mundo já foram relatados mais de quatorze gêneros de nematóides fitoparasitas associados à cultura da pimenta do reino, os de maior importância são *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Pratylenchus*, *Xiphinema*, *Aphelenchoides* (RAMANA, 1987; SINGH et al., 2013). E dentre os fatores que afetam a cultura da pimenta do reino, os nematoides parasitas de plantas estão listados como um dos principais causadores de prejuízos no rendimento, e geradores de estresses bióticos e abióticos na planta (DESOKY et al., 2020). O nematóides cavernícola, *Radopholus similis*, e o nematoide das galhas *Meloidogyne incognita* são frequentemente encontrados infestando a cultura, sendo mais prevalente a espécie *M. incognita* (SUBILA e SUSEELA BHAI, 2020). No Brasil, revelou ser uma praga altamente persistente devido seu potencial de causar danos (RAVINDRA et al., 2014). As infestações excedem a 90% no Brasil e Índia, implicando na diminuição do desenvolvimento, sendo o gênero *Meloidogyne* spp. principal precursor das moléstias (NARAYANA et al, 2018; DE SOUZA et al, 2021).

Gênero *Meloidogyne*

Emílio Goeldi criou o gênero *Meloidogyne* no Brasil em virtude de problemas fitossanitários em cafeeiros na antiga Província do Rio de Janeiro e desde então já soma mais de 100 espécies descritas no gênero desde 1887. Tais organismos caracterizam-se por serem especialistas em parasitar raízes de plantas (FERRAZ et

al., 2001). Conhecidos como nematóides das galhas, devido à sintomatologia caracterizada por deformações no sistema radicular das plantas infestadas, estabelecendo com o hospedeiro uma relação biotrófica por meio do endoparasitismo sedentário das fêmeas (CARNEIRO, 2008). Sendo assim, o parasitismo por *Meloidogyne* traz consequências diretas como os sintomas observados principalmente em raízes, levando frequentemente ao surgimento de galhas (AMORIM et al, 2018).

A fase do parasitismo inicia-se com a deposição dos ovos em uma matriz gelatinosa, que posteriormente se transformam em juvenis de segundo estágio (J2) - iniciando a fase infecciosa. Em condições favoráveis o J2, tipicamente filiforme, adentra a raiz e com seu estilete injeta secreções esofaginas no citoplasma das células do hospedeiro, estabelecendo assim seu sítio de alimentação permanente. Posteriormente, uma vez estabelecido no interior da planta, ocorre uma alteração morfológica no corpo do nematoide para o formato periforme, atingindo assim a fase adulta. Na fase adulta, a fêmea do nematoide oviposita ~ 500 ovos unidos por uma massa de ovos (OLIVEIRA, 2018; FERRAZ et al., 2001). Com relação aos machos, estes permanecem filiformes, móveis e, aparentemente, não são fitoparasitas (AMORIM et al, 2018).

O gênero *Meloidogyne* destaca-se dentre os demais por sua alta agressividade e importância econômica, apresentando uma ampla gama de hospedeiras variando desde hortaliças a culturas perenes (HUNT e HANDOO, 2009). Do ponto de vista de importância econômica agrícola, destacam-se as espécies *M. incognita*, *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood e *M. hapla* Chitwood (FERRAZ e BROWN 2016; AMORIM et al. 2018). O nematoide das galhas é um endoparasita obrigatório que se desenvolve inteiramente dentro das raízes das hospedeiras. E sua alimentação interrompe o fluxo de água e nutrientes pelo sistema radicular, enquanto explora as células gigantes que estão ativas para atender suas demandas nutricionais, definindo a planta (MHATRE et al., 2015). Estima-se que as perdas de produtividade sejam de 15-35% (ABD-ELGAWAD e ASKARY, 2015), causando danos secundários na associação com fungos e bactérias (MITIKU, 2018).

OBJETIVO

Identificar por meio da técnica bioquímica de esterase as espécies de *Meloidogyne* associado a plantações comerciais de pimenta-do-reino no Estado do Espírito Santo, Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta do material

Um total de 30 amostras de raízes sintomáticas e solos infestados com *Meloidogyne* spp. foram coletados em lavouras comerciais de pimenta-do-reino localizadas em seis municípios (São Mateus, Sooretama, Jaguaré, Vila Valério, Conceição da Barra e Nova Venécia) do Estado do Espírito Santo, Brasil (**Figura 1**). A amostragem foi realizada com o auxílio de uma enxada, sendo coletados solos e raízes em uma profundidade de 20-30 cm na região da rizosfera. Em cada ponto amostrado registrou-se a coordenada geográfica com auxílio de um GPS de navegação. As coletas foram realizadas em importantes cidades produtoras de pimenta-do-reino, com histórico da ocorrência da doença e em plantas com raízes sintomáticas. Uma vez realizado a coleta, as amostras foram etiquetadas e enviadas em saco plástico acondicionados em isopor para o Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil.

Multiplicação de *Meloidogyne* spp.

Amostras de solo e raízes advindas do Espírito Santo foram individualmente adicionadas em vasos contendo plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* variedade Santa Clara) com dois pares de folhas verdadeiras e mantidas na casa-de-vegetação do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. As plantas foram acondicionadas a ~25 °C por dois meses. Posterior a formação de galhas no sistema radicular, fêmeas de *Meloidogyne* foram extraídas para a identificação da espécie.

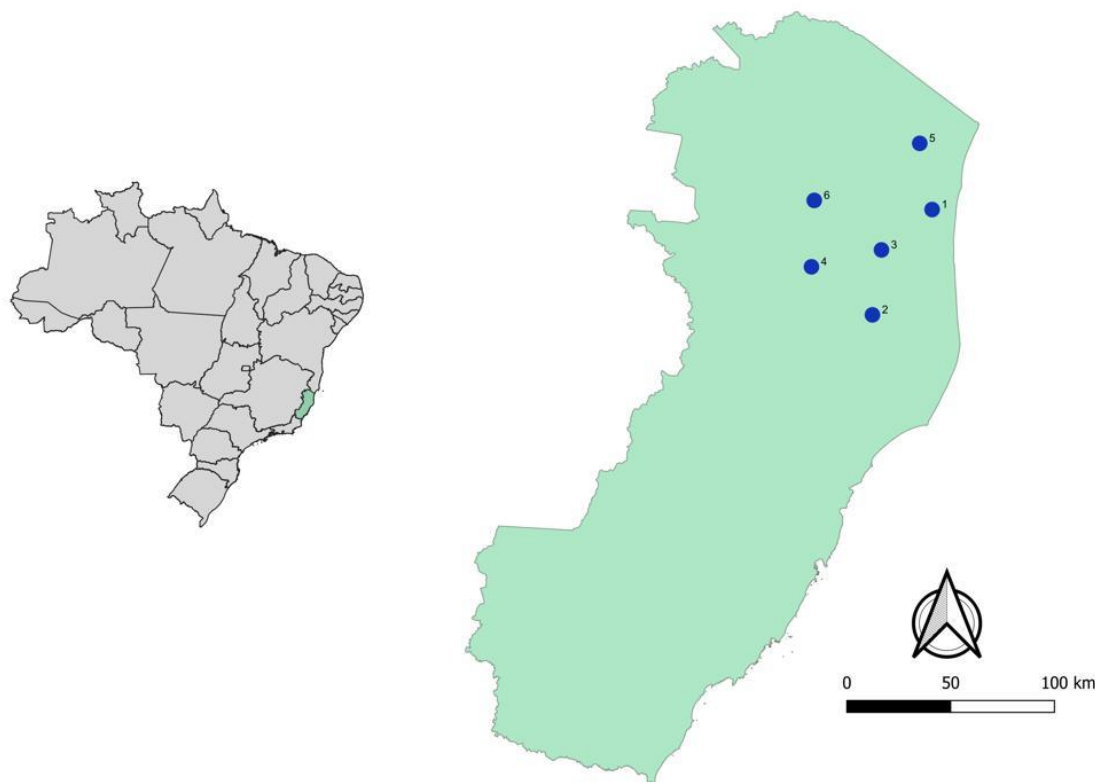


Figura 1. Mapa dos municípios do estado do Espírito Santo coletados e com histórico da ocorrência do nematoide das galhas em plantações comerciais de pimenta-do-reino. Pontos em azul no mapa indicam os municípios de (1) São Mateus, (2) Sooretama, (3) Jaguaré, (4) Vila Valério, (5) Conceição da Barra e (6) Nova Venécia.

Caracterização isoenzimática de *Meloidogyne* spp.

A identificação da espécie de *Meloidogyne* foi realizada por meio do teste bioquímico com adaptações no protocolo descrito por Carneiro e Almeida (2001). Utilizou-se o sistema de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida a 7% para analisar os fenótipos de esterase (EST) dos isolados amostrados e os perfis obtidos foram comparados aos padrões pré-estabelecidos por Carneiro et al. (2016).

Cinco fêmeas em fase reprodutiva com coloração branco-leitoso foram retiradas individualmente das galhas no sistema radicular do tomateiro utilizando

pinças e agulhas com auxílio de uma lupa (Leica, modelo EZ4). As fêmeas foram colocadas em microtubos contendo 5 µL da solução-extratora (sacarose, triton x-100, H₂O destilada) acondicionada em gelo. Após a coleta de todas as fêmeas, adicionou-se 2 µL de azul de bromofenol (0,01%) à solução-extratora. Concomitantemente, o gel de poliacrilamida foi preparado conforme descrito por Carneiro e Almeida (2001) na presença de persulfato de amônio e tetrametiletilenodiamina (TEMED) (ALFENAS, 1998). Para isso, adicionou-se 2,15 mL do tampão Tris-HCl 2,25 M (pH 8,8), 7,15 mL de água destilada, 10 µL de TEMED, 110 µL de persulfato de amônio e 3,45 mL de solução de acrilamida em um béquer. A solução foi imediatamente homogeneizada e vertida em placas de vidros retangulares, antecipadamente montadas, mantendo o cuidado para evitar a formação de bolhas. Posterior a polimerização dos géis, as fêmeas foram maceradas com o auxílio de um pistilo de vidro de ponta arredondada dentro do microtubo e a solução aplicada ao gel de poliacrilamida. *M. javanica* perfil J3 previamente caracterizado foi utilizado no gel como padrão de referência. O gel foi acondicionado na cuba de eletroforese vertical a 200 V e 30 mA contendo uma solução de tanque por 1 h e 10 min mantida a uma temperatura de 4 °C. Após cessar o tempo da corrida, os géis foram acondicionados em uma caixa gerbox contendo a solução tampão de fosfato de sódio (pH 6,2) para lavagem durante 15 min e, posteriormente, transferida para a solução corante (alfa-naftil acetato e corante *fast blue RR*) incubado à 30 °C até o aparecimento das bandas.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Trata-se do primeiro levantamento nematológico realizado no Brasil para a identificação de espécies de *Meloidogyne* associados à cultura de pimenta-do-reino em um estado do Brasil. Anteriormente, estudos pontuais reportaram a ocorrência de *M. incognita* e *M. arenaria* no estado do Pará e Sul da Bahia, respectivamente (DE SOUZA et al 2021). Dentre as 30 amostras biológicas recebidas no Departamento de Fitopatologia foi possível realizar a identificação de espécie *Meloidogyne* e perfil fenotípico de EST de 19 amostras. Não foi possível visualizar a presença de galhas em raízes de tomate em cinco amostras no município de Vila Valério (amostra número 155 e 206), Nova Venécia (amostra número 193 e 194),

Jaguaré (amostra número 99). Além disso, mesmo observando e extraíndo as fêmeas das galhas, não foi possível observar o padrão de EST no gel de poliacrilamida de outras seis amostras coletadas em Jaguaré (amostra número 80, 93 e 119), Vila Valério (amostra número 165), São Mateus (amostra número 2), Sooretama (amostra número 73) (**Tabela 1**). Ressaltando que neste estudo não foi encontrado populações mistas.

Tabela 1. Total de amostras coletadas e analisadas com suas respectivas numerações, municípios, perfil de esterase identificados e o georeferenciamento.

Total de Amostras	Nº da Amostra	Município	Perfil de EST	Localização S	Localização T
1	43	São Mateus	I1	18°44'13.7"	040°11'10.0"
2	44	São Mateus	I1	18°43'55.9"	040°11'20.0"
3	45	São Mateus	J3	18°43'44.5"	040°10'51.0"
4	63	Sooretama	A2	19°02'56.9"	040°02'24.3"
5	73	Sooretama	X	19°06'59.1"	040°11'22.3"
6	75	Sooretama	A2	19°07'05.8"	040°11'45.7"
7	78	Sooretama	A2	19°03'26.4"	040°13'19.4"
8	79	Sooretama	A2	19°05'21.9"	040°11'43.6"
9	84	Jaguaré	I1	18°50'59.8"	040°03'57.3"
10	89	Jaguaré	I1	18°50'09.4"	040°05'16.8"
11	93	Jaguaré	X	18°48'50.9"	040°05'54.8"
12	99	Jaguaré	XX	18°58'02.4"	039°59'18.7"
13	150	Vila Valério	A2	19°02'40.0"	40°15'49.7'
14	155	Vila Valério	XX	19°00'27.1"	040°15'31.1'
15	164	Vila Valério	J3	19°02'33.8"	040°23'44.2
16	193	Nova Venécia	XX	18°37'15.8'	040°29'22.6"
17	194	Nova Venécia	XX	18°36'58.6"	040°25'22.5"
18	206	Vila Valério	XX	18°57'06.6"	040°20'25.8"
19	2	São Mateus	X	18°42'09.1"	040°02'139"
20	3	São Mateus	A2	18°41'06.2"	040°03'53.9"
21	4	São Mateus	I1	18°41'35.3"	040°03'20.9"
22	80	Jaguaré	X	18°53'35.0"	040°04'48"
23	104	Jaguaré	I1	18°59'49.5"	039°55'21.6"
24	115	Jaguaré	A2	18°54'46.4"	040°08'13.0"
25	119	Jaguaré	X	18°55'23.5"	040°09'04.6"
26	123	Jaguaré	A2	18°58'30.4"	040°03'46.5"
27	145	Conceição da Barra	I1	18°19'33.5"	039°52'59.9"
28	160	Vila Valério	A2	18°59'24.8"	040°18'22.5
29	163	Vila Valério	I1	18°59'20.2"	040°19'4.3"
30	165	Vila Valério	X	19°02'25.5"	040°24'17.7"

X - Ausência de Banda. XX - Ausência de Galha

Assim, foi possível identificar por meio da técnica de eletroforese vertical de proteínas as espécies *M. arenaria* perfil A2 (Rm: 1,20 e 1,30), *M. incognita* perfil I1 (Rm: 1,00) e *M. javanica* perfil J3 (Rm: 1,00, 1,25 e 1,40) (**Figura 2**).

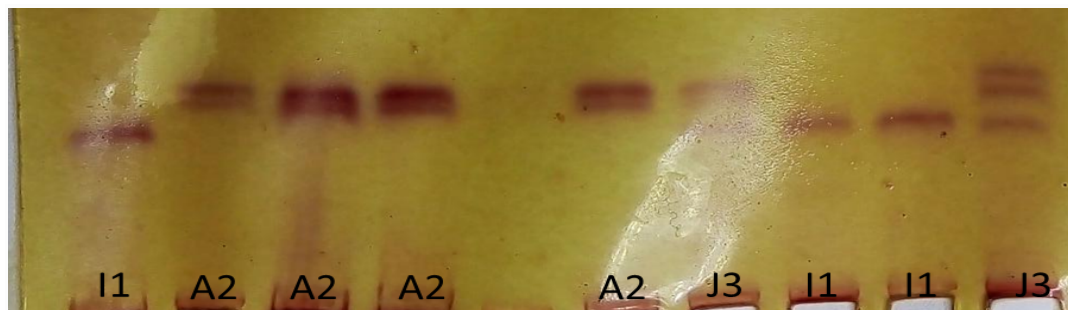


Figura 2. Perfil de esterase de *Meloidogyne arenaria* perfil A2 (Rm: 1,20 e 1,30), *M. incognita* perfil I1 (Rm: 1,00) e *M. javanica* perfil J3 (Rm: 1,00, 1,25 e 1,40) observados em campos comerciais de pimenta-do-reino.

M. arenaria e *M. incognita* foram as espécies predominantes no estado. *M. arenaria* foi detectada em nove amostras nos municípios de São Mateus, Jaguaré, Vila Valério e Sooretama, enquanto que *M. incognita* foi observada em oito amostras nos municípios de São Mateus, Jaguaré, Vila Valério e Conceição da Barra. Além disso, foi possível identificar a presença *M. javanica* em São Mateus e Vila Valério (**Tabela 2**).

Tabela 2. Identificação e distribuição a nível de município das espécies de *Meloidogyne* coletadas em campos comerciais do Estado do Espírito Santo.

ESP/EST*	São Mateus	Jaguaré	Vila Valério	Sooretama	Conceição da Barra	Nova Venécia
<i>M. arenaria</i> A2	1	2	2	4	-	-
<i>M. incognita</i> I1	3	3	1	-	1	-
<i>M. javanica</i> J3	1	-	1	-	-	-

* espécie de *Meloidogyne* identificada (ESP) / padrão de esterase observado (EST)

Nós hipotetizamos que a ocorrência das três espécies de *Meloidogyne* em pimenta-do-reino seja em decorrência da implementação da cultura em campos anteriormente infectados, uma vez que os genótipos do patógeno estão amplamente dispersos pelo estado. Anterior ao nosso estudo, BARROS et al, (2014) já havia identificado as espécies *M. incognita*, *M. exigua* e *M. paranaensis* em área de cultivo

de café (*Coffea* spp.) no estado do Espírito Santo. Os fenótipos de EST I1 e I2 de *M. incognita* foram observados em 21% das propriedades amostradas. Outro estudo desenvolvido pelo mesmo grupo detectou a presença de *M. arenaria*, fenótipo A2, e *M. javanica* (J3) parasitando plantas daninhas presentes em áreas de cultivo de cafeeiros (BARROS, 2010). Somado a isso, reforçando nossa teórica, sabe-se que é frequente a sucessão de pimenta-do-reino em área anteriormente cultivada com café conilon (*Coffea canephora*) sendo, em muitos casos, o plantio ocorre em campos com histórico da ocorrência de espécies de *Meloidogyne* como as amostras analisadas neste estudo (**Tabela 2**).

De acordo com nossos conhecimentos, esse é o primeiro relato da ocorrência da *M. javanica* perfil EST J3 infectando raízes de pimenta-do-reino no Brasil. *M. javanica* é um espécie polífaga capaz de adaptar-se a diferentes locais e hospedeiros (TRUDGILL e BLOK, 2001). Não é raro, estudos apontarem a capacidade dessa espécie em infectar novos hospedeiros. Por exemplo, OLIVEIRA et al. (2022) relatou a capacidade de *M. javanica* em causar doença em lavanda (*Lavandula* × *intermedia* 'Phenomenal') nos Estados Unidos. Além disso, essa mesma espécie já foi observada infectando pimenta-do-reino no Vietnã (Vũ Nguyễn et al., 2020).

A correta identificação das espécies que ocorrem na área, bem como suas variantes, é essencial para uma tomada de decisão eficiente no controle de fitonematoides que inclui o uso de variedades resistentes, rotação de cultura e o produtos à base de compostos biológicos para a minimização dos custos e perdas nas lavouras (NYCZEPIR e THOMAS, 2009). A identificação de diferentes espécies de *Meloidogyne* nos municípios de São Mateus, Jaguaré e Vila Valério é preocupante, uma vez que a região concentra mais de 50% da produção de pimenta-do-reino do estado e ainda não se realizou estudos para identificar variedades resistentes as diferentes espécies presentes nas áreas comerciais no norte do Estado do Espírito Santo (IBGE, 2020). No entanto, diferente do esperado, populações mista não foram detectadas em uma mesma área comercial quando analisou-se as amostras por meio da técnica de esterase e as análises bioquímicas precisam ser repetidas em amostras provenientes do município de Nova Venécia.

Dentre as técnicas para a identificação de espécies de *Meloidogyne*, a eletroforese em gel de poliacrilamida é a mais versátil e facilmente aplicável, sendo

possível identificar as principais espécies do gênero e de novas espécies (Carneiro et al., 1996). Em contrapartida, o método apresenta baixa sensibilidade comparado aos métodos moleculares, sendo necessário a realização de testes complementares para a certificação da ausência de populações mistas, e a avaliação precisa ser realizada em estágios fenológicos específicos do nematoide (CARNEIRO et al, 2001). Possivelmente, a não visualização das bandas se deve ao incorreto estágio fenológico das fêmeas analisadas.

CONCLUSÃO

O conhecimento gerado nesse levantamento de espécies de *Meloidogyne* é valioso para produtores e pesquisadores da região norte do Espírito Santo. Um estudo complementar será realizado com um número maior de amostras coletadas em diferentes municípios e caracterização complementar por meio de técnicas moleculares como SCAR-PCR ou sequenciamento das regiões mitocondriais. Estudos futuros também incluem a avaliação da resistência de diferentes cultivares frente a isolados de *M. arenaria* perfil A2, *M. incognita* perfil I1 e *M. javanica* perfil J3 coletado em áreas comerciais de pimenta-do-reino, bem como avaliar a diferença na agressividade das espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. UFV, Viçosa - MG, Brasil, 1998. 574 pág.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. F. A. **Livro Manual de Fitopatologia**. Agronômica Ceres. 5 ed. Viçosa - MG, Brasil, 2016. 15-83 pág.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; FILHO, A. B. **Livro Manual de Fitopatologia**. Agronômica Ceres. Vol 1. 5 ed. Viçosa - MG, Brasil, 2018. 193-203 pág.

ALBUQUERQUE, F. C. e CONDURÚ, J. M. **Cultura da Pimenta do Reino na Região Amazônica**. Instituto de Pesquisa Agropecuária do Norte (IPEAN). Vol 2 (3), Brasil, 1971.

ALBUQUERQUE, F. C., VELOSO, C. A., DUARTE e M. L., KATO, O. R. **Pimenta do reino recomendações básicas para o seu cultivo**. EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Unidade de execução de pesquisa de Âmbito estadual de Belém. Título 5. Série 4. Belém - PA, 1989. 7-34 pág.

ABD-ELGAWAD, M.M.M., ASKARY, T.H., **Impacto dos fitonematóides na economia agrícola. Agentes de biocontrole de fitonematóides**. Biocontrol agents of phytonematodes. CABI. Wallingford, 2015. 3-49 pág.

BARROS, A. F. **Caracterização de populações de Meloidogyne spp. em cafezais do Estado do Espírito Santo e da Zona da Mata de Minas Gerais**. Universidade Federal de Viçosa - Dissertação (Mestrado em Etiologia; Epidemiologia; Controle) , Viçosa - MG. 54 pág.

BARROS, A. F., OLIVEIRA, R. D. L., LIMA, I.M., COUTINHO, R. R., FERREIRA, A. O., COSTA, A. **Root-knot nematodes, a growing problem for Conilon coffee in Espírito Santo state**. Crop Protection. Vol 55. Brasil, 2014. 74-79 pág.

BRANDÃO, I. D. **Embrapa promove dia da Pimenta do Reino**. EMBRAPA, 2014. Disponível em:

https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1991445/embrapa-promove-dia-da-pimenta-do-reino?p_auth=jWOH36Dy. Acesso em: 30/04/2022.

CARNEIRO, R. M. D. G.; e ALMEIDA, M. R. A. **Técnica eletroforética utilizada no estudo de enzimas de nematóides de galhas para identificação de espécies.** Nematologia Brasileira. Vol 25. Brasília-DF, 2001. 35-44 pág.

CARNEIRO, R. M., SANTOS, M. F., ALMEIDA, M. F., MOTA, F. C., GOMES, A. C., e TIGANO, M. S. **Diversity of Meloidogyne arenaria using morphological, cytological and molecular approaches.** EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia. Vol 10(6). Brasília - DF, 2008. 819-834 pág.

CARNEIRO, R. M. D. G.; MONTEIRO, J. M. S.; SILVA, U. C. e GOMES, G. **Gênero Meloidogyne: diagnosticar através de eletroforese de isoenzimas e indicadores SCAR.** Diagnose de fitonematoides. Millennium. Vol 3. Campinas - SP, 2016. 47-72 pág.

CHITWOOD, B.G. **Nematóides das galhas: uma revisão do gênero Meloidogyne Goeldi, 1887.** Anais da Sociedade Entomológica de Washington. Parte 1. Vol 16(2), 1949. 90-114 pág.

DESOKY, E. S. M., MERWAD, A. R. M., SEMIDA, W. M., IBRAHIM, S. A., EL-SAADONY, M.T. **Bactérias resistentes a metais pesados (HM-RB): potenciais biorremediadores de plantas Spinacia oleracea estressadas por metais pesados.** Ecotoxicol. Ambiente. Saf. Vol 198 (15), 2020.

DUARTE, M. L., POLTRONIERI, M. C., CHU, E. Y., OLIVEIRA, R.F., LEMOS, O.F., BENCHIMOL, R.L., CONCEIÇÃO, H.E.O. e SOUZA, G.F. **A cultura da pimenta do reino.** Embrapa Informação Tecnológica. Revista ampliada. 2. ed. Brasília, DF, 2006. 73 pág.

EMBRAPA. **Manual de segurança e qualidade para a cultura da pimenta do reino.** Projeto PAS Campo. Convênio CNI/ SENAI/ SEBRAE /EMBRAPA . EMBRAPA/sede, Brasília - DF, 2004. 65 pág.

FERRAZ, L. C., ASMUS, G. L., CARNEIRO, R. G., MAZAFFERA, P., SILVA, J. F., **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Sociedade Brasileira de Nematologia. Embrapa Soja, Londrina - PR, 2001. 127 pág.

FERRAZ, L.C. e BROWN, D.J. **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. NORMA, Manaus - AM, 2016.

GENTRY, H. S. **Introduzindo pimenta preta na América**. Econ Bot 9, 1955. 256-268 pág.

HOMMA, A. K. O. **Dinâmica dos sistemas agroflorestais: o caso da colônia agrícola de Tomé Açu, Pará**. IESAM, Vol 2(1-2), 2004. 57-65 pág.

HUNT, D.J. and HANDOO, Z. A. **Taxonomy, Identification, and principal species**. In: Perry, R. N., Moens, M. and Starr, J. L. (eds) *Root-knot Nematodes*. CAB international, Wallingford - UK, 2008. 55-97 pág.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. SIDRA - Sistema IBGE de Recuperação Automática. **Produção agrícola municipal: Pará**. IBGE, Rio de Janeiro, 2020. Disponível em:

<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=resultados>. Acesso em: 30/04/2022.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. SIDRA - Sistema IBGE de Recuperação Automática. **Produção agrícola municipal: Pará**. IBGE, Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 20/03/2022.

KIMATI, AMORIM, REZENDE, FILHO, CAMARGO, et al. **Livro Manual de Fitopatologia. Ceres**. Vol 2. 4 ed. Viçosa - MG, 2005. 663 pág.

LIMA, J. S., OLIVEIRA, R. B., WADSON, D. R., OLIVEIRA, P. C. e QUARTEZANI, W. Z. (2010). **Análise espacial de atributos químicos do solo e da produção da cultura da pimenta do reino (*Piper Nigrum, L.*)**. Scielo. IDESIA. Vol 28(2). Chile, 2010. 31-39 pág.

MHATRE, P. H., PANKAJ, M. S. K., KAUR, S., SINGH, A. K., MOHAN, S., SIROHI, A. **Histopathological changes and evaluation of resistance in Asian rice (*Oryza sativa*) against rice root knot nematode, *Meloidogyne graminicola*.** Indian Journal of Genetics and Plant Breeding. Vol 75(1), 2015. 41-48 pág.

MITIKU, M. **Plant-parasitic nematodes and their management:** A review. Agricultural Research & Technology. 2018. 16 pág.

MOREIRA, G. R., CALIMAN, F. R. B., SILVA, D. J. H., RIBEIRO, C. S. C. **Espécies e variedades de pimenta.** Informe Agropecuário. Vol 27(235), 2006.16-29 pág.

MORESCO, E. R. **Uso da cultura do trigo no controle de fitonematoides.** EMBRAPA, Comunicado técnico - 367, Passo Fundo - RS, 2016. 11 pág.

NAIR, K. P. P. **Agronomia e economia da pimenta-do-reino e do cardamomo. O “Rei” e a “Rainha” das Especiarias.** Elsevier Science Publishing, Londres - UK, 2011. 366 pág.

NARAYANA, R., THOMAS, S., SHEELA, M.S. **Management of root-knot nematode *meloidogyne incognita* infecting black pepper.** Journal of Entomology and Nematology. Vol 48(1), 2018. 51-55 pág.

NGUYÊN , P., NGUYÊN, P. T., VÕ, O. T. T., LÊ D. D. **Um relato de *Meloidogyne javanica* em pimenta preta (*Piper nigrum*) na província de Binh Phuoc, Vietnã.** Planta da Australásia Dis. Notas 15, Artigo 18, 2020.

NYCZEPIR, A. P. e THOMAS, S. H. **Current and future management strategies in intensive crop production systems.** In: PERRY, R. N.; MOENS, M. e STARR, J. L. Root-Knot Nematodes.CAB International, Cambridge, 2009. 412-417 pág.

OLIVEIRA, C.M.G., ROSA, J.M.O., GIORIA, R., e BRAGA, K.R.B. **Nematoides.** SciELO Livros. EDUEM, Maringá - PR, 2018. Cap 9, 315-338 pág.

OLIVEIRA, C. M. G., SANTOS, M. A. e CASTRO, L. H. S. **Diagnose de Fitonematoides.** 1 ed. Millenium, 2016. Cap 3, 47-52 pág.

OLIVEIRA, S A., DUGLOS, D. M. AGUDELO, P. e JEFFERS, S. N. **First report of *Meloidogyne javanica* pathogenic on hybrid lavender (*Lavandula*× *intermedia*) in the United States.** Plant Disease. Department of Plant and Environmental Sciences. Clemson University. Clemson - SC, 2022.

RAMANA K. V. e MOHANDAS, C. **Plant parasitic nematodes associated with black pepper (*Piper nigrum* L.) in Kerala.** National Research Centre for Spices. Indian Journal of Nematology. Vol 17. Kerala - Índia, 1987. 62-66 pág.

RAVINDRA, H., SEHGAL, M., MANU, T.G., MURALI, R., LATHA, M., NARASIMHAMURTHY, H.B. **Incidência do nematoide das galhas (*Meloidogyne incognita*) em pimenta preta em Karnataka.** Journal of Entomology and Nematology. 2014. Vol 6(4). 51-55 pág.

SOUZA, R. A.; ALVES, F. R.; OLIVEIRA, C. M. G.; ROSA, J. M. O.; ASSIS, P. J.; AGUIAR, G. P. e MORAES, W. B. **"Ocorrência de *Meloidogyne Arenaria* em pimenta preta (*Piper nigrum*) no extremo sul do Estado da Bahia, Brasil".** Helminthologia. Vol 58(2), 2021. 213-216 pág.

SINGH, S., SINGH, B., e SINGH, A. P. **Nematodes : A Threat to Sustainability of Agriculture.** Procedia Environmental Sciences. Vol. 29, 2015. 215-216 pág.

SINGH, S.K., HODDA, M., ASH, G. J. **Plant-parasitic nematodes of potential phytosanitary importance, their main hosts and reported yield losses.** EPPO Bull. Vol 43(2), 2013. 334-374 pág.

SUBILA, K.P., SUSEELA BHAI, R. ***Pythium deliense* , um patógeno que causa amarelecimento e murcha da pimenta preta na Índia.** Novo Des. Rep. 2020. Vol 42. 6-6 pág.

TRUDGILL, D. L. e BLOK, V. C. **Apomictic, polyphagous, root-knot nematodes: exceptually successful and damaging root pathogens.** Annual Review of Phytopathology. Vol 39, 2002. 53-77 pág.

VIDAL, M. F. , **EVOLUÇÃO DO CULTIVO DE PIMENTA-DO-REINO NA ÁREA DE ATUAÇÃO DO BNB.** Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste - ETENE. Ano 5. Nº 146. Dezembro. 2020. 1-7 pág.

