



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA – FAV
CURSO DE AGRONOMIA

CAIO AUGUSTO ROSADO TORRES

CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E MOLECULAR DE UMA POPULAÇÃO DE
Meloidogyne goeldii **PROVENIENTE DE CAFEEIROS DO ESTADO DE MINAS**
GERAIS.

BRASÍLIA – DF

DEZEMBRO/2016



CAIO AUGUSTO ROSADO TORRES

CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E MOLECULAR DE UMA POPULAÇÃO DE
Meloidogyne goeldii PROVENIENTE DE CAFEEIROS DO ESTADO DE MINAS
GERAIS.

Orientadores: Prof. Dr. Juvenil
Enrique Cares e Dra. Regina
Maria Dechechi Gomes
Carneiro

BRASÍLIA – DF
DEZEMBRO/2016



CAIO AUGUSTO ROSADO TORRES

CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E MOLECULAR DE UMA POPULAÇÃO DE
Meloidogyne goeldii PROVENIENTE DE CAFEEIRO DO ESTADO DE MINAS
GERAIS.

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

Orientadores: Prof. Dr. Juvenil
Enrique Cares e Dra. Regina Maria
Dechechi Gomes Carneiro

BANCA EXAMINADORA:

Juvenil Enrique Cares, Ph.D (Orientador)
CPF:15067564172
Universidade de Brasília

Jessica da Mata dos Santos Monteiro, DSc
CPF:73842397100
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Daniela Rossato Stefanelo, MSc.
CPF:94797064072
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, pois seus esforços me possibilitaram chegar até aqui.

Agradeço à doutora Regina Carneiro, pois a realização desse trabalho seria impossível sem ela.

Agradeço ao professor Juvenil pelo acolhimento irrestrito.

Agradeço à Giovanna pelo seu apoio incondicional.

Agradeço ao pessoal do laboratório, Vanessa, Marcilene, Carina, Jessica, Guilherme, Éder, Rita e Valdir por seu apoio e prontidão em ajudar.

Agradeço em especial às professoras, Taislene e Selma pela paciência infinita e os mais diversos conselhos.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	3
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
1.1 O cafeeiro.....	5
1.2 Classificação do <i>Meloidogyne</i> spp.....	5
1.3 Biologia e ciclo de vida.....	5
1.4 Métodos de identificação a nível de espécie de <i>Meloidogyne</i>.....	6
1.5 Identificação morfológica, bioquímica e molecular.....	7
1.6 <i>Meloidogyne goeldii</i> Santos, 1997.....	9
1.7 <i>Meloidogyne exigua</i> Goeldi, 1892 e sua diversidade.....	9
MATERIAL E MÉTODOS.....	10
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	18
BIBLIGRAFIA.....	18

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Perfil de esterase (Est.) de *M. javanica* (Est J3) usado como referência e *M. goeldii* (= *M. exigua*) (Est. E1).16
- Figura 2. SCAR-PCR de uma população de *Meloidogyne goeldii* (= *M. exigua*) proveniente de cafezais em Araguari.16
- Figura 3. Cladograma obtido com o método agrupamento de vizinhos (Neighbor-joining) a partir do sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 das populações relacionadas nas Tabelas 3 e 4.17
- Figura 4. Cladograma obtido com o método agrupamento de vizinhos (Neighbor-joining) a partir do sequenciamento da região D2D3 (28S) das populações das Tabelas 3 e 4.....18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos primers SCAR utilizados na amplificação do fragmento espécie específico.....	13
Tabela 2. Sequências dos primers ITS1-ITS2 e D2D3 utilizados na amplificação para clonagem e sequenciamento.	13
Tabela 3. Lista de números de acessos do NCBI (GenBank) usados para gerar as árvores filogenéticas.	14
Tabela 4. Populações de <i>Meloidogyne</i> spp. utilizadas nas análises nos estudos de filogenia.....	14

CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E MOLECULAR DE UMA POPULAÇÃO DE *Meloidogyne goeldii* PROVENIENTE DE CAFEIEIRO DO ESTADO DE MINAS GERAIS.

RESUMO

Os nematoides das galhas, classificados no gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1887, são fator limitante para a cultura do cafeeiro. As perdas causadas por esse gênero de nematoides na cultura do café estão estimadas em 15% de toda a safra mundial. No Brasil as espécies mais importantes para a cafeicultura são *M. exigua*, *M. paranaensis* e *M. incognita*. A identificação correta desses nematoides é essencial para o controle principalmente, quando se trata do uso de variedades resistentes. O objetivo do presente trabalho foi fazer a caracterização isoenzimática, molecular e análise filogenética de uma população proveniente de Araguari, MG (faz. Araras). Identificada como *M. goeldii* Santos, 1997, pelo próprio coletor da espécie. Embora essa espécie tenha sido descrita como nova espécie na tese de doutorado do autor, o trabalho nunca foi publicado e, recentemente, foi clasificada como *nomen nudum*. Várias fêmeas foram utilizadas na determinação do fenótipo de esterase (Est), em géis de poliacrilamida. Foi também extraído DNA de juvenis de segundo estágio (J2) para realização dos testes com marcador SCAR e sequenciamento das regiões ITS1-ITS2 e D2D3. A população estudada demonstrou ter concentração de esterase muito baixa, necessitando de mais de 30 fêmeas para a revelação do perfil Est E1, Rm 1,5, sendo esse o perfil típico de *M. exigua*. O resultado com o marcador SCAR condiz com o padrão isoenzimático, demonstrando uma banda típica de *M. exigua* (fragmento de 562 pb). Nos cladogramas realizados a partir dos fragmentos clonados e sequenciados, essa população agrupou-se com populações de *M. exigua* com alto suporte de bootstrap. Os resultados demonstraram que essa população de *M. goeldii* é uma variante de *M. exigua*. Estudos futuros como a caracterização morfológica e morfométrica de *M. goeldii* serão essenciais para uma correta identificação dessa espécie como uma variante de *M. exigua*.

Palavras chave: café, diagnose, *Meloidogyne exigua*, nematoide das galhas, variabilidade genética

ENZYMATIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A *Meloidogyne goeldii* POPULATION FROM COFFEE PLANTS OF MINAS GERAIS STATE.

ABSTRACT

The root-knot nematodes, classified in the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887, are a limiting factor to coffee production. The losses caused by nematodes of this genus on coffee crop are estimated at 15% of the world crop. In Brazil, the most important species for the coffee plantations are *M. exigua*, *M. paranaensis* and *M. incognita*. The correct identification of these nematodes is essential for their control, using resistant varieties. The objective of this work was to do the enzymatic characterization and phylogenetic analysis of a population identified as *M. goeldii* Santos, 1997, by the collector of the species. Although this species was described as a new one in the author's doctoral thesis, the paper was never published and recently the specie was classified as *nomen nudum*. Several females were used to determine the esterase phenotype (Est), on polyacrylamide gels. DNA was extracted from second stage juveniles (J2) to carry out tests with SCAR marker and sequencing the regions ITS1-ITS2 and D2D3. The studied population showed very low concentration of esterase, needing more than 30 females to reveal the enzymatic profile E1, Rm 1.5, typical profile of *M. exigua*. The results with the SCAR marker confirmed the enzymatic results, demonstrating a typical band of *M. exigua* (562 BP fragment). In the dendograms were made from cloned and sequenced fragments, this population clustered with other *M. exigua* populations with high bootstrap support. The results suggest that this population of *M. goeldii* is a variant of *M. exigua*. Future studies using morphometric and morphological characterization of *M. goeldii* are essential for a correct identification of this species as a variant of *M. exigua*.

Key words: coffee, diagnose, genetic variability, *Meloidogyne exigua*, root-knot nematode

INTRODUÇÃO

O café, introduzido no Brasil em 1727 (Filetto, F. 2000), logo se tornou o principal produto de exportação Brasileira. Atualmente o café continua sendo uma das culturas de maior destaque na agricultura brasileira. De acordo com o relatório mensal do Conselho dos Exportadores de Café do Brasil (CECAFE) (agosto de 2015 a julho de 2016), as exportações geraram uma receita de mais de 5 bilhões de dólares, com um volume de mais de 34 milhões de sacas, esse volume, exportado pelo Brasil, corresponde a pouco mais de 27% do café exportado no mundo, de acordo com a Organização Internacional do Café (ICO), indicando que há mercado para expansão.

Dentre os nematoides fitoparasitas que parasitam o cafeeiro, os nematoides de galha que pertencem ao gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1892 são os mais importantes. Esse gênero de fitonematóides coconstitue um grupo de nematoides parasitas obrigatórios, de hábito sedentário, e que apresentam um tipo de parasitismo altamente especializado e distribuição global (Moens *et al.*, 2009).

Esses nematoides constituem uma ameaça a regiões produtoras de café (Carneiro *et al.*, 2005), onde causam prejuízos a cafeicultura sejam pelo seu parasitismo propriamente dito, reduzindo a produtividade das plantas, ou encarecendo os custos de produção pela necessidade de adubações constantes e métodos de controle. Estima-se que as perdas de produtividade possam chegar em até 45% em cafeeiros parasitados por *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1892 (Barbosa *et al.*, 2004). Dessa forma a correta identificação é extremamente importante para a adoção de métodos de controle mais eficazes e menos oneroso ao produtor, à sociedade e ao meio-ambiente.

Atualmente, 17 espécies de *Meloidogyne* infectam cafeeiros e a sua identificação se dá primordialmente por caracteres morfológicos de fêmeas, machos e juvenis de segundo estágio. A principal fonte de caracteres morfológicos para distinção de espécies de *Meloidogyne* que infectam o cafeeiro foi considerado durante muitos anos o padrão perineal das fêmeas (Campos & Villain, 2005). Esse método, apesar de ser o mais comum para identificação das espécies, é também um desafio mesmo para os taxonomistas mais experientes pois não permite a distinção de várias espécies como é o caso de *M. incognita* e *M. paranaensis* (Carneiro & Cofcewicz, 2008) e, portanto, falhas na identificação são comuns (Carneiro *et al.*, 2004).

Com os avanços na biologia molecular, metodologias mais modernas como, eletroforese de isoenzimas e técnicas de PCR vem ganhando destaque científico. Das 17 espécies que parasitam o cafeeiro, 11 podem ser identificadas pelos fenótipos de isoenzimas (esterase) (Carneiro & Cofcewicz, 2008). A metodologia proposta por Carneiro & Almeida (2001) foi essencial, por permitir a identificação

a partir de algumas fêmeas e a comparação de várias fêmeas no mesmo gel. Essa técnica pode ser usada rotineiramente para identificação de populações, em levantamento para estudos da distribuição de *Meloidogyne* spp. em diferentes culturas, e purificação de populações coletadas a campo para posteriores estudos taxonômicos e moleculares (Carneiro & Cofcewicz, 2008). Mais recentemente, foram desenvolvidos os marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), que permitiram a identificação precisa de espécies de *Meloidogyne*, assim como o uso da reação em multiplex para as três mais importantes espécies de *Meloidogyne* do cafeeiro do Brasil: *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*. (Randig *et al.*, 2002). Essa técnica permite a utilização de poucos juvenis de segundo estágio para identificação e pode ser usada para populações puras ou mesmo em mistura de cerca de 1% (Randig *et al.*, 2004). Esses marcadores também foram validados para diferentes populações e fenótipos de esterase de *M. exigua* (Muniz *et al.*, 2009) e *M. incognita* (Santos *et al.*, 2012).

Meloidogyne goeldii Santos, 1997 foi descrito como uma nova espécie de nematóide das galhas, infectando cafezais no estado de São Paulo. A característica que sugeriu a hipótese de uma nova espécie foi a ausência de bandas na caracterização do fenótipo das esterases. Considerando a fraca resolução dessa enzima para a caracterização de *M. exigua* (Carneiro *et al.*, 1996) e a grande diversidade genética dessa espécie (Muniz *et al.*, 2009), suspeitava-se que *M. goeldii* fosse um variante de *M. exigua*.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a identidade taxonômica de uma população de *M. goeldii* proveniente do estado de Minas Gerais, usando técnica de eletroforese enzimática com um grande número de fêmeas, marcadores SCAR e análises filogenéticas, a partir do sequenciamento dos fragmentos ITS e D2D3.

Revisão de literatura

1.1 O Cafeeiro

O cafeeiro (*Coffea* sp.) é uma planta originária das terras altas etíopes. Seu primeiro cultivo data do século VIII e ganhou popularidade no mundo árabe a partir do Yemen e do Egito, sendo cultivado comercialmente no século XVII. No século XVIII os holandeses começaram o cultivo do café nas suas colônias das Américas e na Ásia, assim como os franceses fizeram na Guiana. Já no Brasil, chegou em 1727 proveniente da Guiana Francesa, por meio do sargento-mor Francisco de Mello Palheta (Taunay, 1945; Romero & Romero, 1997).

O cafeeiro é uma planta arbustiva ou arbórea de caule lenhoso, cilíndrico. Apresenta dimorfismo entre os ramos sendo que os troncos ou hastes são chamados de ortotrópicos, enquanto os ramos secundários, perpendiculares aos ortotrópicos são chamados de plagiotrópicos, são nesses ramos que as gemas florais surgem (Matiello *et al.*, 1981). O sistema radicular é pivotante, podendo atingir até 3 metros de profundidade, sendo que a maior parte se concentra na região de 0 a 60 cm. Contudo, a distribuição do sistema radicular depende da oferta de água e estrutura do solo (Rena & Guimarães, 2000).

1.2 Classificação do gênero *Meloidogyne*

O gênero *Meloidogyne* faz parte de uma pequena parte do Filo Nematoda (Maggenti, 1981), dentro da Classe Chromadorea, Ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Infraordem Tylenchomorpha, Superfamília Tylenchoidea e família Meloidogynidae (De Ley & Blaxter, 2002; Karssen & Moens, 2006).

1.3 Biologia

O ciclo de vida de *Meloidogyne* inicia-se com a fêmea ovipositando em uma matriz gelatinosa, formando uma massa de ovos. Cada massa de ovos contém aproximadamente de 400 a 500 ovos e pode formar-se em meio ao parênquima cortical (internas) ou sobre a superfície das raízes (externas). O desenvolvimento do embrião resulta no juvenil de primeiro estágio (J1), esse por sua vez passa por uma ecdise ainda dentro do ovo, dando origem ao juvenil de segundo estágio (J2). Quando eclodem, as formas J2 pré-infectivas migram em direção às raízes de plantas hospedeiras, guiadas por exsudatos radiculares. Quando chegam à raiz, os J2 utilizando enzimas degradadoras de parede celular, penetram nas raízes, migrando intercelularmente em direção ao cilindro vascular, onde estabelecem o seu sítio de alimentação, com a formação de células gigantes multinucleadas (Taylor & Sasser, 1983). Após a indução do

desenvolvimento do sítio de alimentação, o nematoide passa por todas as outras ecdises (J2 , J3 , J4) até chegar ao estágio adulto (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Quando a fêmea jovem é formada, continua a fase sedentária do nematoide, a qual durará até o final do ciclo de vida. As células adjacentes às células gigantes sofrem hiperplasia devido a distúrbio hormonal (hiperauxina), das mesmas, originando o principal sintoma causado por nematoides desse gênero em plantas, as galhas (Moens *et al.*, 2009). Durante esse desenvolvimento pós-embriônico, o sistema reprodutivo desenvolve-se e crescem as gônadas (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). A mudança de forma nos machos (piriforme para adulto vermiforme) ocorre durante o quarto estágio juvenil (J4), passando por uma metamorfose na qual o corpo se alonga, assumindo o macho uma forma vermiforme e desenvolvendo o sistema reprodutivo masculino. Os machos saem da raiz e movem-se livremente no solo e não se alimentam. Nota-se que não há acasalamento nas espécies partenogênicas, permanecendo os machos no solo até a morte (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

A duração do ciclo de vida do nematoide das galhas é fortemente afetada pela temperatura, umidade e planta hospedeira. Em condições favoráveis, quase a totalidade dos adultos formados são fêmeas. Contudo, em condições ambientais desfavoráveis tais como declínio da planta hospedeira com elevada população de nematoides na raiz ou resistência da planta hospedeira, os J4 podem tornam-se machos, com o desenvolvimento do primórdio sexual em testículos em vez de ovários. Esse fenômeno é conhecido por reversão sexual e é um dos mecanismos de sobrevivência desses nematoides, pois menos ovos serão produzidos, o parasitismo sobre a planta infectada será mais brando, garantindo a sobrevivência da hospedeira por mais tempo e, conseqüentemente, das poucas fêmeas formadas (Freitas *et al.*, 2012).

1.4 Métodos de identificação de *Meloidogyne* a nível de espécie

A identificação a nível de espécie em *Meloidogyne* é difícil e muitas vezes, baseada em caracteres subjetivos. A diagnose é dificultada pelo grande número de espécies descritas, muitas vezes com diagnoses equivocadas, presença de espécies crípticas e pela existência de variabilidade intraespecífica; além do problema com o conceito de espécie para organismos predominantemente partenogênicos (Trudgill, 1991; Hunt & Handoo, 2009).

As metodologias mais empregadas na diagnose de *Meloidogyne* spp. são: a configuração da região perineal de fêmeas, a morfologia da região anterior e do estilete de machos, fêmeas e juvenis de segundo estágio (J2) e, com destaque, a identificação bioquímica e molecular (Eisenback & Hunt, 2009).

1.5 Identificação morfológica, bioquímica e molecular.

A configuração da região perineal de fêmeas maduras é a abordagem morfológica mais utilizada na identificação de espécies de *Meloidogyne*, pelo fato dessa região conter várias estrias formando desenhos, às vezes características da espécie, se assemelhando a uma impressão digital. Contudo, se utilizado como único método na identificação de espécies pode causar erros na identificação, por serem os padrões algumas vezes não específicos, como o caso de *M. paranaensis*, que foi erroneamente identificado como *M. incognita* a partir da configuração da região perineal (Carneiro *et al.*, 1996). Existem outras técnicas muito mais precisas como a caracterização enzimática e a caracterização molecular (Carneiro *et al.*, 2000; Carneiro & Cofcewicz, 2008).

Análises bioquímicas, envolvendo proteínas solúveis (isoenzimas), têm se destacado como uma das técnicas mais confiáveis na identificação de *Meloidogyne* spp., por serem as esterases espécie-específicas e malato desidrogenases auxiliares, sendo possível a identificação de cerca de 40 espécies diferentes (Blok & Powers, 2009). A utilização da isoenzima esterase e os marcadores SCAR são técnicas que permitem de forma não subjetiva a identificação de espécies mistas e a purificação das mesmas através da técnica enzimática (Carneiro & Almeida, 2001; Randig *et al.*, 2002). Das isoenzimas mais estudadas, as esterases são as únicas espécie-específicas e ainda existem. Outras isoenzimas como malato-desidrogenase (MDH), superóxido dismutase (SOD) e glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) que são apenas utilizadas com o propósito de auxiliar na caracterização ou mostrar a variabilidade existente (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985).

A identificação de raças fisiológicas em espécies do gênero *Meloidogyne* é realizada pelo teste de hospedeiros diferenciadores estabelecidos na Carolina do Norte (Hartman & Sasser, 1985). Raças fisiológicas já foram relatadas em importantes espécies como *M. javanica* (Carneiro *et al.*, 2003), *M. incognita* e *M. arenaria* (Hartman & Sasser, 1985), *M. hapla*, *M. exigua* (Silva, 2005; Muniz *et al.*, 2008) e *M. chitwoodi* Santo & Finley, 1980 (Mojtahedi *et al.*, 1988).

Embora a caracterização das principais espécies de *Meloidogyne* tenha sido alcançada por meio de isoenzimas, essa técnica não permite distinguir raças de uma mesma espécie (Janati *et al.*, 1982; Esbenshade & Triantaphyllou, 1990).

O advento e popularização da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) fomentou consideravelmente métodos de análise de DNA, assim como, incentivou a descrição de novos métodos moleculares, que associadas às técnicas de clonagem e sequenciamento de DNA, possibilitam uma rápida aquisição de informações sobre a estrutura dos genomas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Apesar de ainda não abranger todas as espécies, as técnicas moleculares são excelentes métodos de diagnóstico para *Meloidogyne* spp.. Têm a vantagem de serem independentes da variação fenotípica

das esterases, que as vezes envolvem interpretação mais complexa. Os marcadores moleculares permitem a identificação simples, precisa e rápida (Blok & Powers, 2009), contudo não permitem a detecção de novas espécies.

Contudo nem todas as espécies descritas de *Meloidogyne* apresentam padrões enzimáticos de esterase, sobretudo as descritas antes de 2009. A partir dessa data, esses padrões passaram a ser exigidos nas novas descrições (Eisenback & Hunt, 2009). Essas enzimas são sintetizadas pela expressão de genes altamente conservados, representando uma pequena fração do genoma e levando a outro ponto negativo do método, não poder ser utilizado para estudos de variabilidade intraespecífica (Arias *et al.*, 2001; McLain *et al.*, 1987), embora algumas espécies apresentem polimorfismo enzimático.

A partir de 1985, estudos baseados em análise de DNA se intensificaram. A técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) tornou propício o desenvolvimento de métodos de análise de DNA, levando à descrição de outras classes de marcadores moleculares.

A técnica RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA), é uma técnica que gera bandas a partir de primers pouco específicos de sequência aleatória. É amplamente utilizada para estudos genéticos de diversidade e filogenia de muitas espécies de *Meloidogyne* (Cenis, 1993; Castagnone-Sereno *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1997; Randig *et al.*, 2002). Recentemente, a conversão dos marcadores RAPD em SCAR, tem ganhado destaque. O termo SCAR foi designado por Paran & Michelmore (1993) ao definir a sequência interna marcadores RAPD, permitindo a composição de primers mais longos, ricos em guanina e citosina (GC), e por consequência, a geração de primers de sequência específica. Permite também a detecção de espécies presentes em mistura de populações, em proporções iguais ou inferiores a 1% e, portanto, é uma ferramenta muito sensível (Fourie *et al.*, 2001; Randig *et al.*, 2004).

Marcadores SCAR já foram desenvolvidos para separar *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, presentes principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Zijlstra, 2000; Meng *et al.*, 2004), *M. hapla* (Zijlstra *et al.*, 2000), e espécies quarentenárias como *M. chitwoodi* e *M. fallax* (Karssen, 1996). Foram também desenvolvidos para as três principais espécies de *Meloidogyne* parasitas de cafeeiro no Brasil: *M. incognita*, *M. exigua* e *M. paranaensis* (Randig *et al.*, 2002) e, mais recentemente, incluídos nesse kit SCAR-café, *M. arabicida* e *M. izalcoensis* (Correia *et al.*, 2013). Foram também desenvolvidos marcadores SCAR para *M. enterolobii* (Tigano *et al.*, 2010) e para *M. ethiopica* (Correia *et al.*, 2014).

Há alguns exemplos da utilização de vários primers SCAR em conjunto, em reação multiplex (Zijlstra, 2000; Randig *et al.*, 2004, Correa *et al.*, 2013). Até agora, poucas espécies de *Meloidogyne* podem ser identificadas por marcadores SCAR (Blok & Powers, 2009).

1.6 *Meloidogyne goeldii* Santos, 1997

Em sua tese de doutorado, Santos (1997), descreveu *Meloidogyne goeldii* como sendo uma nova espécie infectando cafezais no estado de São Paulo. Na ocasião, a coleta da população que posteriormente o autor viria chamar de *M. goeldii* foi amostrada em cafezal (*Coffea arabica* L.) cv. *catuaí* no município de Dracena, SP. A característica, que abriu hipótese para que a população fosse considerada uma nova espécie, foi a ausência de banda na identificação do fenótipo isoenzimático para esterases. A fim de elucidar a hipótese, o autor recorreu, ainda em sua tese, às análises morfológicas e morfométricas, que para ele bastaram para descrever a população estudada como uma nova espécie. O autor continua detectando essa espécie em cafezais do estado de São Paulo e Minas Gerais e recentemente, uma amostra dessa espécie foi enviada ao laboratório de Nematologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Contudo, essa nova espécie, *M. goeldii* nunca foi descrita eo artigo publicado em revista científica. Essa espécie é referida como *Nomen nudum* por Hunt & Handoo (2009).

1.7 *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1892 e sua diversidade

De 1886 a 1887, Emílio Augusto Goeldi relatava uma doença que assolava os cafezais da então Província do Rio de Janeiro. Na ocasião ele descreveu o gênero *Meloidogyne* e a espécie tipo do gênero, *Meloidogyne exigua*. Além de se tratar de uma espécie de ampla distribuição nas Américas é também a espécie dominante nos cafezais do Brasil, causando sérios danos às lavouras de café do país (Campos & Villain, 2005), seu parasitismo causa redução de vigor generalizada, podendo chegar a causar perdas de até 45% (Barbosa *et al.*, 2004). Um dos sintomas típicos são galhas arredondadas presentes principalmente em raízes jovens, a coloração das galhas varia de marrom amarelado a marrom escuro, de acordo com a idade da planta. Nota-se também que as massas de ovos são depositadas no córtex da raiz, podendo ser internas e externas (Campos & Villain, 2005).

Em 2000, Carneiro & Almeida observaram variações fisiológicas que levaram à descrição de três raças distintas de *M. exigua*, que foram confirmadas posteriormente por Muniz *et al.* (2009), sendo que a raça 1 parasita plantas de pimenta e café, raça 2 plantas de tomate, pimenta e café e a raça 3 somente a seringueira.

Como a reprodução de *M. exigua* é por partenogênese meiótica facultativa, a variabilidade intraespecífica é favorecida por maior probabilidade de recombinação genética (Muniz *et al.*, 2009). *M. exigua* apresenta variações não apenas morfológicas, como também de hospedeiros (Santos, 1997). Em estudos realizados com RAPD por Randig *et al.* (2002), *M. exigua* apresentou variabilidade genética de 67,5%. Os fenótipos de esterase das populações de *M. exigua* analisadas por Muniz *et al.* (2009) apresentaram 4 padrões diferentes (E1, E2 e E3 referentes a populações oriundas de cafeeiro e E2a,

oriunda de seringueira), reforçando ainda mais a hipótese de alta variabilidade intraespecífica de *M. exigua*. Nota-se também que a espécie possui baixa atividade da enzima (esterase) e, portanto, para que o fenótipo seja revelado é necessário a utilização de um maior número de fêmeas (Carneiro *et al.*, 1996). Os estudos de Muniz *et al.* (2009) com várias populações diferentes de *M. exigua* confirmaram a alta variabilidade intraespecífica dessa espécie, apresentando uma taxa de polimorfismo de até 59,6% e confirmando a alta eficiência dos marcadores SCAR para identificar essa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

População de nematoides

A população estudada foi coleta da Fazenda Araras, localizada no município de Araguari – MG e identificada como *Meloidogyne goeldii* (Santos, 1997). Foi mantida em plantas de café (*Coffea arabica* cv. Novo Mundo), em condições de casa de vegetação com temperatura de 22°C a 28°C.

Análises Bioquímicas

A caracterização da isoenzima esterase (Est) foi feita usando gel de poliacrilamida 7%, de acordo com Carneiro & Almeida (2001).

Mais de trinta fêmeas de coloração branco-leitosa de *Meloidogyne* sp., iniciando a fase de postura de ovos, foram extraídas individualmente de raízes de cafeeiro com auxílio de um estilete, sob microscópio estereoscópico e transferidas para tubos micro hematócrito, contendo 3 µl do tampão de extração (sacarose/Triton X-100). Os tubos foram mantidos em recipiente com gelo, durante todo o processo de extração das amostras. As fêmeas foram trituradas com um bastão de aço de extremidade arredondada e o extrato foi aplicado, com o auxílio de uma seringa Hamilton sobre papel Whatman 3 mm, com dimensões de 1,5 x 4,0 mm e; após esse procedimento, os papéis foram colocados nas cavidades do gel de poliacrilamida. Extratos proteicos de fêmeas de *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 jovens e leitosas foram incluídos em cada gel como fenótipo padrão para a caracterização da esterase. Gotas de bromofenol (azul de bromofenol a 0,1%) foram colocadas sobre as amostras para acompanhamento da migração, que seguiu a voltagem de 80-120 V em temperaturas médias de 4-8 °C durante 2h.

Os padrões de bandas no gel de poliacrilamida foram obtidos com as soluções reveladoras específicas para a isoenzima esterase (alfa-naftil-acetato, fast blue RR salt e tampão fosfato de sódio) preparadas no momento do uso. Após incubação no escuro, a 37 °C, por aproximadamente 20-60 minutos,

os géis foram lavados em água corrente e fixados em solução composta de água destilada, álcool metílico e ácido acético na proporção (5:5:1) (v/v) por 30 minutos. Em seguida os géis foram secos entre folhas de papel celofane. Os fenótipos de esterase foram designados pelas letras sugestiva do nome da espécie, acompanhada de um número que indica o número de bandas (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985, 1990).

Análises moleculares

Os ovos para análises de DNA foram extraídos de raízes infectadas conforme a metodologia descrita por Carneiro *et al.* (2004).

As raízes dos cafeeiros foram lavadas cuidadosamente, cortadas e trituradas em liquidificador com 500 ml de solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 1,25% por 40 segundos. Em seguida, o triturado foi passado por um conjunto de peneiras sobrepostas de 50, 100 e 500 mesh. Os resíduos da peneira de 500 mesh foram bem lavados com água corrente e coletados em um béquer.

A suspensão coletada foi distribuída em tubos de Falcon de 50 ml, aos quais adicionou-se caulim (aproximadamente 5 g) em cada tubo e esses foram centrifugados a 2500 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e os tubos foram completados com uma solução gelada (4 °C) de sacarose a 30%, a suspensão foi homogeneizada, e centrifugada a 2500 rpm por 2 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi passado em peneira de 500 mesh e lavado com água destilada para retirar os resíduos de sacarose.

Os ovos retidos na peneira de 500 mesh foram transferidos para tubos Falcon de 15 ml, o volume do tubo foi completado com água estéril e esses foram centrifugados a 2500 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente com auxílio de uma pipeta (P5000), e o pelete formado foi conservado no fundo do tubo. Em seguida, com auxílio de uma pipeta (P100), o pelete formado em cada tubo Falcon (15 ml) foi distribuído em quantidades iguais para 4 ou 2 tubos eppendorf de 1,5 ml (dependendo da quantidade do pelete formado), que foram centrifugados a 13000 rpm por 2 minutos com o objetivo de descartar o excesso de água contida na suspensão de ovos. Por fim, foram estimados a quantidade de ovos, e os tubos foram devidamente identificados e armazenados a -80°C para posterior extração do DNA genômico.

O DNA genômico foi extraído e purificado de alíquotas de 200 – 300 µl de ovos e juvenis de segundo estágio (J2), seguindo o procedimento clássico, fenol – clorofórmio (Randig *et al.*, 2002) e a metodologia descrita por Castagnone-Sereno *et al.* (1995) e Staton *et al.* (1998). Os ovos foram macerados em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido, e o macerado recuperado em tubo Eppendorf de 1,5 ml, ao qual foi adicionado 500 µl de NIB (0,1 M NaCl; 30 mM Tris pH 8; 10 mM EDTA; 0,7 mM β mercaptoetanol; 5 mM Triton - NPHO). Após a homogeneização, os tubos foram

centrifugados a 14000 rpm por dois minutos, e o sobrenadante foi descartado. Esta etapa foi repetida duas vezes. Em seguida foram acrescentados 800 µl de tampão de homogeneização (0,1 M NaCl; 0,2 M sacarose; 10 mM EDTA) e 200 µl do tampão de lise (0,125 M EDTA; 0,5 M Tris pH 9,2; 2,3 % SDS), os tubos foram homogeneizados e incubados em banho maria a 55 °C por 30 minutos, seguido de 10 minutos à temperatura ambiente. A purificação foi realizada adicionando-se 1 V de fenol (1 ml), seguindo-se à homogeneização e centrifugação a 14000 rpm por três minutos. O sobrenadante foi recuperado e depois misturado à ½ V de fenol (0,5 ml) + ½ V de clorofórmio (0,5 ml) e centrifugado a 14000 rpm por três minutos. O sobrenadante foi recuperado em novo tubo, adicionando 200 µl de éter, e centrifugado a 14000 rpm por três minutos. O éter foi eliminado com auxílio de uma pipeta. Para precipitação do DNA, foi adicionado ao tubo 1 ml de etanol absoluto, seguido de homogeneização e observação do pelet formado. O tubo foi então deixado a -80 °C durante 30 minutos. Em seguida efetuou-se uma centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e, adicionou-se etanol 70%. Após a centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos, eliminou-se o etanol. O precipitado foi seco à temperatura ambiente, e recuperado em volume de 10 a 20 µl de água esterilizada (Milli-Q) e o DNA foi armazenado a -20 °C.

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µl, contendo 2 µl de DNA genômico [3 ng/µl], 1 µl de cada primer F e R (Operon Technologies, Alameda, CA, EUA) (tabelas 1 e 2), 4 µl de dNTPs [1,25 mM] (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) (Invitrogen®, São Paulo, Brasil), 2,5 µl de tampão de reação 10X + MgCl₂ (Phoneutria Biotecnologia & Serviços-pht®, São Paulo, Brasil), 0,25 µl da enzima Taq DNA polimerase (pht®) e 14,25 µl de água Milli-Q. As amplificações foram feitas usando o termociclador PTC-100 programmable thermal controller (MJ Research) e as condições da PCR para *M. exigua* foram 5 min. a 94 °C, 30 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 45 seg. a 64 °C, 1min. a 70 °C e extensão final de 8 min. a 70 °C como descrito por Randig *et al* (2002). Os DNAs utilizados na PCR foram extraídos de juvenis de segundo estágio (J2) segundo metodologia proposta por Castagnone-Sereno *et al.*, (1995) e Stanton *et al.*, (1998). Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizados sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio [0,3 µg/ml].

O sequenciamento das regiões ITS1 – 5.8S - ITS2 e da subunidade D2-D3 do gene 28S do rDNA foram realizados utilizando as metodologias descritas por Castillo *et al.* (2003), Tigano *et al.* (2005) e Holterman *et al.* (2006). Para as análises filogenéticas de regiões específicas do rDNA, os fragmentos foram amplificados com os conjuntos de primers ITS1-5.8S-ITS2 e 28 S (D2D3) (Tabela 2), utilizando as condições de PCR descritas por Subbotin *et al.* (2000).

Tabela 1: Sequências dos primers SCAR utilizados na amplificação do fragmento espécie específico de *Meloidogyne* spp.

Espécie	Primer SCAR	Sequências	Referências
<i>M. exigua</i>	ex-D15-F	5-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3	Randig <i>et al.</i> , 2002
	ex-D15-R	5-TCCTCCGCTAAATGATATG-3	

Tabela 2: Sequências dos primers ITS1-ITS2 e D2D3 utilizados na amplificação para clonagem e sequenciamento.

Regiões	Sequências	Referências
ITS1-5.8S-ITS2	Forward: 5-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3	Schmitz <i>et al.</i> , 1998
	Reverse: 5-TCCTCCGCTAAATGATATG-3	
D2-D3	Forward: 5-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3	De Ley <i>et al.</i> , 1999
	Reverse: 5-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3	

Os produtos de PCR dos fragmentos ITS1-ITS2 e D2D3 foram cortados do gel de agarose, utilizando o kit de extração Wizard®SV Gel/PCR Clean Up (Promega, Inc®) e clonados com o Kit de clonagem pGEM-T® Easy vector (Promega, Inc®), seguindo as instruções do fabricante.

O sequenciamento do inserto foi realizado em dois clones independentes pela Macrogen®. As sequências de DNA das população de *Meloidogyne goeldii* foram alinhadas e comparadas com sequências de populações de outras espécies de *Meloidogyne* spp. depositadas no banco de dados do NCBI (GenBank) (Tabela 3), e também com todas as outras populações estudadas no presente trabalho (Tabela 4) através do programa ClustalX versão 1.83 com parâmetros padrões (Thompson *et al.*, 1997) e o cladograma foi gerada usando o Neighbour-Joining (Saitou & Nei, 1987) para as regiões ITS1-5.8S-ITS2, e parcimonia para os fragmentos D2D3 (28S), através do programa PAUP v 4.0 (Swofford, 2002). Uma sequência de *Pratylenchus zaeae* Graham, 1951 (KF765428.1) foi utilizada como “outgroup” no cladograma das regiões ITS1-5.8S-ITS2, e *P. vulnus* Allen & Jensen, 1951 (JX047009.1) no cladograma D2D3.

Tabela 3: Lista de números de acessos do NCBI (GenBank) usados para gerar as árvores filogenéticas.

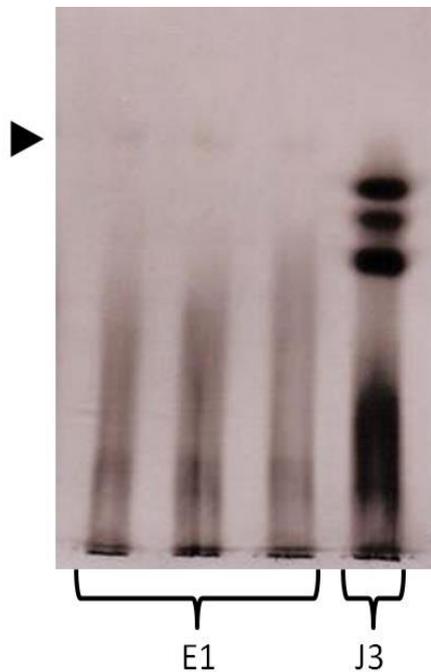
Região ITS1-5.8S-ITS2			Região D2D3 (28S)	
Código do NCBI	Referências	Espécies	Código do NCBI	Referências
Kf765428.1	Wang <i>et al.</i> , 2015	<i>M. exigua</i>	AF435795.1	Tenente <i>et al.</i> , 2001
		<i>Pratylenchus vulnus</i>	JX047009	Wang <i>et al.</i> , 2012

Tabela 4: Populações de *Meloidogyne* spp. utilizadas nas análises nos estudos de filogenia.

Espécie (eserese)	Origem
<i>M. incognita</i> (I1)	Londrina, PR
<i>M. incognita</i> (I2)	Londrina, PR
<i>M. incognita</i> (S2)	Garça, SP
<i>M. paranaensis</i> (P1)	Piumbi, SP
<i>M. exigua</i> (E1)	Lavras, MG
<i>M. paranaensis</i> (P2)	Herculândia, SP
<i>M. paranaensis</i> (P2a)	Guatemala
<i>M. exigua</i> (E2)	Canaã, MG
<i>Meloidogyne goeldii</i> (E1)	Araguari, MG

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A população apresentou bandas de sendo possível a revelação 30 fêmeas. Portanto essa concentração de esterase, por Santos, 1997 para *M.* foi o Est E1, Rm 1,5, perfil (Carneiro *et al.*, 2000) da descrição de *M. goeldii*



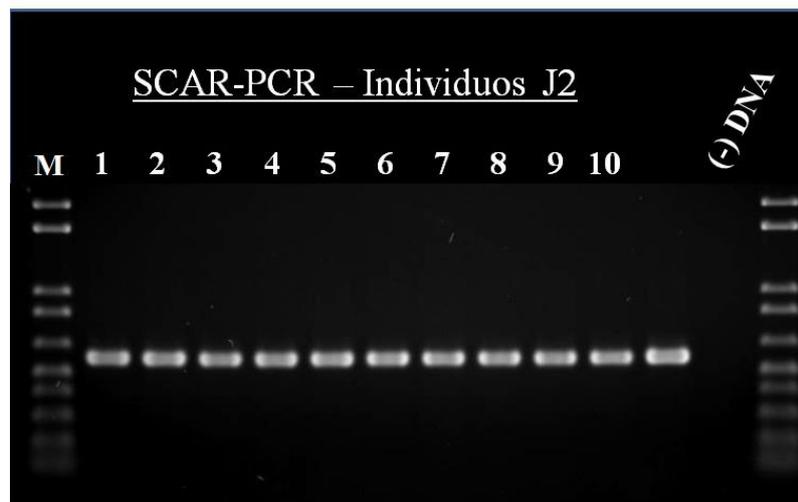
enviada como *M. goeldii* esterase quase imperceptíveis, só quando foram utilizadas mais de população apresentou baixa confirmando o que foi observado *goeldii*. O perfil revelado em gel esse, típico de *M. exigua* (Figura 1). Esse resultado difere indicando que na realidade trata-

se de uma variante de *M. exigua*. Nota-se que a baixa concentração da enzima esterase também é característica de *M. exigua* (Carneiro *et al.*, 1996, 2000), demonstrando então o motivo provável pelo qual Santos (1997) não obteve bandas específicas da população descrita como *M. goeldii*.

O resultado do SCAR-PCR de juvenis de segundo estágio individuais dessa mesma população, apresentou fragmentos de 562 pares de base, o que representa um resultado típico de *M. exigua*, de acordo com Randig *et al.* (2002) (Fig. 2), reforçando o resultado do perfil de esterase obtido.

Figura 1. Perfil de esterase (Est.) para *Meloidogyne* spp., *M. javanica* (Est J3) usado como referência; *M. goeldii* (Est. E1). A seta indica esterase de *M. goeldii*.

Figura 2. SCAR-PCR de uma população de *Meloidogyne goeldii*, proveniente de cafezais de Araguari (MG). (-) DNA= controle negativo. Números (1-10) representam indivíduos J2. M= 1 kb DNA ladder Plus (Invitrogen).



No cladograma a sequências da D2D3 (28S), *M.* se agrupou com demais populações de

partir de região *goeldii* as *M.*

exigua, concomitantemente, aos demais *Meloidogyne* spp. que agrupam entre si. O outgroup é representado por *Pratylenchus vulnus*, se mostrou completamente separado das outras espécies de *Meloidogyne*. Todos os agrupamentos apresentaram bootstrap significativos e altos (Figura 3).

Já no cladograma do ITS1-5.8S-ITS2, *M. goeldii* agrupou-se com *M. exigua* proveniente de Lavras, enquanto a população de *M. exigua* de Canaã não se agrupou com *M. exigua* ou com as demais populações de *Meloidogyne* spp. (Figura 4). *M. exigua* Canaã também foi estudada por Muniz et al. (2008) em análises de RAPD, e se mostrou com alta variabilidade intraespecífica, e muito distante das demais populações de *M. exigua*, e portanto, seu comportamento no cladograma aqui apresentado é compreensível.

Quanto à morfologia, alguns caracteres relativos à descrição de *M. goeldii*, aproximam-se de características descritas para *M. exigua*, embora o autor não tenha usado essa espécie na diagnose da tese,

comparando *M. goeldii* com *M. incognita* e *M. paranaensis* (Santos, 1997), que são completamente diferentes.

Todos esses resultados (enzimáticos e moleculares) reforçam a hipótese que *M. goeldii* foi descrita como uma nova espécie por Santos (1997) trata-se de variante de *M. exigua*. A ausência do perfil de esterase retratada na descrição de *M. goeldii* possivelmente se deu pela baixa atividade dessa enzima, o que na verdade já ocorre para *M. exigua*. A variação morfológica (Santos, 1997) também já era esperada, uma vez que as populações de *M. exigua* apresentaram alta variabilidade genética (Muniz *et al.*, 2008). Uma população de *M. exigua* seringueira, que apresentou um perfil de enzima diferente e alta variabilidade genética (Muniz *et al.*, 2008), também apresentou variabilidade morfológica (Muniz *et al.*, 2009).

A alta variabilidade de *M. exigua* era esperada por se tratar de uma espécie cuja a reprodução é por partenogênese meiótica facultativa, tais espécies apresentam maior variabilidade em relação as espécies partenogênicas mitóticas (Triantaphyllou, 1985).

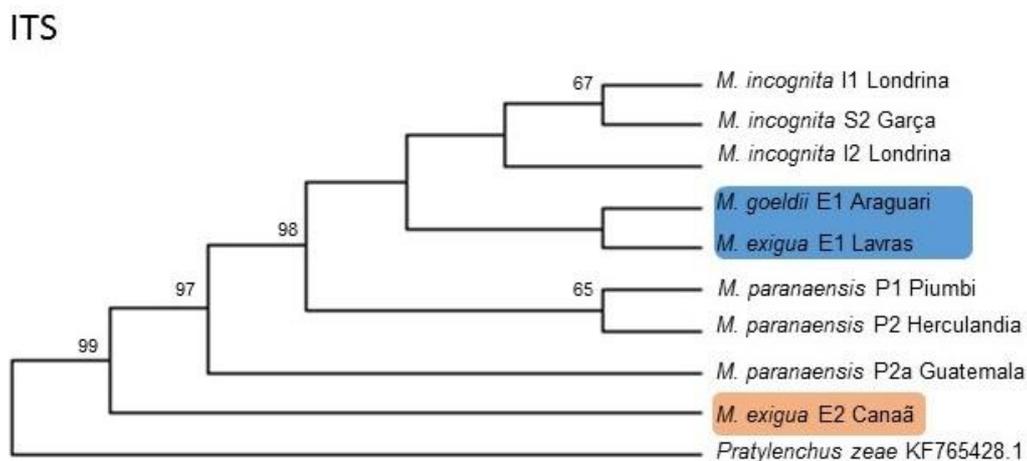


Figura 3. Cladograma obtido com o método agrupamento de vizinhos (Neighbor-joining) a partir do sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 das populações relacionadas nas Tabelas 3 e 4.

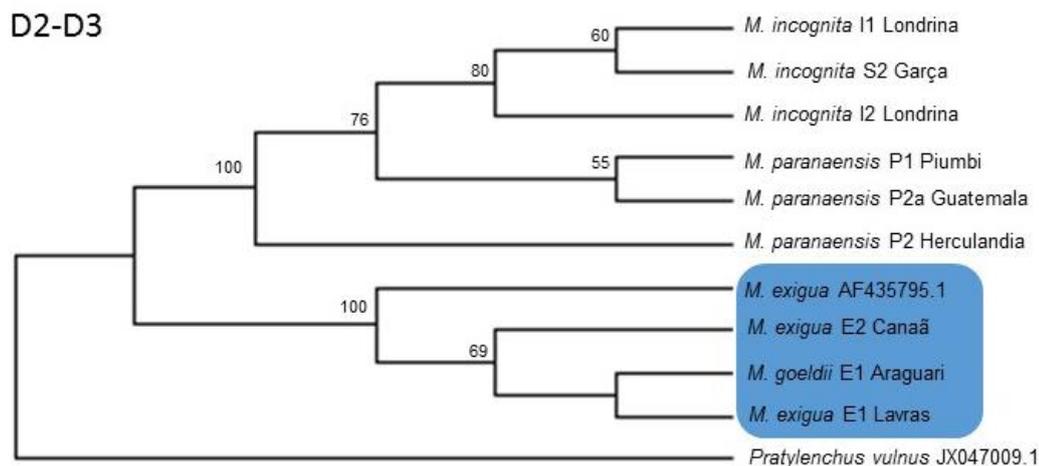


Figura 4. Cladograma obtido com o método agrupamento de vizinhos (Neighbor-joining) a partir do sequenciamento da região D2D3 (28S) das populações das Tabelas 3 e 4.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo permitiu evidenciar a partir de técnicas moleculares, que a população de *M. goeldii* estudada é possivelmente uma variante de *M. exigua*. Dessa maneira, mais estudos morfológicos e morfométricos são necessários no sentido de caracterizar completamente essa população e esclarecer sua identidade taxonômica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, M.E. - RFLP. O Emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. MATIOLI, S.R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, p. 143-152, 2001.

BARBOSA, D.H.S.G.; VIEIRA, H.D.; SOUZA, R.M.; VIANA, A.P.; SILVA, C. P. Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**. Campo dos Goytacazes. v.28. p. 49-54, 2004.

BLOK, V.C.; PHILLIPS, M.S.; MCNICOL, J.W.; & FARGETTE, M. Genetic variation in tropical *Meloidogyne* spp. As shown by rapds. **Fundamental and Applied Nematology**. v.20, n.2, p.127–133,1997.

BLOK, V.C.; POWERS, O. Biochemical and molecular identification. **Root-knot Nematodes**. Cambridge: CABI International. p. 98-118, 2009.

- CAMPOS, V.P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee and cocoa. **Plant parasitic nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture**, Wallingford: CAB International: 2 ed., p. 529-579, 2005.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Caracterização isoenzimática e variabilidade intraespecífica dos nematóides de galhas do cafeeiro no Brasil. **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. Poços de Caldas p. 280- 282, 2000.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**. Brasília: v.25, p. 555–560, 2001.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; CARNEIRO, R.G. Enzyme phenotypes of Brazilian isolates of *Meloidogyne* spp. **Fundamental and Applied Nematology**. v.19, p. 555-560, 1996.
- CARNEIRO, R.M.D.G. Nova raça de *Meloidogyne javanica* detectada em *Arachis pintoi* no estado do Paraná. **Nematologia Brasileira**. Brasília: v. 27, p.219-222, 2003.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; COFCEWICZ, E.T. The taxonomy of Coffee –Parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. **Plant–Parasitic Nematodes of coffee**. Dordrecht: Springer. p. 87-122, 2008.
- 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**. Brasília: v. 29, p. 233-241, 2005.
- 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.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; VANLERBERGHE-MASUTTI, F.; LEROY, F. Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers. **Genome**. v. 37, p. 904-909, 1994
- CASTAGNONE-SERENO, P.; ESPARRAGO, G.; ABAD, P.; LEROY, F.; & BONGIOVANNI, M. Satellite DNA as a target for PCR-specific detection of the plant-parasitic nematode *Meloidogyne* hapla. **Current Genetics**. v. 28, p. 566–70, 1995.
- CASTILLO, P.; CASTILLO, P.; VOVLAS, N.; SUBBOTIN, S.; TROCCOLI, A. A new root-knot nematode, *Meloidogyne baetica* N. Sp (Nematoda : Heteroderidae), parasitizing wild olive in Southern Spain. **Phytopathology**. v. 93, p. 1093–1102, 2003.
- CENIS, J.L. Identification of four major *Meloidogyne* spp. By random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). **Phytopathology**. v. 83, p. 76-80, 1993.
- CORREIA, V.R.; MATTOS, V.S.; ALMEIDA, M.R.A.; SANTOS, M.F.A.; TIGANO, M.S.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R.M.D.G. Genetic diversity of the root-knot nematode

Meloidogyne ethiopica and development of a species-specific SCAR marker for its diagnosis. **Plant Pathology**. v. 63, p. 476-483, 2014.

CORREIA, V. R.. 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.

DE LEY, P.; BLAXTER, M.L. Systematic position and phylogeny. **The Biology of Nematodes**. Londres: p. 1-30, 2002.

DOS SANTOS, M. F. A. et al. Biometrical, biological, biochemical and molecular characteristics of Meloidogyne incognita isolates and related species. **European Journal of Plant Pathology**. v. 134, p. 671-684, 2012.

EISENBACK, J.D.; HUNT, D.J. General morphology. **Root-knot Nematodes**. Cambridge: CABI North America Office, p. 18-54, 2009.

EISENBACK, J.D.; TRIANTAPHYLLOU, H.H. Root-knot nematode: Meloidogyne spp. And races. **Manual of agricultural nematology**. Nova York: p. 191-274, 1991

ESBENSHADE, P.R.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. Isozyme phenotypes for the identification of Meloidogyne species. **Journal of Nematology**. v. 22, p. 10-15, 1990.

ESBENSHADE, P. R.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. Use of enzyme phenotypes for identification of Meloidogyne species. **Journal of Nematology**, v. 17, n. 1, p. 6, 1985.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, p. 220, 1998.

FILETTO, F.; ALENCAR, E. Introdução e expansão do café na região sul de Minas Gerais. **Organizações Rurais e Agroindustriais**. Lavras: v. 3, n. 1, Jan-Jun, 2001.

FOURIE, H.; ZIJLSTRA, C.; MCDONALD, A.H. Identification of root-knot nematode species occurring in South Africa, using the SCAR-PCR technique. **Nematology**: v. 3, p. 675-80, 2001.

FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L.; FERRAZ, S. Nematoides como patógenos de plantas. **O essencial da fitopatologia**. Viçosa: ed. Suprema, p. 89-128, 2012.

HARTMAN, R.M.; SASSER, J.N. Identification of Meloidogyne species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. **An advanced treatise on Meloidogyne**. Raleigh: v. 2, p. 69-77, 1985.

HOLTERMAN, M.; VAN DER WURFF, A.; VAN DEN ELSSEN, S.; VAN MEGEN, H.; BONGERS, T.; HOLOVACHOV, O.; HELDER, J. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic

relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. **Molecular Biology and Evolution**. v. 23, p. 1792–1800, 2006.

HUNT, D.J.; HANDOO, Z.A. Taxonomy, identification and principal species. **Root-knot Nematodes**. Cambridge: CABI North America Office, p. 55-97, 2009.

JANATI A.; BERGÉ J.B.; TRIANTAPHYLLOU A.C.; DALMASS A. Nouvelles données sur l'utilisation des isoestérases pour l'identification des Meloidogyne. **Revue de Nématologie**. v. 5, p. 147-154, 1982.

KARSSSEN, G. Description of *Meloidogyne fallax* n. sp., a root-knot nematode from the Netherlands. **Fundamental and Applied Nematology**. v. 19, p. 593–599, 1996.

KARSSSEN, G.; MOENS, M. Root-knot nematodes. **Plant Nematology**. Wallingford: CABI Publishing, p. 59–90, 2006.

MAGGENTI, A. R. **General Nematology**. New York: ed. Springer- Verlag, 1981.

MATIELLO, J.B. et al. Efeito de espaçamento do cafezal sobre a incidência de Ferrugem e Bicho Mineiro. **Congresso Brasileiro De Pesquisas Cafeeiras**. São Lourenço: v. 9, p. 13-14, 1981.

MCLAIN, D.K.O.; RAI, K.S.; FRASER, J.M. Intraespecific and interspecific variation in the sequence and abundance of highly repeated DNA among Mosquitos of the *Aedes albopictus* subgroup. **Heredity**. v. 58, p. 373-381, 1987.

MENG, Q.P.; LONG, H. XU, J.H. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. Javanica* and *M. Arenaria*. **Acta Phytopathologica Sinica**. v. 34, p. 204-210, 2004.

MOENS, M.; PERRY, R.N.; STARR, J.L. *Meloidogyne* Species – a diverse group of novel and important plant parasites. **Root-knot Nematodes**. Cambridge: CABI North America Office, p. 1-17, 2009.

MOJTAHEDI, H.; SANTO, G.S.; PINKERTON, J.N. Differential response of Thor alfalfa to *Meloidogyne chitwoodi* races and *M. Hapla*. **Journal of Nematology**. v. 20, p. 410-416, 1988.

MUNIZ, M.F.S.; CAMPOS, V.P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CASTRO, J.M.C.; ALMEIDA, M.R.A.; 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. F.; CAMPOS, V.P.; MOITA, A.W.; GONÇALVES, W.; ALMEIDA, M.R.A.; SOUSA, F.R.D.; CARNEIRO, R.M.D. Reaction of coffee genotypes to different populations of *Meloidogyne* spp.: detection of a naturally virulent *M. Exigua* population. **Tropical Plant Pathology**. Brasília: v. 34, p. 370-378, 2009.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 85, p. 985-993, 1993.

RANDIG O.; BONGIOVANNI, M.; CARNEIRO, R.M.; 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.

RANDIG, O.; CARNEIRO. R.M.D.G.; CASTAGNONE-SERENO P. Identificação das principais espécies de Meloidogyne parasitas do cafeeiro no Brasil com marcadores SCAR-CAFÉ em Multiplex-PCR, **Nematologia Brasileira**. Brasília: v. 28, p. 1-10, 2004.

RENA, A.B.; GUIMARÃES, P.T.G. **Sistema radicular do cafeeiro: estrutura, distribuição, atividade e fatores que o influenciam**. Belo Horizonte: ed. Epamig, p. 80, 2000.

ROMERO, J. P.; ROMERO, J. C. P. **Cafeicultura prática: cronologia das publicações e dos fatos relevantes**. São Paulo: ed.Ceres, p. 400, 1997.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SANTO, G. S.; O'BANNON, J. H.; FINLEY, A. M.; GOLDEN, A. M. Occurrence and host range of a new root-knot nematode (*Meloidogyne chitwoodi*) in the Pacific Northwest. **Plant Disease**. v. 64, n. 10, p. 951-952, 1980.

SANTOS, J.M. **Estudo das principais espécies de Meloidogyne Goeldi que infectam o cafeeiro no Brasil com descrição de Meloidogyne goeldii sp.** Tese (Phd) - Faculdade de Ciências Agrômicas - UNESP, Botucatu: 1997.

SCHMITZ, B.; BURGERMEISTER, W.; BRAASCH, H. Molecular Genetic Classification of Central European Meloidogyne Chitwoodi and M. fallax Populations. **Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes**, v. 50, n. 12, p. 310-317, 1998.

SILVA, R.V. **Produção de inóculo e diferenciação de raças de Meloidogyne exigua em Coffea spp.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa: 2005.

STANTON, J.M.; MCNICOL, C.D.; STEELE, V. Non-manual lysis of second-stage Meloidogyne juveniles for identification of pure and mixed samples based on the polymerase chain reaction. **Australian Plant Pathology**. v. 27, p. 112-115, 1998.

SUBBOTIN, S.A.; WAEYENBERGE, L.; MOENS, M. Identification of cyst forming nematodes of the genus Heterodera (Nematoda: Heteroderidae) based on the ribosomal DNA-rflps. **Nematology**. v. 2, p. 153-164, 2000.

- SWOFFORD, D. L. P. **Phylogenetic analysis using parsimony** - and other methods. Sunderland: 2002.
- TAUNAY, A. E. **Pequena história do café no Brasil (1727-1937)**. Rio de Janeiro: ed. DNC, 1945.
- TAYLOR, D.T.; SASSER, J.N. Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (Meloidogyne species). **North Carolina State University and USAID**, p. 111, 1983.
- TENENTE, G.; DE LEY, I.T.; KARSSSEN, G.; VIERSTRAETE, A.; VANFLETEREN, J.; DE LEY, P. Sequence analysis of the D2/D3 region of the large subunit rDNA from different Meloidogyne isolates. **Nematropica**, v. 34, n. 1, p. 1-12, 2004.
- TIGANO, M. Genetic diversity of the root-knot nematode Meloidogyne enterolobii and development of a SCAR marker for this guava-damaging species. **Plant Pathology**. Teliz-Ortiz, D., G, v. 59, p. 1054-1061, 2010.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic acids research**. v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.
- TREUB, M. **Onderzoekingen over sereh-ziek suikerriet gedaan in's Lands plantentuin te Buitenzorg**. Landsdrukkerij: 1885.
- TRUDGILL, D.L. Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. **Annu. Rev. Phytopathol.** v.29, p.167-192, 1991.
- WANG, J.C.; HUANG, G.M.; WEI, Y.D.; LIAO, F.; ZHANG, R.F.; GUO, J.Z.; LIU, P.; ZHANG, Y.J.; LUO, J.F. Phylogenetic analysis of Pratylenchus (Nematoda: Pratylenchidae based on ribosomal internal transcribed spacers (ITS) and D2/D3 expansion segments of 28S rRNA gene. **Acta Zootaxonomica Sinica**, v. 4, p. 687-693, 2012.
- WOFFORD, D.S.; GRAY, F.A.; ECKERT, J.W. Pathogenicity of two populations of Meloidogyne hapla Chitwood on Alfalfa and Sainfoin. **Journal of Nematology**. v. 21, p. 87-91, 1989.
- ZIJLSTRA, C. Identification of Meloidogyne chitwoodi, M. Fallax and M. Hapla based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. **European Journal of Plant Pathology**. v. 106, p. 283-290, 2000.
- ZIJLSTRA, C.; DONKERS-VENNE, D.T.H.M.; FARGETTE, M. Identification of Meloidogyne incognita, M. Javanica and M. Arenaria using sequence characterized amplified regions (SCAR) based PCR assays. **Nematology**. v.2, p. 847-53, 2000.