UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

DIVERSIDADE E OCORRÊNCIA DE *Meloidogyne izalcoensis* PARASITANDO CAFEEIROS NO TRIÂNGULO MINEIRO: RESISTÊNCIA EM *Coffea* spp. E PLANTAS NÃO HOSPEDEIRAS PARA USO EM MANEJOS CULTURAIS.

Diversity and occurrence of *Meloidogyne izalcoensis* parasitizing coffee plants in the Triângulo Mineiro: resistance in *Coffea* spp. and non-host plants for use in crop management.

SHEILA FREITAS DE ALMEIDA

BRASÍLIA-DF
2024

SHEILA FREITAS DE ALMEIDA

DIVERSIDADE E OCORRÊNCIA DE *Meloidogyne izalcoensis* PARASITANDO CAFEEIROS NO TRIÂNGULO MINEIRO: RESISTÊNCIA EM *Coffea* spp. E PLANTAS NÃO HOSPEDEIRAS PARA USO EM MANEJOS CULTURAIS.

Tese apresentada ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Fitopatologia.

Orientador

Prof. Juvenil Enrique Cares

Coorientadora

Dra. Regina Maria Dechechi G. Carneiro

BRASÍLIA-DF
2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Almeida, Sheila Freitas de

I- Diversidade e ocorrência de *Meloidogyne izalcoensis* parasitando cafeeiros no Triângulo Mineiro: resistência em *Coffea* spp. e plantas não hospedeiras para uso em manejos culturais.

Brasília, 2024. Número de folhas: 154 il

Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília-DF.

I- Fitopatologia – Controle genético de nematoides

II- Universidade de Brasília. PPG/FIT

BRASÍLIA-DF

2024

A Deus, minha família, colaboradores e amigos.

DEDICO

“Dar-te-ei os tesouros escondidos e as riquezas encobertas, para que saibas que eu sou o senhor, o Deus de Israel, que te chama pelo teu nome”.

(Isaías 45:3)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a vida e me presentear com uma família linda, cercada de amor, carinho, respeito e proteção.

Ao meu pai Gerson, minha mãe Josilda, irmãs Keila e Leila, por todo apoio, incentivo e amor.

Ao professor e orientador Juvenil E. Carneiro, pela orientação, prestatividade, ensinamentos e apoio necessários para a realização da minha pesquisa.

À Dra. Regina Carneiro, pela coorientação, incentivo, apoio, contribuições e fornecimento de subsídios necessários para a realização da minha tese.

À Marcilene, William, Gleiciane e Vanessa, pelo auxílio no Laboratório de Nematologia, com ensinamentos, paciência, experiência compartilhada e por estarem sempre dispostos a ajudar e esclarecer dúvidas.

Aos colegas do laboratório de Nematologia no CENARGEN, Ana Luiza, Caio Felipe, Carlos Eduardo, Paolo, Ana Cláudia e Murilo, pela presteza, ensinamentos, auxílio, aprendizados e ajuda em diversos momentos, essenciais para a concretização desse trabalho.

À UnB pelo apoio e ensino.

Ao Consórcio Pesquisa Café e à CAPES pelo fornecimento de bolsa e financiamento do Projeto ao longo do doutorado.

Ao CENARGEN, pela infraestrutura, subsídios e apoio à pesquisa.

Muito obrigada a todos!

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Prof. Juvenil Enrique Cares e coorientação da Dra. Regina Maria Dechechi G. Carneiro, com apoio institucional e financeiro da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Consórcio Pesquisa Café e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Diversidade e ocorrência de *Meloidogyne izalcoensis* **parasitando cafeeiros no Triângulo Mineiro: resistência em** *Coffea* spp. **e plantas não hospedeiras para uso em manejos culturais.**

SHEILA FREITAS DE ALMEIDA

TESE APROVADA em: _05_/_12_/2024 por:

Prof. Dr. Valdir Ribeiro Correia

Examinador Externo - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins

Pesquisador/Prof. Dr. Leonardo Silva Boiteux

Examinador Interno – Universidade de Brasília/ Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças

Prof. Dr. Marcelo Fagioli

Examinador Interno – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Juvenil Enrique Cares

Orientador (Presidente da Banca) – Universidade de Brasília.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS..... ii
LISTA DE FIGURAS..... iii
RESUMO GERAL..... v
GENERAL ABSTRACT..... vi
1. INTRODUÇÃO..... 1
2. OBJETIVOS..... 5
2.1 Objetivo geral..... 5
2.2 Objetivos específicos..... 5
3. REVISÃO DE LITERATURA..... 6
3.1 Cultura do cafeeiro..... 6
3.1.1 Características botânicas..... 6
3.1.2 Origem e adaptação das principais espécies de café..... 7
3.1.2.1 *Coffea arabica*..... 7
3.1.2.2 *Coffea canephora*..... 8
3.1.3 Importância nutricional, social e econômica da cafeicultura no Brasil..... 9
3.2 Cultivares de cafeeiro..... 11
3.2.1 Amphillo..... 12
3.2.2 Híbrido de Timor..... 13
3.2.3 Mundo Novo (Cultivares do Grupo Mundo Novo)..... 13
3.2.4 Catuaí (Cultivares do Grupo Catuaí)..... 14
3.2.4.1 Catuaí amarelo 62..... 14
3.2.4.2 Catuaí vermelho IAC 99..... 14
3.2.4.3 Catuaí vermelho IAC 144..... 15
3.2.5 Cv. Apoatã 2258..... 15
3.2.6 'ES8161 Goytacá' (Clone 14) 15
3.2.7 IAC 125 RN..... 16
3.2.8 IAPAR 59..... 17
3.2.9 IPR 99..... 17
3.2.10 IPR 100..... 17
3.2.11 IPR 102..... 18
3.2.12 IPR 103..... 18
3.2.13 IPR 105..... 19
3.2.14 IPR 106..... 19
3.2.15 IPR 107..... 19
3.2.16 IPR 108..... 19
3.3 *Meloidogyne* spp. **na cultura do cafeeiro**..... 20
3.3.1 *Meloidogyne exigua*..... 21
3.3.2 *Meloidogyne incognita*..... 22
3.3.3 *Meloidogyne paranaensis*..... 22
3.3.4 *Meloidogyne izalcoensis*..... 23
3.3.5 *Meloidogyne lopezi*..... 24
3.4 Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp..... 24
3.5 Identificação de espécies de *Meloidogyne*..... 26
3.6 Resistência genética de cafeeiros a *Meloidogyne* spp..... 29
3.6.1 Cultivares de cafeeiros com resistência genética a *Meloidogyne* spp..... 31
3.7 Diversidade genética e filogenia de *Meloidogyne* spp..... 35
3.7.1 Marcadores moleculares: RAPD e AFLP..... 36
3.7.2 Marcadores moleculares: D2D3 e ITS do DNA ribossomal, e DNA

Mitocondrial..... 38
3.7.3 Marcador molecular: Hsp90..... 41
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 42

CAPÍTULO 1. LEVANTAMENTO DE *Meloidogyne* spp**. EM CAFEEIROS NA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO E COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO ENZIMÁTIDO E MOLECULAR..... 61**

RESUMO..... 62
ABSTRACT..... 63
1. INDRODUÇÃO..... 64
2. MATERIAL E MÉTODOS..... 67
2.1 Obtenção de amostras de raízes..... 67
2.2 Identificação bioquímica das espécies de *Meloidogyne*..... **70**
2.3 Identificação molecular de espécies de *Meloidogyne* **por marcadores SCAR espécie-específicos..... 70**
3. RESULTADOS..... 72
4. DISCUSSÃO..... 78
5. CONCLUSÕES..... 84
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 85

CAPÍTULO 2. VARIABILIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DE DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Meloidogyne izalcoensis* **E REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CAFÉ A ESSA NOVA ESPÉCIE DETECTADA NO BRASIL..... 89**
RESUMO..... 90
ABSTRACT..... 91
1. INDRODUÇÃO..... 92
2. MATERIAL E MÉTODOS..... 95
2.1 Populações de nematoides..... 95
2.2 Preparação do DNA genômico..... 95
2.3 Análise RAPD..... 98
2.4 Análise AFLP..... 100
2.5 Diversidade genética de *Meloidogyne izalcoensis*..... **101**
2.6 Análise filogenética de regiões de DNA..... 102
2.7 Ensaios de resistência..... 103
3. RESULTADOS..... 106
3.1 Caracterização das populações de nematoides..... 106
3.2 Diversidade genética de *Meloidogyne izalcoensis***: Marcadores RAPD e AFLP..... 107**
3.3 Análise filogenética de regiões de DNA: ITS, D2-D3, COII e Hsp90..... 110
3.4 Ensaios de resistência..... 114
4. DISCUSSÃO..... 119
5. CONCLUSÕES..... 125
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 126

CAPÍTULO 3. HOSPEDABILIDADE DE PLANTAS DE COBERTURA PARA O MANEJO DE *Meloidogyne izalcoensis* **EM CAFEZAIS INFESTADOS COM NEMATOIDE-DAS GALHAS..... 131**

RESUMO..... **132**
ABSTRACT..... **133**
1. INDRODUÇÃO..... **134**
2. MATERIAL E MÉTODOS..... **137**
2.1 Identificação, inóculo e multiplicação de *Meloidogyne izalcoensis* **em cafeeiros** **137**
2.2 Reprodução de *Meloidogyne izalcoensis* **em diferentes espécies botânicas**..... **137**
2.2.1 Primeiro ensaio: hospedabilidade de diferentes espécies botânicas a *Meloidogyne izalcoensis*..... **139**
2.2.2 Segundo ensaio: hospedabilidade de diferentes plantas antagonistas a *Meloidogyne izalcoensis*..... **140**
2.3 Análise estatística..... **140**
3. RESULTADOS..... **141**
4. DISCUSSÃO..... **145**
5. CONCLUSÕES..... **149**
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... **150**
CONCLUSÕES GERAIS..... **154**

PUBLICAÇÕES RESULTANTES DA TESE

1. Almeida *et al*., 2023. Genetic variability and phylogenetic characterization of different populations of *Meloidogyne izalcoensis* and reaction of coffee genotypes to this new species detected in Brazil. Plant Pathology 72: 636-650. DOI: 10.1111/ppa.13686

2. Almeida *et al*., 2023. Comparison between enzymatic and molecular diagnostic techniques for identification of *Meloidogyne* spp. on coffee in Brazil and restricted occurrence of *M. izalcoensis*. Physiological and Molecular Plant Pathology 128:1-6. DOI: 10.1016/j.pmpp.2023.102156

3. Almeida *et al*., 2024. Host status of cover crops for the management of *Meloidogyne izalcoensis* in coffee orchards infested with root-knot nematodes. Nematology 26: 929-938. DOI: 10.1163/15685411-bja10349

4. Almeida *et al*., 2022. Levantamento do nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) em cafeeiros no Triângulo Mineiro-MG, Brasil: ocorrência restrita de *M. izalcoensis.* Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 378. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1.

Tabela 1. Identificação das áreas de coleta de amostras de raízes de cafeeiros nos municípios de Araguari e Indianópolis, região do Triângulo Mineiro, MG coletadas em 2018..... **68**

Tabela 2. Identificação das áreas de coleta de amostras de raízes de cafeeiros nos municípios de Araguari e Indianópolis, região do Triângulo Mineiro, MG coletadas em 2021..... **69**

Tabela 3. Características dos marcadores moleculares SCAR desenvolvidos para as espécies de *Meloidogyne* associadas ao cafeeiro..... **71**

Tabela 4. Espécies de *Meloidogyne* parasitando cafeeiros nos municípios de Araguari e Indianópolis-MG, detectadas por esterase e marcadores SCAR-PCR em 2018..... **73**

Tabela 5. Espécies de *Meloidogyne* parasitando cafeeiros no município de Araguari-MG, detectadas por marcadores SCAR-PCR em 2021..... **75**

CAPÍTULO 2.

Tabela 1. Lista de isolados de *Meloidogyne izalcoensis* usados neste estudo..... **97**

Tabela 2. Primers oligonucleotídeos (10-mer) usados na análise RAPD..... **99**

Tabela 3. Primers oligonucleotídeos (22-mer) usados na análise AFLP..... **101**

Tabela 4. Descrição dos genótipos de *Coffea* spp. usados neste estudo..... **105**

Tabela 5. Reação de seis genótipos de *Coffea* spp. a população brasileira de *Meloidogyne izalcoensis*, 300 dias após inoculação com 10.000 ovos..... **115**

Tabela 6. Reação de seis genótipos de *Coffea* spp. a população brasileira de *Meloidogyne izalcoensis*, 240 dias após inoculação com 10.000 ovos..... **115**

Tabela 7. Reação de dez genótipos de *Coffea* spp. a população brasileira de *Meloidogyne izalcoensis*, 350 dias após a inoculação com 10.000 ovos..... **117**

Tabela 8. Reação de dez genótipos de *Coffea* spp. a população brasileira de *Meloidogyne izalcoensis*, 340 dias após a inoculação com 10.000 ovos..... **118**

CAPÍTULO 3.

Tabela 1. Espécies botânicas avaliadas neste estudo..... **138**

Tabela 2. Reação de hospedabilidade de diferentes espécies botânicas à população brasileira de *Meloidogyne izalcoensis*, 90 dias após a inoculação com 10.000 ovos de janeiro a abril de 2021..... **142**

Tabela 3. Reação de hospedabilidade de diferentes espécies botânicas à população brasileira de *Meloidogyne izalcoensis*, 90 dias após inoculação com 10.000 ovos de abril a julho de 2021..... **143**

Tabela 4. Reação de hospedabilidade de diferentes espécies botânicas antagonistas à população brasileira de *Meloidogyne izalcoensis*, 90 dias após inoculação com 10.000 ovos de junho a setembro de 2022..... **144**

Tabela 5. Reação de hospedabilidade de diferentes espécies botânicas antagonistas à população brasileira de *Meloidogyne izalcoensis*, 90 dias após inoculação com 10.000 ovos de setembro a novembro de 2022..... **144**

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Ciclo de vida do nematoide-das-galhas em raízes de cafeeiro. Fonte: modificada de Agrios (1988)..... **25**

CAPÍTULO 1.

Figura 1. Fenótipos de esterase (Est) de diferentes populações de *Meloidogyne* spp. do Triângulo Mineiro. **A)** *M. exigua* fenótipo de esterase (Est E2); **B)** *M. paranaensis* fenótipo de esterase (Est P1); **C)** *M. incognita* fenótipo de esterase (Est I1); *M. javanica* (Est J3) foi usado como padrão de referência..... **73**

Figura 2. Amplificações SCAR-PCR para *Meloidogyne* spp. parasitas do cafeeiro nos municípios de Araguari e Indianópolis, MG. **A)** P = *M. paranaensis* (208 pb); **B)** I = *M. incognita* (399 pb); E = *M. exigua* (562 pb). Abreviações: (-) DNA: controle negativo; M: marcador 1kb DNA Plus; pb: pares de base..... **74**

Figura 3. Amplificações SCAR-PCR para *Meloidogyne* spp. parasitas do cafeeiro nos municípios de Araguari e Indianópolis, MG. **1, 2, 3, 4 e 5)** *M. incognita* (399 pb); **6, 7 e 8)** *M. exigua* (562 pb); **9 e 10)** *M. incognita* (399 pb) e *M. exigua* (562 pb). Abreviações dos padrões, P_{+}: *M. paranaensis*, I_{+}: *M. incognita*, E_{+}: *M. exigua*, Iz_{+}: *M. izalcoensis* (670 pb); (-) DNA: controle negativo; M: marcador 1kb DNA Ladder; pb: pares de base..... **76**

Figura 4. Distribuição espacial de *Meloidogyne* spp. em cafeeiros nos municípios de Araguari e Indianópolis na região do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brasil. Elaborado por Sergio Eustáquio de Noronha - EMBRAPA/CENARGEN..... **77**

CAPÍTULO 2.

Figura 1. Fenótipos de esterase de populações de *Meloidogyne izalcoensis* (Est I4). Iza 1-5 do Brasil, El Salvador, Benin, Tanzânia e Vietnã, respectivamente. *Meloidogyne javanica* (Est J3) está incluída como referência..... **106**

Figura 2. Padrões de amplificação de PCR para cinco populações de *Meloidogyne izalcoensis* geradas com primers SCAR específico izAB02F/R (Correa *et al*., 2013). M: 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen); Iza 1-5, *M. izalcoensis* do Brasil, El Salvador, Benin, Tanzânia e Vietnã, respectivamente. (-) Controle negativo..... **107**

Figura 3. Árvore concatenada Neighbor-Joining (NJ) mostrando a análise da variabilidade genética dos marcadores RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) e AFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) de 5 populações de *Meloidogyne izalcoensis*. Os números à esquerda das ramificações são os valores *bootstrap* de 1.000 réplicas. Populações Iza 1 a 5 são do Brasil, El Salvador, Benim, Tanzânia e Vietnã, respectivamente. *Meloidogyne enterolobii* foi usado como *outgroup*..... **109**

Figura 4. Análise de Maximum Likelihood mostrando as relações filogenéticas de populações de *Meloidogyne izalcoensis* com espécies relacionadas com base nas regiões do DNA ribossomal. **A)** Sequências ITS1-5.8S-ITS2 rDNA; **B**) Sequências da região do fragmento D2-D3 do 28S rDNA. Os números à esquerda das ramificações são valores de *bootstrap* para 1.000 repetições. Os números de acesso para sequências de genes recuperadas do GenBank estão listados ao lado dos nomes das espécies e as sequências das populações investigadas neste estudo estão destacadas em negrito, com a adição de um código populacional, Iza 1-5 para populações do Brasil, El Salvador, Benim, Tanzânia e Vietnã, respectivamente..... **111**

Figura 5. Análise de Maximum Likelihood mostrando as relações filogenéticas de populações de *Meloidogyne izalcoensis* com espécies relacionadas com base nas sequências COII-mtDNA. Os números à esquerda das ramificações são valores de *bootstrap* para 1.000 repetições. Os números de acesso para sequências de genes recuperadas do GenBank estão listados ao lado dos nomes das espécies e as sequências das populações investigadas neste estudo estão destacadas em negrito, com a adição de um código populacional, Iza 1, 2, 4 e 5 para populações do Brasil, El Salvador, Tanzânia e Vietnã, respectivamente..... **112**
Figura 6. Análise de Maximum Likelihood mostrando as relações filogenéticas de populações de *Meloidogyne izalcoensis* com espécies relacionadas com base nas sequências do gene Hsp90. Os números à esquerda das ramificações são valores de *bootstrap* para 1.000 repetições. Os números de acesso para sequências de genes recuperadas do GenBank estão listados ao lado dos nomes das espécies e as sequências das populações investigadas neste estudo estão destacadas em negrito, com a adição de um código populacional, Iza 1, 2, 3 e 4, para populações do Brasil, El Salvador, Benim e Tanzânia, respectivamente..... **113**

CAPÍTULO 3.
Figura 1. Raízes de *Crotalaria juncea* parasitadas por *Meloidogyne izalcoensis*. **A)** Visão geral da raiz; **B)** Raízes mostrando galhas, fêmeas brancas e massas de ovos rosadas coradas com Floxina B..... **141**

RESUMO GERAL

Sheila Freitas de Almeida. **Diversidade e ocorrência de** *Meloidogyne izalcoensis* **parasitando cafeeiros no Triângulo Mineiro: resistência em** *Coffea* spp. **e plantas não hospedeiras para uso em manejos culturais.** 2024. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF.

Os nematoides-das-galhas, *Meloidogyne* spp. são considerados importantes patógenos da cultura do café, podendo limitar a produção e causar perdas econômicas. *Meloidogyne izalcoensis* foi recentemente detectada no Brasil, parasitando cafeeiros no Triângulo Mineiro, MG. Os objetivos desta pesquisa foram: **(*i*)** investigar a ocorrência e distribuição de *Meloidogyne* spp. em cafezais presentes no Triângulo Mineiro, com ênfase em *M. izalcoensis*, comparando as técnicas de eletroforese de isoenzimas (α-esterases) e marcadores moleculares específicos (SCAR-PCR-café), **(*ii*)** estudar a diversidade e filogenia de populações brasileiras e estrangeiras de *M. izalcoensis*, usando marcadores RAPD, AFLP, ITS, D2D3, COII e Hsp90, **(*iii*)** avaliar a reação de suscetibilidade ou resistência de cultivares de cafeeiros disponíveis no Brasil a *M. izalcoensis,* e **(*iv*)** analisar a reação de hospedabilidade de diferentes espécies botânicas a *M. izalcoensis.* Nos levantamentos realizados foram identificadas as espécies: *M. exigua* (41,67%), *M. incognita* (33,33%), *M. paranaensis* (20,83%) e *M. izalcoensis* (4,17%). As ferramentas moleculares se mostraram mais adequadas para a identificação das espécies isoladas ou em misturas. Populações de espécies de *Meloidogyne* em mistura foram observadas em 20,83% das amostras. O uso de marcadores SCAR provou ser a ferramenta mais eficaz para identificar com precisão *M. exigua* e mistura de espécies. Essa pesquisa confirma que *M. izalcoensis* tem sua ocorrência restrita na região onde foi inicialmente detectada. Uma baixa variabilidade intraespecífica foi detectada entre populações de *M. izalcoensis* da África, Vietnã, Brasil e El Salvador de acordo com as análises com os marcadores RAPD e AFLP. Filogeneticamente, todas as populações de *M. izalcoensis* de diferentes localidades (El Salvador, Benim, Tanzânia, Vietnã e Brasil) foram agrupadas com 90% e 69% de suporte bootstrap para as regiões COII e HSP90, respectivamente, indicando que essas regiões genômicas são altamente conservadas para a espécie. Além disso, ambos os marcadores permitiram a separação de populações de *M. izalcoensis* de outras importantes espécies de *Meloidogyne* associadas com o cafeeiro, incluindo *M. exigua*, *M. paranaensis*, *M. incognita*, *M. arabicida* e *M. lopezi*. Nos estudos de busca por fontes de resistência, a maioria dos genótipos testados portadores de resistência a outras espécies de *Meloidogyne* (Amphillo × Catuaí, Híbrido de Timor, IAPAR 59, IPR 99, IPR 100, IPR 102, IPR 103, IPR 105, IPR 106, IPR 107 e IPR 108) foram considerados suscetíveis a *M. izalcoensis*, exceto o porta-enxerto cv. Apoatã IAC 2258, que se mostrou moderadamente resistente, com segregação genética de 43,8% para este caráter. Nos ensaios de hospedabilidade, a maioria das espécies botânicas avaliadas foram classificadas como não hospedeiras ou má hospedeiras para *M. izalcoensis*, incluindo o algodão, arroz, feijão, aveia branca, aveia preta, azevém, milho, três espécies de gramíneas, duas cultivares de milheto, duas cultivares de trigo, *Crotalaria breviflora*, *C. ochroleuca*, *C. spectabilis*, feijão-de-porco, mucuna-cinza e duas espécies de capim-arroz. Apenas o tomateiro e o feijoeiro foram classificados como boas hospedeiras, e *C. juncea* e soja e *C. juncea* foram classificadas como hospedeiras intermediárias. As plantas identificadas como não-hospedeiras e más-hospedeiras podem ser recomendadas para culturas intercalares ou em rotação de culturas em áreas infestadas por *M. izalcoensis.*

Palavras-chave: *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, manejo de nematoides, resistência a nematoides, variabilidade genética.

Orientador – Juvenil Enrique Cares – Universidade de Brasília
Co-orientadora – Regina Maria Dechechi G. Carneiro – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

GENERAL ABSTRACT

Sheila Freitas de Almeida. **Diversity and occurrence of** *Meloidogyne izalcoensis* **parasitizing coffee plants in the Triângulo Mineiro: resistance in** *Coffea* spp. **and non-host plants for use in crop management.** 2024. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF.

Root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., are important pathogens of coffee crops that can limit production and cause economic losses. *Meloidogyne izalcoensis* was recently detected in Brazil parasitizing coffee trees in the Triângulo Mineiro, MG. The objectives of this study were: **(*i*)** to investigate the occurrence and distribution of *Meloidogyne* spp. in coffee plantations in the Triângulo Mineiro region, with emphasis on *M. izalcoensis*, comparing isoenzyme electrophoresis (α-esterases) and specific molecular marker (SCAR-PCR-coffee) techniques, **(*ii*)** to study the diversity of Brazilian and foreign populations of *M. izalcoensis*, using RAPD, AFLP, ITS, D2D3, COII and Hsp90 markers, **(*iii*)** to evaluate the resistance reaction of coffee cultivars available in Brazil to *M. izalcoensis*, and **(*iv*)** to analyze the host status reaction of different botanical species and cultivars to *M. izalcoensis*. In the surveys using molecular markers we obtained: *M. exigua* (41.67%), *M. incognita* (33.33%), *M. paranaensis* (20.83%) and *M. izalcoensis* (4.17%), which can be used as unique tools in PCR multiplex in the characterization of *Meloidogyne* spp. from coffee. Mixed population species were also observed in 20.83% of the samples. The use of SCAR markers proved to be the most effective tool for accurately identifying *M. exigua* and mixed species. These surveys confirmed that *M. izalcoensis* has a restricted occurrence in the region where it was initially detected. Based on random amplified polymorphic DNA (RAPD) and amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers, low intraspecific variability was detected among *M. izalcoensis* populations from Africa, Vietnam, Brazil and El Salvador. Phylogenetically, all populations of *M. izalcoensis* from different locations (El Salvador, Benim, Tanzania, Vietnam and Brazil) grouped with 90% and 69% bootstrap support for COII and HSP90 markers, respectively, indicating that these regions are highly conserved for these species. In addition, both markers enabled the separation of *M. izalcoensis* populations from other important coffee *Meloidogyne* species, including *M. exigua*, *M. paranaensis*, *M. incognita*, *M. arabicida* and *M. lopezi*. In the resistance studies, most genotypes tested with resistance to other *Meloidogyne* spp. (Amphillo × Catuaí, Hybrid of Timor, IAPAR 59, IPR 99, IPR 100, IPR 102, IPR 103, IPR 105, IPR 106, IPR 107 and IPR 108) were susceptible to *M. izalcoensis*, except for the rootstock cv. Apoatã IAC 2258, which proved to be moderately resistant, with a genetic segregation for this character of 43.8%. In the host plant assays, the majority of the botanical species tested were classified as non-host or poor-host to *M. izalcoensis*: cotton, rice, white oat, black oat, ryegrass, corn, three grass species, two millet cultivars, two wheat cultivars, *Crotalaria breviflora*, *C. ochroleuca*, *C. spectabilis*, jack bean, gray mucuna bean and two rice grass species. Only tomato and bean were classified as suitable hosts, and *C. juncea* and soybean were classified as intermediate hosts. The plants identified as non-hosts or poor hosts can be used for intercropping or for crop rotation in Brazilian coffee orchards in regions infested by *M. izalcoensis*.

Keywords: *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, genetic variability, nematode management, resistance to nematodes.

Advisor – Juvenil Enrique Cares – Universidade de Brasília
Co-advisor – Regina Maria Dechechi G. Carneiro – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o maior produtor e exportador mundial de café (*Coffea arabica* L. e *C. canephora* Pierre), e também o segundo maior consumidor deste produto (Mapa, 2023). Dados da CONAB (2024) mostram que, na safra 2024, o país atingiu uma produção média de 58,81 milhões de sacas, sendo que 50% do café brasileiro é proveniente do estado de Minas Gerais. A região do Cerrado mineiro (Triângulo, Alto Parnaíba e Noroeste) foi responsável pela produção de 5,59 milhões de sacas (CONAB, 2024).

A cultura do cafeeiro está sujeita ao ataque de diferentes patógenos, tais como fungos, bactérias e nematoides, que reduzem a produtividade e causam prejuízos econômicos. Nos cafezais brasileiros, as espécies pertencentes ao gênero *Meloidogyne* (nematoide-das-galhas, NGs) destacam-se devido à sua ampla distribuição, aliada à sua alta capacidade reprodutiva e agressividade. Esse grupo é responsável por 15% da redução na produção total de café brasileira, em relação aos 20% de prejuízos causados por todos os fitonematoides (Godoy *et al*., 1997).

Entre as principais espécies do gênero *Meloidogyne* que afetam os cafezais brasileiros destacam-se, *Meloidogyne paranaensis* Carneiro *et al*., 1996, *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 consideradas as mais danosas e agressivas, e *M. exigua* Göldi, 1887 originalmente a mais disseminada em Minas Gerais (Oliveira, 2006). Esses nematoides causam destruição do sistema radicular e devido à alta agressividade podem ocasionar a morte da planta (Carneiro & Cofcewicz, 2008). O estudo realizado por Santos *et al*. (2017), na região sul de Minas Gerais, confirmou a espécie *M. exigua* amplamente distribuída nessa região e *M. paranaensis* restrita a um município (Três Pontas), enquanto *M. incognita* ocorreu em três municípios (Aguanil, Coqueiral e Três Pontas), sendo o primeiro relato dessa espécie parasitando cafeeiro na região do Sul do estado de Minas Gerais.

Recentemente, na cultura do cafeeiro, *Meloidogyne izalcoensis* Carneiro, Almeida,

Gomes & Hernandez,. 2005 (uma espécie não detectada previamente no Brasil teve seu primeiro relato parasitando o cafeeiro no município de Indianópolis-MG. Esta região no Triângulo Mineiro é considerada uma importante área produtora de café no país (Stefanelo *et al*., 2019). Devido ao relato relativamente recente, ainda não estão disponíveis estudos sobre a distribuição dessa espécie no Brasil e diversidade genética de *M. izalcoensis*. Também não existem pesquisas sobre resistência genética ou que mostrem a agressividade de *M. izalcoensis* em cultivares suscetíveis ou virulência a fontes de resistência previamente estudadas para outras espécies de *Meloidogyne.* Sabe-se, entretanto, que essa espécie difere bastante dos demais NGs parasitas do cafeeiro ocorrentes no Brasil e nas Américas (Carneiro *et al*., 2005a).

Neste contexto, a espécie *M. izalcoensis* representa uma potencial ameaça ao cultivo de café no estado de Minas Gerais, e a caracterização precisa de *Meloidogyne* spp. em diferentes áreas, especialmente nesse estado deve se tornar prioridade (Stefanelo *et al*., 2019). Todavia, é necessário que levantamentos em cafezais brasileiros sejam estendidos para outras regiões para auxiliar no mapeamento, delimitação de áreas com ocorrência de *Meloidogyne* spp. e estabelecimento de medidas preventivas que evitem a disseminação desses patógenos para outras áreas.

O uso de métodos bioquímicos, como eletroforese de isoenzimas, especialmente as esterases, e os métodos moleculares são importantes ferramentas que têm sido utilizadas na identificação correta das espécies dos NGs (Carneiro *et al*., 2016). Métodos moleculares, em especial os marcadores SCAR, têm sido utilizados para identificar algumas das principais espécies de *Meloidogyne*, tais como, *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949 (Zijlstra *et al*., 2000; Dong *et al*., 2001), *M. incognita* (Zijlstra *et al*., 2000; Dong *et al*., 2001; Randig *et al*., 2002; Meng *et al*., 2004), *M. enterolobii* Yang & Eisenback, 1983 (Tigano *et al*., 2010). O kit SCAR-café foi estabelecido para as principais espécies do cafeeiro ocorrentes no Brasil: *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* (Randig *et al*., 2002) e mais recentemente, esse kit foi

ampliado para as espécies presentes nas Américas: *M. arabicida* López & Salazar, 1989 e *M. izalcoensis* (Correa *et al*., 2013).

Os marcadores moleculares (RAPD e AFLP) têm se mostrado valiosos na discriminação da diversidade genética de espécies de *Meloidogyne*, com resultados significativos (Carneiro *et al*., 2004; Cofcewicz *et al*., 2004; 2005; Santos *et al*., 2012, 2017). Quinze populações de três raças de *M. exigua* presentes em cafeeiros do Brasil, Bolívia e Costa Rica e uma população obtida de seringueira no Brasil foram submetidas a estudos isoenzimáticos e técnicas moleculares. Foram detectados quatro fenótipos de esterases (E1, E2, E2a e E3) e três de malato-desidrogenases (N1, N1a e N2). Os primers SCAR multiplex-PCR possibilitaram a identificação de todas as populações de *M. exigua*. Além disso, verificou-se alto grau de polimorfismo intra-específico (25,9-59,6 %) em todas as populações estudadas. Estudos realizados por Muniz *et al*. (2009) detectaram uma população de *M. exigua* proveniente de Bom Jesus de Itabapoana-RJ altamente virulenta à cultivar IAPAR 59 (FR=165,7) e ao genótipo H 419-5-4-5-2 (FR = 396,2).

O desenvolvimento das técnicas moleculares também permitiu novas perspectivas quanto aos estudos filogenéticos de *Meloidogyne* spp. em regiões distintas do DNA ribossomal (Landa *et al*., 2008). As análises de regiões do DNA ribossomal têm sido usualmente uma das mais extensivas ferramentas moleculares empregadas na filogenia dos NGs (Hillis & Dixon, 1991; Landa *et al*., 2008). Essas análises têm permitido elucidar processos evolutivos com níveis profundos de divergência, sendo mais apropriados os espaçadores transcritos (ITS) dos genes 5,8S e 18S rRNA, e as regiões mais conservadas das sequências do gene 28S (Hillis *et al*., 1996). O DNA mitocondrial (mtDNA) é outra região que também tem sido explorada como marcador em estudos moleculares e filogenéticos de nematoides (Derycke *et al*., 2010). O gene da proteína de choque térmico 90 (Hsp90) também tem sido incluído em estudos filogenéticos de fitonematoides (Skantar & Carta, 2004; Mundo-Ocampo *et al*., 2008; Skantar *et al*., 2008). Estudos

de variabilidade genética e agressividade de populações de *M. paranaensis* e resistência genética do cafeeiro (*Coffea* spp.) a esse nematoide foram recentemente desenvolvidos por Santos *et al*. (2018).

Em relação ao uso de compostos químicos visando o controle de *Meloidogyne* spp. em lavouras cafeeiras no Brasil, atualmente estão registrados nematicidas formulados a partir de seis ingredientes ativos (terbufós, flusensulfona, cadusafós, fostiazato, fenamifós e fluoropyram) (Salgado *et al*., 2021). Todavia, deve-se levar em consideração que os nematicidas não erradicam os nematoides do solo e a adoção dessa medida não é recomendada quando os cafeeiros se encontram severamente depauperados (Salgado *et al*., 2021). Além disso, os nematicidas apresentam limitações, pelo seu alto custo e toxicidade, riscos a organismos não alvos e ao meio ambiente de maneira geral. Nesse aspecto, a resistência de plantas apresenta-se como uma das principais táticas de manejo dos nematoides, por ser mais eficaz em áreas infestadas. No entanto, devido a complexidade encontrada nas espécies de *Meloidogyne*, é necessário a identificação de fontes de resistência espécie-específicas (Starr *et al*., 2002) em diferentes cultivares de cafeeiro (Carneiro *et al*., 2004).

É necessário a realização de mais estudos que visem estabelecer a distribuição de *Meloidogyne* spp. em cafezais brasileiros, através da identificação e caracterização correta das espécies, sobretudo *M. izalcoensis,* recentemente detectada no Brasil. Além disso, abranger os conhecimentos relacionados a essa espécie, estudando a variabilidade genética de diferentes populações e, resistência de cafeeiros já selecionados para outras espécies de *Meloidogyne*, visando a resistência múltipla e a hospedabilidade de plantas intercalares e antagonistas a essa nova espécie de *Meloidogyne* de cafeeiro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a ocorrência e distribuição de *Meloidogyne* spp. em cafezais na região do Triângulo Mineiro, comparando os marcadores enzimáticos e moleculares; estudar a diversidade intraespecífica e as relações filogenéticas de diferentes populações de *M. izalcoensis* em relação a outros nematoides do cafeeiro; estudar também o espectro de resistência em cultivares de cafeeiro disponíveis no Brasil para *Meloidogyne* spp.; e analisar a habilidade de diferentes espécies e cultivares de plantas em hospedar *M. izalcoensis.*

2.2 Objetivos específicos

- Proceder um levantamento de *Meloidogyne* spp. no Triângulo Mineiro, comparar os marcadores enzimáticos (fenótipos de α esterase) e moleculares (PCR-SCAR), e delimitar áreas com a presença de *M. izalcoensis* nessa região.
- Estudar a diversidade e filogenia de populações brasileiras e estrangeiras de *M. izalcoensis*, usando marcadores RAPD, AFLP, ITS, D2D3, COII e Hsp90.
- Estudar o espectro de resistência de cultivares de cafeeiros disponíveis no Brasil: Apoatã IAC 2258, IAPAR 59, IPR 99, IPR 100, IPR 102, IPR 103, IPR 105, IPR 106, IPR 107, IPR 108, MG 0294 pL.1 R1, MG 0179 pL.3 R1 e MG 0179 pL.1 R1 a *M. izalcoensis.*
- Analisar a reação de hospedabilidade de diferentes espécies botânicas em hospedar *M. izalcoensis*, incluindo plantas de cobertura de cultivo intercalar e espécies botânicas conhecidas como antagonistas aos NGs e outros nematoides.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cultura do cafeeiro

3.1.1 Características botânicas

Os cafeeiros são árvores e arbustos perenes que pertencem à divisão das Fanerógamas, classe Angiosperma, subclasse Eudicotiledonea, ordem Rubiales, família Rubiaceae, subfamília Ixoroideae, tribo Coffeae DC. e sub-tribo Coffeinae (Bridson & Verdcourt, 1998; Souza *et al*., 2015). Antigamente, os cafeeiros pertenciam ao gênero *Psilanthus* Hook. f (20 espécies), porém foram incluídos no gênero *Coffea*, aumentando o número de espécies de 104 para 124 (Davis *et al*., 2006; 2010; 2011; Villain *et al*., 2018).

O gênero *Coffea* é agrupado em quatro secções: *Argocoffea*, *Eucoffea*, *Mascarocoffea* e *Paracoffea* (Chevalier, 1942). A seção *Eucoffea* reúne as espécies mais importantes de cafeeiros, como por exemplo, *C. arabica* e *C. canephora* (Guerreiro Filho *et al*., 2007). Esta seção é também dividida em cinco subseções: *Erytrocoffea*, com frutos de coloração vermelha, incluindo as espécies *C. arabica*, *C. canephora* e *C. congensis* Froehner; *Melanocoffea*, com frutos pretos, por exemplo, *C. stenophylla* G. Don; *Nanocoffea*, com espécies de plantas pequenas e arbustivas, como *C. humilis* A. Chev. e *C. brevipes* Hiern; *Pachycoffea*, com espécies arbóreas, como *C. liberica* Hiern; e *Mozambicoffea*, como as espécies *C. zanguebarie* Lour., *C. racemosa* Ruiz & Pav., *C. salvatrix* Swynnerton & Phillipson, *C. eugenioides* S. Moore (Chevalier, 1947; Berthaud & Charrier, 1985).

Os cafeeiros possuem madeira dura e densa, dois tipos de ramificação (plagiotrópica e ortotrópica), inflorescências axilares pareadas, calículo presente e geralmente visível, cálice truncado a ondulado, ou levemente lobado, flores hermafroditas, corolas brancas ou raramente róseas, e botões florais com pétalas sobrepostas e contorcidas para a esquerda (Souza *et al*., 2015). Essas plantas caracterizam-se por apresentar fruto simples, derivado de um ovário,

classificado como drupáceo, carnoso e contém um caroço (Melo & Sousa, 2011). O fruto contém duas sementes plano-convexas, sulcadas longitudinalmente em sua face plana, que constituem os grãos característicos do café (Davis *et al*., 2006; Maurin *et al*., 2007). Morfologicamente, o fruto possui um pedúnculo curto, oval e elíptico, com superfície lisa e brilhante, apresentando coloração verde quando imaturo, e podendo evoluir para vermelho ou amarelo após a maturação, o que varia de acordo com a cultivar (Carvalho & Mônaco, 1965).

Apesar do gênero *Coffea* apresentar 124 espécies, apenas *C. arabica* e *C. canephora* são cultivadas em escala global. Todas as espécies de café são diploides, ou seja, possuem 22 cromossomos somáticos (2n = 2x = 22), exceto *C. arabica*, que é a única espécie tretraploide do gênero, com 44 cromossomos (2n = 4x = 44) (Villain *et al*., 2018). O cafeeiro é um arbusto perene, que sob crescimento livre pode chegar a 4–6 m de altura para *C. arabica* e 8-12 m para *C. canephora*, e o amadurecimento dos frutos em 7–9 (*C. arabica*) a 9–11 (*C. canephora*) meses a partir da data de floração, dependendo da variedade e ambiente (Lashermes *et al*., 2008).

3.1.2. Origem e adaptação das principais espécies de café

3.1.2.1 *Coffea arabica*

Considerada a principal espécie de café produzida no mundo, *Coffea arabica* L. é originária da região montanhosa e de clima ameno da Etiópia, sendo resultante do cruzamento natural de duas espécies: a espécie silvestre *Coffea eugenioides* S. Moore (diploide) e *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner (diploide) (Lashermes *et al*., 1999, 2008; Alves *et al*., 2019). Apresenta apenas um caule ortotrópico, enquanto são múltiplos para *C. canephora* (Villain *et al*., 2018). Caracteriza-se por ser autofértil e autocompatível, sendo 90% ou mais de seus grãos formados por autofecundação (autogamia) e os remanescentes (10%) oriundos da polinização cruzada (alogamia) por outras plantas, favorecida pela gravidade, vento e insetos,

principalmente as abelhas (Fazuoli *et al*., 1991, 2000; Medina Filho & Bordignon, 2007). As cultivares comerciais do cafeeiro arábica apresentam pouca variabilidade genética e são comercialmente propagadas por sementes (Souza *et al*., 2015; Ferrão *et al*., 2021). Isso possibilita a manutenção das características genéticas desejáveis economicamente, mas, por outro lado, permite que essa espécie apresente maior suscetibilidade a pragas e doenças (Ferrão *et al*., 2010).

3.1.2.2 *Coffea canephora*

O cafeeiro da espécie *C. canephora*, conhecido como café Conilon, é originária das florestas baixas da África equatorial, sendo cultivado em países da África Central e Ocidental, sudeste da Ásia e América do Sul (Souza *et al*., 2015). No Brasil, as variedades de *C. canephora* que apresentam maior porte e vigor também são chamadas de 'Robustas', em contraste com as mais compactas, que são chamadas de 'Conilon' (Souza *et al*., 2015). Logo, o nome "robusta" deriva da expressão rusticidade e pelo fato de apresentar resistência a doenças das plantas (Ferrão *et al*., 2007).

Coffea canephora produz grãos menos aromáticos, com elevado teor de cafeína, e que quando torrados produzem uma bebida diferenciada (Souza *et al*., 2004). Possui natureza alógama e alta diversidade fenotípica em relação a algumas características da planta, por exemplo, ciclo de maturação, tamanho do fruto e da semente, entre outros (Gonçalves *et al*., 2021). Por apresentar polinização cruzada, possui grande variabilidade genética, e por isso não se recomenda utilizar sementes de uma única planta matriz, ainda que tenha características desejáveis (Melo & Sousa, 2011). Essa característica de autoincompatibilidade faz com que as populações dessa espécie, inclusive cultivares, sejam extremamente desuniformes quando obtidas por sementes, em função da elevada heterozigose apresentada pelas plantas individuais, gerando ampla segregação na descendência, como por exemplo, a presença de frutos em diferentes graus de maturação (Melo & Sousa, 2011).

Todavia, vale ressaltar que variabilidade genética é uma ferramenta fundamental para os programas de melhoramento na cultura do café (Valois *et al*., 2001). A grande variabilidade entre e dentro das populações naturais de *C. canephora* faz dessa espécie uma excelente fonte de alelos para o desenvolvimento de novas cultivares, bem como, para o melhoramento de *C. arabica* (Souza *et al*., 2015). De acordo com Lashermes *et al*. (2000), acessos do Híbrido de Timor e *C. canephora* representam valorosas fontes de resistência para o melhoramento genético, visando resistência aos NGs e à ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. & Broome). Por esses motivos, embora *C. canephora* possa ser multiplicada por sementes, é preferencialmente propagada por estacas obtidas de plantas matrizes superiores, mantidas em jardins clonais (Padilha *et al*., 2007). A propagação vegetativa de plantas selecionadas é de grande interesse, como forma de uniformizar as lavouras, para a obtenção de "cultivares clonais" (Melo & Sousa, 2011). Jardins clonais são campos de produção de estacas para a formação de mudas das variedades clonais e que devem ser implantados visando a máxima produção de ramos ortotrópicos que se transformarão em mudas (Ferrão *et al*., 2012).

3.1.3 Importância nutricional, social e econômica da cafeicultura no Brasil

O café é uma planta exótica no Brasil que apresenta relevante importância econômica e social, devido à grande capacidade de geração de empregos e distribuição de renda na agricultura (Oliveira *et al*., 2021). Do ponto de vista alimentício, o café é uma bebida considerada saudável e rica em propriedades nutricionais (Encarnação & Lima, 2003). O grão possui de 1 a 2,5% de cafeína, é rico em antioxidantes e outras substâncias biologicamente ativas (César *et al*., 2013). Além disso, é rico em sais minerais (3 a 5%), como Potássio, Magnésio, Cálcio, Sódio, Ferro, Manganês e Cobre, bem como contém quantidade de lipídeos (10 a 20%), açúcares (35 a 55%) e aminoácidos (2%), substâncias importantes como fontes de energia, e também ácido clorogênico e niacina ou vitamina PP – vitamina do complexo B (0,5%) (Encarnação & Lima, 2003).

A cultura do café foi introduzida no Brasil no início do século XVIII, em 1727, proveniente de Caiena, Capital da Guiana Francesa, pelo sargento-mor Francisco de Mello Palheta, que introduziu pequena quantidade de sementes e mudas na região Norte do País, em Belém, no estado do Pará, iniciando assim o cultivo de café no Brasil (Rufino, 2006; Mendes *et al*., 2007a). Porém, o cafeeiro não apresentou boa adaptação na região amazônica, devido às condições naturais que não eram favoráveis (Nagay, 1999). O café foi então levado para o Maranhão e posteriormente para o Rio de Janeiro, onde se difundiu rapidamente, sendo considerada por muito tempo, a cultura principal no estado. O cultivo do cafeeiro alcançou depois os estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná (Mendes *et al*., 2007a). Após a migração da cultura para as regiões sudeste e sul, a cafeicultura evoluiu rapidamente e passou a ocupar um relevante espaço na economia nacional (Rufino, 2006).

Atualmente, os países que apresentam maior produção de café no mundo são Brasil, Vietnã e Colômbia, respectivamente, enquanto a União Européia e os Estados Unidos da América são os maiores consumidores e importadores (FAO, 2021; Agência Gov, 2024). A cafeicultura é uma atividade agrícola que contribui expressivamente para o agronegócio brasileiro. Estima-se o envolvimento de cerca de 290 mil produtores em aproximadamente 1.900 municípios, que se distribuem em 15 estados: Acre, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rondônia e São Paulo (Brasil, 2016; Mapa, 2022). A erradicação de áreas pouco produtivas, investimento em novas tecnologias, características climáticas favoráveis e manejo dos efeitos fisiológicos foram fatores importantes que promoveram a melhoria no incremento da produtividade do café na safra 2020 (CONAB, 2020). Na safra 2024, a produção do café arábica foi estimada em 42,10 milhões de sacas de café beneficiado, e a produção do café conilon estimada em 16,7 milhões de sacas (CONAB, 2024). Nesse período, a área destinada à cafeicultura nacional foi de 1,9 milhões de hectares para lavouras em produção

(CONAB, 2024).

Nesse cenário, Minas Gerais destaca-se como maior produtor brasileiro, possuindo maior área em produção e formação de café, com 1,10 milhões de hectares na safra 2024, correspondendo a 58,37 % da área ocupada com café arábica em âmbito nacional (CONAB, 2024). O café é o principal produto da pauta de exportações do agronegócio de Minas Gerais, contribuindo para a geração de emprego e renda para agricultores mineiros (Mesquita *et al*., 2016). No *ranking* de produtividade, o estado Espírito Santo (principal produtor de conilon) ocupa o segundo lugar, seguido por São Paulo (CONAB, 2024).

3.2 Cultivares de cafeeiro

No Brasil, diferentes programas de melhoramento genético desenvolvidos pelas instituições que pesquisam café no Brasil têm desempenhado papel importante no desenvolvimento de cultivares de cafeeiros com vários atributos positivos de interesse dos produtores rurais e do mercado, entre os quais, maior produtividade, tolerância e resistência a pragas e doenças, produção de grãos com alta qualidade e plantas mais adaptadas às condições climáticas das diferentes regiões cafeeiras do país (Guerra *et al*., 2021). Um dos principais desafios é desenvolver cultivares de café arábica com produtividades superiores às cultivares tradicionais, como as dos grupos Catuaí e Mundo Novo, que são as mais cultivadas no Brasil (Chalfoun & Reis, 2010). Elas apresentam alta produtividade e ampla adaptabilidade no país (Sera *et al*., 2017).

Na escolha da cultivar a ser implementada no empreendimento rural devem-se levar em consideração alguns aspectos, como: porte e arquitetura da planta, índices de produtividade, qualidade de bebida, tolerância a pragas e doenças, adaptabilidade às condições climáticas do local, além do nível tecnológico a ser adotado (Mesquita *et al*., 2016). Atualmente, no Brasil 171 cultivares estão registradas no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA , em que cada uma reúne uma série de características desejáveis (Mesquita *et al*., 2016;

MAPA, 2024).

3.2.1 Amphillo

O cafeeiro Amphillo representa um grupo de plantas originadas de sementes coletadas em Amphillo, na Etiópia, onde é amplamente cultivado (Fazuoli, 1986). Inicialmente foi estudado no CATIE (Centro Agronômico Tropical de Investigação e Educação Superior) (Fazuoli, 1986) e posteriormente, mudas foram introduzidas no Brasil em 1953 pelo IAC (Instituto Agronômico de Campinas), onde foi realizado um experimento para avaliar suas características gerais, resultando na seleção da melhor progênie identificada como IAC 1167-19, que apresenta características agronômicas desejáveis (Salgado *et al*., 2022).

Em 2004, progênies F3 dos cruzamentos Catuaí Vermelho × Amphillo MR 2-161 e Catuaí Vermelho × Amphillo MR 2-474 foram introduzidos no Banco Ativo de Germoplasma de Café da EPAMIG (Banco Ativo de Germoplasma – BAG) no Campo Experimental de Patrocínio, MG, denominados MG 0179 e MG 0185, respectivamente (Salgado *et al*., 2022). De acordo com Salgado *et al*. (2014), as linhagens 16-6-I, descendentes de MG 0179-1-R1, e 29-2-I, descendentes de MG 0185-2-R2, e outras, foram indicadas como genótipos promissores segundo avaliações quanto à produção dos primeiros frutos, vigor vegetativo e provável resistência a *M. paranaensis*. Por exemplo, Peres *et al*. (2017) confirmaram a resistência a *M. paranaensis* em condições controladas de casa de vegetação. Ainda nessa mesma propriedade, surgiram as cultivares MGS Guaiçara (progênie MG 0179-1-R1-16- 6-I-10-7-II) e MGS Vereda (progênie MG 0185-2-R2-29-2-I-11-7-II), que são resistentes a *M. paranaensis* (Salgado *et al*., 2022).

Peres e colaboradores (2017) avaliaram 18 genótipos de *C. arabica* pertencentes ao Banco de Germoplasma da EPAMIG – Lavras MG e observaram que seis acessos pertencentes ao grupo Amphillo, cinco resultantes do cruzamento entre Catuaí Vermelho × Amphillo MR 2-161 e um resultante do cruzamento de Catuaí Vermelho × Amphillo MR 2-474 foram

resistentes a *M. incognita* raça 1. Em relação à resistência a *M. paranaensis*, quatro acessos resultantes do cruzamento de Catuaí Vermelho × Amphillo MR 2-161 e um acesso resultante do cruzamento de Catuaí Vermelho × Amphillo MR 2-474 foram resistentes a esse nematoide.

3.2.2 Híbrido de Timor

O Híbrido de Timor é resultante de um cruzamento natural entre *C. arabica* e *C. canephora*, identificado por volta de 1917, proveniente de uma plantação de *C. arabica* no Timor-Leste (Mendes *et al*., 2007b). Pesquisadores da Universidade Federal de Viçosa iniciaram os estudos dessa população quando o clone CIFC 4106 foi introduzido no Departamento de Fitopatologia da UFV, em 1976, com registro de UFV 516, que em conjunto com a EPAMIG, vem sendo estudado até os dias atuais (Mendes *et al*., 2007b). Por ser considerado um genótipo de interesse para o melhoramento genético do cafeeiro como fonte de resistência à ferrugem, antracnose, bacterioses e *M. exigua*, tem sido utilizado para a obtenção de várias populações de cafeeiros resistentes à ferrugem, como no caso do Catimor, Sarchimor, Cavimor, Cachimor, Blumor e outros (Mendes *et al*., 2007b).

3.2.3 Mundo Novo (Cultivares do Grupo Mundo Novo)

É resultante de um cruzamento natural entre as cultivares Sumatra e Bourbon Vermelho, encontrada no município paulista de Mineiros do Tietê (Fazuoli *et al*., 2008). Sementes de um desses cafeeiros foram plantadas no município de Mundo Novo (hoje Urupês-SP), onde foram selecionadas as plantas matrizes que deram origem à cultivar Mundo Novo (Fazuoli *et al*., 2008). Foram realizadas seleções de várias plantas matrizes entre os anos de 1943 a 1952, e posteriormente, seleções entre e dentro das progênies, procurando-se eliminar vários dos defeitos observados na população (Fazuoli *et al*., 2008). Progênies selecionadas, então denominadas Mundo Novo, foram multiplicadas para serem distribuídas aos agricultores a partir de 1952, e novas seleções foram liberadas pelo IAC a partir de 1977 (Fazuoli *et al*.,

2008). No entanto, as cultivares do grupo Mundo Novo têm a desvantagem de serem suscetíveis à ferrugem, a nematoides e outras doenças (Pereira & Baiao, 2015), e o porte elevado dessas plantas dificulta a colheita mecanizada.

3.2.4. Catuaí (Cultivares do Grupo Catuaí)

O termo Catuaí, em tupi-guarani, tem significado de "muito bom" (Fazuoli *et al*., 2008). Os cruzamentos realizados em 1949 entre as cultivares de *C. arabica* Caturra Amarelo IAC 476-11 e Mundo Novo IAC 374-19, seguidas de diversas seleções, viriam a gerar em 1972 as cultivares do grupo Catuaí, cujas características incorporam rusticidade, alta produção, porte reduzido e boa qualidade de bebida (Carvalho & Mônaco, 1972). O cruzamento inicialmente realizado no IAC em 1949 tinha o objetivo de transmitir os alelos responsáveis pelo porte reduzido de Caturra Amarelo (CtCt) para a cultivar Mundo Novo (Carvalho & Monaco, 1972). Na progênie H2077-2-5 selecionaram-se plantas com frutos de cor vermelha e cor amarela, dando origem às cultivares Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo. Assim como as cultivares do grupo Mundo Novo, as do grupo Catuaí também são sucetíveis à ferrugem e a nematoides (Pereira & Baiao, 2015).

3.2.4.1 Catuaí amarelo 62: Apresenta porte baixo, frutos de cor amarela, maturação dos frutos média a tardia e desuniforme, sementes de tamanho médio, internódios curtos, ramificação secundária abundante, bienalidade de produção, peneira média acima de 16, ótima qualidade de bebida, possui suscetibilidade à ferrugem, sendo indicada para plantios adensados (Ferrão *et al*., 2009; IAC, 2022). É uma das cultivares mais plantadas no Brasil e possui 75% da genética do café Bourbon em sua formação (IAC, 2022).

3.2.4.2 Catuaí vermelho IAC 99: Apresenta porte baixo, frutos de cor vermelha de maturação desuniforme média a tardia, internódios curtos, ramificação secundária abundante, maturação

dos frutos média e desuniforme, bienalidade de produção, peneira média acima de 16, ótima qualidade de bebida, possui suscetibilidade à ferrugem, sendo indicada para plantios adensados (Ferrão *et al*., 2009; IAC, 2022). É uma das cultivares mais plantadas no Brasil e também possui 75% da genética do café Bourbon em sua formação (IAC, 2022).

3.2.4.3 Catuaí vermelho IAC 144: Apresenta porte baixo, frutos de cor vermelha de maturação desuniforme média a tardia, internódios curtos, ramificação secundária abundante, bienalidade de produção, peneira média acima de 16, ótima qualidade de bebida, possui suscetibilidade à ferrugem, sendo indicada para plantios adensados (Ferrão *et al*., 2009; IAC, 2022). É uma das linhagens da cultivar Catuaí mais plantadas no Brasil e possui 75% de participação do café Bourbon em sua formação (IAC, 2022).

3.2.5. Cv. Apoatã IAC 2258

Os cafeeiros da cultivar 'Apoatã IAC 2258' se caracterizam por serem multicaules, muito vigorosos e possuírem robusto sistema radicular, daí o nome dado à cultivar Apoatã, palavra que em tupi-guarani significa "raiz forte" (Fonseca *et al*., 2007). Apresenta ainda resistência aos nematoides *M. exigua*, *M. paranaensis* e a algumas raças de *M. incognita*, com sistema radicular vigoroso e abundante (Carneiro & Santos, 2022; IAC, 2022).

3.2.6. 'ES8161 Goytacá' (Clone 14)

Recentemente, o clone 14 foi lançado pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) como cultivar denominada 'ES8161 Goytacá' (Lima *et al*., 2022). Por apresentar polinização aberta/natural, os progenitores são desconhecidos. Essa cultivar caracteriza-se pela rusticidade no campo e tolerância à seca, conseguindo manter a produção regular e constante mesmo em condições adversas de déficit hídrico e temperaturas elevadas. Segundo Pinheiro *et al*. (2005) o clone 14 apresentou crescimento radicular com

maior profundidade quando comparado a outros dois clones sensíveis ao estresse, onde as raízes foram encontradas mais próximas à superfície. Clones de *C. canephora* com melhor rendimento e estabilidade durante a seca, ou com capacidade de sobreviver a episódios de seca em situações mais restritas do uso da água, podem apresentar grande valor para a cafeicultura (Vinecky *et al*., 2008). No entanto, em função da não possibilidade de indicação do genótipo *per si*, devido a autoincompatibilidade genética da espécie, essa cultivar é indicada como porta-enxerto, sendo recomendada preferencialmente para áreas infestadas ou com histórico de NGs, por apresentar potencial de resistência múltipla às espécies *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranensis* em cafeeiros (Carneiro *et al*., 2009; Lima *et al*., 2015; Lima *et al*., 2022). Para a implantação de lavouras, mudas da cultivar ES8161 Goytacá são propagadas por estaquia e em seguida devem ser selecionados os materiais genéticos que serão enxertados (copa) na cultivar porta-enxerto (Lima *et al*., 2022).

3.2.7 IAC 125 RN

A cultivar 'IAC 125 RN' é originada do cruzamento de 'Villa Sarchi' CIFC H361/4 (*Coffea arabica*) e 'Híbrido de Timor CIFC 832/2' e possui resistência a *M. exigua* e a ferrugem (Fazuoli *et al*., 2018; Salgado *et al*., 2021). Apresenta alta produtividade, boa qualidade de bebida, porte baixo, internódios curtos, brotos novos de coloração verde, frutos grandes, vermelhos e de maturação precoce a média, sementes com peneira média 17, resistência às duas raças do nematoide *M. exigua* e à ferrugem (Salgado *et al*., 2021; IAC, 2022). É uma cultivar exigente em nutrição, mais sensível à seca do que a cultivar Catuaí Vermelho IAC 144, sendo indicada para solos com alta fertilidade, cultivos adensados, particularmente para cultivos irrigados, e regiões com altitudes mais elevadas e clima ameno, adequadas para o cultivo de *C. arabica*, sem resgistro de períodos secos acentuados (Salgado *et al*., 2021; IAC, 2022).

3.2.8 IAPAR 59

A cultivar ‘IAPAR 59’ é originada do cruzamento de ‘Vila Sarchi’ CIFC 971/10 e Híbrido de Timor’ CIFC 832/2 e possui resistência a *M. exigua* e a ferrugem (Salgado *et al*., 2005; Muniz *et al*., 2009; Salgado *et al*., 2021). Caracteriza-se por apresentar produtividade elevada, boa qualidade de bebida, porte e diâmetro de copa inferiores à ‘Catuaí vermelho’, brotos de cor predominante bronze, com pequeno percentual de brotos verdes, frutos vermelhos, maturação precoce a média, peneira média acima de 16, é preferencialmente indicada para regiões mais frias, de maior altitude e chuvosas, e para solos mais férteis, devendo ser plantada apenas nos sistemas de plantio andensado ou superadensado (Ferrão *et al*., 2009; Salgado *et al*., 2021).

3.2.9 IPR 99

IPR 99 é derivada do cruzamento entre “Villa Sarchi CIFC 971/10” e “Híbrido de Timor CIFC 832/2” (híbrido interespecífico entre *C. arabica* e *C. canephora*), realizado no Centro de Pesquisa de Ferrugem do Cafeeiro – CIFC) em Portugal, onde foi nomeado HW 361 (Sera *et al*., 2013a). Essa cultivar caracteriza-se por possuir porte baixo, qualidade de bebida especial, alta produtividade nas regiões cafeeiras mais frias e mais quentes do Paraná, apresenta resistência à mancha angular, resistência parcial à ferrugem, maturação dos frutos semi-tardia, e em condições de campo, resistência parcial à necrose e mumificação de frutos jovens (Sera *et al*., 2005; Sera *et al*., 2013a). Além disso, possui resitência a *M. exigua* (Barrantes *et al*., 2020) e resistência parcial em baixo nível à raça 1 de *M. incognita* (Kanayma *et al*., 2009).

3.2.10 IPR 100

A cultivar ‘IPR 100’ é derivada do cruzamento de Catuaí (“Catuaí” × genótipo de café da série ‘BA-10’) e *C. liberica* Hiern, e possui resistência a *M. incognita*, *M. paranaensis* (Salgado *et al*., 2021) e *M. exigua* (Barrantes *et al*., 2020). Apresenta alta qualidade de bebida, alta produtividade, rusticidade, porte médio, frutos maduros de coloração vermelha, maturação tardia,

adaptação a altas temperaturas, baixas altitudes e solos pobres, sendo recomendada para áreas menos sujeitas a geadas, mesmo podendo apresentar altas produtividades em regiões mais frias (Salgado *et al*., 2021).

3.2.11 IPR 102

IPR 102 é derivada do cruzamento entre plantas de "Catuaí" e "Icatu", realizado no IAC, em 1972. Essa cultivar apresenta alta produtividade, ampla adaptabilidade, rusticidade e difere das cultivares Catuaí por ser resistente ao crestamento bacteriano, moderadamente resistente à ferrugem (Sera *et al*., 2017) e resistente a *M. exigua* (Barrantes *et al*., 2020).

3.2.12 IPR 103

A cultivar 'IPR 103' é derivada do cruzamento entre cafeeiros dos grupos 'Catuaí' e 'Icatu', realizado pelo IAC em 1972, no qual foram incorporadas algumas características por introgressão de genes de *C. canephora* de 'Icatu' (Sera *et al*., 2013b; Oliveira *et al*., 2021). Em 1977, foi introduzido pelo IAPAR sob a denominação de IAC H 9878-EP 187 c.582, que passou a ser denominada IAPAR 77054, e por meio do método genealógico, foi selecionada a progênie IAPAR 77054-40, que deu origem à progênie F_5 IAPARLF 77054-40-10 (Fazuoli *et al*., 2008). Essa cultivar caracteriza-se por apresentar elevada produtividade, rusticidade, porte médio similar a 'Catuaí', alto vigor vegetativo, grande ramificação plagiotrópica secundária, rusticidade, sementes com tamanho médio, maturação mais tardia que 'Catuaí' e pouco desuniforme, frutos maduros com coloração vermelha, brotos de cor bronze-claro, moderada resistência à ferrugem do café e resistência à necrose e mumificação dos frutos (antracnose) é recomendada para sistemas de plantio semi-densos e densos, em áreas de temperaturas mais baixas e mais altas com média anual entre 19 e 23 ºC (Sera *et al*., 2013b; Oliveira *et al*., 2021). No entanto, apesar de possuir ampla adaptabilidade a várias regiões cafeeiras, é mais indicada para regiões mais quentes (Oliveira *et al*., 2021). Possui resistência a *M. exigua* (Barrantes *et*

al., 2020) e resistência parcial em baixo nível à raça 1 de *M. incognita* (Kanayma *et al*., 2009).

3.2.13 IPR 105

A cultivar 'IPR 105' é derivada do cruzamento entre 'Catuaí Vermelho IAC 81' e progênie do cruzamento entre 'Catuaí Vermelho IAC 81' × IAC 1110-8 (BA-10) realizado pelo IAC, e foi desenvolvida pelo IDR-Paraná (Carvalho *et al*., 2022). Caracteriza-se por apresentar porte baixo, diâmetro da copa médio, folhas jovens (brotos) com coloração bronze, frutos maduros vermelhos, grão de tamanho médio, vigor vegetativo alto, qualidade de bebida regular, maturação tardia, produtividade muito alta, parcialmente resistente à ferrugem, mancha-aureolada e à mancha de *Phoma*.

3.2.14 IPR 106

A cultivar 'IPR 106' apresenta alta produtividade, boa qualidade de bebida, porte médio, frutos maduros de coloração amarela, maturação tardia e resistência a *M. paranaensi*s e *M. incognita*, sendo indicada para regiões aptas ao cultivo de café arábica com temperatura média anual entre 20 e 23 ºC (Sera *et al*., 2020; Salgado *et al*., 2021).

3.2.15 IPR 107

A cultivar 'IPR 107' é derivada do cruzamento entre 'Iapar 59' e 'Mundo Novo IAC 376-4' realizado pelo IDR-PR (Carvalho *et al*., 2022). Esta cultivar apresenta porte médio, qualidade superior e alto rendimento em várias regiões cafeeiras, precocidade no amadurecimento, total resistência à ferrugem (Sera & Sera, 2013) e também resistência a *M. exigua* (Barrantes *et al*., 2020).

3.2.16 IPR 108

A cultivar 'IPR 108' é derivada do cruzamento entre 'Iapar 59' e 'Catuaí Vermelho IAC

99’ x ‘Icatu de porte baixo’, realizado pelo IDR-Paraná (Carvalho *et al*., 2022). Apresenta porte baixo, alto vigor vegetativo, qualidade de bebida diferenciada, diâmetro grande da copa, folhas jovens com coloração verde e bronze, fruto de coloração amarela, grão grande e época de maturação tardia, parcialmente resistente à ferrugem, e suscetível a *M. paranaensis* e *M. incognita* (Carvalho *et al*., 2022).

3.3 *Meloidogyne* spp. **na cultura do cafeeiro**

Os nematoides são organismos pseudocelomados, não segmentados, de simetria bilateral, ovíparos, dioicos (machos e fêmeas), com sistemas digestivo e reprodutivo completos, sendo encontrados na água, solo, matéria orgânica em decomposição, se alimentando de organismos como bactérias, fungos, nematoides e, parasitando plantas (fitoparasitas) e animais (zooparasitas) (Cares *et al*., 2012). Os fitoparasistas constituem-se fator limitante à produtividade agrícola de várias culturas, dentre elas o café, podendo acarretar sérios prejuízos econômicos.

Os nematoides pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, também conhecidos como nematoides-das-galhas, é considerado o grupo de fitonematoides mais importante em todo o mundo, devido à sua vasta distribuição, ampla gama de hospedeiros e danos severos que causam às principais culturas de importância econômica (Jones *et al*., 2013). Provavelmente, se trata dos patógenos mais prejudiciais que afetam o café, especialmente na América Latina (Villain, *et al*., 2018). O café é afetado por *Meloidogyne* spp. durante todo seu ciclo no campo, comprometendo o desenvolvimento da raiz e podendo ocasionar a morte das plantas (Salgado *et al*., 2021).

Os NGs mais bem-sucedidos na natureza, caracterizam-se por serem endoparasitas sedentários, passando grande parte da sua vida alimentando-se de células da raiz no mesmo local (sítio de alimentação) (Salgado & Rezende, 2010; Salgado *et al*., 2011). Esses, pertencem ao Filo Nematoda, classe Chromadorea, ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Infraordem

Tylenchomorpha, Superfamília Tylenchoidea e Família Meloidogynidae (Karssen & Moens, 2006). São cosmopolitas, polífagos e possuem dimorfismo sexual, caracterizado pela presença de fêmeas obesas e machos vermiformes (Castagnone-Sereno *et al*., 2013; Ravichandra, 2014).

O gênero *Meloidogyne* possui cerca de 100 espécies descritas (Karssen *et al*., 2013), e até o momento, 18 foram relatadas como parasitas do café (Carneiro & Cofcewicz, 2008; Villain *et al*., 2018; Le *et al*., 2019; Trinh *et al*., 2019). Essas podem ser separadas em três categorias: maior importância/prejudiciais e mais difundidas (*M. exigua*, *M. paranaensis* e *M. incognita*); menor importância e menos difundidas (*M. africana* Whitehead, 1960; *M. arabicida* López & Salazar, 1989; *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949; *M. coffeicola* Lordello & Zamith 1960; *M. daklakensis* Trin *et al*., 2019; *M. enterolobii* Yang & Eisenback, 1983; *M. hapla* Chitwood, 1949; *M. izalcoensis*; *M. kikuyensis* De Grisse, 1961; *M. lopezi* Humphreys-Pereira *et al*., 2014; *M. megadora* Whitehead, 1968; e *M. moensi* Le *et al*., 2019); e espécies que não parasitam o café, mas que erroneamente foram relatadas parasitando cafeeiros: *M. javanica* (Treub 1885) Chitwood, 1949; *M. inornata* Lordello, 1956; e *M. konaensis* Eisenback, Bernard & Smitt, 1994) (Carneiro & Cofcewicz, 2008; Monteiro *et al*., 2016; Carneiro & Santos, 2022).

3.3.1 *Meloidogyne exigua*

Meloidogyne exigua é a espécie tipo do gênero, a qual foi relatada pela primeira vez em cafezais do Rio de Janeiro pelo naturalista Emilio Göldi em 1887. É o NGs com maior distribuição mundial na cultura do café (Carneiro & Santos, 2022), encontrando-se amplamente distribuído no Caribe e nas Américas do Sul e Central (Campos & Villain, 2005; Carneiro & Cofcewicz, 2008; Villain *et al*., 2013). É a espécie mais disseminada, predominando em todos os principais estados produtores de café no Brasil, seguida por *M. incognita* e *M. paranaensis* (Salgado *et al*., 2011). No país, as perdas de produtividade são estimadas em até 45% (Barbosa *et al*., 2004). Os nematoides da espécie *M. exigua* geralmente causam numerosas galhas

pequenas, arredondadas ou alongadas, principalmente em raízes novas, e as massas de ovos geralmente não são expostas (Carneiro & Santos, 2022).

3.3.2 *Meloidogyne incognita*

As espécies *M. incognita* e *M. paranaensis* são as que causam mais prejuízos ao cafeeiro devido a agressividade, grande número de hospedeiros e alta persistênica no solo, levando à destruição do sistema radicular e à morte da planta (Salgado *et al*., 2011, 2021). O primeiro relato de *M. incognita* em cafeeiro na espécie *C. arabica* foi realizado por Chitwood & Berger (1960) na Guatemala. No Brasil, a primeira ocorrência desse nematoide em cafeeiros foi observada no município de Pindorama, no estado de São Paulo por Lordello & Mello Filho (1970). Embora essa espécie ocorra em várias áreas de cultivo de café em todo o mundo, atualmente o Basil é o único país da América Latina em que ocorre a ampla distribuição de *M. incognita* no cafeeiro, devido aos sintomas mais graves e às numerosas identificações confiáveis baseadas em marcadores enzimáticos e moleculares (Campos & Villain, 2005; Carneiro & Cofcewicz, 2008; Villain *et al*., 2018; Carneiro & Santos, 2022).

3.3.3 *Meloidogyne paranaensis*

Meloidogyne paranaensis é considerada uma das principais espécies de NGs que parasitam a cultura do café, devido à sua importância econômica no Brasil (Carneiro *et al*., 1996, Carneiro & Santos, 2022). Foi descrita como nova espécie por Carneiro *et al*. (1996), a partir do conhecido *Meloidogyne* biótipo IAPAR ou raça 5 de *M. incognita*, cuja ocorrência até então era limitada aos estados do Paraná e São Paulo. Sua distribuição é restrita às Américas, incluindo o Brasil, Peru, Guatemala, Havaí (Campos & Villain, 2005; Villain *et al*., 2018) e México (López-Lima *et al*., 2015). No Brasil, tem sido reportada principalmente nos estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais (Carneiro *et al*., 1996; Castro & Campos, 2004; Campos & Villain, 2005; Souza *et al*., 2014; Salgado *et al*., 2015; Villain *et al*., 2018).

As espécies *M. paranaensis* e *M. incognita* são as mais danosas ao cafeeiro por sua agressividade, podendo levar a planta à morte em decorrência da destruição do sistema radicular (Campos & Villain 2005; Salgado & Rezende, 2010; Salgado *et al*., 2011). Os sintomas em plantas infectadas por *M. paranaensis* incluem rachaduras no tecido radicular, especialmente na raiz principal, manchas necróticas ao longo das raízes onde as fêmeas estão localizadas, clorose foliar, crescimento reduzido e morte, mas não há a formação de galhas típicas do NGs (Carneiro *et al*., 1996).

3.3.4 *Meloidogyne izalcoensis*

Meloidogyne izalcoensis foi primeiramente descrita por Carneiro *et al*. (2005a) parasitando cafeeiros na região do vulcão Izalco, Sonsonate, El Salvador. Posteriormente, também foi identificado em raízes de cafeeiro no Quênia (Kabete) e Tanzânia (Mufindi), tornando-se o primeiro relato dessa espécie nesses países e no continente Africano (Jorge Júnior *et al*., 2016). Além do cafeeiro, *M. izalcoensis* também foi detectada em outras culturas, como repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) em Benin (Cotonou), tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.) em Tindini e Kianga (Tanzania), respectivamente (Jorge Júnior *et al*., 2016).

No Brasil, a espécie *M. izalcoensis* foi detectada recentemente (Stefanelo *et al*., 2019) em amostras de raízes de cafeeiro infectadas por esse nematoide que foram enviadas ao Laboratório de Nematologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília, DF pelo IAC. Os nematoides foram extraídos das raízes infectadas e inoculados em cafeeiros da cv. Mundo Novo. Em seguida, foram realizados estudos enzimáticos através do fenótipo de esterase (Carneiro & Almeida, 2001) e moleculares com primers SCAR (Correa *et al*., 2013). Estudos complementares com caracteres morfológicos possibilitaram a identificação da espécie (Stefanelo *et al*., 2019).

Em relação a hospedeiros diferenciadores, Carneiro *et al*. (2005a) observaram que a

população proveniente de Izalco, El Salvador reproduziu-se no tomateito cv. Rutgers, tabaco cv. NC95, pimentão cv. California Wonder e melancia cv. Charleston Gray. Todavia, não foi observada reprodução em algodão cv. Deltapine 61 e amendoin cv. Florunner. Embora a espécie tenha sido descrita em 2005, é necessário que todos os estudos relacionados à resistência de diferentes genótipos de café já estudados para outras espécies sejam realizados para *M. izalcoensis* do Brasil.

3.3.5 *Meloidogyne lopezi*

Meloidogyne lopezi foi descrita como uma nova espécie de *Meloidogyne* em cafeeiro, na Costa Rica, diferindo das outras espécies pela morfologia e fenótipos isoenzimáticos (Humphreys-Pereira *et al*., 2014). No entanto, essa espécie apresenta relações filogenéticas muito próximas com *M. arabicida, M. izalcoensis* e *M. paranaensis* (Humphreys-Pereira *et al*., 2014). Estudos realizados por Carneiro *et al*. (2004) usando marcadores RAPD mostraram que as espécies *M. izalcoensis* (Est S4) e *M. lopezi* (Est S2) são muito próximas, se agrupando com 100% de boostrap e se separando completamente das demais espécies do cafeeiro: *M. arabicida, M. paranaensis, M. incognita* e *M. exigua,* entre outras.

3.4 Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp.

O ciclo de vida dos NGs (Figura 1) é constituído pela fase de ovo, quatro estádios juvenis (J1, J2, J3, J4) e adultos (Gheysen & Fennol, 2002). Inicia-se com a deposição dos ovos pela fêmea em geral próximo à superfície da raiz em uma massa gelatinosa constituída de uma matriz de glicoproteínas (Agrios, 2005; Moens *et al*., 2009).

Os ovos são unicelulares e sua segmentação ocorre dentro de poucas horas após a oviposição, resultando em 2, 4, 8 e mais células, até a total formação do juvenil de primeiro estádio (J1) no seu interior (Saigusa, 1957). Esse, por sua vez, após passar pela primeira ecdise transforma-se no segundo estádio juvenil (J2) (Cares *et al*., 2012). Por ação de diversos fatores

físicos e químicos, como temperatura, umidade, aeração, disponibilidade de oxigênio e pH do solo, os J2s eclodem e se movimentam por meio de um filme de água entre as partículas de solo, à procura de raízes novas, onde penetram próximo à sua extremidade por ação mecânica e química (Taylor & Sasser, 1983; Curtis *et al*., 2009; Salgado *et al*., 2021). Eles migram entre as células até a região meristemática, movem-se entre as células dos tecidos da raiz, em seguida migram até a zona de elongação, e atingem a região do cilindro central onde estabelecem sítios de alimentação no parênquima vascular, iniciando um complexo e íntimo relacionamento com a planta (Taylor & Sasser, 1983; Hunt & Handoo, 2009).

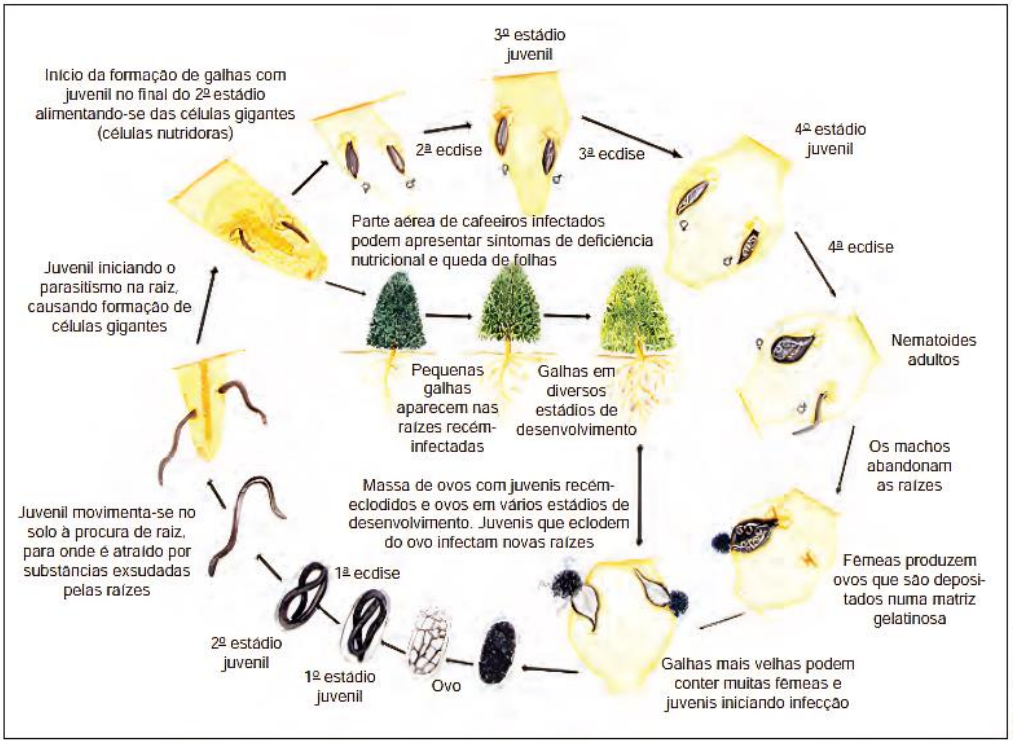

Figura 1. Ciclo de vida do nematoide-das-galhas em raízes de cafeeiro. Fonte: modificada de Agrios (1988).

Através do estilete os nematoides introduzem secreções produzidas pelas glândulas esofagianas, que causam um crescimento celular desordenado resultando na formação das células nutridoras multinucleadas resultantes de endomitoses, também conhecidas como células gigantes. O sítio de alimentação é constituído de cinco a sete células multinucleadas e

são responsáveis por nutrir os nematoides durante o seu desenvolvimento e reprodução (Einsenback & Triantaphyllou, 1991; Abad *et al.*, 2003; Karssen & Moens, 2006; Hunt & Handoo, 2009). Ao mesmo tempo ocorre intensa multiplicação celular (hiperplasia) resultando na formação das galhas (Einsenback & Triantaphyllou, 1991; Karssen & Moens, 2006).

Em decorrência da destruição das raízes novas ocasionadas pelo parasitismo de *M. incognita* e *M. paranaensis* no cafeeiro, as fêmeas dessas espécies são localizadas mais internamente em raízes mais velhas (Salgado & Rezende, 2010; Salgado *et al*., 2021). Os sintomas e sinais induzidos pelo NGs no cafeeiro variam dependendo da espécie de *Meloidogyne* envolvida. *Meloidogne exigua* e *M. izalcoensis* induzem galhas arredondadas, porém, *M. exigua* frequentemente produz massas de ovos internas, enquanto *M. izalcoensis* produz massas de ovos externas ao sistema radicular (Mendes *et al*., 1977; Carneiro *et al*., 2005a; Stefanelo *et al*., 2019). *Meloidogyne coffeicola* e *M. paranaensis* não induzem galhas, e sim engrossamentos e rachaduras no tecido radicular (Carneiro *et al*., 1996; Souza, 2008), e *M. incognita* provoca sintomas semelhantes aos de *M. paranaensis*, mas as massas de ovos algumas vezes podem ser observadas como pequenos pontos escuros quase que totalmente externas às raízes.

3.5 Identificação de espécies de *Meloidogyne*

Por vários anos, o padrão perineal e vários outros caracteres mofométricos e morfológicos das fêmeas, machos e J2s foram utilizados como critérios únicos na identificação de várias espécies de *Meloidogyne* (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Desses, apesar do aprimoramento de técnicas mais avançadas, a morfologia dos padrões do períneo das fêmeas é o caráter morfológico mais frequentemente utilizado em vários laboratórios no Brasil, para a identificação das espécies de *Meloidogyne*, em função do baixo custo e de não ser necessária a aquisição de nenhum equipamento adicional, além de um bom microscópio (Carneiro *et al*., 2016; Ferraz & Machado, 2019).

Embora a observação cuidadosa dos padrões perineais possa possibilitar a identificação das espécies quando se tem experiência com *Meloidogyne* spp. (Ferraz & Machado, 2019), atualmente não se recomenda o emprego dessa técnica isoladamente para identificação de rotina, devido ao grande número de identificações errôneas que vêm sendo realizadas no Brasil (Carneiro *et al*., 2016). Esse método requer larga experiência e comporta alto grau de subjetividade, haja vista às semelhanças gerais existentes entre os padrões perineais de algumas espécies (Ferraz & Machado, 2019).

A diagnose correta das espécies de *Meloidogyne* é de fundamental importância para os testes de resistência em programas de melhoramento vegetal e permite a escolha de medidas de controle mais adaptadas a cada situação (Randig *et al*., 2004). A técnica de caracterização das esterases e a técnica PCR-SCAR são as mais precisas na identificação de espécies de *Meloidogyne* presentes nos cafezais (Carneiro & Santos, 2022).

A eletroforese de isoenzimas é uma técnica baseada na migração de moléculas proteicas de acordo com a carga elétrica e seu peso molecular, e que apresenta relativa simplicidade, segurança, baixo custo, reprodutibilidade e rapidez (Ito *et al*., 2019). A identificação das espécies através dos perfis de esterase de *Meloidogyne* spp. constituem-se numa das etapas iniciais para estudos da diversidade, pois além da identificação é possível verificar a presença de misturas de espécies e posteriormente realizar a purificação das mesmas, por meio da multiplicação com as massas de ovos em hospedeiro suscetível, geralmente o tomateiro (Carneiro & Almeida, 2001; Carneiro *et al*., 2016; Carneiro & Santos, 2022).

Os fenótipos de esterase (Est) mostraram-se específicos sendo uma ótima ferramenta para identificar as principais espécies de *Meloidogyne* em várias culturas e no café, a saber: *M. incognita* (Est I1, I2), *M. paranaensis* (Est P1) e *M. exigua* (Est E1, E2) (Carneiro *et al*., 2005b, Carneiro *et al.*, 2016). Villain e colaboradores (2013), analisando 11 perfis de esterase identificaram nove espécies de *Meloidogyne*: *M. exigua, M. arabicida, M. arenaria, M. hapla*

Chitwood, 1949, *M. izalcoensis*, *M. paranaensis*, *M. morocciensis* Rammah & Hirschmann, 1990, *M. enterolobii* e *M. incognita*, parasitando cafeeiros, em diferentes regiões produtoras da América Central: Guatemala, Costa Rica, El Salvador e Honduras. Todavia, vale ressaltar que o uso de fêmeas jovens ou adultas é uma das limitações dessa técnica pois exige que as fêmeas estejam em bom estado de conservação enzimática (Carneiro & Cofcewicz, 2008).

As análises moleculares se tornaram importantes ferramentas no diagnóstico de nematoides, cujo avanço tem permitido a confirmação dos padrões enzimáticos e maior confiabilidade na identificação das principais espécies de *Meloidogyne* do cafeeiro (Salgado *et al*., 2015). Segundo Randig *et al*. (2004) a conversão dos marcadores RAPD em SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), termo cunhado por Paran & Michelmore (1993) para definir marcadores RAPD cuja sequência interna tenha sido determinada, permitiram compor primers mais longos, ricos em GC (guanina-citosina) e de sequência específica para identificação de *Meloidogyne* spp.

A técnica PCR-SCAR (Polymerase Chain Reaction) é um método que tem sido utilizado com sucesso na diagnose de *Meloidogyne* spp. Primers SCAR foram desenvolvidos com o objetivo de identificar as principais espécies do NGs na cultura do cafeeiro ocorrentes no Brasil, mesmo em mistura na amostra e a partir de poucos indivíduos (Randig *et al*., 2002). Randig e colaboradores (2002) desenvolveram os primers SCAR para identificação de *M. exigua* (ex D15 F/R), *M. incognita* (incK 14F/R) e *M. paranaensis* (par C09 F/R), e posteriormente Randig *et al*. (2004) otimizaram as condições de PCR para detectar uma mistura dessas espécies em uma PCR multiplex. Posteriormente, Correa *et al*. (2013) desenvolveram primers espécie-específicos para a detecção de espécies presentes nas américas: *M. arabicida* e *M. izalcoensis*. Todos esses primers foram referidos no kit diagnóstico SCAR/Café, que vem sendo utilizado no Brasil e na América Central (Carneiro *et al*., 2005b; López-Lima *et al*., 2015).

Carneiro e colaboradores (2005b) comprovaram a eficiência dos fenótipos de esterase e SCAR-Multiplex-PCR, ao realizar um levantamento utilizando ambas as técnicas simultaneamente. Para *M. izalcoensis* (Est I4= S4) com quatro bandas (Rm: 0,86, 0,96, 1,24, 1,30), as duas técnicas são também muito precisas (Stefanelo *et al*., 2019). López-Lima e colaboradores (2015) detectaram *M. paranaensis* pela primeira vez no México, usando marcadores SCAR descritos por Randig *et al*. (2002).

3.6 Resistência genética de cafeeiros a *Meloidogyne* spp.

Os nematoides são disseminados e introduzidos em lavouras cafeeiras principalmente por material vegetal, água (irrigação e enxurradas) e solo contaminado aderido às máquinas e implementos (Salgado *et al*., 2011). Como é praticamente impossível erradicar os nematoides da lavoura, o manejo deve ser considerado desde o início (Salgado *et al*., 2021). O manejo de fitonematoides consiste na aplicação de várias táticas de controle que visam manter populações de nematoides fitoparasitas em níveis abaixo do qual eles não causem danos econômicos (Freitas *et al*., 2001).

O manejo de NGs em cafeeiro pode ser realizado principalmente com: escolha da melhor área para o estabelecimento da cultura, sem nenhuma plantação de café por vários anos, ou as usadas no cultivo de outras culturas de interesse econômico sem a infestação com os nematoides do cafeeiro; plantio de mudas sadias e com certificado de sanidade, que ateste a ausência de nematoides; limpeza de máquinas e implementos com jatos fortes de água; contenção de enxurradas com construção de curvas de nível, terraços ou bacias; adição de matéria orgânica; controle de plantas invasoras; destruição de plantas atacadas; alqueive; aplicação de nematicidas; rotação de culturas em áreas onde os antigos cafeeiros foram erradicados; e resistência genética (Campos, 1997; Campos & Villain, 2005; Salgado *et al*., 2008; Salgado *et al*., 2011; Salgado *et al*., 2021).

O controle do NGs por resistência genética é um componente essencial de uma

estratégia de manejo integrado de pragas, uma vez que o uso de cultivares ou porta-enxertos resistentes é o método de controle mais eficaz, econômico e ambientalmente correto, possibilitando a substituição de lavouras improdutivas e infectadas (Silva *et al*., 2007; Bertrand & Anthony, 2008) e a manutenção de populações do nematoide abaixo do nível econômico de dano (Gonçalves & Silvarolla, 2001).

A resistência é um termo utilizado para descrever a capacidade de uma planta em suprimir o desenvolvimento ou reprodução do nematoide (Muniz *et al*., 2009) e tem sido encontrada principalmente para os nematoides endoparasitas sedentários, que possuem uma interação altamente especializada com seus hospedeiros, especialmente os do gênero *Meloidogyne* (Roberts, 2002). No entanto, o sucesso dessa prática depende do conhecimento das espécies, raças ou biótipos dos nematoides presentes na área, pois a resistência é na maioria das vezes específica (Roberts *et al*., 1998).

Os mecanismos de defesa das plantas podem ser ativados em diversas fases do ciclo de vida e do parasitismo do nematoide, desde a atração até a fase final de interação, afetando a reprodução do nematoide (Faria *et al*., 2003). As plantas suscetíveis permitem a penetração, o desenvolvimento e a reprodução normal dos nematoides, enquanto nas plantas resistentes ou imunes, ocorre a penetração dos juvenis na raiz, porém a reação de hipersensibilidade no local de infecção impede e/ou limita o desenvolvimento do nematoide e sua reprodução no tecido vegetal (Fonseca & Jaehn, 2000; Roberts, 2002; Salgado *et al*., 2011; Lima *et al*., 2015).

Segundo Roberts (2002) uma planta altamente resistente impede ou reduz significativamente a reprodução do nematoide, por outro lado, em plantas moderadamente resistentes ocorre reprodução intermediária desses organismos; já as plantas tolerantes permitem o desenvolvimento e reprodução do nematoide, mas não sofrem danos significativos nas suas funções fisiológicas, pois conseguem suportar ou tolerar as ações parasitárias do nematoide, sofrendo pouco ou com nenhum efeito do parasitismo, mesmo crescendo em solo

altamente infestado; as plantas intolerantes são severamente afetadas pelo parasitismo de nematoides, refletindo no mau desenvolvimento, no qual ocorre redução no crescimento e baixa produtividade da planta, com debilidade marcada pela drástica redução do sistema radicular, que por sua vez contribui para a menor reprodução do nematoide e morte da planta.

A reação de resistência pré-infectiva ocorre independente da infecção, impedindo o nematoide de penetrar na superfície da raiz, enquanto a pós-infectiva, ocorre em resposta à infecção pelo nematoide, como por exemplo, impedindo a formação ou a manutenção do sítio de alimentação (Roberts *et al*., 1998). Estudos anteriores apontaram que a resistência do cafeeiro aos nematoides do gênero *Meloidogyne* é do tipo pós-infectiva com reação de hipersensibilidade (Anthony *et al*., 2005; Oliveira, 2006; Albuquerque *et al*., 2010; Lima *et al*., 2015).

3.6.1 Cultivares de cafeeiros com resistência genética a *Meloidogyne* spp.

Embora existam poucas cultivares de café resistentes aos NGs no Brasil, esforços têm sido direcionados ao desenvolvimento de cultivares de café arábica com resistência a *Meloidogyne* spp. (Salgado *et al*., 2021). A grande maioria das fontes de resistência aos NGs foram identificadas em *C. canephora* (Bertrand *et al*., 2000), e em cafeeiros silvestres de *C. arabica* da Etiópia (Anzueto *et al*., 2001; Boisseau *et al*., 2009). No entanto, apesar da maioria das cultivares comerciais de *C. arabica* serem consideradas altamente suscetíveis a *Meloidogyne* spp., algumas apresentam resistência a nematoides. Por exemplo, a cultivar IPR 100, originária do cruzamento realizado entre cafeeiros do germoplasma Catuaí ("Catuaí" × genótipo de café da série 'BA-10') e *C. liberica* Hiern portadora de genes de resistência (Sera *et al*., 2007) é resistente a *M. exigua* (Rezende *et al*., 2017), *M. paranaensis* (Santos *et al*., 2018) e *M. incognita* (Carneiro & Santos, 2022). A cultivar IAC 125 RN, desenvolvida pelo Instituto Agronômico de Campinas possui resistência às raças 1 e 2 de *M. exigua* (Fazuoli *et al*., 2018). Dentre outras cultivares de *C. arabica*, há ainda a Catiguá MG3 (resitente a *M. exigua*), MG Vereda

e MG Guaiçara, ambas com resistência a *M. paranaensis* (Salgado *et al*., 2021).

Santos e colaboradores (2018) relataram resistência genética na cultivar IPR 100 de *C. arabica* a sete populações de *M. paranaensis* provenientes de diferentes localidades do Brasil e do mundo. Foram estudados três perfis de esterases típicos da espécie (Est P1, P2 e P2a) e a resistência confirmou-se com baixos índices de segregação. Progênies de cruzamentos entre as cultivares Catuaí e Amphilo também proporcionaram resistência contra *M. paranaensis* e *M. incognita* em casa de vegetação (Peres *et al*., 2017) e teve excelente desempenho em área infestada por *M. paranaensis* em Piumhi, MG, e já estão sendo validadas em outras regiões do Brasil. Esses genótipos provenientes de cruzamentos com Amphilo, foram lançadas como duas cultivares – MG Vereda e MG Guaiçara – ambas possuem excelentes características agronômicas e resistência a *M. paranaensis* em condições de casa de vegetação e campo (Salgado *et al*., 2021).

A resistência a nematoides também foi encontrada em progênies derivadas do Híbrido de Timor. Esse, por sua vez, é fenotipicamente semelhante a *C. arabica*, sendo considerado a principal fonte de resistência contra a infecção de NGs usadas em programas de melhoramento de café atualmente (Lashermes *et al*., 1999). A resistência encontrada em genótipos do Híbrido de Timor é determinada por um gene principal derivado de *C. canephora*, a partir do qual o locus *Mex*-1 que atribui resistência a nematoide foi identificado (Noir *et al*., 2003). Várias linhagens derivadas de cruzamentos interespecíficos entre *C. arabica* e *C. canephora* (Híbrido de Timor) mostraram resistência a *M. exigua*, semelhante ao observado em *C. canephora* (Silvarolla *et al*., 1998; Bertrand *et al*., 2001; Muniz *et al*., 2009). No estudo desenvolvido por Silva *et al*. (2007) as progênies do Híbrido de Timor UFV 981, UFV 1266 e UFV 1848 não foram infectadas por quaisquer das populações de *M. exigua* avaliadas sendo classificadas como imunes.

Semelhante ao Híbrido de Timor, a cultivar IAPAR 59 (*C. arabica* × *C. canephora*) apresenta resistência a *M. exigua* conferida pelo gene *Mex*-1 (Noir *et al*., 2003). No entanto, a

resistência é do tipo monogênica e esse gene apresenta incompleta expressão de dominância e não confere resistência a *M. incognita* e *M. paranensis* (Noir *et al*., 2003; Muniz *et al*., 2009). Reações do tipo hipersensibilidade e mecanismos de defesa induzidos e constitutivos foram relatados nessa cultivar (Anthony *et al*., 2005).

O plantio de cultivares suscetíveis de café arábica enxertadas em porta-enxerto resistente tem papel importante na redução e manutenção de baixos níveis das populações de nematoides, especialmente em áreas infestadas de renovação da cultura (Guerreiro Filho *et al*., 2023). Tal prática vem sendo adotada desde o final da década de 1980 através do uso do porta-enxerto Apoatã IAC 2258 (Fazuoli *et al*., 1987) em associação com a técnica de enxertia hipocotiledonar desenvolvida por Reina (1966) e adaptada por Moraes & Franco (1987). Atualmente três cultivares de *C. canephora* estão disponíveis comercialmente para serem utilizadas como porta-enxertos para resistência a *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* e que podem receber enxertos de *C. arabica* e *C. canephora*: 'Apoatã IAC 2258', 'Nemaya' e 'Goytacá' (= Clone 14). Na América Central, a cultivar "Nemaya", derivada do cruzamento entre os clones de *C. canephora* T3561 e T3751, tem permitido a sobrevivência e competitividade da cafeicultura em regiões infestadas por *Meloidogyne* (Campos & Villain, 2005). No Brasil, a variedade Robusta, representada pela cultivar Apoatã IAC 2258 é uma das mais utilizadas como porta-enxerto resistente a *Meloidogyne*. Essa cultivar Apoatã IAC 2258 é bastante recomendada para uso como porta-enxerto do café arábica (Fonseca *et al*., 2007) e tem demonstrando resistência a *M. exigua*. (Salgado *et al*., 2005; Ferrão *et al*., 2015), *M. incognita* e *M. paranaensis* (Sera *et al*., 2006; Fonseca *et al*., 2007, Ferrão *et al*., 2015; Pereira & Baiao, 2015). Essa cultivar confirmou a resistência quando submetida a sete populações de *M. paranaensis*, apresentando um nível de segregação de 12% (Santos *et al*., 2018).

Para garantir uma maior segurança e sustentabilidade ao sistema produtivo da cafeicultura de conilon, espera-se que os programas de melhoramento mantenham o foco na

seleção de clones ou variedades resistentes a fitonematoides, seja para utilizar como porta-enxerto ou para compor variedades clonais resistentes (Ventura *et al*., 2017). Além disso, a identificação e seleção de clones de *C. canephora* combinando tolerância à seca com outras características agronômicas (floração eficiente, produtividade e vigor) e resistência múltipla aos NGs é de grande interesse na geração de novas variedades mais bem adaptadas às mudanças climáticas e estresses abióticos (Fonseca *et al*., 2004; Ferrão *et al*., 2010). Estudos realizados por Carneiro *et al*. (2009) mostraram que o clone 14 ('Goytacá') possui resistência múltipla a *M. incognita*, *M. paranaensis*. Lima e colaboradores (2013) também demonstraram que esse mesmo clone apresentou resistência múltipla a *M. incognita* e *M. paranaensis*. Lima e colaboradores (2015) também observaram que alguns clones de café conilon cv. Vitória Incaper 8142 de *C. canephora* exibiram resistência múltipla a essas espécies. Santos e colaboradores (2018) verificaram que os genótipos Clone 14 INCAPER, Catuaí Vermelho × Amphillo MR2161 (E1 16-5 III), Apoatã IAC 2258, Híbrido de Timor UFV 408-01 (E1 6-6 II) e IPR 100, apresentaram resistência a sete populações de *M. paranaensis*, no entanto, exibiram segregação para resistência nas taxas de 0%, 2,4%, 12%, 26% e 29%, respectivamente.

Afim de reduzir a taxa de segregação próxima a 20% para suscetibilidade da cv. Apoatã IAC 2258 e visando o desenvolvimento de novas cultivares de porta-enxertos de *C. canephora* com resistência aos NGs, pelo programa de melhoramento de café do IAC, Gonçalves *et al.* (2021) selecionaram novos clones de *C. canephora* por cerca de 30 anos com base no desempenho agronômico, e confirmaram a resistência a *M. paranaensis, M. incognita* e *M. exigua*, dentre eles, os clones CcK1 , CcR2, CcR6, CcR7, CcR9 e CcR10. Todos, exceto o clone CcR6 compõem um novo porta-enxerto registrado em 2022 pelo IAC, denominado 'IAC Herculândia'. Estudos conduzidos por Fatobene *et al*. (2018) já haviam demonstrado que os clones CcK1 e CcR2, além de resistentes a *M. incognita* e *M. M. paranaensis*, também foram considerados promissores por não terem seu crescimento vegetativo prejudicado pelos nematoides. A

proteção desses cinco clones ainda não foi publicada pelo MAPA e por esse motivo ainda são utilizados os nomes pré-comerciais ou experimentais mencionados das cultivares clonais denominadas IAC WG, IAC FEBS, IAC PM, IAC LCCBF e IAC ARM, respectivamente (Gonçalves *et al*., 2021). Segundo Guerreiro Filho *et al*. (2023), a cultivar IAC Herculândia foi desenvolvida para aumentar a frequência de alelos de resistência contra *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* em um novo porta-enxerto, reduzir a necessidade de replantio em áreas infestadas e permitir o plantio e o manejo do café arábica sem a adoção de nenhum nível tecnológico extra.

3.7 Diversidade genética e filogenia de *Meloidogyne* spp.

As espécies de nematoides parasitas de plantas exibem expressiva variabilidade genética, que resulta em diferentes atributos (Semblat *et al*., 2000; Castagone-Sereno, 2002). Isso ocorre porque durante o processo de coevolução, a íntima relação entre nematoides fitoparasitas e as plantas resultou no surgimento de organismos com diferentes hábitos de parasitismo, modos de reprodução e capacidade de adaptação a diferentes condições edafoclimáticas (Perry & Moens, 2011).

Os nematoides pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, por exemplo, são conhecidos por serem altamente variáveis ou diversificados quanto à morfologia, biologia e genética (Randig *et al*., 2002; 2004). Os nematoides desse gênero exibem extrema diversidade citogenética (com níveis frequentes e variáveis de aneuploidia e poliploidia), e seu modo de reprodução é variável, podendo se reproduzir por fertilização cruzada, partenogênese meiótica facultativa ou partenogênese mitótica obrigatória (Triantaphyllou, 1985). Possuem ainda uma notável diversidade na relação com suas plantas hospedeiras, de modo que, enquanto algumas espécies são extremamente polifagas, com até 3000 espécies de plantas hospedeiras, outras possuem gama de hospedeiros restrita a poucas espécies de plantas (Jepson, 1987; Castagnone-Sereno, 2002).

A variabilidade genética nas populações de fitopatógenos é um dos aspectos mais importantes em um programa de melhoramento genético (Nunes *et al*., 2021). Tendo em vista que a resistência genética é considerada uma das estratégias de controle mais recomendadas para o controle de *Meloidogyne* (Bertrand & Anthony, 2008), e que a seleção e manutenção da eficiência de genes de resistência prescindem desta informação (Dropkin, 1988), os marcadores moleculares são ferramentas que têm sido utilizadas com eficiência na análise da variabilidade genética em NGs. Atualmente existem vários tipos de marcadores moleculares baseados em diferenças no tamanho e sequências de DNA (Nunes *et al*., 2021).

3.7.1 Marcadores moleculares: RAPD e AFLP

O desenvolvimento de técnicas moleculares contribuiu com a abertura de novas perspectivas para a identificação de espécies de *Meloidogyne* e estudo da variabilidade intraespecífica dos NGs (Santos *et al*., 2018). Desde a invenção da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), em 1985 por Kary B. Mullis (Mullis *et al*., 1986; Saiki *et al*., 1988), diferentes áreas de estudos, incluindo a Nematologia (Roberts *et al*., 2016) foram fortemente impactadas por essa tecnologia. A partir do PCR várias derivações do método foram desenvolvidas, como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* ou DNA polimórfico amplificado ao acaso) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados). Esses marcadores moleculares neutros têm sido amplamente utilizados para analisar a diversidade genética e relações filogenéticas de espécies de *Meloidogyne* (Randing *et al*., 2002; Carneiro *et al*., 2004; Muniz *et al*., 2008; Santos *et al*., 2012; Silva *et al*., 2014).

A técnica RAPD é uma variação da PCR que se baseia na amplificação do DNA genômico utilizando apenas um ‘primer’ curto (até 10 nucleotídeos), e que devido ao seu pequeno tamanho, pode parear em diversos pontos do genoma (Williams *et al*., 1990; Ferreira & Grattapaglia, 1995; Fonseca & Boiteux, 2021). Esse primer único possui sequência

arbitrária, e portanto, sua sequência alvo é desconhecida (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Por não exigir o conhecimento prévio da sequência que está sendo amplificada, um mesmo conjunto de 'primers' pode ser usado para amplificar o DNA dos mais diversos tipos de organismos (Fonseca & Boiteux, 2021). Devido à grande quantidade de DNA produzido, este segmento pode ser visualizado diretamente na forma de uma banda num gel de eletroforese (Ferreira & Grattapaglia, 1995). O polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, ou seja, o seguimento amplificado é representado pela presença ou ausência de bandas no gel e, portanto, marcadores RAPD são tipicamente dominantes (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Buso *et al*., 2009).

O método RAPD tem sido amplamente utilizado como um marcador molecular para estimar relações genéticas, taxonômicas e filogenéticas dos NGs (Cenis, 1993; Baum *et al*., 1994; Castagnone-Sereno *et al*., 1994; Blok *et al*., 1997; Randig *et al*., 2002). Em uma única reação de PCR, a amplificação do DNA genômico usando um único primer pode revelar polimorfismo considerável, mesmo entre organismos intimamente relacionados (Welsh & McClelland, 1990; Williams *et al*., 1990). Dentre as vantagens, sua sensibilidade, rapidez e relativa simplicidade e o fato de não requerer informações acerca da sequência nucleotídica do DNA genômico, tem contribuído para que o método RAPD seja utilizado em muitos estudos (Randig *et al*., 2004).

De maneira semelhante à análise de RAPD, a técnica de AFLP permite a detecção de polimorfismo a nível específico e/ou subespecífico em *Meloidogyne* spp. (Semblat *et al*., 1998). Essa técnica baseia-se na amplificação por PCR de fragmentos de DNA clivados/digeridos com enzimas de restrição (Vos *et al*., 1995). O DNA é clivado com duas enzimas de restrição (uma de corte raro e outra de corte frequente), deixando as extremidades dos fragmentos de restrição coesivas de sequência conhecida, onde são ligados os adaptadores, os quais servem de sítios de ligação para 'primers' numa reação de PCR (Fonseca & Boiteux,

2021). Dessa maneira, uma vez que a sequência dos adaptadores e a do sítio de restrição são conhecidas, podem-se construir iniciadores específicos a essas sequências para pré-amplificação dos fragmentos de restrição (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Dentre as vantagens, o AFLP gera grande número de fragmentos em uma única reação, apresentando um grande poder de detecção de variabilidade genética, maior robustez quando comparado com o RAPD e por não necessitar de dados de sequenciamento prévio do genoma da espécie em estudo (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Spooner *et al*., 2005). Essa técnica explora simultaneamente o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição, tal como no ensaio de RFLP, e a ocorrência ou não de amplificação a partir de sequências arbitrárias, tal como o ensaio RAPD, conseguindo assim uma flexibilidade significativa na obtenção de marcadores polimórficos (Ferreira & Grattapaglia, 1995). A principal limitação é o baixo conteúdo de informação genética por loco, além de envolver maior número de etapas do que a de RAPD (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

3.7.2 Marcadores moleculares: D2D3 e ITS do DNA ribossomal, e DNA mitocondrial

Entre as regiões do DNA que têm sido exploradas como marcadores em estudos moleculares dos NGs, destaca-se a região do DNA ribossomal (rDNA) e do DNA mitocondrial (mtDNA). Essas apresentam a vantagem de estarem presentes em número elevado de cópias em cada célula, facilitando a recuperação e amplificação (Roberts *et al*., 2016).

Marcadores de rDNA têm sido amplamente usados como marcadores genéticos na maioria dos organismos vivos, incluindo plantas, insetos, peixes e nematoides (Hajibabaei *et al*., 2007). O arranjo dos genes que codificam o RNA ribossômico de um genoma eucarionte consiste em várias cópias repetidas em *tandem* de uma unidade de transcrição (que codifica o RNA ribossômico para formar a estrutura do ribossomo) e o espaçador não transcrito (NTS – *Non-Transcribed Spacer*, frequentemente chamado de espaçador intergênico (IGS – *Intergenic Spacer*), e o exato número de cópias pode variar de uma a milhares (Hillis & Dixon, 1991; Powers, 2004). Os genes do rRNA

são os mais abundantes e importantes genes de manutenção na célula, sendo altamente conservados de bactérias a humanos (Kobayashi, 2011).

Os três genes 18S rDNA, 5.8S rDNA e 28S rDNA codificam as subunidades ribossomais 18S, 5.8S e 28S e são transcritos em um único RNA, separados por duas regiões: os espaçadores internos transcritos (ITS) – ITS1, entre os genes das subunidades 18S e 5.8S, e ITS2, entre os genes das subunidades 5.8S e 28S (Hillis & Dixon, 1991). Esses genes que codificam o RNA ribossômico e suas sequências intercalares são provavelmente considerados os melhores genes caracaterizados em Nematoda (Powers, 2004). Essa região tem sido muito usada para estudos das relações filogenéticas entre as espécies de fitonematoides (Castagnone-Sereno *et al*., 2011). Isso ocorre porque diferentes regiões da unidade de repetição do rDNA evoluem a diferentes taxas e há ilhas de sequências altamente conservadas dentro da maioria desses genes, tornado-os alvos ideais para primers universais, permitindo a amplificação de diferentes espécies com um único conjunto de primers de PCR (Roberts *et al*., 2016). Além disso, a principal vantagem dos marcadores baseados em rDNA é que eles estão presentes como multicópias, fornecendo amplo material para estudo com variação e estabilidade suficientes (Castagnone-Sereno *et al*., 2011).

Historicamente, a subunidade menor do ribossomo (SSU) tem o rRNA mais estudado por estar entre as sequências alvo que evoluem mais lentamente, sendo encontrada em todos os organismos vivos, o que permite o desenho de primers universais que amplificarão quase todos os alvos (Hillis & Dixon, 1991; Roberts *et al*., 2016). Os genes rRNA de 5.8S em eucariontes possuem taxa evolutiva similar à subunidade menor, mas seu menor comprimento limita a utilidade para estudos de relações filogenéticas (Nazar *et al*., 1976). Já os genes da subunidade maior do ribossomo (LSU) apresenta números de diferentes domínios que evoluem em taxas diferentes, sendo incluídos muitos domínios ou segmentos de expansão (Hassouna *et al*., 1984; Roberts *et al*., 2016). Segundo Roberts *et al*. (2016), D2-D3 é a região de expansão mais

comumente estudada para reconstrução de eventos evolutivos ou determinar relações entre organismos próximos, com relações interespecíficas. Em relação às regiões espaçadoras, as regiões ITS (ITS1 e ITS2) são alvos atrativos para a análise com primers universais, pois por serem mais conservadas que a NTS/IGS (região que evolui mais rapidamente entre todas as regiões do rDNA), quando ancorados nas regiões terminais conservadas da subunidade menor 5.8S e a subunidade maior, podem permitir a amplificação por PCR das regiões ITS completas (Roberts *et al*., 2016).

O DNA mitocondrial (mtDNA) também tem sido usado em grande número de estudos filogenéticos de nematoides (Derycke *et al*., 2010). O mtDNA dos animais são moléculas circulares relativamente pequenas, que variam de 12 a 20 kb de tamanho, embora genomas de mtDNA maiores já tenham sido descritos (Tang & Hyman, 2007), esses genomas extracromossômicos contêm aproximadamente 37 genes que codificam tRNAs, rRNAs e mRNAs, os últimos codificando proteínas envolvidas principalmente na cadeia de transporte de elétrons e na fosforilação oxidativa das mitocôndrias (Boore, 1999).

Estudos mostram que existem divergências de sequências no mtDNA, que incluem inserções e deleções, que podem ser atribuídas à taxa acelerada de mutação no mtDNA em comparação com o DNA nuclear e provavelmente surge da falta de mecanismos de reparo eficazes durante a replicação (Brown, 1985; Wilson *et al*., 1985). Tais divergências proporcionaram o estudo de regiões-alvo para distinção de *Meloidogyne* spp. (Powers & Harris, 1993; Blok *et al*., 2002; Brito *et al*., 2004; Jeyaprakash *et al*., 2006). Estudo realizado por Santos *et al*. (2020) mostrou que as sequências COII mostraram-se úteis tanto para a identificação de espécies quanto para estudos filogenéticos de espécies de NGs em café, como *M. paranaensis*.

O mtDNA apresenta várias vantagens como marcador molecular, dentre elas, ocorre em múltiplas cópias por célula, sendo facilmente amplificado, em geral altamente conservado entre animais, com raras duplicações, sem íntrons e regiões intergênicas muito curtas (Gissi *et al*., 2008). Além disso, possui regiões variáveis que são geralmente ladeadas por regiões altamente

conservadas, permitindo o desenho de primers de PCR que deverão amplificar entre espécies (Gissi *et al*., 2008). No entanto, apesar da relevância, ainda existem poucas informações sobre a importância dos genomas mitocondriais na genética, sistemática e ecologia de nematoides (Hu & Gasser, 2006).

3.7.3 Marcador molecular: Hsp90

O gene da proteína de choque térmico 90 (Hsp90) tem sido usado em estudos filogenéticos de nematoides parasitas de plantas (Skantar & Carta, 2004; Mundo-Ocampo *et al*., 2008; Skantar *et al*., 2008) ou em caracterização de espécies crípticas (Handoo *et al*., 2005; Skantar *et al*., 2008). Esse gene é considerado um candidato atraente para estudos filogenéticos de nematoides porque provavelmente está presente em cópia única e não é facilmente confundido com genes com relacionamento filogenético distantaciado (Skantar & Carta, 2004).

Estudo realizado por Santos *et al*. (2020) mostrou que a análise Hsp90 revelou menor variabilidade entre as populações de *M. paranaensis* e apenas *M. paranaensis* P2a da Guatemala apresentou variação intraespecífica variando de 14 (1,4%) a 16 (1,6%) pares de bases quando comparado com as demais.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, P.; FAVERY, B.; ROSSO, M. N. & CASTAGNONE-SERENO, P. 2003. Root-knot nematode parasitism and host response: Molecular basis of a sophisticated interaction. Molecular Plant Pathology 4: 217-224.

AGÊNCIA GOV. 2024. https://agenciagov.ebc.com.br/noticias/202407/producao-mundial-de-cafe-foi-estimada-em-176-2-milhoes-de-sacas-de-60kg-para-a-safra-202420132025 Consultado em: 16/ 09/2024.

AGRIOS, G. N. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Elsevier academic press. Burlington, MA. 922p.

ALBUQUERQUE, E. V. S.; CARNEIRO, R. M. D. G.; COSTA, P. M.; GOMES, A. C. M. M.; SANTOS, M.; PEREIRA, A. A; NICOLE, M.; FERNANDEZ, D. & GROSSI-DE-SÁ, M. F. 2010. Resistance to *Meloidogyne incognita* expresses a hypersensitive-like response in *Coffea arabica*. European Journal of Plant Pathology 127: 365-373.

ALVES, P. S.; FATOBENE, B. J. dos R.; SALGADO, S. M. L.; GOMES, A. C. M. M.; CAMPOS, V. P.; CARNEIRO, R. M. D. G. & SOUZA, J. T. 2019. Early and late responses characterise the resistance derived from Ethiopian wild germplasm 'Amphillo' of *Coffea arabica* to *Meloidogyne paranaensis*. Nematology 21: 793-804.

ANTHONY, F.; TOPART, P.; MARTINEZ, A.; SILVA, M.; NICOLE, M. & SILVA, A. R. 2005. Hypersensitive-like reaction conferred by the *Mex*-1 resistance gene against *Meloidogyne exigua* in coffee. Plant Pathology 54: 476-482.

ANZUETO, F.; BERTRAND, B.; SARAH, J. L.; ESKES, A. B.; DECASY, B. 2001. Resistance to *Meloidogyne incognita* in Ethiopian *Coffea arabica* accessions. Euphytica 118: 1-8.

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

BARRANTES, M. R.; VALERIO, D. R.; FEGUEROA, L. S.; SERA, T. & SERA G. H. 2020. *Coffea arabica* cultivars with resistance to nematode *Meloidogyne exigua* originated from Costa Rica. Australian Journal of Crop Science 14:1-6.

BAUM, T. J.; GRESSHOFF, P. M.; LEWIS, S. A. & DEAN, R. A. 1994. Characterization and phylogenetic analysis of four root-knot nematode species using DNA amplification fingerprinting and automated polyacrylamide gel electrophoresis. Molecular Plant-Microbe Interactions 7: 39-47.

BERTHAUD, J. & CHARRIER, A. 1985. Genetic resources of *Coffea*. *In*: Clarck, R. J. & Macrae, R. (eds.). Coffee – Agronomy. Elsevier Applied Science. London. p.1-40.

BERTRAND, B. & ANTHONY, F. 2008. Genetics of resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and breeding. *In*: Souza, R. M (ed.) Plant-parasitic nematodes of coffee. Springer Science. Dordrecht, NL. p.165-190.

BERTRAND, B.; ANTHONY, F. & LASHERME, P. 2001. Breeding for resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica* by introgression of resistance genes of *Coffea canephora*. Plant Pathology 50: 637- 643.

BERTRAND, B.; PENA-DURAN, M. X.; ANZUETO, F.; CILAS, C.; ETIENNE, H.; ANTHONY, F. & ESKES, A. 2000. Genetic study of *Coffea canephora* coffee tree resistance to *Meloidogyne incognita* nematodes in Guatemala and *Meloidogyne* sp. nematodes in El Salvador for selection of rootstock varieties in Central America. Euphytica 113: 79-86.

BLOK, V. C.; PHILLIPS, M. S.; McNICOL, J. W. & FARGETTE, M. 1997. Genetic variation in tropical *Meloidogyne* spp. as shown by RAPDs. Fundamental and Applied Nematology 20: 127-133.

BLOK, V. C.; WISHART, J.; FARGETTE, M.; BERTHIER, K. & PHILLIPS, M. 2002. Mitochondrial DNA differences distinguishing *Meloidogyne mayaguensis* from the major species of tropical root-knot nematodes. Nematology 4: 773-781.

BOISSEAU, M.; ARIBI, J.; SOUZA, F. R.; CARNEIRO, R. M. D. G. & ANTHONY, F. 2009. Resistance to *Meloidogyne paranaensis* in wild *Coffea arabica*. Tropical Plant Pathology 34: 38-41.

BOORE, J. L. 1999. Animal mitochondrial genomes. Nucleic Acids Research 27: 1767-1780.

BRASIL-Ministério da Agricultura. 2016. Café. Safra 2015. http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe/saiba-mais Consultado em: 15/ 04/2022.

BRIDSON, D. M. & VERDCOURT, B. 1988. Flora of tropical East Africa: Rubiaceae (Part 2). Iziko Museums of Cape Town. Cape Town. p. 415-747.

BRITO, J.; POWERS, T. O.; MULLIN, P. G.; INSERRA, R. N. & DICKSON, D. W. 2004. Morphological and molecular characterization of *Meloidogyne mayaguensis* isolates from Florida. Journal of Nematology 36: 232-240.

BROWN, W. M. 1985. The mitochondrial genome of animals. *In*: MacIntyre, R. H. (ed.). Molecular evolutionary genetics. Plenum Press. New York, USA. p.95-130.

BUSO, G. S.; YAMAGUISHI, A. T.; AZEVEDO, V. C. R.; LEÃO, D. A.; FERREIRA, M. A.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S. & MAZZUCATO, A. 2009. Manual de utilização de marcadores moleculares para análise de diversidade genética. Documentos 291. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF. 30 p.

CAMPOS, V. & VILLAIN, L. 2005. Nematode parasites of coffee and cocoa. *In*: Luc, M.; Skora, R. A. & Bridge, J. (eds.). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 2ª ed. CABI Publishing. Wallingford, UK. p. 529-580.

CAMPOS, V. P. 1997. Café (*Coffea arabica* L.): controle de doenças - doenças causadas por nematoides. *In*: Vale, F. X. R. & Zambolim, L. (ed.). Controle de doenças de plantas: grandes culturas. v.1. UFV. Viçosa, MG. p. 141-170.

CARES, J. E.; FURLANETTO, C. & BLUM, L. E. B. 2012. Nematoides fitoparasitas. *In*:

Blum, L. E. B.; Uesugi, C. H.; Cares, J. E. & Vale, H. M. M. (eds.). Fitopatologia e microrganismos fitopatogênicos. 1ª ed. Gráfica e Editora Positiva Ltda. Brasília, DF. p. 116-136.

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

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

CARNEIRO, R. M. D. G. & COFCEWICZ, E. T. 2008. Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. *In:* Souza, R. M. (ed.). Plant parasitic nematodes of coffee. Springer. Holand. p.87-122.

CARNEIRO, R. M. D. G.; COSTA, S. B.; SOUSA, F. R.; SANTOS, D. F.; ALMEIDA, M. R. A.; SIQUEIRA, K. M.S.; TIGANO, M. S. & FONSECA, A. F. A. 2009. Reação de cafeeiros 'Conilon' a diferentes populações de *Meloidogyne* spp. *In*: Anais do VI SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. 02 a 05 de junho de 2009. Vitória, ES. Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café e Embrapa Café. 6p.

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

CARNEIRO, R. M. D. G.; COSTA, S. B.; SOUSA, F. R.; SANTOS, D. F.; ALMEIDA, M. R. A.; SIQUEIRA, K. M.S.; TIGANO, M. S. & FONSECA, A. F. A. 2009. Reação de cafeeiros 'Conilon' a diferentes populações de *Meloidogyne* spp. *In*: Anais do VI SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. 02 a 05 de junho de 2009. Vitória, ES. Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café e Embrapa Café. 6p.

CARNEIRO, R. M. D. G.; MONTEIRO, J. M. S.; SILVA, U. C. & GOMES, G. 2016. O gênero *Meloidogyne*. Diagnose através da eletroforese de isoenzimas e marcadores SCAR. *In*: Oliveira, C. M. G.; Santos, M. A. & Castro, L. H. S.(eds.). Diagnose de fitonematoides. 1ª ed. v.1. Millennium. Campinas, SP. p. 46-70.

CARNEIRO, R. M. D. G.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M. R. A. & GONÇALVES, W. 2005b. Identificação e Caracterização de *Meloidogyne* spp. em cafeeiro nos Estados de São Paulo e Minas Gerais através do fenótipos das esterases e SCAR-PCR-Multiplex. Nematologia Brasileira 29: 233-241.

CARNEIRO, R. M. D. G. & SANTOS, M. F. A. 2022. Integrated management of nematodes in coffee. *In*: Muschler, R. (ed.). Climate-smart production of coffee: improving social and environmental sustainability. Burleigh Dodds Science Publishing. Cambridge, UK. p. 343-378.

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

CARVALHO, A. & MONACO, L. C. 1965. Natural cross pollination in *Coffea arabica*. *In*: Annals of the INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS 26. Brussels, Toronto. International Horticultural Society. p. 447-449.

CARVALHO, A. & MÔNACO, L. C. 1972. Transferência do fator caturra para o cultivar Mundo Novo de *Coffea arabica*. Bragantia. Campinas, SP. p.379-399.

CARVALHO, C. H. S.; BARTELEGA, L.; SERA, G. H.; MATIELLO, J. B.; ALMEIDA, S. R.; SANTINATO, F. & HOTZ, A. L. 2022. Catálogo de cultivares de café arábica. Documentos 16. Embrapa Café. Brasília, DF. 115 p.

CASTAGNONE-SERENO, P. 2002. Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes? Euphytica 124: 193-199.

CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E. G.; PERFUS-BARBEOCH, L. & ABAD, P. 2013. Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: new insights from the genomic era. Annual Review of Phytopathology 51: 203-220.

CASTAGNONE-SERENO, P.; SKANTAR, A. & ROBERTSON, L. 2011. Molecular tools for diagnostics. *In*: Jones, J.; Gheysen, G. & Fenoll, C. (eds). Genomics and molecular genetics of plant nematode-interactions. Springer. London, UK. p. 443-464.

CASTAGNONE-SERENO, P.; WANLERBERGHE-MASSUTTI, F. & LEROY, F. 1994. Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers. Genome 37: 904-909.

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

CENIS, J. L. 1993. Identification of four major *Meloidogyne* spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). Phytopathology 83: 76-78.

CÉSAR, L. A. M.; MORETTI, M. A. & MIOTO, B. M. 2013. Medicina: Pesquisas comprovam benefícios do café à saúde humana. Visão Agrícola Nº12, USP ESALQ. p.112-114.

CHALFOUN, S. M. & REIS, P. R. 2010. História da cafeicultura no Brasil. *In*: Reis, P.R. & Da Cunha, R. L. Café Arábica: do plantio à colheita. EPAMIG. Lavras, MG. p. 23-83.

CHEVALIER, A. 1942. Iconographie des caféiers sauvages et cultivés et des Rubiacées prises pour des caféiers Les caféiers du globe. Lechevalier. p. 36.

CHEVALIER, A. 1947. Systematique des caféiers et faux-caféiers. Maladies et insects nuisibles. *In*: Eciclopedie Biologique XXVIII. Les caféiers du globe. 3.ed. Lechevalier. p. 257.

CHITWOOD, B. G. & BERGER, C. A. 1960. Nematodes parasites of coffee in Guatemala. Phytopathology 50: 631.

COFCEWICZ, E. T.; CARNEIRO, R. M. D. G.; CASTAGNONE-SERENO, P. & QUÉNÉHERVÉ, P. 2004. Enzyme phenotypes and genetic diversity of root-knot nematodes parasitizing *Musa* in Brazil. Nematology 6: 85-95.

COFCEWICZ, E.T.; CARNEIRO, R. M. D. G.; RANDIG, O.; CHABRIER, C. & QUÉNÉHERVE, P. 2005. Diversity of *Meloidogyne* spp. on *Musa* in Martinique, Guadeloupe and French Guiana. Journal of Nematology 37:313-322.

CONAB. 2020. Acompanhamento safra brasileira: café. Safra 2020. Quarto levantamento. v.5. Brasília. p. 1-45.

CONAB. 2024. Acompanhamento da safra brasileira de café. Segundo levantamento, maio 2024. vol. 1, n. 1. Brasília, DF. http://www.conab.gov.br Consultado em 02/07/2024.

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

CURTIS, R. H.; ROBINSON, A. F. & PERRY, R. N. 2009. Hatch and host location. *In*: Perry, R. N.; Moens, M. & Starr, J. L. Root-knot nematodes. CAB International. Wallingford, UK. p.139-162.

DAVIS, A. P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D. M. & STOFFELEN, P. 2006. An annotated taxonomic conspectus of the genus C*offea* (Rubiaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 152: 465-512.

DAVIS, A. P.; RAKOTONASOLO, F. & DE BLOCK, P. 2010. *Coffea toshii* sp. nov. (Rubiaceae) from Madagascar. Nordic Journal of Botany 28: 134-136.

DAVIS, A. P.; TOSH, J.; RUCH, N. & FAY, M. F. 2011. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea.* Botanical Journal of the Linnean Society 167: 357-377.

DERYCKE, S.; VANAVERBEKE, J.; RIGAUX, A.; BACKELJAU, T. & MOENS, T. 2010. Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes. PLoS One 5: e13716.

DONG, K.; DEAN, R. A.; FORTNUM, B. A. & LEWIS, S. A. 2001. Development of PCR primers to identify species of root-knot nematodes: *M. arenaria, M. hapla, M. incognita* and *M. javanica*. Nematropica 31: 271-280.

DROPKIN, V. 1988. The concept of race phytonematology. Annual Review of Phytopathology 26: 145-161.

EISENBACK, J. D. & TRIANTAPHYLLOU, H. H. 1991. Root-knot nematode: *Meloidogyne* sp. and races. *In*: Nickle, W. R. (ed.). Manual of Agricultural Nematology. Marcel Dekker. New York, USA. p.191-274.

ENCARNAÇÃO, R. O. & DARCY, R. L. 2003. O café e a saúde humana. Documentos 1. Embrapa Café. Brasília, DF. 64 p.

FAO. 2021. Coffee. Disponível em https://www.fao.org/markets-and-trade/commodities/coffee/en/ Consultado em 22/01/2023

FARIA, C. M. D. R.; SALGADO, S. M. L.; CAMPOS, H. D.; RESENDE, M. L. V.; CAMPOS, V. P. & COIMBRA, J. L. 2003. Mecanismos de ataque e defesa na interação nematoide-planta. RAPP 11: 373-410.

FATOBENE, B. J.; ANDRADE, V. T.; GONÇALVES, W. & GUERREIRO FILHO, O. 2018. *Coffea canephora* clones with multiple resistance to *Meloidogyne incognita* and *M. paranaensis*. Experimental Agriculture 55: 443-451.

FAZUOLI, L. C. 1991. Metodologia, critérios e resultados da seleção em progênies do café Icatu com resistência a *Hemileia vastatrix*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP.

FAZUOLI, L. C. Genética e melhoramento do cafeeiro. 1986. *In*: Rena, A. B.; Malavolta, E.; Rocha, N. & Yamada, J. (eds.). Cultura dcafeeiro: fatores que afetam a produtividade do cafeeiro. Potafós. Piracicaba, SP. p. 87-113.

FAZUOLI, L. C.; CARVALHO, C. H. S.; CARVALHO, G. R.; GUERREIRO FILHO, O. G..; PEREIRA, A. A.; ALMEIDA, S. R.; MATIELLO, J. B.; BARTHOLO, G. F.; SERA, T.; MOURA, W. M.; MENDES, A. N. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G.; FERRÃO, R. G.; NACIF, A. P. & SILVAROLLA, M. B. 2007. Cultivares de café arábica (*Coffea arabica* L.). *In*: Carvalho, C. H. S. (ed.). Cultivares de café: origem, características e recomendações. Embrapa Café. Brasília, DF. p. 125-198.

FAZUOLI, L. C.; LIMA, M. M. A.; GONÇALVES, W. & COSTA, W. M. 1987. Melhoramento do cafeeiro visando resistência a nematoides: utilização de porta enxertos resistentes. *In*: Anais do CONGRESSO PAULISTA DE AGRONOMIA. Piracicaba, SP. AEASP. p. 171-180.

FAZUOLI, L. C.; MEDINA FILHO, H. P.; GUERREIRO FILHO, O.; GONÇALVES, W.; SILVAROLLA, M. B. & GALLO, P. B. 2000. Cultivares de café IAC apropriadas para plantio adensado. Fôlder. Instituto Agronômico de Campinas. Campinas, SP.

FAZUOLI, L. C.; SILVAROLLA, M. B.; SALVA, T. J. G.; GUERREIRO FILHO, O.; MEDINA FILHO, H. P. & GONÇALVES, W. 2008. Cultivares de café arábica do IAC: Um patrimônio da cafeicultura brasileira. O Agronômico 59: 12-15.

FAZUOLI, L. C.; BRAGHINI, M. T.; SILVAROLLA, M. B.; GONÇALVES, W.; MISTRO, J. C.; GALLO, P. B. & GUERREIRO FILHO, O. 2018. IAC 125 RN – A dwarf coffee cultivar resistant to leaf rust and root-knot nematode. Crop Breeding and Applied Biotechnology 18: 237-240.

FERRÃO, L. F. V.; CAIXETA, E. T.; PENA, G.; ZAMBOLIM, E. M.; COMES D. C.; ZAMBOLIM, L.; FERRATO, M. A. & SAKIYAMA, N. S. 2015. New EST–SSR markers of *Coffea arabica*: transferability and application to studies of molecular characterization and genetic mapping. Molecular Breeding 35:31.

FERRÃO, M. A. G.; FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; VERDIM FILHO, A. C. & VOLPI, P. S. 2007. Origem, dispersão geográfica, taxonomia e diversidade genética de *Coffea canephora*. *In*: Ferrão, R. G.; Fonseca, A. F. A.; Bragança, S. M.; Ferrão, M. A. G. & De Muner, L. H. (eds). Café conilon. Incaper. Vitória, ES. p. 64-91.

FERRÃO, M. A. G.; FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; VERDIN FILHO, A. C. V. & VOLPI, P. S. 2010. Origem, dispersão geográfica, taxonomia e diversidade genética de *Coffea canephora*. *In*: Ferrão, R. G.; Fonseca, A. F. A.; Bragança, S. M.; Ferrão, M. A. G. & Muner, L.H. (eds.). Café Conilon. Incaper. Vitória, ES. p. 67-91.

FERRÃO, M. A. G.; FERRÃO, R. G.; FORNAZIER, M. J.; FONSECA, A. F. A.; ALIXANDRE, F. T.; COSTA, H.; ROCHA, A. C.; ROCHA, A. C.; MORELI, A. P.; MARTINS, A. G.; SOUZA, E. M.; ARAÚJO, J. B. S.; VENTURA, J. A.; CASTRO, L. L. F. & GUARÇONI, R. C. 2009. Técnicas de produção de café arábica: Renovação e revigoramento das lavouras no estado do Espírito Santo. Circular técnica Nº 05-I. Incaper. Vitória, ES. 56 p.

FERRÃO, M. A. G.; RIVA-SOUZA, E. M.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G.; SANTOS, W. G. & SPADETO, J. 2021. Indicação de cultivares de café arábica para o estado do Espírito Santo e avaliação comparativa com o conilon em altitude elevada. Circular Técnica 6. Embrapa. Brasília, DF. 46 p.

FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G.; VERDIN FILHO, A. C.; VOLPI, P. S.; DE MUNER, L. H.; LANI, J. A.; PREZOTTI, L. C.; VENTURA, J. A.; MARTINS, D. S.; MAURI, A. L.; MARQUES, E. M. G. & ZUCATELI, F. 2012. Café conilon: Técnicas de produção com variedades melhoradas. Circular técnica Nº 03-I. Incaper. Vitória, ES. 75 p.

FERRAZ, L. C. & MACHADO, A. C. Z. 2019. Estudos morfológicos e morfométricos. *In*: Machado, A.C.Z.; Silva S. A. & Ferraz, L. C. C. B. (eds.). Métodos em nematologia agrícola. Sociedade Brasileira de Nematologia. Piracicaba, SP. p. 71-93.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ª ed. Embrapa Cenargen. Brasília, DF. 220 pp.

FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G.; FERRÃO, R. G.; VERDIN FILHO, A. C.; VOLPI, P. S. & ZUCATELI, F. 2004. Conilon Vitória – Incaper 8142: variedade clonal de café Conilon. Documento 127. Incaper. Vitória, ES. 24 p.

FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G.; FERRÃO, M. A. G. & FAZUOLI, L. C. 2007. Cultivares de café robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner). *In*: Carvalho, C. H. S. de. (ed.). Cultivares de café. Embrapa Café. Brasília, DF. p.199-218.

FONSECA, H. S. & JAENH, A. 2000. Estudos dos mecanismos de resistência em raizes de porta-enxertos de seringueira ioculadas com *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira 24: 233-237.

FONSECA, M. E. N. & BOITEUX, L. S. 2021. Biotecnologia no melhoramento genético de plantas para resistência a patógenos: Exemplos da aplicação de sistemas de seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) no tomateiro. *In*: Rios, J. A.; Almeida, L. C. & Souza, E. B. (eds.). Resistência de plantas a patógenos. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, PE. p. 121-167.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. 2001. Introdução à nematologia. 1st ed. (8ª reimpressão). Editora UFV. Viçosa, MG.

GHEYSEN, G. & FENOLL, C. 2002. Gene expression in nematode feeding sites. Annual Review of Phytophatology 40: 191-219.

GISSI, C.; IANNELLI, F. & PESOLE, G. 2008. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. Heredity 101: 301-320.

GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A. & SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). 1997. *In*: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A.; Rezende, J. A. M. (eds.). Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 3ª ed. Agronômica Ceres. São Paulo, SP. p. 184-200.

GONÇALVES, W. & SILVAROLLA, M. B. 2001. Nematoides parasitos do cafeeiro. *In*: Zambolim, L. (ed.). Tecnologias de produção de café com qualidade. UFV. Viçosa, MG. p. 199-267.

GONÇALVES, W.; ANDRADE, V. T.; FATOBENE, B. J. R.; CAIXETA, L. B.; PADILHA, L.; OLIVEIRA, C. M. G.; ROSA, J. M. O.; RODRIGUES, L. M. R. & GUERREIRO FILHO, O. 2021. Selection strategy of a *Coffea canephora* rootstock with simultaneous nematode resistance to *Meloidogyne exigua*, *M. incognita* and *M. paranaensis*. European Journal Plant Pathology 160: 81-95.

GUERRA, A. F.; SANTOS, J. F.; FERREIRA, L. T. & ROCHA, O. C. 2021. Cafés do Brasil. Pesquisa, sustentabilidade e inovação. *In*: Telhado, S. F. P. & Capdevilee, G. Tecnologias poupa-terra 2021. Embrapa. Brasília, DF. p. 63-75.

GUERREIRO FILHO, O.; FAZUOLI, L. C.; BRAGHINI, M. T.; GALLO, P. B.; OLIVEIRA, C. M. G.; PADILHA, L.; FATOBENE, B. J. R.; ANDRADE, V. T.; VASCONCELOS, L. B. C. & ROSA, J. M. O. 2023. IAC Herculândia - a *Coffea canephora* rootstock multiresistant to *Meloidogyne* species. Crop Breeding and Applied Biotechnology 23: e46322339.

GUERREIRO FILHO, O.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, G. R.; SILVAROLLA, M. B.; BOTELHO, C. E. & FAZUOLI, L. C. 2007. Origem e cassificação botânica do cafeeiro. *In*: Carvalho, C. H. S. (ed.). Cultivares de café. Embrapa. Brasília, DF. p. 23-30.

HAJIBABAEI, M.; SINGER, G. A. C.; HEBERT, P. D. N. & HICKEY, D. A. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. Trends Genetic 23:167-172.

HANDOO, Z. A.; SKANTAR, A. M.; CARTA, L. K. & SCHMITT, D. P. 2005. Morphological and molecular evaluation of a *Meloidogyne hapla* population damaging coffee (*Coffea arabica*) in Maui, Hawaii. Journal of Nematology 37: 136-145.

HASSOUNA, N.; MITHOT, B. & BACHELLERIE, J. P. 1984. The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. Nucleic Acids Research 12: 3563-3583.

HILLIS, D. M. & DIXON, M. T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. The Quarterly Review of Biology 66: 411-453.

HILLIS, D. M.; MORITZ, C. & MABLE, B. K. 1996. Molecular Systematics. Sinauer Associates. Massachusetts, USA. 665p.

HU, M. & GASSER, R. B. 2006. Mitochondrial genomes of parasitic nematodes – progress and perspectives. Trends in Parasitology 22: 78-84.

HUMPHREYS-PEREIRA, D. A.; FLORES-CHAVES, L.; GOMEZ, M.; SALAZAR, L.; GOMES-ALPIZAR, L. & ELLING, A. A. 2014. *Meloidogyne lopezi* n.sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a new root-knot nematode associated with coffee (*Coffea arabica* L.) in Costa Rica, its diagnosis and phylogenetic relationship with other coffee-parasitising *Meloidogyne* species. Nematology 16: 643-661.

HUNT, D. J. & HANDOO, Z. A. 2009. Taxonomy, identification and principal species. *In*: Perry, R.N.; Moens, N. & Starr, J. L. (eds). Root-knot nematodes. CABI. Cambridge, USA. p. 55-97.

IAC. 2022. Cultivares de café desenvolvidas pelo Instituto Agronômico (IAC) e registradas no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Registro Nacional de Cultivares (RNC). Disponível em https://www.iac.sp.gov.br/ Consultado em 23/02/2022.

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

JEPSON, S. B. 1987. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). CABI. Wallingford, UK. p.265

JEYAPRAKASH, A.; TIGANO, M. S.; BRITO, J.; CARNEIRO, R. M. D. G. & DICKSON, D. W. 2006. Differentiation of *Meloidogyne floridensis* from *M. arenaria* using high-fidelity PCR amplified mitochondrial AT-rich sequences. Nematropica 36:1-12.

JONES, J. T.; HAEGEMAN, A.; DANCHIN, E. G. J.; GAUR, H. S.; HELDER, J.; JONES, M. G. K.; KIKUCHI, T.; MANZANILLA-LÓPEZ, R.; PALOMARES-RIUS, J. E.; WESEMAEL, W. M. L. & PERRY, R. N. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 14: 946-961.

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

KANAYAMA, F. S.; SANTIAGO, D. C.; ALEGRE, C. R.; SERA, G. H.; SHIGUEOKA, L. H.; ITO, S. D.; SERA, T. & FERNANDEZ, L. 2009. Resposta das cultivares de café desenvolvidas pelo IAPAR aos nematóides *Meloidogyne paranaensis* e *M. incognita* raças 1 e 2. *In*: Anais do VI SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. 02 a 05 de junho de 2009. Vitória, ES. Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café e Embrapa Café. 6p.

KARSSEN, G. & MOENS. M. 2006. Root-knot nematodes. *In*: Perry, R.L. & Moens, M. (eds.). Plant Nematology. CABI North American Office. Cambridge, USA. p. 59-90.

KARSSEN, G.; WESEMAEL, W. & MOENS, M. Root-knot nematodes. 2013. *In*: Perry, R. N. & Moens, M. (eds.). Plant Nematology. 2nd ed. CAB International. Wallingford, UK. p. 73-108.

KOBAYASHI, T. 2011. Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast. Celular and Molecular Life Sciences 68:1395-1403.

LANDA, B. B.; RIUS, J. E. P.; VOVLAS, N.; CARNEIRO, R.; MALEITA, C. M. N.; ABRANTES, I. M. D. & CASTILLO, P. 2008. Molecular characterization of *Meloidogyne hispanica* (Nematoda, Meloidogynidae) by phylogenetic analysis of genes within the rDNA in *Meloidogyne* spp. Plant Disease 92: 1104-1110.

LASHERMES, P.; ANDRADE, A. C. & ETIENNE, H. Genomics of coffee, one of the world's largest traded commodities. 2008. *In*: Moore, P.H. & Ming, R. (eds.). Genomics of tropical crop plants. Springer. Nova York, US. p. 203-226.

LASHERMES, P.; ANDRZEJEWSKI, S.; BERTRAND, B.; COMBES, M. C.; DUSSERT, S.; GRAZIOSI, G.; TROUSLOT, P. & ANTHONY, F. 2000. Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). Theoretical and Applied Genetics 100: 139-46.

LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F. & CHARRIER, A. 1999. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. Molecular Genetics and Genomics 261:259-266.

LE, T. M. L.; NGUYEN, T. D.; NGUYEN, H. T.; LIEBANAS, G.; NGUYEN, T. A. D. & TRINH, Q. P. 2019. New root-knot nematode, *Meloidogyne moensi* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), Parasitizing robusta coffee from Western Highlands, Vietnam. Helminthologia 55: 229-246.

LIMA, E. A.; FURLANETTO, C.; NICOLE, M.; GOMES, A. C. M. M.; ALMEIDA, M. R. A.; ALDEMIRO, J. J.; CORREA, V. R.; SALGADO, S. M.; FERRÃO, M. A. G. & CARNEIRO, R. M. D. G. 2015. The multi-resistant reaction of drought-tolerant *Coffea* "conilon Clone 14" to *Meloidogyne* spp. and late hypersensitive-like response in *Coffea canephora*. Phytopathology 105: 805-814.

LIMA, E. A.; FURLANETTO, C.; SOUSA, M. G.; MENEZES, A. C.; SOUSA, F. R.; ALMEIDA, M. R. A.; SÉRGIO JÚNIOR, A.; FERRÃO, M. A. & CARNEIRO, R. M. D. G. 2013. Resistência múltipla a resposta de hipersensibilidade do cafeeiro 'conilon 14' a *Meloidogyne* spp. *In*: Anais do VII SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. 25 a 28 de novembro de 2013, Salvador, BA. Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, EPAMIG, UFLA e Embrapa café.

LIMA, I. M.; VENTURA, J. A.; COSTA, H.; VOLPI, P. S.; FERRÃO, M. A. G.; VERDIN FILHO, A. C.; FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A. & COMÉRCIO, M. 2022. 'ES8161 Goytacá': porta-enxerto clonal de café conilon resistente a nematoide-das-galhas. Documento

293. Incaper. Vitória, ES. 8 p.

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

LORDELLO, L. G. E. & MELLO FILHO, A.T. 1970. Mais um nematóide ataca o cafeeiro. Revista da Agricultura 45: 102.

MAPA. 2022. Café no Brasil e ementário do café. https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura-brasileira Consultado em 13/08/2024.

MAPA. 2023. Brasil é o maior produtor mundial e o segundo maior consumidor de café. https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/brasil-e-o-maior-produtor-mundial-e-o-segundo-maior-consumidor-de-cafe Consultado em 02/07/2024.

MAPA. 2024. Cultivares ou espécies registradas. https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/sementes-e-mudas/registro-nacional-de-cultivares/cultivares-ou-especies-registradas Consultado em 30/08/2024.

MAURIN, O.; DAVIS, A. P.; CHESTER, M.; MVUNG, E. F.; JAUFEERALLY-FAKIM, Y. & FAY, M. F. 2007. Towards a phylogeny for *Coffea* (Rubiaceae): identifying well-supported lineages based on nuclear and plastid DNA sequences. Annals of Botany 100: 1565-1583.

MEDINA FILHO, H. P. & BORDIGNON, R. 2007. Melhoramento do café arábica ao longo dos anos. *In*: Carvalho, C. H. S. (ed.). Cultivares de café. Embrapa. Brasília, DF. p. 65-82.

MELO, B. & SOUSA, L. B. 2011. Biologia da reprodução de *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre. Revista Verde 6: 01-07.

MENDES, A. N. G.; CARVALHO, G. R.; BOTELHO, C. E.; FAZUOLI, L. C. & SILVAROLLA, M. B. 2007a. História das primeiras cultivares de café plantadas no Brasil. *In*: Carvalho, C. H. S. (ed.). Cultivares de café. Embrapa. Brasília, DF. p. 57-64.

MENDES, A. N. G.; CARVALHO, G. R.; BOTELHO, C. E.; FAZUOLI, L. C. & SILVAROLLA, M. B. 2007b. Cultivares de importância histórica ou para a pesquisa. *In*: Carvalho, C. H. S. (ed.). Cultivares de café. Brasília, Embrapa, DF. p. 219-231.

MENDES, B. V.; FERRAZ, S. & SHIMOYA, C. 1977. Observações histopatologicas de raízes de cafeeiro parasitadas por *Meloidogyne exigua* Goldi, 1887. Nematologia Brasileira 2: 207-229.

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

MESQUITA, C. M.; MELO, E. M.; REZENDE, J. E.; CARVALHO, J. S.; FABRI JÚNIOR, M. A.; MORAES, N. C., DIAS, P. T.; CARVALHO, R. M. & ARAÚJO, W. G. 2016. Manual do café: implantação de cafezais *Coffea arabica* L. EMATER. Belo Horizonte, MG. 72p.

MOENS, M.; PERRY, R. N. & STAR, J. L. 2009. *Meloidogyne* species - a diverse group of novel and important plant parasites. *In*: Moens, M.; Perry, R. & Starr, J. L. (eds.). Root-knot nematodes. CAB International. Wallingford, UK. p. 1-17.

MONTEIRO, J. S.; CARES, J. E.; GOMES, A. M.; CORREA, V. R.; MATTOS, V. S.; SANTOS, M. A.; ALMEIDA, M. R. A.; SANTOS, C. G.; CASTAGNONE-SERENO, P. & CARNEIRO, R. M. D. G. G. 2016. First report of, and additional information on, *Meloidogyne konaensis* (Nematoda: Meloidogyninae) parasitising various crops in Brazil. Nematology 18: 831-844.

MORAES, M. V & FRANCO, C. M. 1987. Método expedito para enxertia em café. IBC, Campinas, 16p.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G. & ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative 51: 263-273.

MUNDO-OCAMPO, M.; TROCCOLI, A.; SUBBOTIN, S. A.; DEL CID, J.; BALDWIN, J. G. & INSERRA, R. N. 2008. Synonomy of *Afenestrata* with *Heterodera* supported by phylogenetics with molecular and morphological characterisation of *H. koreana* comb. n. and *H. orientalis* comb. n. (Tylenchida: Heteroderidae). Nematology 10: 611-632.

MUNIZ, M. F. D.; CAMPOS, V. P.; MOITA, A. W.; GONÇALVES, W.; ALMEIDA, M. R. A. & SOUZA, F. R.de; CARNEIRO, R. M. D. G. 2009. Reaction of coffee genotypes to different populations of *Meloidogyne* spp.: detection of a naturally virulent *M. exigua* population. Tropical Plant Pathology 34: 379-378.

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

NAGAY, J. H. C. 1999. Café no Brasil: Dois séculos de história. Formação Econômica 3: 17-23.

NAZAR, R. N.; SITZ, T. O. & BUSCH, H. 1976. Sequence homologies in mammalian 5.8S ribosomal RNA. Biochemistry 15: 505-508.

NOIR, S.; ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; COMBRES, M. C.; & LASHERMES, P. 2003. Identification of major gene (*Mex*-1) from *Coffea canephora* confering resistance to *M. exigua* in *Coffea arabica.* Plant Pathology 52: 97-103.

NUNES, G. H. S.; FERREIRA, R. R.; NUNES, E. W. L. P. & MARTINS, A. F. 2021. A biotecnologia aplicada ao melhoramento genético de plantas a patógenos. *In*: Rios, J. A.; Almeida, L. C. & Souza, E. B. (eds.). Resistência de plantas a patógenos. 1ª ed. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, PE. p. 70-90.

OLIVEIRA, A. C. B.; PEREIRA, A. A.; CAIXETA, E. T.; RESENDE, M. D. V. & RIBEIRO, M. F. 2021. Cultivares de café resistentes à ferrugem: alternativa viável para a cafeicultura das Matas de Minas. Documentos 14. Embrapa Café. Brasília, DF. 46p.

OLIVEIRA, D. S. 2006. Patogenicidade de populações de *Meloidogyne incognita*, provenientes de Minas Gerais e São Paulo, ao cafeeiro. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.

PADILHA, L.; CARVALHO, G. R. & EIRA, M. T. S. 2007. Colheita, preparo e armazenamento de sementes de café. *In*: Carvalho, C. H. S. (ed.). Cultivares de café. Embrapa. Brasília, DF. p. 239-244.

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

PEREIRA, A. A. & BAIAO, A. C. 2015. Cultivares. *In*: Sakiyama, N.; Martinez, H.; Tomaz, M. & Borém, A. (eds.). Café arábica do plantio à colheita. 1ª ed. UFV. Viçosa, MG. 316 p.

PERES, A. C. J.; SALGADO, S. M. L.; CORREA, V. R.; SANTOS, M. F. A.; MATTOS, V. S.; MONTEIRO, J. M. S. & CARNEIRO, R. M. D. G. 2017. Resistance of *Coffea arabica* genotypes against *Meloidogyne paranaensis* and *M. incognita* under controlled and field conditions, Nematology19: 617-627.

PERRY, R. N. & MOENS, M. 2011. Survival of parasitic nematodes outside the host. *In*: Perry, R. N. & Wharton, D. A. (eds.). Molecular and physiological basis of nematode survival. CABI Publishing. Wallingford, UK. p. 1-27.

PINHEIRO, H.A.; DA MATTA, F. M.; CHAVES, A. R. DE M.; LOUREIRO, M. E. & DUCATTI, C. 2005. Drought tolerance is associated with root depth and stomatal control of water use in clones of *C. canephora*. Annals of Botany 96: 101-108.

POWERS, T. 2004. Nematode molecular diagnostic. Annual Review of Phytopathology 42: 367-383.

POWERS, T.O. & HARRIS, T.S. 1993. A polymerase chain reaction method for the identification of five major *Meloidogyne* species. Journal of Nematology 25: 1-6.

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

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

RAVICHANDRA, N. G. 2014. Horticultural nematology. Springer India. New Delhi. 412 p.

REINA, E. H. 1966. La técnica del injerte hipocotiledonar del cafeto para el control de nematodos. Turrialba **7**: 5-11.

REZENDE, R. M.; ANDRADE, V. T.; SALGADO, S. M. L.; REZENDE, J. C.; MENEZES, J. O. & CARVALHO, G. 2017. Genetic gain in the resistance of arabica coffee progenies to root-knot nematode. Crop Science 57:1355-1362.

ROBERTS, D.; OLIVEIRA, C. M. G.; NEILSON, R. & BLOK, V. 2016. Diagnose molecular de nematoides parasitos de plantas. *In*: Oliveira, C. M. G.; Santos, M.A. & Castro, L. H. S. Diagnose de fitonematoides. Millennium Editora. Campinas, SP. p.278-320.

ROBERTS, P. A. 2002. Concepts and consequences of resistance. *In*: Starr, J. L.; Cook, R. & Bridge, J. (eds.). Plant resistance to parasitic nematodes. CABI. Wallingford, UK. p.23-42.

ROBERTS, P.A.; MATTHEWS, W.C. & VEREMIS, J. C. 1998. Genetic mechanisms of host-plant resistance to nematodes. *In*: Pederson, G.A.; Windham, G. L. & Barker, K. R. (eds). Plant–nematode interactions. Agronomy Society of America. Madison. Wisconsin. p. 209-238.

RUFINO, J. L. S. 2006. Programa Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento do Café: antecedentes, criação e evolução. Embrapa Café. Brasília, DF. 348 p.

SAIGUSA, T. 1957. On the egg development and its morphological observations of the root-knot nematode, *Meloidogyne* spp. Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology 1: 238-243.

SAIKI, R.; GELFAND, D.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.; HIGUCHI, R.; HORN, G.; MULLIS, K. & ERLICH, H. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.

SALGADO, S. M. de L.; CARNEIRO, R. M. D.G. & PINHO, R. S. C. 2011. Aspectos técnicos dos nematoides parasitas do cafeeiro. Boletim Técnico 98. EPAMIG. Belo Horizonte, MG. 60 p.

SALGADO, S. M. L. & REZENDE, J. C. 2010. Manejo de fitonematoides em cafeeiro. *In*: Reis, P. & Cunha, R. L. Café arábica do plantio à colheita. v.1. EPAMIG. Lavras, MG. p.757-804.

SALGADO, S. M. L.; FATOBENE, B. J. dos R.; TERRA, W. C. & CARNEIRO, R. M. D. G. 2021. Nematoides parasitas do cafeeiro: aspectos gerais e controle. Boletim Técnico 111. EPAMIG. Belo Horizonte, MG. 56 p.

SALGADO, S. M. L.; FATOBENE, B. J. R.; PEREIRA, A. A.; ABRAHÃO, J. C. R.; BOTELHO, C. E.; CARVALHO, G. R.; OLIVEIRA, A. C. B.; FERREIRIA, A. D.; FIGUEIREDO, V. C.; VILELA, D. J. M.; LUZ, S. R. O. T. & ANDRADE, V. T. 2022. MGS Guaiçara and MGS Vereda: *Coffea arabica* cultivars resistant to the root-knot nematode *Meloidogyne paranaensis.* Crop Breeding and Applied Biotechnology 22: e42132236.

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

SALGADO, S. M. L.; REZENDE, J. C. & NUNES, J. A. R. 2014. Selection of coffee progenies for resistance to nematode *Meloidogyne paranaensis* in infested area. Crop Breeding and Applied Biotechnology 14: 94-101.

SALGADO, S. M. L.; PEREIRA, T. B. & ABREU, F. A. 2008. Cafeicultor: Atenção com os nematoides que parasitam o cafeeiro. Circular Técnica 37. EPAMIG. Belo Horizonte, MG. 2p.

SALGADO, S. M. L.; RESENDE, M. L.V. & CAMPOS, V. P. 2005. Reprodução de *Meloidogyne exigua* em cultivares de cafeeiros resistentes e susceptíveis. Fitopatologia Brasileira 30: 413-415.

SANTOS, M. F. A.; FURLANETTO, C.; ALMEIDA, M. R. A.; CARNEIRO, R. M. D. G.; MOTA, F. C.; SILVEIRA, N. O. R.; SILVA, J. G. P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; TIGANO, M. S. & CARNEIRO, R. M. D. G. 2012. Biometrical, biological and molecular characteristics of *Meloidogyne incognita* isolates and related species. European Journal Plant Pathology 134: 671-684.

SANTOS, M. F. A.; CORREA, V. R.; PEIXOTO, J. R.; MATTOS, V. S.; SILVA, J. G. P.; MOITA, A. W.; SALGADO, S. M. L.; CASTAGNONE-SERENO, P. & CARNEIRO, R. M. D. G. 2018. Genetic variability of *Meloidogyne paranaensis* populations and their aggressiveness to susceptible coffee genotypes. Plant Pathology 67: 193-201.

SANTOS, M. F. A.; MATTOS, V. S.; GOMES, A. C. M. M.; MONTEIRO, J. M. S.; SOUZA, D.A.; TORRES, C. A. R.; SALGADO, S. M. L.; CASTAGNONE-SERENO, P. & CARNEIRO, R. M. D. G. 2020. Integrative taxonomy of *Meloidogyne paranaensis* populations belonging to different esterase phenotypes. Nematology 22: 453-468.

SANTOS, M. F. A.; SALGADO, S. M. L.; SILVA, J. G. P.; CORREA, V. R.; CARNEIRO, R. M. D. G. 2017. First report of *Meloidogyne incognita* parasitizing coffee plants in southern Minas Gerais, Brazil. Tropical Plant Pathology 100: 25-28.

SEMBLAT, J. P.; BONGIOVANNI, M.; WAJNBERG, E.; DALMASSO, A.; ABAD, P. & CASTAGNONE-SERENO, P. 2000. Virulence and molecular diversity of parthenogenetic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. Heredity 84: 81-89.

SEMBLAT, J. P.; WAJNBERG, E.; DALMASSO, A.; ABAD, P. & CASTAGNONE-SERENO, P. 1998. High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis. Molecular Ecology 7:119-125.

SERA, G. H.; MACHADO, A. C. Z.; ITO, D. S.; SHIGUEOKA, L. H.; SILVA, A. & SERA, T. 2020. IPR 106: new Arabica coffee cultivar, resistant to some *Meloidogyne paranaensis* and *M. incognita* nematode populations of Paraná. Crop Breeding and Applied Biotechnology 20: e30552031.

SERA, G. H.; SERA, T.; AZEVEDO, J. A. & MATA, J. S.; RIBEIRO-FILHO, C.; DOI, D. S.; ITO, D. S. & FONSECA, I. C. 2006. Porta-enxertos de café robusta resistentes aos nematoides *Meloidogyne paranaensis* e *M. incognita* raças 1 e 2. Ciências Agrárias 27:171-184.

SERA, G. H.; SERA, T.; ITO, D. S.; MATA, J. S.; DOI, D. S.; AZEVEDO, J. A. & RIBEITO

FILHO, C. 2007. Progênies de *Coffea arabica* cv IPR-100 resistentes ao nematoide *Meloidogyne paranaensis*. Bragantia 66: 43-49.

SERA, G.H.; SERA, T.; ITO, D. S.; DOI, D. S.; RIBEIRO-FILHO, C.; MATA, J. S & AZEVEDO J. A. 2005. Avaliação de cultivares de café arábica para resistência de campo a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em região quente do Paraná. SBPN Scientific Journal 9: 26-27.

SERA, T. & SERA, G. H. 2013. IPR 107 – Dwarf arabic coffee cultivar with resistance to coffee leaf rust. Crop Breeding and Applied Biotechnology 13: 215-217.

SERA, T.; SERA, G. H. & FAZUOLI, L. C. 2013b. IPR 103 – Rustic dwarf arabic coffee cultivar more adapted to hot regions and poor soils. Crop Breeding and Applied Biotechnology 13: 95-98.

SERA, T.; SERA, G. H.; FAZUOLI, L. C. & BETTENCOURT, A. J. 2013a. IPR 99 - Dwarf arabica coffee cultivar resistant to coffee ringspot virus. Crop Breeding and Applied Biotechnology 13: 91-94.

SERA, T.; SERA, G. H.; FAZUOLI, L. C.; MACHADO, A. C. Z.; ITO, D. S.; SHIGUEOKA, L. H. & SILVA, S. A. 2017. IPR 100 – Rustic dwarf arabica coffee cultivar with resistance to nematodes *Meloidogyne paranaensis* and *M. incognita.* Crop Breeding and Applied Biotechnology 17: 175-179.

SILVA, E. H.; MATTOS, V. S.; FURLANETO, C.; GIBAND, M.; BARROSO, P. A. V.; MOITA, A. W.; JORGE-JUNIOR, A.; CORREA, V. R.; CASTAGNONE-SERENO, P. & CARNEIRO, M. D. G. C. 2014. Genetic variability and virulence of *Meloidogyne incognita* populations from Brazil to resistant cotton genotypes. European Journal of Plant Pathology 139:195-204.

SILVA, R. V.; OLIVEIRA, R. D. L.; PEREIRA, A. A. & SÊNI, D. J. 2007. Respostas de genótipos de *Coffea* spp. a diferentes populações de *Meloidogyne exigua*. Fitopatologia Brasileira 32: 205-212.

SILVAROLLA, M. B.; GONÇALVES, W.; LIMA, M. M. A. 1998. Resistência do cafeeiro a nematoides – reprodução de *Meloidogyne exigua* em cafeeiros derivados da hibridização de *Coffea arabica* com *C. canephora*. Nematologia Brasileira 22:51-59.

SKANTAR, A. M. & CARTA, L. K. 2004. Molecular characterization and phylogenetic evaluation of the Hsp90 gene from selected nematodes. Journal of Nematology 36: 466-480.

SKANTAR, A. M.; CARTA, L. K. & HANDOO, Z. A. 2008. Molecular and morphological characterization of an unusual *Meloidogyne arenaria* population from traveler's tree *Ravenala madagascariensis*. Journal of Nematology 40: 179-189.

SOUZA, F. F.; FERRÃO, L. F. V.; CAIXETA, E. T.; SAKIYAMA, N. S.; PEREIRA, A. A. & OLIVEIRA, A. C. B. 2015. Aspectos gerais da biologia e da diversidade genética de *Coffea canephora*. *In*: Marcolan, A. L. & Espindula, M. C. (eds.). Café na Amazônia. Embrapa. Brasília, DF. p.84-98.

SOUZA, F. F.; SANTOS J. C. F.; COSTA, J. N. M. & SANTOS, M. M. 2004. Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia. Documentos 93. Embrapa Rondônia. Porto Velho, RO. 21p.

SOUZA, R. M. 2008. Plant-parasitic nematodes of coffee. Springer. Berlin, Germany. p.340.

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

SPOONER, D.; TREUREN, R. & VICENTE, M. C. 2005. Molecular markers for genebank management. IPGRI Technical Bulletin, 10. International Plant Genetic Resources Institute. Rome. 126 p.

STARR, J. L.; BRIDGE, J. & COOK, R. 2002. Resistance to plant-parasitic nematodes: history, current use and future potential. *In*: Starr, J. L.; Cook, R. & Bridge, J. (eds). Plant resistance to parasitic nematodes. CAB International. Wallingford, UK. p. 1-22.

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

TANG, S. & HYMAN, B. C. 2007. Mitochondrial genome haplotype hypervariation within the isopod parasitic nematode *Thaumamermis cosgrovei*. Genetics 176: 1139-1150.

TAYLOR, A. L. & SASSER, J. N. 1983. Biología, identificación y control de los nematodos del nódulo de la raíz (*Meloidogyne* sp.). Proyecto Internacional de *Meloidogyne.* Universidad del Estado de Carolina del Norte. Carolina del Norte. 111 pp.

TIGANO, M.; DE SIQUEIRA, K.; CASTAGNONE-SERENO, P.; MULET, K.; QUEIROZ, P.; DOS SANTOS, M.; TEIXEIRA, C.; ALMEIDA, M.; SILVA, J. & CARNEIRO, R. 2010. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* and development of a SCAR marker for this guava-damaging species. Plant Pathology 59: 1054-1061.

TRIANTAPHYLLOU, A. C. 1985. Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. *In*: Sasser, J. N. & Carter, C. C. (eds.). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Biology and Control. North Carolina State University Graphics. Raleigh, NC. p. 113-126.

TRINH Q.; LE, T.; NGUYEN, T.; NGUYEN, H.; LIEBANAS, G. & NGUYEN, T. 2019. *Meloidogyne daklakensis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a new root-knot nematode associated with robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) in the Western Highlands. Vietnam. Journal of Helminthology 93:242-254.

VALOIS, A. C. C.; PAIVA, J. R.; FERREIRA, F. R.; SOARES FILHO, W. S. S. & DANTAS, J. L. L. 2001. Melhoramento de espécies de propagação vegetativa. *In*: Nas, L. L.; Valois, A. C. C.; Melo, I. S. & Valadares-Inglis, M. C. Recursos genéticos e melhoramentos-plantas. Fudação MT. Rondonópolis, MT. p. 283-291.

VENTURA, J. A.; COSTA, H. & LIMA, I. M. 2017. Manejo das doenças do cafeeiro conilon.

In: Ferrão, R. G.; Fonseca, A. F. A.; Ferrão, M. A. G. & Muner, L. H. (eds.) Café Conilon. Incarper. Vitória, ES. p. 434-479.

VILLAIN, L.; SALGADO, S. M. L. & TRINH, P. Q. 2018. Nematodes parasites of coffee and cocoa. *In*: Sikora, R. A., Coyne, D. L., Hallman, J. & Timper, P. (eds). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 3rd edition. CAB International. Wallingford, UK. p. 536-583.

VILLAIN, L.; SARAH J. L.; HERNÁNDEZ, A.; BERTAND, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P.; CHARMENTANT, P.; ANZUETO, F.; FIGUEROA, P. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2013. Diversity of root-knot nematodes associated with coffee orchards in Central America. Nematropica 43:194-206.

VINECKY, F.; ALVES, G. S. C.; VIEIRA, N. G.; FREIRE, L. P.; HEIMBECK, I. G. R.; FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G.; SILVA, V. A.; MARRACCINI, P. & ANDRADE, A. C. 2008. Análises da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (Qpcr) de genes candidatos para a tolerância à seca em cafeeiro. *In*: Anais do VII SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. 22 a 25 de Agosto de 2011. Araxá , MG. Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, EPAMIG, UFLA e Embrapa café. 6p.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. V.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KULPER, M. & ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Nucleic Acid Research 23: 4404-4414.

WELSH, J. & MCCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research 18: 7213-7218.

WILLAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.

WILSON, A. C; CAN, R. L.; CARR, S. M.; GEORGE, M.; GYLLENSTEN, U. B.; HELM-BYCHOWSKI, K. M.; HIGUCHI, R. G.; PALUMBI, S. R.; PRAGER, E. M.; SAGE, R. D.; & STONEKING, M. 1985. Mitochondria1 DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Biological journal of the Linnean Sociey 26: 375-400.

ZIJLSTRA, C.; DONKERS-VENNE, D. T. H. M. & FARGETTE, M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, and *Meloidogyne arenaria* using sequence characterized amplified regions (SCAR) based PCR assays. Nematology 2: 847-853.

CAPÍTULO 1

LEVANTAMENTO DE *Meloidogyne* spp. **EM CAFEEIROS NA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO E COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO ENZIMÁTICO E MOLECULAR**

Levantamento de *Meloidogyne* spp. **em cafeeiros na região do Triângulo Mineiro e comparação entre as técnicas de diagnóstico enzimático e molecular.**

RESUMO

Os nematoides-das-galhas (NGs), *Meloidogyne* spp. são considerados patógenos importantes na cultura do café, que limitam a produção e causam perdas econômicas. O nematoide *Meloidogyne izalcoensis* foi detectado recentemente na região do Triângulo Mineiro, estado de Minas Gerais (MG), parasitando plantas de café. Para investigar principalmente a distribuição de *M. izalcoensis* na região do Triângulo Mineiro onde foram feitas as primeiras detecções deste patógeno (municípios de Araguari e Indianópolis), foram realizados dois levantamentos prospectivos visando espécies de *Meloidogyne* em cafezais, empregando duas técnicas de identificação diferentes: fenótipos de esterase (Est) e marcadores SCAR. No segundo levantamento, o alto nível de degeneração das fêmeas impossibilitou a identificação das espécies usando fenótipos de esterase. Em ambos os levantamentos, o Kit SCAR-café provou ser altamente eficaz na identificação precisa de todas as espécies de *Meloidogyne* encontradas em plantas de café, especialmente *M. exigua*. Utilizando ovos e juvenis de segundo estágio (J2s) extraídos de raízes de café, foram obtidos DNAs confiáveis para a identificação de *M. exigua* (41,67%), *M. incognita* (33,33%), *M. paranaensis* (20,83%) e *M. izalcoensis* (4,17%), que podem ser usados como ferramentas únicas em multiplex na caracterização de *Meloidogyne* spp. do café. Espécies presentes em mistura de populações também foram observadas em 20,83% das amostras. O uso de marcadores SCAR provou ser a ferramenta mais eficaz para identificar com precisão *M. exigua* e espécies em mistura de populações. Essas pesquisas confirmaram que *M. izalcoensis* tem uma ocorrência ainda restrita à região onde foi inicialmente detectado.

Palavras-chave: α-esterases, café, marcadores SCAR, nematoides-das-galhas.

Survey of *Meloidogyne* spp. **on coffee in the Triângulo Mineiro region and comparison between enzymatic and molecular diagnostic techniques.**

ABSTRACT

Root-knot nematodes (RKNs), *Meloidogyne* spp. are considered important pathogens of the coffee crop, limiting production and causing economic losses. *Meloidogyne izalcoensis* was recently detected parasitizing coffee plants in the Triângulo Mineiro region, Minas Gerais (MG) state of Brazil, parasitizing coffee plants. To investigate the distribution of this particular nematode species in this region, two prospective surveys targeting *Meloidogyne* spp. on coffee plantations were carried out, employing two different techniques (esterase phenotypes (Est) and SCAR markers) in the municipalities of Araguari and Indianópolis where *M. izalcoensis* had been previously detected. Unfortunately, the high level of female degeneration in the second survey prevented us from identifying the species using esterase phenotypes. In both surveys, we employed the SCAR-coffee Kit, which proved to be highly effective in accurately identifying all the species of *Meloidogyne* found in coffee plants, especially *M. exigua*. By using eggs and second stage juveniles (J2s) extracted from coffee roots, we obtained reliable markers for the identification of *M. exigua* (41.67%), *M. incognita* (33.33%), *M. paranaensis* (20.83%) and *M. izalcoensis* (4.17%), which can be used as unique tools in multiplex in the characterization of *Meloidogyne* spp. from coffee. Populations of mixed species were also observed in 20,83% of the samples. The use of SCAR markers proved to be the most effective tool for accurately identifying *M. exigua* and and other species in mixed populations. These surveys confirmed that *M. izalcoensis* has a restricted occurrence in the region where it was initially detected.

Keywords: α-esterases, coffee, SCAR markers, root-knot nematodes.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o maior produtor e exportador mundial de café (*Coffea arabica* L. e *C. canephora* Pierre), e também o segundo maior consumidor deste produto (Mapa, 2023). Na safra de 2024, o país atingiu uma produção média de 58,81 milhões de sacas, sendo que 50% do café brasileiro é proveniente do estado de Minas Gerais (Conab, 2024).

A cultura do café está sujeita ao ataque de pragas e doenças, que podem limitar a produção e causar perdas econômicas. Dentre elas, as espécies de nematoides pertencentes ao gênero *Meloidogyne* Göldi, 1887, comumente conhecidas como nematoides-das-galhas (NGs), estão entre patógenos considerados mais importantes dessa cultura, podendo ser responsáveis por perdas de produtividade de aproximadamente 36% em todo o mundo (Hein & Gatzweiler, 2006; Lima *et al*., 2015; Villain *et al*., 2018). Até o momento, 18 espécies de *Meloidogyne* foram relatadas parasitando cafeeiros, incluindo *M. izalcoensis* Carneiro *et al*., 2005 (Carneiro & Santos, 2022), que recentemente teve seu primeiro relato no Brasil, parasitando cafeeiros no município de Indianópolis, na região do Triângulo Mineiro, Minas Gerais (Stefanelo *et al*., 2019), onde a cafeicultura tem significativa importância social e econômica.

Nos cafezais brasileiros, entre as principais espécies de nematoides do gênero *Meloidogyne* que causam danos à cultura, *M. exigua* Göldi, 1887 é endêmica e a espécie mais frequente, seguida por *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 e *M. paranaensis* Carneiro *et al*., 1996 (Villain *et al*., 2018; Carneiro & Santos, 2022). No entanto, *M. paranaensis* e *M. incognita* são consideradas as mais prejudiciais à cultura do café, devido à agressividade e capacidade de persistir no solo por longos períodos, ampliando seu impacto negativo na cultura (Villain *et al*., 2018; Salgado *et al*., 2021). Os sintomas causados por NGs nas raízes de cafeeiro podem diferir entre as espécies. Por exemplo, *M. exigua* causa inúmeras galhas pequenas a grandes, arredondadas ou alongadas, principalmente em raízes novas e esbranquiçadas, enquanto *M. paranaensis* e *M. incognita* induzem sintomas distintos em

plantas de café, incluindo a formação de galhas pequenas e alongadas e engrossamento nas raízes mais jovens, descamação e rachaduras na superfície da raiz devido à hipertrofia dos tecidos infectados e rupturas do córtex e da epiderme, o que pode resultar na destruição completa do sistema radicular (Carneiro & Cofcewicz, 2008; Lopez-Lima *et al*., 2014; Villain *et al*., 2018; Carneiro & Santos, 2022). Os sintomas radiculares induzidos por *M. izalcoensis* são completamente diferentes daqueles causados por *M. paranaensis*, *M. incognita*, *M. arabicida* Lopez & Salazar, 1989 e *M. exigua*. Essa espécie em particular causa pequenas galhas típicas, principalmente nas extremidades de raízes recém-formadas, com necrose do tecido. Além disso, *M. izalcoensis* exibe um comportamento notável, produzindo grande quantidade de massas de ovos externas às raízes (Carneiro *et al*., 2005a; Stefanelo *et al*., 2019; Carneiro & Santos, 2022).

Para evitar a disseminação desses nematoides para regiões não insfestadas, é essencial uma compreensão abrangente da distribuição atual das espécies de NGs e adotar medidas para conter o foco da doença (Santos *et al*., 2018; Carneiro & Santos, 2022). A identificação precisa das espécies é um aspecto muito importante, pois facilita a seleção de medidas de controle apropriadas e permite a implementação de testes de resistência eficazes em programas de melhoramento de plantas (Randig *et al*., 2002; Correa *et al*., 2013). Esse conhecimento desempenha um papel fundamental no gerenciamento e mitigação do impacto dessas pragas destrutivas. Métodos bioquímicos e moleculares, como eletroforese de isoenzimas (esterases) e marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) são ferramentas importantes e têm sido usadas na identificação de espécies de *Meloidogyne* (Carneiro *et al*., 2016; Carneiro & Santos, 2022).

A análise de isoenzimas apresenta algumas vantagens, como baixo custo, reprodutibilidade, rapidez, detecção de espécies de NGs crípticas e mistura de espécies (Carneiro & Almeida, 2001; Ito *et al*., 2019; Carneiro & Santos, 2022). No entanto, essa técnica

requer o uso de fêmeas intactas, o que às vezes se torna um fator limitante em amostras de raízes de café, uma vez que é uma planta perene e as amostras de raízes são frequentemente enviadas para laboratórios com sintomas severos, em condições precárias para o uso dessa técnica de esterase. Além disso, essa técnica enfrenta outra limitação quanto à detecção de *M. exigua*, pois as fêmeas dessa espécie são caracterizadas por seu pequeno tamanho e baixa concentração de α-esterase (Santos *et al*., 2021; Carneiro & Santos, 2022). Os marcadores SCAR do tipo espécie-específicos foram estabelecidos por Randig *et al*. (2002, 2004) para resolver esse problema e identificar as três principais espécies de NGs do café ocorrentes no Brasil (*M. exigua*, *M. paranaensis* e *M. incognita*). O kit de diagnóstico SCAR-café incorpora primers espécie-específicos que foram expandidos para outras espécies de NGs do café presentes nas Américas: *M. arabicida* e *M. izalcoensis* (Correa *et al*., 2013). Essa técnica pode ser aplicada efetivamente em reações PCR multiplex usando uma combinação de primers, o que permite a identificação precisa de espécies, detecção de misturas de espécies e facilita o diagnóstico rápido (Randig *et al*., 2002; Correa *et al*., 2013).

Considerando a importância do estado de Minas Gerais como o maior produtor de café no Brasil e o recente relato de *M. izalcoensis* na região do Triângulo Mineiro, o objetivo desse estudo foi investigar a ocorrência e distribuição de *Meloidogyne* spp. em cafezais dessa região, com ênfase em *M. izalcoensis*, comparando as técnicas de eletroforese de isoenzimas (α-esterases) e marcadores moleculares específicos (SCAR-PCR-café), estabelecidos para as espécies de NGs do cafeeiro como ferramentas de diagnóstico para identificação rápida e precisa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção de amostras de raízes

Dois levantamentos foram realizados em cafezais localizados nos municípios de Araguari e Indianópolis, ambos pertencentes à região do Triângulo Mineiro, no estado de Minas Gerais. O primeiro levantamento foi realizado em novembro de 2018 e o segundo em novembro de 2021, ambos durante a estação chuvosa.

As amostras de raízes foram sempre coletadas de cafeeiros com sintomas de meloidoginose. No primeiro, foram coletadas nove amostras de raízes em nove cafezais (Tabela 1), e entre elas, raízes de soja 'BRS Favorita RR1', na mesma área anteriormente plantada com café em 2017, e onde havia sido detectada *M. izalcoensis*. As plantas de café das áreas amostradas apresentavam sintomas mais leves de meloidoginose e as raízes coletadas foram mais novas, permitindo a análise das esterases e marcadores SCAR. No segundo, foram coletadas quinze amostras de raízes em quinze cafezais (Tabela 2) e as raízes das plantas amostradas estavam mais danificadas, impossibilitando a análise usando as esterases. Dessa maneira, as raízes foram analisadas apenas usando o kit SCAR café em multiplex (Randig *et al*., 2002; Correa *et al*., 2013). Nesse, por sua vez foi coletado todo o sistema radicular dos cafeeiros.

Em cada talhão do cafezal amostrado, foi coletada uma amostra composta por raízes (aprox. 500g) e solo (aprox. 2000 cm^3), a uma profundidade que variou de 0-60 cm conforme as Tabelas 1 e 2. As coordenadas geográficas e a altitude foram registradas com auxílio de um GPS de Navegação, e ao final de cada coleta, foi realizada a limpeza dos instrumentos utilizados para evitar a disseminação de nematoides entre áreas e propriedades, e a contaminação das amostras.

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

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

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

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

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

2.2 Identificação bioquímica das espécies de *Meloidogyne*

Quando possível, as fêmeas de NGs foram extraídas individualmente das raízes das plantas de café e a identificação bioquímica foi realizada pela técnica de eletroforese de isoenzimas, utilizando a enzima α-esterase (Est), em gel poliacrilamida, de acordo com a metodologia descrita por Carneiro & Almeida (2001). Os perfis de isoenzimas obtidos foram comparados e confirmados de acordo com os descritos na literatura (Carneiro *et al*., 2016).

2.3 Identificação molecular de espécies de *Meloidogyne* por marcadores SCAR espécie-específicos

Cada amostra foi processada separadamente para extração dos ovos de *Meloidogyne* spp., pelo método modificado de Hussey & Barker (1973), que ao invés de agitação manual, consistiu no uso de um liquidificador de alta rotação com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5%, por 40 segundos. Devido aos tamanhos variados das raízes observadas no segundo levantamento, o tempo de processamento foi dividido em dois intervalos para garantir uma extração completa dos ovos.

A suspensão de ovos obtida de cada amostra foi colocada em funil de Baermann modificado, contendo três camadas de guardanapos de papel, para eclosão e obtenção de juvenis de segundo estádio (J2s), de acordo com Whitehead & Hemming (1965). As coletas dos J2s foram realizadas a cada dois dias por um período de 8 semanas. O DNA genômico dos J2s foi extraído de acordo com o método descrito por Randig *et al*. (2002). Testes de amplificação foram realizados com quatro pares de primers espécie-específicos do tipo SCAR (Tabela 3), destinados à identificação das espécies *M. paranaensis*, *M. incognita*, *M. exigua* e *M. izalcoensis* (Randig *et al*., 2002; Correa *et al*., 2013). A análise da raiz com o kit multiplex de SCAR-café foi realizada com algumas pequenas modificações (5 min a 94 °C seguido por 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 64 °C, 1 min a 70 °C e uma extensão final de 8 min a 70 °C).

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

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

3. RESULTADOS

A identificação das espécies no primeiro levantamento foi realizada por meio da metodologia combinada usando eletroforese de isoenzimas revelando a α-esterase (Est) e marcadores moleculares espécie-específicos da (SCAR-PCR). No primeiro levantamento, do total de nove áreas amostradas, cinco apresentaram as espécies *M. paranaensis* e *M. exigua*, e em uma foi detectada *M. incognita* (Tabela 4). O fenótipo Est E2 (Rm 1,1 e 1,9) foi detectado em todas as populações de *M. exigua* (Figura 1A). As populações de *M. paranaensis* apresentaram o fenótipo Est P1 (Rm: 1,32) (Figura 1B). Uma população de *M. incognita* com fenótipo Est I1 (Rm:1,0) foi detectada (Figura 1C). Apenas em uma das amostras (A2) não foi possível realizar a identificação por esterase devido à destruição das raízes, decorrente do parasitismo por *Meloidogyne* spp. A análise de marcadores espécie-específicos do tipo SCAR desenvolvidos para as espécies de nematoides do café: um único fragmento de 208 pb foi obtido para as quatro populações de *M. paranaensis*; um fragmento de 399 pb foi obtido para uma população de *M. incognita*; e um fragmento de 562 pb foi amplificado para as cinco populações de *M. exigua* (Figura 2). Esses dados confirmaram a identificação dessas espécies de acordo com os perfis de esterase.

Os resultados obtidos neste estudo relacionados à identificação da espécie *M. izalcoensis* foram publicados por Stefanelo *et al*. (2019) e confirmados através da população mantida em casa de vegetação na Embrapa Cenargen. O fenótipo de esterase Est I4 (Rm: 0,86; 0,96; 1,24; 1,30) foi confirmado (Carneiro *et al*., 2005a), e a PCR usando primers SCAR amplificou um fragmento específico de tamanho esperado (670 bp) (Correa *et al*., 2013). Coletas realizadas na mesma área em soja em 2018 não detectaram nenhuma espécie de *Meloidogyne* nessa cultura, e formulamos a hipótese de que essa planta seja má hospedeira de *M. izalcoensis*. Misturas de espécies foram detectadas em três áreas amostradas (A4, A5 e A7), duas com *M. paranaensis* e *M. exigua* (A4 e A5), e uma área com *M. incognita* e *M. exigua*

(A7).

Tabela 4. Espécies de *Meloidogyne* parasitando cafeeiros nos municípios de Araguari e Indianópolis-MG, detectadas por esterase e marcadores SCAR-PCR em 2018.

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

*População estudada por Stefanelo *et al.*, 2019 e mantida em casa de vegetação na EMBRAPA CENARGEN.

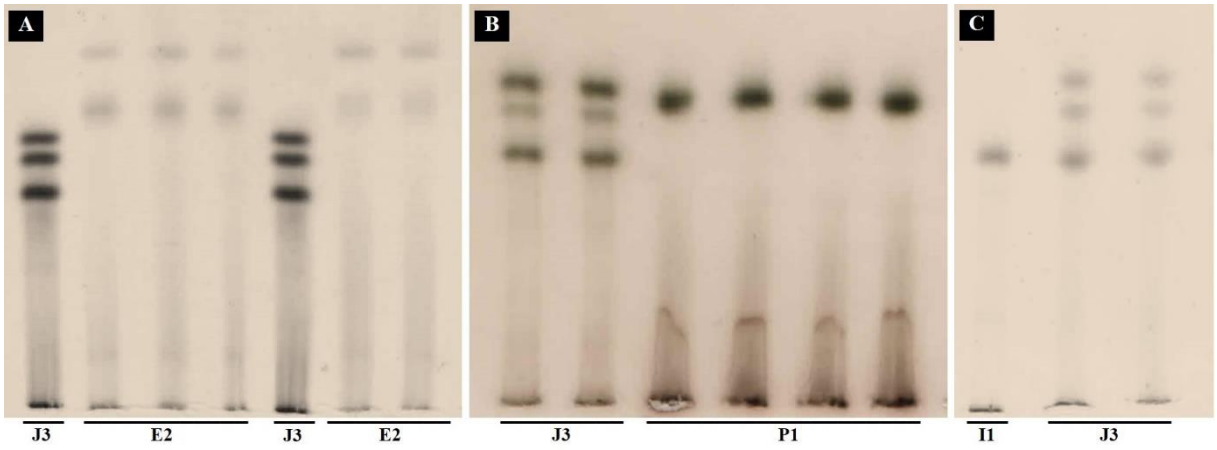

Figura 1. Fenótipos de esterase (Est) de diferentes populações de *Meloidogyne* spp. do Triângulo Mineiro. **A)** *M. exigua* fenótipo de esterase (Est E2); **B)** *M. paranaensis* fenótipo de esterase (Est P1). **C)** *M. incognita* fenótipo de esterase (Est I1); *M. javanica* (Est J3) foi usado como padrão de referência.

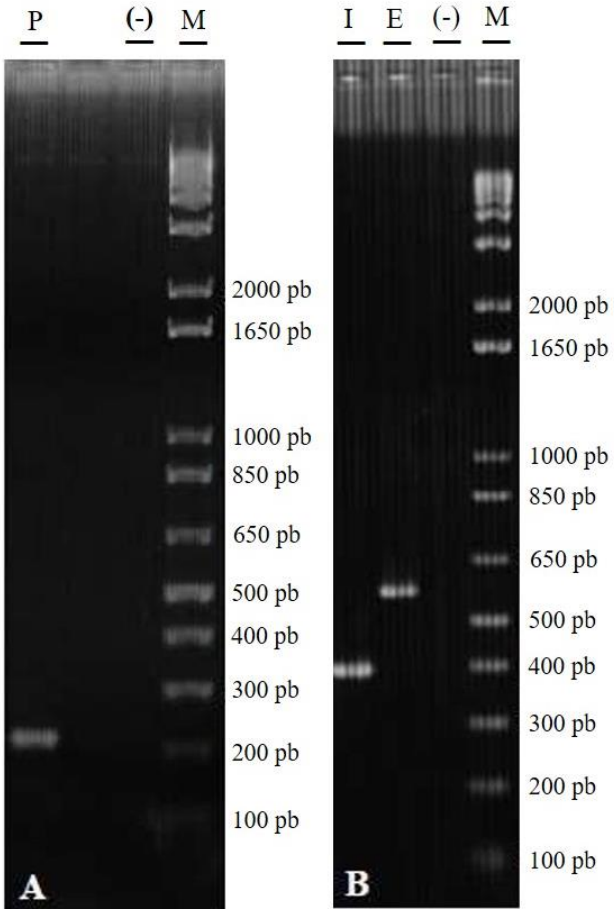

Figura 2. Amplificações SCAR-PCR para *Meloidogyne* spp. parasitas do cafeeiro nos municípios de Araguari e Indianópolis, MG. **A)** P = *M. paranaensis* (208 pb); **B)** I = *M. incognita* (399 pb); E = *M. exigua* (562 pb). Abreviações: (-) DNA: controle negativo; M: marcador 1kb DNA Plus; pb: pares de base.

No segundo levantamento, o uso combinado de eletroforese de isoenzimas e marcadores moleculares espécie-específicos (PCR-SCAR) não foi possível devido ao estado avançado de degradação dos tecidos radiculares parasitados por NGs e à condição enzimática comprometida das fêmeas (exibindo coloração amarela a marrom) como resultado da má preservação (Tabela 5). Nesse levantamento em particular, apenas uma amostra (A22) foi submetida à eletroforese de isoenzimas, mas essa técnica não revelou nenhuma banda de esterase, impossibilitando a identificação da espécie. Na análise com marcadores espécie-específicos do tipo SCAR desenvolvidos para as espécies de nematoides do café: *M. incognita*, *M. paranaensis*, *M. exigua* e *M. izalcoensis*, foi obtido um fragmento de 399 pb para sete populações de *M. incognita* e um

fragmento de 562 pb foi amplificado para as cinco populações de *M. exigua*, incluindo uma amostra de bandas não coradas da área A22, usando uma enzima esterase (Figura 3).

Em resumo, os NGs foram detectados em 79,17% dos 24 cafezais inspecionados em Minas Gerais (Figura 4). Dentre as espécies identificadas, observou-se que *M. exigua* foi a mais frequente nas amostras analisadas (41,67%). Enquanto *M. incognita* foi encontrada em 33,33%, *M. paranaensis* em 20,83% e *M. izalcoensis* em 4,17%. Os nematoides-das-galhas também foram detectados em misturas (20,83% das amostras), incluindo *M. incognita* + *M. exigua* em 12,5%, e *M. paranaensis* + *M. exigua* em 8,33% das amostras examinadas.

Tabela 5. Espécies de *Meloidogyne* parasitando cafeeiros no município de Araguari-MG, detectadas por marcadores SCAR-PCR em 2021.

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

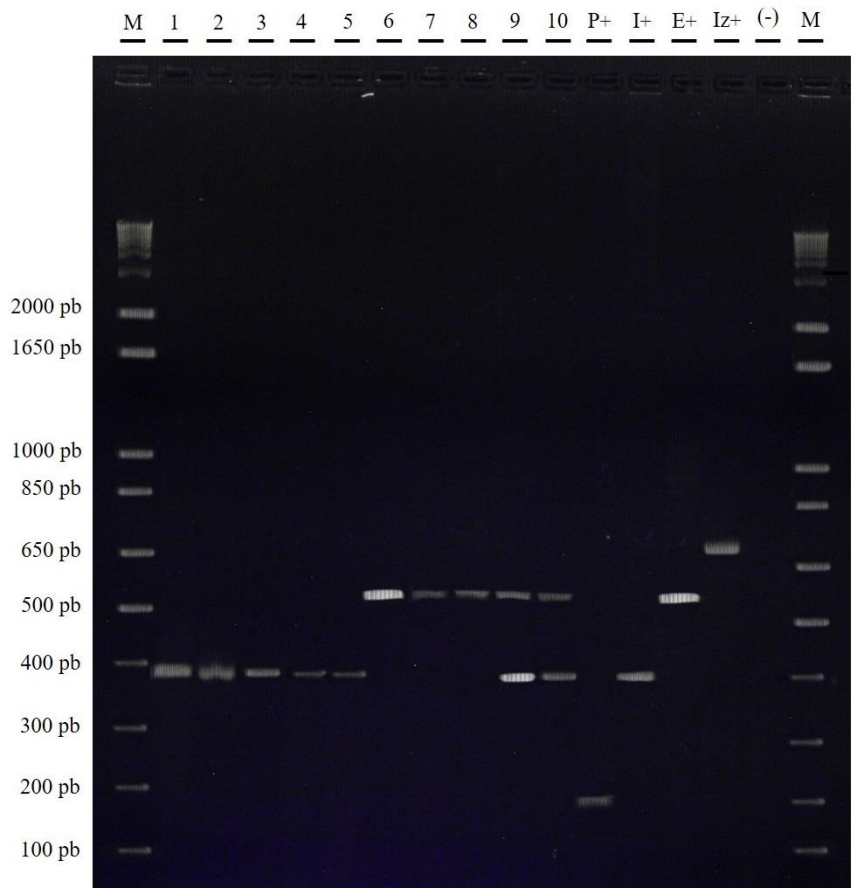

Figura 3. Amplificações SCAR-PCR para *Meloidogyne* spp. parasitas do cafeeiro nos municípios de Araguari e Indianópolis, MG. **1, 2, 3, 4 e 5)** *M. incognita* (399 pb); **6, 7 e 8)** *M. exigua* (562 pb); **9 e 10)** *M. incognita* (399 pb) e *M. exigua* (562 pb). Abreviações dos padrões, P_+: *M. paranaensis*, I_+: *M. incognita*, E_+: *M. exigua*, Iz_+: *M. izalcoensis* (670 pb); (-) DNA: controle negativo; M: marcador 1kb DNA Ladder; pb: pares de base.

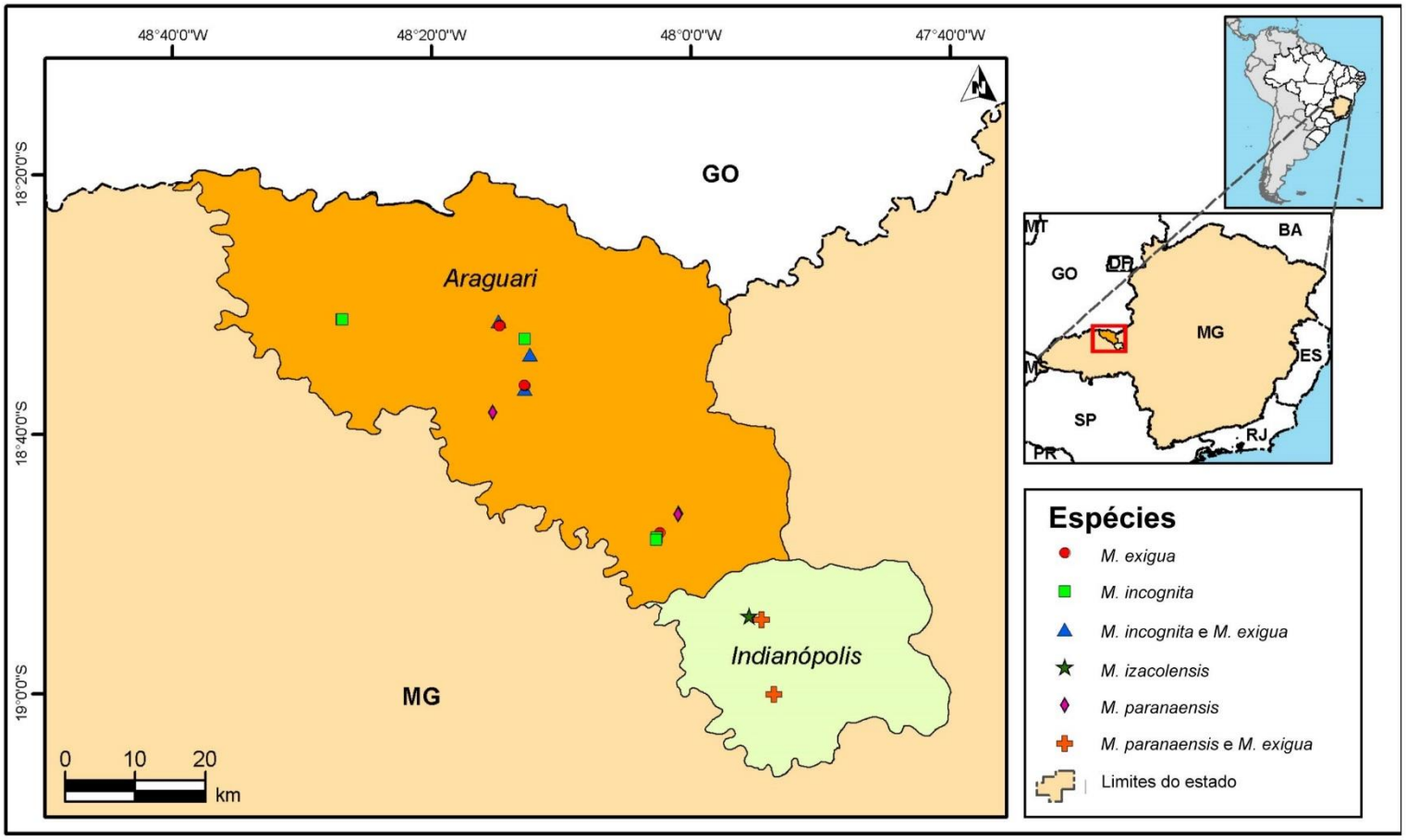

Figura 4. Distribuição espacial de *Meloidogyne* spp. em cafeeiros nos municípios de Araguari e Indianópolis na região do Triângulo Mineiro, Minas Gerais. Elaborado por Sergio Eustáquio de Noronha - EMBRAPA/CENARGEN.

4. DISCUSSÃO

Por vários anos, as espécies de NGs do café eram identificadas pela análise do padrão perineal das fêmeas, morfologia dos machos, juvenis de segundo estádio (J2s) e, mais recentemente, por fenótipos de esterase (Carneiro & Cofcewicz, 2008). Devido à frequente identificação errônea de *M. paranaensis* como *M. incognita* (Carneiro *et al*., 1996; Carneiro & Santos, 2022) que ocorre em função das características morfológicas sobrepostas e falta de fenótipos enzimáticos, a distribuição e importância relativa das espécies de NGs permanece incerta em alguns países da América Latina, Ásia e África (Carneiro & Cofcewicz, 2008; Janssen *et al*., 2016, 2017; Villain *et al*., 2018).

Todos os fenótipos de esterase (Est) de NGs detectados no café estão disponíveis em Carneiro & Cofcewicz (2008) e Villain *et al*. (2018), exceto a espécie recentemente descrita como *M. lopezi* Humphreys-Pereira *et al*., 2014. Mais recentemente, os fenótipos de esterase de *M. megadora* Whitehead, 1968 (Maleita *et al*., 2016) e *M. africana* Whitehead, 1960 (=*M. decalineata* e *M. oteifae*) foram caracterizados (Janssen *et al*., 2017). Com base em extensivos estudos conduzidos em espécies de *Meloidogyne* encontradas no café, a análise de isoenzimas permanece sendo uma ferramenta útil para a identificação de NGs, quando as fêmeas estão em condições ótimas e não há marcadores moleculares disponíveis para a identificação de certas espécies, como as da África (Carneiro & Santos, 2022).

Nas últimas décadas, técnicas moleculares precisas e rápidas foram validadas para o diagnóstico de NGs, usando várias fontes de DNA, como ovos, juvenis e adultos. Os marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) desenvolvidos por Randig *et al*. (2002) provaram ser a melhor ferramenta para identificar todas as populações de *M. exigua* do café (Muniz *et al*., 2008). Os marcadores moleculares espécie-específicos do tipo SCAR foram desenvolvidos para a maioria das espécies de NGs que parasitam o café na América Latina: *M. exigua*, *M. incognita*, *M. paranaensis*, *M. enterolobii* Yang & Eisenback, 1985, *M.*

arenaria (Neal, 1889) Chitwood, 1949, *M. arabicida* e *M. izalcoensis* (Correa *et al*., 2013). Os marcadores SCAR multiplex-PCR constituem em uma ferramenta confiável para monitorar diferentes espécies de NGs presentes em cafezais e para detectar espécies em baixas densidades, devido à alta sensibilidade dessa técnica (Randig *et al*., 2002; Randig *et al*., 2004; Correa *et al*., 2013). Outras vantagens dessa técnica são que o DNA dos NGs pode ser extraído de todos os estádios de vida coletados das raízes e amplificados com PCR, em comparação com a análise de esterase, que requer apenas fêmeas (Carneiro & Santos, 2022).

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

No estudo realizado por Santos *et al*. (2018) no Brasil, confirmou-se que a espécie *M. exigua* esteve amplamente distribuída na região sul de Minas Gerais (31,1% das amostras), *M. paranaensis* foi restrita ao município de Três Pontas, e a presença de *M. incognita* ocorreu em três municípios mineiros (Três Pontas, Coqueiral e Aguanil), sendo este o primeiro relato de *M. incognita* parasitando café na região sul desse estado. No entanto, atualmente sabe-se que o

Brasil possui ampla distribuição de *M. incognita* em café, devido às numerosas identificações confiáveis baseadas em marcadores SCAR espécie-específicos e/ou fenótipos de esterase (Campos & Villain, 2005; Carneiro & Cofcewicz, 2008; Villain *et al*., 2018). A presença dessa espécie foi confirmada em outros países, como Nicarágua (Herrera *et al*., 2011), Costa Rica e Guatemala, com distribuição confirmada (Villain *et al*., 2013; Villain *et al*., 2018) e Vietnã com ampla distribuição (Thrinh *et al*., 2013).

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

O presente estudo incluiu a caracterização e identificação de 24 populações de NGs parasitando cafeeiros na região do Triângulo Mineiro, no estado de Minas Gerais, com o objetivo principal de detectar outras populações da espécie *M. izalcoensis*. Este estudo fornece informações sobre a distribuição de espécies de *Meloidogyne* nos municípios de Araguari e Indianópolis, próximos aos dois locais de detecção de *M. izalcoensis*, indicando a presença endêmica de *M. exigua* e confirmando a ocorrência de *M. incognita* e *M. paranaensis*, as espécies de NGs mais recentemente introduzidas em cafezais no estado de MG (Castro *et al*., 2008; Santos *et al*., 2018; Terra *et al*., 2019; Carneiro & Santos, 2022).

Estes resultados sugerem que *M. izalcoensis* tem uma presença relativamente limitada na região, destacando seu status como uma espécie de menor importância no contexto local. Foi detectada apenas duas vezes no Brasil (MG), em café (Stefanelo *et al*., 2019) e em Melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.) por Carneiro (2014) em levantamento realizado em 18 cafezais do município de Araguari-MG. A análise, que envolveu a utilização de isoenzima (α-esterase) em conjunto com características morfológicas, revelou a presença de *M. incognita*, *M. exigua* e *M. paranaensis* em 50%, 28% e 17% das amostras, respectivamente. Embora nesse estudo tenha sido utilizado cerca de 20 fêmeas de NGs, não obtiveram bandas da enzima esterase (Est) para *M. exigua* nas amostras coletadas em campo. Nesse levantamento, uma espécie atípica de *Meloidogyne* (Est N4) foi detectada em uma cucurbitácea conhecida como Melão-de-São-Caetano. Comparando os fenótipos de esterase (Carneiro & Cofcewicz, 2008), a espécie foi identificada como *M. izalcoensis* (Est N4-I4) conforme descrito também por Stefanelo *et al*. (2019). Essa espécie parece ter distribuição restrita em cafezais na região do vulcão Izalco, Sonsonate, no sudoeste de El Salvador, de onde foi descrita no café (Carneiro *et al*., 2005a). No entanto, vale destacar que a presença da espécie não foi relatada em nenhuma outra região de El Salvador (Villain *et al*., 2018), sugerindo que sua distribuição está confinada a uma limitada área geográfica. Os padrões perineais observados nessa espécie em particular assemelham-se aos de *M. incognita*. No entanto, é importante notar que o fenótipo Est é específico para essa espécie em particular (Carneiro *et al*., 2005a; Carneiro & Cofcewicz, 2008;).

Este estudo confirmou que a correta identificação de *M. exigua* requer principalmente o uso de marcadores moleculares espécie-específicos da espécie (PCR-SCAR), considerando que *M. exigua* possui tamanho pequeno e baixa concentração de α-esterase, características que contribuem para a ineficácia da técnica de eletroforese de isoenzimas para essa espécie (Carneiro & Cofcewicz, 2008; Carneiro & Santos, 2022). Além disso, é crucial garantir que os

espécimes de fêmeas de *Meloidogyne* spp. encontrados nas raízes do café estejam em ótimas condições para a realização de estudos de isoenzimas, pois o sistema radicular pode, às vezes, sofrer degradação em decorrência de infecção por nematoides ou apresentar sinais de envelhecimento ou ressecamento, principalmente devido à escassez de água durante a estação seca (Salgado *et al*., 2015).

Em pesquisas recentes envolvendo cinco isolados de *M. izalcoensis* de vários países, foi observado que essa espécie partenogênica mitótica exibiu variabilidade genética limitada. O estudo confirmou ainda a eficácia excepcional dos marcadores SCAR desenvolvidos por Correa *et al*. (2013) na identificação e distinção precisa de *M. izalcoensis* de outras espécies de *Meloidogyne* encontradas em cafeeiros nas Américas (Almeida *et al*., 2023). Em contraste, *M. exigua*, uma espécie altamente diversa geneticamente (Muniz *et al*., 2008), exibiu população virulenta, notavelmente, o isolado de Bom Jesus de Itabapoana, RJ, se destaca por sua extrema virulência, pois superou com sucesso a resistência conferida pelo gene *Mex*-1 na cultivar IAPAR 59 (Muniz *et al*., 2009). Similarmente, *M. izalcoensis* também foi caracterizado por sua capacidade de exibir virulência em relação a certos genótipos de café que possuem resistência contra outras espécies de *Meloidogyne*, como 'IPR 100' e outras (Almeida *et al*., 2023).

Resumindo esses estudos, o kit SCAR-café demonstrou sua capacidade excepcional de identificar precisamente todas as espécies de *Meloidogyne* encontradas em cafeeiros em todo o Brasil. Notavelmente, essa identificação foi alcançada mesmo ao usar ovos e J2s extraídos de raízes de café que estavam em más condições. Os marcadores SCAR-café provaram ser eficazes na distinção de *M. exigua*, *M. incognita*, *M. paranaensis* e *M. izalcoensis*. Este kit oferece uma abordagem abrangente e confiável para identificação de espécies e pode ser usado como um método autônomo para caracterizar com precisão *Meloidogyne* spp. do café. Esse estudo fornece a confirmação de que a presença de *M. izalcoensis* no Brasil permanece restrita à região de Indianópolis e Araguari, onde essa espécie foi inicialmente detectada. Além disso, os resultados

deste estudo são de grande importância para a agricultura mineira, ressaltando a necessidade de implementação de medidas preventivas para evitar a disseminação de espécies altamente agressivas, como *M. incognita* e *M. paranaensis*, para outras áreas do estado de Minas Gerais onde ainda não estão estabelecidas.

5. CONCLUSÕES

Esse estudo confirmou que o uso de marcadores moleculares SCAR é mais eficiente e prático do que o uso de marcadores enzimáticos na distinção de *M. exigua, M. incognita, M. paranaensis* e *M. izalcoensis* na cultura do café, e também demonstrou que a ocorrência de *M. izalcoensis* no Brasil é considerada restrita à região de Indianópolis-MG, onde essa espécie foi inicialmente detectada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. F.; SANTOS, M. F. A.; STEFANELO, D.; MATTOS, V. S.; RODRIGUES-SILVA, P. L.; SOUSA, G. P.; SALGADO, S. M. L.; SERA, G. H.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARES, J. E. & CARNEIRO, R. M. D. G. 2023. Genetic variability and phylogenetic characterization of different populations of *Meloidogyne izalcoensis* and reaction of coffee genotypes to this new species detected in Brazil. Plant Pathology 72: 636-650.

BELL, C. A.; ATKINSON, H. J.; ANDRADE, A. C.; NGUYEN, H. X.; SWIBAWA, I. G.; LILLEY, C. J.; MCCARTHY, J. & URWIN, P. E. 2018. A high-throughput molecular pipeline reveals the diversity in prevalence and abundance of *Pratylenchus* and *Meloidogyne* species in coffee plantations. Phytopathology 108: 641-650.

CAMPOS, V. P. & VILLAIN, L. 2005. Nematodes parasites of coffee and cocoa. *In*: Luc, M.; Sikora, R. A.; Bridge, J. (eds.). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. CABI. Wallingford, UK. p. 529-579.

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

CARNEIRO, R. M. D. G & SANTOS, M. F. A. 2022. Integrated management of nematodes in coffee. *In*: Muschler, R. (ed.). Climate-smart production of coffee: improving social and environmental sustainability. Burleigh Dodds Science Publishing. Cambridge, UK. p. 343-378.

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

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

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

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

CARNEIRO, R. M. D. G.; MONTEIRO, J. M. S.; SILVA, U. C. & GOMES. G. O. 2016. Gênero *Meloidogyne*: Diagnose através da eletroforese de isoenzimas e marcadores SCAR. *In*: Oliveira, C. M. G. dos Santos, M. A. & Castro, L. H. S. (eds). Diagnose de fitonematoides. Millennium. Campinas, SP. p. 47-70.

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

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

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

CASTRO, J. M. C.; CAMPOS, V. P.; POZZA, E. A.; NAVES, R. L.; ANDRADE JÚNIOR, W. C.; DUTRA, M. R.; COIMBRA, J. L.; MAXIMINIANO, C. & SILVA, J. R. C. 2008. Levantamento de fitonematóides em cafezais do Sul de Minas Gerais. Nematologia Brasileira 32: 56-64.

CONAB. 2024. Acompanhamento da safra brasileira de café. Segundo levantamento, maio 2024. Vol. 1, n. 1. Brasília, DF. http://www.conab.gov.br Consultado em 02/07/2024.

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

GONÇALVES, W. & SILVAROLLA, M. B. 2001. Nematoides parasitas do cafeeiro. *In*: Zambolim, L. (ed.). Tecnologias de produção de café com qualidade. Editora UFV. Viçosa, MG. p. 199-268.

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

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

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

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

JANSSEN, T.; KARSSEN, G.; TOPALOVIĆ, O.; COYNE, D. & BERT. W. 2017. Integrative taxonomy of root-knot nematodes reveals multiple independent origins of mitotic parthenogenesis. PloS One. 12: e0172190.

JANSSEN, T.; KARSSEN, G.; VERHAEVEN, M.; COYNE, D. & BERT, W. 2016. Mitochondrial coding of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne*) supports haplotype based diagnostics and reveals evidence of recent reticulate evolution Scientific Reports 6: 22591.

LIMA, E. A.; FURLANETTO, C.; NICOLE, M.; GOMES, A. C. M. M.; ALMEIDA, M. R.

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

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

MALEITA, C. M.; DE ALMEIDA, A. M. S. F.; VOVLAS, N. & ABRANTES, I. 2016. Morphological, biometrical, biochemical, and molecular characterization of the coffee root-knot nematode *Meloidogyne megadora*. Plant Disease 100: 1725-1734.

MAPA. 2023. https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/brasil-e-o-maior-produtor-mundial-e-o-segundo-maior-consumidor-de-cafe Consultado em 02/07/2024.

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

MUNIZ, M. F. S.; CAMPOS, V. P.; MOITA, A. W.; GONÇALVES, W.; ALMEIDA, M. R. A.; SOUZA, F. R.; CARNEIRO R. M. D. G. 2009. Reaction of coffee genotypes to different populations of *Meloidogyne* spp.: detection of a naturally virulent *M. exigua* population. Tropical Plant Pathology 34: 370-378.

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

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

SALGADO, S. M. L.; FATOBENE, B. J. dos R.; TERRA, W. C. & CARNEIRO, R. M. D. G. 2021. Nematoides parasitas do cafeeiro: aspectos gerais e controle. Boletim Técnico 111. EPAMIG, Belo Horizonte. 56 p.

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

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

SANTOS, M. F. A.; SOUSA, G. P.; ALMEIDA, S. F.; MAIA, Y. M.; SALGADO, S. M. L.; VILELA, D. J. M. & CARNEIRO. R. M. D. G. 2021. Detecção de *Meloidogyne exigua* em

cultivares de cafeeiro resistentes, usando marcadores moleculares e a influência de mecanismos tardios nos sintomas e na resistência ao nematoide. Comunicado Técnico 211. Brasília, DF. Embrapa Cenargen. 9 p.

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

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

TERRA, W. C.; SALGADO, S. M. L.; FATOBENE, B. J. R. & CAMPOS, V. P. 2019. Expanded geographic distribution of *Meloidogyne paranaensis* confirmed on coffee in Brazil. Plant Disease 103: 589-589.

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

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

VILLAIN, L.; SARAH, A.; HERNÁNDEZ, J. L.; BERTRAND, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P.; CHARMENTANT, P.; ANZUETO, F.; FIGUEROA, P.; CARNEIRO, R.M.D.G. 2013. Diversity of root-knot nematodes associated with coffee orchards in Central America. Nematropica 43: 194-206.

WHITEHEAD, A.G. & HEMMING J. R. A. 1965. Comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Annals of Applied Biology 55: 25-38.

CAPÍTULO 2

VARIABILIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DE DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Meloidogyne izalcoensis* E REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CAFÉ A ESSA NOVA ESPÉCIE DETECTADA NO BRASIL

Variabilidade genética e caracterização filogenética de diferentes populações de *Meloidogyne izalcoensis* e reação de genótipos de café a essa nova espécie detectada no Brasil.

RESUMO

O nematoide-das-galhas *Meloidogyne izalcoensis* foi recentemente detectado pela primeira vez infectando o cafeeiro no Brasil. Essa espécie foi inicialmente descrita em café em El Salvador e posteriormente detectada na Ásia e na África. Não há relatos sobre a diversidade genética e sobre fontes de resistência a *M. izalcoensis* em cultivares de café. Todas as populações de *M. izalcoensis* foram identificadas pelo fenótipo de esterase e pelos marcadores espécie-específicos SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). Com base em marcadores RAPD (Random amplified polymorphic DNA) e AFLP (Amplified fragment length polymorphism), foi detectada baixa variabilidade intraespecífica entre populações de *M. izalcoensis* da África, Vietnã e Brasil. No entanto, a população de El Salvador apresentou menores níveis de diferenças genéticas em relação às outras populações. Filogeneticamente, todas as populações de *M. izalcoensis* de diferentes locais (El Salvador, Benim, Tanzânia, Vietnã e Brasil) agruparam-se com 90% e 69% de suporte bootstrap para as regiões COII e HSP90, respectivamente, indicando que essas regiões genômicas são altamente conservadas na espécie. Além disso, ambos os marcadores permitiram a separação das populações de *M. izalcoensis* de outras importantes espécies de *Meloidogyne* do café, incluindo *M. exigua*, *M. paranaensis*, *M. incognita*, *M. arabicida* e *M. lopezi*. Nos estudos de resistência, a maioria dos genótipos testados apresentam resistência a outras espécies de *Meloidogyne* (Amphillo × Catuaí, Híbrido de Timor, IAPAR 59, IPR 99, IPR 100, IPR 102, IPR 103, IPR 105, IPR 106, IPR 107 e IPR 108) foram considerados suscetíveis a *M. izalcoensis*, exceto o porta-enxerto cv. Apoatã IAC 2258, que se mostrou moderadamente resistente, com segregação genética para este caráter de 43,8%.

Palavras-chave: Amplified fragment length polymorphism (AFLP), *Coffea* spp., COII, HSP90, random amplified polymorphic DNA (RAPD), resistência genética, variabilidade genética.

Genetic variability and phylogenetic characterization of different populations of *Meloidogyne izalcoensis* and reaction of coffee genotypes to this new species detected in Brazil.

ABSTRACT

A new root-knot nematode (RKN), *Meloidogyne izalcoensis*, was detected on coffee in Brazil. This species was first described on coffee in El Salvador and later detected in Asia and Africa. There are no reports on the genetic diversity of this species and resistance to *M. izalcoensis* has not yet been studied in coffee cultivars. All populations were identified by esterase phenotype and SCAR (Sequence-characterized amplified region) species-specific markers. Based on RAPD (Random amplified polymorphic DNA) and AFLP (Amplified fragment length polymorphism) markers, low intraspecific variability was detected among *M. izalcoensis* populations from Africa, Vietnam and Brazil, but the population from El Salvador showed fewer genetic differences from the other populations. Phylogenetically, all populations of *M. izalcoensis* from different locations (El Salvador, Benin, Tanzania, Vietnam and Brazil) grouped with 90% and 69% bootstrap support for COII and HSP90 regions, respectively, indicating that these regions are highly conserved for the species. In addition, both markers enabled separation of *M. izalcoensis* populations from other important coffee *Meloidogyne* species, including *M. exigua*, *M. paranaensis*, *M. incognita*, *M. arabicida* and *M. lopezi*. In resistance studies, most genotypes tested that had resistance to other *Meloidogyne* species (Amphillo × Catuaí, Hybrid of Timor, IAPAR 59, IPR 99, IPR 100, IPR 102, IPR 103, IPR 105, IPR 106, IPR 107 and IPR 108) were found to be susceptible to *M. izalcoensis*, except for the rootstock cv. Apoatã IAC 2258, which proved to be moderately resistant, with a genetic segregation for this character of 43.8%.

Key words: Amplified fragment length polymorphism (AFLP), *Coffea* spp., COII, genetic resistance, HSP90, random amplified polymorphic DNA (RAPD), variability.

1. INTRODUÇÃO

Os nematoides-das-galhas (NGs) estão entre os fitonematoides economicamente mais importantes que infectam o café (*Coffea* spp.) em vários países das Américas, incluindo Brasil, El Salvador, Guatemala, Costa Rica e Havaí, na África e em outros continentes (Carneiro & Santos, 2022). Recentemente, uma nova espécie, *Meloidogyne izalcoensis* Carneiro *et al.*, 2005, foi detectada em café no Brasil (Stefanelo *et al*., 2019). Essa espécie foi descrita pela primeira vez a partir de uma população coletada em El Salvador, onde causa danos substanciais a plantas de café (Carneiro *et al*., 2005; Carneiro & Santos, 2022). Também foi detectada no Quênia (Kabete), Cotonou (Benin) e na Tanzânia (Mufindi) na África, sem informação sobre danos (Jorge Júnior *et al*., 2016; Carneiro & Santos, 2022). *Meloidogyne izalcoensis* causa pequenas galhas com massas de ovos externas e necrose nas extremidades das raízes, causando sintomas radiculares diferentes de outras espécies de *Meloidogyne* do café no Brasil (Carneiro *et al*., 2005; Stefanelo *et al*., 2019). A identificação morfológica de *M. izalcoensis* é difícil, devido à semelhança do seu padrão perineal com o de *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 e *M. paranaensis* Carneiro *et al*., 1996 (Carneiro *et al*., 2005). Bioquimicamente, o fenótipo da esterase (Est I4) é único e pode ser usado para diferenciar *M. izalcoensis* de outras espécies de NGs do café (Carneiro & Cofcewicz, 2008).

Ferramentas moleculares, particularmente marcadores moleculares neutros, por exemplo, RAPD (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente) e AFLP (Polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados) têm sido amplamente utilizados para analisar a diversidade genética dentro de *Meloidogyne* spp. provenientes do café, ou seja, *M. exigua* Göldi, 1887, *M. incognita* e *M. paranaensis* (Randig *et al*., 2002; Carneiro *et al*., 2004; Muniz *et al*., 2008; Santos *et al*., 2012, 2018). Análises filogenéticas de NGs do café usando dados moleculares como sequências de rDNA e mtDNA têm sido utilizadas como métodos de caracterização para diferentes espécies e permitiram que processos evolutivos fossem

resolvidos em níveis complexos de divergência (Humphreys-Pereira *et al*., 2014; Janssen *et al*., 2017; Santos *et al*., 2020). Porém, até o momento praticamente não houve relatos sobre a variabilidade genética e diversidade filogenética de *M. izalcoensis*. Dentre as sequências genômicas de interesse, foram desenvolvidos marcadores SCAR (Sequence characterized amplified regions) para a identificação de *Meloidogyne* spp. da cafeicultura brasileira: *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* (Randig *et al*., 2002), e mais recentemente para *M. izalcoensis* e *M. arabicida* López & Salazar, 1989 (Correa *et al*., 2013), estendendo os marcadores moleculares para todas as espécies de NGs das Américas, exceto para *M. lopezi* Humphreys-Pereira *et al*., 2014, que foi descrito posteriormente. Além disso, o gene que codifica a proteína de choque térmico 90 (Hsp90) tem sido cada vez mais utilizado em estudos filogenéticos de nematoides parasitas de plantas (Skantar & Carta, 2004; Skantar *et al*., 2008) ou para identificação de espécies (Skantar *et al*., 2008), embora a divergência desse gene entre espécies de nematoides seja geralmente menor do que as diferenças genéticas mitocondriais relatadas para o mesmo táxon (Skantar & Carta, 2004).

A resistência genética do café aos nematoides é considerada uma das principais estratégias de manejo, pois possibilita a redução da densidade populacional de nematoides no solo e a manutenção econômica aceitável da produtividade da cultura em áreas infestadas (Carneiro & Santos, 2022). As espécies *Coffea canephora* Pierre, *C. dewevrei* De Wild. & T. Durand, 1899 e *C. congensis* Froehner foram o principal foco para a produção de porta-enxertos resistentes a nematoides, pois essas espécies apresentam sistemas radiculares abundantes, bem como resistência a patógenos. Entretanto, genes de resistência encontrados em linhagens selvagens ou semi-selvagens de *C. arabica* L. da Etiópia, bem como acessos de Amphillo, poderiam ser usados em hibridização intraespecífica com outras cultivares de *C. arabica* com boas características agronômicas (Carneiro & Santos, 2022). A maioria das fontes de resistência aos NGs foram identificadas em *C. canephora* (Carneiro & Santos, 2022). Três cultivares de

C. canephora estão disponíveis comercialmente para serem utilizadas como porta-enxertos para resistência a *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*: Apoatã IAC 2258, Nemaya e Goytacá (= Clone 14), podendo receber enxertos de *C. arabica* e *C. canephora*. Essas cultivares robusta são altamente recomendadas para plantio em áreas extensivamente infestadas com *Meloidogyne* spp. (Gonçalves *et al*., 2021; Carneiro & Santos, 2022). O Híbrido de Timor, que é fenotipicamente um café arábica, é provavelmente um híbrido natural entre *C. arabica* e *C. canephora*, e tem sido frequentemente usado em programas de melhoramento genético brasileiros como fonte de resistência a *Meloidogyne* spp. Entre seus derivados estão as cultivares Obatã IAC 1669-20, Tupi IAC 1669-33, IAC 125 RN e IAPAR-59, que são resistentes a *M. exigua* e à ferrugem do café causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome (Fazuoli *et al*., 2018; Carneiro & Santos, 2022). Progênies de Icatu Vermelho IAC 4160, resultantes de cruzamentos entre *C. arabica* e *C. canephora*, foram classificadas como resistentes a *M. paranaensis* em condições de casa de vegetação e campo (Carneiro & Santos, 2022). Outra, Icatu IAC 925, foi utilizada por alguns programas de melhoramento (Shigueoka *et al*., 2016) e Sera *et al*. (2020) a utilizaram para desenvolver a cultivar IPR 106, resistente a *M. paranaensis*. A maioria das cultivares comerciais de *C. arabica* são altamente suscetíveis aos NGs do café, com exceção das cultivares selecionadas pelos melhoristas de café: Acauã, Catucaí 785-15, IAPAR 59, IAC 125 RN, IPR 100, IPR 106, MGS Catiguá, MGS Guaiçara e MGS Vereda, que estão disponíveis no Brasil e são recomendadas para áreas infestadas com NGs, dependendo das espécies de nematoides identificadas na área de plantio. Esses genótipos apresentam diferentes fontes de resistência aos NGs (Carneiro & Santos, 2022).

O primeiro objetivo do presente estudo foi avaliar a variabilidade genética de populações de *M. izalcoensis* provenientes de diferentes localizações geográficas do mundo (El Salvador, Benim, Tanzânia, Vietnã e Brasil) utilizando marcadores neutros de DNA, e suas relações filogenéticas utilizando regiões distintas do DNA ribossomal (rDNA): o gene

mitocondrial do citocromo c oxidase II (COII) e o gene codificador da proteína nuclear Hsp90. O segundo objetivo deste estudo foi avaliar a reação da população brasileira de *M. izalcoensis* em diferentes cultivares de café portadoras de genes de resistência a outras espécies de *Meloidogyne*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Populações de nematoides

Cinco populações de *M. izalcoensis* de diferentes localizações geográficas do mundo (El Salvador, Benim, Tanzânia, Vietnã e Brasil) foram mantidas por subcultivos periódicos em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Santa Clara) em casa de vegetação (Tabela 1). Todos os estudos genéticos e filogenéticos foram realizados usando essas populações. Elas foram identificadas usando fenótipo de esterase (Est), segundo Carneiro & Almeida (2001) e confirmados com SCAR-PCR (Correa *et al*., 2013). Uma população de *M. enterolobii* Yang & Eisenback, 1983 foi incluída no estudo como outgroup.

2.2 Preparação do DNA genômico

Para cada população de *M. izalcoensis*, o DNA genômico total foi extraído e purificado a partir de alíquotas de 100 µL de ovos, seguindo o método descrito por Randig *et al*. (2002). Para isso, os ovos previamente extraídos e armazenados a -80 ºC foram macerados em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido e recuperado em tubo Eppendorf 2 mL, ao qual adicionou-se 500 µL de tampão NIB (5 M NaCl; 1 M Tris pH 8; 0,5 M EDTA; 0,7 mM β mercaptoetanol; 5 mM Triton - NPHO). Efetuada a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por dois minutos e eliminado o sobrenadante. Esta operação de lavagem foi efetuada duas vezes. Em seguida acrescentados 800 µL de tampão de homogeneização (5 M NaCl; 0,2 M sacarose; 0,5 M EDTA) e 200 µL do tampão de lise (0,5 M EDTA; 2 M Tris pH 9,2; 10% SDS).

Após homogeneização, as amostras foram incubadas a 55 ºC por 30 minutos, seguido de 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 1 V de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1), seguindo-se a homogeneização em vortex por 30 segundos, centrifugação a 13.000 rpm por cinco minutos e transferência do sobrenadante para um tubo de microcentrifuga de 2 mL.

Para precipitação do DNA, adicionou-se 1.000 µL de etanol 100% ao sobrenadante e em seguida o tubo foi invertido suavemente para observação do pellet. As amostras foram incubadas a -20 ºC por 20 minutos, seguido de centrifugação a 13.000 rpm por cinco minutos e eliminação do etanol com auxílio de uma micropipeta. Em seguida, realizada a lavagem com 1.000 µL de etanol 70%, efetuando-se outra centrifugação a 13.000 rpm por cinco minutos. Após a eliminação do etanol, o precipitado foi seco à temperatura ambiente, recuperado em 20 µL de água esterilizada e armazenado a -20 ºC.

O DNA genômico isolado de cada população de *M. izalcoensis* foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 v.3.8.1 (Thermo Scientific).

Tabela 1. Lista de isolados de *Meloidogyne izalcoensis* usados neste estudo.

Isolado[a]	Origem (Município-Estado)	Hospedeira	Fenótipo de esterase	Número de acesso do GenBank[a]			
				D2D3	ITS	mtDNA	Hsp90
Iza 1	Indianópolis, MG, Brasil	*Coffea arabica*	I4	MZ363741	MZ327286	MZ358903	MZ358898
Iza 2	Izalco, El Salvador	*C. arabica*	I4	MZ361699	MZ327283	MZ358900	MZ358895
Iza 3	Cotonou, Benim	*C. arabica*	I4	-	MZ367177	-	MZ358899
Iza 4	Tindini, Tanzânia,	*C. arabica*	I4	MZ327284	-	MZ358901	MZ358896
Iza 5	Vietnã	*Musa* sp.	I4	MZ328082	MZ327285	MZ358902	-

Abreviação: MG, Minas Gerais.

[a]Números de acesso GenBank para o fragmento D2-D3 de 28S rRNA, ITS1-5.8S-ITS2 rRNA, COII mtDNA e sequências Hsp90 de *Meloidogyne* spp. clonados neste estudo e utilizados para alinhamento e análise filogenética.

(-) A sequência não apresentou qualidade suficiente.

2.3 Análise RAPD

As amplificações das amostras de DNA de cada população foram realizadas pela técnica de RAPD conforme Randig *et al*. (2002). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 13 μL, contendo: 1,3 μL de tampão 10X de reação de PCR (Invitrogen®), 0,4 μL do primer [10 μM], 2 μL de dNTPs [1,25 mM] (dATP, dTTP, dGTP e dCTP – Invitrogen®), 0,2 μL (5U/μL) de *enzimaTaq* DNA polimerase (Invitrogen®), 3 μL de DNA genômico total (3 ng/μL) de cada população e 6,1 μL de água Mili-Q®. Foram utilizados na análise 30 primers aleatórios de 10-mer (Operon Technologies®) (Tabela 2).

As amplificações das amostras de DNA foram realizadas em um termociclador PTC-100 (MJ Research), sob as seguintes condições: 5 min a 94°C; 40 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 36°C, 2 min a 70°C; e uma extensão final de 10 min a 70°C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em tampão TBE 0,5% (90 mM Tris-HCl, 89 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA, pH 8,3), à uma corrente constante de 100 mA por aproximadamente 3 horas, corados com brometo de etídio (0,3 μg/mL) e visualizados sob luz UV. Todas as análises RAPD foram repetidas pelo menos duas vezes.

Tabela 2. Primers oligonucleotídeos (10-mer) usados na análise RAPD.

Primer	**Sequência de nucleotídeo (5'→ 3')**
OPA-12	TCGGCGATAG
OPAB-06	GTGGCTTGGA
OPAU-13	CCAAGCACAC
OPC-07	GTCCCGACGA
OPC-09	CTCACCGTCC
OPF-06	GGGAATTCGG
OPG-04	AGC GTG TCT G
OPG-13	CTCTCCGCCA
OPJ-19	GGACACCACT
OPK-01	CATTCGAGCC
OPK-19	CACAGGCGGA
OPL-19	GAGTGGTGAC
OPM-20	AGGTCTTGGG
OPN-07	CAGCCCAGAG
OPN-10	ACAACTGGGG
OPP-01	GTAGCACTCC
OPP-06	GTGGGCTGAC
OPR-03	ACACAGAGGG
OPR-07	ACTGGCCTGA
OPT-06	CAAGGGCAGA
OPU-05	TTGGCGGCCT
OPV-07	GAAGCCAGCC
OPW-05	GGCGGATAAG
OPW-06	AGGCCCGATG
OPW-15	ACACCGGAAC
OPX-20	CCCAGCTAGA
OPY-05	GGCTGCGACA
OPY-16	GGGCCAATGT
OPZ-04	AGGCTGTGCT
OPZ-17	CCTTCCCACT

2.4 Análise AFLP

A análise utilizando o marcador PCR-AFLP foi realizada conforme o método adaptado de Suazo & Hall (1999), que consiste em quatro etapas. Inicialmente, para cada população de *M. izalcoensis*, 1 µg do DNA genômico total extraído dos ovos foi clivado/digerido por uma enzima de restrição (EcoRI – 15 U/µL; Invitrogen®). Na segunda etapa, os adaptadores específicos foram ligados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem da enzima. Os adaptadores EcoRI (upper e lower) foram aquecidos a 95°C durante 5 min no termociclador (PTC-100, MJ Research), e mantidos em temperatura ambiente durante aproximadamente 10 min.

A reação de ligação/digestão dos adaptadores ao DNA foi realizada em um volume final de 20 µL, contendo: 2 µL de tampão da T4 DNA Ligase 10X, 2 µL de NaCl 0,5M, 0,5 µL de BSA, 2 µL de adaptadores EcoRI [25 µM], 0,5 µL da enzima EcoRI [12 U/µL], 1µL T4 DNA Ligase [1 U/µL], 2 µL de água Milli-Q, 10 µL de DNA [100 ng/µL]. Essa reação foi incubada a 37°C por 12 h. Em cada reação foi retirado um volume de 5 µL para a corrida em gel de agarose 1,5% com a finalidade de conferir o sucesso da digestão.

Após verificação da digestão de cada amostra, o restante da reação (15 µL) foi diluído para o volume final de 150 µL para a realização das reações de PCR. Do total de 150 µL, foi utilizado 1µL do DNA digerido para cada reação. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo: 1 µL DNA total digerido [50 ng/µL], 2,5 µL de tampão 10X sem Cloreto de Magnésio (Invitrogen), 1 µL de $MgCl_2$ [50 mM], 0,5 µL de dNTPs [10 mM], 1 µL do primer [10 µM], 0,3 µL da enzima *Taq* DNA polimerase [5 U/µL; Invitrogen] e 18,3 µL de água Mili-Q. O DNA foi amplificado usando o termociclador PT-C100 (MJ Research) sob as seguintes condições: 1 min a 95°C; 37 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C, 2 min e 30 s a 72°C; e uma extensão final de 10 min a 72°C (Suazo & Hall, 1999). Foram utilizados na análise sete primers aleatórios de 22-mer (Integrated DNA Technologies) (Tabela 3).

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose-synergel a 1,5% (p/v) (0,7% de agarose, 0,4% de synergel; Diversified Biotech Synergel^{TM}), a uma corrente constante de 100 mA por aproximadamente 3 horas. Para visualização, os géis foram corados com brometo de etídio (0,3 μg/mL) e fotografados sob luz UV. A análise foi repetida duas vezes.

Tabela 3. Primers oligonucleotídeos (22-mer) usados na análise AFLP.

Primers	**Sequência de nucleotídeos (5'→ 3')**
AFLP13	AATGACTGCGTACCAATTCAGT
AFLP15	GCC GACTGCGTACCAATTCAGT
AFLP16	CGAGACTGCGTACCAATTCAGT
AFLP17	GGGGACTGCGTACCAATTCAGT
AFLP18	CTCGACTGCGTACCAATTCAGT
AFLP25	CCGGACTGCGTACCAATTCAGT
AFLP30	CACGACTGCGTACCAATTCAGT

2.5 Diversidade genética de *Meloidogyne izalcoensis*

Os fragmentos revelados (DNA *fingerprints*) com os dois marcadores RAPD e AFLP foram usados para inferir a diversidade genética das cinco populações de *M. izalcoensis* e uma população de *M. enterolobii* usada como *outgroup*. Para cada marcador, as bandas amplificadas foram pontuadas como presentes (1) ou ausentes (0) das fotografias digitalizadas dos géis e convertidas em uma matriz binária 0-1. Para a reconstrução filogenética foi realizada uma análise de distância usando o algorítimo de Neighbor-Joining - NJ (Saitou & Nei, 1987) combinando os resultados dos dois marcadores (AFLP e RAPD) no PAUP∗ versão 4b10 (Swofford, 2002), considerando os dados como não ordenados e sem ponderação. Para testar a significância do dendrograma obtido, a análise foi realizada com 1.000 repetições de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) e apenas valores de suporte acima de 50% foram considerados. Como os dois tipos de marcadores poderiam ser considerados independentes um do outro, os dois conjuntos de dados foram analisados em uma análise NJ global usando a abordagem de evidência total proposta por Huelsenbeck *et al*. (1996) com as mesmas configurações das

análises individuais de NJ.

2.6 Análise filogenética de regiões de DNA

Para as análises filogenéticas, o DNA das cinco populações de *M. izalcoensis* previamente caracterizadas foi amplificado e investigado usando os primers para as seguintes regiões:

a) Regiões específicas do rDNA: A região ITS1-ITS2 entre o gene 5.8S (Conjunto de primers: Forward 5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT-3' e Reverse 5'-TCC TCC GCT AAA TGA TAT G-3'; Schmitz *et al*., 1998), e a expansão do fragmento D2-D3 do gene 28S (conjunto de primers: Forward 5'-ACA AAG TAC CGT GAG GGA AAG TTG-3' e Reverse 5'-TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA-3'; De Ley *et al*., 1999), utilizando as condições da PCR descritas por Subbotin *et al*. (2000); **b) Gene mtDNA citocromo c oxidase II (COII):** (Forward 5'-GGT CAA TGT TCA GAA ATT TGT GG-3' e Reverse 5'-TAC CTT TGA CCA ATC ACG CT-3'; Powers & Harris, 1993) usando as condições de PCR descritas por Subbotin *et al*. (2000); **c) Hsp90:** (Conjunto de primers: Forward 5'-GCY GAT CTT GTY AAC AAC CYT GGA AC-3' e Reverse 5'-TCG AAC ATG TCA AAA GGA GC-3') usando condições de PCR de acordo com Nischwitz *et al*. (2013).

Os produtos da PCR foram cortados do gel de agarose e purificados com o Wizard® SV Gel/PCR e PCR Clean Up System (Promega, Inc®), e clonados com o Kit pGEM-T® Easy Vector (Promega, Inc®), seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento do inserto foi realizado em dois clones independentes pela Macrogen (Coreia do Sul).

As sequências de DNA clonadas das populações de *M. izalcoensis* foram alinhadas usando ClustalW no Mega 5.0.3 (Tamura *et al*., 2011) e comparadas com outras sequências obtidas no banco de dados NCBI de importantes espécies de *Meloidogyne* de café, ou seja, *M. exigua*, *M. paranaensis*, *M. incognita*, *M. arabicida* e *M. lopezi*. Foram utilizados como *outgroups* as sequências das espécies *Pratylenchus neglectus* Filipjev and Schuurmans

Stekhoven, 194 (KP995311) (Rensch, 1924), *P. zeae* Graham, 1951 (AB933463), *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949 (KF251133.1) e *P. coffeae* (Zimmermann, 1898) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 (HE601548.1).

Para identificar os modelos de melhor ajuste de cada análise foi utilizado o programa MrModeltest (Nylander, 2004) implementado no PAUP* e as árvores filogenéticas foram geradas com base na análise de Maximum Likelihood (ML) no IQtree (Trifinopoulos *et al*., 2016). Para testar o suporte dos ramos da árvore gerada, o filograma foi inicializado 1.000 vezes, e apenas valores de suporte acima de 50% foram considerados.

2.7 Ensaios de Resistência

O inóculo de *M. izalcoensis* usado nos experimentos foi proveniente do estado de MG e foi multiplicado em plantas de tomate (Cv. Santa Clara) e café (Cv. Catuaí Amarelo IAC 62) por 3 e 8 meses, respectivamente. Os ovos de *M. izalcoensis* foram extraídos de raízes infectadas conforme descrito no item 2.3 (Capítulo 1), usando liquidificador por 40 segundos. Plantas de café foram semeadas em bandejas e posteriormente transplantadas para vasos de polietileno (20 cm de largura x 40 cm de profundidade, capacidade para 5 L), preenchidos com uma mistura de solo autoclavado e composto Bioplant® (1:1). Quando atingiram 4 a 6 pares de folhas, foram inoculados com 10.000 ovos de *M. izalcoensis*/planta.

Quinze genótipos de café foram testados: Catuaí Amarelo IAC 62 e Catuaí Vermelho IAC 99 (controles suscetíveis), Catuaí Vermelho × Amphillo 2-161 (28-2-II), Catuaí Vermelho × Amphillo 2-161 (16-5-III), Híbrido de Timor UFV 408-01 MG (6-I-III), IAPAR 59, IPR 99, IPR100, IPR 102, IPR 103, IPR 105, IPR 106, IPR 107, IPR 108 e Apoatã IAC 2258 (*C. canephora*) (Tabela 4). As plantas foram dispostas em delineamento inteiramente casualizado com oito repetições para cada tratamento. Quatro experimentos foram conduzidos em casa de vegetação na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen, Brasília, DF): O primeiro foi implantado em 27 de março de 2018, o segundo em 11 de abril de 2019 (repetição),

o terceiro e o quarto em 18 de março de 2020 e 12 de junho de 2020, respectivamente.

A avaliação dos quatro experimentos foi realizada aos 240-350 dias após a inoculação (DAI). Foram determinadas as seguintes variáveis: peso fresco da raiz, índice de galhas (IG), número total de ovos por grama de raiz, número total de ovos, fator de reprodução (FR) e reação final. Antes de avaliar os ensaios, algumas plantas dos controles (cafeeiros suscetíveis) suplementares foram sempre analisadas para determinar se o fator de reprodução era alto o suficiente para avaliar os bioensaios.

Para determinar o peso fresco das raízes, as raízes foram cuidadosamente lavadas para remover o solo aderido e, após a remoção do excesso de água, foram pesadas. Os sistemas radiculares foram corados com Floxina B a 0,0015 % (15 mg/L) por 15-20 minutos e avaliados quanto ao índice de galhas. O índice de galhas (IG) foi determinado com base em uma escala de 0 a 5 proposta por Hartman & Sasser (1985), como segue: 0 = ausência; 1 = 1 a 2; 2 = 3 a 10; 3 = 11 a 30; 4 = 31 a 100 e 5 = mais de 100 galhas por planta. A extração dos ovos foi realizada de acordo com os métodos citados acima, utilizando NaOCl 1%. O número total de ovos por planta foi determinado em microscópio de luz usando lâmina de Peter em contagem tripla.

O fator de reprodução (FR) foi calculado como FR = PF/PI, onde PF corresponde à população final de nematoides e PI refere-se à população inicial de nematoides (IP = 10.000). Genótipos para FR < 1 foram considerados resistentes (R), enquanto aqueles para FR > 1 foram considerados suscetíveis (S). Populações com valores de FR estatisticamente diferentes foram agrupadas como baixa suscetibilidade (BS), alta suscetibilidade (AS) e moderada resistência (MR). Os dados foram transformados em log (x+1) antes da análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparados pelo teste de Scott-Knott ($P<0,05$), utilizando o software SISVAR (Ferreira, 2011).

Tabela 4. Descrição dos genótipos de *Coffea* spp. usados neste estudo.

Genótipos ou códigos de acesso	Espécies	Origem	Instituto de origem
Catuaí Amarelo IAC 62	*Coffea arabica* L.	Caturra Amarelo IAC 476-11 × Mundo Novo IAC 374-19	IAC
Catuaí Vermelho IAC 99	*C. arabica*	Caturra Amarelo IAC 476-11 × Mundo Novo IAC 374-19	IAC
Porta-enxerto Cv. Apoatã IAC 2258	*Coffea canephora* L.	Matriz 2258 do CATIE × Seleções de cafeeiros resistentes a nematoides	IAC
MG 0294 pl.1 R1	*C. arabica*	Híbrido de Timor 408-01 MG 0294 pl.1 R1 (6-6-II)	EPAMIG
MG 0179 pl.3 R1	*C. arabica*	Catuaí Vermelho × Amphillo 2-161 MG 0179 pl3 R1 (28-2-II)	EPAMIG
MG 0179 pl.1 R1	*C. arabica*	Catuaí Vermelho × Amphillo 2-161 MG 0179 pl1 R1 (16-5-III)	EPAMIG
IAPAR 59	*C. arabica*	Villa Sarchi CIFC 971/10 × Híbrido de Timor CIFC 832/2	IAPAR
IPR 99	*C. arabica*	Villa Sarchi CIFC 971/10 × Híbrido de Timor CIFC 832/2	IAPAR
IPR 100	*C. arabica*	Catuaí V. IAC 81 × (Catuaí V. IAC 81 x IAC 1110-8)	IAPAR
IPR 102	*C. arabica*	Catuaí V. IAC 99 × Icatu de porte baixo	IAPAR
IPR 103	*C. arabica*	Catuaí V. IAC 99 × Icatu de porte baixo	IAPAR
IPR 105	*C. arabica*	Catuaí V. IAC 81 × (Catuaí V. IAC 81 × IAC 1110-8)	IAPAR
IPR 106	*C. arabica*	Icatu IAC 925 × *Coffea arabica* desconhecido de porte baixo	IAPAR
IPR 107	*C. arabica*	IAPAR 59 × Mundo Novo IAC 376-4	IAPAR
IPR 108	*C. arabica*	IAPAR 59 × (Catuaí V. IAC 99 × Icatu de porte baixo	IAPAR

Abreviações: IAC, Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP; EPAMIG, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Belo Horizonte,MG; IAPAR, Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná, Londrina, PR.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização das populações de nematoides

Todas as populações de *M. izalcoensis* foram identificadas por seu fenótipo de esterase (Est I4, Rm: 0,86, 0,96, 1,24, 1,30) (Figura 1) conforme relatado na descrição de Carneiro *et al*. (2005). Para confirmar a identificação, o marcador SCAR específico desenvolvido para *M. izalcoensis*, ou seja, um único amplicon de 670 pb, foi obtido para todas as populações de *M. izalcoensis* (Iza 1-5) utilizadas nesse estudo (Figura 2).

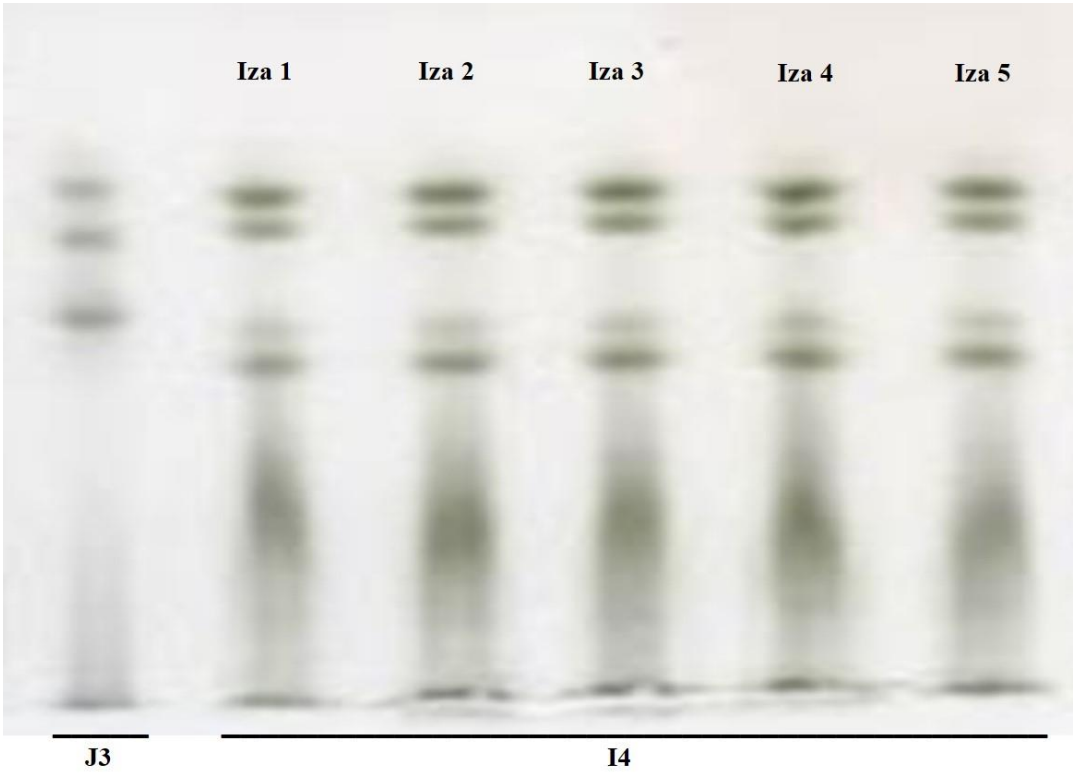

Figura 1. Fenótipos de esterase de populações de *Meloidogyne izalcoensis* (Est I4). Iza 1-5 do Brasil, El Salvador, Benim, Tanzânia e Vietnã, respectivamente. *Meloidogyne javanica* (Est J3) está incluída como referência.

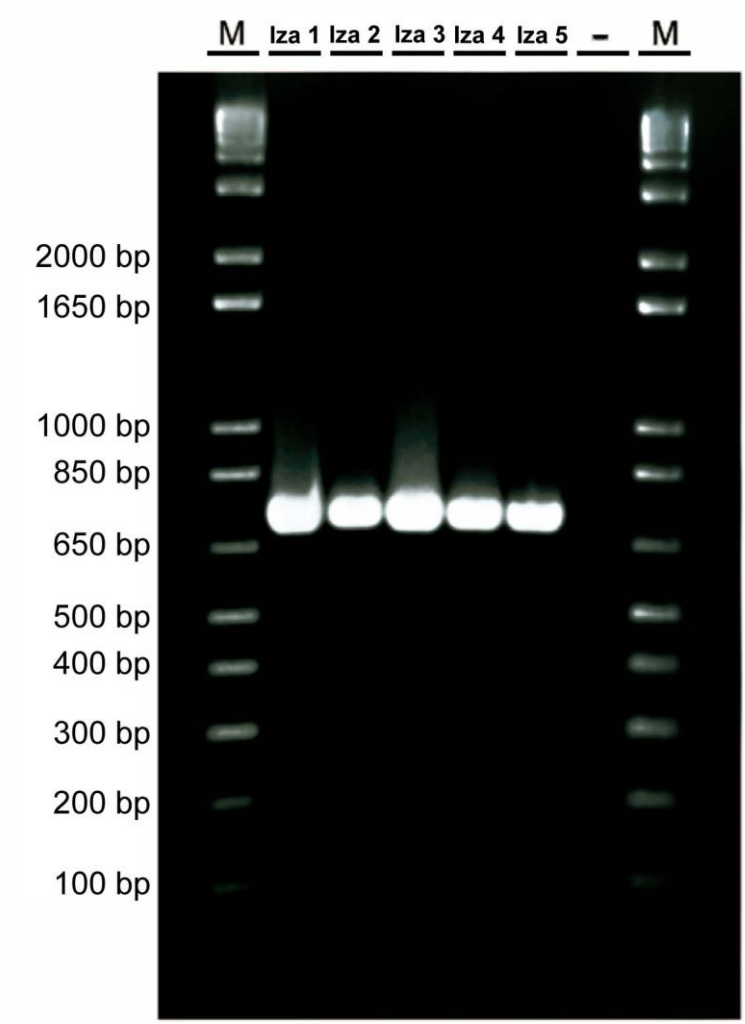

Figura 2. Padrões de amplificação de PCR para cinco populações de *Meloidogyne izalcoensis* geradas com primers SCAR específico izAB02F/R (Correa *et al*., 2013). M: 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen); Iza 1-5, *M. izalcoensis* do Brasil, El Salvador, Benin, Tanzânia e Vietnã, respectivamente. (-) Controle negativo.

3.2 Diversidade genética de *Meloidogyne izalcoensis*: Marcadores RAPD e AFLP

Para o estudo da diversidade genética das cinco populações de *M. izalcoensis* foram utilizados um total de 30 primers RAPD e 7 de AFLP. O número de fragmentos amplificados para os dois marcadores foi de 306 (RAPD: 200 fragmentos monomórficos e 64 polimórficos; AFLP: 36 monomórficos e 6 polimórficos) e os tamanhos dos fragmentos amplificados variaram de 200 a 4500 pb.

Em geral, houve baixa variabilidade genética entre as populações de *M. izalcoensis* com

22% de polimorfismo. A matriz binária 0-1 (ausência/presença de fragmentos) obtida de todo o conjunto de marcadores foi utilizada para inferir as relações genéticas entre os isolados. Os resultados do dendrograma de Neighbor Joining (NJ) confirmaram uma baixa variabilidade intraespecífica entre as populações de *M. izalcoensis* do Brasil, África (Benim e Tanzânia) e Vietnã (Iza 1, Iza 3, Iza 4 e Iza 5, respectivamente), com 91% bootstrap, enquanto a população de El Salvador (Iza 2) exibiu pouca diferença genética das outras populações (Figura 3).

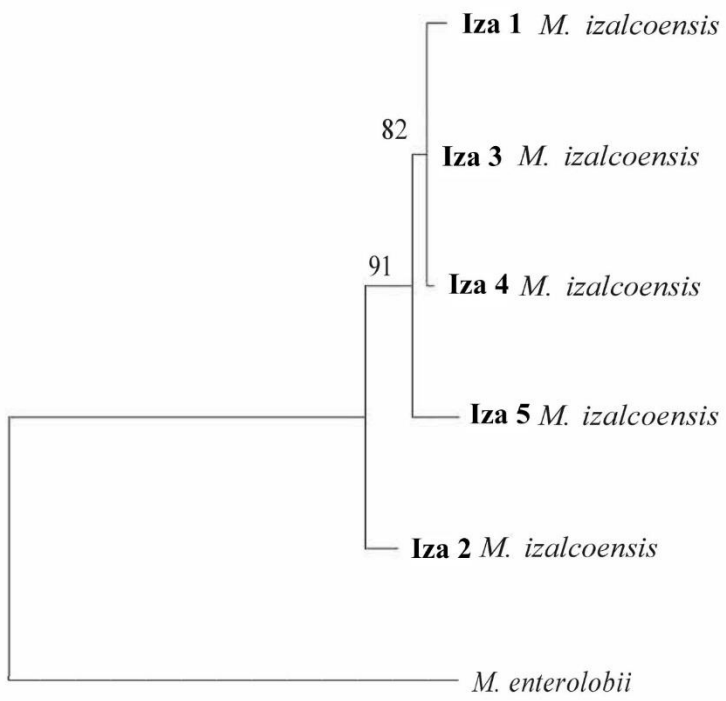

Figura 3. Árvore concatenada Neighbor-Joining (NJ) mostrando a análise da variabilidade genética dos marcadores RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) e AFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) de 5 populações de *Meloidogyne izalcoensis*. Os números à esquerda das ramificações são os valores *bootstrap* de 1.000 réplicas. Populações Iza 1 a 5 são do Brasil, El Salvador, Benim, Tanzânia e Vietnã, respectivamente. *Meloidogyne enterolobii* foi usado como *outgroup*.

3.3 Análise filogenética de regiões de DNA: ITS, D2-D3, COII e Hsp90

Na análise filogenética obtida na região intergênica ITS1-5.8S-ITS2, as populações de *M. izalcoensis* não formaram *clusters* coesos (Figura 4A), sugerindo uma baixa resolução filogenética dessas sequências. No entanto, para as outras três sequências estudadas, todas as populações de *M. izalcoensis* de diferentes origens se agruparam com 71%, 90% e 69% de suporte *bootstrap* para as regiões D2D3, COII e Hsp90, respectivamente (Figuras 4B, 5 e 6), indicando que esses marcadores são altamente conservados para as populações dessa espécie utilizadas nesse estudo. Além disso, os dois últimos marcadores permitiram a separação das populações de *M. izalcoensis* de outras importantes espécies de NGs do café, incluindo *M. exigua*, *M. paranaensis*, *M. incognita*, *M. arabicida* e *M. lopezi*, mostrando que estes são excelentes marcadores específicos para essas espécies.

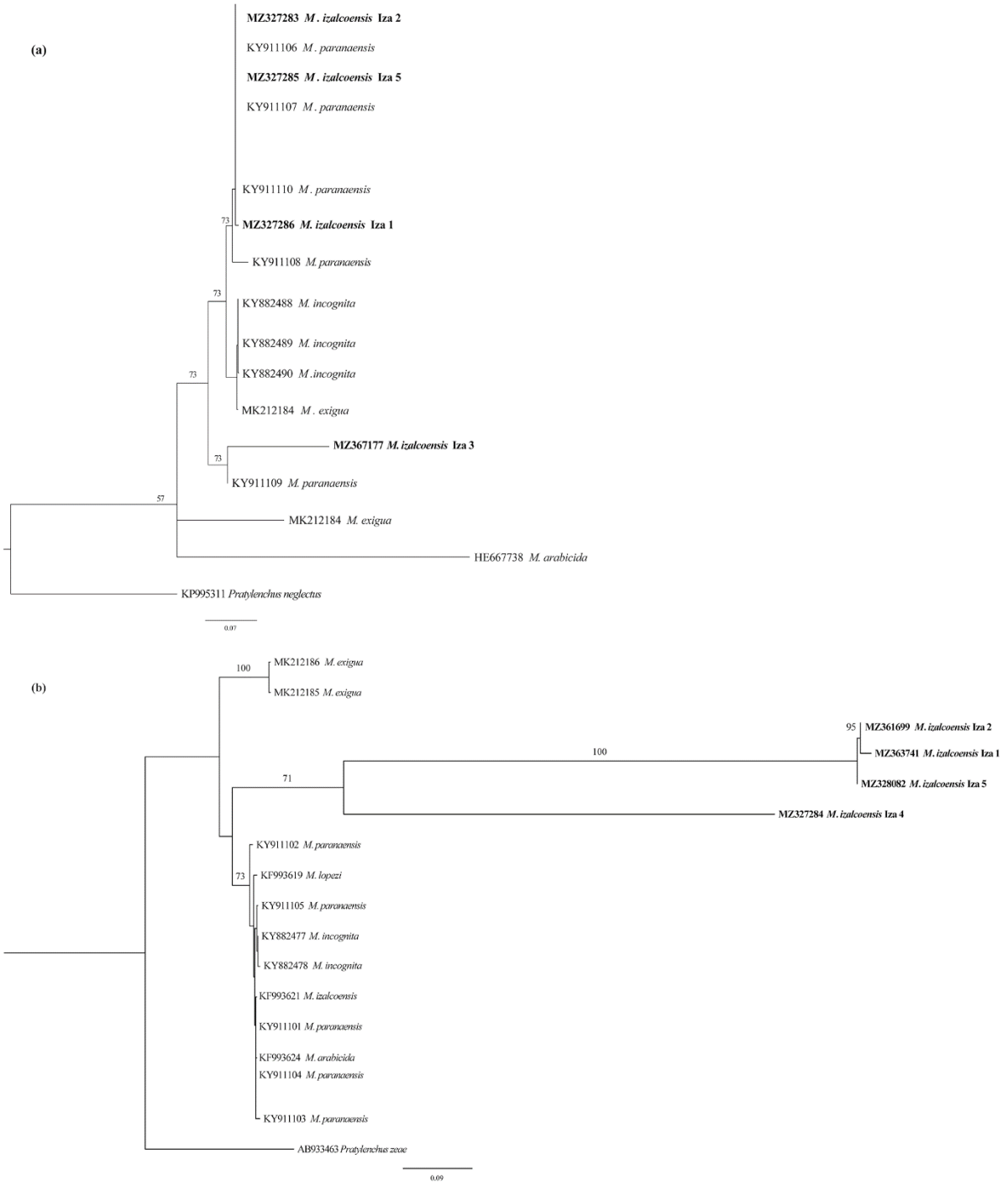

Figura 4. Análise de Maximum Likelihood mostrando as relações filogenéticas de populações de *Meloidogyne izalcoensis* com espécies relacionadas com base nas regiões do DNA ribossomal. **A)** Sequências ITS1-5.8S-ITS2 rDNA; **B**) Sequências da região do fragmento D2-D3 do 28S rDNA. Os números à esquerda das ramificações são valores de *bootstrap* para 1.000 repetições. Os números de acesso para sequências de genes recuperadas do GenBank estão listados ao lado dos nomes das espécies e as sequências das populações investigadas neste estudo estão destacadas em negrito, com a adição de um código populacional, Iza 1-5 para populações do Brasil, El Salvador, Benim, Tanzânia e Vietnã, respectivamente.

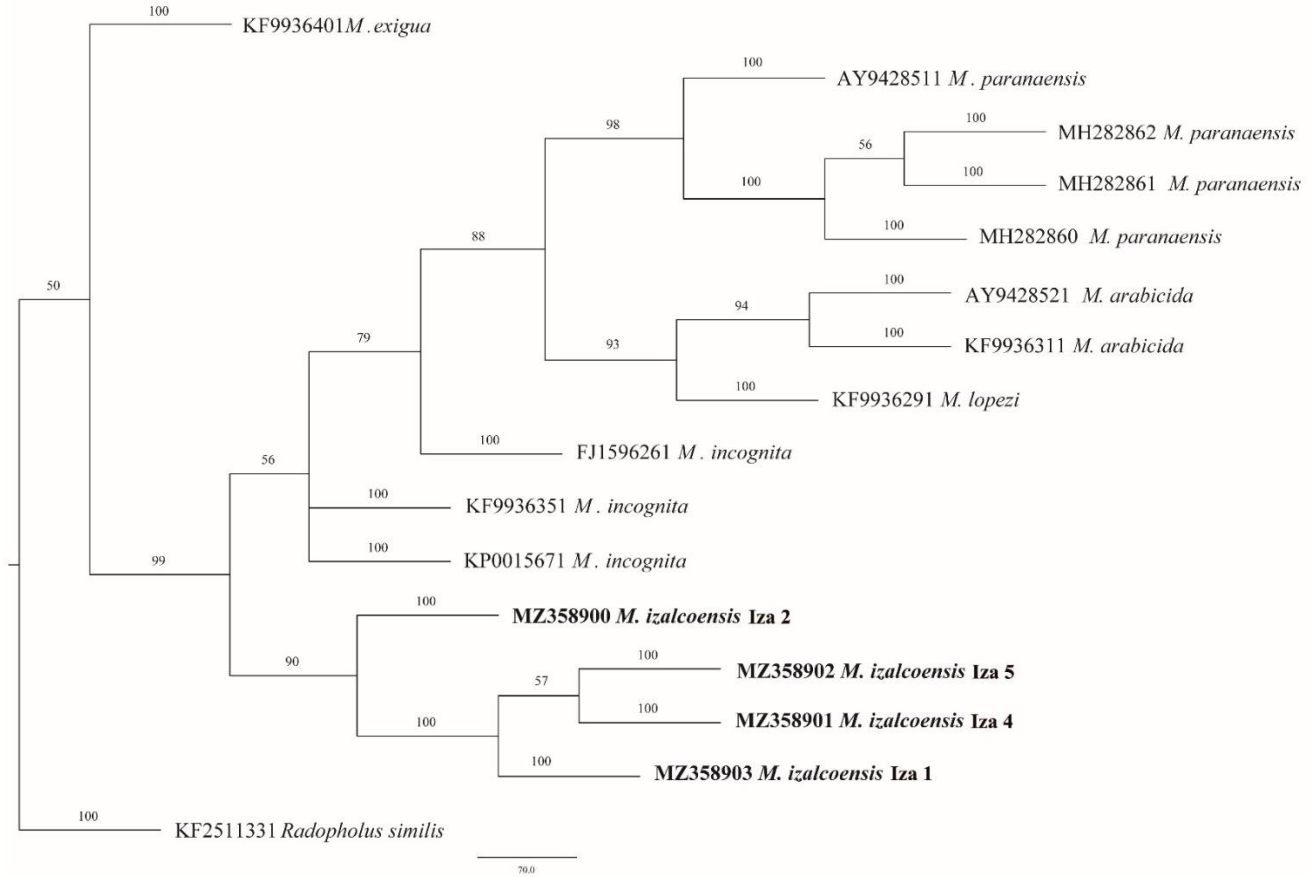

Figura 5. Análise de Maximum Likelihood mostrando as relações filogenéticas de populações de *Meloidogyne izalcoensis* com espécies relacionadas com base nas sequências COII-mtDNA. Os números à esquerda das ramificações são valores de *bootstrap* para 1.000 repetições. Os números de acesso para sequências de genes recuperadas do GenBank estão listados ao lado dos nomes das espécies e as sequências das populações investigadas neste estudo estão destacadas em negrito, com a adição de um código populacional, Iza 1, 2, 4 e 5 para populações do Brasil, El Salvador, Tanzânia e Vietnã, respectivamente.

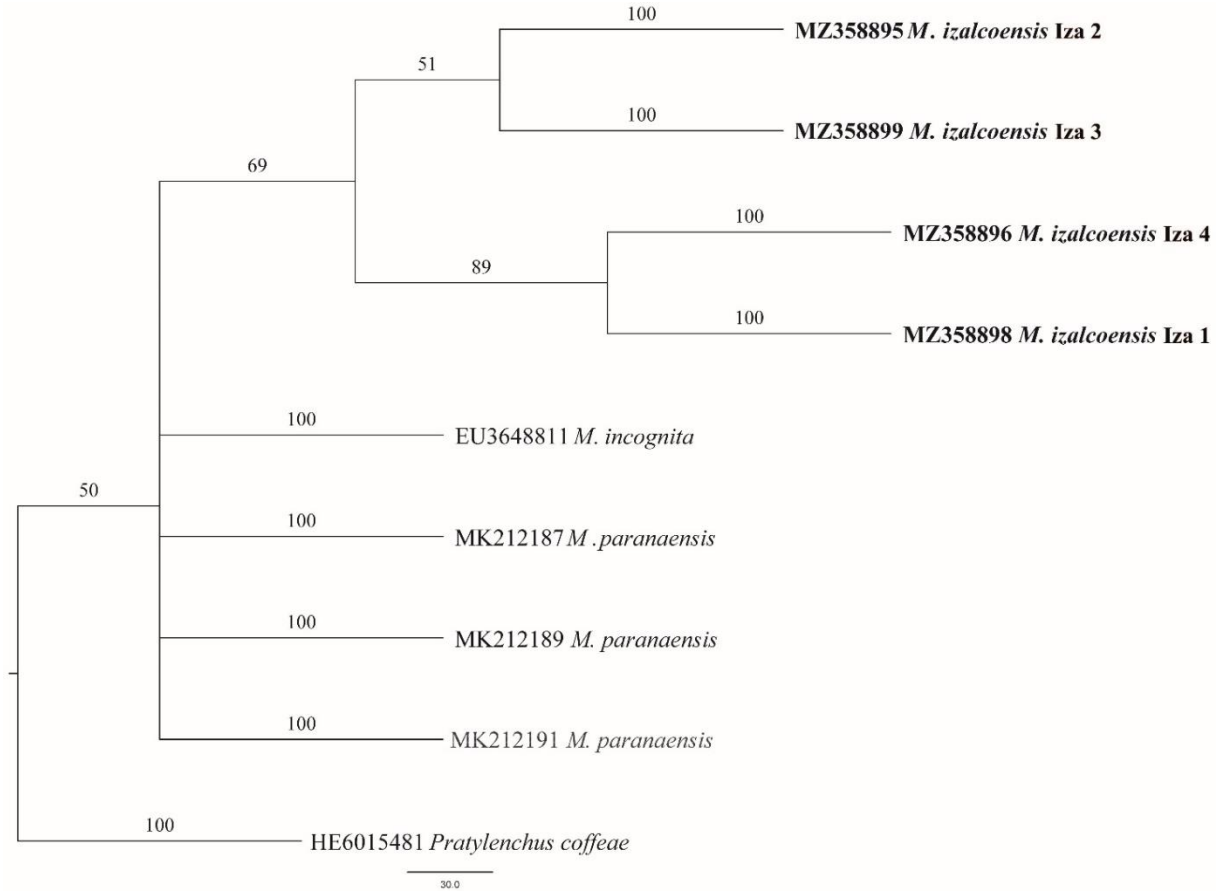

Figura 6. Análise de Maximum Likelihood mostrando as relações filogenéticas de populações de *Meloidogyne izalcoensis* com espécies relacionadas com base nas sequências do gene Hsp90. Os números à esquerda das ramificações são valores de *bootstrap* para 1.000 repetições. Os números de acesso para sequências de genes recuperadas do GenBank estão listados ao lado dos nomes das espécies e as sequências das populações investigadas neste estudo estão destacadas em negrito, com a adição de um código populacional, Iza 1, 2, 3 e 4, para populações do Brasil, El Salvador, Benim e Tanzânia, respectivamente.

3.4 Ensaios de resistência

Nos dois primeiros ensaios (Tabelas 5 e 6), nenhuma cultivar diferiu significativamente do controle suscetível (Catuaí Amarelo IAC 62) quanto ao peso fresco de raiz, mas houve diferença entre a cv. IPR 100 e o porta-enxerto Apoatã. No terceiro e quarto ensaio (Tabelas 7 e 8), apenas a IPR 103 apresentou menor peso de raiz quando comparado com todos os tratamentos.

No primeiro experimento (Tabela 5), quando analisado o número de ovos por grama de raiz, apenas o genótipo Catuaí Vermelho × Amphillo 2-161 (16-5-III) e o porta-enxerto Apoatã IAC 2258 diferiram estatisticamente do controle. Em relação ao fator de reprodução (FR), os genótipos IPR 100, Híbrido de Timor e Catuaí Vermelho × Amphillo 2-161 (28-2-II) não diferiram estatisticamente do controle e foram considerados altamente suscetíveis (AS) a *M. izalcoensis*. Em contrapartida, o genótipo MG 0179 pl.1 R1 (Catuaí Vermelho × Amphillo 2-161 [16-5-III]) e o porta-enxerto Apoatã IAC 2258 diferiram estatisticamente da testemunha e foram considerados suscetíveis (S) e moderadamente resistente (MR) com uma redução de FR de 77% e 83%, respectivamente.

Na repetição, que foi o segundo experimento (Tabela 6), os resultados foram semelhantes aos do primeiro ensaio, sem diferenças na reação entre as cultivares. Novamente, o porta-enxerto Apoatã foi o único que se mostrou moderadamente resistente. Analisando as 16 repetições individuais de Apoatã, ocorreu uma segregação genética de 43,8%, com valores de FR variando de 9,8 a 0, mostrando plantas suscetíveis e resistentes nos mesmos tratamentos (dados não apresentados). De modo geral, nos dois primeiros ensaios (Tabelas 5 e 6), a cultivar Apoatã apresentou FRs médios baixos (3,7 e 1,6) e algumas plantas tiveram FRs zero, tornando-se uma interessante fonte de resistência.

Tabela 5. Reação de seis genótipos de *Coffea* spp. a população brasileira de *Meloidogyne izalcoensis*, 300 dias após inoculação com 10.000 ovos.

Genótipos ou códigos de acesso[1]	PFR (g)[2]	IG[3]	Ovos/g de raiz[4]	FR[5]	Reação[6]
Catuaí Amarelo IAC 62**	29,6 AB*	5	7.398,7 A	21,9 A	AS
IPR 100	44,8 A	5	3.995,5 ABC	17,9 A	AS
MG 0294 pl.1 R1	28,7 AB	5	5.888,5 AB	16,9 A	AS
MG 0179 pl.3 R1	33,3 AB	5	4.594,6 ABC	15,3 A	AS
MG 0179 pl.1 R1	30,9 AB	5	1.650,5 C	5,1 B	S
Porta-enxerto cv. Apoatã IAC 2258	16,1 B	4	2.298,1 BC	3,7 C	MR

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e os dados originais foram mantidos na tabela; CV = Coeficiente de variação; [1]Genótipos ou códigos de acesso são dados na Tabela 4; [2]Pesos frescos de raízes (PFR) foram transformados usando $\sqrt{}$ (PFR +0,5), CV= 21,21%; [3]Índice de galhas (IG): 0 = ausência; 1 = 1 a 2; 2 = 3 a 10; 3 = 11 a 30; 4 = 31 a 100, e 5 = > 100 galhas por planta (Hartman & Sasser, 1985). [4]Ovos/g de raízes foram transformados usando Log_{10} (x + 1), CV = 43,65%; [5]Fator de reprodução (FR) foi transformado usando Log_{10} (x+1), CV = 26,62%; [6]AS = Altamente suscetível; S = Suscetível; MR = Moderadamente resistente. **Controle suscetível.

Tabela 6. Reação de seis genótipos de *Coffea* spp. a população brasileira de *Meloidogyne izalcoensis*, 240 dias após inoculação com 10.000 ovos.

Genótipos ou códigos de acesso[1]	PFR (g)[2]	IG[3]	Ovos/g de raiz[4]	FR[5]	Reação[6]
Catuaí Amarelo IAC 62**	27,7 AB*	5	9.386,3 AB	26,0 A	AS
IPR 100	37,2 A	5	6.505,4 AB	24,2 A	AS
MG 0294 pl.1 R1	30,3 AB	5	4.488,4 AB	13,6 A	AS
MG 0179 pl.3 R1	22,0 AB	5	3,636,4 AB	8,0 B	S
MG 0179 pl.1 R1	24,0 AB	5	6.000 AB	14,4 A	AS
Porta-enxerto cv. Apoatã IAC 2258	18,1 B	3	884,0 B	1,6 C	MR

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e os dados originais foram mantidos na tabela; CV = Coeficiente de variação; [1]Genótipos ou códigos de acesso são dados na Tabela 4; [2]Pesos frescos de raízes (PFR) foram transformados usando $\sqrt{}$ (PFR +0,5), CV= 23,65%; [3]Índice de galhas (IG): 0 = ausência; 1 = 1 a 2; 2 = 3 a 10; 3 = 11 a 30; 4 = 31 a 100, e 5 = > 100 galhas por planta (Hartman & Sasser, 1985). [4]Ovos/g de raízes foram transformados usando Log_{10} (x + 1), CV = 36,70%; [5]Fator de reprodução (FR) foi transformado usando Log_{10} (x+1), CV = 33,02%; [6]AS = Altamente suscetível; S = Suscetível; MR = Moderadamente resistente. **Controle suscetível.

No terceiro experimento (Tabela 7), os genótipos IAPAR 59, IPR 99, IPR 102, IPR 105, IPR 106, IPR 107 e IPR 108 apresentaram maior número de ovos por grama de raiz em relação ao controle, mas não houve diferença estatística entre as cultivares IPR 100, IPR 103 e o controle. Nesse experimento, os FRs dos genótipos IAPAR 59, IPR 99, IPR 100, IPR 102, IPR 105, IPR 106 e IPR 108 não diferiram estatisticamente do controle e foram considerados suscetíveis a *M. izalcoensis*. Os mesmos resultados para o FR dessas cultivares foram obtidos no quarto experimento (Tabela 8), exceto para IPR 107 e IPR 108, e, novamente, não diferiram estatisticamente do controle e foram consideradas suscetíveis. Em contraste, os genótipos IPR 107 e IPR 108 diferiram estatisticamente do controle e apresentaram maior número de ovos por grama de raiz, assim como maior FR, e foram considerados altamente suscetíveis. Em ambos os experimentos (Tabelas 7 e 8), o genótipo IPR 103 apresentou FR mais baixo que todas as outras cultivares e foi considerado de baixa suscetibilidade (BS). No entanto, cabe ressaltar que o IPR 103 possui um sistema radicular menor (1/5 do controle) e, como o FR é calculado a partir do número total de ovos/planta e depende do tamanho da raiz, isso poderia explicar o menor FR.

O índice de galhas foi o mesmo (IG = 5) para todos os genótipos nos quatro experimentos, exceto para o porta-enxerto Apoatã IAC 2258, que apresentou IG = 4 no experimento 1 (Tabela 5) e IG = 3 no experimento 2 (Tabela 6). Todas as cultivares e genótipos de café avaliados apresentaram sintomas característicos do parasitismo de *M. izalcoensis*: presença de pequenas galhas arredondadas, geralmente em maior número nas raízes mais jovens, necrose na ponta da raiz e massas de ovos externas. No entanto, embora Apoatã IAC 2258 tenha apresentado sintomas típicos ocasionados por *M. izalcoensis* em algumas plantas avaliadas, em outras plantas esses sintomas não foram observados (dados não apresentados).

Em resumo, a maioria dos genótipos avaliados nos quatro experimentos (Catuaí Amarelo 62, Catuaí Vermelho IAC 99, Híbrido de Timor HT UFV 408-01 MG 0294 pl.1 R1

(6-I-III), Catuaí Vermelho × Amphillo 2-161 MG 0179 pl3 R1 (28-2-II), Catuaí Vermelho × Amphillo 2-161 MG 0179 pl1 R1 (16-5-III), IAPAR 59, IPR 99, IPR 100, IPR 102, IPR 105, IPR 106, IPR 107 e IPR 108) mostraram suscetibilidade a *M. izalcoensis*. Apenas o porta-enxerto Apoatã IAC 2258 pode ser considerado moderadamente resistente, com segregação de algumas plantas para essa característica (dados não apresentados).

Tabela 7. Reação de dez genótipos de *Coffea* spp. a população brasileira de *Meloidogyne izalcoensis*, 350 dias após a inoculação com 10.000 ovos.

Genótipos[1]	PFR (g)[2]	IG[3]	Ovos/g de raiz[4]	FR[5]	Reação[6]
Catuaí vermelho IAC 99**	106,3 A	5	4.317,9 C	45,9 B	S
IAPAR 59	55,8 B	5	8.655,9 AB	48,3 B	S
IPR 99	95,5 AB	5	7.308,9 AB	68,9 AB	S
IPR 100	74,6 AB	5	5.750,7 C	42,9 B	S
IPR 102	89,5 AB	5	8.301,7 AB	74,3 AB	S
IPR 103	21,9 C	5	5.342,5 C	11,7 C	BS
IPR 105	66,3 B	5	10.346,9 A	68,6 AB	S
IPR 106	68,3 B	5	4.011,7 AB	27,4 B	S
IPR 107	119,0 A	5	10.798,3 A	128,5 A	AS
IPR 108	87,5 AB	5	7.874,3 AB	69,5 AB	S

*Médias seguidas na coluna pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e os dados originais foram mantidos na tabela; CV = Coeficiente de variação; [1]Genótipos ou códigos de acesso são dados na Tabela 4; [2]Pesos frescos de raízes (PFR) foram transformados usando $\sqrt{(PFR + 0,5)}$, CV= 22,40%; [3]Índice de galhas (IG): 0 = ausência; 1 = 1 a 2; 2 = 3 a 10; 3 = 11 a 30; 4 = 31 a 100, e 5 = > 100 galhas por planta (Hartman & Sasser, 1985). [4]Ovos/g de raízes foram transformados usando Log_{10} (x + 1), CV = 14,91%; [5]Fator de reprodução (FR) foi transformado usando Log_{10} (x+1), CV = 16,23%; [6]S = Suscetível; BS = Baixa Suscetibilidade; AS = Altamente Suscetível. **Controle suscetível.

Tabela 8. Reação de dez genótipos de *Coffea* spp. a população brasileira de *Meloidogyne izalcoensis*, 340 dias após a inoculação com 10.000 ovos.

Genótipos[1]	PFR (g) [2]	IG[3]	Ovos/g de raiz[4]	FR[5]	Reação[6]
Catuaí vermelho IAC 99**	70,3 AB	5	5.391,2 BC	37,9 B	S
IAPAR 59	59,1 B	5	9.864,6 AB	58,3 B	S
IPR 99	71,9 AB	5	8.497,9 AB	61,1 AB	S
IPR 100	96,6 AB	5	9.120,1 AB	88,1 AB	S
IPR 102	45,3 B	5	10.662,3 AB	48,3 B	S
IPR 103	30,3 C	5	2.541,3 C	7,7 C	BS
IPR 105	44,7 B	5	7.807,6 AB	29,9 B	S
IPR 106	52,8 B	5	6.609,8 BC	34,9 B	S
IPR 107	95,3 AB	5	15.372,5 A	146,5 A	AS
IPR 108	114,0 A	5	12.166,7 A	138,7 A	AS

*Médias seguidas na coluna pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e os dados originais foram mantidos na tabela; CV = Coeficiente de variação; [1]Genótipos ou códigos de acesso são dados na Tabela 4; [2]Pesos frescos de raízes (PFR) foram transformados usando $\sqrt{(PFR + 0,5)}$, CV= 25,14%; [3]Índice de galhas (IG): 0 = ausência; 1 = 1 a 2; 2 = 3 a 10; 3 = 11 a 30; 4 = 31 a 100, e 5 = > 100 galhas por planta (Hartman & Sasser, 1985). [4]Ovos/g de raízes foram transformados usando $Log_{10} (x + 1)$, CV = 18,1%; [5]Fator de reprodução (FR) foi transformado usando $Log_{10} (x+1)$, CV = 15,3%; [6]S = Suscetível; BS = Baixa Suscetibilidade; AS = Altamente Suscetível. **Controle suscetível.

4. DISCUSSÃO

A variabilidade intraespecífica e a estrutura genética não são bem caracterizadas para populações de *M. izalcoensis*, mas essa informação é crucial para evitar erros de identificação e otimizar estratégias de controle eficazes. Estudos genéticos em conjunto com métodos taxonômicos tradicionais e integrados com abordagens enzimáticas e moleculares provaram ser úteis na resolução de problemas de identificação de nematoides (Santos *et al*., 2012, 2018, 2020). Este é o primeiro estudo de caracterização genética e filogenética de diferentes populações de *M. izalcoensis*, uma espécie parasita de café recentemente detectada no Brasil (Stefanelo *et al*., 2019).

O desenvolvimento de técnicas moleculares abriu novas perspectivas para a identificação de espécies de *Meloidogyne* e para estudos sobre variabilidade intraespecífica e relações filogenéticas usando regiões distintas do DNA ribossomal (rDNA), o gene mitocondrial citocromo *c* oxidase II (COII) e o gene codificador de proteínas nuclear (Hsp90) para NGs (Randig *et al*., 2002; Carneiro *et al*., 2004; Santos *et al*., 2012, 2018, 2020). Os marcadores SCAR foram desenvolvidos para os NGs frequentemente associados ao café no Brasil e nas Américas (Randig *et al*., 2002; Correa *et al*., 2013), ou seja, *M. exigua*, *M. paranaensis* e *M. incognita* (Randig *et al*., 2002) e para as novas espécies *M. izalcoensis* e *M. arabicida* (Correa *et al*., 2013). No presente estudo, essa abordagem foi validada pela análise de cinco populações de *M. izalcoensis* de diferentes localizações geográficas no mundo e exibindo o mesmo fenótipo de esterase (Est I4). O uso de fenótipos de isoenzimas de esterase é restrito à caracterização de fêmeas de NGs (Carneiro & Cofcewicz, 2008) e os métodos baseados em PCR são mais adequados para diagnóstico de rotina, especialmente em raízes de café infectadas com *Meloidogyne* spp., em que as fêmeas coletadas de campos são frequentemente mal-preservadas, dificultando a identificação usando as isoenzimas de esterase. A PCR é rápida, pode ser usada em um grande número de amostras e pode ser aplicada

a ovos e J2 de amostras de solo de campo e raízes. Também não requer multiplicação na planta hospedeira até que os nematoides atinjam o estádio de fêmea adulta antes da identificação.

Marcadores moleculares neutros, como RAPD e AFLP, têm sido usados para analisar a diversidade genética de espécies de *Meloidogyne* do café (Randig *et al*., 2002; Carneiro *et al*., 2004; Muniz *et al*., 2008; Santos *et al*., 2012, 2018). Neste estudo, usando esses marcadores, foi encontrada baixa variabilidade genética entre as cinco populações de *M. izalcoensis* de diferentes localizações geográficas no mundo. Essa baixa variabilidade genética também foi observada para outras espécies de *Meloidogyne* relacionadas ao café, ou seja, *M. incognita* (Santos *et al*., 2012) e *M. paranaensis* (Santos *et al*., 2018). No entanto, o oposto foi observado entre as populações de *M. exigua*, entre as quais foi observado um alto grau de variabilidade genética (Muniz *et al*., 2008). Este resultado está relacionado ao seu modo de reprodução: partenogênese mitótica para *M. incognita*, *M. paranaensis* e *M. izalcoensis*, e partenogênese meiótica para *M. exigua*.

Sequências dos genes ITS1-5.8S-ITS2, D2-D3 (28S) rRNA, mitocondrial COII e HSP90 têm sido usadas para inferir relações filogenéticas em espécies de NGs e podem permitir que processos evolutivos sejam resolvidos em diferentes níveis de divergência (Humphreys-Pereira *et al*., 2014; Janssen *et al*., 2017; Santos *et al*., 2020). No entanto, no presente estudo, poucas sequências polimórficas foram encontradas para populações de *M. izalcoensis*.

O rDNA é relativamente conservado com alta similaridade entre as três espécies tropicais mais comuns de NGs, *M. incognita*, *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949 e *M. javanica* (Treub 1885) Chitwood, 1949, e, portanto, não é útil como região para identificação dessas espécies (Janssen *et al*., 2017). As diversas cópias do rDNA fornecem um amplo alvo para amplificação por PCR e permite que a variação intraespecífica seja detectada em populações de *Meloidogyne* spp. (Zijlstra *et al*., 1995; Adam *et al*., 2007). No entanto, nas

análises da região intergênica ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, as populações de *M. izalcoensis* não formaram clusters coesos, demonstrando uma limitação filogenética desses marcadores. Em contraste, as análises obtidas das regiões D2-D3 do rDNA 28S agruparam as populações de *M. izalcoensis*. No entanto, a sequência do isolado KF 993621 de *M. izalcoensis* estudada por Álvarez-Ortega *et al*. (2019) não se agrupou com as demais sequências, apresentando certa discrepância ainda a ser explicada.

Uma região do gene HSP90 também foi usada anteriormente para distinguir diferentes espécies de *Meloidogyne* (Blouin, 2002; Tigano *et al*., 2005; Skantar *et al*., 2008), mas no presente estudo foi verificada uma baixa diversidade nas sequências de HSP90 entre as populações de *M. izalcoensis*.

Do ponto de vista da identificação, o genoma mitocondrial fornece uma rica fonte de marcadores genéticos para identificação (Hu & Gasser, 2006). Essa região tem uma taxa de evolução mais rápida do que os genes nucleares correspondentes (Blok & Powers, 2009). De fato, a região codificadora mitocondrial já é considerada uma região de código de barras (*barcoding*) com melhor potencial para distinguir alguns grupos de *Meloidogyne* spp., porque regiões intergênicas demonstraram conter repetições de AT que parecem não se correlacionar com eventos de especiação (Pagan *et al*., 2015). Essa região tem sido usada para distinguir *Meloidogyne* spp. (Powers & Harris, 1993; Blok *et al*., 2002; Brito *et al*., 2004). No presente estudo, as sequências COII de *M. izalcoensis* mostraram-se úteis tanto para identificação de espécies quanto para estudos filogenéticos, como observado para algumas outras espécies de NGs em café, por exemplo, *M. paranaensis* (Santos *et al*., 2020). Na realidade, em nosso estudo, este marcador permitiu a separação de populações de *M. izalcoensis* de outras importantes espécies de *Meloidogyne* do café, incluindo *M. exigua, M. paranaensis*, *M. incognita*, *M. arabicida* e *M. lopezi*.

Investigando a resistência do café a *M. izalcoensis*, esse estudo confirmou resultados

anteriores e forneceu novas informações. Resultados semelhantes aos aqui obtidos para o Híbrido de Timor UFV 408-01 foram relatados por Carneiro *et al*. (2008), que testaram a progênie H419-5-4-5 obtida do cruzamento artificial da cultivar Catuaí Amarelo IAC 30 x Timor UV 445-46, que foram suscetíveis a *M. izalcoensis*, mas resistentes a *M. exigua*. Hernández e colaboradores (2004) não observaram resistência a *M. izalcoensis* em cultivares de *C. arabica* da Etiópia, mas a resistência a *M. paranaensis* foi observada por Boisseau *et al*. (2009). Também verificou-se que genótipos cuja fonte de resistência é Amphillo (*C. arabica* da Etiópia) foram suscetíveis a *M. izalcoensis*. Portanto, embora a resistência de Amphillo tenha controlado *M. paranaensis* e *M. incognita* em casa de vegetação e em condições de campo (Carneiro & Santos, 2022), ela não é eficiente no controle de *M. izalcoensis*.

Alguns dos genótipos ou cruzamentos com o Híbrido de Timor como fonte de resistência, como o IAPAR 59, que foram avaliados neste estudo já foram testados com outras espécies de *Meloidogyne* em condições de casa de vegetação e mostraram-se resistentes a *M. exigua* e suscetíveis a *M. incognita* e *M. paranaensis* (Carneiro & Santos, 2022). No entanto, nesse estudo, os cinco genótipos com essa fonte de resistência foram suscetíveis a *M. izalcoensis*.

Outros estudos mostraram que o porta-enxerto Apoatã IAC 2258 é resistente a *M. paranaensis, M. exigua* e *M. incognita*, conforme relatado por Carneiro & Santos (2022). Desde 1987, a adoção dessa cultivar de porta-enxertos multirresistentes têm sido recomendada para o manejo de nematoides em áreas de cultivo de café infestadas; isso é particularmente eficaz em condições de campo porque mais de uma espécie de *Meloidogyne* pode ocorrer simultaneamente (Carneiro & Santos, 2022). Nesse estudo, foi observada apenas a resistência moderada da cultivar Apoatã IAC 2258 a *M. izalcoensis*, com segregação confirmada. O mesmo foi observado para diferentes populações de *M. paranaensis* em casa de vegetação (12% de segregação; Santos *et al*., 2018). Embora o uso de cultivares ou porta-enxertos

resistentes seja um método de controle ambientalmente correto e eficiente, ele apresenta limitações, como segregação para suscetibilidade a nematoides (10% a 15%), e quebra na região da enxertia resultando na necessidade de replantio (cerca de 10% a 15%) (Gonçalves *et al*., 2021). No entanto, a cultivar Apoatã pode ser considerada uma fonte promissora de resistência a *M. izalcoensis*, por *C. canephora* ser uma espécie alógama com algumas plantas mostrando FR igual a zero.

Todas as cultivares desenvolvidas pelo IDR-Paraná avaliadas neste estudo são consideradas suscetíveis a *M. izalcoensis*, embora, em outros estudos, algumas dessas cultivares tenham apresentado resistência a outras espécies de *Meloidogyne*; assim, representam uma importante ferramenta, pois possibilitam a redução da densidade populacional de nematoides de maneira economicamente aceitável (Carneiro & Santos, 2022). A cultivar arábica IPR 100, portadora de genes de *C. liberica* Hiern é resistente às populações de *M. exigua* (Rezende *et al*., 2017), *M. paranaensis* (Santos *et al*., 2018) e *M. incognita* (Carneiro & Santos, 2022). A cultivar IAPAR 59 é resistente a diferentes populações de *M. exigua*, mas esta cultivar é suscetível a *M. paranaensis*, *M. incognita* (Carneiro & Santos, 2022) e, no presente estudo, a *M. izalcoensis*. Há evidências de que a resistência de IAPAR 59 a *M. exigua* se origina do Híbrido de Timor, que carrega resistência a esse nematoide e que se mostrou controlado por um gene principal com dominância incompleta (Alpizar *et al*., 2007). Embora a cultivar IPR 106 não tenha apresentado resistência a *M. izalcoensis*, já foi demonstrada resistência a *M. paranaensis* e *M. incognita* (Sera *et al*., 2020). Acredita-se que as cultivares IPR 98, IPR 99 e IPR 107 tenham herdado o gene Mex-1 do Híbrido de Timor CIFC 832/2, conforme demonstrado para IAPAR 59, enquanto as cultivares IPR 102 e IPR 103 teriam herdado a resistência de *C. canephora* do Icatu.

Sera e colaboradores (2020) avaliaram o desempenho de cultivares de café arábica em área infestada pelos nematoides *M. paranaensis* e *M. incognita* e confirmaram que as cultivares

IPR 100 e IPR 106 apresentaram o melhor desempenho, com alto vigor vegetativo e produtividade. Em contrapartida, as cultivares IPR 103, IAPAR 59 e Catuaí Vermelho IAC 81 apresentaram redução na produtividade e baixo desenvolvimento vegetativo das plantas com até 45% de plantas mortas sete anos após o plantio.

Nos estudos de diversidade genética do NGs de café, *M. izalcoensis* separou filogeneticamente de todas as outras espécies (*M. exigua*, *M. paranaensis*, *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. enterolobii* e *M. lopezi*); portanto, espera-se que as fontes de resistência genética a essa espécie também sejam diferentes. O presente estudo demonstrou que as fontes de resistência de cafeeiros a *M. izalcoensis* não são as mesmas relatadas anteriormente para *M. paranaensis*, *M. incognita* e *M. exigua*. Apesar de algumas fontes de resistência disponíveis, como o Híbrido de Timor, Amphillo, Icatú IAC 925 e IPR 100 (*C. liberica*) tenham mostrado suscetibilidade a *M. izalcoensis*, cultivares como Apoatã IAC 2258, cuja fonte de resistência se origina de *C. canephora* puro, são promissoras para o estudo da resistência a *M. izalcoensis*. Outros genótipos de *C. canephora* também devem ser investigados, como a cultivar Goytacá' (= Clone 14), recentemente registrada pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), e as cultivares policlonais do IAC, compostas pelos clones CcK1, CcR2, CcR8 e CcR10, que segundo Gonçalves *et al*. (2021), são resistentes a *M. exigua*, *M. paranaensis* e *M. incognita*. Campos de sementes para produção comercial de clones IAC serão estabelecidos após registro e proteção dos clones.

5. CONCLUSÕES

Uma baixa variabilidade intraespecífica foi detectada entre as populações de *M. izalcoensis* de diferentes países e *M. izalcoensis* se separou filogeneticamente de todas as outras espécies de nematoides-das-galhas do café. Nos ensaios de resistência, o porta-enxerto Apoatã IAC 2258 foi a única cultivar que apresentou resistência moderada, confirmando que cultivares de *C. canephora* são promissoras para o estudo da resistência a *M. izalcoensis*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ADAM, M. A. M.; PHILLIPS, M. S. & BLOK, V. C. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). Plant Pathology 56: 190-197.

ALPIZAR, E.; ETIENNE, H. & BERTRAND, B. 2007. Intermediate resistance to *Meloidogyne exigua* root-knot nematode in *Coffea arabica*. Crop Protection 26: 903-910.

ÁLVAREZ-ORTEGA, S.; BRITO, J.A. & SUBBOTIN, S.A. 2019. Multigene phylogeny of root-knot nematodes and molecular characterization of *Meloidogyne nataliei* Golden, Rose & Bird, 1981 (Nematoda: Tylenchida). Scientific Reports 9: 11788.

BLOK, V. C. & POWERS, T. O. 2009. Biochemical and molecular identification. *In*: Perry, R. N.; Moens, M. & Starr, J. L. (eds.). Root-knot nematodes. CABI. Wallingford, UK. p. 98-118.

BLOK, V. C.; WISHART, J.; FARGETTE, M.; BERTHIER, K. & PHILLIPS, M. 2002. Mitochondrial DNA differences distinguishing *Meloidogyne mayaguensis* from the major species of tropical root-knot nematodes. Nematology 4: 773-781.

BLOUIN, M. S. 2002. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. International Journal for Parasitology 32: 527-531.

BOISSEAU, M.; ARIBI, J.; SOUZA, F. R.; CARNEIRO, R. M. D. G. & ANTHONY, F. 2009. Resistance to *Meloidogyne paranaensis* in wild *Coffea arabica*. Tropical Plant Pathology 34: 38-41.

BRITO, J. A.; POWERS, T. O.; MULLIN, P. G.; INSERRA, R. N. & DICKSON, D. W. 2004. Morphological and molecular characterization of *Meloidogyne mayaguensis* isolates from Florida. Journal of Nematology 36: 232-240.

CARNEIRO, R. M. D. G. & ALMEIDA, M. R. A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. Nematologia Brasileira 25: 35-44.

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

CARNEIRO, R. M. D. G. & SANTOS, M. F. A. 2022. Integrated management of nematodes in coffee. *In*: Muschler, R. (ed.). Climate-smart production of coffee: improving social and environmental sustainability. Burleigh Dodds Science Publishing. Cambridge, UK. p. 343-378.

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

CARNEIRO, R. M. D. G.; MESQUITA, L. F. G.; GONÇALVES, W. & PEREIRA, A. A. 2008. Pathogenicity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) from Brazil and Central America on two genotypes of *Coffea arabica*. Tropical Plant Pathology 33: 309-312.

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

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

DE LEY, P.; FELIX, M. A.; FRISSE, L. M.; NADLER, S. A.; STERNBERG, P. W. & THOMAS, W. K. 1999. Molecular and morphological characterisation of two reproductive species with mirror image anatomy (Nematoda: Cephalobidae). Nematology 1: 591-612.

FAZUOLI, L. C.; BRAGHINI, M. T.; SILVAROLLA, M. B.; GONÇALVES, G.; MISTRO, J. C.; GALLO, P. B. & GUERREIRO FILHO, O. 2018. IAC 125 RN - a dwarf coffee cultivar resistant to leaf rust and root-knot nematode. Crop Breeding and Applied Biotechnology 18: 237-240.

FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.

FERREIRA, D. F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia 35:1039-1042.

GONÇALVES, W.; ANDRADE, V. T.; FATOBENE, B. J. R.; CAIXETA, L. B.; PADILHA, L.; OLIVEIRA, C. M. G.; ROSA, J. M. O.; RODRIGUES, L. M. R. & GUERREIRO FILHO, O. 2021. Selection strategy of a *Coffea canephora* rootstock with simultaneous nematode resistance to *Meloidogyne exigua*, *M. incognita* and *M. paranaensis*. European Journal Plant Pathology 160: 81-95.

HARTMAN, K. M. & SASSER, J. N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. *In*: Barker, K. R.; Carter, C. C. & Sasser, J. N. (eds.). An advanced treatise on *Meloidogyne*. Methodology. North Carolina State University Graphics. Raleigh, NC, USA. p. 69-77.

HERNANDEZ, A.; FARGETTE, M. & SARAH, J.L. 2004. Characterization of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) from coffee plantations in Central America and Brazil. Nematology 6: 193-204.

HU, M. & GASSER, R. B. 2006. Mitochondrial genomes of parasitic nematodes – progress and perspectives. Trends in Parasitology 22: 78-84.

HUELSENBECK, J. P.; BULL, J. J. & CUNNINGHAM, C. W. 1996. Combining data in phylogenetic analysis. Trends in Ecology & Evolution 11: 152-158.

HUMPHREYS-PEREIRA, D. A.; FLORES-CHAVES, L.; GÓMEZ, M.; SALAZAR, L.; GÓMEZ-ALPÍZAR, L. & ELLING, A. A. 2014. *Meloidogyne lopezi* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a new root-knot nematode associated with coffee (*Coffea arabica* L.) in Costa Rica, its diagnosis and phylogenetic relationship with other coffee-parasitising *Meloidogyne* species. Nematology 16: 643-661.

JANSSEN, T.; KARSSEN, G.; TOPALOVIĆ, O.; COYNE, D. & BERT, W. 2017. Integrative taxonomy of root-knot nematodes reveals multiple independent origins of mitotic parthenogenesis. PLoS One 12: e0172190.

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

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

NISCHWITZ, C.; SKANTAR, A.; HANDOO, Z. A.; HULT, M. N.; SCHMITT, M. E. & MCCLURE, M. A. 2013. Occurrence of *Meloidogyne fallax* in North America, and molecular characterization of *M. fallax* and *M. minor* from U.S. golf course greens. Plant Disease 97: 1424-1430.

NYLANDER, J. A. A. 2004. MrModelTest, version 2. Evolutionary Biology Centre. Uppsala, Sweden. Uppsala University.

PAGAN, C.; COYNE, D.; CARNEIRO, R.; KARIUKI, G.; LUAMBANO, N.; AFFOKPON, A. & WILLIAMSON, V. M. 2015. Mitochondrial haplotype-based identification of ethanol-preserved root-knot nematodes from Africa. Phytopathology 105: 350-357.

POWERS, T. O. & HARRIS, T. S. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. Journal of Nematology 25: 1-6.

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

REZENDE, R. M.; ANDRADE, V. T.; SALGADO, S. M. L.; DE REZENDE, J. C.; MENEZES, J. O. & CARVALHO, G. R. 2017. Genetic gain in the resistance of arabica coffee progenies to root-knot nematode. Crop Science 57: 1355-1362.

SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406-425.

SANTOS, M. F. A.; CORREA, V. R.; PEIXOTO, J. R.; MATTOS, V. S.; SILVA, J. G. P.; MOITA, A. W.; SALGADO, S. M. L.; CASTAGNONE-SERENO, P. & CARNEIRO, R. M. D. G. 2018. Genetic variability of *Meloidogyne paranaensis* populations and their aggressiveness to susceptible coffee genotypes. Plant Pathology 67: 193-201.

SANTOS, M. F. A.; FURLANETTO, C.; ALMEIDA, M. R. A.; CARNEIRO, M. D. G.; MOTA, F. C.; GOMES, A. C. M. M.; SILVEIRA, N. O. R.; SILVA, J. G. P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; TIGANO, M. S. & CARNEIRO, R. M. D. G. 2012. Biometrical, biological and molecular characteristics of *Meloidogyne incognita* isolates and related species. European Journal Plant Pathology 134: 671-684.

SANTOS, M. F. A.; MATTOS, V. S.; GOMES, A. C. M. M.; MONTEIRO, J. M. S.; SOUZA, D.A.; TORRES, C. A. R.; SALGADO, S. M. L.; CASTAGNONE-SERENO, P. & CARNEIRO, R. M. D. G. 2020. Integrative taxonomy of *Meloidogyne paranaensis* populations belonging to different esterase phenotypes. Nematology 22: 453-468.

SCHMITZ, V. B.; BURGERMEISTER, W. & BRAASCH, H. 1998. Molecular genetic classification of central European *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax* populations. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 50: 310-317.

SERA, G. H.; MACHADO, A. C. Z.; ITO, D. S.; SHIGUEOKA, L. H.; SILVA, A. & SERA, T. 2020. IPR 106: new arabica coffee cultivar, resistant to some *Meloidogyne paranaensis* and *M. incognita* nematode populations of Paraná. Crop Breeding and Applied Biotechnology 20: e30552031.

SHIGUEOKA, L. H.; SERA, G. H.; SERA, T.; FONSECA, I. C. B.; ANDREAZI, E.; CARVALHO, F. G.; CADUCCI, F. C. & ITO, D. S. 2016. Reaction of arabica coffee progenies derivative from Icatu to *Meloidogyne paranaensis*. Plant Protection 75: 193-198.

SKANTAR, A. M. & CARTA, L. K. 2004. Molecular characterization and phylogenetic evaluation of the Hsp90 gene from selected nematodes. Journal of Nematology 36: 466-480.

SKANTAR, A. M.; CARTA, L. K. & HANDOO, Z. A. 2008. Molecular and morphological characterization of an unusual *Meloidogyne arenaria* population from traveler's tree *Ravenala madagascariensis*. Journal of Nematology 40: 179-189.

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

SUAZO, A. & HALL, H. G. 1999. Modification of the AFLP protocol applied to honey bee (*Apis mellifera* L.) DNA. BioTechniques 26: 704-709.

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

SWOFFORD, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Sunderland Sinauer Associates., MA, USA.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M. & KUMAR, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.

TIGANO, M. S.; CARNEIRO, R. M. D. G.; JEYAPRAKASH, A.; DICKSON, D. W. & ADAMS, B. J. 2005. Phylogeny of *Meloidogyne* spp. based on 18S rDNA and the intergenic region of mitochondrial DNA sequences. Nematology 7: 851-862.

TRIFINOPOULOS, J.; NGUYEN, L. T.; VON HAESELER, A. V. & MINH, B.Q. 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. Nucleic Acids Research 44: W232-W235.

ZIJLSTRA, C.; LEVER, A. E. M.; UENK, B. J. & VAN SILFHOUT, C. H. 1995. Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. Phytopathology 85: 1231-1237.

CAPÍTULO 3

HOSPEDABILIDADE DE PLANTAS DE COBERTURA PARA O MANEJO DE *Meloidogyne izalcoensis* EM CAFEZAIS INFESTADOS COM O NEMATOIDE-DAS-GALHAS

Hospedabilidade de plantas de cobertura para o manejo de *Meloidogyne izalcoensis* em cafezais infestados com o nematoide-das-galhas.

RESUMO

O nematoide-das-galhas *Meloidogyne izalcoensis* foi inicialmente descrito parasitando cafeeiros e causando danos na região vulcânica Izalco, Sonsonate, El Salvador. No Brasil, esta espécie foi detectada em raízes de café no município de Indianópolis, estado de Minas Gerais (MG). O cultivo intercalar de plantas de cobertura é uma prática tradicional nos cafezais brasileiros, e a utilização de plantas não hospedeiras ou antagônicas aos nematoides é uma estratégia promissora para o manejo de áreas infestadas. Devido à escassez de informações sobre a hospedabilidade de *M. izalcoensis*, o objetivo deste estudo foi avaliar 24 plantas de cobertura e selecionar as não hospedeiras ou má hospedeiras. Dois ensaios foram realizados em diferentes períodos e todas as plantas foram inoculadas com 10.000 ovos de uma população obtida de cafeeiro em Indianópolis-MG. Após 90 dias, foram determinados os seguintes parâmetros: peso fresco de raiz, fator de reprodução (FR) e reação final. Plantas com FR < 1,0 foram classificadas como não hospedeiras (NH), aqueles com FR > 1,0 foram consideradas hospedeiras e utilizando análises estatísticas foram classificadas como: boa hospedeira (BH), hospedeira intermediária (HI) e má hospedeira (MH). A maioria das espécies botânicas avaliadas foram classificadas como NH ou MH para *M. izalcoensis*, incluindo o algodão, arroz, feijão, aveia branca, aveia preta, azevém, milho, três espécies de gramíneas, duas cultivares de milheto, duas cultivares de trigo, *Crotalaria breviflora*, *C. ochroleuca*, *C. spectabilis*, feijão de porco, mucuna cinza e duas espécies de capim-arroz. Apenas o tomate e o feijão foram classificados como BH, e *C. juncea* e soja foram classificados como HI. As plantas identificadas como não hospedeiras ou má hospedeiras podem ser recomendadas para cultivo intercalar ou para rotação de culturas em cafezais brasileiros em regiões infestadas por *M. izalcoensis*.

Palavras-chave: *Coffea* spp., culturas intercalares, manejo de nematoides, relação parasita-hospedeiro, rotação de culturas.

Host status of cover crops for the management of *Meloidogyne izalcoensis* in coffee orchards infested with root-knot nematodes.

ABSTRACT

The root-knot nematode *Meloidogyne izalcoensis* was initially described parasitising coffee trees and causing damage in the Izalco volcano region, Sonsonate, El Salvador. In Brazil, it was detected in coffee roots in the municipality of Indianópolis, Minas Gerais state (MG). Intercropping cover crops is a traditional practice in Brazilian coffee orchards, and the use of plants that are non-hosts or antagonistic to the nematodes is a promising strategy for coffee in infested areas. Due to the scarce information on the host status of *M. izalcoensis*, the aim of this study was to evaluate 24 plants of different species of cover crops and select the non-hosts or poor hosts. Two assays were conducted at different times, and all plants were inoculated with 10,000 eggs. After 90 days, the following parameters were determined: fresh root weight, reproduction factor (RF) and final reaction. Plants with RF < 1.0 were classified as non-hosts (NH), those with RF > 1.0 were considered as hosts and using statistical analyses they were classified as: good host (GH), intermediate host (IH) and poor host (PH). Most of the botanical species tested were classified as NH or PH to *M. izalcoensis*: cotton, rice, bean, white oat, black oat, ryegrass, corn, three species of grass, two cultivars of millet, two wheat cultivars, *Crotalaria breviflora*, *C. ochroleuca*, *C. spectabilis*, jack bean, gray mucuna and two species of rice grass. Only tomato and bean were classified as GH, and *C. juncea* and soybean were classified as IH. The plants identified as non-hosts or poor hosts may be recommended for intercropping or for crop rotation in Brazilian coffee orchards in regions infested by *M. izalcoensis*.

Palavras-chave: *Coffea*, intercropping, nematode management, host-parasite relationship, crop rotation.

1. INTRODUÇÃO

Os nematoides-das-galhas (NGs), *Meloidogyne* spp., estão entre os nematoides parasitas de plantas mais economicamente importantes que infectam o café (*Coffea* spp.) em vários países nas Américas, incluindo Brasil, El Salvador, Guatemala, Costa Rica e Havaí, na África e em outros continentes. Até o momento, 18 espécies de *Meloidogyne* foram relatadas parasitando cafeeiros (Carneiro & Santos, 2022). No Brasil, entre as principais espécies deste gênero que causam danos à cultura do café, *M. exigua* Göldi, 1887 é a mais frequentemente encontrada (endêmica), seguida por *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 e *M. paranaensis* Carneiro *et al*., 1996 (Carneiro & Santos, 2022). No entanto, *Meloidogyne izalcoensis* Carneiro *et al*., 2005 foi detectada recentemente parasitando café arábica no município de Indianópolis, estado de Minas Gerais (Stefanelo *et al*., 2019), considerada uma importante região produtora de café no Brasil. Embora *M. izalcoensis* já tivesse sido detectada em melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.) no município de Araguari (MG) (Carneiro, 2014), esse nematoide não foi identificado a nível de espécie naquele momento.

Meloidogyne izalcoensis foi descrita pela primeira vez parasitando cafeeiro na região vulcânica Izalco, Sonsonate, El Salvador (Carneiro *et al*., 2005). Posteriormente, também foi encontrada em raízes de café em Kabete (Quênia) e Mufindi (Tanzânia), estabelecendo o primeiro relato dessa espécie nesses países no café e no continente africano (Jorge Junior *et al*., 2016). A mesma espécie também foi detectada em outras culturas, como repolho (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) em Cotonou (Benin), e em tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.) em Tindini e Kianga (Tanzânia), respectivamente (Jorge Junior *et al*., 2016). Este nematoide difere significativamente de outras espécies parasitas de NGs que ocorrem em plantas de café no Brasil e nas Américas (Carneiro *et al*., 2005; Correa *et al*., 2013; Humphreys-Pereira *et al*., 2014). A identificação desta espécie é possível usando taxonomia integrativa, devido à similaridade do padrão perineal com o de *M. incognita* e *M.*

paranaensis (Carneiro *et al*., 2005). Os fenótipos de esterase (Est) e marcadores moleculares de quatro espécies de NGs de cafezais brasileiros são diferentes e descritos por Carneiro *et al*. (2024). O fenótipo Est I4 é único e pode ser usado para diferenciar *M. izalcoensis* de outras espécies de NGs de café (Carneiro & Cofcewicz, 2008; Carneiro *et al*., 2024). Existem também marcadores SCAR para identificar *M. izalcoensis* e diferenciá-la de outras espécies de NGs de café (Correa *et al*., 2013). Além disso, o nematoide causa sintomas completamente diferentes daqueles causados por *M. paranaensis*, *M. incognita*, *M. arabicida* Lopez & Salazar, 1989 (raízes com espessamento e rachaduras) e *M. exigua* (galhas de tamanhos diferentes com massas de ovos internas) (Almeida *et al*., 2023 a, b). Os sintomas induzidos por *M. izalcoensis* são típicos com pequenas galhas, necrose nos tecidos nas extremidades das raízes, e grandes quantidades de massas de ovos externas (Stefanelo *et al*., 2019), semelhantes aos causados por *M. lopezi*.

Embora existam algumas informações, a gama de hospedeiros de *M. izalcoensis* ainda é desconhecida, ao contrário de outras espécies de NGs que foram extensivamente estudadas. Em relação aos hospedeiros diferenciadores, Carneiro *et al*. (2005) observaram que a população de *Coffea arabica*, Izalco, El Salvador, reproduziu-se em tomateiro 'Rutgers', tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) 'NC95', pimentão (*C. annuum*) 'California Wonder' e melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) 'Charleston Gray'. No entanto, nenhuma reprodução foi observada em algodão (*Gossypium hirsutum* L.) 'Deltapine 61' e amendoim (*Arachis hypogaea* L.) 'Florunner'. Recentemente, estudos de resistência conduzidos por Almeida *et al*. (2023a) em cafeeiros demonstraram que a maioria dos genótipos testados com resistência a outras espécies de *Meloidogyne* (Amphillo × Catuaí, Híbrido de Timor, IAPAR 59, IPR 99, IPR 100, IPR 102, IPR 103, IPR 105, IPR 106, IPR 107 e IPR 108) foram suscetíveis a *M. izalcoensis*, exceto o porta-enxerto 'Apoatã IAC 2258', que se mostrou moderadamente resistente, com segregação genética para esse caráter de 43,8%.

O cultivo intercalar de plantas de cobertura em plantações de café Arábica e Canephora é uma prática tradicional em muitos países, devido aos benefícios que as culturas de cobertura apresentam em relação ao manejo de plantas daninhas, conservação do solo e redução de produtos químicos usados na cafeicultura (Opoku-Ameyaw *et al*., 2003; Santos *et al*., 2016). No Brasil, plantas fixadoras de nitrogênio, como as mucunas e crotalárias, são usadas como plantas de cobertura para café porque melhoram a fertilidade do solo ao fornecer nitrogênio orgânico (Carvalho *et al*., 2009; Partelli *et al*., 2011; Mesquita *et al*., 2016). A rotação de culturas com plantas antagonistas ou não hospedeiras é uma prática que visa reduzir a população de nematoides parasitas de plantas. É recomendada quando o cafezal estiver infestado com *Meloidogyne* spp., durante o processo de renovação dos cafeeiros com novas cultivares de café (Lima *et al*., 2009; Villain *et al*., 2018; Salgado *et al*., 2021).

As culturas mais comumente usadas para cultivo intercalar em cafezais no Brasil são arroz (*Oryza sativa* L.), milho (*Zea mays* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), amendoim, mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), inhame (*Dioscorea cayanensis* Lam.), girassol (*Helianthus annuus* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merr.) (Mesquita *et al*., 2016).

Considerando a escassez de informações sobre os hospedeiros de *M. izalcoensis* e a necessidade de aumentar o conhecimento relacionado a gama de hospedeiras desse nematoide, o objetivo deste estudo foi investigar a capacidade de 24 plantas de diferentes espécies e cultivares em hospedar *M. izalcoensis*, incluindo plantas de cobertura de cultivo intercalar e espécies botânicas conhecidas como antagonistas/armadilhas dos NGs e outros nematoides.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Identificação, inóculo e multiplicação de *Meloidogyne izalcoensis* em cafeeiros

A identificação do nematoide foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Carneiro & Almeida (2001) usando o fenótipo da enzima esterase (Est I4) (Carneiro *et al*., 2024). O inóculo de *M. izalcoensis* foi obtido de raízes de café coletadas em Indianópolis, estado de Minas Gerais, e foi multiplicado em plantas de café e tomate. O café 'Catuaí Amarelo IAC 62' foi semeado em bandejas com substrato Bioplant® e mantido a 15-30°C em condições de casa de vegetação. Quando as mudas de café atingiram 10 cm, elas foram transplantadas individualmente para vasos de polipropileno de 5 L preenchidos com solo esterilizado (autoclavado a 120°C por 2 h) + substrato Bioplant® (1:1). Os ovos de *M. izalcoensis* foram extraídos de raízes de café infectadas conforme descrito no item 2.3 (Capítulo 1), usando um liquidificador por 40 segundos. Plantas de café com 6-8 pares de folhas foram inoculadas com 10.000 ovos e mantidas em casa de vegetação por 8-14 meses, para fornecer o inóculo inicial para os ensaios.

2.2 Reprodução de *Meloidogyne izalcoensis* em diferentes espécies botânicas

A hospedabilidade de várias espécies botânicas a *M. izalcoensis* foi avaliada por meio de dois ensaios *in vivo*, cada um repetido duas vezes e conduzido em casa de vegetação na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa Cenargen, Brasília, Brasil). O primeiro ensaio (repetido duas vezes) foi realizado de janeiro a julho (verão/outono) 2021, e o segundo ensaio (repetido duas vezes) de junho a novembro (outono/primavera) de 2022 com temperaturas em ambos os ensaios variando de 25 a 30°C. Vinte e quatro plantas de diferentes espécies botânicas e cultivares foram testadas: algodão, arroz, aveia branca (*Avena sativa* L.), aveia preta (*A. strigosa* Schreb), azevém (*Lolium multiflorum* L.), duas espécies de capim-arroz (*Echinocloa colonum* (L.) Link e *E. crus-galli* (L.) P. Beauv), capim-braquiária (*Brachiaria*

decumbens Stapf), capim-colonião (*Panicum maximum* Jacq), capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica* L.), quatro espécies de crotalária (*Crotalaria breviflora* DC., *C. juncea* L., *C. ochroleuca* G. Don., e *C. spectabilis* (DC.) Roth.), feijão carioca (*P. vulgaris* L.), feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* (L.) DC.), duas cultivares de milheto (*Pennisetum glaucun* L.), milho (*Zea mays* L), soja (*Glycine max* (L.) Mer., mucuna-cinza (= mucuna-preta, mucuna anã, feijão veludo, *Mucuna pruriens* (L.) DC.), duas cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.) e tomate 'Santa Clara' (*Solanum lycopersicum* L.), usada como controle (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies botânicas avaliadas neste estudo.

	Espécies botânicas/cultivares	**Nomes científicos**
1	Algodão cv. FM966	*Gossypium hirsutum* L.
2	Arroz cv. IRGA424	*Oryza sativa* L.
3	Aveia branca cv. URS Estampa	*Avena sativa* L.
4	Aveia preta cv. Embrapa 29 (Garoa)	*A. strigosa* Schreb
5	Azevém cv. BRS Ponteio	*Lolium multiflorum* L.
6	Capim arroz cv. Crus-pavonis	*Echinocloa colonum* (L.) Link
7	Capim arroz cv. Crus-galli	*E. crus-galli* (L.) P. Beauv
8	Capim braquiária cv. Basilisk	*Brachiaria decumbens* Stapf
9	Capim colonião cv. Colonião	*Panicum maximum* Jacq
10	Capim pé-de-galinha cv. Indian	*Eleusine indica* L.
11	Crotalária cv. Pohliana	*Crotalaria breviflora* DC.
12	Crotalária cv. IAC KR1	*C. juncea* L.
13	Crotalária cv. desconhecida	*C. ochroleuca* G. Don
14	Crotalária cv. Embrapa	*C. spectabilis* DC. Roth
15	Feijão de porco cv. desconhecida	*Canavalia ensiformis* (L.) DC.
16	Feijão carioca cv. NAT 05 Stilo	*Phaseolus vulgaris* L.
17	Milheto cv. ADR 500	*Pennisetum glaucun* L.
18	Milheto cv. ADR 905	*P. glaucun* L.
19	Milho cv. AL Bandeirantes	*Zea mays* L.
20	Mucuna cinza cv. Brasil	*Mucuna pruriens* (L.) DC.
21	Soja cv. Potência RR	*Glycine max* (L.) Mer.
22	Tomate cv. Santa Clara (Controle)	*Solanum lycopersicum* L.
23	Trigo cv. Sonik	*Triticum aestivum* L.
24	Trigo cv. Toruk	*T. aestivum* L.

2.2.1 Primeiro ensaio: hospedabilidade de diferentes espécies botânicas a *Meloidogyne izalcoensis*

No primeiro e segundo experimentos, a reprodução de *M. izalcoensis* foi avaliada em 18 plantas de diferentes espécies e cultivares: algodão, arroz, aveia branca, aveia preta, azevém, duas espécies de capim-arroz, capim-braquiária, capim-colonião, capim-pé-de-galinha, feijão carioca, duas cultivares de milheto, milho, soja, duas cultivares de trigo e uma cultivar de tomate (Tabela 1). O tomate 'Santa Clara' (Gabriel *et al*., 2022) foi o controle suscetível. Sementes de diferentes espécies botânicas e cultivares foram semeadas em vasos de polipropileno de 5 L preenchidos com solo esterilizado (autoclavado a 120°C por 2 h) + substrato Bioplant® (1:1), e mantidos a 15-30°C em casa de vegetação. Todas as plantas (oito repetições por tratamento) foram inoculadas com 10.000 ovos de *M. izalcoensis* por planta e mantidas em casa de vegetação por 90 dias, em delineamento inteiramente casualizado, à temperatura média de 25-30°C, com irrigação e fertilização conforme necessário. A avaliação foi realizada conforme descrito no item 2.7 (Capítulo 2) e foram determinadas as seguintes variáveis: peso fresco da raiz, número de ovos por grama de raiz, fator de reprodução (FR) (Oostentenbrink, 1966) e reação final. O índice de galhas e massas de ovos não foi avaliado, uma vez que massas de ovos em gramíneas geralmente são produzidas dentro do tecido radicular. Plantas com FR < 1,0 foram classificadas como não hospedeiras (NH), aquelas com FR > 1,0 foram classificadas como hospedeiras, e os critérios de boa hospedeira (BH), hospedeira intermediária (HI) ou má hospedeira (MH) foram determinados usando análise estatística.

2.2.2 Segundo ensaio: hospedabililidade de diferentes plantas antagonistas a *Meloidogyne izalcoensis*

No terceiro e quarto experimentos, a reprodução de *M. izalcoensis* foi avaliada em seis plantas antagonistas, selecionadas de acordo com a literatura (Ferraz & Freitas, 2004): quatro espécies de crotalária, feijão-de-porco e mucuna-cinza (Tabela 1). O tomateiro 'Santa Clara' foi o controle. As sementes das espécies botânicas foram semeadas em vasos de polipropileno de 5 L preenchidos com solo esterilizado (autoclavado a 120°C por 2 h) + substrato Bioplant® (1:1) e mantidos a 25-30°C em condições de estufa. Todas as plantas (oito repetições por tratamento) foram inoculadas com 10.000 ovos de *M. izalcoensis* por planta. As plantas foram mantidas em casa de vegetação por 90 dias após a inoculação do nematoide e ao fim do ensaio, as raízes foram avaliadas conforme descrito no item 2.7 (Capítulo 2).

2.3 Análise estatística

Ambos os experimentos, cada um repetido duas vezes, foram estabelecidos em um delineamento inteiramente casualizado com 18 e sete tratamentos com oito repetições. Nos quatro ensaios, os parâmetros foram transformados usando log (x + 1) para ANOVA porém, os valores numéricos descritos nas tabelas são originais, sem a transformação. As médias foram comparadas pelo teste Scott Knott ($P < 0,05$), usando o software SISVAR (Ferreira, 2011). O peso fresco da raiz foi considerado apenas para observar o crescimento da raiz de diferentes plantas (sem análise estatística) e para calcular o número de ovos $(g\ raiz)^{-1}$. Os diferentes níveis de hospedabilidade foram determinados de acordo com a análise estatística (Tabelas 2-5).

3. RESULTADOS

Em todos os experimentos, verificou-se que a maioria das espécies botânicas avaliadas foram classificadas como não hospedeiras (NH, FR < 1,0) ou más hospedeiras (MH, FR > 1,0 e < 2,0) a *M. izalcoensis*: algodão, arroz, aveia branca, aveia preta, azevém, milho, três espécies de capins, duas cultivares de milheto, duas cultivares de trigo, *C. breviflora*, *C. ochroleuca*, *C. spectabilis*, feijão-de-porco, mucuna cinza e duas espécies de capim-arroz (Tabelas 1-5). Os resultados dos ensaios de repetição em diferentes estações foram semelhantes aos dos quatro ensaios, considerando que as temperaturas médias diárias em Brasília não variam muito. Apenas o tomateiro 'Santa Clara' (controle, FR = 16,5 - 34,6) e o feijão carioca (FR = 12,3 - 15,3) (Tabelas 1-5) foram revelados como boas hospedeiras (BH). A soja 'Potência RR' (FR = 3,4 - 4,3) e *C. juncea* 'IAC KR1' (FR = 2,4 - 4,2) (Figura 1) foram classificadas como hospedeiras intermediárias (HI) em ambos os experimentos (Tabelas 2-5).

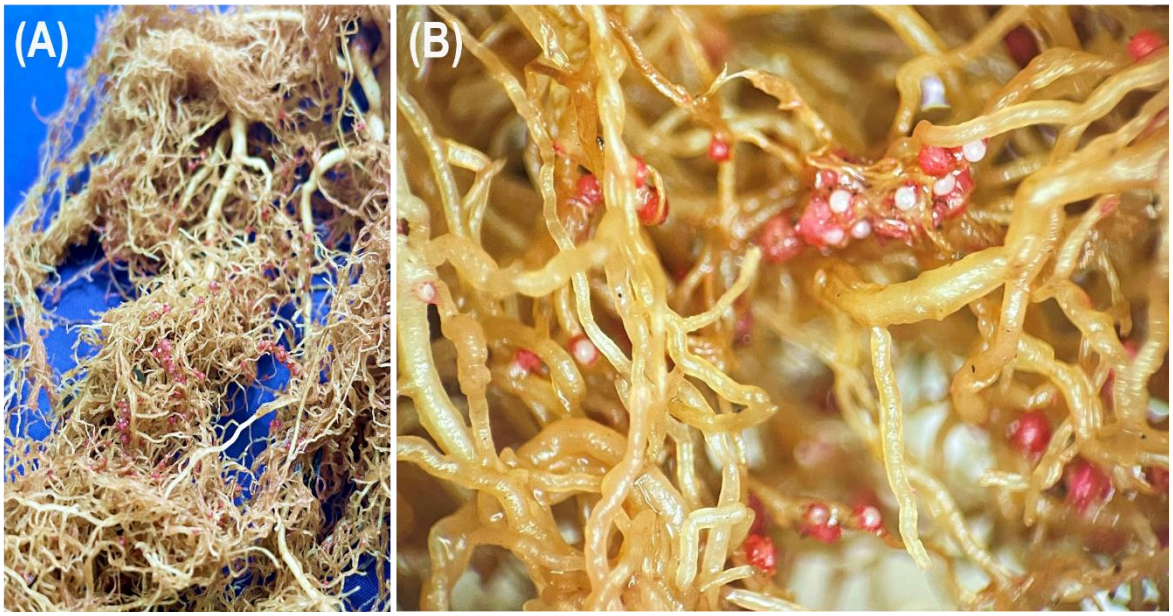

Figura 1. Raízes de *Crotalaria juncea* parasitadas por *Meloidogyne izalcoensis*. **A)** Visão geral da raiz; **B)** Raiz mostrando galhas, fêmeas brancas e massas de ovos rosadas coradas com Floxina B.

Tabela 2. Reação de hospedabilidade de diferentes espécies botânicas à população brasileira de *Meloidogyne izalcoensis*, 90 dias após a inoculação com 10.000 ovos de janeiro a abril de 2021.

Espécies botânicas/cultivres	**Peso fresco raiz (g)**	**Ovos (g de raiz)$^{-1}$**	**Fator de Reprodução**[2]	**Reação**[3]
Feijão carioca cv. NAT 05 Stilo	38,50	4.657,99 e[1]	12,31 e	BH
Tomate cv. Santa Clara	33,13	1,879,99 e	16,96 e	BH
Algodão cv. FM966	7,50	12,02 b	0,01 a	NH
Arroz cv. IRGA424	45,88	23,72 b	0,27 a	NH
Aveia branca cv. URS Estampa	22,63	0 a	0 a	NH
Aveia preta cv. Embrapa 29 (Garoa)	12,63	0 a	0 a	NH
Azevém cv. BRS Ponteio	60,88	10,54 a	0,09 a	NH
Capim arroz cv. Crus-galli	16,38	422,11 d	1,18 c	MH
Capim arroz cv. Crus-pavonis	14,63	387,02 d	1,16 c	MH
Capim braquiária cv. Basilisk	86,13	0 a	0 a	NH
Capim colonião cv. Colonião	5,75	123.54 c	0,09 a	NH
Capim pé-de-galinha cv. Indian	51,00	91,52 c	0,45 b	NH
Milheto cv. ADR 500	26,38	0 a	0 a	NH
Milheto cv. ADR 905	67,63	0 a	0 a	NH
Milho cv. AL Bandeirantes	143,08	0 a	0 a	NH
Soja cv. Potência RR	15,50	3.178,44 e	3,36 d	HI
Trigo cv. Sonik	8,13	198,65 d	0,32 a	NH
Trigo cv. Toruk	13,63	303,48 d	0,52 b	NH
CV (%)	21,29	30,36	44,69	-

[1] Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram pelo teste de Scott-Knott a 5% e os dados originais foram mantidos na tabela. CV = coeficiente de variação. [2] FR: Fator de reprodução. A hospedabilidade foi designada da seguinte forma: FR > 5,0, Boa hospedeira, 1,0 < FR < 2,0, Má hospedeira, 2,0 < FR < 5,0 Hospedeira intermediária. [3] Reação: BH = Boa hospedeira; NH = Não hospedeira; MH = Má hospedeira, HI = Hospedeira intermediária.

Tabela 3. Reação de hospedabilidade de diferentes espécies botânicas à população brasileira de *Meloidogyne izalcoensis*, 90 dias após inoculação com 10.000 ovos de abril a julho de 2021.

Espécies botânicas	**Peso fresco raiz (g)**	**Ovos (g de raiz)$^{-1}$**	**Fator de Reprodução**[2]	**Reação**[3]
Feijão carioca cv. NAT 05 Stilo	44,63	3.944,78 e[1]	15,28 d	BH
Tomate cv. Santa Clara	32,00	2.401,07 e	16,47 d	BH
Algodão cv. FM966	9,75	15,53 b	0,01 a	NH
Arroz cv. IRGA424	41,13	69,45 c	0,53 b	NH
Aveia branca cv. URS Estampa	24,63	0 a	0 a	NH
Aveia preta cv. Embrapa 29 (Garoa)	11,75	0 a	0 a	NH
Azevém cv. BRS Ponteio	60,88	7,25 b	0,08 a	NH
Capim arroz cv. Crus-galli	18,00	266,68 d	0,85 b	NH
Capim arroz cv. Crus-pavonis	13,13	483,99 d	1,14 b	MH
Capim braquiária cv. Basilisk	72,50	0 a	0 a	NH
Capim colonião cv. Colonião	3,25	319,44 d	0,18 a	NH
Capim pé-de-galinha cv. Indian	57,63	81,36 c	0,47 b	NH
Milheto cv. ADR 500	29,00	0 a	0 a	NH
Milheto cv. ADR 905	58,63	0 a	0 a	NH
Milho cv. AL Bandeirantes	132,50	0 a	0 a	NH
Soja cv. Potência RR	28,75	1.059,30 e	4,34 c	HI
Trigo cv. Sonik	11,38	75,62 c	0,18 a	NH
Trigo cv. Toruk	9,38	241,35 d	0,42 b	NH
CV (%)	15,53	25,77	45,65	-

[1] Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram pelo teste de Scott-Knott a 5% e os dados originais foram mantidos na tabela. CV = coeficiente de variação. [2] FR: Fator de reprodução. A hospedabilidade foi designada da seguinte forma: FR > 5,0, Boa hospedeira, 1,0 < FR < 2,0, Má hospedeira, 2,0 < FR < 5,0 Hospedeira intermediária. [3] Reação: BH = Boa hospedeira; NH = Não hospedeira; MH = Má hospedeira, HI = Hospedeira intermediária.

Tabela 4. Reação de hospedabilidade de diferentes espécies botânicas antagonistas à população brasileira de *Meloidogyne izalcoensis*, 90 dias após inoculação com 10.000 ovos de junho a setembro de 2022.

Espécies botânicas	**Peso fresco raiz (g)**	**Ovos (g de raiz)$^{-1}$**	**Fator de Reprodução**[2]	**Reação**[3]
Crotalaria juncea cv. IAC KR1	27,70	1.370,88 d[1]	4,24 b	HI
C. breviflora	7,10	0 a	0 a	NH
C. ochroleuca	34,70	50,12 b	0,17 a	NH
C. spectabilis	24,00	0 a	0 a	NH
Feijão de porco	27,02	0 a	0 a	NH
Mucuna cinza (= feijão veludo)	49,40	199,90 c	0,95 a	NH
Tomate cv. Santa Clara	142,62	4.841,07 e	34,55 c	BH
CV(%)	15,06	15,97	39,72	-

[1] Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram pelo teste de Scott-Knott a 5% e os dados originais foram mantidos na tabela. CV = coeficiente de variação. [2] FR: Fator de reprodução. A hospedabilidade foi designada da seguinte forma: FR > 5,0, Boa hospedeira, 1,0 < FR < 2,0, Má hospedeira, 2,0 < FR < 5,0 Hospedeira intermediária. [3] Reação: HI = Hospedeira intermediária; NH = Não hospedeira; BH = Boa hospedeira.

Tabela 5. Reação de hospedabilidade de diferentes espécies botânicas antagonistas à população brasileira de *Meloidogyne izalcoensis*, 90 dias após inoculação com 10.000 ovos de setembro a novembro de 2022.

Espécies botânicas	**Peso fresco raiz (g)**	**Ovos (g de raiz)$^{-1}$**	**Fator de Reprodução**[2]	**Reação**[3]
Crotalaria juncea cv. IAC KR1	21,50	1.566,63d[1]	2,36 b	HI
C. breviflora	10,40	0 a	0 a	NH
C. ochroleuca	26,00	50,04 b	0,10 a	NH
C. spectabilis	27,60	0 a	0 a	NH
Feijão de porco	27,10	0 a	0 a	NH
Mucuna cinza (= feijão veludo)	35,80	191,03 c	0,82 a	NH
Tomate cv. Santa Clara	143,04	4.783,43 e	34,22 c	BH
CV (%)	25,66	23,35	36,45	-

[1] Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram pelo teste de Scott-Knott a 5% e os dados originais foram mantidos na tabela. CV = coeficiente de variação [2] FR: Fator de reprodução. A hospedabilidade foi designada da seguinte forma: FR > 5,0, Boa hospedeira, 1,0 < FR < 2,0, Má hospedeira, 2,0 < FR < 5,0 Hospedeira intermediária. [3] Reação: HI = Hospedeira intermediária; NH = Não hospedeira; BH = Boa hospedeira.

4. DISCUSSÃO

Métodos de controle cultural, como rotação de culturas com espécies não hospedeiras, têm sido eficazes como estratégia de manejo de nematoides (Halbrendt & Lamondia, 2004). Essas práticas podem manter as populações de nematoides abaixo do limiar de danos econômicos. A maioria dos estudos foi realizada com plantas antagonistas com foco no uso de *Crotalaria* spp. (crotalárias) e *Mucuna* spp. (mucunas), entre outras. O uso de plantas antagonistas para o controle de nematoides é uma alternativa muito atraente. Algumas dessas plantas contribuem como adubo verde e também controlam os nematoides. Plantas como *Crotalaria* spp. permitem que o nematoide penetre, bloqueando sua migração e sua reprodução dentro das raízes, reduzindo a densidade populacional. A fixação de nitrogênio da atmosfera no solo, melhorando a fertilidade do solo, é outro benefício das plantas antagonistas da família Fabaceae. Algumas plantas de cobertura, quando incorporadas, adicionam uma quantidade considerável de matéria orgânica ao solo e consequentemente aumentam a atividade de fungos antagonistas (Ferraz & Freitas, 2004). Algumas gramíneas não hospedeiras também demonstraram resultados satisfatórios no controle de *Meloidogyne* spp. Elas também podem ser usadas entre as linhas de café, fornecendo outra fonte de renda para o agricultor e reduzindo a população de nematoides (Halbrendt & Lamondia, 2004).

Devido à escassez de estudos sobre *M. izalcoensis*, há informações limitadas disponíveis sobre a hospedabilidade das plantas em relação ao controle desse nematoide usando rotação de culturas intercalares em cafezais. O conhecimento atual é baseado principalmente em pesquisas relacionadas a outras espécies dos NGs do café, levando em consideração a mistura frequente de espécies que ocorrem em cafezais brasileiros (Carneiro & Santos, 2022).

Conforme demonstrado neste estudo, a maioria das plantas avaliadas exibe comportamento de não hospedeira, má hospedeira ou hospedeira intermediária em relação a *M. izalcoensis*, com exceção do tomate, feijão comum, soja e *C. juncea*, que se comportaram como boas hospedeiras. Entre outros nematoides que parasitam café, uma gama restrita de hospedeiros também foi

observada para *M. exigua* (CABI, 2021). Almeida & Campos (1991b) avaliaram a capacidade reprodutiva de *M. exigua* em 14 espécies de plantas após 60 dias de inoculação e confirmaram que a maioria das plantas foram classificadas como não hospedeiras, entre elas soja, pimenta, mucuna-preta (= mucuna-cinza), melancia, feijão, cebolinha (*Allium fistulosum* L.), *C. spectabilis*, milho, cacau (*Theobroma cacao* L.), arroz, sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e capim colonião. A erradicação de *M. exigua* em um cafezal após 23 meses foi comprovadamente eficaz usando arroz, feijão, milho, capim colonião, mucuna-cinza, *C. spectabilis*, soja e sorgo (Almeida & Campos, 1991a). De Moraes *et al*. (1977) também estudaram rotações com soja e milho, em cafezais infestados por *M. exigua* e concluíram que essas plantas não são hospedeiras, e então sugerindo que o cultivo de café poderia ser retomado após rotação de 1 ano com essas culturas. Considerando áreas infestadas com as duas espécies (*M. exigua* e *M. izalcoensis*), milho, arroz, capim colonião, *C. spectabilis* e mucuna cinza podem ser usadas como plantas de cobertura adequadas a uma estratégia para controlar essas duas espécies NGs, com melhora na conservação do solo, aumentando a fertilidade do solo ao fornecer matéria orgânica como fonte de nitrogênio (Paulo *et al*., 2001; Bergo *et al*., 2006; Patelli *et al*., 2011).

A rotação de culturas para erradicar *M. incognita* é considerada mais difícil em algumas áreas (Salgado *et al*., 2021). Diferentemente de *M. izalcoensis*, essa espécie causa destruição do sistema radicular e é considerada mais prejudicial devido à sua agressividade, grande número de hospedeiros e alta persistência no solo (Campos & Villain, 2005; Salgado *et al*., 2021; Almeida *et al*., 2023b). Carneiro & Carneiro (1982) confirmaram que plantas como amendoim 'Tatu', mamona (*Ricinus comunis* L.) 'Guarani', aveia preta, mucuna-anã (mucuna) e *C. spectabilis* apresentaram resistência a *M. incognita*, indicando que podem ser cultivadas em rotação de culturas em áreas infestadas. Outras plantas, como nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.), capim-pangola 'Pangola' (*Digitaria decumbens* Stent), capim pangola 'Guiné', feijão-de-porco e azevém podem ser cultivadas em áreas infestadas com *M. incognita* (Ferraz & Freitas, 2004). Em áreas infestadas com

M. izalcoensis, amendoim, aveia preta, *C. spectabilis*, mucuna e azevém também podem ser usadas. Mais espécies como capim bachiaria e capim colonião (Brito & Ferraz, 1987) também podem ser incluídas para as espécies de NGs *incognita* e *M. izalcoensis*.

Pesquisas têm demonstrado que *M. paranaensis* possui uma gama de hospedeiros mais restrita em comparação com *M. incognita* e causa destruição do sistema radicular. Sua detecção é mais frequente em cafezais do que *M. incognita*, que ocorre em uma ampla gama de hospedeiros (Carneiro & Santos, 2022). Roese & Oliveira (2004) avaliaram a capacidade reprodutiva de *M. paranaensis* em 28 espécies de plantas daninhas e observaram que a maioria se comportou como resistente ou imune, enquanto algumas plantas se comportaram como suscetíveis, incluindo capim-arroz e capim pé-de-galinha. A resistência a *M. paranaensis* foi detectada em algumas cultivares de milheto, sorgo e milho; todas as cultivares de milho testadas, com exceção de 'AG 7575', foram resistentes a *M. paranaensis* (Carneiro *et al*., 2007). O plantio sucessivo de *C. spectabilis*/aveia branca/amendoim, mucuna preta/aveia branca/amendoim, mucuna preta/aveia branca e amendoim reduziu a população de *M. paranaensis* a níveis muito baixos (Silva & Carneiro, 1995).

Levando em consideração nossos resultados, *C. spectabilis*, aveia branca, amendoim, *B. decumbens*, capim colonião, azevém, milheto, milho e aveia preta também podem ser usadas para controlar mistura de populações de *M. izalcoensis* e *M. paranaensis* (Moritz *et al*., 2003; Carneiro *et al*., 2006a, b; Mônaco *et al*., 2008). Considerando as quatro espécies de NGs do café mencionadas acima, amendoim, *C. spectabilis*, aveia preta e branca, azevém e capim braquiária podem ser usadas em cultivos intercalares e como plantas de cobertura em cafezais de *C. arabica* e *C. canephora*, com o benefício de planta de cobertura no controle de *Meloidogyne* spp. e no manejo de plantas daninhas, conservação do solo e redução do uso de produtos químicos na cafeicultura (Opoku-Amyaw *et al*., 2003; Santos *et al*., 2016).

A realização de testes de hospedabilidade com várias espécies botânicas é crucial para controlar os NGs de maneira eficaz em áreas infestadas. No entanto, nas últimas duas décadas,

houve ênfase limitada no uso de plantas de cobertura, com mais atenção dada ao desenvolvimento de novas moléculas fitoquímicas. Apesar dos esforços globais, o progresso no desenvolvimento de nematicidas a base de extratos botânicos, incluindo no Brasil, tem sido lento (Willian Terra, informação pessoal). Os desafios incluem a padronização de formulações para utilizar constituintes ativos naturais sem prejudicar os microrganismos não alvos do solo e a variação na qualidade dos produtos devido a métodos inconsistentes de obtenção, extração e formulação. A comercialização de novos nematicidas a base de extratos vegetais tem sido prejudicada pela rápida degradação e dispersão de compostos ativos dificultando o uso por agricultores devido a resultados científicos inconsistentes (Mwamula *et al*., 2022).

Até o momento, *M. izalcoensis* parece ter se disseminado pouco no Brasil (Almeida *et al*., 2023b), mas os resultados deste estudo permitem recomendar plantas conhecidas como culturas de cobertura efetivas, assim como plantas não hospedeiras ou antagônicas para rotação ou cultivo nas entrelinhas em cafezais com a presença desse nematoide ou outro NGs em café. Mais estudos com culturas de cobertura devem ser realizados no futuro, nas condições atuais de manejo em cafezais, utilizando principalmente novas cultivares agora disponíveis com resistência total ou parcial a *Meloidogyne* spp.

5. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo mostraram que *M. izalcoensis* tem uma gama restrita de hospedeiros (cafeeiro, tomateiro, feijão, soja e *Crotalaria juncea*) e permitem a recomendação de plantas identificadas como não hospedeiras ou má hospedeiras (algodão, arroz, aveia branca, aveia preta, azevém, milho, três espécies de capins, duas cultivares de milheto, duas cultivares de trigo, *C. breviflora*, *C. ochroleuca*, *C. spectabilis*, feijão-de-porco, mucuna cinza e duas espécies de capim-arroz) para uso em manejos culturais, em cafezais infestados por *M. izalcoensis*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. F.; SANTOS, M. F. A.; STEFANELO, D.; MATTOS, V. S.; RODRIGUES-SILVA, P. L.; SOUSA, G. P.; SALGADO, S. M. L.; SERA, G. H.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARES, J. E. & CARNEIRO, R. M. D. G. 2023a. Genetic variability and phylogenetic characterization of different populations of *Meloidogyne izalcoensis* and reaction of coffee genotypes to this new species detected in Brazil. Plant Pathology 22: 1-15.

ALMEIDA, S. F.; SANTOS, M. F. A.; STEFANELO, D. R.; SOUZA, C. F. B.; CARES, J. E. & CARNEIRO, R. M. D. G. 2023b. Comparison between enzymatic and molecular diagnostic techniques for identification of *Meloidogyne* spp. on coffee in Brazil and restricted occurrence of *M. izalcoensis*. Physiological and Molecular Plant Pathology 72: 636-650.

ALMEIDA, V. F. & CAMPOS, V. P. 1991a. Alternância de culturas e sobrevivência de *Meloidogyne exigua* em áreas de cafezais infestados e erradicados. Nematologia Brasileira 15: 30-42.

ALMEIDA, V. F. & CAMPOS, V. P. 1991b. Reprodutividade de *Meloidogyne exigua* em plantas antagonistas e em culturas de interesse econômico. Nematologia Brasileira 15: 24-29.

BERGO, C. L.; PACHECO, E. P.; MENDONÇA, H. A. & MARINHO, J. T. S. 2006. Avaliação de espécies leguminosas na formação de cafezais no segmento da agricultura familiar no Acre. Acta Amazonica 36: 19-24.

BRITO, J.A. DE & FERRAZ, S.(1987). Antagonismo de *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum* cv. 'Guiné' a *Meloidogyne javanica.* Nematologia Brasileira 11: 270-285.

CABI. 2021. *Meloidogyne exigua* (coffe root-knot nematode). Wallingford, UK. CABI Compendium.

CAMPOS, V. P. & VILLAIN, L. 2005. Nematodes parasites of coffee and cocoa. *In*: Luc, M.; Sikora, R. A. & Bridge, J. (eds.). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Wallingford, UK. CAB International. p. 529-579.

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

CARNEIRO, R. G. & CARNEIRO, R. M. D. G. 1982. Seleção preliminar de plantas para rotação de culturas em áreas infestadas por *M. incognita* nos anos de 1970 e 1980. Nematologia Brasileira 6: 141-148.

CARNEIRO, R. G.; MÔNACO, A. P. A.; LIMA, A. C. C.; NAKAMURA, K. C.; MORITZ, M. P.; SCHERER, A. & SANTIAGO, D. C. 2006a. Reação de gramíneas a *Meloidogyne incognita*, a *M. javanica* e a *M. paranaensis*. Nematologia Brasileira 30: 287-291.

CARNEIRO, R. G.; MORITZ, M. P.; MÔNACO, A. P. A.; LIMA, A. C. C. & SANTIAGO, D. C. 2006b. Reação de cultivares de aveia às raças 1 e 3 de *Meloidogyne incognita* e a *M. paranaensis*. Nematologia Brasileira 30: 281-285.

CARNEIRO, R. G.; MORITZ, M. P.; MÔNACO, A. P. A.; NAKAMURA, K. C. & SCHERER, A. 2007. Reação de milho, sorgo e milheto a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. paranaensis*. Nematologia Brasileira 31: 67-71.

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

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

CARNEIRO, R. M. D. G. & SANTOS, M. F. A. 2022. Integrated management of nematodes in coffee. *In*: Muschler, R. (ed.). Climate-smart production of coffee: improving social and environmental sustainability. Cambridge, UK. Burleigh Dodds Science Publishing. p. 343-378.

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

CARNEIRO, R. M. D. G.; SOUZA, C. F. B.; MATTOS, V. S. & CORREIA, V. R. 2024. Molecular techniques for root-knot nematode identification. In: Molinari, S. (Ed.). *Plant - nematode interactions. Methods in molecular biology*. Bari, Italy, Humana Press, p. 227-245.

CARVALHO, A. J.; ANDRADE, M. J. B.; REIS, R. P. & GUIMARÃES, R. J. 2009. Viabilidade técnico-econômica do consórcio de feijão-comum com cafeeiro adensado em formação, em função do número de fileiras e da adubação do feijoeiro. Bioscience Journal 25: 32-42.

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

DE MORAES, M. V.; LORDELLO, L. G. E.; REIS, A. J.; THOMAZIELLO, R. A. & GONÇALVES, W. 1977. Ensaio de rotação de culturas para reaproveitamento com cafeeiros de terras infestadas por *Meloidogyne exigua*. Nematologia Brasileira 2: 257-265.

FERRAZ, S. & FREITAS, L. G. 2004. Use of antagonistic plants and natural products. *In*: Chen Z. X.; Chen, S. Y. & Dickson, D. W. (eds.). Nematology - Advances and perspectives. Tsinghua University Press. Tsinghua, China. p. 931-978.

FERREIRA, D. F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e* Agrotecnologia 35: 1039-1042.

GABRIEL, M.; KUCZYNSKI, S. M.; SANTOS, M. F. A.; SOUZA, C. F. B.; MUNIZ, M. F. B.; BOITEUX, L. S. & CARNEIRO, R. M. D. G. 2022. A novel virulent Brazilian pathotype of *Meloidogyne javanica* towards the tomato *Mi*-1.2 gene and pathogenicity to resistant rootstock. Journal of Plant Diseases and Protection 129: 1269-1276.

HALBRENDT, J. M. & LAMONDIA, J. A. 2004. Crop rotation and other cultural practices. *In*: Chen Z. X, Chen, S. Y & Dickson, D. W. (eds.). Nematology - Advances and perspectives. Tsinghua University Press. Tsinghua, China. p. 909-930.

HUMPHREYS-PEREIRA, D. A.; FLORES-CHAVES, L.; GÓMEZ, M.; SALAZAR, L.; GÓMEZ-ALPÍZAR, L. AND ELLING, A. A. 2014. *Meloidogyne lopezi* n.sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a new root-knot nematode associated with coffee (L.) in Costa Rica, its diagnosis and phylogenetic relationship with other coffee-parasitising *Meloidogyne* species. Nematology 16: 643-661.

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

LIMA, E. A.; MATTOS, J. K.; MOITA, A. W.; CARNEIRO, R. G. & CARNEIRO, R. M. D. G. 2009. Host status of different crops for *Meloidogyne ethiopica* control. Tropical Plant Pathology 34: 152-157.

MESQUITA, C. M.; MELO, E. M.; REZENDE, J. E.; CARVALHO, J. S.; FABRI JÚNIOR, M. A.; MORAES, N. C.; DIAS, P. T.; CARVALHO, R. M. & ARAÚJO, W. G. 2016. Manual do café: implantação de cafezais *Coffea arabica* L. Belo Horizonte, MG. EMATER. 50p.

MÔNACO, A. P.; CARNEIRO, R. G.; KRANZ, W. M.; GOMES, J. C.; SCHERER, A.; NAKAMURA, K. C.; MORITZ, M. P. & SANTIAGO, D. C. 2008. Reação de espécies de plantas daninhas a *Meloidogyne paranaensis*. Nematologia Brasileira 32: 279-284.

MORITZ, M. P.; SIMÃO, G. & CARNEIRO, R. C. 2003. Reação de aveia a *Meloidogyne incognita* raças 1 e 3, e a *M. paranaensis*. Nematologia Brasileira 27: 207-210.

MWAMULA, A. O.; KABIR, M. D. F. & LEE, D. W. 2022. A Review of the potency of plant extracts and compounds from key families as an alternative to synthetic nematicides: History, efficacy, and current developments. Plant Pathology Journal 38: 53-77.

OOSTENBRINK, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Mendelingen Landbouwhogeschool Wageningen 6: 1-46.

OPOKU-AMEYAW, K.; OPPONG, F. K.; OFORI-FRIMPONG, K.; AMOAH, F. M. & OSEI-BONSU, K. 2003. Intercropping robusta coffee with some edible crops in Ghana: Agronomic performance and economic returns. Ghana Journal of Agricultural Science 36: 13-21.

PARTELI, F. L.; VIEIRA, H. D.; FERREIRA, E. P. B.; VIANA, A. P.; ESPINDOLA, J. A. A.; URQUIAGA, S. & BODDEY, R. M. 2011. Biological dinitrogen fixation and nutrient cycling in cover crops and their effect on organic Conilon coffee. Semina Ciências Agrárias 32: 995-1006.

PAULO, E. M.; BERTON, R. S.; CAVICHIOLI, J. C.; BULISANI, E. A. & KASAI, F. S. 2001. Produtividade do café Apoatã em consórcio com leguminosas na região da Alta Paulista. Bragantia 60: 195-199.

ROESE, A. D. & OLIVEIRA, R. D. L. 2004. Capacidade reprodutiva de *Meloidogyne paranaensis* em espécies de plantas daninhas. Nematologia Brasileira 28: 137-141.

SALGADO, S. M. L.; FATOBENE, B. J. DOS R.; TERRA, W. C. & CARNEIRO, R. M. D. G. 2021. Nematoides parasitas do cafeeiro: aspectos gerais e controle. Boletim Técnico 111. Belo Horizonte, MG, Brasil, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais.

SANTOS, J. C. F.; CUNHA, A. J.; FERREIRA, F. A.; SANTOS, R. H. S.; SAKIYAMA, N. S. & LIMA, P. C. 2016. Herbaceous legumes intercropping in weed management of the coffee crop. Journal of Agriculture and Environmental Sciences 5: 91-100.

SILVA, J. F. V. & CARNEIRO, R. G. 1995. Efeito de sucessões de culturas sobre *Meloidogyne incognita* biótipo IAPAR. *In*: Anais do Congresso Internacional de Nematologia Tropical. 04 a 09 de junho de 1995. Rio Quente, GO. Sociedade Brasileira de Nematologia, p.65.

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

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

CONCLUSÕES GERAIS

1. Os marcadores moleculares SCAR são mais eficientes e práticos do que os marcadores enzimáticos na distinção dos nematoides do cafeeiro, *M. exigua, M. incognita, M. paranaensis* e *M. izalcoensis* devido à baixa concentração de esterase em *M. exigua.*

2. A ocorrência de *M. izalcoensis* no Brasil é considerada restrita à região de Indianópolis-MG, onde essa espécie foi inicialmente detectada, embora levantamentos mais abrangentes não tenham sido ainda realizados.

3. Uma baixa variabilidade intraespecífica foi detectada entre as populações de *M. izalcoensis* de diferentes países e essa espécie se separou filogeneticamente de todos os outros nematoides-das-galhas do cafeeiro.

4. Dentre as 15 cultivares com resistência a *Meloidogyne* spp. testadas, o porta-enxerto Apoatã IAC 2258 foi a única que apresentou resistência moderada a *M. izalcoensis*.

5. Nos testes de hospedabilidade de diferentes plantas a *M. izalcoensis* comportaram-se como não hospedeiras ou má hospedeiras: algodão, arroz, aveia branca, aveia preta, azevém, milho, três espécies de capins, duas cultivares de milheto, duas cultivares de trigo, *C. breviflora*, *C. ochroleuca*, *C. spectabilis*, feijão-de-porco, mucuna cinza e duas espécies de capim-arroz. Essas plantas podem ser usadas em rotação de culturas ou cultivo nas entrelinhas em cafezais infestados por *M. izalcoensis*.