

PRIMEIRO RELATO DE *Meloidogyne izarcoensis* EM CAFEZAL NO ESTADO DE MINAS GERAIS E LEVANTAMENTO DE *Meloidogyne* spp. EM CAFEZEIROS NO TRIÂNGULO MINEIRO¹

Marcilene Fernandes Almeida dos Santos²; Daniela Rossato Stefanelo³; Vanessa da Silva Mattos⁴; Masako Toma Braghini⁵; Sônia Maria Lima Salgado⁶; Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro⁷

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café - Consórcio Pesquisa Café.

²Bolsista Pós-Doc, INCT- Café, lenebio@gmail.com

³Professora, Universidade do Estado da Bahia - UNEB, Barreiras - BA, drstefanelo@yahoo.com.br

⁴Bolsista Pós-Doc, FMC, nessinha.agro@gmail.com

⁵Bolsista, Consórcio Pesquisa Café, IAC, Campinas-SP, mako@iac.sp.gov.br

⁶Pesquisador, PhD, EPAMIG Sul - UFLA, Lavras-MG, soniamaria@epamig.br

⁷Pesquisador, PhD, Embrapa - Cenargen, regina.carneiro@embrapa.br

RESUMO: Neste estudo foi realizada a identificação de uma nova espécie de *Meloidogyne* no Triângulo Mineiro, em plantas de cafeeiro, e também a detecção de outras espécies de nematoides de galhas ocorrentes nessa região. Para tanto, foram empregadas técnicas bioquímicas a partir dos fenótipos da enzima esterase (Est) e técnicas moleculares, a partir dos marcadores moleculares espécie-específico do tipo SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions). A utilização dessas técnicas permitiu a identificação de *M. izarcoensis* em Indianópolis, MG, que havia sido descrita pela primeira vez em El Salvador por Carneiro et al. (2005), parasitando plantas de cafeeiro. Em uma prospeção posterior em locais próximos a detecção dessa espécie nova, foram encontradas outras três espécies de *Meloidogyne* parasitando cafeeiros no Triângulo Mineiro: *M. exigua*, *M. paranaensis* e *M. incognita*. Em amostras de dois locais, misturas de *M. exigua* e *M. paranaensis* foram detectadas; em outra amostra ocorreram populações mistas de *M. exigua* e *M. incognita*. Os fenótipos de esterase e os marcadores moleculares SCAR foram eficientes na identificação de espécies de *Meloidogyne* spp., que parasitam o cafeeiro. Esse foi o primeiro relato de *M. izarcoensis* ocorrendo em cafeeiros no Brasil, e a sua distribuição parece restrita. Entretanto, mais estudos são necessários para precisar a distribuição de *M. izarcoensis* no Triângulo Mineiro.

PALAVRAS-CHAVE: cafeeiro, diagnose, nematoide das galhas, nova espécie.

FIRST REPORT OF *Meloidogyne izarcoensis* ON COFFEE IN MINAS GERAIS STATE AND SURVEY OF *Meloidogyne* spp. ON COFFEE IN TRIÂNGULO MINEIRO

ABSTRACT: In this study, a new species of *Meloidogyne* found on coffee in Triângulo Mineiro was identified and other root-knot nematode species were detected occurring in this location. Biochemical techniques based on esterase (Est) enzyme phenotypes and species-specific molecular techniques based on Sequence Characterized Amplified Regions (SCAR) revealed, for the first time, *M. izarcoensis* parasitizing coffee plants in Indianópolis, Triângulo Mineiro, MG. This species was first described in El Salvador by Carneiro et al. (2005). Further survey at locations near the detection of this new species found three other species of *Meloidogyne* parasitizing coffee trees in the Triângulo Mineiro: *M. exigua*, *M. paranaensis* and *M. incognita*. In samples from two locations, mixtures of *M. exigua* and *M. paranaensis* were detected, and an other sample presented mixed populations of *M. exigua* and *M. incognita*. Esterase phenotypes and SCAR molecular markers were efficient in identifying *Meloidogyne* species occurring on coffee in Triângulo Mineiro. It was the first report of *M. izarcoensis* parasitizing coffee in Brazil and its distribution seems restricted. Further studies are needed to determine the distribution of *M. izarcoensis* in the Triângulo Mineiro region.

KEYWORDS: coffee, diagnosis, new species, root-knot nematodes.

INTRODUÇÃO

Meloidogyne spp. são os nematoides parasitas de plantas mais prejudiciais ao cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Dezoito espécies de *Meloidogyne* foram relatadas parasitando café em todo o mundo (Carneiro & Cofcewicz, 2008; Humphreys - Pereira et al. 2014). Nos últimos 25 anos, quatro novas espécies de nematoides de galhas (NG) associadas ao café

foram descritas. Destas, *M. paranaensis* Carneiro et al. (1996); *M. izalcoensis* Carneiro et al. (2005) e *M. lopezi* Humphreys - Pereira et al. (2014) foram descritas no Brasil, El Salvador e Costa Rica, respectivamente. Além disso, *M. konaensis* Eisenback et al. (1994) foi descrita como uma espécie parasita do cafeeiro, mas recentemente, foi demonstrado que esse nematoide não infecta plantas de café, em vez disso, foi confirmado que a espécie que infecta o cafeeiro no Havaí é *M. paranaensis* (Monteiro et al. 2016).

No Brasil, quatro espécies principais de NG foram detectadas, incluindo *M. exigua* Göldi, 1887, *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, *M. paranaensis* e *M. coffeicola* Lordello & Zamith, 1960 (Carneiro & Cofcewicz, 2008; Ferraz, 2008). *Meloidogyne exigua* é amplamente distribuída e adaptada a várias regiões, especialmente ao Estado de Minas Gerais (MG). Como o maior produtor brasileiro de café, o estado de MG está em risco, a partir da introdução de espécies mais agressivas como *M. paranaensis* e *M. incognita*, o que poderia levar a perdas substanciais de rendimento (Ferraz, 2008).

Meloidogyne izalcoensis é um parasita do café, detectado pela primeira vez em El Salvador e descrito por Carneiro et al. (2005b). O diagnóstico de *M. izalcoensis*, no entanto, é difícil devido à semelhança do padrão perineal aos de *M. incognita* e *M. paranaensis*. Bioquimicamente, o fenótipo da esterase (Est) é único e pode ser usado para diferenciar *M. izalcoensis* de outras espécies descritas no café (Carneiro & Cofcewicz, 2008). Marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) foram também obtidos para os nematoides parasitas do cafeeiro e permitiram que cinco espécies *Meloidogyne* fossem diferenciadas: *M. exigua*, *M. paranaensis*, *M. incognita*, *M. arabicida* e *M. izalcoensis* (Correa et al. 2013).

Recentemente, *M. izalcoensis* foi identificada a partir de amostras provenientes de café no Quênia (Kabete) e na Tanzânia (Mufindi), e a mesma espécie também foi detectada em repolho (*Brassica* sp.), originário do Benim (Cotonou), do tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.) em Tindini e Kianga, na Tanzânia, respectivamente (Jorge Júnior et al. 2016).

Em 2016, uma amostra contendo raízes de café galhadas da região de Indianópolis, estado de Minas Gerais, foi enviada à Embrapa Cenargen (Brasília, DF) e foi diretamente inoculada em cafeeiro cultivar Mundo Novo. As plantas de café infectadas a campo, nesta região, mostraram folhas cloróticas na cv. Mundo Novo e folhas verdes sem cloroses na cv. IAC 125 RN (resistente a *M. exigua*), cultivada na mesma área. Raízes da cv. Mundo Novo apresentaram pequenas galhas e necroses, enquanto nenhum sintoma de galhas foi observado na cv. IAC 125 RN.

O objetivo deste estudo foi identificar a população de *Meloidogyne* sp. detectada no município de Indianópolis (Triângulo Mineiro) e fazer um levantamento rápido nessa região de outras populações de *Meloidogyne* ocorrentes para medir a distribuição dessa nova espécie na área.

MATERIAL E MÉTODOS

Detecção de *Meloidogyne izalcoensis* no Triângulo Mineiro

Para identificar a espécie, as fêmeas foram extraídas das raízes e caracterizadas utilizando fenótipos de esterase (Carneiro & Almeida, 2001; Carneiro et al. 2005b). As raízes remanescentes foram usadas para extração de ovos (Carneiro et al. 2004). O DNA genômico total foi extraído de 200 a 300 µl de ovos do nematoide, usando o método de extração fenol-clorofórmio, como descrito por Randig et al. (2002); as reações de PCR foram realizadas de acordo com Correa et al. (2013). Para os estudos morfológicos e morfométricos foi utilizada a metodologia utilizada por Carneiro et al. (2005b).

Levantamento de espécies de *Meloidogyne* no Triângulo Mineiro

Para a detecção de *Meloidogyne* spp. foram realizadas coletas nos municípios de Araguari e Indianópolis, próximos aos locais da detecção de *M. izalcoensis*, ambos localizados no Triângulo Mineiro. O clima segundo Koppen, (Cwb) subtropical de altitude, com inverno seco e verão ameno. A temperatura média do mês mais quente foi inferior a 22 °C (EMBRAPA, s/d). Os solos predominantes foram representados por latossolo vermelho distrófico e latossolo vermelho-amarelo distrófico, a vegetação foi predominantemente de cerrado. Na Tabela 1 estão relacionadas às áreas de amostragem pertencentes aos municípios do Triângulo Mineiro.

Tabela 1. Áreas de coleta de amostras de solo e raízes de cafeeiros na região do Triângulo Mineiro.

Área	Características do cultivo	Município / UF	Coordenadas geográficas
A17	Cultivo de Cafeeiro (irrigado). Área do talhão: 16 ha. Cv. Catuaí.	Araguari/MG	18°38'19" S, 48°15'16" W
A18	Cultivo de Cafeeiro (sequeiro). Área do talhão: 1ha. Cv. Acauã (3 anos).	Araguari/MG	18°46'07" S, 48°00'55" W
A19	Cultivo de Cafeeiro (irrigado). Área do talhão: 11ha. Cv. Mundo Novo (15 anos).	Araguari/MG	18°46'11" S, 48°00'59" W
A20	Cultivo de Cafeeiro (sequeiro). Área do talhão: 12 ha. Cultivar IBC 12 (8 anos).	Indianópolis/MG	19°00'05" S, 47°53'36" W
A21	Cultivo de Cafeeiro (irrigado). Área do talhão: 28 ha. Cv. Catuaí 99 (12 anos).	Indianópolis/MG	18°54'17" S, 47°54'33" W
A22	Cultivo de Cafeeiro (sequeiro). Área do talhão: 25 ha. Cv. Catuaí 99 e Topázio (20 anos).	Araguari/MG	18°47'35" S, 48°02'24" W
A23	Cultivo de Cafeeiro (irrigado). Área do talhão: 6 ha. Cv. Mundo Novo (20 anos).	Araguari/MG	18°31'17" S, 48°14'49" W
A24	Cultivo de Cafeeiro (irrigado). Área do talhão: 9 ha. Cv. Catuaí 99 (15 anos).	Araguari/MG	18°31'36" S, 48°14'45" W

Em cada talhão amostrado foi coletada uma amostra composta de solo (aprox. 2000 cm³) e raízes (aprox. 200g), a uma profundidade de 0-30 cm. Todas as amostras foram coletadas com o devido cuidado de se realizar a limpeza de todos os instrumentos utilizados, a fim de evitar a disseminação dos fitonematoides, entre áreas e propriedades, assim como, para evitar a contaminação das amostras. Os dados das coordenadas geográficas foram registrados com auxílio de um GPS de Navegação.

A identificação de espécies do *Meloidogyne* provenientes de amostras de raízes de cafeeiros do Triângulo Mineiro foram analisadas com base no fenótipo de esterase (Carneiro & Almeida, 2001), conforme descrito anteriormente. O restante das raízes foi utilizado para extração de ovos, utilizando o método de Hussey & Barker (1973). A suspensão de ovos foi colocada em um funil de Baermann modificado de acordo com Whitehead & Hemming (1965). A extração do DNA genômico e reações de PCRs foram realizadas de acordo com Randig et al. (2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Detecção de *M. izalcoensis* no Triângulo Mineiro

O fenótipo da esterase (Est I4, Rm: 0,86, 0,96, 1,24, 1,30) foi utilizado para a identificação de *M. izalcoensis* (Figura 1a) (Carneiro et al. 2005a) e também foi confirmada a pureza desta população. Para confirmar a identificação da espécie, a reação de PCR usando primers SCAR, amplificou um fragmento específico de tamanho esperado (670 pb), típico de *M. izalcoensis* (Figura 1b) (Correa et al. 2013). A identidade da espécie foi também confirmada por características morfológicas segundo Carneiro et al. (2005b), apresentando dados morfométricos nos intervalos descritos para *M. izalcoensis*.

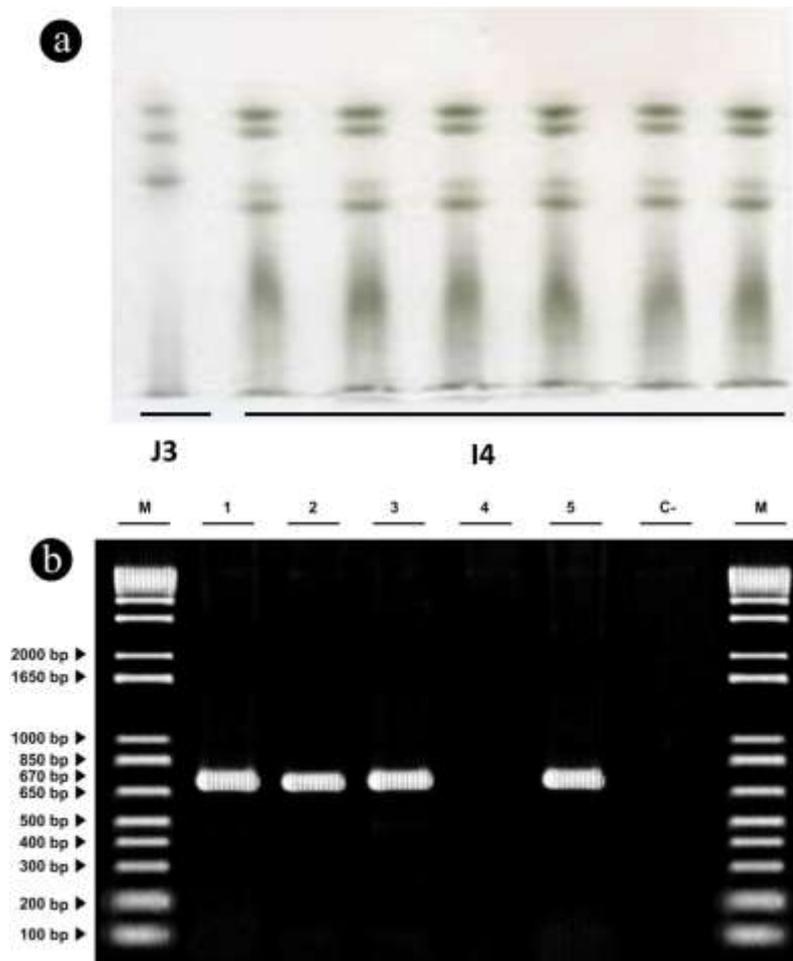


Figura 1. a) Fenótipo Esterase de *Meloidogyne izalcoensis* (Est I4) coletada em cafeeiro, Indianópolis, MG, Brasil. *M. javanica* (Est J3) foi usada como referência. b) SCAR-PCR de populações de *M. izalcoensis* de diferentes países: 1) El Salvador, Izalco; 2) Benin, Cotonou; 3) Quênia, Kabete; 4) Tanzânia, Tindini (não houve amplificação de fragmento, DNA degradado); 5) Brasil, Indianópolis, MG; C- controle negativo; M- marcador 1 kb DNA Plus. Amostras caracterizadas com primers ar-A12F / R (Correa et al. 2013).

Meloidogyne izalcoensis causa destruição severa da raiz, matando frequentemente cafeeiros em El Salvador (Carneiro et al. 2005a). No Brasil, os cafeeiros foram erradicados em fazenda em Indianópolis (18° 53' 52,84"S, 47° 54' 21,00" O, elev. 968 m) e foi plantada soja na área infestada. Essa espécie foi detectada primeiramente em Araguari, MG, utilizando o fenótipo da esterase (Est S4) em *Momordica indica* L., mas a espécie permaneceu não identificada pois os autores não tinham o conhecimento do perfil de enzima (Carneiro, 2014).

As raízes de café infectadas com *M. izalcoensis* produziram galhas relativamente pequenas (Figura 2a). As massas de ovos foram formadas fora das raízes, em grandes quantidades (Figura 2b-c); foi observada também a presença de tecidos necróticos nas extremidades das raízes (Figura 2d). Cada galha foi caracterizada por uma única fêmea, expondo a massa de ovos do lado de fora da galha. Nenhuma rachadura na superfície da raiz, tipicamente causada por *M. paranaensis* ou *M. incognita* foi observada. As galhas causadas por *M. exigua* são maiores e podem conter mais de uma fêmea, pequenas e localizadas no interior das raízes, apresentando massas de ovos, em geral, dentro das raízes.

Os sintomas da raiz causados por *M. izalcoensis* em cafeeiro são completamente diferentes daqueles causados por *M. paranaensis*, *M. incognita*, *M. arabicida* e *M. exigua* (Campos & Villain, 2005), mas idênticos aos de *M. lopezi* (Humphreys - Pereira et al., 2014). Estas duas espécies, *M. izalcoensis* e *M. lopezi* (Est S4 e Est S2, respectivamente) foram coletados em diferentes fazendas na mesma região em El Salvador (Hernandez et al. 2004). Elas mostraram-se intimamente relacionadas em análise de DNA (Carneiro et al. 2004). O fenótipo SA2 foi descrito como *M. lopezi* (Humphreys-Pereira et al. 2014) a partir de cafeeiros no sul da Costa Rica.



Figura 2. Sintomas causados por *Meloidogyne izalcoensis* em raízes de cafeeiro (*Coffea arabica*) cv. Mundo Novo. a) visão geral de sistema radiculares infectados por *M. izalcoensis*. b-d) Pequenas galhas redondas e massas de ovos externas induzidas pelo nematoide. Seta indica necrose na ponta da raiz. Fotos: Cláudio Bezerra.

Este é o primeiro registro de *M. izalcoensis* ocorrendo em cafeeiros no Brasil e embora, a distribuição geográfica dessa espécie no Brasil ainda não seja conhecida; portanto, sua ocorrência no cafeeiro indicaria uma ameaça potencialmente importante para o cultivo comercial de café, especialmente no estado de Minas Gerais. Considerando esta nova informação, deve ser dada prioridade à caracterização precisa de espécies de *Meloidogyne* em diferentes áreas de cultivo de café. Esta informação será de grande interesse para o desenvolvimento de variedades com resistência duradoura, adaptadas ao complexo de espécies de nematoides das galhas do cafeeiro detectadas no Brasil. A ocorrência deste parasita no Brasil foi notificada ao Ministério da Agricultura do Brasil, documento n° 214/2018 / DSV - MAPA.

Identificação de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiros no Triângulo Mineiro

Do total de oito áreas amostradas, três apresentaram a espécie *M. paranaensis*, duas *M. exigua*. Foram detectadas misturas de espécies em 3 áreas amostradas (A20, A21 e A23), duas com *M. paranaensis* e *M. exigua* (A20 e A21) e uma outra área com *M. incognita* e *M. exigua* (A23) (Tabela 2). Não foi detectada a presença de *M. izalcoensis* nas áreas amostradas, sugerindo que a ocorrência seja mais restrita.

Tabela 2. Espécies de *Meloidogyne* parasitando cafeeiros nos municípios de Araguari e Indianópolis- MG, detectadas por esterase e marcadores SCAR-PCR.

Áreas	Município	Espécies	
		Esterase (EST)	SCAR-PCR
A17	Araguari/MG	<i>M. paranaensis</i>	<i>M. paranaensis</i>
A18*	Araguari/MG	-	<i>M. paranaensis</i>
A19	Araguari/MG	<i>M. paranaensis</i>	<i>M. paranaensis</i>
A20	Indianópolis/MG	<i>M. paranaensis</i> e <i>M. exigua</i>	<i>M. exigua</i>
A21	Indianópolis/MG	<i>M. paranaensis</i> e <i>M. exigua</i>	<i>M. paranaensis</i> e <i>M. exigua</i>
A22	Araguari/MG	<i>M. exigua</i>	<i>M. exigua</i>
A23	Araguari/MG	<i>M. incognita</i> e <i>M. exigua</i>	<i>M. incognita</i> e <i>M. exigua</i>
A24	Araguari/MG	<i>M. exigua</i>	<i>M. exigua</i>

* raízes muito degradadas.

A identificação correta das espécies presentes nas áreas foi possível devido ao uso combinado de eletroforese de izarozimas (Est- Esterase) e marcadores moleculares espécie-específicos (PCR-SCAR). O fenótipo Est E2 (Rm 1,1 e 1,9) foi detectado em todas as populações de *M. exigua*. As populações de *M. paranaensis* apresentaram o fenótipo Est P1 (Rm: 1.32) e uma população de *M. incognita* com fenótipo Est I1 (Rm:1,03), de acordo com Carneiro & Cofcewicz (2008). Somente em uma das amostras (A18) não foi possível realizar a identificação mediante esterase, devido à destruição das raízes, em decorrência do parasitismo por *M. paranaensis*.

Na análise dos marcadores espécie-específicos do tipo SCAR desenvolvidos para as espécies de nematoides do cafeeiro: *M. incognita*, *M. paranaensis* e *M. exigua*. Um único fragmento de 208 pb foi obtido para as cinco populações de *M. paranaensis* (Est P1); um fragmento de 399 pb foi obtido para uma população de *M. incognita* (Est I1) e um fragmento de 562 pb para as cinco populações de *M. exigua* (Est E2). Esses dados confirmaram a identificação dessas espécies obtidas por meio dos perfis de esterase.

Os marcadores SCAR foram eficientes na diferenciação das espécies de *Meloidogyne* presentes nas amostras de cafeeiro do Triângulo Mineiro. Esses dados corroboraram com os obtidos por Carneiro et al. (2005b), que identificaram misturas de espécies de *Meloidogyne* em 24% de um total de 54 amostras, observando a predominância de *M. incognita* e *M. paranaensis*. Neste estudo, foi observada também a mistura das espécies *M. exigua* e *M. paranaensis* e *M. incognita* e *M. exigua*.

Recentemente, Santos et al. (2018), na região sul de Minas Gerais, importante pólo produtor de café, confirmou a espécie *M. exigua* amplamente distribuída naquela 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. Carneiro (2014) em um levantamento realizado em 18 cafezais do município de Araguari-MG detectou, com auxílio de eletroforese de izarozimas e caracteres morfológicos, *M. incognita*, *M. exigua* e *M. paranaensis* em 50%, 28% e 17% das amostras, respectivamente. Na planta daninha melão-de-são-caetano (*Momordica indica* L.), presente em um dos cafezais amostrados, foi detectada *Meloidogyne* sp. que apresentou o fenótipo da esterase (Est S4). Essa espécie não foi identificada na ocasião, mas tratase de *M. izarcoensis*, devido ao perfil de enzima S4. Salgado et al. (2014) constataram a presença de *M. exigua* em 92,95%, *M. paranaensis* em 4,22% e *M. exigua* e *M. paranaensis*, em mistura em 2,81% das detecções de um total 165 amostras coletadas na região Sul de Minas Gerais. Para *M. exigua* os fenótipos de esterase Est E1 e E2 foram encontrados, no entanto, esse último foi o mais frequente na maioria dos municípios amostrados (Guaxupé, Monte Belo, Monte Santo de Minas, Muzambinho e São Pedro da União). O fenótipo Est (P1) de *M. paranaensis* foi detectado parasitando cafeeiros nos municípios de Alpinópolis e Coqueiral, causando danos severos às plantas.

CONCLUSÕES

1. Os métodos bioquímicos e moleculares permitiram fazer o primeiro relato de *M. izarcoensis* parasitando cafeeiros no Brasil e a sua publicação em periódico especializado (Stefanelo et al. 2019). Não foi possível precisar a distribuição dessa espécie no Triângulo Mineiro.
2. A combinação dos métodos baseados em eletroforese de izarozimas (esterase) e marcadores moleculares espécie-específicos (PCR-SCAR), proporcionou a correta identificação das espécies de *Meloidogyne* spp. provenientes de cafeeiros no Triângulo Mineiro: *M. exigua*, *M. paranaensis* e *M. incognita*. Os métodos utilizados permitiram a detecção de misturas de espécies em 3 áreas amostradas, duas com *M. paranaensis* e *M. exigua* e uma área com *M. incognita* e *M. exigua*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMPOS, V.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee and cocoa. In: Luc, M.; Skora, R.A.; Bridge, J. (Eds) Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 2nd ed. Egham, UK, CABI Biosciences, p. 529-580, 2005.
- CARNEIRO, F.A. Espécies de *Meloidogyne Goeldi* em cafeeiro no município de Araguari, MG. (Dissertação Mestrado), Universidade de Botucatu, 2014, 50 p.
- CARNEIRO, R.G.; COFCEWICZ E.T. The taxonomy of *Meloidogyne* spp. from coffee. In: Souza, R.M. (Ed.). Plant parasitic nematodes of coffee. Dordrecht, NL., Springer Science Business, 2008, p. 165-190.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; GOMES, A.C.M.M.; HERNANDEZ, A. *Meloidogyne izarcoensis* n.sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in El Salvador. *Nematology* 7:819–832, 2005a.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A.; GONÇALVES, W. Caracterização de *Meloidogyne* spp. em cafeeiro nos Estados de São Paulo e Minas Gerais através dos fenótipos das esterases e Scar-PCR-Multiplex. *Nematologia Brasileira* 29:33-241, 2005b.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; TIGANO, M.S.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A.; SARAH, J.L. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology* 6: 287-298, 2004.
- CARNEIRO, R.M.D.; ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécie. *Nematologia Brasileira* 25: 35-44, 2001.

- CARNEIRO, R.M.D.G.; CARNEIRO, R.G.; ABRANTES, M.O.; SANTOS, M.S.N.A.; ALMEIDA, M.R. *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. *Journal of Nematology* 28:177-189, 1996a.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de café – Safra 2018. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>>. Acesso em 17 de jun. 2019.
- CORREA, V.F.; SANTOS, M.F.A.; ALMEIDA, M.R.A.; PEIXOTO, J.R.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R.M.D.G. Species-specific DNA markers for identification of two root-knot nematodes of coffee: *Meloidogyne arabicida* and *M. izalcoensis*. *European Journal Plant Pathology* 137:305–313, 2013.
- FERRAZ, L.C.C.B. Plant parasitic nematodes of coffee in Brazil. In: Souza, R.M. (Ed) Plant parasitic nematodes of coffee. New York, APS Press & Springer, 2008, p. 225–248.
- HERNANDEZ, A.; FARGETTE, M.; SARAH, J.L. Pathogenicity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) isolates from Central America and Brazil on four genotypes of *Coffea arabica*. *Nematology* 6:205-213, 2004.
- SALAZAR, L.; GOMES-ALPIZAR, L.; ELLING, A.A. *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, 2014.
- HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A. Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease* 57:1025-1028, 1973.
- JORGE JUNIOR, A.S.; CARES, J.E.; MATTOS, V.S.; COYNE, D.; SANTOS, M.F.A.; CARNEIRO, R.M.D.G. First Report of *Meloidogyne izalcoensis* (Nematoda: Meloidogynidae) on coffee, cabbage, and other crops in Africa. *Plant Disease* 100: 2173, 2016.
- MONTEIRO, J.M.S.; CARES, J.E.; GOMES, A.C.M.M.; CORREA, V.R.M.V.S.; SANTOS, M.F.A.; ALMEIDA, M.R.A.; SANTOS, C.D.G.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R.M.D. First report of, and additional information on, *Meloidogyne konaensis* (Nematoda: Meloidogyninae) parasitising various crops in Brazil. *Nematology* 18:831–844, 2016.
- RANDIG, O.; BONGIOVANNI, M.; CARNEIRO, R.M.D.G.; CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome* 45:862-870, 2002.
- SALGADO, S.M.L.; GUIMARÃES, N.M.R.B.; BOTELHO, C.E.; Guilherme A.T.; TASSONE, G.A.T.; MARCELO, A.L.; SOUZA, S.R.; OLIVEIRA, R.D.L.; FERREIRA, D.F.F. *Meloidogyne paranaensis* e *Meloidogyne exigua* em lavouras cafeeiras na região sul de Minas Gerais. *Coffee Science* 10: 475 – 481, 2014.
- SANTOS, M.F.A.; SALGADO, S.M.L.; SILVA, J.G.P.; CORREA, V.R.; CARNEIRO, R.M.D.G. First report of *Meloidogyne incognita* parasitizing coffee plants in southern Minas Gerais, Brazil. *Tropical Plant Pathology* 43(1):95-98, 2018.
- STEFANELO, D.R.; SANTOS, M.F.A.; MATTOS, V.S.; MASSAKO, T. B.; MENDONÇA, J.S.F.; CARES, J.E.; CARNEIRO, R.M.D.G. *Meloidogyne izalcoensis* parasitizing coffee in Minas Gerais state: the first record in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 44: 209-212, 2019.
- WITEHEAD, A.G.; HEMMING, J.R. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Annals of Biology* 55:25-38, 1965.