

GUSTAVO BRAGA BABILÔNIA

**LEVANTAMENTO POPULACIONAL DO NEMATOIDE DAS GALHAS EM
CAFEIROS DO CERRADO MINEIRO E DIAGNOSE DE *Meloidogyne exigua*
POR MEIO DE AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP (LAMP)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Everaldo Antônio Lopes

Coorientador: Bruno Sérgio Vieira

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Universidade Federal
de Viçosa - Campus Rio Paranaíba**

T

B1141
2022

Babilônia, Gustavo Braga, 1997-

Levantamento populacional do nematoide das galhas em
cafeeiros do Cerrado mineiro e diagnose de *Meloidogyne exigua*
por meio da amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) /
Gustavo Braga Babilônia. – Rio Paranaíba, MG, 2022.
76f: il. (algumas color.).

Orientador: Everaldo Antônio Lopes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Instituto de Ciências Agrárias, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvcrp.2022.008>

Modo de acesso: <https://www.locus.ufv.br/>.

1. Identificação. 2. Isoenzimas. 3. Medidas. I. Lopes,
Everaldo Antônio. II. Universidade Federal de Viçosa. Instituto
de Ciências Agrárias. Mestrado em Agronomia (Produção
Vegetal). III. Título.

633.73

Bibliotecário(a) responsável: Crislene Silva de Sousa 2539

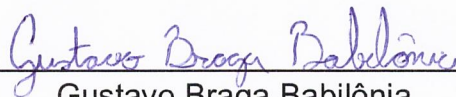
GUSTAVO BRAGA BABILÔNIA

**LEVANTAMENTO POPULACIONAL DO NEMATOIDE DAS GALHAS EM
CAFEIROS DO CERRADO MINEIRO E DIAGNOSE DE *Meloidogyne exigua*
POR MEIO DE AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP (LAMP)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2022.

Assentimento:



Gustavo Braga Babilônia
Autor



Everaldo Antônio Lopes
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sem ele nada seria, por estar ao meu lado em todos os momentos, me protegendo e proporcionando tantas bênçãos.

Agradeço ao professor Dr. Everaldo Antônio Lopes, que sempre me orientou em todas as coisas não apenas para fins acadêmicos, mas também em questões pessoais.

Agradeço a Maria Luiza Araújo Londe, por toda ajuda na condução dos ensaios laboratoriais e a Natália Coelho Oliveira pela ajuda na coleta das amostras para o estudo de campo populacional.

Agradeço a toda minha família, que sempre estiveram ao meu lado nos bons momentos e nos momentos de necessidade.

Agradeço a Sônia Maria Salgado por todas as indicações de áreas a serem estudadas.

Agradeço a Paula Adriana, pela motivação, incentivo e apoio em todos os momentos. Seu apoio é fundamental para meu crescimento!

Agradeço o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela bolsa de estudos (Código de Financiamento 001), à

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro ao projeto (APQ-02349-17 e APQ-0077719) e ao Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ (Grant No 306267/2018-7).

Dedico a Deus, que me proporcionou esta e tantas outras bênçãos, e a toda minha família, que sempre me apoiaram em tudo. Sem eles, eu não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem ele nada seria, por estar ao meu lado em todos os momentos, me protegendo e proporcionando tantas bênçãos. (UNIPAM).

Agradeço ao professor Dr. Everaldo Antônio Lopes, que sempre me orientou com maestria não apenas para fins acadêmicos, mas também em quesitos pessoais.

Agradeço a Maria Luiza Araújo Londe, por toda ajuda na condução dos ensaios LAMP, e a Natália Coelho Oliveira pela ajuda na coleta das amostras para o levantamento populacional.

Agradeço a toda minha família, que sempre estiveram ao meu lado nos bons momentos e nos momentos de necessidade.

Agradeço a Sônia Maria Salgado por todas as indicações de áreas a serem amostradas.

Agradeço a Paula Adriana, pela motivação, incentivo e apoio em todos os momentos. Seu apoio é fundamental para meu crescimento!

Agradeço o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela bolsa de estudos (Código de Financiamento 001), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro ao projeto (APQ-02349-17 e APQ-0077719) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ (Grant Nº 306267/2018-7).

Em 2020, Babilônia ingressou no programa de mestrado em Produção Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa Campus Rio Piranga, iniciando seu projeto de pesquisa sob orientação do professor Dr. Everaldo Antônio Lopes, sendo bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Em maio de 2021 obtenção de sua bolsa na CAPES para iniciar sua carreira profissional como Assistente Júnior de demanda híbrido da Bayer Crop Science - Sementes, Agrocores, onde atua até o presente momento no distrito de Patá de Minas - MG.

BIOGRAFIA

Gustavo Babilônia, inicialmente Gustavo Braga Babilônia é engenheiro agrônomo formado pelo Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

Nascido em 27 de agosto de 1997 em Patos de Minas, Gustavo é filho de Dário Ferreira Babilônia e Elen Cristina Braga Babilônia, tendo mais duas irmãs, Giovana Braga Babilônia e Giulia Braga Babilônia.

Aos seis anos ingressou-se na Escola Estadual José Marciano Brandão em Monjolinho de Minas, distrito de Lagoa Formosa, e após cursar seu primário em diferentes escolas municipais, algumas delas localizadas na zona rural, retornou no sexto ano do ensino fundamental para a Escola Estadual José Marciano Brandão, de onde saiu no segundo ano do ensino médio para a Escola Estadual Nossa Senhora da Piedade, onde concluiu o ensino médio.

Aos 17 anos iniciou seus estudos em agronomia no Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), iniciando em 2015 e finalizando em 2019. No decorrer de sua graduação foi monitor de Controle de Plantas Daninhas, Fitopatologia Geral e Fitopatologia Aplicada.

Babilônia sempre se destacou na área da fitopatologia onde desenvolveu e publicou vários trabalhos junto ao grupo de estudos NUMIF (núcleo de estudos em microbiologia e fitopatologia). Em 2019 participou do Congresso Brasileiro de Fitopatologia, onde apresentou e publicou dois estudos nos anais do evento.

Em 2020, Babilônia ingressou no programa de mestrado em Produção Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa *Campus* Rio Paranaíba, iniciando seu projeto de pesquisa sob orientação do professor Dr. Everaldo Antônio Lopes, sendo bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Em maio de 2021 abriu mão de sua bolsa na CAPES para iniciar sua carreira profissional como Assistente gerador de demanda híbrido da Bayer Crop Science e Sementes Agroceres, onde atua até o presente momento no distrito de Patos de Minas – MG.

RESUMO

BABILÔNIA, Gustavo Braga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Levantamento populacional do nematoide das galhas em cafeeiros do Cerrado mineiro e diagnose de *Meloidogyne exigua* por meio de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP)**. Orientador: Everaldo Antônio Lopes. Coorientador: Bruno Sérgio Vieira.

O nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) parasita as principais culturas agrícolas, incluindo o cafeeiro. O ataque de nematoide das galhas ao cafeeiro causa prejuízos à cadeia produtiva do café e para o controle eficiente deste fitopatógeno é importante ressaltar algumas medidas, como o levantamento populacional por regiões, afim de evitar a introdução do patógeno na lavoura, e a correta identificação da espécie. Visando tais medidas, abordou-se neste trabalho o levantamento populacional do nematoide das galhas na região produtora de café do Cerrado mineiro, e o estabelecimento de um ensaio para a utilização da amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) a fim de identificar *M. exigua*. No Capítulo 1, abordou-se levantamento populacional do nematoide das galhas no Cerrado mineiro. Após a coleta, as amostras foram identificadas utilizando eletroforese de isoenzimas, reação em cadeia da polimerase, observação dos padrões perineais da fêmea e da morfologia do macho. Após o levantamento, a espécie mais encontrada foi *M. exigua*, seguida de *M. paranaensis* e *M. incognita*. Também foi diagnosticado em uma amostra *M. arenaria*. No Capítulo 2, foi realizada uma revisão sobre a utilização da LAMP na identificação de fitonematoides, discutindo detalhes da técnica e seu potencial para diagnose desses patógenos. No Capítulo 3 estabelecemos um ensaio LAMP para a identificação de *M. exigua*, com primers baseados na região 28S do rDNA do patógeno, sendo monitorada em gel de eletroforese e a olho nu por colorimetria, utilizando o mastermix WarmStart®. A reação proposta foi capaz de amplificar especificamente DNA de *M. exigua*, não amplificando de *M. incognita* e *M. paranaensis*. Além disso, o ensaio LAMP foi altamente sensível, amplificando 0,0026 ng de DNA alvo.

Palavras-chave: Identificação. Isoenzimas. Medidas. Patógeno.

ABSTRACT

BABILÔNIA, Gustavo Braga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2022. **Population survey of root-knot nematode in coffee in the Cerrado of Minas Gerais and diagnosis of *Meloidogyne exigua* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)**. Advisor: Everaldo Antônio Lopes. Co-advisor: Bruno Sérgio Vieira.

The root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) parasitizes the main cultivated crops, including coffee. The attack of the root-knot nematode on coffee plants causes losses to the coffee production chain, and for the efficient control of this plant pathogen it is important to emphasize some measures, such as the population survey by regions in order to avoid the introduction of the pathogen in the crop, and the correct identification of the species. Thus, was approached in this work the population survey of the root-knot nematode in the coffee producing region of the Cerrado Mineiro, and the establishment of an assay using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in order to identify *M. exigua*. In Chapter 1, was addressed the population survey of the root-knot nematode in the Cerrado of Minas Gerais. After collection, samples were identified using isoenzyme electrophoresis, polymerase chain reaction, observation of female perineal patterns and male morphology. After the survey, the most found species was *M. exigua*, followed by *M. paranaensis* and *M. incognita*. *Meloidogyne arenaria* was also diagnosed in a sample. In Chapter 2, a review was carried out on the use of LAMP in the identification of nematodes, discussing details of the technique and its potential for the diagnostics of these pathogens. In Chapter 3, we established a LAMP assay for the identification of *M. exigua*, with primers based on the 28S region of the rDNA of the pathogen, being monitored in gel electrophoresis and with the naked eye by colorimetry, using the WarmStart® mastermix. The proposed reaction was able to specifically amplify DNA only from *M. exigua*, not from *M. incognita* and *M. paranaensis*. Furthermore, the LAMP assay was highly sensitive, amplifying 0.0026 ng of target DNA.

Keywords: Identification. Isoenzymes. Measurements. Pathogen.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 10 |
| REFERÊNCIAS..... | 12 |
| CAPÍTULO I- LEVANTAMENTO POPULACIONAL DO NEMATOIDE DAS GALHAS EM CAFEEIROS DA REGIÃO DO CERRADO DE MINAS GERAIS | 14 |
| RESUMO | 14 |
| ABSTRACT..... | 15 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS | 17 |
| 2.1. Amostragem..... | 17 |
| 2.2. Identificação das populações de nematoide das galhas..... | 17 |
| 3. RESULTADOS..... | 20 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 29 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 31 |
| REFERÊNCIAS..... | 32 |
| CAPÍTULO II- AMPLIFICAÇÃO ISOTERMICA MEDIADA POR LOOP (LAMP) NA IDENTIFICAÇÃO DE FITONEMATOIDES | 36 |
| RESUMO | 36 |
| ABSTRACT..... | 37 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 38 |
| 2. ANTECEDENTES E DESENVOLVIMENTO DA LAMP | 40 |
| 3. ENSAIOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE FITONEMATOIDES | 41 |
| 3.1. Extração de DNA da espécie | 41 |
| 3.2. Desenho dos primers LAMP | 42 |
| 3.3. Otimização da reação | 44 |
| 3.4. Sensibilidade da técnica | 46 |
| 3.5. Monitoramento da amplificação | 47 |
| 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 48 |
| REFERÊNCIAS..... | 50 |
| CAPÍTULO III- DIAGNOSE DE <i>Meloidogyne exigua</i> POR MEIO DA AMPLIFICAÇÃO ISOTERMICA MEDIADA POR LOOP (LAMP | 56 |
| RESUMO | 56 |
| ABSTRACT..... | 57 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 58 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS | 60 |

| | |
|--|----|
| 2.1. Isolamento e manutenção de inóculos | 60 |
| 2.2. Extração de DNA | 60 |
| 2.3. Desenho dos primers | 60 |
| 2.4. Otimização da reação | 60 |
| 2.5. Especificidade da LAMP | 61 |
| 2.6. Sensibilidade do ensaio LAMP | 62 |
| 3. RESULTADOS | 64 |
| 3.1. Otimização da reação | 64 |
| 3.2. Especificidade da LAMP | 65 |
| 3.3. Sensibilidade da LAMP | 66 |
| 4. DISCUSSÃO | 67 |
| 5. CONCLUSÕES | 69 |
| REFERÊNCIAS | 70 |

INTRODUÇÃO GERAL

Os nematoides do gênero *Meloidogyne* spp. são conhecidos popularmente como nematoides das galhas e ocorrem em diversas regiões produtoras de café do Brasil (Salgado *et al.*, 2015). Esses nematoides são endoparasitas sedentários capazes de estabelecer prolongada relação de parasitismo com seus hospedeiros, onde extraem nutrientes para seu desenvolvimento e reprodução (Ali *et al.*, 2017). Em geral, as plantas parasitadas por esses patógenos apresentam deficiências nutricionais e subdesenvolvimento (Lu *et al.*, 2014).

As espécies *Meloidogyne exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* são as mais danosas na cultura do café no Brasil (Oliveira *et al.*, 2011). Em Minas Gerais, a espécie mais predominante de nematoide das galhas é *M. exigua* (Campos & Villain, 2005; Salgado *et al.*, 2015). Embora menos disperso, *M. paranaensis* é capaz de causar danos mais severos e vem sendo encontrado em várias regiões produtoras de café em Minas Gerais desde 2013 (Salgado *et al.*, 2018). *Meloidogyne incognita* foi detectado em 2018 em alguns municípios do sul de Minas Gerais (Santos *et al.*, 2018).

Levantamentos e constatações de espécies de *Meloidogyne* spp. são de grande importância para a cafeicultura. Tais pesquisas permitem que os locais infestados sejam conhecidos e que medidas preventivas de contenção e manutenção das boas condições fitossanitárias sejam intensificadas na região (Salgado *et al.*, 2015). Castro *et al.* (2008) realizaram levantamentos de fitonematoides no sul de Minas Gerais, uma das maiores regiões produtoras do Brasil. Em 2015, um levantamento específico para a ocorrência de *M. paranaensis* e *M. exigua* foi feito também no Sul de Minas (Salgado *et al.*, 2015). Embora a região do Cerrado de Minas Gerais seja uma das principais produtoras de café do Brasil, até o momento nenhum levantamento foi realizado nesta região.

Em conjunto ao levantamento da ocorrência de fitonematoides, a correta diagnose das espécies é extremamente importante no controle e na prevenção da dispersão desses patógenos (Mitkowski & Abawi, 2003). Por muito tempo, a identificação de espécies de *Meloidogyne* foi realizada por meio da observação de padrões perineais em fêmeas. No entanto, algumas espécies possuem padrões semelhantes, o que compromete a acurácia da diagnose (Hartman & Sasser, 1985). Técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase propiciam identificação

acurada. No entanto, essas técnicas necessitam de equipamentos caros e especializados. O método ideal para a identificação de fitonematoides deve ser rápido, sensível, simples e econômico.

Em 2000, uma nova técnica molecular foi desenvolvida no Japão com a possibilidade de identificação molecular acurada, rápida e relativamente barata (Notomi et al., 2000). Trata-se da amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP – *Loop-mediated isothermal amplification*), que permite amplificar regiões genômicas específicas em condições isotérmicas (Niu et al., 2011; Niu et al., 2012). Com isso, equipamentos simples, incluindo banho maria e blocos de aquecimento, podem ser usados. Além disso, a amplificação pode ser detectada a olho nu, com uso de indicadores de metal, ligantes de DNA que emitem fluorescência e alteração do pH (Notomi et al., 2000; Zhang et al., 2014). Embora vários protocolos LAMP já tenham sido estabelecidos para fitonematoides, inclusive para *M. incognita* (Niu et al., 2011), nenhum protocolo foi desenvolvido para a identificação de *M. exigua* e *M. paranaensis* até o momento. Neste sentido, o desenvolvimento de protocolos LAMP para a identificação de *M. exigua* e *M. paranaensis* é importante para a cafeicultura brasileira e mundial, assim como o levantamento das espécies *M. incognita*, *M. exigua* e *M. paranaensis* na região produtora de café do Cerrado de Minas Gerais.

A principal hipótese deste trabalho é que o LAMP pode ser utilizado no diagnóstico acurado de espécies de *Meloidogyne* que parasitam o cafeeiro. Este trabalho foi dividido em três capítulos. No primeiro foi realizado o levantamento das espécies *M. incognita*, *M. exigua* e *M. paranaensis* em 16 municípios localizados na região do Cerrado de Minas Gerais. No segundo foi realizada uma revisão sobre a utilização da amplificação isotérmica mediada por loop na identificação de fitonematoides. No terceiro foi desenvolvido um protocolo LAMP para a identificação de *M. exigua*.

REFERÊNCIAS

- Ali, M.A., Azeem, F., Li, H., Bohlmann, H., 2017. Smart parasitic nematodes use multifaceted strategies to parasitize plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1699.
- Campos, V.P., Villain, L. Nematodes parasites of coffee and cocoa. In: LUC, M., SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Ed.). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford: CAB International, 2005. p. 529-579.
- Castro, J.M.C., Campos, V.P., Pozza, E.A., Naves, R.L., Andrade Júnior, W.C., Dutra, M.R., Coimbra, J.R., Maximiniano, C., Silva, J.R.C., 2008. Levantamento de fitonematoides em cafezais do Sul de Minas Gerais. *Nematologia Brasileira*, 32, 56-64.
- Hartman, R.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. *An advanced treatise on Meloidogyne*. Vol. 2. Methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 69-77.
- Lu, P., Davis, R.F., Kemerait, R.C., van Iersel, M.W., Scherm, H., 2014. Physiological effects of *Meloidogyne incognita* infection on cotton genotypes with differing levels of resistance in the greenhouse. *Journal of Nematology*, 46, 352-359.
- Mitkowski, N.A., Abawi, G.S. Nematóides de galhas. (Portuguese translation by E.A, Lopes, R. Dallemole-Giaretta and B.S. Vieira, 2011). *The Plant Health Instructor*, 2003. Disponível em: <DOI:10.1094/PHI-I-2011-03-29-01>. Acesso em 15 mai 2020.
- Niu, J.H., Guo, Q.X., Jian, H., Chen, C.L., Yang, D., Lin, Q., Guo, Y.D., 2011. Rapid detection of *Meloidogyne* spp. by LAMP assay in soil and roots. *Crop Protection*, 30, 1063-1069.

Niu, J.H., Jian, H., Guo, Q.X., Chen, C.L., Wang, X.Y.; Lin, Q., Guo, Y.D., 2012. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays based on 5S rDNA-IGS2 regions for detecting *Meloidogyne enterolobii*. *Plant Pathology*, 61, 809-819.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28, e63.

Oliveira, D.S., Oliveira, R. D. L., Silva, D. G., Silva, R. V., 2011. Characterization of *Meloidogyne incognita* populations from São Paulo and Minas Gerais state and their pathogenicity on coffee plants. *Tropical Plant Pathology*, 36, 190-194.

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., Terra, W.C., Fatobene, B.J.R., Bento, A.T., Pinheiro, I.C.L., Matos, C.S.M., 2018. Detecção de *Meloidogyne paranaensis* em Carmo da Cachoeira, região Sul de Minas Gerais. Circular Técnica, EPAMIG 269. Belo Horizonte, MG, Brazil, EPAMIG.

Santos, M.F.A., Salgado, S.M.L, Silva, J.G.P., Correa, V.R., Mendonça, J.S.F., Carneiro, R.M.D.G., 2018. *Meloidogyne incognita* parasitizing coffee plants in Southern Minas Gerais, Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 43, 95–98.

Zhang, X., Lowe, S.B., Gooding, J.J., 2014. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosensors and Bioelectronics*, 61, 491-499.

CAPÍTULO I

Levantamento populacional do nematoide das galhas em cafeeiros da região do Cerrado de Minas Gerais

RESUMO

A produção de café pode ser comprometida devido à ocorrência de eventos bióticos e abióticos. Dentre os principais fatores bióticos limitantes da cafeicultura tropical, destaca-se o parasitismo de fitonematoides do gênero *Meloidogyne*. Levantamentos de fitonematoides foram realizados em cafezais em algumas regiões de Minas Gerais, mas nenhum ainda foi realizado no Cerrado, uma das principais produtoras de café do estado. Dessa forma, um levantamento da dispersão de *Meloidogyne* spp. foi realizado com base nos padrões perineais das fêmeas, morfologia dos machos, fenótipos de esterase e marcadores SCAR de amostras coletadas em 16 municípios, *M. exigua* foi detectada em 83,8% das áreas; *M. paranaensis* em 19%, *M. incognita* em 4,9%, e *M. arenaria* 0,7%. Algumas destas áreas eram compostas de populações mistas de *M. paranaensis* + *M. incognita*, *M. exigua* + *M. paranaensis*, *M. exigua* + *M. incognita* e *M. arenaria* + *M. paranaensis* + *M. exigua*. Técnicas para que estas populações de nematoides não se espalhem para áreas vizinhas são recomendadas, em especial em locais infestados com *M. paranaensis* e *M. incognita*, espécies agressivas ao cafeeiro e com potencial de causar sérios prejuízos aos produtores.

Palavras-chaves: Café, *Coffea arabica*, Diagnose, *Meloidogyne*.

Population survey of root-knot nematodes in coffee in the Cerrado of Minas Gerais

ABSTRACT

Coffee production can be compromised due to the occurrence of abiotic and biotic events. Among the main limiting biotic factors of tropical coffee production, the parasitism of plant-parasitic nematodes of the genus *Meloidogyne* stands out. Surveys of plant-parasitic nematodes have been carried out in coffee plantations in some regions of Minas Gerais, but none have yet been carried out in the Cerrado, one of the main coffee producers in the state. Thus, a survey of the dispersion of *Meloidogyne* spp. was carried out based on the female perineal patterns, male morphology, esterase phenotypes and SCAR markers from samples collected in 16 municipalities, *M. exigua* was detected in 83.8% of the areas; *M. paranaensis* in 19%, *M. incognita* in 4.9%, and *M. arenaria* 0,7%. Some of these areas were composed of mixed populations of *M. paranaensis* + *M. incognita*, *M. exigua* + *M. paranaensis*, *M. exigua* + *M. incognita*, and *M. arenaria* + *M. paranaensis* + *M. exigua*. Techniques to prevent spreading these nematodes to neighboring areas are recommended, especially in places infested with *M. paranaensis* and *M. incognita*, species that are aggressive to coffee plants and have the potential to cause serious losses to producers.

Key words: *Coffea arabica*, Diagnosis, *Meloidogyne*.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de café, com a estimativa para até 55,7 milhões de sacas a serem produzidas em 2022 (CONAB, 2022). A cultura chegou ao país em 1727 trazido da Guiana Francesa para Belém, tendo seu plantio se desenvolvido no interior de São Paulo e Rio de Janeiro (DIAS & SILVA, 2015). Minas Gerais é o maior produtor brasileiro, sendo responsável por aproximadamente a metade da produção nacional em 2020 (CONAB, 2022).

Inúmeros fatores podem limitar a produção de café. Os nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.) figuram entre os principais agentes bióticos que reduzem ou impossibilitam a produção de café em condições tropicais (Campos & Villain, 2005; Goulart *et al.*, 2019). Esses nematoides formam um conjunto de células gigantes no hospedeiro e tais locais passam a ser drenos metabólicos para a planta, resultando em sintomas de deficiência nutricional e limitação do crescimento (Abad & Williamson, 2010; Babilônia & Mendes, 2020). As espécies *Meloidogyne exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* são as principais espécies associadas a danos ao cafeeiro no Brasil (Oliveira *et al.*, 2011). Em Minas Gerais, a maior prevalência é de *M. exigua* (Campos & Villain, 2005; Salgado *et al.*, 2015). No entanto, os maiores danos às plantas têm sido observados em áreas infestadas com *M. paranaensis* e *M. incognita* (Salgado *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018).

Meloidogyne exigua tem ampla dispersão em Minas Gerais e em outras regiões produtoras (Gonçalves & Silvarolla, 2007). Este patógeno induz a formação de galhas e raramente desorganiza o tecido cortical (Muniz *et al.*, 2008). Barbosa *et al.* (2004) relataram perdas de até 13% na produção no estado do Rio de Janeiro, com níveis de *M. exigua* entre 10 e 15 J₂ / 100 cm³ de solo. Embora menos frequente em Minas Gerais, *M. paranaensis* pode causar efeitos mais severos, incluindo manchas necróticas e rachaduras nas raízes em conjunto com as galhas, resultando em declínio geral da planta e culminando com a sua morte (Ferraz, 2008). A espécie *M. incognita* na cultura do café também apresenta sintomas mais severos que *M. exigua*, como engrossamento nas raízes mais velhas, rachaduras, fendilhamentos e escamações, com descolamento dos tecidos corticais (Vieira Junior & Fernandes, 2015; Zambolim, 2016; Ventura *et al.*, 2017; Lima, *et al.*, 2019).

O manejo de fitonematoides depende da identificação acurada das espécies que ocorrem na área de cultivo. Com essa informação, é possível decidir a estratégia de manejo visando à redução das populações que ocorrem no local e adotar medidas de prevenção de espécies potencialmente danosas. Levantamentos de infestações de *Meloidogyne* spp. já foram realizados na região produtora de café no sul de Minas Gerais (Castro *et al.*, 2008; Salgado *et al.*, 2015). Entretanto, nenhum levantamento ainda foi realizado na região do Cerrado de Minas Gerais. Dessa forma, o objetivou-se com este trabalho realizar o levantamento do nematoide das galhas em 16 municípios produtores de café localizados na região do Cerrado de Minas Gerais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem

As amostras de *Meloidogyne* foram coletadas em áreas com histórico de ocorrência recente do patógeno em 16 municípios produtores de café da região do Cerrado mineiro (Tabela 1). Os locais de coleta foram georreferenciados com auxílio de receptor GPS (Garmin, modelo Etrex H). O número de amostras por município foi calculado segundo Salgado *et al.* (2015) (Tabela 1).

Em cada propriedade, amostras simples de raízes (10 g) foram coletadas na projeção da copa de 10 plantas, para formar amostras compostas de 50 g de raízes. As raízes foram acondicionadas em sacos de papel. Caixas de isopor foram utilizadas para acondicionamento e transporte das amostras ao Laboratório de Nematologia do Instituto Biológico em Campinas (SP) e para o Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa Campus Rio Paranaíba.

2.2. Identificação das populações de nematoide das galhas

Fêmeas de *Meloidogyne* foram usadas para identificação por meio de análises de padrões perineais, eletroforese de isoenzimas (Esbenshade & Triantaphyllou, 1990; Carneiro & Almeida, 2001) e reação em cadeia da polimerase (PCR - Randing *et al.*, 2004). Análise da região de machos também foi utilizada em algumas populações (Cunha *et al.*, 2018). As populações coletadas foram mantidas em casa de vegetação para eventuais estudos posteriores.

Tabela 1. Número de amostras de amostras do nematoide das galhas em cafeeiros em municípios do Cerrado de Minas Gerais.

| Município | Nº de amostras necessárias* | Nº de amostras coletadas |
|---------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| Araguari | 8 | 9 |
| Arapuá | 1 | 5 |
| Araxá | 3 | 3 |
| Campos Altos | 2 | 4 |
| Carmo do Paranaíba | 4 | 24 |
| Estrela do Sul | 1 | 1 |
| Indianópolis | 2 | 2 |
| Lagos Formosa | 2 | 2 |
| Monte Carmelo | 4 | 10 |
| Patos de Minas | 3 | 3 |
| Patrocínio | 13 | 24 |
| Rio Paranaíba | 5 | 23 |
| Santa Rosa da Serra | 2 | 3 |
| São Gotardo | 1 | 9 |
| Serra do Salitre | 5 | 17 |
| Tiros | 1 | 1 |

*Segundo Salgado *et al.* (2015).

Para identificação por eletroforese de isoenzimas, dez fêmeas adultas do nematoide de galhas foram excisadas de raízes com auxílio de estilete de ponta fina e estereomicroscópio. As fêmeas foram transferidas para tubos contendo de 3 a 5 mL do tampão de extração (Carneiro & Almeida, 2001), maceradas com pistilo e aplicadas em cavidade formadas no gel de poliacrilamida. Cultura pura de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood foi utilizada como padrão de referência comparativa entre os fenótipos encontrados no campo. O extrato enzimático dessas amostras foi aplicado em duas cavidades de cada gel. A identificação dos fenótipos foi realizada por meio do cálculo da mobilidade relativa (Rm) de cada banda polimórfica comparada ao padrão.

Para extração de DNA, foi usado o protocolo de Lopes et al. (2018), com modificações. Quinze juvenis de segundo estágio ou fêmeas foram transferidos individualmente para um microtubo com 15 µl de água livre de nuclease, 3 µl de 5X tampão GoTaq® Flexi PCR (Promega, USA) e cinco esferas de vidro de 1-mm de diâmetro (Thistle Scientific, UK). Nematoides foram triturados em amalgamador (Dentomat®, Model 600 BR, Degussa, Germany) por 30 segundos a 50/60 Hz. Dois microlitros de proteinase K (100 mg ml⁻¹) foram adicionados em cada microtubo, seguido de incubação por 60 min a 60 °C, 15 min a 95 °C e 2 min a 15 °C. DNA foi armazenado a -20 °C até o uso.

A amplificação dos fragmentos de DNA foi feita em termociclador (Veriti®, Applied Biosystems, USA) em um volume final de 15 µl e usando 3,0 µl 5X GoTaq® G2 PCR buffer (Promega), 0,47 µl de cada dNTP a 2 mM (Promega), 0,6 µl de cada primer a 10 µM, 0,06 µl de GoTaq® G2 (Promega), 2 µl de DNA e 8,33 µl de água livre de nuclease. Todas as amplificações incluíram controles positivos e negativos (sem DNA de nematoides). Os primers utilizados para identificação de *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Conjunto de primers usados para identificação de espécies de *Meloidogyne exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* em cafeeiro. Adaptado de Randig et al. (2004).

| Código | Sequência do primer 5' – 3' | Especificidade e tamanho do fragmento amplificado |
|---------------|------------------------------------|--|
| ex-D15-F | CATCCGTGCTGTAGCTGCGAG | <i>M. exigua</i> – 562 pb |
| ex-D15-R | CTCCGTGGGAAGAAAGACTG | |
| inc-K14-F | GGGATGTGTAATGCTCCTG | <i>M. incognita</i> – 399 pb |
| inc-K14-R | CCCGCTACACCCTCAACTTC | |
| par-C09-F | GCCCGACTCCATTTGACGGA | <i>M. paranaensis</i> – 208 pb |
| par-C09-R | CCGTCCAGATCCATCGAAGTC | |

O DNA foi desnaturado por 10 min a 94 °C; seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 64 °C por 45 segundos, 72 °C por 60 segundos; incluindo um período final de extensão de 72 °C por 8 minutos. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em tampão TBE 1 X a 75 V usando gel de agarose corado

com 0,7 µl SYBR Safe® (10.000 x, Invitrogen, Carlsbad, USA). Foram utilizados Marcadores moleculares 100 Base-Pair Ladder® (Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, USA) para comparação dos produtos da amplificação. O gel foi visualizado em transiluminador de luz UV (Waltec, Model MD-20, 312mm) e fotografado.

3. RESULTADOS

A espécie de maior ocorrência nos municípios do Cerrado mineiro foi *M. exigua*, sendo encontrada em 83,8% das áreas amostradas, seguido por *M. paranaensis* que foi diagnosticado em 19% das áreas e *M. incognita* que esteve presente em apenas 4,9% dos locais (Tabela 3). Dentre as sete amostras diagnosticadas com *M. incognita*, seis foram compostas por populações mistas. Dos municípios incluídos, em exceção Araxá, Santa Rosa da Serra e Tiros, todos os outros apresentaram pelo menos uma área diagnosticada com *M. paranaensis*, com maior frequência em Monte Carmelo, Araguari, Patrocínio e Serra do Salitre (Tabela 3).

Algumas áreas amostradas foram diagnosticadas com populações mistas, como foi o caso das amostras de número 117, no município de São Gotardo; 125, 126 e 127, no município de Serra do Salitre que foram encontradas populações mistas de *M. paranaensis* e *M. incognita*. Populações mistas também foram encontradas das espécies *M. exigua* e *M. paranaensis* nas amostras de número 38, do município de Carmo do Paranaíba; 46, de Estrela do Sul, 50, de Lagoa Formosa, e 99, de Rio Paranaíba. Para *M. exigua* e *M. incognita*, duas amostras foram encontradas com populações mistas, sendo respectivamente as amostras de número 7, em Araguari ; e 15, em Araxá. Ainda foi encontrada uma população mista de *M. arenaria*, *M. paranaensis* e *M. exigua*, em Patos de Minas (Tabela 3).

Usando o conceito de taxonomia integrativa, várias técnicas foram adotadas para identificação das espécies de *Meloidogyne*, incluindo eletroforese de isoenzimas (Figura 1), análise do padrão perineal de fêmeas (Figura 2), reação em cadeia da polimerase com primers específicos (Figura 3) e morfologia da região labial de machos (Cunha et al., 2018). Em alguns casos, as amostras não foram possíveis de serem identificadas por eletroforese de isoenzimas devido ao estado do material coletado, com poucas fêmeas e, ou com o material ressecado. Nesses casos, a identificação foi feita por PCR com primers específicos ou análise morfológica dos machos.

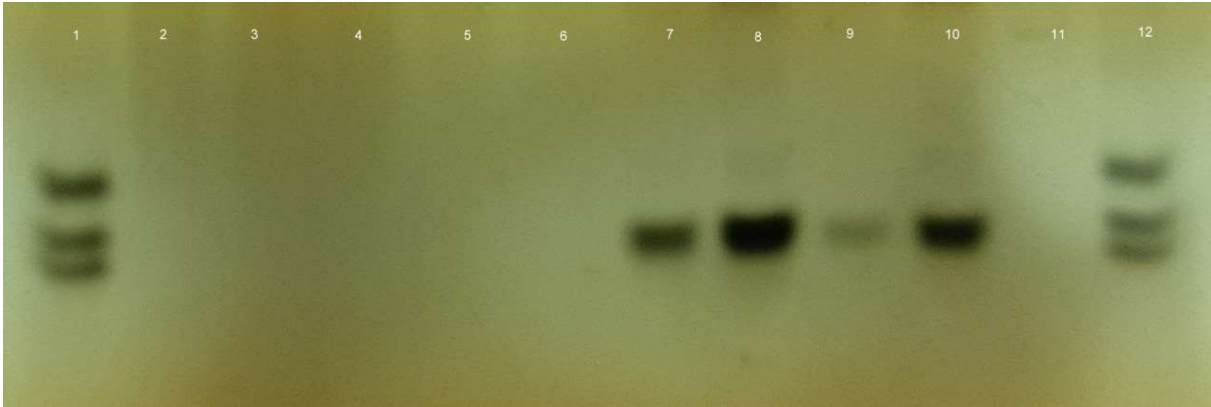


Figura 1 – Fenótipos de esterase de populações de *Meloidogyne* spp. coletadas em áreas de cultivo de café em diferentes municípios do estado de Minas Gerais. Amostras 2, 3, 4, 5, 6 e 11 = sem resposta. Amostras 7, 8 e 10 = *M. paranaensis*. R.m.= razão de migração em relação da banda mais lenta (R.m= 1,0) de *M. javanica*.

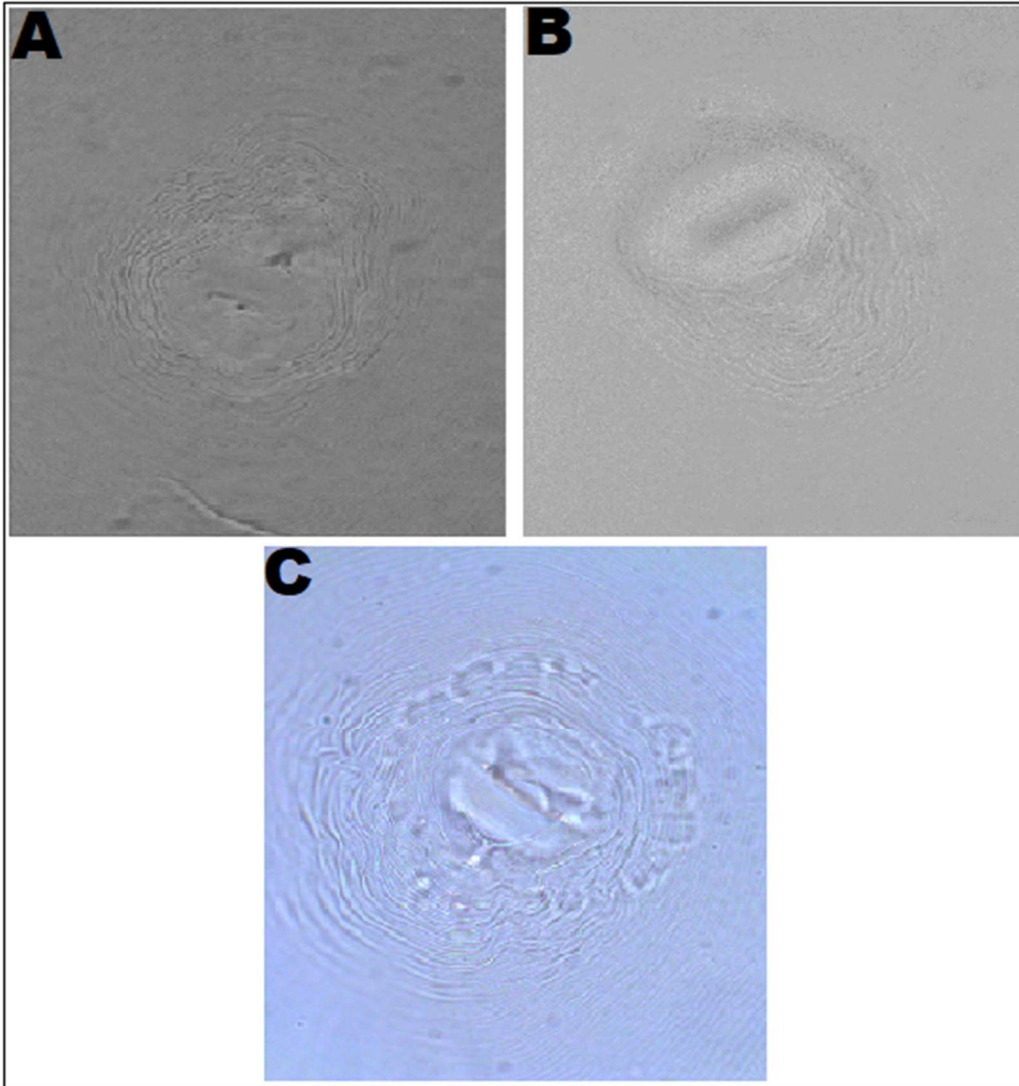


Figura 2 – Padrões perineais de espécies de *Meloidogyne* spp. em áreas de cultivo de café em diferentes municípios do Cerrado de Minas Gerais. A) *M. incognita*, B) *M. paranaensis*, C) *M. arenaria*.

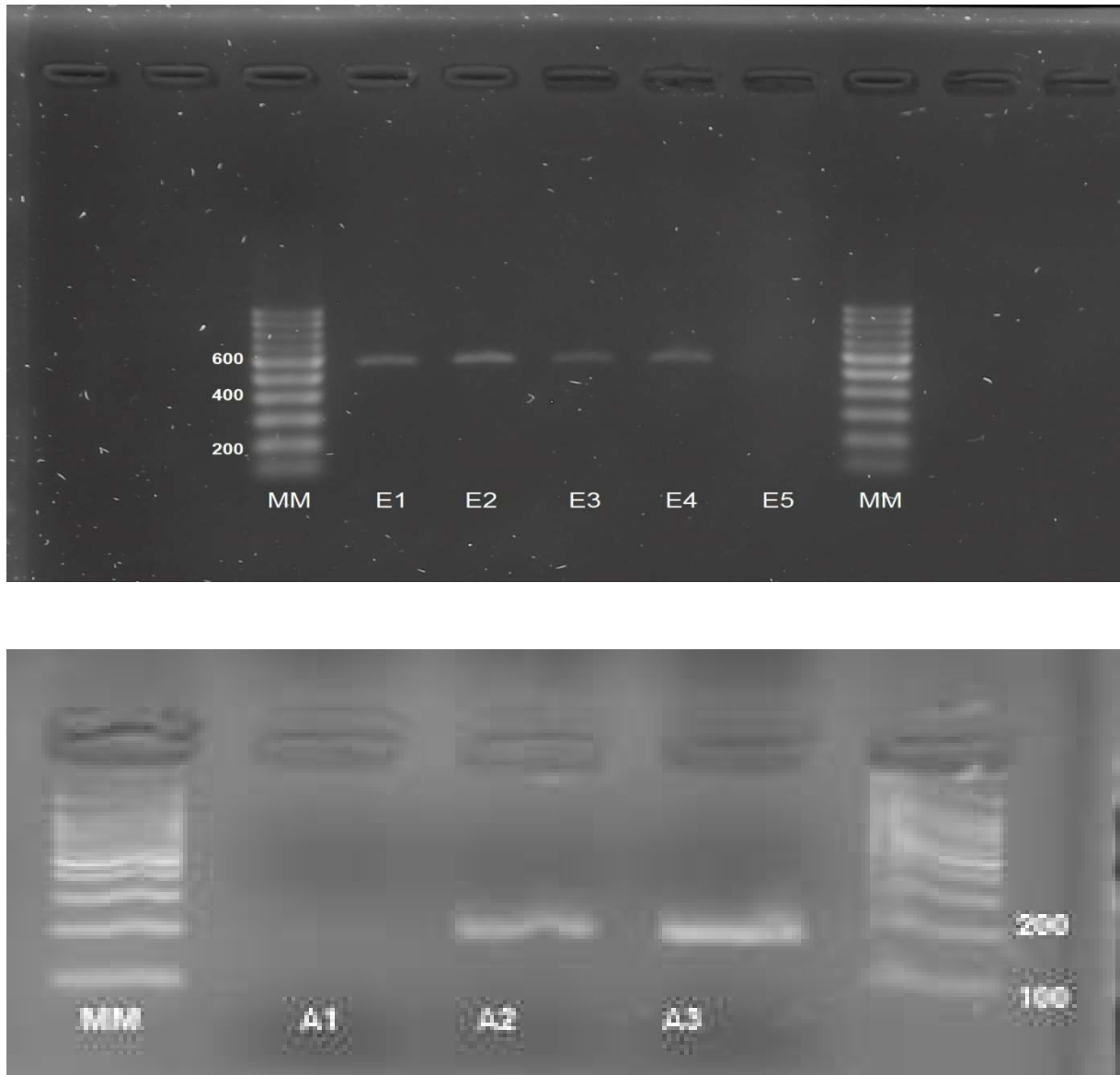


Figura 3 – Gel de agarose feito a partir de produtos de amplificação de reação em cadeia da polimerase (PCR) com primers específicos para *Meloidogyne exigua* (Imagem superior, primers ex-D15-F/ex-D15-R, produto de 592 pares de bases) e *Meloidogyne paranaensis* (Imagem inferior, primers par-C08-F/par-C08-R, produto de 208 pares de bases). (pb). E1: controle positivo, contendo DNA de *M. exigua*; E2-E4: amostras de campo; E5: controle negativo, sem DNA de nematoides. A1: controle negativo, sem DNA de nematoides. A2: controle positivo, contendo DNA de *M. paranaensis*. A3: amostra de campo. MM: marcador molecular de 100 pb.

Tabela 3. Espécies de *Meloidogyne* encontradas em amostras coletadas em municípios localizados na região do Cerrado mineiro.

| Amostra | Município | Espécie de <i>Meloidogyne</i> spp. |
|----------------|--------------------|---|
| 1 | Araguari | <i>M. paranaensis</i> ^{ab} |
| 2 | Araguari | <i>M. incognita</i> ^a |
| 3 | Araguari | <i>M. paranaensis</i> ^d |
| 4 | Araguari | <i>M. paranaensis</i> ^d |
| 5 | Araguari | <i>M. paranaensis</i> ^d |
| 6 | Araguari | <i>M. exigua</i> ^d |
| 7 | Araguari | <i>M. exigua</i> ^d , <i>M. incognita</i> ^d |
| 8 | Araguari | <i>M. exigua</i> ^d |
| 9 | Araguari | <i>M. exigua</i> ^d |
| 10 | Arapuá | <i>M. exigua</i> ^d |
| 11 | Arapuá | <i>M. exigua</i> ^d |
| 12 | Arapuá | <i>M. exigua</i> ^d |
| 13 | Arapuá | <i>M. exigua</i> ^d |
| 14 | Arapuá | <i>M. exigua</i> ^d |
| 15 | Araxá | <i>M. exigua</i> ^{ab} , <i>M. incognita</i> ^a |
| 16 | Araxá | <i>M. exigua</i> ^c |
| 17 | Araxá | <i>M. exigua</i> ^{abc} |
| 18 | Campos Altos | <i>M. exigua</i> ^d |
| 19 | Campos Altos | <i>M. exigua</i> ^d |
| 20 | Campos Altos | <i>M. exigua</i> ^d |
| 21 | Campos Altos | <i>M. paranaensis</i> ^d |
| 22 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 23 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 24 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 25 | Carmo do Paranaíba | <i>M. paranaensis</i> ^d |
| 26 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 27 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 28 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 29 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |

Continua...

Tabela 3 - Continuação. Espécies de *Meloidogyne* encontradas em amostras coletadas em municípios localizados na região do Cerrado mineiro.

| Amostra | Município | Espécie de <i>Meloidogyne</i> spp. |
|----------------|--------------------|---|
| 30 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 31 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 32 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 33 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 34 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 35 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 36 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 37 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> |
| 38 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d , <i>M. paranaensis</i> ^d |
| 39 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 40 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 41 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 42 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 43 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 44 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 45 | Carmo do Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 46 | Estrela do Sul | <i>M. exigua</i> ^{ab} , <i>M. paranaensis</i> ^b |
| 47 | Indianópolis | <i>M. paranaensis</i> ^d |
| 48 | Indianópolis | <i>M. paranaensis</i> ^d |
| 49 | Lagoa Formosa | <i>M. exigua</i> ^{abc} |
| 50 | Lagoa Formosa | <i>M. exigua</i> ^{ac} , <i>M. paranaensis</i> ^a |
| 51 | Monte Carmelo | <i>M. exigua</i> ^d |
| 52 | Monte Carmelo | <i>M. exigua</i> ^d |
| 53 | Monte Carmelo | <i>M. exigua</i> ^d |
| 54 | Monte Carmelo | <i>M. exigua</i> ^d |
| 55 | Monte Carmelo | <i>M. exigua</i> ^d |
| 56 | Monte Carmelo | <i>M. exigua</i> ^d |
| 57 | Monte Carmelo | <i>M. paranaensis</i> ^d |
| 58 | Monte Carmelo | <i>M. paranaensis</i> ^d |

Continua...

Tabela 3 - Continuação. Espécies de *Meloidogyne* encontradas em amostras coletadas em municípios localizados na região do Cerrado mineiro.

| Amostra | Município | Espécie de <i>Meloidogyne</i> spp. |
|----------------|------------------|---|
| 59 | Monte Carmelo | <i>M. paranaensis</i> ^d |
| 60 | Monte Carmelo | <i>M. paranaensis</i> ^d |
| 61 | Patos de Minas | <i>M. arenaria</i> ^{ab} , <i>M. paranaensis</i> ^b , <i>M. exigua</i> ^c |
| 62 | Patos de Minas | <i>M. exigua</i> ^{abc} |
| 63 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^c |
| 64 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 65 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 66 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 67 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 68 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 69 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 70 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 71 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 72 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 73 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 74 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 75 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 76 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 77 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 78 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 79 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 80 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 81 | Patrocínio | <i>M. paranaensis</i> ^d |
| 82 | Patrocínio | <i>M. paranaensis</i> ^d |
| 83 | Patrocínio | <i>M. paranaensis</i> ^d |
| 84 | Patrocínio | <i>M. paranaensis</i> ^d |
| 85 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 86 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |

Continua...

Tabela 3 - Continuação. Espécies de *Meloidogyne* encontradas em amostras coletadas em municípios localizados na região do Cerrado mineiro.

| Amostra | Município | Espécie de <i>Meloidogyne</i> spp. |
|----------------|---------------------|--|
| 87 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 88 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 89 | Patrocínio | <i>M. exigua</i> ^d |
| 90 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 91 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 92 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 93 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 94 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 95 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 96 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 97 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 98 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 99 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d , <i>M. paranaensis</i> ^d |
| 100 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 101 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 102 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 103 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 104 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 105 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 106 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 107 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 108 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 109 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 110 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 111 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 112 | Rio Paranaíba | <i>M. exigua</i> ^d |
| 113 | Santa Rosa da Serra | <i>M. exigua</i> ^d |
| 114 | Santa Rosa da Serra | <i>M. exigua</i> ^d |
| 115 | Santa Rosa da Serra | <i>M. exigua</i> ^d |

Continua...

Tabela 3 - Continuação. Espécies de *Meloidogyne* encontradas em amostras coletadas em municípios localizados na região do Cerrado mineiro.

| Amostra | Município | Espécie de <i>Meloidogyne</i> spp. |
|----------------|------------------|--|
| 116 | São Gotardo | <i>M. paranaensis</i> ^a |
| 117 | São Gotardo | <i>M. paranaensis</i> ^a , <i>M. incognita</i> ^a |
| 118 | São Gotardo | <i>M. exigua</i> ^{ad} |
| 119 | São Gotardo | <i>M. exigua</i> ^d |
| 120 | São Gotardo | <i>M. exigua</i> ^d |
| 121 | São Gotardo | <i>M. exigua</i> ^d |
| 122 | São Gotardo | <i>M. exigua</i> ^d |
| 123 | São Gotardo | <i>M. exigua</i> ^d |
| 124 | São Gotardo | <i>M. exigua</i> ^d |
| 125 | Serra do Salitre | <i>M. paranaensis</i> ^{ac} , <i>M. incognita</i> ^c |
| 126 | Serra do Salitre | <i>M. paranaensis</i> ^{ac} , <i>M. incognita</i> ^c |
| 127 | Serra do Salitre | <i>M. paranaensis</i> ^a , <i>M. incognita</i> ^{ac} |
| 128 | Serra do Salitre | <i>M. paranaensis</i> ^d |
| 129 | Serra do Salitre | <i>M. exigua</i> ^d |
| 130 | Serra do Salitre | <i>M. exigua</i> ^d |
| 131 | Serra do Salitre | <i>M. exigua</i> ^d |
| 132 | Serra do Salitre | <i>M. exigua</i> ^d |
| 133 | Serra do Salitre | <i>M. exigua</i> ^d |
| 134 | Serra do Salitre | <i>M. exigua</i> ^d |
| 135 | Serra do Salitre | <i>M. exigua</i> ^d |
| 136 | Serra do Salitre | <i>M. exigua</i> ^d |
| 137 | Serra do Salitre | <i>M. exigua</i> ^d |
| 138 | Serra do Salitre | <i>M. exigua</i> ^d |
| 139 | Serra do Salitre | <i>M. exigua</i> ^d |
| 140 | Serra do Salitre | <i>M. exigua</i> ^d |
| 141 | Serra do Salitre | <i>M. exigua</i> ^d |
| 142 | Tiros | <i>M. exigua</i> ^{abc} |

^a Identificação de acordo com o padrão perineal da fêmea; ^b Identificação de acordo com a morfologia do macho; ^c Identificação por eletroforese de isoenzimas; ^d Identificação molecular utilizando a reação em cadeia da polimerase.

4. DISCUSSÃO

Meloidogyne exigua foi a espécie com maior prevalência em cafezais do Cerrado mineiro. Estes resultados corroboram parcialmente com os obtidos por Santos *et al.* (2018b) que também encontrou *M. exigua* com maior amplitude de distribuição, entretanto, foram encontradas maiores incidências de *M. incognita* em seu levantamento do que de *M. paranaensis*. Ainda no Sul de Minas Gerais, a espécie prevalente também é *M. exigua*, com presença em 24,2% das amostras e 95,1% dos municípios amostrados por Castro *et al.* (2008), que realizou levantamento e amostragem em áreas independentes de sintomas de parasitismo de *Meloidogyne* spp., diferente deste estudo que se limitou a amostragem em áreas com sintomas de parasitismo.

Meloidogyne paranaensis é um nematoide agressivo ao cafeeiro e o fato de que 19% das áreas amostradas no Cerrado mineiro estarem infestadas com essa espécie é preocupante. No Brasil, a instalação de lavouras de café arábica em áreas de infestação de *M. paranaensis* é classificado como atividade de alto risco, visto que os danos provocados pela espécie são severos. Perdas significativas causadas por esse nematoide já ocorreram em lavouras no Paraná nos anos 1960, 1970 e 1980 (Ferraz & Brown, 2016). Os danos às plantas ocorrem devido à destruição do sistema radicular do cafeeiro, alta persistência do patógeno no solo e a ampla gama de hospedeiros que tornam o controle mais complicado (Santos *et al.*, 2018a).

Meloidogyne exigua pode causar reduções de até 45% na produtividade do cafeeiro (Barbosa *et al.*, 2004), embora as plantas infectadas consigam sobreviver e apresentar leve a moderado aspecto de depauperamento, a depender da idade da planta e da densidade de inóculo no solo. No entanto, plantas atacadas por *M. paranaensis* podem definhir e morrer muito rapidamente. Isso torna essa espécie uma ameaça à produção de café em áreas infestadas.

Raízes de plantas de café infectadas por *M. paranaensis* e *M. incognita* não costumam apresentar galhas bem definidas em plantas adultas assim como *M. exigua*. O que são comumente observados em plantas infectadas por essas espécies são raízes com descamações, rachaduras, pontos necróticos e aspecto de cortiça (Salgado *et al.*, 2011). Por isso, a taxonomia integrativa é uma abordagem interessante para diagnose, pois espécies distintas podem induzir sintomas similares

no hospedeiro e quanto mais ferramentas usadas na identificação maior a acurácia e a chance de detecção de populações mistas.

Dentre as três espécies, *M. incognita* foi a menos prevalente em cafezais do Cerrado mineiro. Estes resultados diferem dos obtidos por Santos *et al.* (2018b), encontrados no sul de Minas Gerais, visto que obtiveram menor frequência de *M. paranaensis*. Isto pode indicar não apenas que a dispersão de *M. paranaensis* tem aumentado cada vez mais, mas que algo dificulta o aumento em mesma proporção nas populações de *M. incognita*, visto que os dados indicam um aumento maior na frequência das outras duas espécies. Apesar de serem distintas as regiões de Minas Gerais onde foram realizados o presente estudo e o de Santos *et al.* (2018b), este é um ponto importante a ser averiguado em estudos futuros, visto que as primeiras ocorrências de *M. paranaensis* foram no sul de Minas Gerais, se disseminando então em seguida para a região do Cerrado.

Uma baixa variabilidade genética foi observada em isolados de *M. incognita* ao serem estudados por Santos *et al.* (2012). Considerando esta hipótese, a probabilidade de populações diferentes de *M. incognita* não conseguirem parasitar lavouras cafeeiras na mesma intensidade que *M. exigua* e *M. paranaensis*, também deveria ser baixa. Em um estudo anterior, Oliveira *et al.* (2011) relataram que uma população de *M. incognita* foi incapaz de infectar plantas de café com suscetibilidade ao patógeno. Dessa forma, mais estudos são necessários com diferentes populações e raças de *M. incognita* relacionados à sua variabilidade genética e capacidade de infecção ao café suscetível.

A presença de *M. arenaria* não é algo comum em lavouras cafeeiras, não apenas em Minas Gerais, mas também no restante do mundo. O primeiro relato desta espécie de nematoide das galhas parasitando o cafeeiro foi feito por Villain *et al.* (2013) na Guatemala. Os sintomas observados por Villain *et al.* (2013) foram considerados severos, incluindo total inchaço radicular e indução de formação de raízes adventícias. Como a área no presente estudo diagnosticada com *M. arenaria* é também uma área de populações mistas, é impossível descrever e afirmar que os sintomas observados na lavoura são atribuídos a *M. arenaria*, sendo necessários novos estudos da importância desta espécie para a cultura do café.

Em comparação a levantamentos em outras regiões cafeeicultoras, é possível perceber aumento na disseminação do nematoide das galhas no cafeeiro,

especialmente para as espécies *M. exigua* e *M. paranaensis*. Mais estudos semelhantes em diferentes regiões são importantes, não apenas para o simples conhecimento do avanço das espécies por regiões cafeeiras, mas também para que os devidos cuidados sejam tomados, de maneira a evitar os impactos causados por tais patógenos.

5. CONCLUSÕES

As espécies encontradas em áreas de café do Cerrado mineiro foram *Meloidogyne exigua*, *M. paranaensis*, *M. incognita* e *M. arenaria*, com predominância das três primeiras. A espécie *M. exigua* é a mais comum nas áreas amostradas, ocorrendo em populações isoladas ou mistas com *M. incognita* e *M. paranaensis*.

Meloidogyne paranaensis foi encontrado em 13 dos 16 municípios deste levantamento. *Meloidogyne incognita* teve menor prevalência que *M. paranaensis*, sendo encontrado com frequência em populações mistas.

Meloidogyne arenaria foi encontrado em uma amostra coletada em Patos de Minas, em população mista com *M. exigua* e *M. paranaensis*.

REFERÊNCIAS

- Abad, P., Williamson, V.M., 2010. Plant nematode interaction: a sophisticated dialogue. In: KADER, J. C., DELSENY, M. *Advances in Botanical Research*. Philadelphia, PA: Elsevier, 53, 147-192.
- Babilônia, G.B., Mendes, L.S., 2020. Sensibilidade de plantas de cobertura ao nematoide das galhas (*Meloidogyne incognita* e *M. javanica*). *Perquirere*, 17, 9-18.
- 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.
- Boneti, J.I.S., Ferraz, S., 1981. Modificação do método de Hussey e Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* no cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6, 553.
- Jenkins, W.R., 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant disease reporter*, 48, 692.
- Campos, V.P., Villain, L. Nematodes parasites of coffee and cocoa. In: LUC, M., SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Ed.). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford: CAB International, 2005. p. 529-579.
- 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 espécies. *Nematologia Brasileira*, 25, 35-44.
- Castro, J.M.C., Campos, V.P., Pozza, E.A., Naves, R.L., Andrade Júnior, W.C., Dutra, M.R., Coimbra, J.R., Maximiniani, C., Silva, J.R.C., 2008. Levantamento de fitonematoides em cafezais do Sul de Minas Gerais. *Nematologia Brasileira*, 32, 56-64.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: Café, vol. 9, n. 1, Safra 2022, 61 p. Brasília.

Cunha, T.G.; Visôto, L.E.; Lopes, E.A.; Oliveira, C.M.G.; Good God, P.I.V., 2018. Diagnostics methods for identification of root-knot nematodes species from Brazil. *Ciência Rural*, 48, e20170449.

Dias, L.O., Silva, M.S. Determinantes da demanda internacional por café brasileiro. *Revista de Política Agrícola*, Ano XXIV, N. 01, jan./fev./mar, 2015. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/126824/1/Determinantes-dademanda-internacional.pdf> .> Acesso em: 28 Mar. 2021.

Esbenshade, P.R., Triantaphyllou, A.C., 1990. Isozyme phenotypes for the identifications of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 22, 10-15.

Ferraz, L.C.C.B., 2008. Brazil. In: Souza, R.M. (Ed.) *Plant-parasitic nematodes of coffee*. Springer, 225-248.

Ferraz, L.C.C.B., Brown, D.J.F., 2016. *Nematologia de plantas: fundamentos e importâncias*. Manaus: Norma Editora, 251p.

Gonçalves, W., Silvarolla, M.B., 2007. A luta contra a doença causada pelos nematóides parasitos do cafeeiro. *O Agrônomo*, 59, 54-56.

Goulart, R.R, Terra, W.C., Salgado, S.M.L, Alves, J.D., Campos, V.P., Fatobene, B.J.R., Marchiori, P.E.R., Souza, S.R. Oliveira, R.D'A.L., 2019. *Meloidogyne paranaensis* and *M. exigua* alter coffee physiology. *Nematology*, 21, 459-467.

Jenkins, W.R., 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, 48, 692.

Lima, I.D.M., Buonicontro, D., Arpini, B.D.S., Teodoro, M., Costa, N.S., 2019. Gerenciamento de nematoides no sistema de produção do cafeeiro 'Conilon'. In: Partelli, F.L., Espindula, M.C. (Org.). *Café Conilon: conhecimento para superar desafios*. Alegre, ES : CAUFES, Cap. 4, p. 61-74.

Lopes, E.A., Orr, J.N., Blok, V.C., 2018. Does soil warming affect the interaction between *Pasteuria penetrans* and *Meloidogyne javanica* in tomato plants? *Plant Pathology*, 67, 1777-1783.

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.

Oliveira, D.S., Oliveira, R. D. L., Silva, D. G., Silva, R. V., 2011. Characterization of *Meloidogyne incognita* populations from São Paulo and Minas Gerais state and their pathogenicity on coffee plants. *Tropical Plant Pathology*, 36, 190-194.

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., 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., Carneiro, R.M.D.G., Pinho, R.S.C., 2011. Aspectos técnicos dos nematoides parasitas do cafeeiro. Belo Horizonte: EPAMIG, 60p.

Salgado, S.M.L., Terra, W.C., Fatobene, B.J.R., Bento, A.T., Pinheiro, I.C.L., Matos, C.S.M., 2018. Detecção de *Meloidogyne paranaensis* em Carmo da Cachoeira, região Sul de Minas Gerais. Circular Técnica, EPAMIG 269. Belo Horizonte, MG, Brazil, EPAMIG.

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, biochemical and molecular characteristics of *Meloidogyne incognita* isolates and related species. *European Journal of Plant Pathology*, 134, 671–684.

Santos, M.F.A., Mattos, V.S., Silva, J.G.P., Moita, A.W., Salgado, S.M.L., Castagnone-Sereno, P., Carneiro, R.M.D.G., 2018a. Variabilidade genética e agressividade de populações de *Meloidogyne paranaensis* em genótipos de *Coffea* spp. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e biotecnologia, 43p.

Santos, M.F.A., Salgado, S.M.L., Silva, J.G.P., Correa, V.R., Mendonça, J.S.F., Carneiro, R.M.D.G., 2018b. *Meloidogyne incognita* parasitizing coffee plants in southern Minas Gerais, Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 43, 95–98.

Villain, L., Sarah, J.L., Hernández, A., Bertrand, B., Anthony, F., Lashermes, P., Charmetant, P., Anzueto, F., Carneiro, R.M.D.G., 2013. Diversity of root-knot nematodes associated with coffee orchards in Central America. *Nematropica*, 43, 194–206.

Ventura, J.A., Costa, H., Lima, I., 2017. Manejo de pragas do café conilon. In: Ferrão, R.G., da Fonseca, A.F.A., Ferrão, M.A.G., de Muner, L.H. (Ed.). *Café Conilon*. 2 ed. atual. e ampl. - Vitória, ES : Incaper, 434-479.

Vieira Júnior, J.R., Fernandes, C.D.F., Matos, S.I., Freire, T.C., Fonseca, A.S., Marreiros, J.A.A., Silva, D.S.G.D., 2015. Levantamento da ocorrência de populações do nematoide das-galhas-do-cafeeiro (*Meloidogyne* sp.) em Rondônia-primeira atualização. Porto Velho: Embrapa Rondônia, Comunicado Técnico, n. 397. 2015. 5 p.

Zambolim, L. Doenças do cafeeiro. Manual de fitopatologia: doença das plantas cultivadas. 5ª ed. Ouro Fino –MG: Agronômica Ceres, 2016. v.2, p. 208-210.

CAPÍTULO II

Amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) na identificação de fitonematoides

RESUMO

As principais culturas de importância econômica são parasitadas por fitonematoides e isso resulta em prejuízos anuais de bilhões de dólares. A diagnose acurada desses patógenos é essencial para que as estratégias corretas de manejo sejam adotadas. Vários métodos podem ser usados para identificação de espécies de nematoides. No entanto, alguns dependem de taxonomistas treinados (métodos morfológicos), estádios específicos do nematoide (eletroforese de isoenzimas e análise do padrão perineal) ou demandam equipamentos e reagentes caros (reação em cadeia da polimerase convencional ou em tempo real). Além disso, algumas abordagens podem ser menos acuradas, em função do reduzido número de caracteres a serem observados e da similaridade de características entre espécies distintas, a exemplo dos métodos morfológicos. A amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) é uma técnica molecular que pode ser usada na identificação de espécies de nematoides, com potencial de resultar em diagnose acurada, simples e relativamente barata. Essa técnica tem sido muito utilizada na microbiologia e na medicina humana e veterinária. Na nematologia, alguns protocolos foram desenvolvidos, embora ainda exista potencial para explorar essa técnica nessa área da ciência. Neste artigo foi revisada a técnica de LAMP, os protocolos desenvolvidos para diagnose de fitonematoides e as perspectivas de exploração do método.

Palavras-chaves: Acurácia, Diagnose molecular, Amplificação isotérmica mediada por loop, Taxonomia.

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in the identification of plant-parasitic nematodes

ABSTRACT

The main crops of economic importance are parasitized by nematodes, and this results in annual losses of billions of dollars. The accurate diagnosis of these pathogens is essential for the adoption of effective management strategies. Several methods can be used to identify nematode species. However, some rely on trained taxonomists (morphological methods), specific stages of the nematode (isoenzyme electrophoresis and perineal pattern analysis) or require expensive equipment and reagents (conventional or real-time polymerase chain reaction). In addition, some approaches may be less accurate, due to the reduced number of characters to be observed and the similarity of characteristics between different species, such as morphological methods. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a molecular technique that can be used in the identification of nematode species, with the potential to result in an accurate, simple and relatively inexpensive diagnosis. This technique has been widely used in microbiology and in human and veterinary medicine. In nematology, some protocols have been developed, although there is still potential to explore this technique in this area of science. In this article was reviewed the LAMP technique, the protocols developed for the diagnosis of nematodes and the prospects for exploring the method.

Key words: Accuracy, Molecular diagnosis, Loop-mediated isothermal amplification, Taxonomy.

1. INTRODUÇÃO

Fitonematoides são organismos que parasitam inúmeras plantas cultivadas e silvestres. Mais de 4100 espécies de fitonematoides já foram descritas (Ferraz & Brown, 2016). A maioria dos fitonematoides parasitam as raízes das plantas, o que pode levar à demora nos agricultores perceberem que tais patógenos são responsáveis por redução na produção vegetal. Estima-se que o prejuízo anual causado por esses patógenos seja de 100 bilhões dólares em todo o mundo (Coyne *et al.*, 2018).

Diversas estratégias podem ser usadas com o objetivo de evitar a introdução ou reduzir as populações de fitonematoides em campos de produção. Entretanto, para que se possa determinar uma estratégia de controle apropriada é necessário a correta identificação da espécie (Coyne *et al.*, 2009). Os nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.) são os principais causadores de danos em plantas em todo o mundo, principalmente em países tropicais. A identificação de espécies desse gênero foi realizada por décadas a partir da análise de padrões perineais de fêmeas (Hartman & Sasser, 1985). Entretanto, a semelhança das características perineais entre as espécies de fitonematoides pode resultar em menor acurácia da diagnose, além de demandar que fêmeas estejam presentes na amostra (Cunha *et al.*, 2018). A eletroforese de isoenzimas é um método usado para identificação de espécies de *Meloidogyne* (Esbenshade & Triantaphyllou, 1990; Carneiro *et al.*, 2000). No entanto, não se aplica a outros gêneros de fitonematoides e apenas pode ser feito a partir de fêmeas maduras. Vários métodos moleculares foram desenvolvidos nas últimas décadas para identificação de fitonematoides, principalmente baseados em reação em cadeia da polimerase (Devran & Söğüt, 2009; Humphreys-Pereira & Elling, 2014; Araya *et al.*, 2016; Janssen *et al.*, 2017; Fanelli *et al.*, 2017; Handoo *et al.*, 2020). Todavia, tais métodos requerem equipamentos e reagentes caros, o que pode limitar o uso desses protocolos em rotinas laboratoriais. Em suma, um método ideal de identificação de fitonematoides deve ser preciso, rápido, simples e econômico.

A técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) tem o potencial de ser usada na identificação de fitonematoides por atender vários desses requisitos. Desenvolvida no ano 2000 no Japão, o método permite amplificar ácidos nucleicos com especificidade, sensibilidade, eficiência e rapidez em condições isotérmicas, não

necessitando de equipamentos caros (Notomi *et al.*, 2000). As reações LAMP geralmente amplificam DNA com maior eficiência em uma temperatura entre 60 e 65°C, em um tempo que pode variar entre 30 e 60 minutos (Niu *et al.*, 2011). Além disso, quando a amplificação ocorre, o resultado pode ser visualizado a olho nu por meio da adição de corantes de ligação de DNA, não requerendo a etapa de eletroforese em gel de agarose (Notomi *et al.*, 2000).

A técnica tem sido usada amplamente na microbiologia e na medicina humana e veterinária. Na fitopatologia, a detecção de vírus, fungos e bactérias também é possível por LAMP (Mori & Notomi, 2009). Embora ainda menos numerosos do que para outros organismos, protocolos LAMP tem sido desenvolvidos para a identificação de fitonematoides (Tabela 1).

Tabela 1 - Espécies de fitonematoides que tiveram protocolos LAMP desenvolvidos para sua identificação.

| Espécie | Referência |
|--|--------------------------------|
| 1- <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> | Kikuchi <i>et al.</i> , 2009 |
| 2- <i>Meloidogyne incognita</i> | Niu <i>et al.</i> , 2011 |
| 3- <i>Meloidogyne enterolobii</i> | Niu <i>et al.</i> , 2012 |
| 4- <i>Radopholus similis</i> | Peng <i>et al.</i> , 2012 |
| 5- <i>Tylenchulus semipenetrans</i> | Lin <i>et al.</i> , 2016 |
| 6- <i>Bursaphelenchus cocophilus</i> | Ide <i>et al.</i> , 2017 |
| 7- <i>Meloidogyne hapla</i> | Peng <i>et al.</i> , 2017 |
| 8- <i>Meloidogyne mali</i> | Zhou <i>et al.</i> , 2017 |
| 9- <i>Tylenchulus semipenetrans</i> | Song <i>et al.</i> , 2017 |
| 10- <i>Pratylenchus zaeae</i> | Liu <i>et al.</i> , 2017 |
| 11- <i>Anguina wevelli</i> | Yu <i>et al.</i> , 2018 |
| 12- <i>M. chitwoodi</i> and <i>M. fallax</i> | Zhang & Gleason, 2019 |
| 13- <i>Ditylenchus destructor</i> | Ding <i>et al.</i> , 2019 |
| 14- <i>Aphelenchoides besseyi</i> | Yang & Yu, 2019 |
| 15- <i>Aphelenchoides ritzemabosi</i> | Wang <i>et al.</i> , 2019 |
| 16- <i>Meloidogyne partityla</i> | Waliullah <i>et al.</i> , 2020 |
| 17- <i>Anguina agrostis</i> | Yu <i>et al.</i> , 2020 |
| 18- <i>Meloidogyne graminicola</i> | He <i>et al.</i> , 2021 |

Considerando o potencial do LAMP para uso em nematologia, esta revisão visa abordar os principais aspectos da técnica, listar os protocolos disponíveis para diagnose de fitonematoides e discutir as perspectivas de estudos e possibilidades de exploração do método.

2. ANTECEDENTES E DESENVOLVIMENTO DA LAMP

A amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) foi desenvolvida por Notomi *et al.* (2000) com a premissa de amplificar ácidos nucleicos com precisão, rapidez, simplicidade e economia, sem a dependência de equipamentos caros, visto que as técnicas disponíveis até então continham limitações. A técnica é capaz de amplificar fragmentos de DNA na magnitude de 10^9 em menos de uma hora, com alta especificidade e em condições isotérmicas. Em seu desenvolvimento inicial, a técnica não foi direcionada a um organismo específico, deixando claro as possibilidades de aplicação em todos os campos das ciências biológicas, diagnoses de doenças infecciosas e distúrbios genéticos, o que futuramente levou a sua inclusão para o campo da nematologia.

De maneira geral, a reação típica consiste em adicionar solução tampão, primers, nucleotídeos (dNTP's), DNA alvo, sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e a enzima Bst DNA polimerase. Em alguns protocolos, corantes e, ou ligantes de DNA podem ser adicionados antes ou depois das reações. A reação é submetida a uma temperatura isotérmica que pode variar entre 60 a 65 °C durante aproximadamente uma hora (Notomi *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2001).

A enzima Bst DNA polimerase possui atividade de deslocamento de fita, onde pode catalisar e realizar polimerização do DNA no sentido 5'-3', com temperatura ótima de 63 °C (Nagamine *et al.*, 2001). O sulfato de magnésio, embora também esteja contido na solução tampão, é utilizado para formar um precipitado branco visível por meio do acúmulo de pirofosfato na reação (Mori *et al.*, 2001). O tamanho do DNA alvo é um fator que pode ser limitante, visto que melhores resultados são obtidos com DNAs de 130 a 200 pares de bases (pb), e acima de 500 pb a amplificação não acontece com perfeição (Notomi *et al.*, 2000). Os dNTP's funcionam como fonte de nucleotídeos para a reação (Mori *et al.*, 2001). Opcionalmente, a betaína pode ser usada em alguns casos, com o objetivo de melhorar estabilização de adenina-timina e guanina-citosina na reação. O mínimo de quatro primers são necessários para atingir regiões de um gene específico, sendo dois primers internos (FIP - *forward inner primer* e BIP - *backward inner primer*) e dois externos (F3 - *forward outer primer* e B3 - *backward outer primer*). Entretanto, o tempo da reação pode ser reduzido para

aproximadamente 30 minutos com a adição de loop primers, LF (*loop forward*) e LB (*loop backward*) (Nagami *et al.*, 2002).

O processo de amplificação da LAMP envolve duas fases: a cíclica e a não cíclica, onde a fase não cíclica é predecessora da fase cíclica (Parida *et al.*, 2008). A fase não cíclica se inicia com o anelamento do primer FIP com a sequência complementar do DNA alvo e a síntese de DNA com a Bst DNA polimerase deslocando a fita e liberando um DNA de fita simples. Em seguida, o primer F3 anela na região F3c fora do FIP e desloca a fita de DNA, resultando em uma única fita em forma de sino na extremidade 5'. Essa fita é usada como modelo pelo primer BIP para anelar em uma sequência complementar na região B2c, sendo alongada em seguida pela Bst DNA polimerase. Juntamente com a enzima, o primer B3 anela em B3c fora do BIP, iniciando o deslocamento do DNA, formando uma estrutura de DNA na extremidade 3'. No final da fase não cíclica são formadas hastes de loop de DNA nas extremidades da fita (Parida *et al.*, 2008).

Na fase cíclica, o primer FIP se anela com a região de fita simples no DNA de loop e na síntese de deslocamento da fita primária de DNA, liberando a fita previamente sintetizada, onde a fita simples liberada forma uma estrutura de haste de loop na extremidade 3' em razão das regiões complementares B1c e B1. Por meio da extremidade 3' da região B1, a síntese de DNA se inicia utilizando a própria estrutura como molde, liberando a fita complementar ligada a FIP, que por sua vez gera uma estrutura semelhante a halteres, pois ambas as extremidades têm regiões F1-F1c e B1c-B1 complementares. O primer BIP se emparelha com a região B2c e com a fita principal da síntese de DNA, liberando a fita de DNA iniciada com B1, e como resultado de todo esse processo, estruturas de diferentes tamanhos são formadas compostas por repetições invertidas da sequência alvo na mesma fita, levando ao acúmulo de 10^9 cópias em menos de uma hora. Os loop primers, quando utilizados atuam na fase cíclica, acelerando o processo (Parida *et al.*, 2008).

3. ENSAIOS LAMP PARA A IDENTIFICAÇÃO DE FITONEMATÓIDES

3.1 Extração de DNA da espécie

Esta parte do processo varia muito, podendo envolver kits comerciais de extração ou protocolos simples (Niu et al., 2011; Niu et al., 2012; Peng et al., 2012; Zhou et al., 2017; Yu et al., 2018; Zhang & Gleason, 2019; Waliullah et al., 2020). Em alguns protocolos LAMP, no entanto, não é necessário fazer a extração de DNA (Tsai et al., 2016; Khan et al., 2018).

3.2 Desenho dos primers LAMP

Diferentes alvos genômicos podem ser usados para amplificação e, por consequência, para o desenho de primers. Nos protocolos disponíveis na área de fitonematologia, os principais alvos são as regiões ITS e 18S do rDNA (Niu et al., 2011; Zhang & Gleason, 2019).

O desenho dos primers pode ser feito manualmente ou, mais comumente, com uso de softwares, a exemplo do PrimerExplorer (Niu et al., 2011; Niu et al., 2012; Peng et al., 2012) ou o Clustal Omega (Sievers et al. 2011; Zhang & Gleason, 2019). O desenho dos primers não é uma etapa fácil, pois os primers devem ser específicos (Tabela 2) e algumas espécies distintas apresentam elevada similaridade nas principais regiões genômicas alvos, como no caso de *M. chitwoodi* e *M. fallax* (Zhang & Gleason, 2019). A reação pode ser feita com quatro (Niu et al., 2011), cinco (Zhang & Gleason, 2019) ou com até seis primers (Waliullah et al., 2020).

3.3 Otimização da reação

A otimização das reações LAMP demanda ajustes de concentrações de reagentes (primers, magnésio, betaína, indicadores de metal ou corantes de DNA), temperatura de incubação e tempo de reação. A processo é realizado em um volume total de 25 µl 1 X de tampão de amplificação, 1,6 mM de cada dNTP, 0,8 µM cada um dos primers internos FIP e BIP, 0,2 µM cada de primers externos F3 e B3, 4 mM de MgSO₄, 8 unidades da enzima Bst DNA polimerase e 1 – 2 µl de DNA alvo. No caso da utilização de loop primers, inclui a adição de 0,4 µM de cada primer (LB e LF) (Nagami et al., 2002). O uso de betaína conforme proposto por Notomi et al. (2000) é opcional, adotado em apenas alguns protocolos.

Tabela 2 – Exemplos de primers utilizados nos protocolos LAMP para as algumas espécies de fitonematoides.

| Primers | Sequência (5' - 3') | Alvo e referência |
|---------|---|--|
| FIP | CTTTCCTTGG AATTGGAACAGGGTCAATTGCTTTATATCAAACACC | <i>Meloidogyne incognita</i> (Niu et al., 2011) |
| BIP | GGACGGAGAAGTATGTTCCCTCTCTGGAAAAGAAAAATCAGTCTT | |
| F3 | TATGTCAGCCCCCGGTTT | |
| B3 | GAGAAGGAAAAGAGTGCCAA | |
| FIP | ACAGTGATTACGACCATACCGCGTTCGTTGCTTAACTTGCCAGA | <i>Meloidogyne enterolobii</i> (Niu et al., 2012) |
| BIP | TCTAAGGCAAAGTGGGCGGAGCTCTYTTTGCCTTAAACCATTCCC | |
| F3 | CCAAGTACTAAGGAAGCCC | |
| B3 | ATCCTAATTTTYCTCCCACACA | |
| Loop F | AAGCACGCCATCCCGTC | |
| Loop B | TGTTGTTGCTGTTTCG | <i>Radopholus similis</i> (Peng et al., 2012) |
| FIP | GCACCCAACGGACAAAACAACACATTCAGCCTCTGGGCATC | |
| BIP | GCAGCGCTGTGAGCCTGTTTGTTCGCCATTCTGGGTAC | |
| F3 | AGCTGGCGTATCTAGCCTG | |
| B3 | AACGCCAGAACGCACAAC | |
| Loop F | AGGCGTTCGTCCTCAAGGTCA | <i>Tylenchulus semipenetrans</i> (Lin et al., 2016) |
| FIP | CRGGTAAGAGCCGAGAAGGACAGTCATACTTCCTCYGCCGCT | |
| BIP | TGTAACGCTGAGCGACTGTTGAGCGACATGTGGAGAAGGC | |
| F3 | GCATCTGGCGAGTCTGTG | |
| B3 | GCACCGAATCTGGAATCAT | <i>Bursaphelenchus cocophilus</i> (Ide et al., 2017) |
| FIP | TCGCCGGTCAAACACACATTCGCAACTACCGTCTTCCGCTG | |
| BIP | TCTGCCAATACGGCGCTGATCGGAACAGGGTTTGTCTG | |
| F3 | GGTTCTGCTCTTCGGCATAT | |
| B3 | ACGTGTGCGACCAACAAC | <i>Meloidogyne mali</i> (Zhou et al., 2017) |
| FIP | CGACGTATCCTCCCAATCTTGTGCGAATGAGCCTTGTATTG | |
| BIP | CGACTCTCGTCGTGTAACGGGATGGCACAACCTGCTCAG | |
| F3 | TGCTGCTGGATCATTACAC | |
| B3 | TCCTGGGCTCATTAAAGTCT | |
| Loop F | CGTGGAGTAGACGAAGAAATCT | <i>Tylenchulus semipenetrans</i> (Song et al., 2017) |
| Loop B | CTACGCTGGTGTCTGTGT | |
| FIP | CAGATGCCAGAAGCAGCGACAGGCACATCGGGTGGAGAG | |
| BIP | TGGTCATACTTCCTCTGCCGCTAGGTAAGAGCCGAGAAGGA | |
| F3 | CCAGGTTGAGCAGAGTCCTT | |
| B3 | GCCGTTTTTCGCCTGTAGTC | |
| Loop B | GAGGAAGGGATACTGAGCTT | |

Continua...

Tabela 2 (Continuação) – Exemplos de primers utilizados nos protocolos LAMP para as algumas espécies de fitonematoides.

| Primers | Sequência (5' - 3') | Alvo e referência |
|---------|---|---|
| FIP | ACCAGGTAAAAACCTTAATTCCGGGCTTATTTTAGGGGGGCT | <i>Pratylenchus zae</i> (Liu <i>et al.</i> , 2017) |
| BIP | TATTCGTTTTGGTCCGGTTTTTTTTCAAATAACCCCAGAGCAAC | |
| F3 | GGTTTAGATCTTGATTCTCGG | |
| B3 | GTAATAATAATCCAAAGTGGCA | |
| FIP | GGTGGGGACTTCACCAGAAAATAGCCAAACAGTCCAAGAAGG | <i>Anguina wevelli</i> (Yu <i>et al.</i> , 2018) |
| BIP | TGGACGAAAAAACGGCTCTGGACGTAGGCATACAACCTGCT | |
| F3 | CCTTTCCGTGGAATGTTGAA | |
| B3 | ACGTACCGATTCTCTTCAA | |
| FIP | AGACACGTCGTGTCACCTATATAAAGCATAGCGGTTTGTTC | <i>Meloidogyne chitwoodi</i> and <i>M. fallax</i> (Zhang & Gleason, 2019) |
| BIP | ATGAAGATATCTGGTTGATCCTGCACATGCATGGCTTAATCTTTG | |
| F3 | GAAGTCTCTCGTGTGAGAT | |
| B3 | CTCGATAAATCGATTAAACTGGT | |
| Loop B | CTGAACTGATGTGTTCA | |
| FIP | CACTGCAAGCAGTCGGGACG-CGAGCTTATATGCGACCTCG | <i>Ditylenchulus destructor</i> (Ding <i>et al.</i> , 2019) |
| BIP | GCGGAGGAAGAGCATACTCGC-AGAGTTTCCTCTGGCTTCGT | |
| F3 | GCGCAATGAAAGTAAAGGC | |
| B3 | AGAACCGCTCCGGACTTC | |
| Loop F | AGATGGTGAACCTATGCCTGAGC | |
| FIP | TCTTGTTCCCTGCACCCATATCTTGCCTGTAGCTTTATTTTTGC | <i>Aphelenchoides besseyi</i> (Yang & Yu, 2019) |
| BIP | ATCCTCCTTTAAGAACTCTTGGTCACACAATGAAGCCTAAAAATGG | |
| F3 | CGTCTAAATAATTTGAGGTTTTGGT | |
| B3 | ACCTAAAAATAGAATAATCCAG | |
| FIP | TCTTGTTCCCTGCACCCATATCTTGCCTGTAGCTTTATTTTTGC | <i>Aphelenchoides ritzemabosi</i> (Wang <i>et al.</i> , 2019) |
| BIP | ATCCTCCTTTAAGAACTCTTGGTCACACAATGAAGCCTAAAAATGG | |
| F3 | CGTCTAAATAATTTGAGGTTTTGGT | |
| B3 | ACCTAAAAATAGAATAATCCAG | |
| Loop F | GCGCAAACACGCAAAATACC | |
| FIP | ACCGATAAGGCTAGAAATTTTCGTTACTTAATGAGCCTCTTAAGTGA | <i>Meloidogyne partityla</i> (Waliullah <i>et al.</i> , 2020) |
| BIP | CGGCTCGTGGATCGATGAAGTCAAGGTTTCTGCAGTTCCG | |
| F3 | AGGACTCTTTTTTGGGGTT | |
| B3 | ATGCGTTCAAACTTTTATGC | |
| Loop F | AAAAAGAGTGCTGGCGTCC | |
| FIP | CCTTGATCTCCGTGAACAGCGGTTATGATGGTGGAGGT | <i>Meloidogyne graminicola</i> (He <i>et al.</i> , 2021) |
| BIP | GGCATCTTACATCATCTTCTGTTTTCTTTTACTTTTGGCTCC | |
| F3 | AAGATGAGGATGAGGAGGA | |
| B3 | GAATAAGGATCTGGAACCTTGT | |

Continua...

Tabela 2 (Continuação) – Exemplos de primers utilizados nos protocolos LAMP para as algumas espécies de fitonematoides.

| Primers | Sequência (5' - 3') | Alvo e referência |
|---------|--|--|
| FIP | CTGCTAAGCGGTGGGGACGAGTCTGAGAAGGTGCCCT | <i>Anguina agrostis</i> (Yu <i>et al.</i> , 2020) |
| BIP | TCTCTGAGCAGTTGTATGCCTACGCTCGCGATCACGAAGACC | |
| F3 | GACGAATTCATTCTTACAGCCA | |
| B3 | GCACCATATCTGGTACTCATTG | |
| Loop F | CACCAGTAAGCAGCGTGC | |
| Loop B | CTGCGTTGAAGAGAGACGG | |

É importante ressaltar que na otimização da reação, as quantidades de cada ítem podem variar de espécie para espécie, segundo os protocolos disponíveis. Niu *et al.* (2011) utilizaram 0,35 µM de cada dNTP, e 1,6 µM cada um dos primers internos, enquanto Niu *et al.* (2012) já utilizaram 1,4 µM de cada dNTP assim como 0,8 µM de cada primer loop. Yu *et al.* (2020) utilizaram na reação para identificar *A. agrostis* 20 µM de cada primer loop. Waliullah *et al.* (2020) após usarem diferentes concentrações encontraram melhores condições de amplificação nas concentrações de 0,2 µM de cada primer externo (F3 e B3), 1,6 µM cada primer interno (FIP e BIP), e 0,8 µM de cada primer loop (LF e LB), sendo o padrão mais utilizado nos protocolos.

Além dos primers, a quantidade de sulfato de magnésio também pode variar de acordo com o protocolo. Peng *et al.*, 2017 encontraram melhores condições utilizando 5 mM de MgSO₄ para *M. hapla*, Zhou *et al.*, 2017 por sua vez utilizaram 6,5 mM para *M. mali*. Lin *et al.*, 2016 usaram 100 mM de MgSO₄ para a reação de *Tylenchulus semipenetrans*, enquanto Song *et al.*, 2017 utilizaram apenas 4 mM para a mesma espécie, a qual estabeleceu um diferente protocolo com um desenho diferente de primers.

Alguns protocolos incluem a desnaturação do DNA da espécie alvo, para melhorar a eficiência da amplificação. Dessa forma, antecedendo a adição da enzima Bst DNA polimerase, o DNA é desnaturado a 95 °C durante 5 minutos, sendo posteriormente resfriado em gelo (Niu *et al.*, 2011).

A temperatura de incubação ideal para a amplificação é algo que varia de acordo com a espécie. Nos protocolos disponíveis a temperatura ótima variou entre 63 e 70°C (Tabela 3). Dessa forma, para estabelecer a reação para uma espécie que ainda não teve seu ensaio LAMP otimizado, é necessário submeter a reação a diferentes temperaturas para que se possa determinar a temperatura ótima.

O tempo de amplificação também pode variar de acordo com a espécie (Tabela 3). Kikuchi *et al.* (2009) determinaram o tempo de amplificação de 60 minutos para *Bursaphelenchus xylophilus*, enquanto Zhang & Gleason (2019) obtiveram êxito na amplificação de *M. chitwoodi* e *M. fallax* em apenas 45 minutos de incubação.

Tabela 3 - Temperatura e tempo de reação utilizado nas reações LAMP de algumas espécies de fitonematoides.

| Espécie | Temperatura (°C) | Tempo (minutos) |
|---|-------------------------|------------------------|
| <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> (Kikuchi <i>et al.</i> , 2019) | 63 | 60 |
| <i>Meloidogyne incognita</i> (Niu <i>et al.</i> , 2011) | 63 | 60 |
| <i>Meloidogyne enterolobii</i> (Niu <i>et al.</i> , 2012) | 63 | 60 |
| <i>Radopholus similis</i> (Peng <i>et al.</i> , 2012) | 63 | 60 |
| <i>Tylenchulus semipenetrans</i> (Lin <i>et al.</i> , 2016) | 65 | 50 |
| <i>Bursaphelenchus cocophilus</i> (Ide <i>et al.</i> , 2017) | 63 | 60 |
| <i>Meloidogyne hapla</i> (Peng <i>et al.</i> , 2017) | 65 | 45 |
| <i>Meloidogyne mali</i> (Zhou <i>et al.</i> , 2017) | 63 | 60 |
| <i>Tylenchulus semipenetrans</i> (Song <i>et al.</i> , 2017) | 63 | 60 |
| <i>Pratylenchus zaeae</i> (Liu <i>et al.</i> , 2017) | 64 | 40 |
| <i>Anguina wevelli</i> (Yu <i>et al.</i> , 2018) | 63 | 60 |
| <i>M. chitwoodi</i> and <i>M. fallax</i> (Zhang & Gleason, 2019) | 68 | 45 |
| <i>Ditylenchus destructor</i> (Ding <i>et al.</i> , 2019) | 65 | 50 |
| <i>Aphelenchoides besseyi</i> (Yang & Yu, 2019) | 63 | 65 |
| <i>Aphelenchoides ritzemabosi</i> (Wang <i>et al.</i> , 2019) | 65 | 60 |
| <i>Meloidogyne partityla</i> (Waliullah <i>et al.</i> , 2020) | 70 | 60 |
| <i>Anguina agrostis</i> (Yu <i>et al.</i> , 2020) | 63 | 60 |
| <i>Meloidogyne graminicola</i> (He <i>et al.</i> , 2021) | 63 | 60 |

Ao final do tempo de incubação, o ensaio pode ser aquecido em 80 °C de 2 a 5 minutos para que se encerre a atividade da Bst DNA polimerase. Feito isso, os produtos LAMP podem ser visualizados a olho nu ou via eletroforese em gel de agarose (Notomi *et al.*, 2000).

3.4 Sensibilidade da técnica

De forma geral, a LAMP é mais sensível do que a PCR convencional. Isso é vantajoso, principalmente em instâncias onde a concentração do DNA alvo é baixa. Zhang & Gleason (2019), por exemplo, relataram que foi possível detectar DNA de *M. chitwoodi* em diluições conseguiram resultados LAMP positivos em diluições de até 10^{-5} a partir de 1 ng do DNA genômico, enquanto com PCR convencional foi possível detectar apenas em diluições até 10^{-3} , sendo assim o LAMP cem vezes mais sensível que a PCR. Ide *et al.* (2017) conseguiram atestar a olho nu a ocorrência de amplificação de DNA de *Bursaphelenchus cocophilus* diluído até a concentração de 1:25, enquanto diluições de 1:50 e 1:100 foram possíveis de visualizar apenas por eletroforese em gel de agarose.

3.5. Monitoramento da amplificação.

O monitoramento da amplificação LAMP é uma etapa fundamental do processo. Uma eficiente identificação com o uso da LAMP não depende apenas do sucesso da amplificação do DNA, mas também da eficiência do método utilizado para monitorar a reação (Parida *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014). Como a reação visa precisão, rapidez, simplicidade e economia, o melhor método de monitoramento é o que se enquadra em todas estas características.

Um método bastante utilizado é a adição de corantes de ligação de DNA após o término da reação. Com boa sensibilidade, o corante forma um complexo com quantidade suficiente de DNA, o que permite a mudança de cor (Zhang *et al.*, 2014). Um exemplo de corante de ligação é o SYBR Green I, que muda a cor do produto de laranja para verde na presença de DNA alvo em quantidade suficiente, sendo possível a visualização a olho nu. Entretanto, como a adição do corante é realizada após a reação acontecer, aumenta-se o risco de contaminação do produto, ocasionando em erro.

Embora seja menos prático e venha a ocasionar dependência de mais equipamentos, é o monitoramento da reação LAMP por meio da aplicação do produto em gel de eletroforese. A visualização do produto LAMP positivo é possível no gel de eletroforese após a coloração do produto com corantes fluorescentes, tais como o brometo de etídio ou o SYBR Green I, resultando em bandas de tamanho diferente com padrão bastante característico que se assemelha a uma escada, que difere bastante do padrão observado na reação em cadeia da polimerase (Le *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014).

Visando eficiência e praticidade na identificação de fitonematoides, um método que pode ser empregado é a colorimetria do DNA amplificado, o que permite a visualização do produto a olho nu. Uma vantagem que este processo possui, é a possibilidade da adição do indicador colorimétrico no momento da preparação da reação, não necessitando da abertura do tubo após a reação, o que evita a contaminação (Parida *et al.*, 2008; Tomita *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014). Dois exemplos que podem ser utilizados é o hydroxy naphthol azul (HNB) e a calceína. O HNB que originalmente apresenta a cor roxa, muda a cor da solução de roxa para azul celeste. Essa mudança ocorre pela redução da concentração de magnésio na solução, que ocorre pela produção de pirofosfato de magnésio insolúvel que ocorre no processo de amplificação (Goto *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014). A calceína por sua vez, combina com íons de manganês antes da reação acontecer dando a cor laranja para a solução, e após a reação ocorrer, a calceína se desliga dos íons de manganês, fazendo com que a mesma recupere sua coloração verde fluorescente (Tomita *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A LAMP possui potencial de uso na diagnose de várias espécies de fitonematoides. Muitas espécies de importância econômica já foram alvo de desenvolvimento de protocolos, mas várias outras ainda não foram estudadas, incluindo *Pratylenchus brachyurus*, *M. paranaensis*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *Rotylenchus reniformis*, espécies importantes para a agricultura. Dessa forma, novos estudos são importantes para facilitar incluir outras espécies e contribuir para a redução das perdas mundiais decorrentes de fitonematoides.

A avaliação prática dos ensaios LAMP utilizando solo ou amostras de raízes infectadas é um ponto que também deve continuar sendo bastante estudado (Niu *et al.*, 2011), considerando que nos ensaios LAMP disponíveis foram avaliados apenas utilizando solos inoculados artificialmente com altas infestações (Zhou *et al.*, 2017), necessitando de mais estudos de práticas em campos com infestações naturais. Além disso, seria interessante estudos da avaliação prática utilizando amostras de solo na mistura, eliminando a necessidade da extração de DNA. Uma vez que se comprove a eficiência utilizando este processo, a técnica se tornaria ainda mais rápida e econômica. Isso possibilitaria o uso de novas tecnologias a campo para a realização da LAMP em tempo real, como o estabelecimento de kits liofilizados.

REFERÊNCIAS

- Araya, T. Z., Padilla, W. P., Archidona-Yuste, A., Cantalapiedra-Navarrete, C., Liébanas, G., Palomares-Rius, L. E., Castillo, P., 2016. Root-lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae) from Costa Rica with molecular identification of *P. gutierrezi* and *P. panamaensis* topotypes. *European Journal of Plant Pathology*, 145, 973–998.
- Carneiro, R.M.D.G., Almeida, M.R.A., Quénéhervé, P., 2000. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology*, 2, 645-654.
- Coyne, D.L., Cortada, L., Dalzell, J.J., Claudius-Cole, A.O., Haukeland, S., Luambano, N., Talwana, H., 2018. Plant-parasitic nematodes and food security in Sub-Saharan Africa. *Annual Review of Phytopathology*, 56, 381–403.
- Coyne, D.L., Fourie, H.H., Moens, M., 2009. Current and future management strategies in resource-poor farming. In: Perry, R.N., Moens, M., Starr, J.L., editors. *Root-Knot Nematodes*. 1st ed. Wallingford, UK: CAB International, pp. 444-475.
- Devran Z., Söğüt M. A., 2009. Distribution and identification of root-knot nematodes from Turkey. *Journal of Nematology*, 41, 128-133.
- Ding, S., Yang, S., Wu, W., Xie, H., Xu, C., 2019. Rapid diagnosis of *Ditylenchus destructor* by loop-mediated isothermal amplification assay based on 28S rRNA sequences. *European Journal of Plant Pathology*, 153, 1165–1175.
- Esbenshade, P.R., Triantaphyllou, A.C. 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 22, 10–15.
- Lambert, K., Bekal, S., 2002. Introduction to plant-parasitic nematodes. The plant health instructor. Disponível em: <<https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/nematode/intro/Pages/IntroNematodes.aspx>>

Fanelli, E., Cotroneo, A., Carisio, L., Troccoli, A., Grosso, S., Boero, C., Capriglia, F., De Luca, F., 2017. Detection and molecular characterization of the rice root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 149:467–476.

Ferraz, L.C.C.B., Brown, D.J.F., 2016. Os nematoides no contexto da Agricultura atual. In: Ferraz, L.C. C. B., Brown, D. J. F., editors. *nematologia de plantas: fundamentos e importância*. Campos dos Goytacazes (RJ), Brasil: Sociedade Brasileira de Nematologia, pp. 1-13.

Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., Hanaki, K., 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques* 46, 167-172.

Handoo, Z.A., Skantar, A.M., Kantor, M.R., Hafez, S.L., Hult, M.N., 2020. Molecular and morphological characterization of the amaryllis lesion nematode, *Pratylenchus hippeastri* (Inserra et al., 2007), from California. *Journal Of Nematology*, 52, e2020-58.

Hartman, R.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. *An advanced treatise on Meloidogyne*. Vol. 2. Methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 69-77.

He Q., Wang D., Tang B., Wang J., Zhang D., Liu Y., Cheng F., 2020. Rapid and sensitive detection of *Meloidogyne graminicola* in soil using conventional PCR, loop-mediated isothermal amplification, and real-time PCR methods. *Plant Dis*. 2020 Jul 30. doi: 10.1094/PDIS-06-20-1291-RE. Epub ahead of print. PMID: 32729804.

Humphreys-Pereira, D.A., Elling, A.A., 2014. Mitochondrial genomes of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. incognita* (Nematoda: Tylenchina): comparative analysis, gene order and phylogenetic relationships with other nematodes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 194, 20-32.

Ide, T., Kanzaki, N., Parra Giraldo, P.P., Giblin-Davis, R.M., 2017. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of the red ring nematode. *Nematology*, 19, 559-565.

Janssen, T., Karssen, G., Orlando, V., Subbotin, S.A., Bert, W., 2017. Molecular characterization and species delimiting of plant-parasitic nematodes of the genus *Pratylenchus* from the penetrans group (Nematoda: Pratylenchidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 117, 30–48.

Khan, M., Wang, R., Li, B., Liu, P., Weng, Q., Chen Q., 2018. Comparative evaluation of the LAMP assay and PCR-based assays for the rapid detection of *Alternaria solani*. *Frontiers in Microbiology*, 9:2089.

Kikuchi, T., Aikawa, T., Oeda, Y., Karim, N., Kanzaki, N., 2009. A rapid and precise diagnostic method for detecting the Pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathology*, 99, 1365-1369.

Leiva, N.P.F., Santana-Gomes, S. M., Zabini, A.V., Velazquez, L.M.G., Dias-Arieira, C.R., 2020. Soil chemical properties and their relationship with phytonematode populations inside and outside patches of soybean fields. *Rhizosphere*, 15:100231.

Le, T.H., Nguyen, N.T.B., Truong, N.H., De, N.V., 2012. Development of Mitochondrial Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of the Small Liver Fluke *Opisthorchis viverrini* (Opisthorchiidae; Trematoda; Platyhelminthes) *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 1178–1184.

Lin, B., Wang, H., Zhuo, K., Liao, J., 2016. Loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Tylenchulus semipenetrans* in soil. *Plant Disease*, 100, 877-883.

Liu, X., Wang, H., Lin, B., Tao, Y., Zhuo, K., Liao, J., 2017. Loop-mediated isothermal amplification based on the mitochondrial COI region to detect *Pratylenchus zaeae*. *European Journal of Plant Pathology*, 148, 435–446.

Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., Notomi, T., 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289, 150–154.

Mori, Y., Notomi, T., 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 15, 62-69.

Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T., 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, 16, 223–229.

Nagamine, K., Watanabe, K., Ohtsuka, K., Hase, T., Notomi, T., 2001. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template. *Clinical Chemistry*, 47, 1742–1743.

Niu, J.H., Guo, Q.X., Jian, H., Chen, C.L., Yang, D., Lin, Q., Guo, Y.D., 2011. Rapid detection of *Meloidogyne* spp. by LAMP assay in soil and roots. *Crop Protection*, 30, 1063-1069.

Niu, J.H., Jian, H., Guo, Q.X., Chen, C.L., Wang, X.Y.; Lin, Q., Guo, Y.D., 2012. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays based on 5S rDNA-IGS2 regions for detecting *Meloidogyne enterolobii*. *Plant Pathology*, 61, 809-819.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28, e63.

Parida M., Sannarangaiah S., Dash P.K., Rao P.V.L., Morita K., 2008 Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*, 18, 407–421.

Peng, H., Long, H., Huang, W., Liu, J., Cui, J., Kong, L., Hu, X., Gu, J., Peng, D., 2017. Rapid, simple and direct detection of *Meloidogyne hapla* from infected root galls using loop mediated isothermal amplification combined with FTA technology. *Scientific Reports*, 7, 44853.

Peng, H., Peng, D.L., Hu, X. Q., He, X.F., Wang, Q., Huang, W.K., He, W.T., 2012. Loop-mediated isothermal amplification for rapid and precise detection of the burrowing nematode, *Radopholus similis*, directly from diseased plant tissues. *Nematology*, 14, 977-986.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W.Z., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J. D., and Higgins, D. G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7,539.

Song, Z., Cheng, J., Cheng. F., Zhang, D., Liu, Y., 2017. Development and Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of *Tylenchulus semipenetrans* Using DNA Extracted from Soil. *The Plant Pathology Journal*, 33, 184-192.

Tsai, C.C., Shih, H.C., Ko, Y.Z., Wang, R.H., Li, S.J., Chiang, Y.C., 2016. Direct LAMP assay without prior DNA purification for sex determination of papaya. *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 1630. 2016.

Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., Notomi, T., 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, 3,877–882.

Waliullah, S., Bell, J., Jagdale, G., Stackhouse, T., Hajihassani, A., Brenneman, T., Ali, M., E., 2020. Rapid detection of pecan root-knot nematode, *Meloidogyne partityla*, in laboratory and field conditions using loop-mediated isothermal amplification. *Plos One*, 15, e0228123.

Wang, D., Xu, C., Bai, Z., Li, J., Han, Y., Zhao, L., Xie, H., 2019. Development of a loop-mediated isothermal amplification for rapid diagnosis of *Aphelenchoides ritzemabosi*. *European Journal of Plant Pathology*, 155, 173–179.

Yang, J., Yu, G., 2019. A loop-mediated isothermal amplification assay for the plant parasitic nematode *Aphelenchoides besseyi* in rice seedlings. *Journal of Nematology*, e2019-80.

Yu, L., Song, S., Yu, C., Jiao, B., Tian, Y., Li, Y., 2020. Rapid detection of *Anguina agrostis* by loop-mediated isothermal amplification. *European Journal of Plant Pathology*, 156, 819–825.

Yu, L., Song, S.-Y., Yu, C., Q, L., Yu, Z., Jiao, B., Yang, J., 2018. A loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid and reliable detection of *Anguina wevelli*, a grass parasitic nematode. *European Journal of Plant Pathology*, 150, 725-734.

Zhang, L., Gleason, C., 2019. Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Diagnostic Detection of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*. *Plant Disease*, 103, 12-18.

Zhang, X., Lowe, S.B., Gooding, J.J., 2014. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosensors and Bioelectronics*, 61, 491-499.

Zhou, Q., Cai, Y., Gu, J., Wang, X., Chen, J., 2017. Rapid and sensitive detection of *Meloidogyne mali* by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *European Journal of Plant Pathology*, 148, 755-769.

CAPÍTULO III

Diagnose de *Meloidogyne exigua* por meio de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP)

RESUMO

Fitonematoides do gênero *Meloidogyne* spp. conhecidos como nematoide das galhas, são endoparasitas sedentários que atacam uma ampla gama de hospedeiros. Para a cultura do café, existem três espécies de nematoides das galhas que parasitam mais comumente causando grandes prejuízos, *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*, sendo *M. exigua* a mais comum entre as três. O controle de fitonematoides geralmente é muito específico direcionado à espécie, sendo necessário acurácia no momento da identificação. Entretanto, os métodos tradicionais utilizados para a identificação requerem pessoal altamente capacitado ou equipamentos de elevado custo. Ao contrário dos métodos tradicionais, a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) amplifica DNA alvo com rapidez, acurácia e simplicidade a um baixo custo. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi estabelecer um ensaio LAMP para *M. exigua*. A reação foi estabelecida com quatro primers que foram baseados na região 28S do rDNA de *M. exigua*. O monitoramento da reação foi realizado a olho nu por colorimetria obtida pelo master mix WarmStart® e por eletroforese em gel de agarose. O ensaio estabelecido foi capaz de detectar especificamente *M. exigua*, não amplificando as outras duas espécies de nematoide das galhas do cafeeiro *M. incognita* e *M. paranaensis*. Além disso, o ensaio estabelecido apresentou alta sensibilidade, sendo capaz de amplificar com boa visualização a quantidade mínima de 0,0026 ng de DNA de *M. exigua*. O ensaio LAMP estabelecido pode ser concluído durante 75 minutos, mostrando ser rápido, preciso, simples e barato, e será de grande utilidade para a correta identificação de *M. exigua*.

Palavras-chave: Cafeeiro, ensaio, reação, sensibilidade.

***Meloidogyne exigua* diagnosis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)**

ABSTRACT

Plant-parasitic of *Meloidogyne* spp. (root-knot nematodes) are sedentary endoparasites that attack a wide range of hosts. For coffee, there are three species of root-knot nematode that most commonly parasitize causing great damage, *M. exigua*, *M. incognita* and *M. paranaensis*, with *M. exigua* being the most common among the three. The control of nematodes is generally very species-specific, requiring accuracy at the time of identification. However, the traditional methods used for identification require highly skilled personnel or expensive equipment. Unlike traditional methods, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) amplifies target DNA quickly, accurately, and simply at a low cost. In this sense, the aim of this study was to establish a LAMP assay for *M. exigua*. The reaction was established with four primers that were based on the 28S region of the *M. exigua* rDNA. Reaction was monitored with the naked eye by colorimetry obtained by the WarmStart® master mix and by agarose gel electrophoresis. The established assay was able to specifically detect *M. exigua*, not amplifying the other two species of coffee root-knot nematode *M. incognita* and *M. paranaensis*. In addition, the established assay showed high sensitivity, being able to amplify with good visualization the minimum amount of 0.0026 ng of *M. exigua* DNA. The established LAMP assay can be completed for 75 minutes, proving to be fast, accurate, simple and inexpensive, and will be very useful for the correct identification of *M. exigua*.

Keywords: Assay, coffee tree, reaction, sensitivity.

1. INTRODUÇÃO

O cafeeiro é parasitado por várias espécies de fitonematoides e os maiores prejuízos são associados ao gênero *Meloidogyne*, que causam o declínio da cultura podendo levar até mesmo a morte da planta (Contarato *et al.*, 2014). No Brasil, *Meloidogyne exigua*, e *M. paranaensis* são as que causam mais danos à cultura (Santos *et al.*, 2018). *Meloidogyne exigua* é a espécie com maior dispersão em todas as áreas de produção de café no país, onde parasita as plantas induzindo a formação de galhas típicas geralmente sem desorganizar o tecido radicular cortical (Muniz *et al.*, 2008, Goulart *et al.*, 2019).

A identificação acurada das espécies de fitonematoides é fundamental para estabelecer medidas eficazes de manejo. Por muito tempo os principais métodos de identificação dos nematoides das galhas foram baseados nas características morfológicas de fêmeas, machos e juvenis de segundo estágio (Wesemael *et al.* 2011; He *et al.*, 2021). Entretanto, a semelhança das características perineais entre as espécies de fitonematoides pode resultar em menor acurácia da diagnose, além de demandar que fêmeas estejam presentes na amostra (Cunha *et al.*, 2018). *Meloidogyne paranaensis*, por exemplo, foi por muito tempo diagnosticado como *M. incognita*, devido à similaridade dos padrões perineais de ambas as espécies (Cunha *et al.*, 2018). Outra opção de identificação é a utilização de padrões de isoenzimas como base e da resposta da planta hospedeira à infecção. No entanto, apenas fêmeas maduras podem ser usadas para identificação das espécies (Carneiro *et al.*, 2004; Esbenshade *et al.*, 1990; Waliullah *et al.*, 2020).

Os métodos moleculares permitem a diagnose acurada de fitopatógenos, com base na detecção de polimorfismo específicos em regiões do DNA (Humphreys-Pereira & Elling, 2014). Nas últimas décadas vários protocolos moleculares de identificação de espécies de *Meloidogyne* foram desenvolvidos, principalmente baseados em reação em cadeia da polimerase – PCR (Han *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2011; Akyasi & Feleck, 2013; Humphreys-Pereira & Elling, 2014). No entanto, a PCR demanda termocicladores, aparelhos de eletroforese para gel de agarose e fotodocumentadores, o que pode limitar a adoção dessa técnica em laboratórios de rotina em função dos custos desses equipamentos. Nesse contexto, a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP - *Loop-mediated isothermal amplification*) tem o

potencial de ser uma técnica amplamente usada para a diagnose de fitonematoides, por ser acurada, sensível, rápida, não demandar um estágio específico do patógeno e ser relativamente barata.

A técnica permite amplificar ácidos nucleicos em condições isotérmicas, o que pode ser feito usando banho maria ou blocos de aquecimento (Notomi *et al.*, 2000). As reações LAMP geralmente amplificam DNA com maior eficiência em uma temperatura entre 60 e 65°C, em um tempo que pode variar entre 30 e 60 minutos (Niu *et al.*, 2011). Além disso, quando a amplificação ocorre, o resultado pode ser visualizado a olho nu por meio da adição de corantes de ligação de DNA, não requerendo a etapa de eletroforese em gel de agarose (Notomi *et al.*, 2000).

LAMP tem sido utilizado na medicina humana e veterinária, microbiologia e na diagnose de fungos e vírus fitopatogênicos (Karami *et al.*, 2011). Em relação aos fitonematoides já foram desenvolvidos protocolos para *Bursaphelenchus xylophilus* (Kikuchi *et al.*, 2009), *M. incognita* (Niu *et al.*, 2011), *M. enterolobii* (Niu *et al.*, 2012), *Radopholus similis* (Peng *et al.*, 2012), *Tylenchulus semipenetrans* (Lin *et al.*, 2016), *Bursaphelenchus cocophilus* (Ide *et al.*, 2017), *M. hapla* (Peng *et al.*, 2017), *M. mali* (Zhou *et al.*, 2017), *Anguina wevelli* (Yu *et al.*, 2018), *M. chitwoodi* e *M. fallax* (Zhang & Gleason, 2019), *A. agrostis* (Yu *et al.*, 2020), *M. partityla* (Waliullah *et al.*, 2020), e *M. graminicola* (He *et al.*, 2021). Até o momento nenhum protocolo para identificação de *M. exigua* está disponível. Assim, o propósito deste trabalho foi desenvolver um protocolo LAMP para diagnose de *M. exigua*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento e manutenção de inóculos

Populações puras de *M. exigua* e das outras espécies usadas para validação da LAMP foram mantidas em casa de vegetação ou coletadas diretamente em locais infestados, com verificação da identidade e pureza dos inóculos por meio de PCR com primers específicos.

2.2 Extração de DNA

Dois métodos de extração de DNA de nematoides foram usados neste trabalho. Nas etapas de identificação das espécies e de otimização das reações LAMP foi usado o protocolo descrito por Cunha *et al.* (2021). Nas etapas de especificidade (validação) e sensibilidade da LAMP, o DNA foi extraído com uso do kit comercial PureLink® Genomic DNA Mini kit (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante.

2.3 Desenho dos primers

O desenho dos primers LAMP para diagnose de *M. exigua* foi feito usando o software on-line PrimerExplorer v5 (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>) e com base em variações nas regiões 28S rDNA da espécie alvo e de outras espécies do gênero *Meloidogyne*. Três conjuntos de primers foram desenhados para diagnose de *M. exigua* e usados nos experimentos (Tabela 1).

2.4. Otimização da reação

O volume final das reações foi de 25 µL, com variações entre os componentes da reação. O mix foi composto por 2,5 µL de tampão 10X da Bst polimerase (New England Biolabs), 2 µL de dNTPs (10 mM), 0 a 3 µL de MgSO₄ (25 mM, New England Biolabs), 0 a 3 µL de betaína 5 M, 1 µL do primer FIP (20 mmol/L), 1 µL do primer BIP (20 mmol/L), 1 µL do primer F3 (5 mmol/L), 1 µL do primer B3 (5 mmol/L), 1 µL da Bst DNA polimerase (Bst 3.0 DNA polymerase, New England Biolabs), 2 µL de DNA do patógeno. Para otimizar a temperatura e o tempo para visualizar a amplificação, as reações foram conduzidas a 65 °C em termociclador por 60 min.

Nesta etapa de otimização, nenhum método colorimétrico foi usado para averiguação dos produtos da amplificação, apenas a observação de bandas típicas

em padrão de escada após eletroforese em gel de agarose. A eletroforese foi realizada com tampão TBE 1X a 50 V usando gel de agarose 3%, corado com 0,7 µL SYBR Safe (Invitrogen). Marcadores moleculares 100 Base-Pair Ladder® (Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, USA) foram usados para comparação dos produtos da amplificação. O gel foi visualizado em transiluminador de luz UV (Waltec, Model MD-20, 312mm) e, em seguida, fotografado.

Tabela 1. Conjunto de primers usados para diagnose de *Meloidogyne exigua* por meio da técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP).

| Conjunto | Código | Sequência do primer 5' – 3' |
|----------|--------|---|
| 1 | FIP | GCCGACTCTATCCGTTTCCACACTTTGAAGAGAGAG TTAAAGAGG |
| | BIP | TTGCATTTCAGTTGTATCTTCTGACTGCAAGTAAATG CATTACAAACAATC |
| | F3 | GACCGTGAGGGAAAGTTG |
| | B3 | GTCTCAGAAATCCCCACG |
| 2 | FIP | CGTTTCCACCTCACCGGTTTAGTTGCAAAGCACTTT GAAG |
| | BIP | GCGTATCTTGCAAGTATTCATTTGCCAATCATATAAT CCATCTCTGTCC |
| | F3 | TACAAGACCGTGAGGGAA |
| | B3 | GCACCAAGCAAGTAAATGC |
| 3 | FIP | ATACTTGCAAGATACGCCGACTCGAGAGTTAAAGA GGACGTGAA |
| | BIP | TTGCATTTCAGTTGTATCTTCTGACTGCAAGTAAATG CATTACAAACAATC |
| | F3 | AGTTGCAAAGCACTTTGAAG |
| | B3 | TGTCTCAGAAATCCCCAC |

2.5 Especificidade da LAMP

A especificidade de detecção foi avaliada utilizando *M. exigua*, *M. incognita*, *M. paranaensis*. O DNA das espécies foi extraído usando kit comercial PureLink®

Genomic DNA Mini kit (Invitrogen). Para *M. exigua*, foram usadas 15 fêmeas, para *M. incognita* e *M. paranaensis* foram utilizadas 10 fêmeas. A concentração de DNA foi quantificada com uso de espectrofotômetro de ácidos nucleicos (Nanodrop® Lite, ThermoFisher Scientific). As quantidades de DNA utilizadas em cada uma das etapas foram de 2,6 ng μL^{-1} para *M. exigua*, 4,8 ng μL^{-1} para *M. incognita*, e 7,2 ng μL^{-1} para *M. paranaensis*.

As reações LAMP foram realizadas usando o conjunto de primers 2 e a 65 °C, condições selecionadas na etapa de otimização da reação. O tempo de reação selecionado anteriormente foi de 1 hora usando o kit Bst 3.0 DNA polymerase (New England Biolabs). No entanto, nesta etapa utilizou-se um master mix com indicador colorimétrico de amplificação (WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix DNA & RNA, New England Biolabs). Com esse master mix, quando ocorre a amplificação a solução muda a coloração de vermelho (reação negativa) para amarelo (reação positiva). A amplificação ocorreu ao fazer a reação por 1 hora usando esse material, mas só foi possível observar após eletroforese em gel de agarose. Para que houvesse a mudança da coloração, foi necessário manter a reação por 1h15min. Por isso, esse tempo de reação foi adotado.

As reações LAMP foram realizadas em bloco de aquecimento KASVI® K80-01 em volume final de 25 μl contendo 12,5 μl de WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix, 2,5 μl de mix de primers do conjunto de primers FIP (20 μl) BIP (20 μl), F3 (5 μl), B3 (5 μl), 8 μl de água livre de nuclease e 2 μl de DNA.

A detecção da amplificação foi feita de 2 formas: visualização o olho nu da alteração de cor, por meio do indicador de pH contido no master mix; eletroforese em gel de agarose a 2% a 75 V por 60 minutos, com observação das bandas típicas em formato de escada do LAMP.

As reações foram conduzidas três vezes, com três repetições por espécie de nematoide em cada reação.

2.6 Sensibilidade do ensaio LAMP

A sensibilidade da LAMP em comparação com PCR convencional foi avaliada nesta etapa. Para isso, o DNA de 15 fêmeas de *M. exigua* foi extraído usando PureLink® Genomic DNA Mini kit e armazenado a -20 °C até o uso. A concentração de DNA foi de 2,6, quantificada em espectrofotômetro. Para as reações, o DNA foi

usado na concentração original (10^0) ou diluído serialmente de 10^{-1} a 10^{-6} usando água livre de nuclease.

As reações de PCR foram feitas em termociclador (Veriti[®], Applied Biosystems, USA) em um volume final de 15 μ l e usando 3,0 μ l 5X GoTaq[®] G2 PCR buffer (Promega), 0,47 μ l de cada dNTP a 2 mM (Promega), 0,6 μ l de cada primer ex-D15-F e ex-D15-E a 10 μ M, 0,06 μ l de GoTaq[®] G2 (Promega), 2 μ l de DNA (10^0 a 10^{-6}) e 8,33 μ l de água livre de nuclease. Todas as amplificações incluíram controles positivos (com DNA de nematoides) e negativos (sem DNA de nematoides). O DNA foi desnaturado por 10 min a 94 °C; seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 64 °C por 45 segundos, 72 °C por 60 segundos; incluindo um período final de extensão de 72 °C por 8 minutos. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em tampão TBE 1 X a 75 V usando gel de agarose corado com 0,7 μ l SYBR Safe[®] (10.000 x, Invitrogen, Carlsbad, USA). Foram utilizados Marcadores moleculares 100 Base-Pair Ladder[®] (Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, USA) para comparação dos produtos da amplificação. O gel foi visualizado em transiluminador de luz UV (Waltec, Model MD-20, 312mm) e fotografado.

As reações de LAMP foram realizadas conforme descrito no item 2.5, usando DNA não diluído ou diluído de 10^{-1} a 10^{-6} . Os produtos das reações foram observados em eletroforese em gel de agarose (PCR e LAMP), e visualmente a olho nu com uso de colorimetria pelo WarmStart[®].

3. RESULTADOS

3.1. Otimização da reação

Bandas com padrão de escadas, típicas de reações positivas de LAMP, foram observadas em gel de agarose quando DNA de *M. exigua* foi submetido à amplificação por 1 hora a 65 °C usando o conjunto 2 (Figura 1). A reação que resultou em amplificação das amostras continha 2,5 µL de tampão 10X da Bst polimerase, 2 µL de dNTPs, 3 µL de MgSO₄, 3 µL de betaína 5 M, 1 µL do primer FIP (20 mmol/L), 1 µL do primer BIP (20 mmol/L), 1 µL do primer F3 (5 mmol/L), 1 µL do primer B3 (5 mmol/L), 1 µL da Bst DNA polimerase (Bst 3.0 DNA polymerase), 2 µL de DNA do patógeno.

Com base nesses resultados, o conjunto 2 de primers e as condições de reação foram selecionadas para os experimentos seguintes.

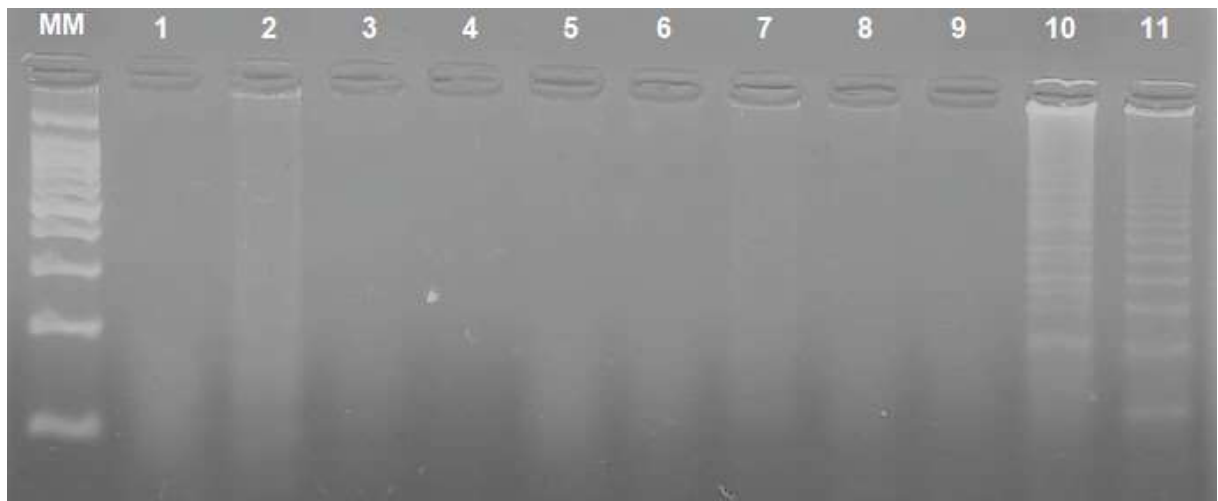


Figura 1. Gel de agarose de produtos de amplificação de amostras de DNA de *Meloidogyne exigua* submetidas à técnica de amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP). MM = marcador molecular 100 pb. Amostras 2, 10 e 11 = Múltiplas bandas (padrão de escada) indicam reação positiva, ou seja, amplificação de DNA. Reações positivas mais evidentes em 10 e 11 = conjunto 2 de primers a 65 °C.

Para que se possa eliminar mais equipamentos e tornar a identificação mais simples, é possível utilizar métodos colorimétricos para monitorar a amplificação, e visualizar o produto a olho nu. Neste estudo, após utilizarmos o mastermix foi possível

visualizar o produto por meio da mudança de coloração de vermelho para amarelo que ocorreram nos tubos com DNA de *M. exigua*, e ao mesmo tempo o controle negativo sem DNA de *M. exigua* permaneceu na coloração vermelha (Figura 2).

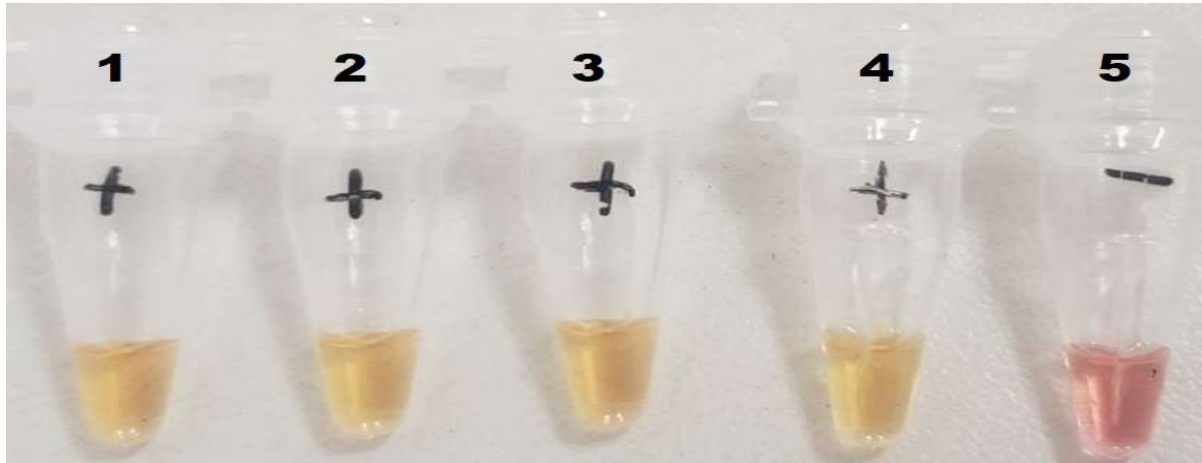


Figura 2. Reações LAMP com amostras de DNA de *M. exigua* coradas com o master mix WarmStart®. Amostras 1, 2, 3, e 4 = Coloração amarela indicando reação positiva (amostras contendo DNA do nematoide). Amostra 5 = Coloração vermelha indicando reação negativa (controle negativo, sem DNA do nematoide).

3.2 Especificidade da LAMP

Como a espécie *M. exigua* é mais importante para a cultura do café, em uma situação de campo as prováveis espécies que podem ser diagnosticadas como negativas pela reação proposta são as espécies mais comumente encontradas na cultura do café. Dessa forma, para validar se os primers desenhados são específicos para *M. exigua*, adicionou-se para reação o DNA de outras duas espécies de *Meloidogyne* spp. que acometem a cultura do café, sendo *M. paranaensis* e *M. incognita*.

Em ambas as formas de monitoramento, gel de eletroforese e colorimetria, foi possível visualizar que a reação proposta amplificou especificamente apenas *M. exigua*. Nenhuma mudança de cor foi observada nos produtos de *M. incognita* e *M. paranaensis*, assim como não foi visualizado o “padrão escada” característico da amplificação por LAMP (Figura 3, Figura 4). Isto validou que os primers desenhados amplificam apenas *M. exigua*, e não *M. paranaensis* ou *M. incognita*.



Figura 3. Teste de especificidade nos ensaios LAMP monitorado a olho nu por colorimetria, corados com o master mix WarmStart®. Amostra 1 = Controle negativo sem DNA. Amostras 2, 3, e 4 = *M. exigua*. Amostras 5, 6, e 7 = *M. incognita*. Amostras 8, 9, e 10 = *M. paranaensis*.

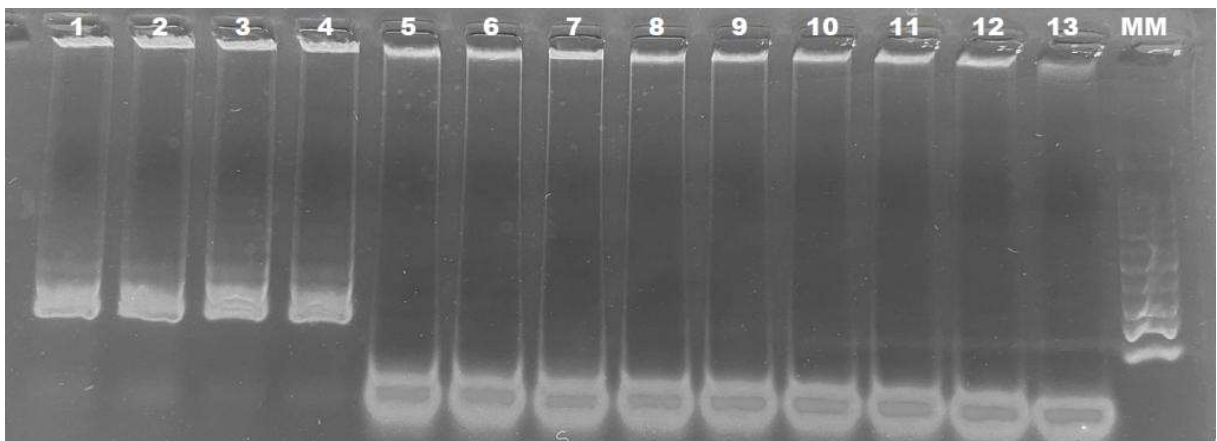


Figura 4. Teste de especificidade nos ensaios LAMP monitorado por gel de eletroforese. Amostra 1, 2, 3, e 4 = DNA amplificado por LAMP visível com “padrão escada”. Amostras 5, 6, 7 e 8 = *M. incognita*. Amostras 9, 10, 11, e 12 = *M. paranaensis*. Amostra 13 = Controle negativo sem DNA. MM = Marcador molecular de 100 pares de bases.

3.3 Sensibilidade da LAMP

Para avaliar a sensibilidade do LAMP foram feitas seis diluições da concentração original de DNA de *M. exigua* ($2,6 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) utilizada nas reações, sendo de 10^{-1} a 10^{-6} . Em ambos os monitoramentos, a olho nu por colorimetria ou por gel de eletroforese, produziram resultados positivos até a diluição de 10^{-6} (Figura 5, Figura 6). Observando o gel de eletroforese (Figura 6) é possível perceber mais facilmente que a partir da diluição 10^{-4} as bandas começam a enfraquecer, embora no

monitoramento por colorimetria não tenha sido possível observar menor coloração. Em suma, a reação amplificou perfeitamente até a quantidade de 0,0026 ng de DNA.

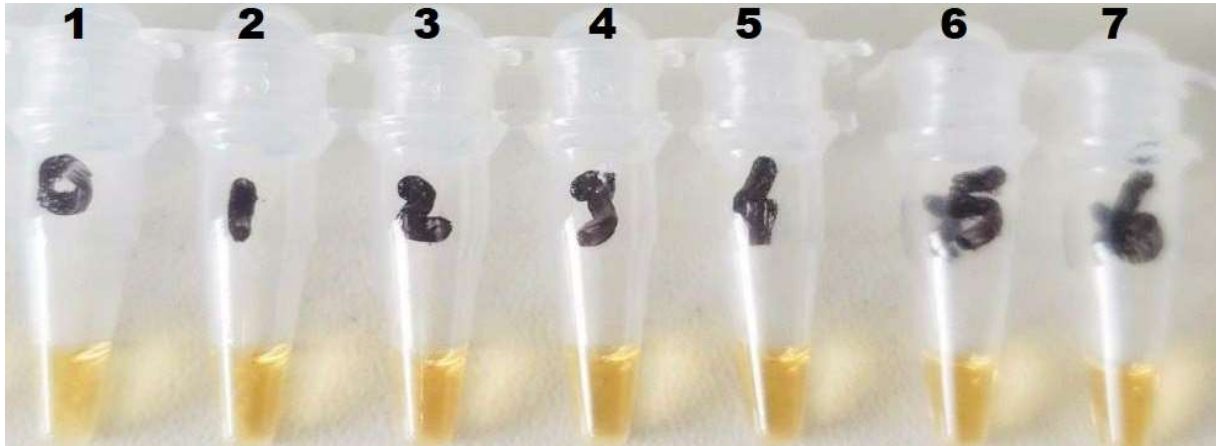


Figura 5. Teste de sensibilidade nos ensaios LAMP, monitoramento por colorimetria. 1 = 10^0 - Sem diluição de DNA. 2 = DNA diluído a 10^1 vezes. 3 = DNA diluído a 10^2 vezes. 4 = DNA diluído a 10^3 vezes. 5 = DNA diluído a 10^4 vezes. 6 = DNA diluído a 10^5 vezes. 7 = DNA diluído a 10^6 vezes.

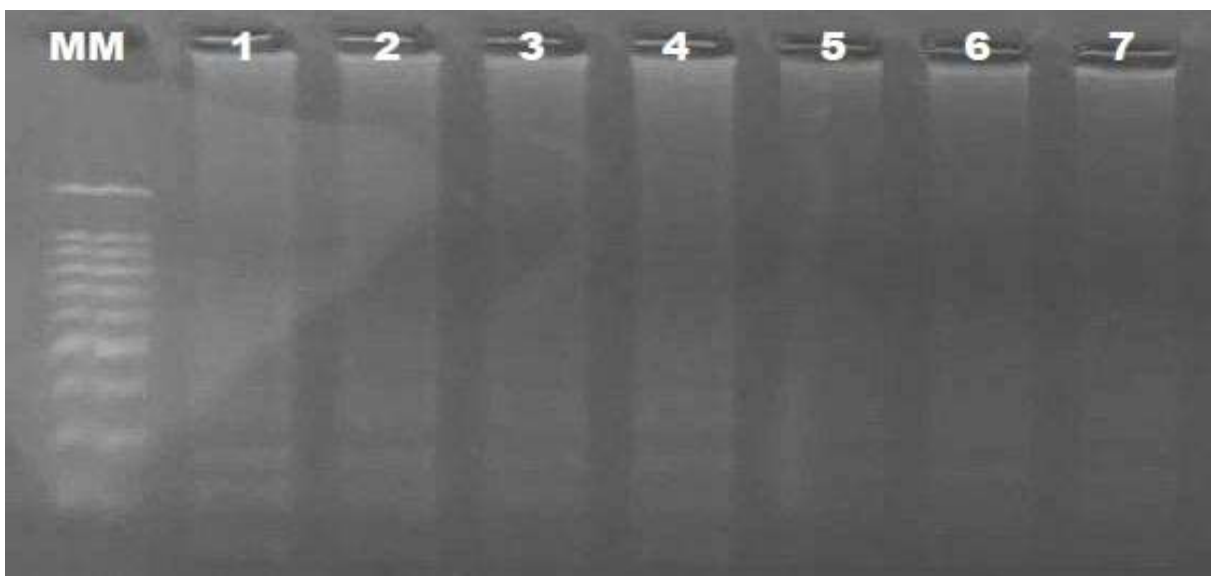


Figura 6. Teste de sensibilidade nos ensaios LAMP, monitoramento por gel de eletroforese. 1 = 10^0 - Sem diluição de DNA. 2 = DNA diluído a 10^1 vezes. 3 = DNA diluído a 10^2 vezes. 4 = DNA diluído a 10^3 vezes. 5 = DNA diluído a 10^4 vezes. 6 = DNA diluído a 10^5 vezes. 7 = DNA diluído a 10^6 vezes. MM = Marcador molecular de 100 pares de bases.

4. DISCUSSÃO

A reação proposta foi capaz de amplificar com sensibilidade, eficiência, rapidez e acurácia, em condições isotérmicas o DNA de *M. exigua*. Isto foi possível com o conjunto 2 de primers propostos, que foram desenhados baseados em variações nas regiões 28S rDNA da espécie alvo. Dessa forma, o LAMP se mostrou uma ferramenta útil para detectar a presença de *M. exigua*, não apenas pelas características consideradas, mas também pela simplicidade e não necessidade de equipamentos caros e dispendiosos.

Considerando a região escolhida para o desenho dos primers, o sucesso da validação da especificidade da reação foi de grande importância, visto que embora a matriz do rRNA seja um alvo atraente para o desenho de primers, a mesma tem grande conservação entre as espécies de *Meloidogyne* spp (Powers & Harris, 1993; Stanton *et al.*, 1997; Powers *et al.*, 1997; Niu *et al.*, 2011). Entretanto, a variação é mais facilmente encontrada nos espaçadores ITS1 e ITS2 (Niu *et al.*, 2011). Para *M. exigua*, os primers desenhados com base nas variações da região 28S foram específicos em relação as outras duas espécies que acometem a cultura do café, *M. incognita* e *M. paranaensis*, entretanto, se o objetivo fosse propor uma reação para *M. paranaensis* e obter especificidade apenas para esta espécie poderia ser um pouco mais complicado, considerando a grande semelhança molecular entre *M. incognita* e *M. paranaensis*, mesmo nos espaçadores transcritos internos ITS1 e ITS2.

O uso do master mix WarmStart® foi outro ponto importante na reação. Ele utiliza fenol vermelho sensível ao pH, fazendo com que sua cor mude de vermelho para amarelo na presença do DNA amplificado (Waliullah *et al.*, 2020). O master mix facilita não apenas no momento da mistura e na visualização a olho nu, mas também a não contaminação da reação, visto que não é necessário abrir o tubo após a reação para adicionar corante de ligação de DNA. A contaminação da reação pode causar alteração no resultado, pois por menor que seja o LAMP é uma técnica sensível.

Neste contexto, é interessante ressaltar a alta sensibilidade do LAMP. A reação não mostrou enfraquecimento na cor pelo monitoramento a olho nu com o master mix WarmStart® mesmo após a diluição até 10^{-6} vezes a partir de $2,6 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de DNA, entretanto mostrou enfraquecimento nas bandas do gel de eletroforese a partir da diluição em 10^{-4} vezes, ou seja, conseguiu amplificar perfeitamente até $0,0026 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$

¹ de DNA. Isto indica provavelmente que o gene selecionado apresenta alta capacidade de cópia, mesmo com a adição de apenas quatro primers na reação.

Utilizando também o mastermix WarmStart[®], (Waliullah *et al.*, 2020) conseguiram boa visualização na amplificação tanto por colorimetria quanto por gel de eletroforese utilizando até 0,001 ng de DNA de *M. partityla*. Indo mais além, Zhang & Gleason (2019) conseguiram visualizar resultados positivos utilizando até 0,0001 ng μL^{-1} de DNA de *M. chitwoodi* raça 1 após diluição. Isso indica que a alta sensibilidade da técnica pode ser variável, dependendo do gene escolhido para o desenho dos primers, e também da quantidade de primers. A alta sensibilidade é algo positivo em função de ser algo que possibilitaria a identificação utilizando o nematoide sem a extração do DNA puro, entretanto é algo que requer mais atenção ainda para a contaminação da amostra para que não resulte em um falso positivo.

Em suma, este estudo desenvolveu um ensaio LAMP preciso, rápido, simples e econômico, que permite identificar positivamente *M. exigua* sem identificar *M. incognita* e *M. paranaensis*. Visto as vantagens dessa técnica, novos estudos são necessários para que possamos ter ensaios LAMP que identifiquem exclusivamente espécies problemáticas como *M. paranaensis*, além de validar a reação já estabelecida para *M. incognita* (Niu *et al.*, 2011) para a cultura do café, e se necessário estabelecer outro ensaio.

5. CONCLUSÕES

- A diagnose de *M. exigua* por LAMP pode ser realizada usando conjunto de primers desenhados neste projeto e com reação realizada a 65 °C por 60 a 75 minutos.
- O ensaio apresentou sensibilidade elevada podendo amplificar perfeitamente até 0,0026 ng μL^{-1} de DNA de *M. exigua*.
- O ensaio apresentou especificidade para *M. exigua* quando comparado com *M. incognita* e *M. paranaensis*.

REFERÊNCIAS

- Akyazi, F., Felek, A.F., 2013. Molecular identification of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* from kiwi fruit orchards in Ordu province, Turkey. *Turkiye Entomoloji Dergisi*, 37, 449-456.
- Alfenas, A.C. 2006. Eletroforese e Marcadores Bioquímicos em Plantas e Microrganismos. Viçosa: Editora UFV, 627p.
- Bellé, C., Kulczynski, S.M., Kaspary, T.E., Kuhn, P.R., 2017. Plantas daninhas como hospedeiras alternativas para *Meloidogyne incognita*. *Nematropica*, 47, 26-33
- BONETI, J.I.S., FERRAZ, S., 1981. Modificação do método de Hussey e Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* no cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6, 553.
- Carneiro, R., Randig, O., Sarah, J-L., Tigano, M., Almeida, M.R., 2004. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp.(Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology*. 2004; 6, 287–298.
- Castagnone-Sereno, P., Esparrago, G., Abad, P.; Leroy, F., Bongiovanni., 1995. M. Satellite DNA as a target for PCR-specific detection of the plant-parasitic nematode *Meloidogyne hapla*. *Current Genetics*, 28, 66–570.
- Castro, J.M.C.; Campos, V.P., Dutra, M.R., 2004. Ocorrência de *Meloidogyne coffeicola* em cafeeiros do município de Coromandel, Região do Alto Paranaíba em Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, 29, 227.
- Castro, J.M.C.; Naves, R.L., Campos, V.P., 2003. Ocorrência de *Meloidogyne paranaensis* em cafeeiro na região do Alto Paranaíba em Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 565.
- CECAFE – CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL. Relatório mensal de exportações abril 2020. Disponível em: <

<https://www.cecafe.com.br/publicacoes/relatorio-de-exportacoes>>. Acesso em: 15 mai. 2020.

Chitwood, D. J., 2003. Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service. *Pest Management Science*, 59, 748-753.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: Café, vol. 6, n. 1, Safra 2020, 62 p. Brasília.

Contarato, C., Tomaz, M.A., Alves, F.R., Sombreira, F.M.; Junior, W.C.J., Rabello, L.K.C., Ferrão, M.A.G.; Ferrão, R.G., 2014. Reaction of Cultivar *Coffee* 'Vitória INCAPER 8142' of Conillon to parasitism of *Meloidogyne exigua*. *Idesia*, 32, 93-97.

Cunha, T.G.; Visôto, L.E.; Pinheiro, L.M.; Good God, P.I.V.; Rosa, J.M.O.; Oliveira, C.M.G.; Lopes, E.A., 2021. Distribution of *Meloidogyne* species in carrot in Brazil. *Ciência Rural*, 51: e20200552.

Donoso, A., Valenzuela, S., 2018. In-field molecular diagnosis of plant pathogens: recent trends and future perspectives. *Plant Pathology*, 67, 1451-1461.

Esbenshade, P.R., Triantaphyllou, A.C., 1990. Isozyme phenotypes for the identifications of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 22, 10-15.

Goulart, R.R., Terra, W.C., Salgado, S.M.L., Alves, J.D., Campos, V.P., Fatobene, B.J.R., Marchiori, P.E.R., Souza, S.R., Oliveira, R.D'A.L., 2019. *Meloidogyne paranaensis* and *M. exigua* alter coffee physiology. *Nematology*, 21, 459-467.

Han, H., Cho, M.R., Jeon, H.Y., Lim, C.K., Jang, H.I., 2004. PCR-RFLP identification of three major *Meloidogyne* species in Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 7, 171–175.

Hartman, R.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. An advanced treatise on *Meloidogyne*. Vol. 2. Methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 69-77.

He Q., Wang D., Tang B., Wang J., Zhang D., Liu Y., Cheng F., 2021. Rapid and sensitive detection of *Meloidogyne graminicola* in soil using conventional PCR, loop-mediated isothermal amplification, and real-time PCR methods. *Plant Disease*, 105: 456-463.

Humphreys-Pereira, D.A., Elling, A.A., 2014. Mitochondrial genomes of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. incognita* (Nematoda: Tylenchina): comparative analysis, gene order and phylogenetic relationships with other nematodes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 194, 20-32.

Ide, T., Kanzaki, N., Parra Giraldo, P.P., Giblin-Davis, R. M., 2017. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of the red ring nematode. *Nematology*, 19, 559-565.

Jenkins, W.R., 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant disease reporter*, 48, 692.

Kang, J.S., Kim, A.Y., Han, H.R., Moon, Y.S., Koh, Y.H., 2015. Development of two alternative Loop-mediated isothermal amplification tools for detecting pathogenic pine wood nematodes. *Forest Pathology*, 45, 127-133.

Karami, A., Gill, P., Motamedi, M., Saghafinia, M.A., 2011. Review of the current isothermal amplification techniques: Applications, advantages and disadvantages. *Journal of Global Infectious Diseases*, 3, 293-302.

Kikuchi, T., Aikawa, T., Oeda, Y., Karim, N., Kanzaki, N., 2009. A rapid and precise diagnostic method for detecting the Pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathology*, 99, 1365-1369.

Lin, B., Wang, H., Zhuo, K., Liao, J., 2016. Loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Tylenchulus semipenetrans* in soil. *Plant Disease*, 100, 877-883.

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.

Mitkowski, N.A., Abawi, G.S. Nematóides de galhas. (Portuguese translation by E.A. Lopes, R. Dallemole-Giaretta and B.S. Vieira, 2011). *The Plant Health Instructor*, 2003. Disponível em: <DOI:10.1094/PHI-I-2011-03-29-01>. Acesso em 15 mai 2020.

Moens. M., Perry, R.N., Starr, J. L., 2009. *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: MOENS. M.; PERRY, R.N.; STARR, J.L. Root-knot Nematodes. 1.ed Cambridge: CABI. cap. 1, 1-13.

Niu, J.H., Guo, Q.X., Jian, H., Chen, C.L., Yang, D., Lin, Q., Guo, Y.D., 2011. Rapid detection of *Meloidogyne* spp. by LAMP assay in soil and roots. *Crop Protection*, 30, 1063-1069.

Niu, J.H., Jian, H., Guo, Q.X., Chen, C.L., Wang, X.Y.; Lin, Q., Guo, Y.D., 2012. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays based on 5S rDNA-IGS2 regions for detecting *Meloidogyne enterolobii*. *Plant Pathology*, 61, 809-819.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28, e63.

OEPP/EPPO Bulletin. 2016. PM 7/41 (3) *Meloidogyne chitwoodi* and *Meloidogyne fallax*. EPPO Bull. 46, 171-189, 2016.

Oliveira, C.M.G., Monteiro, A.R., Blok, V.C., 2011. Morphological and molecular diagnostics for plant parasitic nematodes: working together to get the identification done. *Tropical Plant Pathology*, 36, 65-73.

Peng, H., Long, H., Huang, W., Liu, J., Cui, J., Kong, L., Hu, X., Gu, J., Peng, D., 2017. Rapid, simple and direct detection of *Meloidogyne hapla* from infected root galls using loop mediated isothermal amplification combined with FTA technology. *Scientific Reports*, 7, 44853.

Peng, H., Peng, D. L., Hu, X. Q., He, X. F., Wang, Q., Huang, W. K., He, W. T., 2012. Loop-mediated isothermal amplification for rapid and precise detection of the burrowing nematode, *Radopholus similis*, directly from diseased plant tissues. *Nematology*, 14, 977-986.

Powers, T.O., Harris, T.S., 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne spp.* *Journal of Nematology*, 25, 1-6.

Powers, T.O., Todd, T.C., Burnell, A.M., Murray, P.C.B., Fleming, C.C., Szalanski, A.L., Adams, B.A., Harris, T.S., 1997. The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *Journal of Nematology*, 29, 441-450.

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.

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.

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.

Sasser, J.N., Freckman, D.W., 1987. A world perspective on nematology: The role of society. Pages 7-14 in: *Vistas on Nematology: A Commemoration of the Twenty-fifth Anniversary of the Society of Nematologist*. J. A. Veech , D.W. Dickson, eds. Society of Nematologists, Lakeland, FL.

Stanton, J., Hugall, A., Moritz, C., 1997. Nucleotide polymorphisms and an improved PCR-based mtDNA diagnostic for parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne*). *Fundamental and Applied Nematology*, 20, 261-268.

Waliullah, S., Bell, J., Jagdale, G., Stackhouse, T., Hajihassani, A., Brenneman, T., Ali, M., E. Rapid detection of pecan root-knot nematode, *Meloidogyne partityla*, in laboratory and field conditions using loop-mediated isothermal amplification. *Plos One*, 15, e0228123.

Wesemael, W.M.L., Viaene, N., Moens, M., 2011. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe. *Nematology*, 13, 3-16.

Yu, L., Song, S., Yu, C., Jiao, B., Tian, Y., Li, Y., 2020. Rapid detection of *Anguina agrostis* by loop-mediated isothermal amplification. *European Journal of Plant Pathology*, 156, 819–825.

Yu, L., Song, S.-Y., Yu, C., Qi, L., Yu, Z., Jiao, B., Yang, J., 2018. A loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid and reliable detection of *Anguina wevelli*, a grass parasitic nematode. *European Journal of Plant Pathology*, 150, 725-734.

Zhang, L., Gleason, C., 2019. Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Diagnostic Detection of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*. *Plant Disease*, 103, 12-18.

Zhou, Q., Cai, Y., Gu, J., Wang, X., Chen, J., 2017. Rapid and sensitive detection of *Meloidogyne mali* by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *European Journal of Plant Pathology*, 148, 755-769.