

DAGOBERTO SAUNDERS DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE *Meloidogyne exigua*  
ASSOCIADAS A CAFEEIROS NA ZONA DA  
MATA DE MINAS GERAIS**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2002

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

O48c  
2002

Oliveira, Dagoberto Saunders de, 1977-

Caracterização de populações de *Meloidogyne exigua*  
associadas a cafeeiros na Zona da Mata de Minas Gerais /  
Dagoberto Saunders de Oliveira. – Viçosa : UFV, 2002.  
48p. : il.

Orientador: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de  
Viçosa

1. *Meloidogyne exigua* - Caracterização. 2. Eletrofo-  
rese de iso-enzimas. 3. *Meloidogyne exigua* - Morfologia.  
4. Plantas hospedeiras - Nematóides fitopatogênicos. 5.  
Café - Doenças e pragas. I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 595.18204524

CDD 20.ed. 595.18204524

DAGOBERTO SAUNDERS DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE *Meloidogyne exigua*  
ASSOCIADAS A CAFEEIROS NA ZONA DA  
MATA DE MINAS GERAIS**

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

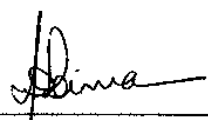
APROVADA: 2 de abril de 2002.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Acelino Couto Alfenas  
(Conselheiro)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Leandro Grassi de Freitas  
(Conselheiro)

  
\_\_\_\_\_  
Profª Hermínia Emília Preto Martinez

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Silmar Ferraz

  
\_\_\_\_\_  
Profª Rosângela D'Arc de Lima Oliveira  
(Orientadora)

*Aos meus pais José Xavier de Oliveira e  
Maria Tarcila Saunders de Oliveira.  
Aos meus irmãos Déborah, Higo, Ravic,  
Renée, Safira e Tarvi.  
À minha esposa Maria Andréa Borges Cavalcante.*

## **AGRADECIMENTO**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do Programa de Pós-Graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Rosângela D'Arc de Lima Oliveira, pela orientação.

Aos professores Leandro Grassi de Freitas, Acelino Couto Alfenas, Silamar Ferraz e Hermínia Emília Prieto Martinez, pelas sugestões e informações necessárias à correção deste trabalho.

Ao professor Vicente Paulo Campos (UFLA), e à pesquisadora Estela Dalva (CEPLAC), pelo envio de materiais indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao Consórcio Brasileiro para Pesquisa e Desenvolvimento do café (CBP&D/café), pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

Ao pesquisador Antônio Alves Pereira (EPAMIG), pelo apoio na realização deste trabalho.

Aos colegas de turma Alexandre, Cléia, Dirceu, Eduardo, Suzuki, Raquel e Renato.

Ao bolsista Rodrigo Vieira da Silva, pela grande contribuição para a realização deste trabalho.

Ao amigo José Mauro da Cunha e Castro, pelo apoio dado neste trabalho.

Aos colegas da Nematologia Cláudia, Edson e Fábio.

Aos amigos Cândia, Clara, Diolino, Leopoldo e Magno.

Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

DAGOBERTO SAUNDERS DE OLIVEIRA, filho de José Xavier de Oliveira e Maria Tarcila Saunders de Oliveira, nasceu em 16 de agosto de 1977, em Fortaleza, Ceará.

Em agosto de 1999, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza, Ceará.

Em fevereiro de 2000, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, em nível de Mestrado, na área de Nematologia, na Universidade Federal de Viçosa.

## CONTEÚDO

	<b>Página</b>
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1. Coleta e multiplicação das populações de <i>Meloidogyne</i> spp. ....	12
2.2. Caracterização morfológica das populações de <i>Meloidogyne</i> spp. ....	13
2.3. Caracterização isoenzimática das populações de <i>Meloidogyne</i> spp. ....	13
2.4. Gama de hospedeiros das populações de <i>Meloidogyne</i> spp. ....	15
3. RESULTADOS.....	17
3.1. Caracterização morfológica das populações de <i>Meloidogyne</i> spp. ....	17
3.2. Caracterização isoenzimática das populações de <i>Meloidogyne</i> spp. ....	17
3.3. Gama de hospedeiros das populações de <i>Meloidogyne</i> spp. ....	23
4. DISCUSSÃO .....	27
5. CONCLUSÕES .....	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
APÊNDICE .....	45

## RESUMO

OLIVEIRA, Dagoberto Saunders, M.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2002. **Caracterização de populações de *Meloidogyne exigua* associadas a cafeeiros na Zona da Mata de Minas Gerais.** Orientadora: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira. Conselheiros: Acelino Couto Alfenas e Leandro Grassi de Freitas.

Para determinar a ocorrência e variabilidade de *Meloidogyne* spp. em cafeeiros da região da Zona da Mata de Minas Gerais, 57 populações de 16 municípios foram avaliadas pela caracterização morfológica e enzimática e pela gama de hospedeiros. Todas as populações foram identificadas como *M. exigua* por meio das configurações perineais, mas as populações de São João do Manhuaçu mostraram perineal similar àquela de *M. arenaria*. Contudo, a identificação de todas as populações como *M. exigua* foi confirmada por fenótipos de esterase, malato desidrogenase, superóxido dismutase e glutamato oxaloacetato transaminase. Treze populações apresentaram o fenótipo de esterase típico de *M. exigua* (VF1), enquanto a maioria das populações (77,2%) exibiu o fenótipo de duas bandas (VF2). Nenhuma variabilidade fisiológica intra-específica foi observada nas populações estudadas, e todas elas foram capazes de se reproduzir em plantas de tomate, pimentão, cacau, cebola, feijão e soja. A reprodução dessas populações em plantas de tomate e pimentão foi maior do que em mudas de cafeeiro, utilizadas como padrão de suscetibilidade.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Dagoberto Saunders, M.S., Universidade Federal de Viçosa, April 2002. **Characterization of populations of *Meloidogyne exigua* associated the coffee crop in the Zona da Mata of Minas Gerais State.** Adviser: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira. Committee Members: Acelino Couto Alfenas and Leandro Grassi de Freitas.

Minas Gerais State is the most important producer of coffee (*Coffea arabica*) in Brazil and 28% of its production occurs in the Zona da Mata region. Four major species of root-knot nematodes attacking coffee plants have been reported in Brazil, and some of them can cause plant death. The correct identification of species and, or race (s) of *Meloidogyne* present in roots of coffee is extremely important in deciding which measures are more appropriate for controlling the pathogens. In order to determine the occurrence and variability of *Meloidogyne* spp. in the region, 57 populations from 16 locations were evaluated based on morphologic, enzymatic and physiologic traits. All the 57 populations were identified as *Meloidogyne exigua* based on their perineal patterns, but the populations from São João do Manhuaçu showed perineal pattern very similar to *M. arenaria*. Even though, the identification of all populations was confirmed by phenotypes of esterase, malate dehydrogenase, sulfoxide dismutase and glutamate oxaloacetate transaminase. Thirteen populations presented the typical esterase phenotype showed by one band (VF1), while most of the populations (77,2%)

exhibit a phenotype showed by two bands (VF2). No intraspecific physiological variability was observed in the studied populations, and all of them were able to reproduce on tomato (*Lycopersicon esculentum*), pepper (*Capsicum annuum*), cocoa (*Theobroma cacao*), onion (*Allium cepa*), bean (*Phaseolus vulgaris*) and soybean (*Glycine max*). The reproduction of those populations on tomato and on pepper plants was higher than on coffee seedlings (standard of susceptibility).

## 1. INTRODUÇÃO

O café é considerado um dos principais produtos agrícolas do mercado mundial, sendo cultivado em mais de 50 países. Das espécies do gênero *Coffea*, em número aproximado de 80, apenas *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre ex Froehner são cultivadas, sendo a primeira responsável por cerca de 75% do café comercializado no mundo (GONÇALVES e SILVAROLLA, 2001).

A cafeicultura mundial ocupa uma área superior a 11 milhões de hectares, com produção média anual em torno de 97 milhões de sacas de 60 kg. O Brasil, maior produtor e exportador, é responsável por 28% desta produção e possui um parque cafeeiro com cerca de 6 bilhões de pés em aproximadamente 2,6 milhões de hectares (CONAB, 2001).

A cadeia produtiva brasileira de café movimenta, anualmente, cerca de 3,4 bilhões de dólares, sendo os setores industrial, de exportação e de café solúvel responsáveis por 1,5, 1,8 e 0,1 bilhões de dólares, respectivamente. Finalmente, vale salientar a importância social da cafeicultura brasileira, responsável por cerca de 9 milhões de empregos diretos e indiretos (CAIXETA, 2001).

O Estado de Minas Gerais lidera a produção brasileira de café, cuja safra 2001/2002 está estimada em 12,2 milhões de sacas, o que equivale a 43% da produção nacional (CONAB, 2001). As principais regiões cafeeiras do Estado são a Sul, com 49,2% da produção, a Zona da Mata, com 28,1%

e o Cerrado (Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba), com 22,7%. Essas regiões fornecem, naturalmente, condições favoráveis à produção de cafés finos e especiais, que alcançam valor diferenciado no mercado, principalmente o internacional. A Zona da Mata, que já foi considerada uma região produtora de cafés de baixa qualidade, hoje ostenta o título de uma das regiões que produzem um dos melhores cafés do mundo, tendo conquistado vários prêmios internacionais pela excelente qualidade de bebida de seus cafés (MELLO, 2001).

Dentre os diversos entraves à produtividade do cafeeiro, os de natureza fitossanitária merecem especial atenção. Destes se destacam os nematóides, que ocasionam redução significativa na produção e, em alguns casos, até o abandono da atividade cafeeira (GONÇALVES e SILVAROLLA, 2001). Até o presente, pelo menos 40 espécies, pertencentes a 31 gêneros de fitonematóides têm sido encontradas associadas a raízes de cafeeiros no Brasil, mas poucas são as que apresentam boa adaptação, disseminação e capacidade de causar prejuízos à cafeicultura (LIMA, 1993; CAMPOS, 1997; MONTEIRO et al., 2001).

GOTOH (1985) relatou que *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filipjev & Schuurmans Stekhoven e *P. coffeae* (Zimmermann) Goodey podem causar redução no sistema radicular, desenvolvimento retardado, desfolhamento e fortes sintomas de deficiência nutricional em cafeeiros. Mas essas espécies, apesar de ocorrerem com freqüência em plantações de café no Brasil, aparentemente não têm causado danos expressivos. Na Índia, *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira impede o estabelecimento de lavouras de *C. arabica* em áreas com populações acima de 100 espécimes/100 cm<sup>3</sup> de solo. No Brasil, ainda não se conhecem danos causados por essa espécie (CAMPOS, 1997).

A ampla distribuição e disseminação das espécies do gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1887 nos cafezais brasileiros, aliada à sua alta capacidade reprodutiva e agressividade, torna os nematóides de galhas responsáveis por 15% da redução total da produção nacional de café, em relação aos 20% de prejuízos causados por todos os fitonematóides (LORDELLO, 1984). Das 80 espécies relatadas de *Meloidogyne*, 17 infectam o cafeeiro em todo o mundo; destas, *M. exigua* Goeldi, *M. javanica* (Treub.)

Chitwood, *M. hapla* Chitwood, *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *M. paranaensis* Carneiro et al. e *M. coffeicola* Lordello & Zamith já foram encontradas associadas à cultura no Brasil (GONÇALVES e SILVAROLLA, 2001). Com base nos sintomas que causam em cafeeiro, elas podem ser separadas em dois grupos. No primeiro encontram-se *M. exigua*, *M. javanica* e *M. hapla*, que causam galhas radiculares, e no segundo, *M. incognita*, *M. paranaensis* e *M. coffeicola*, que causam descascamentos, necroses, lesões e redução do sistema radicular (CAMPOS, 1997).

As espécies do primeiro grupo são menos agressivas e causam problemas, principalmente, em cafezais submetidos a condições de estresse (GONÇALVES, 1992). A espécie-tipo do gênero, *M. exigua*, é a que tem maior distribuição e disseminação nos cafezais brasileiros e sua ocorrência é freqüente mesmo em regiões cafeeiras emergentes de Minas Gerais e da Bahia (SOUZA et al., 2000; PINHEIRO et al., 2000). Essa espécie causa galhas tipicamente arredondadas e em maior número nas raízes mais novas e superficiais. As galhas são inicialmente brancas a amarelo-amarronzadas e se tornam, com o tempo, marrom-escuras. Nas raízes velhas não se observam galhas. As mudas infectadas e os cafezais novos infestados apresentam crescimento reduzido, clorose, queda de folhas e muitas plantas não sobrevivem na estação seca. Porém, dependendo do tipo de solo, os cafeeiros infectados no estágio adulto podem apresentar recuperação satisfatória quando submetidos a um bom manejo cultural (LORDELLO, 1984; CAMPOS, 1997).

Segundo CARNEIRO e ALMEIDA (2000), os hospedeiros diferenciadores da Carolina do Norte (HARTMAN e SASSER, 1985), quando inoculados com *M. exigua*, permitem a diferenciação de quatro possíveis raças fisiológicas. A raça 1, cujos indivíduos não conseguem parasitar o tomateiro, mas conseguem parasitar o pimentão; a raça 2, constituída de indivíduos que são capazes de parasitar o tomateiro e o pimentão, e a raça 3, à qual pertencem os indivíduos que não parasitam o tomateiro e nem o pimentão. Populações em que os indivíduos parasitam somente o tomateiro ainda não foram relatadas.

O parasitismo de *M. javanica* em cafeeiro *C. arabica* foi relatado pela primeira vez no Estado do Ceará (PONTE e FREIRE, 1971). Posteriormente,

esse nematóide foi constatado em cafezais do Distrito Federal (SHARMA e SAMPAIO, 1985) e de São Paulo (GARCIA et al., 1988). Há também relatos desse nematóide associado a cafeeiros na Tanzânia, no Zaire, em El Salvador, em Cuba, em São Tomé e Príncipe e na Índia (CAMPOS et al., 1997). Segundo SHARMA e SAMPAIO (1985) e GARCIA et al. (1988), *M. javanica* causa galhas semelhantes às aquelas provocadas por *M. exigua*, mas trabalhos posteriores geraram controvérsias sobre a capacidade de *M. javanica* parasitar cafeeiros. VOVLAS e DI VITO (1991) estudaram, em casa de vegetação, os efeitos de diferentes concentrações populacionais de *M. javanica* no desenvolvimento de *C. arabica* 'São Tomé' e observaram que a reprodução do nematóide foi muito baixa. SANTOS e TRIANTAPHYLLOU (1993) verificaram que populações de *M. javanica*, identificadas pelo fenótipo de esterese, não foram capazes de parasitar cafeeiros. ARAYA e CASWELL-CHEN (1995) verificaram que juvenis de segundo estágio (J2) de uma população californiana de *M. javanica* penetraram nas raízes de *C. arabica* 'Caturra' e 'Catuaí', mas o desenvolvimento e a reprodução do nematóide não foram observados. Além disto, não foram encontradas galhas nas raízes e o crescimento da planta não foi afetado. Resultados semelhantes foram encontrados por OLIVEIRA et al. (1998), em cafeeiros *C. arabica* 'Catuaí'. Essa divergência de resultados provavelmente se deve à identificação imprecisa de *M. javanica* nos trabalhos mais antigos, uma vez que a diagnose era baseada apenas em caracteres morfológicos, enquanto nos trabalhos mais recentes, além da identificação com base em configurações perineais, emprega-se a eletroforese de isoenzimas. Outra possibilidade é a existência de variabilidade, ainda não estudada nessa espécie.

LORDELLO e MONTEIRO (1974) mencionaram a primeira ocorrência de *M. hapla* em cafezais brasileiros no município de São Manuel, no Estado de São Paulo. Segundo os autores, esse fitonematóide causa, em cafeeiro, galhas de diferentes tamanhos, semelhantes às provocadas por *M. exigua*; induz à emissão de raízes laterais a partir das galhas, característica do ataque desse nematóide em diversas outras culturas; além de necroses nos tecidos onde se encontram os nematóides. Também na Tanzânia, no Zaire, no Quênia, no Congo e na Índia, cafeeiros são parasitados por esse nematóide (CAMPOS et al., 1997).

As espécies de *Meloidogyne* que causam destruição do sistema radicular foram e ainda são um dos principais fatores que ocasionam o abandono da atividade cafeeira em alguns municípios do norte do Paraná e do oeste de São Paulo (CAMPOS et al., 1985). Destas, *M. incognita*, que possui ampla distribuição geográfica, com incidência mais generalizada em regiões de solos arenosos, é a que tem causado os danos mais sérios em áreas produtoras de café, inclusive morte de plantas. A alta persistência no solo, a baixa eficiência do controle químico, a existência de raças fisiológicas e a destruição do sistema radicular do cafeeiro fazem com que *M. incognita* constitua fator limitante, tanto na implantação de novos cafezais onde ele ocorre, como na manutenção das lavouras contaminadas (GONÇALVES e SILVAROLLA, 2001).

A espécie *Meloidogyne coffeicola* foi constatada e descrita pela primeira vez em 1960, no Paraná (LORDELLO e ZAMITH, 1960). Posteriormente, verificou-se que esse nematóide encontrava-se bastante disseminado, principalmente no norte deste Estado e em São Paulo (LORDELLO et al., 1974). Esse patógeno causa leve engrossamento e rachaduras na região cortical, onde os ovos são depositados. As raízes infectadas apresentam pequenas manchas, muito numerosas, correspondendo às massas de ovos. Os sintomas na parte aérea são representados por clorose foliar, queda de folhas e declínio generalizado na planta, com redução no crescimento e morte (CARNEIRO et al., 1996). Devido à erradicação das lavouras atacadas, à ocorrência de poucos hospedeiros e, praticamente, por não infectar mudas de cafeeiro, essa espécie encontra-se atualmente pouco disseminada nessas regiões cafeeiras. Em Minas Gerais, esse fitonematóide foi constatado em apenas uma propriedade no município de Machado, cujo foco foi erradicado (GUERRA NETO et al., 1983).

*Meloidogyne paranaensis* foi descrita como uma nova espécie por CARNEIRO et al. (1996), a partir do já conhecido biótipo IAPAR de *M. incognita*, cuja ocorrência, até então, estava limitada ao Estado do Paraná. Atualmente, essa espécie já se encontra disseminada em São Paulo (LORDELLO e LORDELLO, 2001), enquanto em Minas Gerais há apenas um relato de sua ocorrência (SANTOS, 1997). Esse nematóide causa

rachaduras e degradação dos tecidos corticais, especialmente da raiz principal. Manchas necróticas são observadas ao longo da raiz onde ocorrem as fêmeas. Os sintomas da parte aérea são semelhantes aos causados por *M. coffeicola* (CAMPOS, 1997).

O controle de nematóides do gênero *Meloidogyne* é, de modo geral, operação difícil de ser realizada, pois sua erradicação é praticamente impossível (CAMPOS, 1997). Além disto, é necessário conhecer bem as espécies que ocorrem nas áreas cafeicultoras, para controlá-las com eficiência. As medidas preventivas são as mais eficientes para evitar as perdas causadas por esses nematóides. Estas medidas iniciam-se no planejamento do cafezal, dando-se preferência a solos onde o café não tenha sido cultivado, ou mesmo culturas suscetíveis aos nematóides parasitas do cafeeiro. Além disso, antes do plantio é importante realizar amostragens do solo e das raízes das plantas presentes no local, das culturas e das ervas daninhas, para exames nematológicos. Deve-se evitar o plantio em áreas que, pela sua localização, possam receber enxurradas e trânsito provenientes de cafezais infestados por fitonematóides.

Apesar das normas proibitivas que controlam a comercialização de mudas de café infectadas por nematóides do gênero *Meloidogyne*, estas se tornaram o meio mais eficiente de disseminação desses parasitas à longa distância (GONÇALVES e SILVAROLLA, 2001). As mudas utilizadas devem ser comprovadamente isentas desses fitonematóides, adquiridas de viveiristas idôneos e registrados, ou de preferência produzidas na própria propriedade. Em Minas Gerais, o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) é o responsável pelo programa de certificação de mudas, amostragem e análise, sendo obrigatório o seu aval para a comercialização. Os lotes com mudas infectadas por *Meloidogyne* spp. são destruídos, visando impedir a disseminação de espécies pouco freqüentes ou, mesmo, restringir espécies amplamente disseminadas, como *M. exigua*, para áreas isentas.

É extremamente importante evitar o transporte de mudas não certificadas de uma região cafeeira para outra, notadamente mudas oriundas de regiões onde predominam as espécies de *Meloidogyne* mais agressivas ao cafeeiro, como por exemplo, *M. incognita* e *M. paranaensis*. Tal prevenção se aplica principalmente às mudas produzidas nas regiões

cafeiras em solos de arenito dos Estados de São Paulo e Paraná (KRZYŻANOWSKI et al., 2001; LORDELLO et al. 2001).

Nos cafezais em que o ataque dos nematóides está no início e comumente ocorrendo em reboleiras, é conveniente promover a destruição e o isolamento dos focos iniciais. Recomenda-se, após a eliminação das plantas atacadas, o plantio de mucuna-preta ou crotalária para baixar a população do nematóide antes do plantio de mudas enxertadas em porta-enxerto resistente, pois mesmo estas podem sofrer danos severos quando são submetidas à alta população do nematóide, principalmente com as espécies mais agressivas de *Meloidogyne* (GONÇALVES e SILVAROLLA, 2001).

O manejo químico dos fitonematóides em cafezais infestados tem sido realizado quase que exclusivamente com nematicidas sistêmicos granulados ou de contato, organofosforados e organocarbamatos, que atuam diminuindo o nível populacional desses parasitas por um determinado período (CAMPOS et al., 1990). Os nematicidas mais comumente utilizados na cafeicultura são aldicarb, carbofuran, terbufós e outros que, aplicados em doses adequadas, são efetivos no decréscimo da população dos nematóides *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*, em torno de três a quatro meses após a aplicação (GUIMARÃES FILHO et al., 1992; NOVARETTI et al., 1997, 2001; LUSVARGHI e SANTOS, 1997; SOUZA et al., 1997). Com relação a *M. exigua*, os cafeeiros implantados em solos infestados pelo nematóide e tratados durante seis anos consecutivos com aldicarb e carbofuran produziram em média nas quatro primeiras safras, 30,9% a mais do que cafeeiros infectados e não-tratados (LORDELLO et al., 1990). Deve-se, porém, acrescentar que os nematicidas não erradicaram esses patógenos (GONÇALVES e SILVAROLLA, 2001). Embora o ingrediente vá atuar em quaisquer fitonematóides no solo, o conhecimento das espécies presentes pode ajudar a prever a efetividade do controle, pois plantas atacadas por *M. incognita* e *M. paranaensis* não se recuperam totalmente, mesmo com o manejo químico.

O manejo economicamente mais viável no controle desses patógenos, quando presentes em uma área, é o uso de material resistente, principalmente como porta-enxerto. Ao contrário do que se verifica em

*C. arabica*, fontes de resistência aos nematóides do gênero *Meloidogyne* têm sido encontradas em outras espécies de café. Do ponto de vista do aproveitamento, como porta-enxerto ou para os trabalhos de melhoramento, as espécies *C. canephora*, *C. congensis* e *C. dewevrei* são as que apresentam maior interesse. Diversos autores têm reportado a resistência de *C. canephora*, *C. congensis*, *C. dewevrei*, *C. liberica*, *C. racemosa* e *C. salvatrix* a *M. exigua* (CURI et al., 1970; FAZUOLI e LORDELLO, 1977; 1978; RIBEIRO et al., 2001). Com relação a *M. incognita* e *M. paranaensis*, trabalhos conduzidos em campo e, ou, em casa de vegetação, sobre a reação de cafeeiros a esses parasitas, revelaram plantas resistentes pertencentes a *C. canephora* e *C. congensis*, porém a grande maioria segregou para a resistência (FAZUOLI et al., 1978, 1983; GONÇALVES e FERRAZ, 1987; LIMA et al., 1987; GONÇALVES et al., 1988, 1996). CARNEIRO FILHO e YAMAGUCHI (1995), ao estudarem o comportamento de progênies de *C. arabica* enxertadas em *C. canephora* 'Robusta' (C1651), em áreas infestadas por *M. coffeicola*, comprovaram a resistência deste porta-enxerto ao nematóide.

Assim, o êxito do emprego de medidas quarentenárias, do manejo por meio de material resistente, da rotação de culturas, entre outros, está na dependência da identificação correta da(s) espécie(s) e, ou, da(s) raça(s) presente(s) na área.

A identificação precisa das espécies de *Meloidogyne* é difícil e, muitas vezes, baseada apenas em caracteres subjetivos. Além disto, a diagnose é bastante dificultada pelo elevado número de espécies e pela existente variabilidade morfológica intra-específica. Essa variabilidade provavelmente se deve ao modo de reprodução desses nematóides, que varia de anfimixia à partenogênese facultativa ou obrigatória; ao grau de ploidia, que vai desde haplóide até vários níveis de poliploidia; além de variações no número de cromossomos somáticos, que variam de 14 a 74 (CARNEIRO e ALMEIDA, 2000). Entre os métodos empregados na diagnose de *Meloidogyne* spp. podem-se citar: estudo da configuração perineal de fêmeas (TAYLOR e NETSCHER, 1974); morfologia da região labial e estilete de juvenis de segundo estágio, de machos e de fêmeas; gama de hospedeiros (HARTMAN e SASSER, 1985); e características citogenéticas

(TRANTAPHYLLOU, 1985), bioquímicas (HUSSEY et al., 1972) e moleculares (CURRAN et al., 1986).

As características morfológicas são rotineiramente utilizadas nos estudos taxonômicos de nematóides. No caso de *Meloidogyne* spp., a configuração da região perineal de fêmeas é a característica mais comumente empregada. Entretanto, esta característica é muito subjetiva e o surgimento de populações com configurações atípicas e o grande número de espécies desse gênero dificulta sua utilização.

A gama de hospedeiros diferenciadores, proposta pelo IMP na Carolina do Norte, é um método simples, confiável e de baixo custo, mas é empregado apenas para identificar as principais espécies de *Meloidogyne* e suas raças fisiológicas (EISENBACK, 1985).

A eletroforese de isoenzimas tem se destacado como a técnica mais promissora para caracterização e identificação de fitonematóides (HUSSEY et al., 1972; ESBENSHADE e TRIANTAPHYLLOU, 1990), por apresentar alta eficiência na diferenciação das principais espécies de *Meloidogyne*, ainda que em mistura, identificação de populações atípicas, rapidez e custo relativamente baixo. CARNEIRO et al. (1996), em estudo realizado com 90 populações de *Meloidogyne* spp. de diferentes regiões do Brasil, confirmaram o fato de que o fenótipo de esterase é uma característica bioquímica de grande valor na identificação das principais espécies do gênero, e também na detecção de novas espécies. Além da esterase, outras enzimas como malato desidrogenase, superóxido dismutase e a glutamato oxaloacetato transaminase também são empregadas na taxonomia de *Meloidogyne* spp. (CARNEIRO et al., 1996, 2000).

Apesar das inúmeras vantagens da eletroforese de isoenzimas na identificação de *Meloidogyne* spp., esta apresenta algumas limitações como: não permite a separação de raças fisiológicas (JANATI et al., 1982; ESBENSHADE e TRIANTAPHYLLOU, 1990), apenas fêmeas maduras podem ser utilizadas (WILLIAMSON et al., 1997) e são conhecidas apenas 26 fenótipos de esterase das 80 espécies de *Meloidogyne* descritas na literatura (CARNEIRO et al., 2000).

O crescente uso dessa ferramenta na identificação desses nematóides, aliado à expansão e à renovação da cafeicultura brasileira nos

últimos anos, levou à constatação de novas espécies e, ou, raças de *Meloidogyne* nos cafezais. Um exemplo foi à descrição de *M. paranaensis* (CARNEIRO et al., 1996), até então diagnosticada como *M. incognita*. Contudo, nem todos os estudos de distribuição dos nematóides de galhas têm empregado essa técnica.

LORDELLO et al. (2001), ao realizarem o levantamento dos nematóides associados ao cafeeiro no Estado de São Paulo, verificaram por meio de análise das configurações perineais que das 62 populações de nematóides de galhas, coletadas em 37 diferentes municípios, 37,7% não puderam ser identificadas. *Meloidogyne incognita* foi encontrada em 19 amostras, *M. exigua* em 15, *M. paranaensis* em três e *M. javanica* em uma amostra. Os autores também verificaram a presença de mais de uma espécie em algumas amostras. KUBO et al. (2001) estudaram a distribuição de nematóides no mesmo Estado e verificaram que das 195 amostras analisadas *Meloidogyne* spp. estava presente em 56,4%, sendo 10,3% com *M. incognita*, 9,7% com *M. exigua*, 1,5% com *M. paranaensis*, 1,0% com *M. coffeicola* e 33,9% com juvenis de *Meloidogyne* sp.

No Estado do Paraná, KRZYZANOWSKI et al. (2001) avaliaram 657 amostras de solo e raízes de áreas cafeeiras e em 224 encontraram *Meloidogyne* spp. Segundo estudos das configurações perineais, os autores constataram que *M. paranaensis* estava presente em 43,8%, *M. incognita* em 17,8% e *Meloidogyne* sp. em 15,6%. Mistura de *M. paranaensis* e *M. incognita* foi constatada em 22,8% das amostras.

Com base em análises das configurações perineais, LORDELLO et al. (1961), LOUREIRO e CRUZ FILHO (1970) e CAMPOS et al. (1987) evidenciaram a ampla distribuição de *M. exigua* em cafezais de Minas Gerais. Também por meio de características morfológicas, LIMA e ALMEIDA (1989) verificaram a ampla distribuição e disseminação de *M. exigua* em cafeeiros de municípios do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. Apenas em Uberaba foram encontradas propriedades com presença *M. incognita*, cuja introdução se deveu ao uso de mudas contaminadas, trazidas do Paraná (LIMA e ALMEIDA, 1989).

Como exposto, as informações sobre a ocorrência e distribuição do nematóide de galhas em Minas Gerais são oriundas da década de 80, e

geralmente baseadas em análises de caracteres morfológicos. Visando atualizar essas informações por meio de técnicas mais precisas, procurou-se, neste trabalho, caracterizar as populações de *Meloidogyne* spp. em cafeeiros na região da Zona da Mata de Minas Gerais, por meio de eletroforese de isoenzimas, características morfológicas e inoculação em hospedeiros diferenciadores.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Coleta e multiplicação das populações de *Meloidogyne* spp.

As populações de *Meloidogyne* spp. foram coletadas em cafezais na região da Zona da Mata de Minas Gerais, em municípios previamente selecionados em função da ocorrência desses nematóides. As amostras de solo e raízes foram retiradas na área de projeção da copa de plantas vivas, em quatro ou mais pontos, até uma profundidade aproximada de 30 cm. As amostras compostas, constituídas por cerca de 500 g de solo e 200 g de raízes, foram colocadas em sacos plásticos, devidamente etiquetadas, e encaminhadas para o laboratório de Nematologia da Universidade Federal de Viçosa, juntamente com uma ficha de informações.

Para multiplicação das populações de *Meloidogyne* spp., as raízes coletadas foram lavadas cuidadosamente em água corrente, para retirar as partículas de solo aderidas, cortadas em pedaços de aproximadamente 1 a 2 cm e trituradas em liquidificador com solução de NaOCl 0,5%, por 20 segundos. A suspensão de ovos e raízes foi passada por uma peneira de 0,074 mm de abertura (200 “mesh”), acoplada à outra de 0,0254 mm (500 “mesh”), ficando os ovos retidos nessa última (Hussey e Barker, 1973, modificada por BONETI e FERRAZ, 1981). A contagem dos ovos foi feita em câmara de Peters, e a suspensão foi calibrada para 1.000 ovos/mL.

Em período precedente à coleta das populações, sementes de *C. arabica* 'Catuaí' foram semeadas em bandejas contendo areia esterilizada com brometo de metila. Quando as mudas atingiram o estágio "palito de fósforo", foram transplantadas para vasos de argila com capacidade de 3 L, parcialmente cheios com uma mistura de solo e areia na proporção 2:1, previamente tratada com brometo de metila. A inoculação foi feita quando as mudas de cafeeiro apresentavam-se no estágio "orelha de onça". Para tanto 5 mL da suspensão de ovos, obtida como descrito anteriormente, totalizando 5.000 ovos, foram aplicados, com o auxílio de uma pipeta, em quatro orifícios de cerca de 5 cm de profundidade, feitos no substrato ao redor das plantas.

As mudas com as respectivas populações de *Meloidogyne* spp. foram mantidas em casa de vegetação no Departamento de Fitopatologia da UFV. Os devidos cuidados foram tomados para evitar a contaminação entre as diferentes populações, e os tratamentos culturais necessários ao desenvolvimento das plantas foram efetuados de acordo com as recomendações técnicas para a cultura.

## **2.2. Caracterização morfológica das populações de *Meloidogyne* spp.**

De cada uma das populações mantidas em casa de vegetação, pelo menos dez fêmeas branco-leitosas foram removidas de raízes infectadas e imediatamente transferidas para uma gota de solução de ácido láctico a 45%. A região perineal de cada fêmea foi cortada, limpa e montada em lâmina com glicerina, para observação ao microscópio ótico (TAYLOR e NETSCHER, 1974).

## **2.3. Caracterização isoenzimática das populações de *Meloidogyne* spp.**

As receitas das soluções utilizadas na extração de proteínas, no preparo do gel de poliacrilamida e na revelação das enzimas estudadas encontram-se relacionadas no Apêndice.

As fêmeas em fase reprodutiva, de coloração branco-leitosa, foram retiradas individualmente do interior das raízes de cafeeiro com um estilete,

sob microscópio estereoscópico, e colocadas em tubos de microcentrífuga contendo 3,5 µL de solução-tampão, para extração de proteínas (DALMASSO e BERGÉ, 1978). Quando a corrida eletroforética não foi realizada no mesmo dia, as fêmeas foram mantidas em congelador, à temperatura aproximada de -5 °C.

Previamente à aplicação das amostras, as fêmeas foram trituradas com um bastão de vidro de extremidade arredondada, nos próprios tubos de microcentrífuga, sobre um bloco de gelo, e a suspensão foi aplicada em fitas de papel Whatman 3 MM de 1,5 x 4,0 mm, alojadas nas cavidades do gel de poliacrilamida.

O preparo dos géis e as corridas eletroforéticas foram feitos conforme proposto por CARNEIRO et al. (1996). Assim, empregou-se o sistema contínuo de eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida a 7%. O sistema-tampão usado foi o proposto por SCANDALIOS (1969).

Nas corridas eletroforéticas foram utilizadas 180 fêmeas de cada população, 15 por cavidade do gel, para possibilitar a detecção da enzima avaliada, pois as fêmeas, mesmo maduras, apresentam dimensões diminutas. A primeira, a oitava e a última cavidade de cada gel sempre continham uma fêmea de *M. javanica* oriunda de populações puras e de fenótipo isoenzimático conhecido, para comparação dos fenótipos obtidos. A eletroforese foi conduzida em refrigerador, a aproximadamente 4 °C, sob voltagem constante de 100 V. A migração foi monitorada por meio do deslocamento da linha frontal do azul-de-bromofenol e a eletroforese foi interrompida quando esta linha atingia 5 cm a partir da origem, cerca de 3 horas após o início da corrida.

Após interromper a eletroforese, o gel foi retirado da placa e mergulhado em uma solução preparada imediatamente antes de seu uso, visando a revelação da isoenzima esterase (EST), conforme proposto ALFENAS et al. (1991). Após a coloração, o gel foi lavado em água destilada e colocado em uma mistura de água, álcool metílico e ácido acético (na proporção 5:5:1) por 15 minutos, para fixação. Em seguida, foi lavado com água destilada e submetido à secagem. Na secagem dos géis utilizou-se o método do bastidor, descrito por ALFENAS e BRUNE (1998). Após 24 horas, os géis foram removidos dos bastidores, etiquetados e arquivados, para

posterior análise dos resultados. Os fenótipos isoenzimáticos apresentados pelas populações foram identificados segundo ESBENSHADE e TRIANTAPHYLLOU (1990).

Dentre as populações que apresentaram o mesmo fenótipo para EST, foram selecionadas duas populações de cada um dos seguintes municípios: Manhuaçu, Alto Jequitibá, Espera Feliz, Realeza e São João do Manhuaçu, e uma população de Mirai e outra de São Francisco do Glória, para estudos de outros padrões enzimáticos como a malato desidrogenase (MDH), a superóxido dismutase (SOD) e a glutamato oxaloacetato transaminase (GOT). A detecção de tais enzimas, após a corrida eletroforética, foi feita conforme descrito por ALFENAS et al. (1991).

#### **2.4. Gama de hospedeiros das populações de *Meloidogyne* spp.**

Para condução deste ensaio, empregaram-se as plantas usadas como hospedeiras diferenciadoras para os nematóides de galhas: tomate 'Rutgers', pimentão 'Early California Wonder', melancia 'Charleston Gray', amendoim 'Florunner', fumo 'NC 95', algodão 'Deltapine 61' (HARTMAN e SASSER, 1985), café (*Coffea arabica* 'Catuaí') como padrão de suscetibilidade e algumas outras plantas, como cebola (*Allium cepa* 'baia periforme'), cacau (*Theobroma cacao* clone SIC 23), feijão (*Phaseolus vulgaris* 'Carioca') e soja (*Glycine max* 'FT Cristalina'). As sementes das diferentes espécies foram semeadas, separadamente, em bandejas com areia, previamente esterilizada com brometo de metila, e as plântulas foram transplantadas no estágio de dois a quatro pares de folhas definitivas para vasos de argila (capacidade de três litros) contendo uma mistura de solo e areia na proporção 2:1, tratada com brometo de metila. Decorridos dois dias do transplante, procedeu-se à inoculação.

Dez populações de *Meloidogyne* sp. foram selecionadas para esse estudo, sendo duas de cada um dos municípios: de Manhuaçu (1 e 6), de Realeza (2 e 7) e de Mirai (3 e 8), e uma população dos municípios de Alto Jequitibá (4), de Muriaé (5), de Carangola (9) e de São João do Manhuaçu (10). As populações 1, 2, 3, 4 e 5 apresentaram o fenótipo VF1 para esterase, e as populações 6, 7, 8, 9 e 10 apresentaram o fenótipo VF2.

A suspensão de ovos de cada população de *Meloidogyne* sp. para inoculação foi obtida conforme procedimento descrito no item 1. Cinco mililitros de cada suspensão foram aplicados, com o auxílio de uma pipeta, em quatro orifícios de cerca de 5 cm de profundidade, feitos no substrato ao redor das plantas.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFV, sob temperatura média de  $26 \pm 3$  °C, e os tratos culturais foram efetuados de acordo com as recomendações técnicas para cada cultura. O ensaio foi montado em esquema fatorial (10 populações x 11 culturas), em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições.

A avaliação ocorreu aos 60 da inoculação e foram quantificados os números de galhas, de massas de ovos e de ovos por sistema radicular. Essa última variável foi usada para determinação do fator de reprodução ( $FR = Pf/Pi$ ), em que  $Pf$  = população final e  $Pi$  = população inicial do nematóide (OOSTENBRINK, 1966). Os dados coletados foram transformados em  $\sqrt{x}$ , e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. A análise estatística foi realizada no programa SAS.

Com base na contagem de galhas e de massas de ovos foram atribuídas notas de 0 a 5, segundo a escala de TAYLOR e SASSER (1978), para caracterizar a reação das diferentes espécies vegetais diante das populações do nematóide. As plantas que obtiveram nota igual ou inferior a 2 (número de galhas ou massas de ovos  $\leq 10$ ) foram consideradas resistentes, e as plantas com nota maior que 2 (número de galhas ou massas de ovos  $> 10$ ) foram consideradas suscetíveis.

As outras 47 populações foram submetidas apenas à caracterização de raças, conforme proposta de CARNEIRO e ALMEIDA (2000). Para tanto, procedeu-se à inoculação dessas populações, como descrito no item 1, em tomateiro 'Rutgers', pimentão 'Early California Wonder' e em café 'Catuai'. Após 60 dias da inoculação, avaliaram-se o número de galhas e o de massas de ovos para determinação da reação das plantas diferenciadoras (TAYLOR e SASSER, 1978).

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Caracterização morfológica das populações de *Meloidogyne* spp.**

A análise dos padrões perineais mostrou que a maioria das populações apresentou configuração típica de *M. exigua* (Figura 1A, B), ou seja, arco dorsal baixo, levemente plano, com estrias grossas e bem espaçadas, linhas laterais normalmente imperceptíveis, demarcadas por estrias que se dobram ou se interrompem (TAYLOR e SASSER, 1983). Porém, algumas fêmeas das populações provenientes do município de São João do Manhuaçu apresentaram configurações perineais com características de *M. arenaria* (Figura 1C), como arco dorsal arredondado e linhas laterais formando um “ombro”, que é característico dessa espécie (TAYLOR e SASSER, 1983). Contudo, as estrias eram grossas e bem espaçadas como aquelas de *M. exigua*. Assim, essas configurações perineais atípicas foram consideradas como variação intra-específica de *M. exigua*.

#### **3.2. Caracterização isoenzimática das populações de *Meloidogyne* spp.**

As 57 populações foram submetidas à caracterização pela enzima esterase (Tabela 1), pois esta apresenta o maior grau de polimorfismo e especificidade para as principais espécies de nematóides de galhas

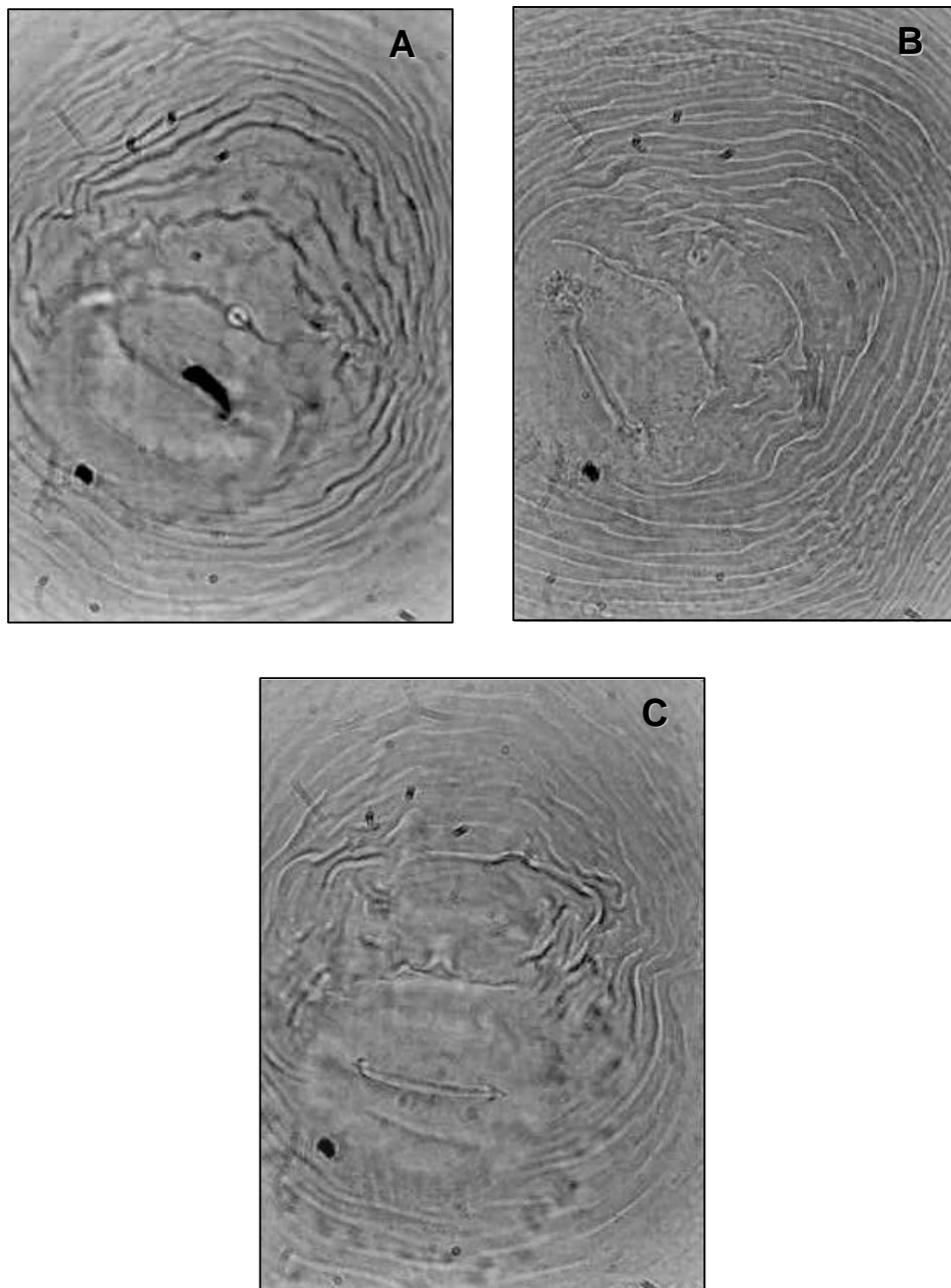


Figura 1 - Configurações perineais encontradas em populações de *Meloidogyne* spp. em cafeeiro na Zona da Mata de Minas Gerais. A e B: configurações perineais típicas de *M. exigua* encontradas na maioria das populações avaliadas e C: configuração perineal encontrada em algumas fêmeas das populações de São João do Manhuaçu.

Tabela 1 - Fenótipos de esterase encontrados nas populações de *M. exigua*, provenientes das amostras de cafeeiros coletadas em municípios produtores da Zona da Mata de Minas Gerais

Municípios	Número de Populações	Fenótipos de Esterase	
		1 banda (VF1)	1 bandas (VF2)
Alto Jequitibá	3	1	2
Carangola	2	1	1
Divino	2	0	2
Espera Feliz	3	1	2
Faria Lemos	2	0	2
Fervedouro	2	0	2
Lajinha	2	0	2
Manhuaçu	7	2	5
Manhumirim	1	0	1
Miradouro	1	0	1
Mirai	2	1	1
Muriaé	2	1	1
Realeza	5	1	4
São Francisco do Glória	2	1	1
Santana do Manhuaçu	1	0	1
São João do Manhuaçu	5	1	4
Outras localidades	15	3	12
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>13</b>	<b>44</b>

\* Populações provenientes de áreas próximas às coletadas, mas cuja procedência ficou impedida de ser claramente identificada.

(ESBENSHADE e TRIANTAPHYLLOU, 1985; CARNEIRO et al., 2000). O fenótipo de esterase típico para *M. exigua*, VF1 (Rm 1,60), foi encontrado em 22,8% das populações estudadas (Figura 2A).

No presente trabalho, um novo fenótipo de esterase foi encontrado em *M. exigua*, e se mostrou amplamente disseminado nos municípios avaliados. A maioria das populações estudadas (77,2%) apresentou o referido fenótipo, que é constituído de duas bandas com Rm de 1,60 e 1,90 (Figura 2B), e foi aqui denominado de VF2.

Aquelas populações de São João do Manhuaçu que continham fêmeas mostrando configuração perineal semelhante à de *M. arenaria*, foram confirmadas como *M. exigua*, uma vez que os fenótipos de esterase encontrados foram os característicos dessa espécie, ou seja, das cinco populações desse município, três apresentaram o fenótipo VF2 e uma o VF1 (Figura 3).

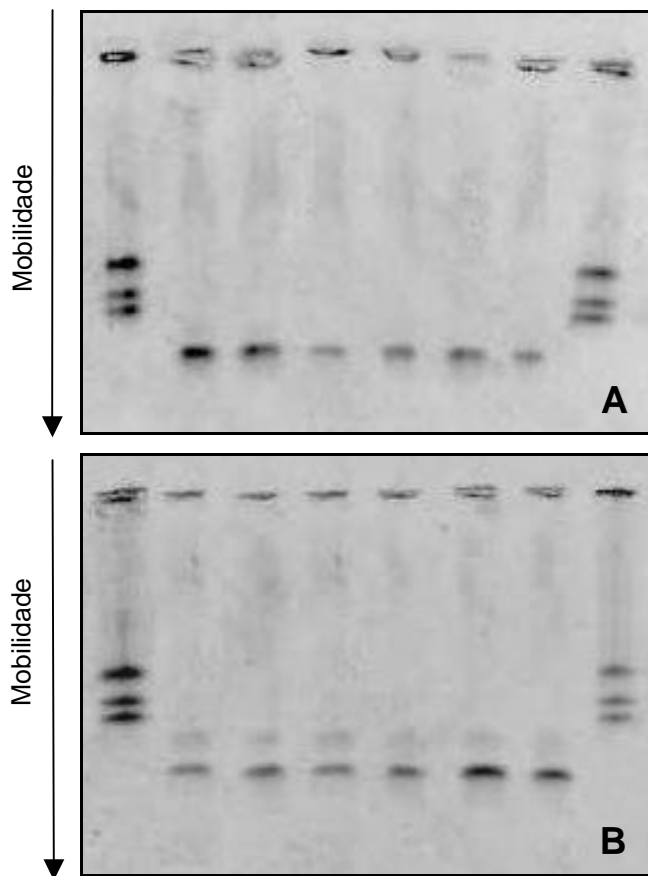


Figura 2 – Fenótipos de esterase encontrados nas populações de *M. exigua*. A: fenótipo de uma banda (VF1), B: fenótipo de duas bandas (VF2) e J3: fenótipo de esterase de *M. javanica* utilizado como padrão de comparação.

As enzimas MDH, SOD e GOT, estudadas no presente trabalho, não permitiram detectar diferenças entre as populações que apresentaram fenótipos diferentes de esterase (Figuras 3, 4 e 5). Contudo, a caracterização por essas isoenzimas permitiu confirmar a diagnose de *M. exigua*, uma vez que as 12 populações estudadas apresentaram os fenótipos típicos de cada uma dessas enzimas para essa espécie. O fenótipo N1 (Rm 1,00) de MDH foi encontrado em todas as populações (Figura 3). As 12 populações apresentaram o fenótipo E1 (Rm 1,10) para a enzima GOT (Figura 4) e o fenótipo N3 (Rm 1,25, 1,30 e 1,40) para SOD (Figura 5).

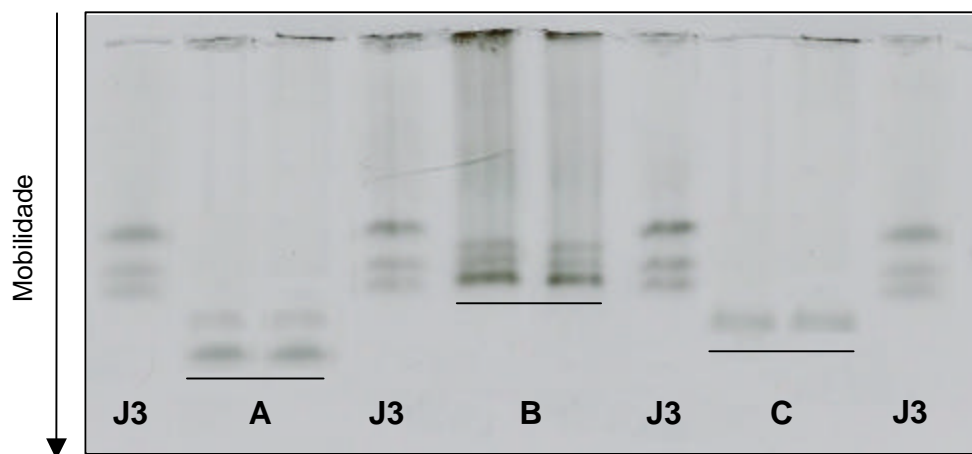


Figura 3 – Comparação dos fenótipos de esterase encontrados nas populações de *M. exigua* do município de São João do Manhuaçu e uma população de *M. arenaria*. A: fenótipo de duas bandas (VF2) de *M. exigua*, B: fenótipo A3 de *M. arenaria*, C: fenótipo de uma banda (VF1) de *M. exigua* e J3: fenótipo de *M. javanica* utilizado como padrão de comparação.

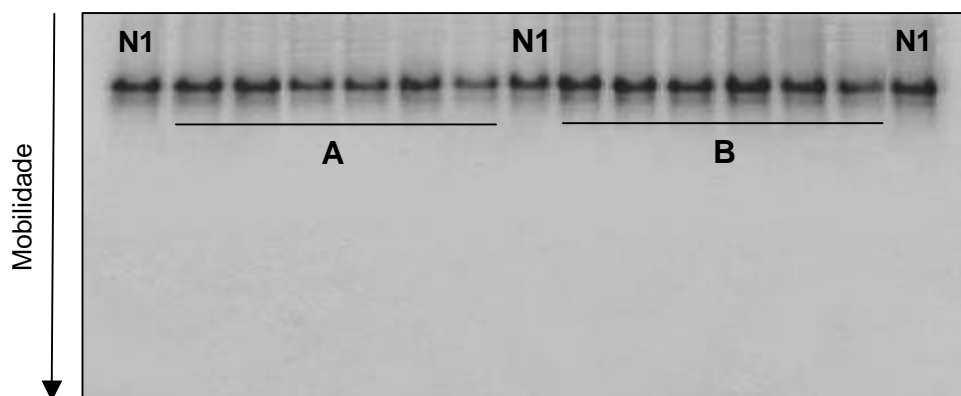


Figura 4 – Fenótipo de malato desidrogenase (MDH) encontrado em populações de *M. exigua*. N1: fenótipo de *M. javanica* utilizado como padrão, A: populações que apresentaram o fenótipo VF1 para esterase e B: populações que apresentaram o fenótipo VF2 para esterase.

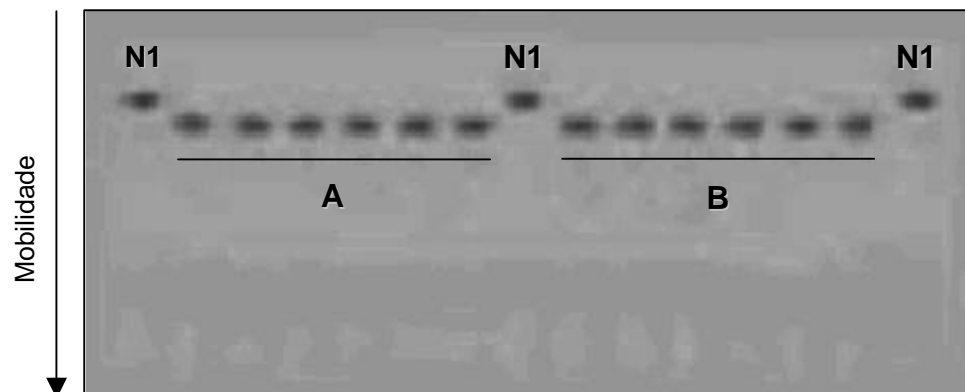


Figura 5 – Fenótipo de glutamato oxaloacetato transminase (GOT) encontrado em populações de *M. exigua*. N1: fenótipo de *M. javanica* utilizado como padrão, A: populações que apresentaram o fenótipo VF1 para esterase e B: populações que apresentaram o fenótipo VF2 para esterase.

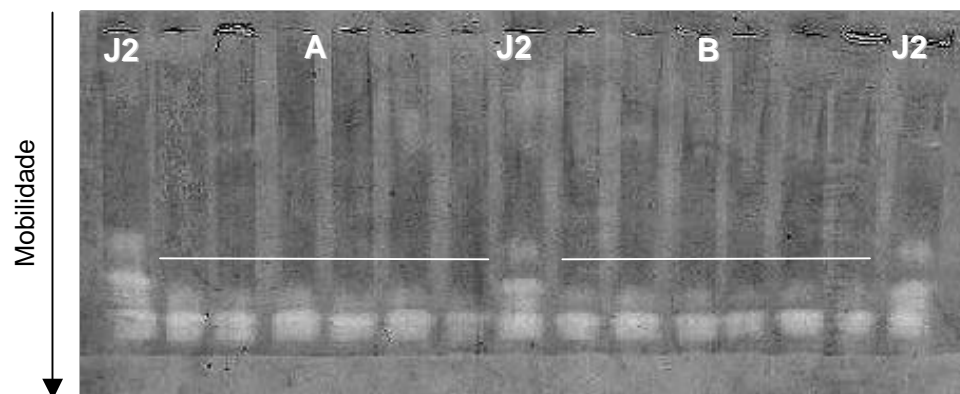


Figura 6 – Fenótipo de superóxido dismutase (SOD) encontrado em populações de *M. exigua*. J2: Fenótipo de *M. javanica* utilizado como padrão, A: populações que apresentaram fenótipo VF1 para esterase e B: populações que apresentaram o fenótipo VF2 para esterase.

### 3.3. Gama de hospedeiros das populações *Meloidogyne* spp.

*Meloidogyne exigua*, a única espécie encontrada entre as populações estudadas, foi capaz de induzir à formação de galhas na maioria das plantas testadas, exceto em algodão, fumo e amendoim (Tabela 2). O número de galhas formadas nas raízes de tomate e pimentão foi estatisticamente superior àquele observado nas demais espécies vegetais. No entanto não se observou diferença significativa na produção de galhas quando se comparou o cafeeiro com o feijoeiro, que foram superiores às plantas de soja e de cacau. A menor produção de galhas foi verificada nas raízes de cebola e de melancia. Não se observou qualquer variabilidade entre as populações estudadas em um mesmo hospedeiro, mas algumas populações, como a 3, 4, 5, 8, 9 e 10, foram capazes de induzir a mais galhas em tomateiro que em plantas de pimentão.

Tabela 2 – Número de galhas por sistema radicular de diferentes plantas, induzidas por dez populações de *Meloidogyne exigua* provenientes de cafeeiros da Zona da Mata de Minas Gerais

Cultura	População <sup>1</sup>									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tomate	23,7A	21,2A	27,0A	28,0A	29,2A	22,4A	23,2A	25,8A	27,9A	26,7A
Pimentão	23,5A	22,6A	21,9B	20,4B	21,1B	22,0A	23,1A	21,6B	21,0B	20,6B
Café	11,4B	11,5B	10,6C	10,9C	10,5C	11,7B	10,4B	11,6C	11,0C	11,0C
Feijão	10,2B	11,0B	9,2C	10,0C	12,0C	13,3B	13,6B	11,5C	11,7C	12,4C
Soja	7,8C	6,7C	8,9D	6,9D	8,4D	8,8C	7,7C	7,1D	7,5D	7,5D
Cacau	7,1C	5,4C	5,8D	6,1D	6,3D	6,5C	6,8C	7,0D	6,0D	6,1D
Cebola	2,1D	2,1D	2,7E	1,4E	2,6E	1,4D	2,4D	2,2E	2,7E	3,1E
Melancia	1,3D	1,9D	3,0E	1,5E	0,7E	3,4D	1,1D	1,5E	1,9E	1,8E
Algodão	0D	0D	0E	0E	0E	0D	0D	0E	0E	0E
Fumo	0D	0D	0E	0E	0E	0D	0D	0E	0E	0E
Amendoim	0D	0D	0E	0E	0E	0D	0D	0E	0E	0E

<sup>1</sup> Média de seis repetições com os dados transformados em  $\sqrt{x}$ . Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ). 1, 2, 3, 4 e 5 = populações que apresentaram o fenótipo VF1 para esterase e 6, 7, 8, 9 e 10 = populações que apresentaram o fenótipo VF2.

O número de massas de ovos externas foi nulo na maioria das culturas, exceto em plantas de pimentão e de tomate. Em pimentão, esse número foi significativamente superior ao do tomate, para todas as populações estudadas (Tabela 3).

Tabela 3 – Número de massas de ovos externas por sistema radicular de diferentes plantas, produzidas por dez populações de *Meloidogyne exigua* provenientes de cafeeiros da Zona da Mata de Minas Gerais

Cultura	População <sup>1</sup>									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pimentão	16,4A	15,1A	15,8A	15,7A	15,5A	16,4A	16,4A	15,8A	14,4A	17,0A
Tomate	11,7B	12,3B	11,3B	9,9B	9,3B	10,7B	11,7B	12,8B	10,4B	10,8B
Café	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C
Feijão	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C
Soja	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C
Cacau	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C
Cebola	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C
Melancia	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C	0C

<sup>1</sup> Média de seis repetições com os dados transformados em  $\sqrt{x}$ . Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,05$ ). 1, 2, 3, 4 e 5 = populações que apresentaram o fenótipo VF1 para esterase e 6, 7, 8, 9 e 10 = populações que apresentaram o fenótipo VF2.

A produção de ovos pelas populações de *M. exigua* em plantas de tomate e de pimentão foi superior à apresentada em café, e além destas culturas apenas em feijão, cacau e soja foi observada reprodução do nematóide (Tabela 4).

Considerando a reação de resistência ou suscetibilidade nas plantas estudadas, não se observou qualquer variabilidade dentre as dez populações (Tabela 5). As plantas de algodão, fumo, melancia, cebola e amendoim foram consideradas não-hospedeiras do nematóide.

As outras 47 populações foram agrupadas na raça 2 de *M. exigua*, segundo a proposta de CARNEIRO e ALMEIDA (2000), pois estas multiplicaram-se tanto em plantas de tomate como de pimentão, com nota 5, segundo a escala proposta por TAYLOR e SASSER (1978).

Tabela 4 – Número de ovos e fator de reprodução (FR) por sistema radicular de diferentes plantas, após inoculação com dez populações de *Meloidogyne exigua* provenientes de cafeeiros da Zona da Mata de Minas Gerais

População		Cultura					
		Tomate	Pimentão	Café	Feijão	Cacau	Soja
1	Nº de ovos <sup>1</sup>	238,8A	193,2B	93,3C	57,1D	29,5E	18,8E
	FR <sup>1</sup>	11,4A	7,6B	1,8C	0,7D	0,2E	0,1E
2	Nº de ovos	276,1A	182,7B	86,8C	44,9D	27,0E	17,7E
	FR	15,3A	6,8B	1,6C	0,5D	0,2E	0,1E
3	Nº de ovos	279,7A	202,0B	80,8C	52,9D	31,1E	16,1E
	FR	16,6A	8,2B	1,5C	0,6D	0,2E	0,1E
4	Nº de ovos	215,4A	172,1B	88,1C	55,3D	30,8E	15,8E
	FR	9,5A	6,0B	1,2C	0,7D	0,2E	0,1E
5	Nº de ovos	218,3A	186,0B	97,0C	48,0D	30,1E	15,4E
	FR	9,7A	7,2B	1,9C	0,5D	0,2E	0,1E
6	Nº de ovos	254,9A	176,0B	84,5C	51,8D	31,2E	19,1E
	FR	13,1A	6,2B	1,4C	0,5D	0,2E	0,1E
7	Nº de ovos	222,6A	184,7B	79,7C	58,5D	30,1E	15,5E
	FR	10,1A	6,9B	1,3C	0,7D	0,2E	0,1E
8	Nº de ovos	230,3A	170,6B	92,4C	64,8D	30,9E	17,5E
	FR	10,7A	5,8B	1,7C	0,7D	0,2E	0,1E
9	Nº de ovos	219,8A	205,9B	87,0C	57,1D	30,9E	18,0E
	FR	9,8A	8,6B	1,5C	0,7D	0,2E	0,1E
10	Nº de ovos	238,5A	193,3B	98,8C	54,3D	31,1E	18,1E
	FR	11,5A	7,5B	1,9C	0,6D	0,2E	0,1E

<sup>1</sup> Média de seis repetições. Os dados dos números de ovos foram transformados em  $\sqrt{x}$ . Médias da mesma variável seguidas da mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo Teste de Tukey (P > 0,05). 1, 2, 3, 4 e 5 = populações que apresentaram o fenótipo VF1 para esterase e 6, 7, 8, 9 e 10 = populações que apresentaram o fenótipo VF2.

Tabela 5 – Reação de algumas espécies vegetais quando inoculadas com dez populações de *Meloidogyne exigua* provenientes de cafeeiros da Zona da Mata de Minas Gerais

Cultura	População									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Café	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tomate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pimentão	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Algodão	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fumo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melancia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amendoim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cebola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cacau	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Feijão	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Soja	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+), (-) = reação de suscetibilidade e resistência, respectivamente, segundo a escala proposta por TAYLOR e SASSER (1978). 1, 2, 3, 4 e 5 = populações que apresentaram o fenótipo VF1 para esterase e 6, 7, 8, 9 e 10 = populações que apresentaram o fenótipo VF2.

## 4. DISCUSSÃO

Em *Meloidogyne exigua*, assim como em outras espécies do gênero, a reprodução ocorre por partenogênese, entretanto a variabilidade intra-específica em caracteres morfológicos, morfométricos e fisiológicos tem sido relatada (SOUZA, 1977; LIMA, 1984; LOPES, 1985; SANTOS et al., 1992). As populações atípicas, como aquelas de *M. exigua* provenientes de São João do Manhuaçu, dificultam a identificação da espécie por meio da configuração perineal, uma vez que a conformação das estrias em torno da região perineal lembrava aquela de *M. arenaria*. Até recentemente, a configuração perineal era a principal característica taxonômica para identificar espécies de *Meloidogyne*. Mas por se tratar de uma análise subjetiva, e também devido ao aumento no número de espécies descritas e ao conhecimento da ocorrência de variabilidade entre indivíduos de uma mesma espécie, essa característica tem deixado de ser a predominante nos laboratórios de diagnose. Um bom exemplo da subjetividade e da baixa confiabilidade dessa característica é a recente descrição de *M. paranaensis*. Essa espécie foi detectada no Paraná e era muito agressiva ao cafeeiro. A análise do padrão perineal conduzia à identificação de *M. incognita*, mas os sintomas apresentados pelo cafeeiro e a agressividade dessa população faziam-na diferente de *M. incognita*. Assim, por falta de informações mais precisas, ela foi denominada *M. incognita* biótipo IAPAR, por cerca de 22 anos. Em 1996 esse biótipo foi reavaliado e descrito como uma espécie

nova, com base nos estudos morfológicos e morfométricos, na resposta de hospedeiros diferenciadores e, principalmente, no fenótipo de esterase (CARNEIRO et al., 1996).

Espécies novas de *Meloidogyne* foram descritas erroneamente no passado, por considerar que pequenas variações morfológicas, inclusive na configuração perineal, eram suficientes para caracterizar uma nova espécie. Sabe-se, atualmente, que essas variações são comumente apresentadas por esses nematóides e constituem a chamada variabilidade intra-específica. Várias dessas espécies indevidamente identificadas foram alocadas como sinónimas de espécies bem caracterizadas, como, por exemplo: *M. acrita* (Chitwood, 1949) Esser, Perry & Taylor, 1976, *M. elegans* da Ponte, 1977 e *M. inornata* Lordello, 1956, que são considerados sinónimas de *M. incógnita*; *M. bauruensis* Lordello, 1956 e *M. lordelloi* da Ponte, 1969, como sinónimas de *M. javanica*; e *M. thamesi* (Chitwood, Sprecht & Havis, 1952) Goodey, 1963, que foi enquadrada como sinónima de *M. arenaria* (EISENBACK, 1985). Assim, ao descrever uma espécie, as características morfológicas devem ser analisadas em elevado número de espécimes, visando detectar a amplitude de variação em cada uma dessas características. Desta forma, espera-se minimizar erros ou dirimir dúvidas quanto ao enquadramento da população em uma espécie já conhecida, ou elegê-la como uma espécie nova.

Reforçando essa premissa, KARSSSEN e AELST (2001) mencionaram que nos trabalhos de taxonomia de espécies de *Meloidogyne* torna-se necessária a observação de muitos cortes perineais, mesmo em uma população supostamente pura, devido à grande variabilidade desta característica. Os autores ainda destacaram que a configuração perineal deve ser utilizada conjuntamente com outros métodos, como caracteres morfoanatômicos de fêmeas, machos e juvenis de segundo estágio, gama de hospedeiros, e análises citogenética e bioquímica.

Dois fenótipos de esterase foram encontrados dentre as 57 populações caracterizadas nesse estudo. As populações de *M. exigua* que apresentaram o fenótipo VF1 (22,8%) encontram-se amplamente distribuídas nas áreas cultivadas com café no Brasil. SANTOS e TRIANTAPHYLLOU (1992) caracterizaram 88 populações de *Meloidogyne*

spp. provenientes de cafeeiros de várias localidades do Brasil, e constataram que todas as populações de *M. exigua* encontradas nesse levantamento apresentavam o fenótipo VF1. Em cafezais do sul de Minas Gerais, NAVES et al. (2001) verificaram que a única espécie do nematóide de galhas encontrada foi *M. exigua* e que todas as populações analisadas apresentaram o fenótipo VF1 de esterase.

O novo fenótipo de esterase, VF2, mostrou-se amplamente disseminado nos diferentes municípios avaliados, sendo encontrado em 77,2% das populações caracterizadas. Aparentemente, a ocorrência das populações de *M. exigua* com esse fenótipo de esterase está restrita aos cafezais da Zona da Mata de Minas Gerais.

Com o novo fenótipo de esterase encontrado no presente trabalho, é possível agora detectarmos três diferentes fenótipos em *M. exigua*, ou seja, o VF1 (1,60), o VF2 (1,60 e 1,90) e um outro fenótipo de duas bandas (Rm 1,10 e 1,60), encontrado por CARNEIRO et al. (2000) em populações coletadas em seringueira no Estado do Mato Grosso do Sul.

A ocorrência de mais de um fenótipo para uma mesma enzima já é conhecido em outras espécies de *Meloidogyne*. A espécie *M. arenaria*, por exemplo, apresenta fenótipos com 1, 2 e 3 bandas, chamadas A1, A2 e A3, respectivamente (ESBENSHADE e TRIANTAPHYLLOU, 1985). Recentemente, foi descrito um novo fenótipo de esterase em *M. incognita*, que até então só era identificada pelo fenótipo I1. Esse fenótipo, chamado I2, apresenta duas bandas com Rm 1,00 e 1,12 (SANTOS e TRIANTAPHYLLOU, 1992; CARNEIRO et al., 1996; CASTRO et al., 2001). *Meloidogyne javanica*, usada como padrão na eletroforese de isoenzimas, exibia apenas o fenótipo J3 de esterase constituído de três bandas características. CARNEIRO et al. (1996) também descreveram um novo fenótipo de esterase, chamado J2, que apresentava duas bandas e foi detectado em milho, arroz, tomate, cana-de-açúcar e *Mimosa scabrella*. CASTRO et al. (2001) encontraram esse mesmo fenótipo em uma população de *M. javanica* em soja, proveniente de Rio Verde-GO. Contudo, ainda são escassas as informações acerca da variabilidade isoenzimática dentro das espécies de *Meloidogyne*, pois a eletroforese de isoenzimas ainda é pouco

usada. Com a implementação desses estudos, novos fenótipos de esterase serão descobertos, e a identificação de espécies se tornará menos subjetiva e mais segura.

Os estudos com as outras enzimas não permitiram detectar variabilidade entre as populações avaliadas, mas foi importante na confirmação da diagnose de *M. exigua*, uma vez que as 12 populações estudadas apresentaram os fenótipos típicos de cada uma dessas enzimas para essa espécie. O fenótipo N1 (Rm 1,00) de MDH foi encontrado em todas as populações. Apesar de ser um fenótipo não-específico, essa enzima é importante para diferenciar *M. exigua* de *M. naasi*, cujo fenótipo para essa enzima é o N1a (Rm 1,40), que apresenta uma molécula de maior mobilidade que aquela de *M. exigua* (ESBENSHADE e TRIANTAPHYLLOU, 1985). As 12 populações apresentaram o fenótipo E1 (Rm 1,10) para enzima GOT, e esse fenótipo foi encontrado por CARNEIRO et al. (2000) em populações de *M. exigua* dos Estados de São Paulo e de Minas Gerais. O fenótipo N3 (Rm 1,25, 1,30 e 1,40) de SOD encontrado nas populações estudadas também coincidem com o encontrado por CARNEIRO et al. (2000).

As 57 populações do nematóide de galhas provenientes de cafeeiros da Zona da Mata-MG foram caracterizadas como *M. exigua*, seja pela configuração perineal ou pela análise de isoenzimas. Entretanto, a variabilidade intra-específica foi detectada nas populações provenientes de São João do Manhuaçu, quando o padrão perineal foi a variável usada. A análise de esterase mostrou também a ocorrência de dois fenótipos dentre as populações estudadas, mas nenhuma relação foi observada entre os dois tipos de variabilidade exibida por *M. exigua*.

Nos estudos de eletroforese, foram usadas 15 fêmeas de *M. exigua* por cavidade de gel, pois além da baixa atividade de esterase nessa espécie as fêmeas são de tamanho reduzido, de 345 a 620 µm de comprimento e de 220 a 455 µm de largura (LIMA e FERRAZ, 1985), o que parece estar relacionado com a quantidade de enzimas. Já *M. javanica*, que é usada como padrão nos géis, possui dimensões maiores, de 545 a 800 µm de comprimento e de 300 a 545 µm de largura (CHITWOOD, 1949), e o uso de apenas uma fêmea/cavidade permite uma fácil visualização das bandas. O

uso de fêmeas isoladas/cavidade é recomendado para facilitar a separação de espécies, quando se tem, no campo, mais de uma espécie ocorrendo simultaneamente. Tal fato permite separar a massa de ovos de cada respectiva fêmea usada na eletroforese. Assim, após a análise dos fenótipos pode-se multiplicar isoladamente cada espécie. Por outro lado, considerando o uso de múltiplas fêmeas/cavidade, como no caso de *M. exigua*, aumenta-se a possibilidade de detecção de provável mistura de espécies em condições de campo, porque o número de fêmeas estudadas passa de 13/gel, no caso de *M. javanica*, para 195/gel, no caso de *M. exigua*.

Pelas análises morfológica e enzimática, observou-se que não houve relação entre as populações que mostraram configurações perineais atípicas e os fenótipos isoenzimáticos. Da mesma forma, também não se observou relação entre estes e a capacidade de reprodução nos diferentes hospedeiros, uma vez que as dez populações, metade expressando o fenótipo VF1 e a outra metade o VF2, exibiram o mesmo comportamento quanto à produção de galhas, massas de ovos e número de ovos/planta. Em *M. incognita*, assim como em outras espécies do gênero, em que raças fisiológicas são relatadas, também é desconhecida a correspondência entre raças e fenótipos isoenzimáticos (JANATI et al., 1982; ESBENSHADE e TRIANTAPHYLLOU, 1990; CARNEIRO et al., 2000; CASTRO, 2001).

Apesar da não-detecção de variabilidade entre essas populações de *M. exigua*, destacou-se a elevada capacidade reprodutiva do nematóide em tomateiro e pimentão, cujo fator de reprodução foi 7,5 e 4,5 vezes superior, respectivamente, àquele apresentado em cafeeiro, planta tida como padrão de suscetibilidade para esse patógeno. Também vale salientar que nos sistemas radiculares dessas espécies observaram-se elevado número de galhas e um grande número de massas de ovos exteriorizadas. Esta última característica é pouco comum nas plantas tidas como hospedeiras desse nematóide, uma vez que as massas são produzidas no interior das raízes (EISENBACK e TRIANTAPHYLLOU, 1991).

Estudando a reprodução de *M. exigua* em algumas espécies vegetais, ALMEIDA e CAMPOS (1991) também verificaram boa reprodução do nematóide em tomateiro em condições de casa de vegetação, mas os fatores de reprodução do nematóide nesse trabalho, ao contrário do que foi

observado aqui, ficaram bem próximos aos apresentados em cafeeiro. FERRAZ e SANTOS (1984), avaliando a produção de inóculo de *M. exigua* em diferentes hospedeiros, verificaram que os cinco cultivares de tomateiro utilizados no ensaio receberam nota 5 na escala de TAYLOR e SASSER (1978), enquanto o cafeeiro recebeu nota 4, mas o fator de reprodução do nematóide em tomateiro também foi bem abaixo do encontrado no presente trabalho. LORDELLO (1964) relatou a infecção de pimentão por *M. exigua*, mas apenas indicando a presença de galhas e fêmeas no interior de suas raízes. Já ALMEIDA e CAMPOS (1991) encontraram um número expressivo de ovos no sistema radicular de pimentão, quando inoculados com *M. exigua*, mas com um fator de reprodução quase que 24 vezes abaixo do encontrado no presente trabalho. Essa diferença de resultados na reprodução de *M. exigua* em plantas de tomate e pimentão pode ser explicada por diferenças no período de avaliação dos experimentos, na temperatura, no desenvolvimento das mudas e na composição do substrato.

Números expressivos de galhas e ovos foram encontrados também nos sistemas radiculares do feijoeiro, mas sem a formação de massas de ovos externamente às raízes, à semelhança do que ocorre com o cafeeiro. Essa cultura, que tem sido cultivada em áreas de cafezais erradicados, pode constituir fonte de inóculo do nematóide, quando da implantação da nova lavoura de café.

Em cacaueteiro, observou-se uma considerável reprodução do nematóide, com ausência de massas de ovos externas. Na Bolívia, o cacaueteiro tem sido relatado como hospedeiro de *M. exigua* (BRIDGE et al., 1982), entretanto ALMEIDA e CAMPOS (1991) observaram que o cacaueteiro mostrou-se resistente ao patógeno em condições de casa de vegetação. Apesar da não-indicação de quais variedades foram utilizadas nesses trabalhos, essa diferença na reação do cacaueteiro a *M. exigua*, provavelmente, se deve ao uso de plantas com diferentes níveis de resistência ao nematóide, ou à variabilidade intra-específica do patógeno e a diferentes condições ambientais.

As espécies que se mostraram não-hospedeiras do nematóide, segundo a escala proposta por TAYLOR e SASSER (1978), foram a melancia, o algodão, o fumo, a cebola e o amendoim. Com exceção da

melancia e cebola, não foi verificada nem mesmo a formação de galhas pelo nematóide. Esses resultados indicam que tais plantas podem ser usadas em áreas infestadas com *M. exigua*, uma vez que não permitem a reprodução da espécie. Sabe-se que a sobrevivência desse nematóide no solo sob pousio não é superior a seis meses (ALVARENGA, 1974; MORAES et al., 1977; ALMEIDA e CAMPOS, 1991), logo o produtor pode utilizar uma dessas culturas para obter algum lucro na área infestada, durante o período necessário para que ocorra uma redução na população do nematóide no solo.

## 5. CONCLUSÕES

- *Meloidogyne exigua* foi a única espécie de nematóide de galhas encontrada parasitando cafeeiros nos municípios da Zona da Mata de Minas Gerais.

- A caracterização morfológica por meio da configuração perineal mostrou alguns padrões perineais atípicos, como as populações de São João do Manhuaçu, porém sem configurar uma outra espécie.

- Os estudos isoenzimáticos revelaram a existência de dois fenótipos de esterase entre as populações de *M. exigua* estudadas, o VF1 (Rm 1,6), constatado em 22,8% das amostras, e o outro de duas bandas, chamado de VF2 (Rm 1,6 e 1,9) em 77,2% das amostras. Todas as populações caracterizadas pelas enzimas malato desidrogenase, superóxido dismutase e glutamato oxaloacetato transaminase apresentaram fenótipos típicos de *M. exigua*.

- Todas as dez populações avaliadas no teste de hospedeiros diferenciadores multiplicaram-se melhor em plantas de tomate e de pimentão do que em cafeeiro. Todas as populações também se multiplicaram em feijão, soja e cacau, portanto deve-se evitar plantar estas culturas em áreas infestadas após a retirada de plantas doentes e antes do replantio de cafeeiros, mesmo que estes sejam enxertados em material resistente.

- A gama de hospedeiros das populações de *M. exigua* não permitiu detectar a variabilidade intra-específica nas mesmas. As 57 populações foram agrupadas na raça 2 de *M. exigua*, segundo a reação apresentada pelas plantas hospedeiras diferenciadoras da Carolina do Norte.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIDATA: Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.http://www.agridata.mg.gov.br/café>. Última atualização em 03 de março de 2002.
- ALFENAS, A.C., PETERS, L., BRUNE, W., PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, Sociedade de Investigações Florestais, 242p, 1991.
- ALFENAS, A.C., BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: ALFENAS, A.C. (ed.) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**, Viçosa: UFV, 574p., il., 1998.
- ALMEIDA, V.F., CAMPOS, V.P. Alternância de culturas e sobrevivência de *Meloidogyne exigua* em áreas de cafezal infestado e erradicado. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.15, p.30-42, 1991.
- ALVARENGA, G. Determinação preliminar da longevidade, no solo, do nematóide *Meloidogyne exigua*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 2, 1974, Poços de Caldas. **Resumos...** Rio de Janeiro. p.45, 1974.
- ARAYA, M., CASWELL-CHEN, E.P. *Coffea arabica* cvs. Caturra and Catuaí nonhosts to a California isolate of *Meloidogyne javanica*. **Nematropica**, v. 25, p.165-171, 1995.
- BONETI, J.I.S., FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p.553, 1981.

- BRIDGE, J., PAGE, S.L.J., WALLER, J.M. **Plant parasitic nematodes and diseases of crops in the Santa Cruz Department of Bolivia**. U.K.: Overseas Development Administration Report, 1982, 60p.
- CAIXETA, G.Z.T. Gerenciamento da cafeicultura em época de crise. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) **Tecnologias de produção de café com qualidade**. Viçosa: Editora UFV, p. 1-24, 2001.
- CAMPOS, V.P., LIMA, R.D., ALMEIDA, V.F. Nematóides parasitas do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.126, p.50-58, 1985.
- CAMPOS, V.P., LIMA, R.D., ALMEIDA, V.F. Nematóides parasitos de grandes culturas identificados em localidades de Minas Gerais e São Paulo. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.11, p.226-232, 1987.
- CAMPOS, V.P., SIVAPALAN, P., GNANAPRAGASAN, N.C. Nematode parasites of coffee, cocoa an tea. In: LUC, M., SIKORA, R.A., BRIDGE, J. (Ed.) **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. London: CAB. Internacional, p.367-397, 1990.
- CAMPOS, V.P. Café (*Coffea arabica* L.). Controle de doenças: Doenças causadas por nematóides. In: VALE, F.X.R., ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa, UFV, v.1, p.141-180, 1997.
- CARNEIRO FILHO, F., YAMAGUCHI, K. Comportamento de progênies de *Coffea arabica* enxertadas em *Coffea canephora*, em área com nematóides *Meloidogyne coffeicola*, Lordello e Zamith, 1960, no Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 21, 1995, Caxambu. **Resumos...** Brasília:MAARA-PROCAFÉ, p.41-42, 1995.
- CARNEIRO, R.M.D.G., CARNEIRO, R.G., ABRANTES, I.M.O., SANTOS, M.S.N.A., ALMEIDA, M.R.A. *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee em Brazil. **J. Nematology**, v.28, p.177-189, 1996.
- CARNEIRO, R.M.D.G., ALMEIDA, M.R.A. Caracterização isoenzimática e variabilidade intraespecífica dos nematóides de galhas do cafeeiro no Brasil. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1. 2000, Poços de Caldas. **Resumos expandidos**. Brasília: Embrapa Café, p.280-282, 2000.
- CARNEIRO, R.M.D.G., ALMEIDA, M.R.A., QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. **Nematology**, v.2, p.645-654, 2000.

- CONVÊNIO Ministério da Agricultura – Secretaria da Produção e Comercialização/CONAB. Previsão da safra brasileira de café 2001/2002, segunda estimativa. Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.http://www.agricultura.gov.br/spc>. Última atualização em 10 de julho de 2001.
- CURI, S.M., CARVALHO, A., MORAES, F.P., MONACO, L.C., ARRUDA, H.V. Novas fontes de resistência genética de *Coffea* no controle do nematóide do cafeeiro, *Meloidogyne exigua*. **O biológico**, v.36, p.41-44, 1970.
- CURRAN, J., McCLURE, M.A., WEBSTER, J.M. Genotypic differentiation of *Meloidogyne* populations by detection of restriction fragment length difference in total DNA. **J. Nematology**, v.18, p.83-86, 1986.
- DALMASSO, A., BERGÉ, J.B. Molecular polymorphism and phylogenetic relationship in some *Meloidogyne* spp.: application to the taxonomy of *Meloidogyne*. **J. Nematology**, v.10, p.323-332, 1978.
- EISENBACK, J.D. Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: SASSER, J.N., CARTER, C.C. (Ed.). **An advanced treatise on Meloidogyne**. North Carolina: North Carolina State University, v.1, p.95-112, 1985.
- ESBENSHADE, P.R., TRIANTAPHYLLOU, A.C. Electrophoretic methods for the study of root-knot nematode enzymes. In: BARKER, K.R., CARTER, C.C., SASSER, J.N. (Eds.) **An advanced treatise on Meloidogyne**. North Carolina State University Graphics, p.115-123, 1985.
- ESBENSHADE, P.R., TRIANTAPHYLLOU, A.C. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. **J. Nematology**, v.22, p.10-15, 1990.
- FAZUOLI, I.C., LORDELLO, R.R.A. Resistência de *Coffea liberica* e *C. dewevrei* a *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, v.2, p.197-199, 1977.
- FAZUOLI, L.C., LORDELLO, R.R.A., GUILHAUMON, F., CORSI, T., COSTA, A.C.M. Tolerância de cafeeiros ao nematóide *Meloidogyne incognita* em condições de campo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 6, 1978, Ribeirão Preto. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC-GERCA, p.246-248, 1978.
- FAZUOLI, L.C., COSTA, W.M., FERNANDES, J.A.R. Variabilidade na resistência de linhagens de *Coffea canephora* em relação a uma população do nematóide *Meloidogyne incognita* em condições de viveiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 10, 1983, Poços de Caldas. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC-GERCA, p. 115-116, 1983.

- FERRAZ, S., SANTOS, J.M. Produção de inóculo de *Meloidogyne exigua* em diferentes hospedeiros. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA, 8, 1984, Recife. **Resumos...** Piracicaba: SBN/ESAL, p.3. 1984.
- GARCIA, A, TIHOHOD, D., CAETANO, M.F., RABELLO, L.R., Nota sobre ocorrência de fitonematóides em cafezais da região paulista de Marília. **Nematologia Brasileira**, v.12, p.151-152, 1988.
- GONÇALVES, W., FERRAZ, L.C.C.B. Resistência do cafeeiro a nematóides – II: testes de progênies e híbridos para *Meloidogyne incognita* raça 3. **Nematologia Brasileira**, v.11, p.125-142, 1987.
- GONÇALVES, W., LIMA, M.M.A., FAZUOLI, L.C. Resistência do cafeeiro a nematóides – III: avaliação da resistência de espécies de *Coffea* e de híbridos interespecíficos a *Meloidogyne incognita* raça 3. **Nematologia Brasileira**, v.12, p.47-54, 1988.
- GONÇALVES, W. Melhoramento do cafeeiro visando resistência a nematóides. **Informe Agropecuário**, v.16, n.172, p.72-77, 1992.
- GONÇALVES, W., FERRAZ, L.C.C.B., LIMA, M.M.A., SILVAROLLA, M.B. Reações de cafeeiros às raças 1, 2 e 3 de *Meloidogyne incognita*. **Summa Phytopathologica**, v.22, p.172-177, 1996.
- GONÇALVES, W., SILVAROLLA, M.B. Nematóides parasitos do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) **Tecnologias de produção de café com qualidade**. Viçosa: Editora UFV, p.199-267, 2001.
- GOTOH, A. Nematóides nocivos a cafeicultura no Estado do Paraná. **Inf. Pesqui.**, v.58, p.1-9, 1985.
- GUERRA NETTO, E.G., D'ANTONIO, A.M., ALMEIDA, S.R., LORDELLO, L.G.E. Ocorrência do nematóide *Meloidogyne coffeicola* Lordello & Zamith, 1960, em lavoura de café no sul do estado de Minas Gerais. **Rev. Agric.**, v.58, p.45-48, 1983.
- GUIMARÃES FILHO, O., DINIZ, H.C., CAMPOS, V.P. Controle de nematóides das galhas do cafeeiro (*Meloidogyne exigua*) pelo uso do terbufos (Counter). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 16, 1992, Lavras. **Resumos...** Piracicaba: SBN/ESAL, p.25. 1992.
- HARTMAN, K.M., SASSER, J.N. 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. (Ed.). **An Advanced Treatise on Meloidogyne**. North Carolina: North Carolina State University, v.2, p. 69-77, 1985.

- HUSSEY, R.S., SASSER, J.N. HUISING, D. Disc-electrophoretic studies of soluble proteins and enzymes of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. **J. Nematology**, v.4, p.183-189, 1972.
- JANATI, A.A., BERGÉ, J.B., TRIANTAPHYLLOU, A.C., DALMASSO, A. Nouvelles données sur utilisation des isoestérases pour l'identification des *Meloidogyne*. **Revue de Nematologie**, v.5, p.147-154, 1982.
- KARSSEN, G., VAN AELST, A.C. Root-knot nematode perineal pattern development: a reconsideration. **Nematology**, v.3, p. 95-111, 2001.
- KRZYZANOWSKI, A.A., FIGUEIREDO, R., SANTIAGO, D.C., FAVORETO, L. Levantamento de espécies e raças de *Meloidogyne* em cafeeiros no Estado do Paraná. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2. 2001, Vitória. **Resumos...** Brasília: Embrapa Café, p. 81, 2001.
- KUBO, R.K., INOMOTO, M.M., OLIVEIRA, C.M.G., ANTEDOMÊNICO, S.R., MONTEIRO, A.R. Nematóides associados a cafeeiros do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 23, 2001, Marília/Garça. **Resumos...** Marília/Garça: SBN/FAEF, p. 91. 2001.
- LIMA, R.D. **Embriogênese, desenvolvimento pós-embriogênico e caracterização morfométrica de *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887**. Viçosa-MG: UFV, 1984. 59 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 1984.
- LIMA, R.D., FERRAZ, S. Biologia de *Meloidogyne exigua* II. Desenvolvimento pós-embriogênico em cafeeiro Mundo Novo. **Revista Ceres**, v.32, p.349-361, 1985.
- LIMA, M.M.A., GONÇALVES, W., TRISTÃO, R.O. Avaliação de resistência de seleções de *Coffea canephora* e *C. congensis* à raça 3 de *Meloidogyne incognita*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 14, 1987, Campinas. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC-GERCA, p. 87-88, 1987.
- LIMA, R.D., ALMEIDA, V.F. Ocorrência e distribuição de fitonematóides em cafeeiros do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA, 13, 1989, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: SBN, p.6, 1989.
- LIMA, R.D. Fitonematóides na cafeicultura mineira: situação atual. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 17. 1993, Jaboticabal. **Anais...** São Paulo: FCAV-UNESP, p. 45-50, 1993.

- LOPES, R. Observaciones sobre la morfologia de *Meloidogyne exigua* com el microscopio eletronic de rastreo. **Nematropica**, v.15, p. 27-33, 1985.
- LORDELLO, L.G.E., ZAMITH, A.P.L. *Meloidogyne coffeicola* sp. n., a pest of coffee trees in the State of Paraná, Brazil (Nematoda, Heteroderidae). **Rev. Brasil. Biol.**, v.20, p.375-379, 1960.
- LORDELLO, L.G.E., MONTEIRO, A.R., OLIVEIRA, A.J., COSTA, C.P. Nematóides atacando cafeeiros no Brasil. **Divulgação Agrônômica**, v.4, p.2-11, 1961.
- LORDELLO, L.G.E. Contribuição ao conhecimento dos nematóides que causam galhas em raízes de plantas em São Paulo e Estados vizinhos. **Anais da ESALQ**, v.21, p.181-218, 1964.
- LORDELLO, L.G.E., MONTEIRO, AR. Informação preliminar sobre um nematóide nocivo do cafeeiro. **Sociedade Brasileira de Nematologia**, v.1, p.13-15, 1974.
- LORDELLO, L.G.E. **Nematóides das plantas cultivadas**. 8 ed. São Paulo: Nobel, 314p., 1984.
- LORDELLO, R.R.A., LORDELLO, A.I.L., MARTINS, A.L.M., PEREIRA, J.C.V.N.A. Plantio de cafezal em área infestada por *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.14, p.18-19, 1990.
- LORDELLO, A.I.L., LORDELLO, R.R.A. Nematóides encontrados em cafezais do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 23, 2001, Marília/Garça. **Resumos...** Marília/Garça: SBN/FAEF, p.85, 2001.
- LORDELLO, A.I.L., LORDELLO, R.R.A., FAZUOLI, L.C. Levantamento de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiros no Estado de São Paulo. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2, 2001, Vitória. **Resumos...** Brasília: Embrapa Café, p. 81, 2001.
- LOUREIRO, M.C., CRUZ FILHO, J. Levantamento da ocorrência de *Meloidogyne exigua* nos cafezais (*Coffea arabica*) do Estado de Minas Gerais. **Seiva**, Viçosa, v.30, p.32-42, 1970.
- LUSVARGHI, H.N., SANTOS, J.M. Eficácia de terbufós e de aldicarb, em mistura com cyproconazole no manejo de *Meloidogyne paranaensis* e da ferrugem do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 20, 1997, Gramado. **Resumos...** Piracicaba: SBN/UFP, p.70, 1997.

- MELLO, E.V. A cafeicultura no Brasil. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) **Tecnologias de produção de café com qualidade**. Viçosa: Editora UFV, p.565-606, 2001.
- MONTEIRO, A.R., ANTEDOMÊNICO, S.R., FERRAZ, L.C.C.B., INOMOTO, M.M., KUBO, R.K., OLIVEIRA, C.M.G. Primeira ocorrência de *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen, 1951, em cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 23. 2001, Marília/Garça. **Resumos...** Marília/Garça:SBN, p.88, 2001.
- MORAES, M.V., LORDELLO, L.G.E., REIS, A.J., THOMAZIELLO, R.A., LORDELLO, R.R.A., GONÇALVES, W. Ensaio de rotação de culturas para reaproveitamento com cafeeiro de terras infestadas por *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, 2, p.257-265, 1977.
- NAVES, R. L., CAMPOS, V. P., DUTRA, M. R., COIMBRA, J. L., ANDRADE JUNIOR, V. C. Ocorrência de nematóides em cafezais do sul de Minas Gerais. In: **Congresso Brasileiro de Nematologia**, 23. Garça, 2001. **Resumos...** Garça, SP. 2001.
- NOVARETTI, W.R.T., PAPA, G., COELHO, J.V.G. Controle químico do nematóide *Meloidogyne incognita* em cafeeiro, com o nematicida terbufós. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 20, 1997, Gramado. **Resumos...** Piracicaba: SBN/UFP, p. 70, 1997.
- NOVARETTI, W.R.T., MANDON, L., ORSI JUNIOR, F. Controle químico do nematóide *Meloidogyne incognita* na cultura do cafeeiro utilizando novos nematicidas e novas formulações. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 23, 2001, Marília/Garça. **Resumos...** Marília/Garça: SBN/FAEF, p.90, 2001.
- OLIVEIRA, C.M.G., KUBO, R.K., ANTEDOMÊNICO, S.R. e MONTEIRO, AR. Reação de cafeeiros a *Meloidogyne javanica*. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.73, fasc. 3, 1998.
- OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Meded. Landbouw**. Wageningen, v.66, n.4, 1966.
- PINHEIRO, J.B., SANTOS, M.A., SANTOS, C.M., LELLES, A.M. Ocorrência de fitonematóides em amostras oriundas de cafezais do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1. 2000, Poços de Caldas. **Resumos expandidos**. Brasília: Embrapa Café, p. 257-259, 2000.
- PONTE, J.J., FREIRE, F.C.O. *Coffea arabica* L. – a new host of *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. **Bol. Cear. Agron.**, v.12, p.1-4, 1971.

- RIBEIRO, R.C.F., OLIVEIRA, C.H., PEREIRA, A.A., LIMA, R.D. Reação de progênies de híbridos interespecíficos de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* à *Meloidogyne exigua* (Goeldi, 1887). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 23, 2001, Marília/Garça. **Resumos...** Marília/Garça: SBN/FAEF, p. 94, 2001.
- SANTOS, J.M., TRIANTAPHYLLOU, H.H. Determinação dos fenótipos isoenzimáticos e estudos comparativos da morfologia de 88 populações de *Meloidogyne* spp., parasitas do cafeeiro. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA, 16, 1992, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba, ESALQ. p. 88, 1992.
- SANTOS, J.M., MATTOS, C., FERRAZ, S. *Meloidogyne exigua*, sério patógeno da seringueira nas plantações E. Michelin, em Rondonópolis, MT. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA, 16, 1992, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba, ESALQ. p.25, 1992.
- SANTOS, J.M. **Estudo das principais espécies de *Meloidogyne* Goeldi que infectam o cafeeiro no Brasil com descrição de *Meloidogyne goeldii* sp. n.** Botucatu: FCA, UNESP, 1997. 153p. Tese (Doutorado). UNESP, 1997.
- SCANDALIOS, J.C. Genetic control of múltiple forms of enzymes in plants: a review. **Biochem. Genetics.**, v.3, p.37-79, 1969.
- SHARMA, R.D., SAMPAIO, J.B.R. Ocorrência de *Meloidogyne exigua* e *M. javanica* parasitando cafeeiros no Distrito Federal. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA, 9, 1985, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba, ESALQ. p.57, 1985.
- SOUZA, P. **A disease complex of coffe involving *Meloidogyge exigua* and *Rhizoctonia solani*.** Raleigh, 1977, 143p. Thesis (Ph.D. in Plant Pathology). North Carolina State University. 1977.
- SOUZA, S.E., SOUZA, L.H., LUSVARGHI, H.N.C. Controle químico de *Meloidogyne exigua* (Goeldi, 1887) em cafeeiro com nematicida terbufós. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 20, 1997, Gramado. **Resumos...** Piracicaba: SBN/UFP, p. 71. 1997.
- SOUZA, S.E., SANTOS, J.M., MATOS, R.V., RAMOS, J.A., SANTOS, F.S., FERRAZ, R.C.N., CARVALHO, G.S., OLIVEIRA, C.A. Levantamento preliminar de *Meloidogyne* em cafeeiros no Estado da Bahia – Planalto de Vitória da Conquista e Chapada Diamantina. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1. 2000, Poços de Caldas. **Resumos expandidos...** Brasília: Embrapa Café, p. 167-170, 2000.

- TAYLOR, D.P., NETSCHER, C. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Nematologica**, v.20, p.268-269, 1974.
- TAYLOR, A.L., SASSER, J.N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.)**. Coop. Publ. Dep. Plant. Pathol., north Carolina State University Graphics Raleigh, 111p, 1978.
- TRANTAPHYLLOU, A.C. Cytological methods for the study of oogenesis and reproduction of root-knot nematodes. In: BARKER, K.R., CARTER, C.C., SASSER, J.N. (Eds.) **An Advanced Treatise on *Meloidogyne***. North Carolina State University Graphics, p.107-114, 1985.
- VOVLAS, N., DI VITO, M. Effect of root-knot nematodes *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* on the growth of coffee (*Coffea arabica*) in pots. **Nematologia Mediterranea**, v.2, p.253-258, 1991.
- WILLIAMSON, V.M., SAWELL-CHEN, E.P., WESTERDAHL, B.B., WU, F.F., CARYL, G.A. PCR assay to identify and distinguish single juveniles of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. **J. Nematology**, v.29, p.9-15, 1997.

## **APÊNDICE**

## APÊNDICE

- Solução-tampão para extração de proteínas (DALMASSO e BERGÉ, 1978) utilizada para as enzimas EST, GOT e SOD:

Sacarose.....	20% (p/v)
Triton X-100 .....	2% (p/v)
Água destilada	
Filtrar a solução e manter em refrigerador (4 °C).	

- Solução-tampão para extração de proteínas (DALMASSO e BERGÉ, 1978) utilizada para a enzima MDH:

Sacarose.....	20% (p/v)
TRIS.....	0,1%
Ácido ascórbico .....	0,1%
Cisteína/HCl.....	0,1%
Água destilada	
Ajustar o pH a 8,0 com HCl	
Filtrar a solução e manter em refrigerador (4°C).	

- Solução-tampão da cuba (SCANDALIOS, 1969):

Hidróxido de lítio (LiOH.H <sub>2</sub> O) .....	1,2 g
Ácido bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ) .....	11,89 g
Água destilada (q.s.p.) .....	1.000 mL

- Tampão do gel:

Uma parte do tampão da cuba  
Nove partes da solução B:

TRIS.....	6,2 g
Ácido cítrico P.A. monohidratado .....	1,6 g
Água destilada (q.s.p.) .....	1.000 mL

- Composição do gel:

Tampão do gel.....	20 mL
Acrilamida .....	1,56 g
Bis-acrilamida .....	0,04 g
Temed.....	20 µL
Persulfato de amônio .....	200 µL

– Solução reveladora de esterase (ALFENAS et al., 1991):

$\alpha$ -naftil-acetato 1% em acetona 50%.....	4,5 mL
<i>Fast Blue</i> RR .....	100 mg
Tampão fosfato de potássio 0,05M, pH 6,0 (q.s.p.).....	100 mL

Incubar o gel a 30-37°C até as bandas aparecerem (até 15 minutos),  
Descartar a solução e fixar o gel em solução de glicerol a 10%.

– Solução reveladora de malato desidrogenase (ALFENAS et al., 1991):

Ácido málico 0,5 M, pH 8,0:

DL-ácido málico.....	10 g
Água destilada.....	80 mL

Ajustar o pH com NaOH 1 M e completar o volume para 100 mL

Coloração:

Ácido málico 0,5 M, pH 8,0.....	4 mL
NAD <sup>+</sup> .....	20 mg
MTT .....	20 mg
PMS .....	2 mg
Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5 (q.s.p.) .....	100 mL

Incubar o gel no escuro a 30 °C, por 15 a 60 minutos, ou até as bandas aparecerem. Descartar a solução e fixar o gel em solução aquosa de glicerol a 10%.

– Solução reveladora de glutamato-oxaloacetato transaminase (ALFENAS et al., 1991):

Ácido L-aspártico .....	150 mg
Ácido $\alpha$ -cetoglutárico .....	100 mg
TRIS-HCl 0,2 M, pH 8,0 (q.s.p.).....	100 mL

Ajustar o pH para 8,0, com NaOH, e adicionar:

Piridoxal-5'-fosfato .....	5 mg
<i>Fast blue</i> BB salt.....	100 mg

Incubar o gel no escuro a 30-37 °C, até o aparecimento das bandas.  
Descartar a solução e fixar o gel em solução aquosa de glicerol a 10%.

Solução reveladora de superóxido dismutase (ALFENAS et al., 1991):

Riboflavina .....	4 mg
EDTA, Na <sub>2</sub> .....	300 mg
MTT ou NBT .....	20 mg
TRIS-HCl 0,05 M, pH 8,5 (q.s.p.).....	100 mL

Incubar o gel a 30-37°C, exposto à luz, até as bandas acromáticas aparecerem. Descartar a solução e fixar o gel em solução aquosa de glicerol a 10%.