

INSTITUTO AGRONÔMICO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA
TROPICAL E SUBTROPICAL

SELEÇÃO DE CAFEEIROS COM RESISTÊNCIA
MÚLTIPLA A NEMATOIDES DO GÊNERO
Meloidogyne

BÁRBHARA JOANA DOS REIS FATOBENE

Orientador: Oliveira Guerreiro Filho

Tese submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de **Doutor** em Agricultura
Tropical e Subtropical, Área de Concentração
em Genética, Melhoramento Genético Vegetal
e Biotecnologia.

Campinas, SP
Dezembro 2014

Ficha elaborada pela bibliotecária do Núcleo de Informação e Documentação do Instituto Agronômico

F254s Fatobene, Bárbara Joana dos Reis
Seleção de cafeeiros com resistência múltipla a nematoides do gênero *Meloidogyne*/ Bárbara Joana dos Reis Fatobene. Campinas, 2014. 71 fls.

Orientador: Oliveira Guerreiro Filho
Tese (Doutorado) Agricultura Tropical e Subtropical – Instituto Agronômico

1. Cafeeiro - resistência I. Guerreiro Filho, Oliveira II. Título

CDD. 633.73



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA
DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO AGRONÔMICO
Pós-Graduação
Av. Barão de Itapura, 1481 Caixa Postal 28
13001-970 Campinas, SP - Brasil
(19) 2137-0601
pgiac@iac.sp.gov.br



**Curso de Pós-Graduação
Agricultura Tropical e Subtropical**

Certificado de Aprovação de Defesa de Tese

"Seleção de cafeeiros com resistência múltipla a nematoides do gênero *Meloidogyne*".

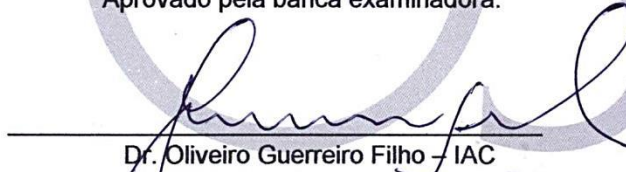
Aluna: Bárbara Joana dos Reis Fatobene

Área de Concentração: Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia

Processo SAA nº: 12.823/2010

Orientador: Dr. Oliveira Guerreiro Filho

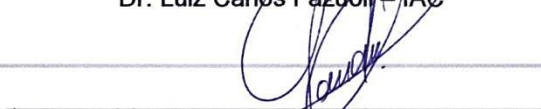
Aprovado pela banca examinadora:


Dr. Oliveira Guerreiro Filho – IAC


Dr. Luiz Carlos Camargo Barbosa Ferraz – USP/ESALQ


Dra. Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro – EMBRAPA


Dr. Luiz Carlos Fazuoli – IAC


Dr. Claudio Marcelo Gonçalves de Oliveira – IB

Visto:


Adriana Parada Dias da Silva
Coordenadora Pós-Graduação
Instituto Agrônomo

Campinas, 10 de dezembro de 2014.

Aos meus queridos avós

Maria e Termino

que se foram, mas me deixaram seu exemplo.

DEDICO

Aos meus avós Ude e José,
que continuam me ensinando.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Wallace Gonçalves por me permitir participar do programa de melhoramento visando resistência a nematoides e pela idealização do projeto.
- Ao Dr. Oliveira Guerreiro Filho por aceitar este desafio junto comigo.
- À Dra. Mirian Perez Maluf pela orientação nas análises moleculares.
- À pesquisadora Maria Bernadete Silvarolla por nos fornecer as informações sobre os cafeeiros da Etiópia.
- Ao Dr. Albertus Bernardus Eskes pelas sugestões e revisão do texto.
- Ao Dr. Cláudio Marcelo Gonçalves de Oliveira pelo treinamento para identificação morfológica e bioquímica das populações de *Meloidogyne* utilizadas neste estudo.
- À Dra. Rosana Bessi pelo auxílio na análise de dinâmica de penetração dos juvenis de *Meloidogyne* spp.
- À Dra. Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro pela prontidão em atender nossos questionamentos.
- Ao Dr. Carlos Eduardo Rossi pela amizade e ajuda.
- À pesquisadora Masako Toma Braghini pelas instruções e ajuda na clonagem dos cafeeiros e pela amizade.
- Às pós-doutorandas Patrícia Favoretto Renci e Juliana Carvalho Martinati Schenk pelo auxílio nas análises moleculares.
- À Giulia Stefania Aloise, pela ajuda na avaliação dos experimentos, pela responsabilidade e dedicação.
- Ao Paulo, sempre presente, pelo carinho, incentivo, ajuda na condução dos experimentos, e pela companhia nos inúmeros fins de semana e feriados na Fazenda Santa Elisa.
- Aos meus pais José Roberto e Marília e meu irmão Pedro pelo amor e incentivo.
- À minha irmã e grande amiga Marília, que me ajudou no desmonte de meu primeiro experimento (aproximadamente 1500 plantas!!!).
- À família Ribeiro Marchiori, agora também minha família.
- Aos amigos Priscila, Marcelo, Ana Julia e Angelina.
- Aos amigos do IAC Alex, Daniel, Juliana, Sara, Kênia, Vinicius, Lucas, Anderson, Elaine, Cristina, Fernanda e Lígia.
- Às colegas Franciane e Cleide, pela amizade e pela ajuda.
- Às colegas do laboratório de biologia molecular Bruna, Daiana e Gabriela Contieri.
- À FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado (2010/15416-0).

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract.....	ix
Introdução	1
Referências Bibliográficas.....	5
Estrutura da tese.....	9
Capítulo 1	10
Resumo	11
Abstract.....	12
1 Introdução	13
2 Material e Métodos.....	15
3 Resultados.....	18
4 Discussão	24
Referências Bibliográficas.....	27
Capítulo 2	31
Resumo	32
Abstract.....	33
1 Introdução	34
2 Material e Métodos.....	35
2.1. Reação de cafeeiros silvestres de <i>Coffea arabica</i> a <i>Meloidogyne paranaensis</i>	35
2.2. Análise de expressão gênica	37
3 Resultados.....	40
3.1. Reação de cafeeiros silvestres de <i>Coffea arabica</i> a <i>Meloidogyne paranaensis</i>	40
3.2. Análise de expressão gênica	46
4 Discussão	48
Referências Bibliográficas.....	52
Capítulo 3	56

Resumo	57
Abstract.....	58
1 Introdução	59
2 Material e Métodos.....	61
3 Resultados.....	63
4 Discussão	65
Referências Bibliográficas.....	68

RESUMO

Os nematoides das galhas constituem fator limitante para a cafeicultura mundial. No Brasil, as espécies *Meloidogyne exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* são as mais importantes, podendo limitar economicamente a manutenção das lavouras infestadas ou a implantação de novos cafezais em solos por eles contaminados. A crescente disseminação de *M. paranaensis* é considerada uma ameaça à produção de café dada à alta patogenicidade e agressividade desta espécie. O uso de cultivares resistentes é considerado o método mais eficiente entre as diversas técnicas de manejo dos nematoides parasitos do cafeeiro, por ser econômico e ambientalmente seguro. O presente trabalho teve por objetivo a seleção de clones de *Coffea canephora* com resistência múltipla a *M. incognita* e *M. paranaensis*, a identificação de acessos silvestres *C. arabica* com resistência a *M. paranaensis*, assim como, a avaliação da viabilidade da técnica de clonagem para a multiplicação de cafeeiros do germoplasma Icatu Vermelho IAC 925 resistentes a *M. paranaensis*. No primeiro experimento, dirigido à seleção de cafeeiros de *C. canephora* com resistência múltipla a *Meloidogyne* spp. foram avaliados três clones – CcK, CcR1 e CcR2 – selecionados em áreas naturalmente infestadas por *M. incognita*. O clone CaMN, cafeeiro da cultivar Mundo Novo IAC 515-20, foi utilizado como controle suscetível. Os clones CcK e CcR2 apresentaram resistência múltipla a *M. incognita* e *M. paranaensis* e não sofreram influência dos nematoides em seu desenvolvimento. O clone CcR1 também apresentou resistência múltipla às populações avaliadas, mas a mortalidade de plantas revelou sensibilidade do genótipo a esta prática. No segundo experimento foram avaliados 71 cafeeiros pertencentes a 20 acessos silvestres de *C. arabica*. Quarenta e sete cafeeiros apresentaram resistência a *M. paranaensis*, sendo que em 38% destes não foi observada segregação da característica. A análise da segregação observada em cafeeiros cujos clones foram classificados como resistentes e as progênies como suscetíveis indica que a resistência a *M. paranaensis* em cafeeiros silvestres de *C. arabica* é provavelmente devida a dois genes dominantes e complementares. Os resultados da análise de expressão gênica relativa do cafeeiro IAC 2279-5B resistente a *M. paranaensis* e do controle suscetível Mundo Novo IAC 515-20 indicam que as respostas de defesa ao nematoide estão relacionadas à via do ácido salicílico. O terceiro experimento realizado teve por objetivo a avaliação da planta matriz IAC 3 do germoplasma Icatu Vermelho IAC 925 de *C. arabica*, selecionada como resistente em lavoura infestada por *M. paranaensis*. Foi observada segregação da resistência

ao nematoide na progênie de polinização aberta devida à provável heterozigose dos genes de resistência na planta matriz. As mudas clonais apresentaram-se todas resistentes a *M. paranaensis*, confirmando a reação da planta matriz em condições de campo. Além disso, a viabilidade do uso de técnicas de clonagem para a propagação de cafeeiros segregantes foi comprovada pelo excelente desempenho do clone IAC 3.

Palavras-chave: *Coffea*, melhoramento do cafeeiro, nematoides das galhas.

Selection of coffee trees with multiple resistance to nematodes of genus *Meloidogyne*

ABSTRACT

Root-knot nematodes constitute a limiting factor for world coffee production. In Brazil *Meloidogyne exigua*, *M. incognita* and *M. paranaensis* are the most important species and may economically limit the maintenance of infested crops or the implementation of new plantations on infested soils. Increasing spread of *M. paranaensis* has been considered a threat to coffee production due to its pathogenicity and aggressiveness. Use of resistant cultivars is considered the most efficient method among the various techniques of management of nematode parasites of coffee, being economical and environmentally safe. In this work we aimed to select *Coffea canephora* clones with multiple resistance to nematodes *Meloidogyne* spp.; to find wild *C. arabica* accessions with resistance to *M. paranaensis*, as well as, evaluating the feasibility of cloning technique for multiplication of germplasm Icatu Vermelho IAC 925 resistant to *M. paranaensis*. In the first experiment, led to the selection of *C. canephora* clones with multiple resistance to *Meloidogyne* spp. three clones were evaluated – CcK, CcR1 and CcR2 – selected in areas naturally infested by *M. incognita*. The clone CaMN, a coffee plant of cultivar Mundo Novo IAC 515-20, was used as a susceptible control. CcK and CcR2 clones showed multiple resistance to *M. incognita* and *M. paranaensis* and their development were not affected the nematodes. CcR1 showed multiple resistance to populations evaluated, but the mortality of inoculated plants reveals sensibility of genotype to this management practice. In the second experiment 71 coffee trees were evaluated belonging to 20 wild *C. arabica* accessions. Forty-seven plants showed resistance to *M. paranaensis*, and in 38% of non-segregation of the trait was observed. Analysis of genetic segregation in coffee plants whose clones were classified as resistant and progenies as susceptible indicated that the resistance to *M. paranaensis* in wild accessions of *C. arabica* is probably due two complementary dominant genes. Results about gene expression analysis on coffee IAC 2279-5B resistant to *M. paranaensis* and on susceptible control Mundo Novo IAC 515-20 indicated that defense responses are related to salicylic acid pathways. The third experiment was aimed at assessing the mother plant IAC 3 of germplasm Icatu Vermelho IAC 925 *C. arabica*, selected as resistant in crop infested by *M. paranaensis*. Segregation of resistance to nematode progeny of open pollinated likely due to heterozygosity of the resistance genes in the plant matrix was observed. The clonal seedlings showed up all resistant *M. paranaensis*, confirming the reaction matrix in field plant. Furthermore, the feasibility of using cloning

techniques for the propagation of segregating coffee was proven by excellent performance of IAC 3.

Keywords: *Coffea*, coffee breeding, root-knot nematodes.

INTRODUÇÃO

Os fitonematoides representam importante limitação à produção agrícola mundial (JONES et al., 2013). Estima-se em 80 bilhões de dólares o prejuízo causado por estes parasitas (NICOL et al., 2011), embora este cálculo seja subestimado pelo desconhecimento de agricultores sobre sua existência, pelo fato de serem patógenos de solo, muito pequenos e cujos sintomas não são específicos (JONES et al., 2013).

Os nematoides das galhas, pertencentes ao gênero *Meloidogyne* Göldi, 1887, encontram-se entre os dez mais importantes grupos de fitonematoides (JONES et al., 2013). Sua importância se dá pelo fato de que são polívoros, altamente adaptados como parasitas obrigatórios, amplamente distribuídos por todo o mundo, parasitando quase todas as espécies de plantas superiores (MOENS et al., 2009).

Esses nematoides são endoparasitos, ou seja, alojam-se no interior do tecido radicular estabelecendo íntima relação com a planta hospedeira. Os juvenis de segundo estágio penetram pela extremidade da raiz, migram até o cilindro vascular onde iniciam a alimentação estimulando a formação das células nutritoras. Este processo é desencadeado por enzimas da glândula esofágica dos juvenis que induzem reprogramação do desenvolvimento das células radiculares com alteração na expressão gênica do hospedeiro. Assim, os RNAs mensageiros da planta hospedeira passam a produzir proteínas que promovem alterações morfológicas e fisiológicas em células da região meristemática. As células são induzidas a sucessivas divisões mitóticas sem a concomitante citocinese, resultando em estruturas celulares hipertrofiadas e multinucleadas, com alta atividade metabólica e secretora, os chamados sítios de alimentação que desviam fotoassimilados para a nutrição dos nematoides durante todo seu ciclo de vida (BERG et al., 2009).

Os nematoides do gênero *Meloidogyne* constituem uma grande ameaça também à produção mundial de café. Os prejuízos econômicos decorrentes da ação destes nematoides variam consideravelmente com as espécies envolvidas e sua distribuição (BERTRAND & ANTHONY, 2008).

Dezoito espécies desse gênero são relatadas como parasitas de cafeeiros em diversas partes do mundo: *M. exigua* Göldi, 1887; *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949; *M. paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes, Santos & Almeida, 1996; *M. coffeicola* Lordello & Zamith, 1960; *M. hapla* Chitwood, 1949; *M. africana* Whitehead, 1960; *M. arabicida* López, 1989; *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949; *M. decalineata* Whitehead, 1968; *M. inornata* Lordello, 1956; *M. izalcoensis* Carneiro, Almeida, Gomes &

Hernandez, 2005; *M. kikuyensis* de Grisse, 1960; *M. konaensis* Eisenback, Bernard & Schmitt, 1994; *M. enterolobii* Yang & Eisenback, 1983; *M. megadora* Whitehead, 1968; *M. oteifae* Elmiligy, 1968 e *M. lopezi* n. sp. Humphreys-Pereira, Flores-Chaves, Gómez, Salazar, Gómez-Alpizar & Elling, 2014. Embora *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 também tenha sido relatada como parasita de cafeeiros no Brasil, países da África, América Central e Índia (CAMPOS & VILLAIN, 2005), inoculações experimentais em genótipos suscetíveis de *C. arabica* nunca confirmaram que o café é um hospedeiro dessa espécie (SANTOS, 1997; OLIVEIRA et al., 1998; CARNEIRO et al., 2005).

Três espécies são as mais importantes considerando-se os danos causados à cafeicultura e sua distribuição geográfica: *M. exigua*, que produz considerável quantidade de galhas, *M. incognita* e *M. paranaensis*, altamente agressivas e que destroem quase todo sistema radicular dos cafeeiros (GONÇALVES & SILVAROLLA, 2001; CAMPOS & VILLAIN, 2005).

Os danos de *M. exigua* são observados na produção da cultura, sobretudo em lavouras de alto nível tecnológico, podendo chegar a 45% quando não é realizado controle destes fitoparasitos (BARBOSA et al., 2004). O contrário ocorre com o ataque de *M. incognita* e *M. paranaensis*, que depauperam severamente o cafeeiro, podendo limitar economicamente a manutenção das lavouras infestadas ou a implantação de novos cafezais em solos por eles contaminados (GONÇALVES & SILVAROLLA, 2001).

A agressividade do ataque de *M. incognita* e *M. paranaensis* pode comprometer a competitividade econômica da cultura nas regiões de arenitos onde ocorrem (GONÇALVES & SILVAROLLA, 2007). Isto porque a ocorrência generalizada de *M. incognita* e *M. paranaensis* aliada a um conjunto de fatores como o perfil do solo (horizonte A arenoso e horizonte B argiloso e mais impermeável), seu manejo inadequado acarretando a degradação física, química e biológica, e as temperaturas mais elevadas tem agravado ainda mais o dano causado por esses parasitos (GONÇALVES & SILVAROLLA, 2001).

Uma das formas de garantir a sustentabilidade e competitividade da cafeicultura é controlar de forma consciente, dos pontos de vista econômico e ambiental, as diversas pragas e doenças que acometem a cultura, com destaque para os nematoides do gênero *Meloidogyne*, uma vez que a erradicação desses parasitos em áreas contaminadas é praticamente impossível (GONÇALVES et al., 2004).

Dentre as diversas técnicas de manejo dos nematoides parasitos do cafeeiro, a utilização da resistência de plantas tem sido considerada a mais eficiente (BERTRAND & ANTHONY, 2008).

Resistência e suscetibilidade de plantas a fitonematoides referem-se à habilidade ou não da supressão do desenvolvimento e reprodução de espécies destes parasitos, existindo um gradiente entre essas duas características (COOK & EVANS, 1987). A resistência tem sido relatada principalmente para os nematoides que possuem uma interação mais especializada com seus hospedeiros, ou seja, os endoparasitos sedentários, como os do gênero *Meloidogyne* (ROBERTS, 2002).

Já a tolerância caracteriza a reação das plantas hospedeiras ao parasitismo dos nematoides e distingue-se da capacidade da planta em suportar a reprodução dos nematoides. Assim, uma planta suscetível pode ser intolerante com significativa redução do desenvolvimento vegetativo, ou pode ser tolerante com limitado dano decorrente da ação dos nematoides, assim como uma planta resistente pode ser tolerante ou intolerante (STARR & ROBERTS, 2004; COOK & EVANS, 1987).

A detecção de fontes de resistência requer estudos acurados devido à variabilidade intra e interespecífica encontradas nas populações dos nematoides (STARR et al., 2002), incluindo as espécies parasitas do cafeeiro (RANDIG et al., 2002, 2004; CARNEIRO et al., 2004; CARNEIRO et al., 2005).

Fontes de resistência a *Meloidogyne* estão presentes especialmente nas espécies diploides de *Coffea*. Do ponto de vista de aproveitamento a curto prazo, como porta-enxerto, utilizando-se a técnica da enxertia hipocotiledonar, ou a médio e longo prazo para os trabalhos de melhoramento, *C. canephora* apresenta maior interesse, pois a resistência aos nematoides está aliada ao seu sistema radicular bem desenvolvido, e porque ela apresenta resistência a outros agentes bióticos, como a cochonilha-da-raiz *Dysmicoccus texensis* (FATOBENE et al., 2012) e nematoides do gênero *Pratylenchus* (VILLAIN et al., 2002; TOMAZINI et al., 2005).

Diversos trabalhos têm reportado a resistência de *C. canephora* a *M. exigua* (FAZUOLI et al., 1978; BERTRAND et al., 2001), porém as populações estudadas segregam para a resistência a *M. incognita* (FAZUOLI et al., 1983; GONÇALVES & FERRAZ, 1987; LIMA et al., 1987; GONÇALVES et al., 1988; GONÇALVES et al., 1996) e *M. paranaensis* (BERTRAND et al., 2000). Fontes de resistência a *M. paranaensis* foram também identificadas em cafeeiros silvestres de *C. arabica* originários da Etiópia (SILVAROLLA et al., 1998; ANZUETO et al., 2001; BOISSEAU et al., 2009).

Em germoplasma derivado de combinações entre *C. arabica* e *C. canephora* como Icatu, Catimor e Sarchimor, inicialmente estudados em relação à ferrugem do cafeeiro *Hemileia vastatrix*, também foram identificadas plantas resistentes a *M. exigua* (BERTRAND

et al. 2001), *M. incognita* (ALBUQUERQUE et al., 2010) e *M. paranaensis* (SERA et al., 2007; SALGADO et al. 2014). Estes estudos têm revelado que algumas progênies derivadas de cafeeiros resistentes segregam para resistência, enquanto outras são homozigotas para a mesma característica.

Como não se preconiza o plantio de *C. canephora* em todas as regiões cafeeiras do Brasil, especialmente pelas restrições climáticas encontradas na maioria delas, recomenda-se a utilização das fontes de resistência encontradas nessa espécie como porta-enxerto para as atuais cultivares de *C. arabica*.

Para isto, utiliza-se a enxertia hipocotiledonar (MORAES & FRANCO, 1973), que é viável e rotineiramente realizada em larga escala por alguns viveiristas. Apesar da viabilidade técnica e econômica, a enxertia é dependente da organização da propriedade para sua execução, e quando não executada corretamente, traz uma série de problemas agrônômicos. A solução ideal para o problema é a seleção de cafeeiros com resistência, que possam ser multiplicados por sementes, dada a maior facilidade e qualidade das mudas de cafeeiros obtidas por essa forma de propagação.

Devido à ocorrência de populações mistas de espécies de *Meloidogyne* em regiões cafeeiras (CARNEIRO et al., 2005), a obtenção de cultivares com resistência múltipla é de grande interesse do ponto de vista econômico por dispensar o uso de uma gama de cultivares com resistência específica, por tratar-se de uma tecnologia adequada, eficiente, com boa relação custo/benefício e não poluente (BERTRAND & ANTHONY, 2008).

Embora muitos progressos já tenham sido alcançados através dos métodos convencionais de melhoramento, deve-se salientar que o longo ciclo de vida da cultura e as diferentes formas de reprodução das espécies silvestres e comerciais de *Coffea* são fatores que dificultam o melhoramento genético do cafeeiro, tornando o processo longo e oneroso. Nesse contexto, a incorporação de técnicas biotecnológicas como a cultura de tecidos, a seleção assistida por marcadores moleculares e a transformação genética de plantas, podem constituir valiosas ferramentas para o melhoramento das cultivares modernas, viabilizando a identificação e introdução de genes de interesse (MALUF, 2008; ALBUQUERQUE, 2009), como aqueles responsáveis pela expressão da resistência aos nematoides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, E.V.S.; CARNEIRO, R.M.D.G.; COSTA, P.M.; GOMES, A.C.M.M.; SANTOS, M.; PEREIRA, A.A.; NICOLE, M.; FERNANDEZ, D.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Resistance to *Meloidogyne incognita* expresses a hypersensitive-like response in *Coffea arabica*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 127, p. 365-373, 2010.
- ALBUQUERQUE, E.V.S. **Estudo da interação entre *Coffea arabica* e o nematoide da galha *Meloidogyne incognita*: identificação da resistência e caracterização por histopatologia e genômica funcional**. 2009. 249p. Tese (Doutorado) - UFRGS.
- ANZUETO, F.; BERTRAND, B.; SARAH, J.L.; ESKES, A.B.; DECASY, B. Resistance to *Meloidogyne incognita* in Ethiopian *Coffea arabica* accessions. **Euphytica**, 118, p.01-08, 2001.
- BARBOSA, D.H.S.G.; VIEIRA, H.D.; SOUZA, R.M.; VIANA, A.P.; SILVA, C.P. Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, v.28, p.49-54, 2004.
- BERG, R.H.; FESTER, T.; TAYLOR, C.G. Development of the root-knot nematodes feeding sites. In: BERG, R.H. & TAYLOR, C.G. (Eds). **Cell Biology of Plant Nematode Parasitism**. Springer, p.115-152, 2009.
- BERTRAND, B.; ANTHONY, F. Genetics of resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and breeding. In: SOUZA, R.M. (Ed). **Plant-Parasitic Nematodes of Coffee**. 1 ed. USA: APS Press & Springer, v.1, p.165-190, 2008.
- BERTRAND, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P. Breeding for resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica* by introgression of resistance genes of *Coffea canephora*. **Plant Pathology**, v.50, p.637-643, 2001.
- BERTRAND, B.; PEÑA DURÁN, M.X.; ANZUETO, F.; CILAS, C.; ETIENNE, H.; ANTHONY, F.; ESKES, A.B. Genetic study of *Coffea canephora* coffee tree resistance to *Meloidogyne incognita* nematodes in Guatemala and *Meloidogyne* sp. nematodes in El Salvador for selection of rootstock varieties in Central America. **Euphytica**, v.113, p.79-86, 2000.
- BOISSEAU, M.; ARIPI, J.; SOUSA, F.R.; CARNEIRO, R.M.D.G.; ANTHONY, F. Resistance to *Meloidogyne paranaensis* in wild *Coffea arabica*. **Tropical Plant Pathology**, v.34, p.38-41, 2009.
- CAMPOS, V.P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: LUC M.; SIKORA R. A.; BRIDGE J. (Eds.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CAB International, 2005. p.529-579.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A.; GONÇALVES, W. Identificação e caracterização de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiro nos estados de São Paulo e Minas Gerais através dos fenótipos de esterase e SCAR-Multiplex-PCR. **Nematologia Brasileira**, v. 29, p. 233-242, 2005.

CARNEIRO, R.M.D.G.; TIGANO, M.S.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A.; SARAH, J.L. Identification, characterization and diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida, Heteroderidae) on coffee from Brazil, North and Hawaii. **Nematology**, v.6, p.287-298, 2004.

COOK, R.; EVANS, K. Resistance and tolerance. In: BROWN, R.H.; KERRY, B.R. (Eds). **Principles and practice of nematode control in crops**. Marrickville: Academic Press, p.179-231, 1987.

FATOBENE, B.J.R.; GUERREIRO FILHO, O.; GONÇALVES, W. Avaliações preliminares da resistência à cochonilha-da-raiz *Dysmicoccus texensis* em clones de *Coffea canephora* resistentes a *Meloidogyne* spp. **Coffee Science**, v.7, p.160-166, 2012.

FAZUOLI, L.C.; COSTA, W.M.; FERNANDES, J.A.R. Variabilidade na resistência de linhagens de *Coffea canephora* em relação a uma população do nematoide *Meloidogyne incognita* em condições de viveiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 10., Poços de Caldas, 1983. **Anais...** Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1983. p.45-46.

FAZUOLI, L.C.; LORDELLO, R.R.A. Fontes de resistência em espécies de cafeeiros ao nematoide *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, v.3, p.49-52, 1978.

GONÇALVES, W.; RAMIRO, D.A.; GALLO, P.B.; GIOMO, G.S. Manejo de nematoides na cultura do cafeeiro. In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO - CAFÉ, 10, 2004, Mococa, SP. **Anais...** Mococa: Instituto Biológico, 2004. p.48-66.

GONÇALVES, W.; SILVAROLLA, M.B. A luta contra a doença causada pelos nematoides parasitos do cafeeiro. **O Agrônomo**, v.59, p.54-56, 2007.

GONÇALVES, W.; SILVAROLLA, M.B. Nematoides parasitos do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Tecnologias de produção de café com qualidade**. Viçosa: UFV, p.199-268, 2001.

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, 1996. p. 172-177.

GONÇALVES, W.; LIMA, M.M.A.; FAZUOLI, L.C. Resistência do cafeeiro à nematoides - III: avaliação da resistência de espécies de *Coffea* e de híbridos interespecíficos à *Meloidogyne incognita* raça 3. **Nematologia Brasileira**, v.12, p.47-54, 1988.

GONÇALVES, W.; FERRAZ, L.C.C.B. Resistência do cafeeiro à nematoides. II Testes de progênies e híbridos para *Meloidogyne incognita* raça 3. **Nematologia Brasileira**, p. 125-142, 1987.

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

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, p. 87-88, 1987.

MALUF, M. P. Genomic tools for the development of engineered *Meloidogyne*-resistant coffee cultivars. In: Souza, R.M. (Ed.). **Plant-parasitic nematodes of coffee**. 1 ed. USA: APS Press & Springer, 2008, v.1, p.191-205.

MOENS, M.; PERRY, R.N.; STARR, J.L. *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: PERRY, R.N.; MOENS, M.; STARR, J.L. (Eds.) **Root-knot nematodes**. CABI Publishing, UK, p.1-17, 2009.

MORAES, M.V.; FRANCO, C.M. **Método expedito para enxertia em café**. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Café, 1973. 8p.

NICOL, J.M.; TURNER, S.J.; COYNE, D.L.; DEN NIJS, L.; HOCKLAND, S.; MAAFI, Z.T. Current nematode threats to world agriculture. In: JONES, J.T.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. (Eds.) **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**, Heidelberg: Springer, 2011, p.21-44.

OLIVEIRA, C.M.G.; Kubo, R.K.; Antedomenico, S.R.; MONTEIRO, A.R. Reação de cafeeiros a *Meloidogyne javanica*. **Revista de Agricultura**, v.73, p. 307–313, 1998.

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

RANDIG, O.; BONGIOVANI, M.; CARNEIRO, R.M.D.G.; CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil as inferred from RSPD analysis and development of SCAR markers specific for the coffee damaging species. **Genome Research**, v.45, p.862-870, 2002.

ROBERTS, P.A. Concepts and consequences of resistance. In: Starr J.L.; Cook, R.; Bridge, J. (Eds.). **Plant resistance to parasitic nematodes**. CAB International, Wallingford, 2002. p. 23-41.

SANTOS, J.M. **Estudos das principais espécies de *Meloidogyne Goeldi* que infectam o cafeeiro no Brasil com descrição de *Meloidogyne goeldii* sp.n.** 1997. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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

SERA, G.H.; SERA, T.; ITO, D.S.; MATA, J.S.; DOI, D.S.; AZEVEDO, J.A.; RIBEIRO FILHO, C. Progenies de *Coffea arabica* IPR 100 resistentes ao nematoide *Meloidogyne paranaensis*. **Bragantia**, v.66, p.43-49, 2007.

SILVAROLLA, M. B.; GONÇALVES, W.; LIMA, M. M. A. ; GUERREIRO FILHO, O.; FAZUOLI, L. C.. Identificação de fontes de resistência a *Meloidogyne paranaensis* em

germoplasma de *Coffea arabica* provenientes da Etiópia. In: Congresso Brasileiro de Nematologia, 21, 1998, Maringá - SP. **Resumos**, 1998. p. 56-57.

STARR, J.L.; ROBERTS, P.A. Resistance to plant-parasitic nematodes. In: CHEN, Z.X.; CHEN, S.Y.; DICKSON, D.W. (Eds.) **Nematology, Advances and Perspectives. Vol. 2. Nematode Management and Utilization**. CAB International, Wallingford, UK, p. 879–907, 2004.

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

TOMAZINI, M.D.; SILVA, R.A.; OLIVEIRA, C.M.G.; GONÇALVES, W.; FERRAZ, L.C.C.B.; INOMOTO, M.M. Resistência de genótipos de cafeeiros à *Pratylenchus coffeae* e *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, v. 29, n. 2, 2005. p. 193-198.

VILLAIN, L.; ANZUETO, F.; SARAH, J.L. Resistance to root-lesion nematodes in *Coffea canephora*. **Nematology**, v. 4, n. 2, 2002. p. 157-158.

ESTRUTURA DA TESE

A tese foi redigida em três capítulos apresentados na forma de manuscritos de artigos científicos. A hipótese do trabalho relaciona-se à possibilidade de identificar genótipos de *Coffea arabica* e *C. canephora* resistentes a *Meloidogyne incognita* e *M. paranaensis* considerando-se que há variabilidade genética em alguns cafeeiros destas espécies para esta característica, inclusive para a existência de genótipos com resistência múltipla *M. incognita* e *M. paranaensis*.

Assim, os capítulos tratam de três objetivos principais:

- a) Selecionar clones de *C. canephora* com resistência múltipla a *M. incognita* e *M. paranaensis*, para uso a curto prazo como porta-enxertos para cultivares de *C. arabica*;
- b) Prosseguir na busca de fontes de resistência a *M. paranaensis* em cafeeiros silvestres de *C. arabica* provenientes da Etiópia.
- c) Avaliar a planta matriz IAC 3 do germoplasma Icatu Vermelho IAC 925, resistente a *M. paranaensis*, quanto à magnitude da segregação da resistência em progênies de polinização aberta, assim como, avaliar a viabilidade do uso da técnica de embriogênese somática direta para a propagação desse cafeeiro.

CAPÍTULO 1

CLONES DE *Coffea canephora* COM RESISTÊNCIA MÚLTIPLA A *Meloidogyne incognita* e *M. paranaensis*

Clones de *Coffea canephora* com resistência múltipla a *Meloidogyne incognita* e *M. paranaensis*

RESUMO

Os nematoides das galhas representam uma séria ameaça à cafeicultura mundial e por isso, a busca por novas fontes de resistência tem se tornado uma prioridade nos programas de melhoramento do cafeeiro. Devido à alta suscetibilidade das cultivares de *Coffea arabica* às espécies *Meloidogyne exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*, o cultivo de cafeeiros do tipo arabica em áreas infestadas por estes nematoides só tem sido possível devido à utilização de porta-enxertos resistentes da espécie *C. canephora*. Neste trabalho três clones de *C. canephora* (CcK, CcR1 e CcR2), cujas plantas matrizes foram selecionadas em lavouras infestadas, foram avaliados quanto a resistência múltipla a quatro populações de *M. incognita*, duas de *M. paranaensis* e uma população mista dessas espécies, todas oriundas de cafeeiros infestados em condições de campo. A cultivar Mundo Novo IAC 515-20 (CaMN), foi utilizada como controle suscetível. Os cafeeiros avaliados foram obtidos por meio de estaquia de ramos ortotrópicos. Os clones CcK e CcR2 apresentaram resistência múltipla a todas as populações de *M. incognita* e *M. paranaensis* de utilizadas no estudo. O clone CcR1 também apresentou resistência múltipla a ambas espécies, exceto à população Mi1 de *M. incognita*. Após a poda dos cafeeiros, algumas plantas de CcR1 morreram, inclusive plantas não inoculadas. A resistência apresentada pelo clone CcK a *M. incognita* e *M. paranaensis* não foi afetada quando aplicado um alto nível de inóculo.

Palavras-chave: nematoides das galhas, resistência genética, café

Coffea canephora* clones with multiple resistance to *Meloidogyne incognita* and *M. paranaensis

ABSTRACT

Since root-knot nematodes represent a serious threat to world coffee production, the search for new sources of resistance should be a priority in coffee breeding. All *Coffea arabica* cultivars are highly susceptible to *M. incognita* and *M. paranaensis*, thence cultivation in infested areas has only been possible with resistant *C. canephora* rootstocks. In this research three elite clones of *C. canephora* (CcK, CcR1 and CcR2), selected as individual trees under nematode infested field conditions, were evaluated for multiple resistances to four populations of *M. incognita*, two of *M. paranaensis* and one mixed population of these species, all originated from infested coffee trees. Cultivar Mundo Novo IAC 515-20 (CaMN), was the susceptible control. The coffee plants were obtained as orthotropic cuttings. CcK and CcR2 clones showed multiple resistances to all populations of *M. incognita* and *M. paranaensis* evaluated. CcR1 showed multiple resistances to both nematode species, except for the population Mi1 of *M. incognita*. After pruning, some plants of CcR1 died, including plants not inoculated. The resistance shown by CcK was not affected by very high inoculum levels applied.

Keywords: root-knot nematodes, genetic resistance, coffee

1 INTRODUÇÃO

Os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) representam a principal ameaça à cafeicultura mundial (BERTRAND & ANTHONY, 2008). No Brasil, *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* são as espécies mais patogênicas e que causam os mais sérios danos. Os danos de *M. exigua* são observados na produção da cultura, sobretudo em lavouras de alto nível tecnológico (BARBOSA et al., 2004). O contrário ocorre com o ataque de *M. incognita* e *M. paranaensis*, que depauperam severamente o cafeeiro, podendo limitar economicamente a manutenção das lavouras infestadas ou a implantação de novos cafezais em solos por eles contaminados (GONÇALVES & SILVAROLLA, 2001).

As cultivares de *Coffea arabica* apresentam alta suscetibilidade às espécies de *Meloidogyne* distribuídas nas principais regiões produtoras dos Estados de São Paulo, Paraná (CAMPOS & VILLAIN, 2005) e Minas Gerais (CASTRO et al., 2008), cuja cafeicultura é tradicionalmente alicerçada no plantio de cultivares de café arábica, e que são responsáveis por mais de 86% da produção brasileira (CONAB, 2014).

A maioria das medidas de controle e manejo de fitonematoides, não apresenta na cultura cafeeira a mesma eficiência observada em outros cultivos. Isto se deve principalmente à severa destruição do sistema radicular causada por *M. incognita* e *M. paranaensis* (GONÇALVES & SILVAROLLA, 2001), quadro irreversível que não permite a recuperação das plantas mesmo com a redução da população de nematoides no solo após o emprego destas medidas.

A resistência genética tem sido considerada a forma mais eficiente de controle de pragas e doenças por tratar-se de uma tecnologia econômica, não poluente e que, geralmente, não demanda mudanças nas práticas culturais (LUC & REVERSAT, 1985). No que diz respeito à resistência aos nematoides parasitos do cafeeiro, duas estratégias tem sido adotadas: a seleção de cultivares pés-francos resistentes ou a seleção de cultivares porta-enxerto resistentes (BERTRAND & ANTHONY, 2008).

Fontes de resistência a *Meloidogyne* estão presentes especialmente nas espécies diploides de *Coffea*. Do ponto de vista do aproveitamento a curto prazo, como porta-enxerto, utilizando-se a técnica da enxertia hipocotiledonar (MORAES & FRANCO, 1973), ou a médio e longo prazo para os trabalhos de melhoramento. Em relação a estes aspectos, *C. canephora* apresenta maior interesse, pois a resistência aos nematoides está aliada ao seu sistema radicular bem desenvolvido, e porque a espécie apresenta resistência a outros agentes

bióticos, como a cochonilha-da-raiz *Dysmicoccus texensis* (FATOBENE et al., 2012) e nematoides do gênero *Pratylenchus* (VILLAIN et al., 2002; TOMAZINI et al., 2005).

Diversos trabalhos têm reportado a resistência de *C. canephora* a *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*, porém, para estas duas últimas espécies, as populações de cafeeiros estudadas segregam para essa característica (FAZUOLI et al., 1978; GONÇALVES & FERRAZ, 1987; GONÇALVES et al., 1988; GONÇALVES et al., 1996; BERTRAND & ANTHONY, 2008).

A utilização das cultivares porta-enxerto Apoatã IAC 2258, no Brasil, e Nemaya, na América Central, tem permitido a sobrevivência e competitividade da cafeicultura em regiões infestadas por *Meloidogyne* (CAMPOS & VILLAIN, 2005). Ambas são derivadas do clone T3561 da coleção de germoplasma do CATIE, na Costa Rica e apresentam resistência a *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*. Apoatã IAC 2258 é propagada através de sementes de polinização aberta, sem controle parental, diferentemente de Nemaya, obtida a partir de jardins biclonais (T3561 x T3751). Embora quase todo germoplasma de *C. canephora* seja resistente a *M. exigua* (FAZUOLI et al., 2002; BERTRAND & ANTHONY, 2008), em ambas cultivares observa-se taxa variável de segregação da resistência a *M. incognita* e *M. paranaensis*, resultando em menor produtividade e morte de parte das plantas em lavouras infestadas (BERTRAND et al., 2000; CAMPOS & SILVA, 2008).

Com vistas à obtenção de novas cultivares de porta-enxerto com elevado nível de resistência a *M. incognita* e *M. paranaensis* as pesquisas foram intensificadas na identificação e seleção de plantas matrizes de *C. canephora* em campos naturalmente infestados. A obtenção de cultivares com resistência múltipla a diferentes nematoides do gênero *Meloidogyne* tornou-se o principal objetivo de programas de melhoramento do cafeeiro, por dispensar o uso de uma gama de cultivares com resistência específica (BERTRAND & ANTHONY, 2008).

O objetivo deste trabalho foi identificar clones de *C. canephora* com resistência múltipla a *M. incognita* e *M. paranaensis*, que poderão, a curto e médio prazo, ser utilizados na implantação de jardins clonais visando à produção de sementes de porta-enxertos resistentes para cultivares de *C. arabica*, assim como, no plantio de pés-francos de *C. canephora* em áreas infestadas por *Meloidogyne* e aptas ao cultivo desse cafeeiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Três clones de *C. canephora*, CcK, CcR1 e CcR2, cujas plantas matrizes foram selecionadas em áreas naturalmente infestadas por diferentes populações de *Meloidogyne* (Tabela 1), foram avaliados em relação à resistência apresentada a duas populações de *M. paranaensis*, quatro populações de *M. incognita*, e uma população mista destas duas espécies (Tabela 2), todas oriundas de cafeeiros infestados. Mudanças clonais da cultivar Mundo Novo IAC 515-20 de *C. arabica* (CaMN) foram utilizadas como controle suscetível.

A identificação das espécies foi realizada através da análise bioquímica dos perfis de esterase segundo método descrito por CARNEIRO & ALMEIDA (2001).

Tabela 1. Descrição dos clones de *Coffea canephora* avaliados quanto à resistência múltipla a *Meloidogyne incognita* e *M. paranaensis* e do controle suscetível de *C. arabica*.

Clone	Descrição
CcK	<i>C. canephora</i> cv. Kouilou
CcR1	<i>C. canephora</i> cv. Robusta IAC C 2291
CcR2	<i>C. canephora</i> cv. Robusta IAC C 2291
CaMN	<i>C. arabica</i> cv. Mundo Novo IAC 515-20

Tabela 2. Descrição e origem das populações de *Meloidogyne incognita* e *M. paranaensis* utilizadas para identificação de clones com resistência múltipla.

População	Espécie/ Fenótipo de esterase	Origem
Mp1	<i>M. paranaensis</i> P1	Cássia dos Coqueiros, SP - Média Mogiana
Mp2	<i>M. paranaensis</i> P2	Herculândia, SP - Alta Paulista
Mi1	<i>M. incognita</i> I1	Lucélia, SP - Alta Paulista
Mi2	<i>M. incognita</i> I1	Ribeirão Corrente, SP - Alta Mogiana
Mi3	<i>M. incognita</i> I2	Garça, SP - Média Paulista
Mi4	<i>M. incognita</i> I2	Marília, SP - Média Paulista
Mp+Mi	<i>M. paranaensis</i> + <i>M. incognita</i> I1	Garça, SP - Média Paulista

As mudas clonais das matrizes selecionadas em campo, assim como do controle suscetível, foram produzidas a partir de estaquia de ramos ortotrópicos segundo método descrito por FONSECA et al. (2007), e transplantadas para vasos de 14 litros contendo mistura de Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico Típico e areia 1:1 (v:v), esterilizada em autoclave e posteriormente fertilizada de acordo com recomendações para a cultura. Foram

utilizadas quatro repetições, com parcelas constituídas de uma planta distribuídas em delineamento experimental inteiramente casualizado. A reação dos cafeeiros às diferentes populações de *Meloidogyne* foi avaliada separadamente através da análise das variáveis relacionadas à reprodução dos nematoides.

O inóculo foi obtido pelo método de HUSSEY & BAKER (1973) modificado por BONETTI & FERRAZ (1981). Cada planta foi inoculada com 25000 ovos+J2, 60 dias após o transplante dos clones para recipientes plásticos, propiciando às plantas condições de produzirem raízes secundárias, preferidas para penetração dos juvenis (NAKASONO et al., 1980; JAEHN et al., 1983). A avaliação do experimento foi realizada 18 meses após a inoculação.

Uma vez que *M. paranaensis* e *M. incognita* não ocasionam a formação de galhas típicas em cafeeiros, foi avaliado o índice de dano (ID) de acordo com escala adaptada de HUSSEY & JANSEN (2002) e de BERTRAND et al. (2000)

O ID foi avaliado através de uma escala de 0 a 5 pontos onde 0 = sistemas radiculares totalmente íntegros; 1 = presença de raros e pequenos engrossamentos nas raízes secundárias; 2 = pequenos engrossamentos em porcentagem inferior a 25% do sistema radicular; 3 = engrossamentos e início de necrose em 25 a 50% do sistema radicular; 4 = perda de raízes secundárias decorrente de necrose observada em 51 a 75% do sistema radicular; e 5 = perda acentuada de raízes secundárias com destruição superior a 75 % do sistema radicular. As plantas foram consideradas resistentes quando $ID \leq 2$, e suscetíveis quando $ID > 2$.

A população final de nematoides nas raízes dos cafeeiros avaliados foi quantificada a partir do número de ovos e juvenis de segundo estágio presentes em cada amostra, utilizando-se para extração dos nematoides o mesmo método de obtenção do inóculo. O fator de reprodução (FR) dos nematoides nos cafeeiros foi calculado através da razão entre a população final e a população inicial ($FR = P_f/P_i$), sendo os tratamentos considerados resistentes quando $FR < 1,0$, e suscetíveis quando $FR \geq 1,0$ (OOSTENBRINK, 1966). A partir do FR foi avaliada a resposta dos cafeeiros inoculados de acordo com critérios adaptados de MOURA & RÉGIS (1987) para classificação de hospedeiros, expressa em porcentagem da redução do fator de reprodução em relação ao controle suscetível (RFR), segundo o qual a planta pode ser considerada imune (RFR=100%), altamente resistente (RFR= 99,9 a 95,1%), resistente (RFR= 95,0 a 90,1 %), moderadamente resistente (RFR= 90 a 75,1 %) e suscetível (RFR= 75,0 a 0%).

A partir da razão entre a população final de nematoides e a massa fresca do sistema radicular dos cafeeiros foi calculado o número de ovos por grama de raiz (NOg^{-1}) para

quantificação proporcional do número de nematoides por tratamento, visto que as plantas podem apresentar diferenças de massa do sistema radicular. Como os dados experimentais de NOg^{-1} , mesmo transformados em $\log(x+1)$ não apresentaram distribuição normal, realizou-se uma análise não paramétrica dos dados, comparando-se os tratamentos ao controle suscetível CaMN através do teste de Mann-Whitney a 5% de probabilidade.

Um grupo de plantas não inoculadas também foram avaliadas a fim de se comparar seu desenvolvimento vegetativo com o das plantas submetidas à ação dos nematoides. O desenvolvimento vegetativo foi mensurado através da massa seca de parte aérea total (MSPA), calculada através da soma da massa seca dos cafeeiros aos nove meses, quando os cafeeiros foram podados a 50 cm de altura, e aos 18 meses, no final do experimento. A poda das plantas foi realizada para simulação de uma prática frequentemente utilizada no manejo das lavouras cafeeiras, uma vez que a consequente redução do sistema radicular pode afetar a tolerância das plantas em solos infestados com altas densidades populacionais de nematoides.

Somente para estas análises, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado arranjado em esquema de parcelas subdivididas, sendo as parcelas constituídas pelos tratamentos inoculados e não inoculados, e as subparcelas pelos clones de *C. canephora* CcK, CcR1, CcR2 e pelo controle suscetível CaMN, com quatro repetições e parcelas de uma planta. Foi realizada análise de variância e as médias de MSPA dos tratamentos inoculados e não inoculados foram comparadas pelo teste t a 5% de probabilidade.

A reação do clone CcK às populações Mp2, Mi1 e Mi3 foi também avaliada quando inoculado com 50000 ovos+J2 planta⁻¹. As variáveis ID, FR e NOg^{-1} , relacionadas à reprodução dos nematoides, e a MSPA, ao desenvolvimento vegetativo das plantas, foram comparadas aos tratamentos inoculados com 25000 ovos+J2 planta⁻¹. Para esta análise foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições e parcelas de uma planta. As médias de NOg^{-1} foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney a 5% de probabilidade. Os dados de desenvolvimento vegetativo das plantas submetidas aos dois níveis de inóculo foram submetidos à análise de variância, e quando detectadas diferenças significativas as médias foram comparadas pelo teste t a 5% de probabilidade.

O potencial dos clones de *C. canephora* na redução da população de nematoides no solo foi avaliado por um teste biológico. Para isto, tomateiros silvestres suscetíveis (*Solanum hirsutum*) foram cultivados concomitantemente com os clones de *C. canephora* e com o controle suscetível inoculados com as sete populações de *Meloidogyne*. Os tomateiros foram plantados nos vasos dos tratamentos 12 meses após a inoculação dos cafeeiros e avaliados

após 60 dias quanto ao índice de galhas e/ou massas de ovos (IG) segundo TAYLOR & SASSER (1978). O experimento encontra-se esquematizado na Figura 1.

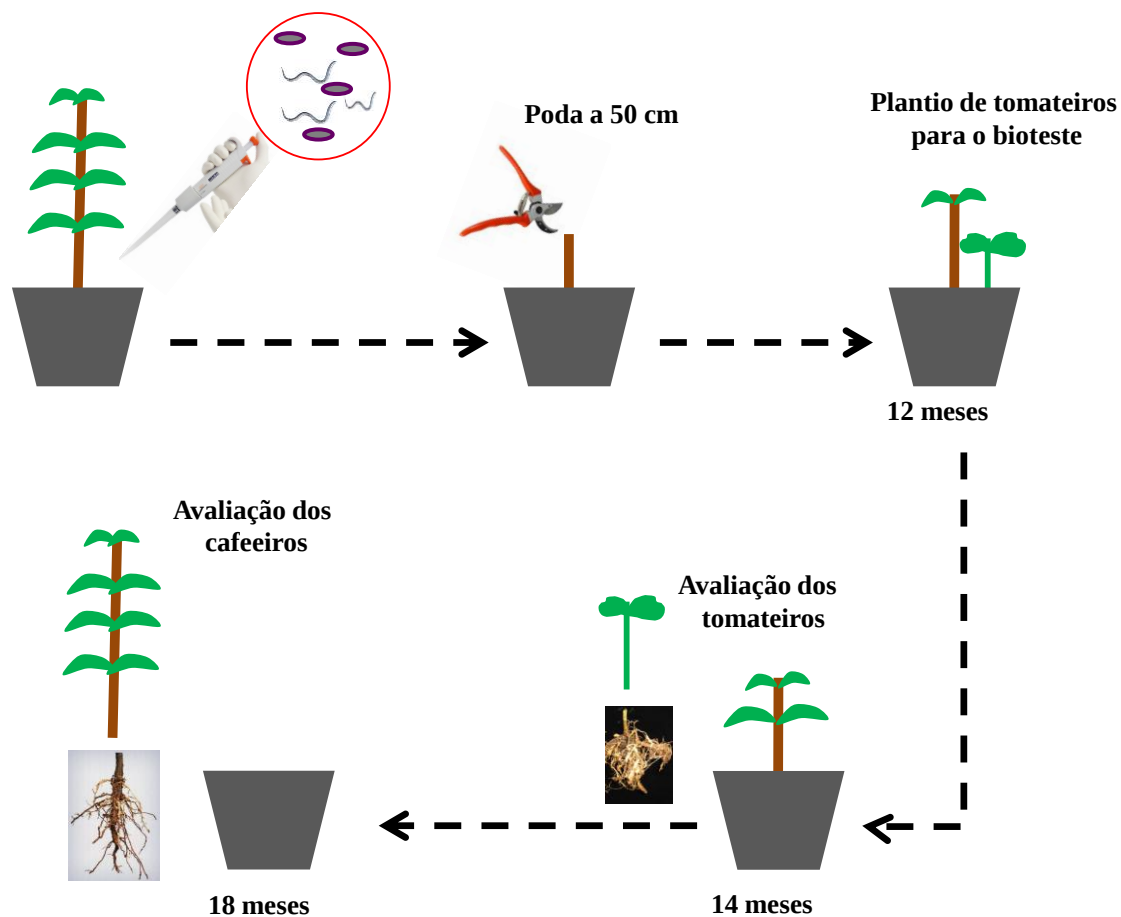


Figura 1. Esquema do experimento.

3 RESULTADOS

A cultivar Mundo Novo IAC 515-20 de *C. arabica* (CaMN) apresentou médias elevadas de ID, FR e NOg⁻¹, confirmando sua eficiência como controle suscetível por proporcionar reprodução satisfatória das sete populações de *Meloidogyne* (Tabela 3).

As plantas não inoculadas de CaMN apresentaram os maiores valores médios MSPA. Entretanto, quando inoculado sofreu influência de todas as populações com redução significativa do desenvolvimento vegetativo (Figura 2C).

Quando inoculado com a população Mp2, o clone CaMN apresentou FR de 0,6 devido à reduzida população final de nematoides observada (Tabela 3). Entretanto, o clone foi considerado suscetível segundo o índice de dano (5,0) o que permite a inferência de que o reduzido número de parasitos se deve à severa destruição do sistema radicular dos cafeeiros. Assim, a variável RFR não foi calculada para os clones inoculados com esta população. Para as demais populações CaMN foi classificado como suscetível, com valores de IG variando de 4,6 a 5,0 e FR de 1,4 a 7,1 (Figura 2A). A suscetibilidade da cultivar Mundo Novo IAC 515-20 pôde ser constatada também no final do experimento, devido à mortalidade de plantas inoculadas com todas as populações de *Meloidogyne* avaliadas, chegando a 75% na população Mp2 (Figura 2B).

O melhor desempenho relacionado à redução da reprodução dos parasitos foi apresentado pelo clone CcK, que apresentou médias reduzidas de NOg^{-1} , significativamente diferentes do tratamento controle, e não teve seu desenvolvimento vegetativo comprometido pelos nematoides (Figura 2C). CcK foi classificado como resistente a todas as populações segundo as variáveis ID e FR. De acordo com a variável RFR foi considerado imune à população Mi4, altamente resistente às populações Mi1, Mi2, Mi3 e Mp+Mi e resistente à Mp1 (Tabela 3).

O clone CcR2 apresentou valores de ID, FR e NOg^{-1} também reduzidos e não sofreu influência dos nematoides em seu desenvolvimento vegetativo (Figura 2C). Quanto a variável RFR, o clone CcR2 apresentou resposta semelhante ao clone CcK, classificado como altamente resistente e resistente às mesmas populações, exceto à Mp1, à qual foi classificado como moderadamente resistente (Tabela 3), com RFR próximo a 80%.

Tabela 3. Reação de clones de *Coffea canephora* CcK, CcR1 e CcR2 e do controle suscetível Mundo Novo IAC 515-20 de *C. arabica* (CaMN) a *Meloidogyne paranaensis* (Mp1 e Mp2), *M. incognita* (Mi1, Mi2, Mi3 e Mi4) e uma população mista de *M. paranaensis* e *M. incognita* (Mp+Mi) segundo as variáveis índice de dano (ID), fator de reprodução (FR), porcentagem de redução do fator de reprodução (RFR), número de ovos por grama de raiz (NOg⁻¹) e eficiência hospedeira (EH).

População	Clones	ID	C	FR	C	RFR	C	NOg ⁻¹	
Mp1	CcK	1,5	R	0,1	R	92,9	R	13,89	*
	CcR1	1,7	R	0,1	R	92,9	R	68,04	*
	CcR2	3,7	S	0,3	R	78,6	MR	65,23	*
	CaMN	5,0	S	1,4	S	Padrão		461,42	
Mp2	CcK	0,0	R	0,1	R	-		11,99	*
	CcR1	3,5	S	0,3	R	-		110,89	ns
	CcR2	1,5	R	0,3	R	-		41,28	*
	CaMN	5,0	S	0,6	R	-		196,47	
Mi1	CcK	0,0	R	0,1	R	96,7	AR	5,41	*
	CcR1	3,6	S	1,5	S	-		433,53	ns
	CcR2	1,0	R	0,3	R	90,0	R	34,91	*
	CaMN	4,6	S	3,0	S	Padrão		776,55	
Mi2	CcK	0,0	R	0,0	R	99,5	AR	2,03	*
	CcR1	2,0	R	0,1	R	98,9	AR	19,01	*
	CcR2	1,5	R	0,0	R	99,5	AR	3,78	*
	CaMN	5,0	S	4,4	S	Padrão		1015,01	
Mi3	CcK	0,0	R	0,0	R	99,5	AR	1,89	*
	CcR1	0,0	R	0,2	R	90,2	R	51,62	*
	CcR2	0,0	R	0,0	R	98,1	AR	6,33	*
	CaMN	5,0	S	2,1	S	Padrão		637,89	
Mi4	CcK	0,0	R	0,0	R	100	I	0	*
	CcR1	3,8	S	0,4	R	94,1	R	213,09	ns
	CcR2	1,5	R	0,1	R	99,0	AR	12,54	*
	CaMN	5,0	S	7,1	S	Padrão		1412,20	
Mp+Mi	CcK	0,0	R	0,0	R	99,1	AR	2,33	*
	CcR1	1,6	R	0,2	R	93,4	R	80,45	ns
	CcR2	1,5	R	0,0	R	98,2	AR	7,17	*
	CaMN	5,0	S	2,3	S	Padrão		582,61	

C= Classificação dos clones; I= imune; AR = altamente resistente; R = resistente; MR = moderadamente resistente; S = suscetível. T = tolerante; INT = intolerante.

* = $p < 0,05$; ns = diferença não significativa. As médias de NOg⁻¹ foram comparadas à média do controle suscetível IAC 20 através do teste não paramétrico Mann-Whitney.

Os cafeeiros foram inoculados com 25000 ovos+J2 planta⁻¹.

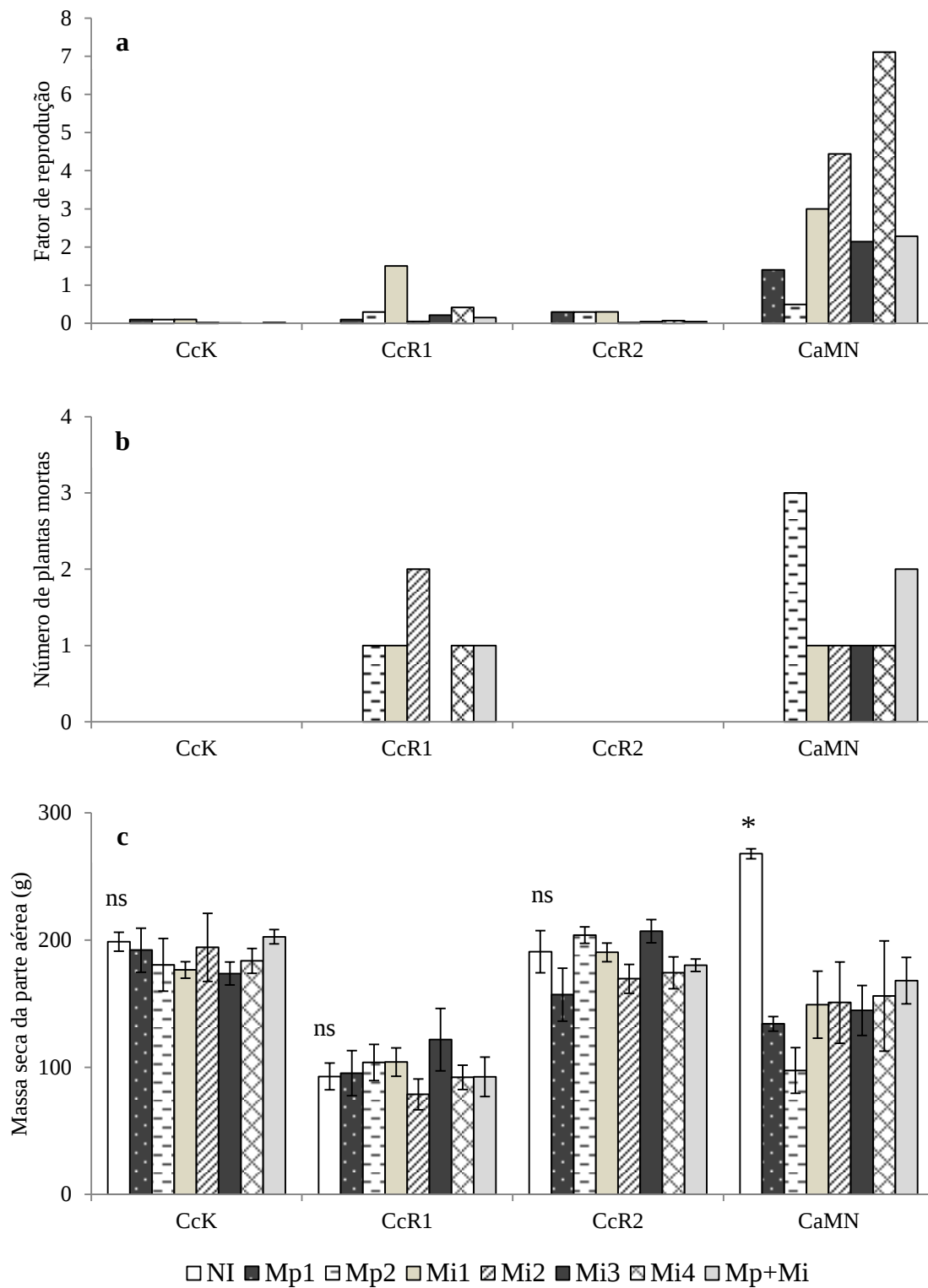


Figura 2. (a) Fator de reprodução; (b) número de plantas inoculadas mortas; (c) massa seca da parte aérea (MSPA) dos clones de *Coffea canephora* CcK, CcR1 e CcR2 e do controle suscetível CaMN inoculados com *M. paranaensis* (Mp1 e Mp2), *M. incognita* (Mi1, Mi2, Mi3 e Mi4) e uma população mista de *M. paranaensis* e *M. incognita* (Mp+Mi) e não inoculados (NI). * = $p < 0,05$; ns = diferenças estatísticas não significativas.

O clone CcR1 apresentou resistência múltipla a todas as populações utilizadas no estudo, exceto Mi1. Entretanto, os valores médios do NOg^{-1} em CcR1 foram superiores àqueles observados nos outros dois clones, e intermediários a esses e ao controle suscetível CaMN.

CcR1 foi considerado resistente a Mp1, Mi2 e Mi3 segundo o FR e suscetível a Mi1, porém sem apresentar redução de seu desenvolvimento vegetativo (Tabela 3, Figura 2C). Embora classificado como resistente a Mp2, Mi4 e Mp+Mi segundo o FR, quando inoculado com essas populações o NOg^{-1} não foi estatisticamente diferente do controle suscetível CaMN.

Não foi observada diferença estatística entre o desenvolvimento vegetativo de plantas inoculadas e não inoculadas de CcR1. Entretanto, após a poda dos cafeeiros algumas plantas morreram, mesmo as não inoculadas.

Na análise da reação do clone CcK inoculado com 25000 e 50000 ovos+J2 planta⁻¹ diferenças significativas do NOg^{-1} foram observadas apenas em plantas inoculadas com a população Mp2 (Tabela 4). O FR foi muito reduzido em ambos os níveis de inóculo das três populações testadas, sobretudo nos cafeeiros inoculados com 50000 ovos+J2 planta⁻¹, que mantiveram o mesmo nível de resistência apresentado quando inoculados com 25000 ovos+J2 planta⁻¹.

Tabela 4. Reação de cafeeiros do clone CcK de *Coffea canephora* inoculados com 25000 e 50000 ovos+J2 planta⁻¹ das populações Mp2 de *Meloidogyne paranaensis*, Mi1 e Mi3 de *M. incognita*, segundo as variáveis índice de dano (ID), fator de reprodução (FR) e número de ovos por grama de raiz (NOg^{-1}).

População	Nível de inóculo	ID	C	FR	C	NOg^{-1}
Mp2	25000	0	R	0,09	R	11,9 *
	50000	0	R	0,005	R	1,1
Mi1	25000	0	R	0,055	R	5,41 ns
	50000	0	R	0,007	R	3,6
Mi3	25000	0	R	0,01	R	1,89 ns
	50000	0	R	0,002	R	0,64

C= Classificação dos clones em R= resistente; * = $p < 0,05$; ns = diferença não significativa. As médias do NOg^{-1} foram comparadas através do teste não paramétrico Mann-Whitney.

Não foram observadas diferenças estatísticas no desenvolvimento vegetativo de plantas inoculadas com 25000 e 50000 ovos+J2 planta⁻¹ das populações Mp2 e Mi1.

Entretanto, cafeeiros do clone CcK inoculados com 50000 ovos da população Mi3 apresentaram maior média de MSPA em relação ao menor nível de inóculo (Figura 3).

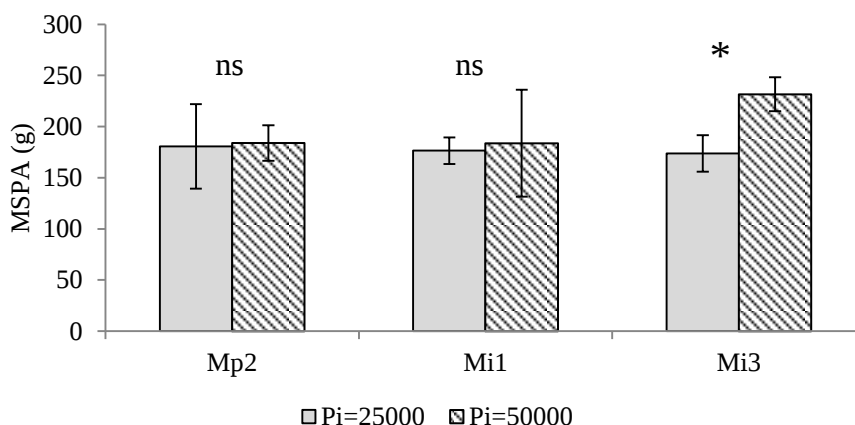


Figura 3. Massa seca de parte aérea (MSPA) de clones CcK inoculados com 25000 e 50000 ovos+J2 planta⁻¹ de *M. paranaensis* (Mp2) e *M. incognita* (Mi1e Mi3).
* = $p < 0,05$; ns = diferença não significativa.

O bioteste com tomateiros confirmou que o clone CcK foi eficiente na redução da população inicial (25000 ovos+J2 planta⁻¹) quando inoculado com as cinco populações de *M. incognita*, uma vez que os tomateiros cultivados em vasos destes cafeeiros apresentaram $IG \leq 2$. Os tomateiros cultivados nos vasos das plantas de CcK inoculadas com as populações de *M. paranaensis* apresentaram médias de IG de 3,5 (Mp1) e 3,25 (Mp2), o que está relacionado à maior patogenicidade da espécie. Respostas similares foram observadas para os tomateiros cultivados em vasos do clone CcR2 inoculados com as duas espécies de *Meloidogyne*.

Tomateiros cultivados em vasos do clone CcR1 apresentaram menor IG quando inoculados com nematoides das populações Mi1, Mi2 e Mi3 de *M. incognita*. Para as demais populações, os valores médios de IG foram superiores a 3,5, acompanhando o desempenho dos cafeeiros de CcR1 no que concerne à variável NOg^{-1} , a qual não diferiu do controle suscetível (Tabela 3). Os tomateiros plantados nos vasos do controle suscetível CaMN apresentaram o valor máximo de IG, como o esperado.

Tabela 5. Índice de galhas de tomateiros cultivados em vasos dos clones de *Coffea canephora* CcK, CcR1, CcR2 e do controle suscetível CaMN de *C. arabica* inoculados com *Meloidogyne paranaensis* (Mp1 e Mp2), *M. incognita* (Mi1, Mi2, Mi3 e Mi4) e uma população mista de *M. paranaensis* e *M. incognita* (Mp+Mi).

Clones	Mp1	Mp2	Mi1	Mi2	Mi3	Mi4	Mp+Mi
CcK	3,50	3,25	2,00	0,25	0,00	0,00	1,00
CcR1	4,75	4,25	2,25	1,75	2,75	4,00	3,50
CcR2	3,00	2,75	2,00	0,00	0,00	2,50	1,75
CaMN	5,00	5,00	5,00	5,00	4,75	5,00	5,00

4 DISCUSSÃO

Os clones CcK, CcR1 e CcR2 apresentam resistência múltipla às diversas populações de *M. incognita* e *M. paranaensis* utilizadas no experimento, o que demonstra a eficiência do programa de seleção realizado pelo Instituto Agrônômico. Na realização deste trabalho foram consideradas variações intra e interespecíficas encontradas nas populações de *Meloidogyne* spp. parasitas de cafeeiros (RANDIG et al., 2002; CARNEIRO et al, 2004), características de extrema importância visto a especificidade dos genes de resistência encontrada em *Coffea* spp. (CARNEIRO et al., 2009), como também, a ocorrência de populações mistas de espécies de *Meloidogyne* em regiões cafeeiras (CARNEIRO et al., 2005).

Comparados a outros tipos de patógenos como vírus, bactérias e fungos, os nematoides das galhas caracterizam-se por baixa dispersão natural, fluxo gênico e diversidade genética entre as populações, o que leva a esperar que os genes de resistência durável possam ser implantados nas plantas cultivadas (McDONALD & LINDE, 2002). A pressão de seleção de nematoides com fatores de virulência correspondentes aos múltiplos genes de resistência demandará diversos eventos de mutação e seleção, aumentando a probabilidade da longa durabilidade da resistência (STARR & ROBERTS, 2004).

O clone CcK quando inoculado com maior nível de inóculo não permitiu a reprodução dos nematoides, apresentando alto nível de resistência e nenhum efeito deletério decorrente de seu parasitismo.

O desenvolvimento vegetativo dos clones CcK e CcR2 não foi influenciado pelas diferentes populações de *Meloidogyne*. Estes resultados estão relacionados à reação das

plantas matrizes em condições de campo, as quais foram inicialmente selecionadas de acordo com seu vigor observado em lavouras infestadas com densidades populacionais muito elevadas de *M. incognita* e *M. paranaensis*.

O desenvolvimento vegetativo de CcR1 foi inferior ao dos outros dois clones devido a morte de cafeeiros após a poda. A mortalidade das plantas foi atribuída à sensibilidade do genótipo a esta prática e não à intolerância desse clone aos nematoides, visto que três plantas não inoculadas também morreram após a poda.

Assim, além da avaliação da habilidade do hospedeiro em reduzir a reprodução dos nematoides é necessário os genótipos resistentes, principalmente aqueles que darão origem a novas cultivares, sejam também conduzidos em condições de campo e submetidos às diversas práticas de manejo usualmente empregadas na cultura.

Os clones CcK e CcR2 foram eficientes na redução da população dos nematoides no solo conforme ilustrado pelo IG dos tomateiros cultivados nos vasos destes cafeeiros, sempre inferiores ao observado nos tomateiros cultivados nos vasos do controle suscetível CaMN. CcR1 proporcionou maior redução da população de nematoides quando inoculado com as populações de *M. incognita* Mi1, Mi2 e Mi3.

A piramidação de genes de resistência a nematoides é considerada a melhor estratégia de melhoramento para combinação da resistência múltipla em um indivíduo (BERTRAND & ANTHONY, 2008). Entretanto, os clones avaliados neste trabalho foram obtidos com a seleção de genótipos a partir da variabilidade genética natural existente em *C. canephora*. Isto é importante visto que para realizar a piramidação de genes de resistência em uma cultivar há a necessidade de hibridação, seleção fenotípica e utilização de ferramentas diversas, como por exemplo os marcadores moleculares, tornando o processo muito laborioso e demorado.

Os cafeeiros dos clones CcK e CcR2 deverão ser avaliados quanto à capacidade de combinação, entre si e como com outros clones de *C. canephora* selecionados pelo programa de melhoramento do Instituto Agrônomo, quanto à reação de suas progênies a diferentes populações de *Meloidogyne* e também aos nematoides das lesões (*Pratylenchus* spp.). Outras características como a época de florescimento, produção e características tecnológicas das sementes devem ser consideradas para a escolha dos genitores utilizados em jardins clonais para a produção de sementes com resistência múltipla.

O uso de cafeeiros com resistência múltipla às espécies e populações de *Meloidogyne*, em conjunto com outras técnicas de manejo de fitonematoídeos constituirá, a curto e médio prazo, a maneira de aprimorar o sistema de implantação da cafeicultura em áreas infestadas por esses parasitas, por tratar-se de uma tecnologia adequada, eficiente, com boa relação

custo/benefício e não poluente, podendo contribuir para uma maior competitividade da cultura, uma das condicionantes da agricultura atual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, D.H.S.G.; VIEIRA, H.D.; SOUZA, R.M.; VIANA, A.P.; SILVA, C.P. Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, v.28, p.49-54, 2004.
- BERTRAND, B.; ANTHONY, F. Genetics of resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and breeding. In: SOUZA, R.M. (Ed). **Plant-Parasitic Nematodes of Coffee**. 1 ed. USA: APS Press & Springer, v.1, p.165-190, 2008.
- BERTRAND, B.; PEÑA DURÁN, M.X.; ANZUETO, F.; CILAS, C.; ETIENNE, H.; ANTHONY, F.; ESKES, A.B. Genetic study of *Coffea canephora* coffee tree resistance to *Meloidogyne incognita* nematodes in Guatemala and *Meloidogyne* sp. nematodes in El Salvador for selection of rootstock varieties in Central America. **Euphytica**, v.113, p.79-86, 2000.
- BONETTI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**. v.6, p.553, 1981.
- CAMPOS, V.P.; SILVA, J.R.C. **Management of *Meloidogyne* spp. in Coffee Plantations**. In: SOUZA, R.M. (Ed). **Plant-Parasitic Nematodes of Coffee**. 1 ed. USA: APS Press & Springer, v.1, p.149-164, 2008.
- CAMPOS, V.P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: LUC M.; SIKORA R. A.; BRIDGE J. (Eds.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CAB International, 2005. p.529-579.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; COSTA, S.B.; SOUSA, F.R.; SANTOS, D.F.; ALMEIDA, M.R.A.; SIQUEIRA, K.M.; SANTOS, M.F.A.; TIGANO, M.; FONSECA, A.F.A. Reação de cafeeiros conilon a diferentes populações de *Meloidogyne* spp. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 6, 2009, Vitória. **Anais...** Brasília, DF : Consórcio Pesquisa Café, 2009.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A.; GONÇALVES, W. Identificação e caracterização de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiro nos estados de São Paulo e Minas Gerais através dos fenótipos de esterase e SCAR-Multiplex-PCR. **Nematologia Brasileira**, v. 29, p. 233-242, 2005.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; TIGANO, M.S.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A.; SARAH, J.L. Identification, characterization and diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida, Heteroderidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. **Nematology**, v.6, p.287-298, 2004.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para a identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v.25, p. 35-44, 2001.

CARNEIRO, R.G.; ALTÉIA, A.A.K. Seleção de cafeeiros (*Coffea canephora*) resistentes a raças de *Meloidogyne incognita*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 16, 1992, Lavras. **Resumos...** Piracicaba: SNB/ESAL, p. 61, 1992.

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

DROPKIN, V.H.; NELSON, P.E. The histopathology of root-knot nematode infections in soybeans, **Phytopathology**, v.50, p.442-447, 1960.

FAZUOLI, L.C.; MEDINA FILHO, H. P.; GONÇALVES, W.; GUERREIRO FILHO, O.; SILVAROLLA, M. B. Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arábica obtidas no Instituto Agrônomo de Campinas. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa: UFV, p.163-215, 2002.

FATOBENE, B.J.R.; GUERREIRO FILHO, O.; GONÇALVES, W. Avaliações preliminares da resistência à cochonilha-da-raiz *Dysmicoccus texensis* em clones de *Coffea canephora* resistentes a *Meloidogyne* spp. **Coffee Science**, v.7, p.160-166, 2012.

FAZUOLI, L.C.; COSTA, W.M.; FERNANDES, J.A.R. Variabilidade na resistência de linhagens de *Coffea canephora* em relação a uma população do nematoide *Meloidogyne incognita* em condições de viveiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 10., Poços de Caldas, 1983. **Anais...** Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1983. p.45-46.

FAZUOLI, L.C.; LORDELLO, R.R.A. Fontes de resistência em espécies de cafeeiros ao nematoide *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, v.3, p.49-52, 1978.

FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, R.G.; FERRÃO, M.A.G.; VERDIN FILHO, A.C; VOLPI, P.S.; BITTENCOURT, M.L.C. Jardins clonais, produção de sementes e mudas. In: FERRÃO, R.G; FONSECA, A.F.A.; BRAGANÇA, S.M.; FERRÃO, M.A.G.; De MUNER, L.H. (Eds.). **Café Conilon**. Vitória: Incaper, 2007, p.229-255.

GONÇALVES, W.; SILVAROLLA, M.B. Nematoides parasitos do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Tecnologias de produção de café com qualidade**. Viçosa: UFV, p.199-268, 2001.

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.; LIMA, M.M.A.; FAZUOLI, L.C. Resistência do cafeeiro à nematoides - III: avaliação da resistência de espécies de *Coffea* e de híbridos interespecíficos à *Meloidogyne incognita* raça 3. **Nematologia Brasileira**, v.12, p.47-54, 1988.

GONÇALVES, W.; FERRAZ, L.C.C.B. Resistência do cafeeiro à nematoides. II Testes de progênes e híbridos para *Meloidogyne incognita* raça 3. **Nematologia Brasileira**, v.11, p. 125-142, 1987.

HUSSEY, R. S.; JANSSEN, G. J. W. Root-knot nematode: *Meloidogyne* species. In: STARR, J. L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (Eds.) **Plant Resistance to Parasitic Nematodes**. Wallingford, UK: CAB International. p.43–70, 2002.

HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Report**, v.57, p.1025-1028, 1973.

JAHN, A.; MONTEIRO, A.R.; LORDELLO, L.G.; DEMÉTRIO, C.G.B. Efeito de nitrogênio e de potássio em *Meloidogyne incognita* (Kofoed & White, 1919). Chtiwood, 1949, como parasito do cafeeiro. **Sociedade Brasileira de Nematologia**, v.7, p.189-208, 1983.

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, p. 87-88, 1987.

LUC, M.; REVERSAT, G. Possibilités et limites des solutions génétiques aux affections provoquées par les nématodes sur les cultures tropicales. Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France (Paris), v.71, p.781-791, 1985.

MCDONALD, B.A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, v.124, p.163-180, 2002.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira/ Café safra 2014. Segundo Levantamento. Maio/2014**. Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: CONAB, 2014. Disponível em: < http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_05_20_08_49_17_boletim_mai-2014.pdf > Acesso em 13 de julho de 2014.

MORAES, M.V.; FRANCO, C.M. Método expedito para enxertia em café. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Café, 1973. 8p.

MOURA, R.M.; RÉGIS, E.M.O. Reações de cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em relação ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* (Nematoda: Heteroderidae). **Nematologia Brasileira**, v. 6, p. 215-225, 1987.

NAKASONO, K.; LORDELLO, R.R.A; MONTEIRO, A.R.; LORDELLO, L.E.G. Desenvolvimento das raízes de cafeeiros novos transplantados e penetração por *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, v.4, p.33-41, 1980.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mededelingen Van De landbouwhogeschool Te Wageningen**, v.66, p.1-46, 1966.

RANDIG, O.; BONGIOVANI, M.; CARNEIRO, R.M.D.G.; CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil as inferred from RSPD analysis and development of SCAR markers specific for the coffee damaging species. **Genome Research**, v.45, p.862-870, 2002.

ROBERTS, P.A.; SCHEUERMAN, R.W. Field evaluation of sweet potato clones and cultivars for reaction to root-knot and stubby root nematodes in California. **Hortscience**, v.19, p.270-273, 1984.

SCHOMAKER, C.H.; BEEN, T.H. Plant growth and population dynamics. In: PERRY, R.N.; MOENS, M. (Eds.) **Plant Nematology**. CAB International, Wallingford, UK, p.275-301, 2006.

SERA, T.; MATA, J. S.; SERA, G. H.; DOI, D. S.; ITO, D. S.; AZEVEDO, J. A.; RIBEIRO FILHO, C. Identificação de porta-enxertos de café robusta resistentes aos nematoides *Meloidogyne paranaensis* e *M. incognita* raças 2 e 1. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., Londrina, 2005. **Anais**. Brasília, D.F.: Embrapa - Café, 2005. (CD-ROM), 5p.

STARR, J.L.; ROBERTS, P.A. Resistance to plant-parasitic nematodes. In: CHEN, Z.X.; CHEN, S.Y.; DICKSON, D.W. (Eds.) **Nematology, Advances and Perspectives. Vol. 2. Nematode Management and Utilization**. CAB International, Wallingford, UK, p. 879–907, 2004.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. **Biology**: identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Raleigh: North Caroline State University, 1978. 111p.

TOMAZINI, M.D.; SILVA, R.A.; OLIVEIRA, C.M.G.; GONÇALVES, W.; FERRAZ, L.C.C.B.; INOMOTO, M.M. Resistência de genótipos de cafeeiros à *Pratylenchus coffeae* e *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, v.29, p.193-198, 2005.

VILLAIN, L.; ANZUETO, F.; SARAH, J.L. Resistance to root-lesion nematodes in *Coffea canephora*. **Nematology**, v.4, p.157-158, 2002.

WILLIAMSON, V.M.; ROBERTS, P.A. Mechanisms and genetics of resistance, In: PERRY, R.N.; MOENS, M.; STARR, J. (Eds.) **Root-knot nematodes**. CABI Publishing, UK, p.301-325, 2009.

CAPÍTULO 2

ACESSOS SILVESTRES DE *Coffea arabica* RESISTENTES A *Meloidogyne paranaensis*

**Acessos silvestres de *Coffea arabica* resistentes a
*Meloidogyne paranaensis***

RESUMO

A resistência de acessos silvestres de *Coffea arabica* à espécie *Meloidogyne paranaensis* tem sido relatada por diversos autores. Entretanto, poucos acessos foram investigados em relação à resistência às diversas variações interespecíficas encontradas nas populações de *Meloidogyne* spp. parasitas de cafeeiros, sendo isto, de extrema importância visto a especificidade dos genes de resistência encontrada em *Coffea* e a frequente ocorrência de populações mistas de espécies de *Meloidogyne* nas regiões cafeeiras. Os acessos silvestres representam importante fonte de variabilidade para a resistência a nematoides dada a maior facilidade de hibridação com as cultivares comerciais da espécie, a consequente transferência dos genes de resistência, assim como, à recuperação mais rápida dos caracteres agronômicos do parental recorrente. Setenta e um cafeeiros silvestres de *C. arabica* provenientes da Etiópia foram avaliados quanto a sua resistência a *M. paranaensis*, considerando-se a reação de mudas clonais e progênies de polinização aberta. Destes, 47 foram considerados resistentes com base no fator de reprodução (FR). Avaliando-se a reação dos dez acessos com menor número de ovos por grama de raiz (NOg⁻¹) verificou-se que estes proporcionaram redução de 85% desta variável em relação a população original dos 71 cafeeiros e de 60% em relação aos 47 cafeeiros resistentes de acordo com o FR. Quarenta e dois cafeeiros foram avaliados simultaneamente através da reação de mudas clonais e progênies de polinização aberta quando inoculados com *M. paranaensis*. Quatorze destes cafeeiros apresentaram reação diversa, ou seja, clones classificados como resistentes e progênies sexuais, como suscetíveis. Este desempenho pode ser explicado pela provável heterozigosidade dos genes de resistência presentes nas plantas matrizes, resultando em progênies segregantes para a característica. A segregação observada adequa-se a hipótese de que dois genes dominantes e complementares são responsáveis pela expressão da resistência a *M. paranaensis*. Os resultados da análise de expressão gênica relativa do cafeeiro IAC 2279-5B resistente a *M. paranaensis* e do controle suscetível Mundo Novo IAC 515-20 indicam que as respostas de defesa ao nematoide estão relacionadas à via do ácido salicílico.

Palavras-chave: resistência, café, nematoides das galhas.

**Wild *Coffea arabica* accessions resistant to
*Meloidogyne paranaensis***

ABSTRACT

Resistance of wild *Coffea arabica* accessions to root-knot nematode *Meloidogyne paranaensis* has been reported. However, resistance of these plants were not investigated in relation to diverse *Meloidogyne* species and races. It is important due the specificity of resistance genes in *Coffea* and the common occurrence of mixed populations in coffee crops. Wild *C. arabica* accessions represent important sources of genetic variability for resistance to nematodes because they may be easily crossing with commercial cultivars to transfer the resistance genes. Seventy-one wild *C. arabica* accessions from Ethiopia were tested again *M. paranaensis* evaluated through the assessment of clonal and open pollinated progenies. Forty-seven plants were considered resistant based in reproduction factor (RF). The top-ten resistant plants provided reduction of 85% of number of eggs per gram of root (NOg⁻¹) in relation of original population of 71 coffee trees and about 60% in relation of 47 resistant plants according to RF. Forty-two coffee trees were simultaneously assessed by the reaction of clones and open pollinated progenies inoculated with *M. paranaensis*. Fourteen of these showed diverse reaction, which means, resistant clones and susceptible progenies. This performance could be explained by the likely heterozygosity of resistance genes present in the mother plants, resulting in progeny segregation for this trait. The observed segregation could fit the hypothesis of two complementary dominant genes are responsible for the expression of resistance to *M. paranaensis*. Results about gene expression analysis on coffee IAC 2279-5B resistant to *M. paranaensis* and on susceptible control Mundo Novo IAC 515-20 indicated that defense responses are related to salicylic acid pathways.

Keywords: resistance, coffee, root-knot nematodes.

1 INTRODUÇÃO

Das dezoito espécies de *Meloidogyne* relatadas como parasitas de cafeeiros em diversas partes do mundo, seis ocorrem no Brasil (CARNEIRO & COFCEWICZ, 2008; LOPEZ-LIMA, 2014) sendo que três delas destacam-se como as mais frequentes em nossos cafezais: *M. exigua*, produzindo considerável quantidade de galhas, enquanto que *M. incognita* e *M. paranaensis* destroem quase todo sistema radicular (GONÇALVES & SILVAROLLA, 2001).

A agressividade de *M. paranaensis* e sua crescente disseminação em regiões produtoras de café a colocam como séria ameaça à cultura no Brasil nos estados de São Paulo, Paraná (CAMPOS & VILLAIN, 2005) e Minas Gerais (CASTRO et al, 2008), assim como em países da América Central (VILLAIN et al, 2008).

Com exceção da cultivar IPR 100 (SERA et al., 2007) todas as cultivares registradas de *Coffea arabica* são altamente suscetíveis a *M. paranaensis*. Em áreas infestadas por nematoides dessa espécie, o cultivo de *C. arabica* só tem sido possível devido à utilização mudas enxertadas em cafeeiros de *C. canephora* resistentes, como Apoatã IAC 2258 (CAMPOS & SILVA, 2008) e Nemaya (BERTRAND et al., 2000).

Muitas das medidas de controle disponíveis para o manejo desses parasitas, como o uso de nematicidas, tornam-se ineficazes mesmo com a redução da população de nematoides no solo. Isto ocorre devido à severa destruição do sistema radicular decorrente do parasitismo de *M. paranaensis*, a qual não permite a recuperação das plantas. Assim, o uso de cultivares resistentes tem sido considerado o método mais eficiente entre as diversas técnicas de manejo dos nematoides parasitos do cafeeiro, por ser econômico e ambientalmente seguro (BERTRAND & ANTHONY, 2008).

Fontes de resistência a *M. paranaensis* tem sido encontradas em acessos silvestres de *C. arabica* oriundos da Etiópia (SILVAROLLA et al., 1998, ANZUETO et al., 2001; BOISSEAU et al., 2009). Esses cafeeiros resistentes representam importante fonte de variabilidade para o desenvolvimento de novas cultivares, dada a maior facilidade de hibridação com as cultivares comerciais da espécie e a consequente transferência dos genes de resistência, assim como, à recuperação mais rápida dos caracteres agronômicos do parental recorrente, contribuindo para abreviação do tempo e dos recursos investidos no melhoramento tradicional da espécie.

Os genes de resistência encontrados em cafeeiros silvestres de *C. arabica* podem ser utilizados para o desenvolvimento de cultivares pés-francos, ou ainda no melhoramento de

porta-enxertos de *C. canephora*, com a vantagem de apresentar melhor adaptabilidade às regiões produtoras de temperatura mais amena (BERTRAND & ANTHONY, 2008; CAMPOS & VILLAIN, 2005).

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a reação de acessos silvestres de *C. arabica* ao nematoide *M. paranaensis*, assim como a reação dos acessos mais promissores às espécies *M. exigua* e *M. incognita*.

Ademais, visando à obtenção de informações sobre a interação molecular entre cafeeiros silvestres de *C. arabica* e *M. paranaensis*, foi realizada análise dos perfis de expressão de genes relacionados ao metabolismo antioxidante, a defesa de plantas a patógenos e ao ciclo celular.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reação de cafeeiros silvestres de *Coffea arabica* a *Meloidogyne paranaensis*

Os acessos silvestres de *C. arabica* analisados neste trabalho foram coletados pela FAO em 1965 na Etiópia, e encontram-se atualmente na coleção do banco ativo de germoplasma (BAG) de *Coffea* do Centro de Café ‘Alcides Carvalho’ do Instituto Agrônomo de Campinas.

A reação a *M. paranaensis* foi avaliada em 20 acessos silvestres de *C. arabica*, selecionados a partir de informações preliminares obtidas por SILVAROLLA et al. (1998), representados por uma a oito plantas, totalizando 71 cafeeiros avaliados (Tabela 2, Figura 1). Foram avaliadas progênies de polinização aberta (geração S₂) dos 71 cafeeiros e mudas clonais obtidas através de propagação vegetativa de 42 cafeeiros.



Figura 1. Progênies S₂ de cafeeiros silvestres de *C. arabica* avaliadas quanto a sua reação à infestação por *M. paranaensis*.

Para obtenção das progênies, frutos maduros foram colhidos de plantas individuais e descascados mecanicamente. As sementes foram secas ao sol e armazenadas em local seco até o momento da semeadura, a qual foi realizada em germinador de areia. Os clones foram obtidos via estaquia a partir de segmentos de ramos ortotrópicos, segundo FONSECA et al. (2007). Foram coletados ramos de todos os 71 acessos, entretanto somente 41 apresentaram enraizamento de número suficiente de mudas clonais para avaliação. Ambas as plantas obtidas por semente e por clonagem foram transplantadas em copos plásticos de 500 ml contendo mistura de Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico Típico e areia 1:1 (v:v), autoclavada por 2 horas a 127 °C e fertilizada de acordo com recomendações para a cultura.

Mudas clonais de aproximadamente nove meses e progênies de cinco meses, foram inoculadas com 5000 ovos+J2 planta⁻¹ com população de *M. paranaensis* proveniente de raízes de cafeeiros cultivados em Cássia dos Coqueiros, SP. A pureza da população foi aferida através de identificação bioquímica dos perfis de esterase segundo método descrito por CARNEIRO & ALMEIDA (2001), sendo a população caracterizada como *M. paranaensis* fenótipo P1.

O inóculo foi obtido de raízes de tomateiros e cafeeiros suscetíveis, segundo o método de HUSSEY & BAKER (1973) modificado por BONETTI & FERRAZ (1981). A cultivar Mundo Novo IAC 515-20 (MN) foi utilizada como controle suscetível. O delineamento estatístico adotado foi o inteiramente casualizado, com 3 a 6 plantas por clone e 15 plantas por progênie de polinização aberta.

Aos 135 dias após a inoculação foi realizada a avaliação das plantas segundo variáveis relacionadas à reprodução dos nematoides.

O índice de dano (ID) foi avaliado segundo escala adaptada de BERTRAND et al (2000) e de HUSSEY & JANSEN (2002) onde 0 = sistemas radiculares totalmente íntegros; 1 = presença de raros e pequenos engrossamentos nas raízes secundárias, sem necrose; 2 = pequenos engrossamentos em porcentagem inferior a 25% do sistema radicular; 3 = engrossamentos e início de necrose em 25 a 50% do sistema radicular; 4 = engrossamentos e perda de raízes secundárias decorrente de necrose observada em 51 a 75% do sistema radicular; e 5 = perda acentuada de raízes secundárias com destruição superior a 75 % do sistema radicular. As plantas foram consideradas resistentes quando $ID \leq 2$, e suscetíveis quando $ID > 2$.

A população final de nematoides nas raízes dos cafeeiros foi quantificada a partir do número de ovos e juvenis de segundo estágio (J2) presentes em cada amostra, utilizando-se o mesmo método de obtenção do inóculo. A partir da contagem do número de ovos e juvenis

(J2) presentes em uma alíquota de 1 ml, calculou-se o número total de nematoides presentes no sistema radicular do cafeeiro, e assim, o fator de reprodução (FR) foi estimado através da razão entre a população final e a população inicial ($FR = P_f/P_i$), sendo as plantas classificadas como resistentes ($FR < 1$) ou suscetíveis ($FR \geq 1$) (OOSTENBRINK, 1966). Os cafeeiros foram classificados quanto à porcentagem de redução do fator de reprodução em relação ao controle suscetível (RFR) conforme sistema adaptado de MOURA & RÉGIS (1987) segundo o qual as plantas podem ser consideradas imunes (RFR=100%), altamente resistentes (RFR= 99,9 a 95,1%), resistentes (RFR= 95,0 a 90,1 %), moderadamente resistentes (RFR= 90 a 75,1 %) ou suscetíveis (RFR= 75,0 a 0%). A partir da razão entre a população final e a massa fresca do sistema radicular dos cafeeiros foi calculado o número de ovos por grama de raiz (NOg^{-1}) para quantificação proporcional do número de nematoides por tratamento, visto que as plantas podem apresentar diferenças de massa do sistema radicular.

Uma vez que os dados de NOg^{-1} não apresentaram distribuição normal, foi realizada análise não paramétrica dos dados, comparando-se os tratamentos ao controle suscetível Mundo Novo IAC 515-20 através do teste de Mann-Whitney a 5% de probabilidade.

Quando observada reação diversa entre as mudas clonais e progênes do mesmo cafeeiro foi realizada uma análise da segregação genética da resistência através de um teste de qui-quadrado (χ^2) para adequar as proporções observadas às esperadas, com base na respectiva hipótese do número de genes envolvidos no controle do caráter resistência dos cafeeiros.

2.2. Análise de expressão gênica

Para a análise de expressão gênica foram utilizados dois genótipos: o acesso silvestre de *C. arabica* IAC 2279-5B, classificado como resistente a *M. paranaensis* e a testemunha suscetível Mundo Novo IAC 515-20. Foram utilizadas plantas de um ano de idade, cultivadas em vasos de 500 ml no mesmo substrato utilizado nas avaliações de resistência. As plantas foram inoculadas com 5000 juvenis de segundo estágio coletados em Funil de Baermann. A cada tempo de coleta quatro plantas foram amostradas.

Foram coletadas as raízes secundárias dos tratamentos antes da inoculação (0), e nos tempos correspondentes à infecção e início da migração dos juvenis no córtex radicular (12 horas após a inoculação – 12 hai), migração e início de estímulo dos sítios de alimentação por alguns dos juvenis (7 dai) e quando sítios de alimentação já estavam bem estabelecidos (14 dai). As amostras foram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para a extração do RNA, aproximadamente 2 g de raízes secundárias foram submetidas à maceração em nitrogênio líquido utilizando Trizol conforme instruções do fabricante (Applied Biosystems). A qualidade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1% seguida de quantificação por espectrofotometria (OD_{220-280nm}).

Para a síntese de cDNA, as amostras de RNA foram tratadas com DNase (RQ1 RNase-Free DNase – Promega), seguindo o protocolo do fabricante. Em seguida, o cDNA foi sintetizado utilizando o Kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Foram sintetizadas 4 alíquotas independentes de cDNA de cada planta amostrada, os quais foram misturados para a obtenção de um bulk das amostras, facilitando as análises de expressão gênica.

A seleção de genes para as análises de expressão gênica foi realizada em função de informações prévias da literatura. Genes potencialmente associados com a resistência de plantas a patógenos, com o metabolismo antioxidante e com funções do ciclo celular foram selecionados como genes candidatos para o estudo (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos genes avaliados na interação entre cafeeiros resistente e suscetível de *Coffea arabica* inoculados com *Meloidogyne paranaensis*.

Gene	Descrição
Cell Div	Cell division cycle protein
BETA	Beta tubulin
DNAM	DNA methyltransferase
APX	Ascorbate peroxidase
CAT	Catalase
CaPrx	Class III peroxidase
EDS1	Enhanced disease susceptibility 1
PAD4	Phytoalexin deficient 4
LTP	Lipid transfer protein [<i>Atriplex nummularia</i>]
RAR1	Required for <i>Mla12</i> resistance
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase
NPR1	Non-expressor of pathogenesis related genes-1

Para a identificação de sequências gênicas homólogas em café foram realizadas buscas dirigidas no Banco de Dados do Genoma Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>) e no banco de dados das Solanáceas (<http://solgenomics.net/>).

As amostras de cDNA foram então submetidas às análises de expressão gênica. As condições de reações foram as mesmas descritas por ISKANDAR et al. (2004). Para uma reação com volume final de 15 µL foram utilizados 2 µL de cDNA na concentração de 1000 ng/µL, 4,6 µL de água ultra pura tratada com DEPC, 0,45 µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*) diluídos a 10 pmol e 7,5 µL de *SYBR green master mix* (Fermentas). O controle endógeno escolhido foi o gene que codifica GAPDH - *Desidrogenase gliceraldeído 3-fosfato* por apresentar maior estabilidade dos Ct's nas amostras analisadas.

Todas as amostras foram analisadas em triplicatas. Foram utilizadas também amostras sem adição de cDNA para detectar qualquer sinal de contaminação, controle negativo. Para confirmar a presença de *amplicons* únicos, os produtos do PCR foram submetidos à curva de dissociação com temperatura variando entre 60 °C e 95 °C. Todas as placas foram feitas em triplicatas para aumentar a precisão experimental.

Os resultados obtidos em plataforma de PCR em tempo real foram submetidos à quantificação relativa (QR), sendo que o calibrador, para todos os genes testados foi o controle suscetível antes da inoculação. As condições da reação são aquelas especificadas pelo fabricante e foram realizadas em termociclador ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystem). Os resultados das quantificações relativas dos genes selecionados foram analisados utilizando-se a quantificação relativa, calculada a partir do valor de 2^{-DDCt} , sendo $DCt = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene controle}}$, e $DDCt = DCt_{\text{gene alvo}} - DCt_{\text{calibrador}}$. Ct é o ciclo definido como "*threshold*", ou seja, onde a fluorescência é detectável e é inversamente proporcional ao logaritmo do número inicial de cópias (TYAGI et al., 1998).

3 RESULTADOS

3.1. Reação de cafeeiros silvestres de *Coffea arabica* a *Meloidogyne paranaensis*

A maior parte dos acessos avaliados através de mudas clonais (93%) foi considerada resistente segundo o FR. Entretanto, quando avaliados por meio da reação de suas progênes de polinização aberta, 47 (66%) foram classificados como resistentes segundo o FR (Tabela 2).

Todos os cafeeiros dos acessos IAC 2036, IAC 2052, IAC 2139, IAC 2163 e IAC 2279 revelaram-se resistentes a *M. paranaensis* segundo o FR, com reduzida taxa de segregação nas progênes. Os cafeeiros IAC 2036-3B, IAC 2041-5A, IAC 2052-1C, IAC 2139-4A e IAC 2279-5B destacaram-se entre as demais progênes destas séries pelo reduzido NOg^{-1} , variável relacionada à resistência e ao sistema radicular bem desenvolvido destas plantas (Figura 2).

Outros acessos como IAC 2041, IAC 2101, IAC 2118, e IAC 2166, representados por três a seis cafeeiros, apresentaram pelo menos uma planta matriz suscetível, embora a maior parte das plantas tenham apresentado excelente resposta com médias reduzidas de FR e NOg^{-1} .

Os acessos IAC 2026, IAC 2032, IAC 2042, IAC 2075, IAC 2111, IAC 2142, IAC 2172 e IAC 2183, representados por 1 a 6 cafeeiros, comportaram-se, em média, como suscetíveis, especialmente os acessos IAC 2032-1A e IAC 2032-1B (Figura 3) que apresentaram os maiores valores de FR e NOg^{-1} , superiores ao controle Mundo Novo IAC 515-20.

A média do NOg^{-1} dos dez acessos – IAC 2041-5A, IAC 2139-4A, IAC 2036-3B, IAC 2118-1A, IAC 2279-5B, IAC 2139-1A, IAC 2139-1C, IAC 2279-5A, IAC 2195-2A e IAC 2052-1C – mais resistentes a *M. paranaensis* segundo esta mesma variável (323,02), foi 85% inferior à média da população inicial composta pelos 71 cafeeiros avaliados (2263,12) e 60% inferior à média dos 47 acessos resistentes segundo o FR (821,13).

Tabela 2. Reação de clones e progênes de polinização aberta de acessos silvestres de *Coffea arabica* a *Meloidogyne paranaensis* segundo as variáveis índice de dano (ID), fator de reprodução (FR), porcentagem de redução do fator de reprodução (RFR), porcentagem de plantas resistentes nas progênes de polinização aberta segundo FR (%R) e número de ovos por grama de raiz (NOg⁻¹).

Acesso	Clones							Progênes de polinização aberta						
	n	ID	FR	C	RFR	C	NOg ⁻¹	ID	FR	C	RFR	C	%R	NOg ⁻¹
IAC 2026-1A	na							3,3	1,8	S			40	5150,7 *
IAC 2026-1B	6	1,8	0,3	R	84,1	MR	334,4 *	2,3	0,7	R	90,9	MR	80	1569,5 *
IAC 2026-1C	6	1,3	0,1	R	92,4	R	213,4 *	2,7	1,0	S			80	1650,7 *
IAC 2026-4A	2	2,5	0,5	R	72,4	MR	1173,6 *	3,1	1,1	S			73	1219,4 *
IAC 2026-4B	2	2,5	0,3	R	85,3	MR	1334,3 ^{ns}	3,2	2,7	S			60	2450,4 *
IAC 2026-6A	6	1,3	0,3	R	85,3	MR	437,9 *	3,0	1,3	S			33	1594,7 *
IAC 2032-1A	na							4,2	13,3	S			0	23425,7 *
IAC 2032-1B	5	3,6	3,5	S			8582,0 ^{ns}	4,1	11,1	S			20	16858,9 ^{ns}
IAC 2036-1A	3	2,3	0,3	R	85,3	MR	442,1 *	2,6	0,2	R	97,4	AR	100	1023,6 *
IAC 2036-1B	na							2,3	0,4	R	94,8	R	87	573,8 *
IAC 2036-1C	na							2,1	0,5	R	93,5	R	80	554,4 *
IAC 2036-2A	na							2,9	0,3	R	96,1	AR	100	699,1 *
IAC 2036-3A	na							2,8	0,2	R	97,4	AR	100	437,4 *
IAC 2036-3B	na							2,2	0,2	R	97,4	AR	100	267,1 *
IAC 2036-4A	3	2,0	0,2	R	90,6	R	888,2 *	2,2	0,3	R	96,1	AR	100	469,6 *
IAC 2036-4B	na							2,4	0,3	R	96,1	AR	87	606,4 *
IAC 2041-2A	na							2,5	0,3	R	96,1	R	87	795,2 *
IAC 2041-2B	na							2,3	0,2	R	97,4	AR	100	714,1 *
IAC 2041-3A	na							3,5	3,7	S			0	5074,2 *
IAC 2041-5A	na							2,3	0,1	R	98,7	AR	100	95,1 *
IAC 2041-5B	na							2,8	0,3	R	96,1	R	93	463,1 *
IAC 2042-2A	6	1,2	0,2	R	91,2	R	260,2 *	3,7	1,9	S			40	3820,7 *
IAC 2052-1A	na							2,4	0,3	R	96,1	AR	93	1194,8 *
IAC 2052-1B	na							2,6	0,4	R	94,8	AR	87	1312,4 *
IAC 2052-1C	na							2,0	0,2	R	97,4	AR	100	432,5 *
IAC 2075-6C	2	1,0	0,2	R	88,2	MR	406,2 *	3,9	3,7	S			13	7709,8 *
IAC 2101-3A	6	1,5	0,1	R	95,3	AR	82,6 *	2,4	0,5	R	93,5	R	73	1005,9 *
IAC 2101-3B	6	1,3	0,3	R	82,4	MR	353,2 *	2,8	0,2	R	97,4	AR	100	633,3 *
IAC 2101-4A	5	3,0	0,2	R	90	MR	556,8 *	2,9	1,3	S			60	2196,5 *
IAC 2101-5A	na							2,9	0,3	R	96,1	AR	100	639,4 *
IAC 2111-2A	6	1,3	0,3	R	84,1	MR	338,7 *	3,0	2,7	S			47	5130,2 *
IAC 2111-3A	2	1,5	0,2	R	88,2	MR	209,4 *	3,0	1,8	S			80	4084,4 *
IAC 2111-3B	4	1,8	0,5	R	70,6	S	615,2 *	3,0	1,2	S			67	2872,0 *
IAC 2116-1A	na							3,8	2,7	S			7	9136,0 ^{ns}
IAC 2116-1B	na							2,5	0,6	R	92,2	R	80	1010,6 *
IAC 2116-1C	5	2,6	0,2	R	88,2	MR	880,5 *	2,6	0,5	R	93,5	R	93	1127,5 *

Continua...

Tabela 2. Continuação.

Acesso	Clones							Progenies de polinização aberta						
	n	ID	FR	C	RFR	C	NOg ⁻¹	ID	FR	C	RFR	C	%R	NOg ⁻¹
IAC 2116-2A	4	2,3	0,2	R	88,2	MR	347,1 *	2,9	1,0	S			60	2400,3 *
IAC 2116-2B	na							2,5	1,0	S			27	3219,0 *
IAC 2116-2C	6	1,5	0,3	R	84,7	MR	303,2 *	2,6	0,8	R	89,6	MR	73	1331,1 *
IAC 2118-1A	5	1,4	0,1	R	96,5	AR	62,1 *	2,5	0,2	R	97,4	AR	87	317,8 *
IAC 2118-6A	2	4,0	2,4	S			6592,1 ^{ns}	3,9	3,4	S			40	5002,4 *
IAC 2118-6B	6	2,7	0,2	R	88,2	MR	458 *	2,4	0,4	R	94,8	R	80	601,5 *
IAC 2118-6C	3	2,0	0,1	R	94,1	R	169,1 *	2,4	0,3	R	96,1	AR	87	479,5 *
IAC 2139-1A	na							2,4	0,2	R	97,1	AR	100	361,8 *
IAC 2139-1B	3	1,7	0,2	R	87,1	MR	1740,5 ^{ns}	2,9	0,9	R	88,3	MR	73	3507,5 *
IAC 2139-1C	na							2,6	0,2	R	97,4	AR	100	371,9 *
IAC 2139-4A	2	2,0	0,0	R	97,6	AR	36,55 *	1,4	0,1	R	98,7	AR	100	211,9 *
IAC 2139-4B	na							2,8	0,8	R	89,6	MR	80	1401,2 *
IAC 2139-4C	2	1,0	0,1	R	94,7	R	2014,3 ^{ns}	2,6	0,7	R	90,9	MR	87	1233,8 *
IAC 2142-3A	na							3,3	2,1	S			27	4332,3 *
IAC 2163-2A	6	1,3	0,1	R	94,1	R	189,8 *	2,9	0,6	R	92,2	R	80	1198,7 *
IAC 2163-2B	5	1,7	0,3	R	85,3	MR	188,3 *	2,5	0,7	R	90,9	R	73	1510,8 *
IAC 2163-2C	6	1,7	0,1	R	95,9	AR	244,5 *	2,5	0,5	R	93,5	R	93	852,4 *
IAC 2163-5A	6	1,5	0,1	R	94,1	R	171,7 *	2,7	0,4	R	94,8	R	100	732,6 *
IAC 2163-5B	6	1,4	0,2	R	88,8	MR	266 *	2,6	0,7	R	90,9	R	73	1157,8 *
IAC 2163-6A	4	1,8	0,1	R	95,9	AR	127,8 *	2,4	0,3	R	96,1	AR	100	585,1 *
IAC 2163-6B	na							2,3	0,3	R	96,1	AR	100	756,6 *
IAC 2163-6C	4	1,3	0,1	R	95,9	AR	90,6 *	2,5	0,3	R	96,1	AR	93	836,2 *
IAC 2166-4A	5	2,4	0,4	R	77,1	MR	1005,1 *	2,8	1,5	S			47	1933,4 *
IAC 2166-4B	na							2,3	0,3	R	96,1	R	93	713,1 *
IAC 2166-4C	na							2,6	0,3	R	96,6	AR	93	597,9 *
IAC 2172-2A	na							2,3	1,0	S			67	1378,6 *
IAC 2183-6A	3	2,3	1,2	S			2183,0 ^{ns}	2,6	4,8	S			20	9103,4 ^{ns}
IAC 2195-2A	na							2,4	0,1	R	98,7	AR	93	414,6 *
IAC 2200-1A	6	1,5	0,1	R	94,1	R	196,6 *	2,1	0,7	R	90,9	R	80	692,7 *
IAC 2200-2A	2	1,5	0,2	R	90	MR	1250 ^{ns}	2,9	0,9	R	88,3	MR	67	1388,6 *
IAC 2200-2B	4	1,0	0,2	R	88,8	MR	1825,1 ^{ns}	2,3	1,0	S			67	1044,7 *
IAC 2200-4A	6	2,0	0,3	R	81,2	MR	288 *	2,3	1,2	S			53	1299,8 *
IAC 2200-5A	6	1,2	0,1	R	97,1	AR	51,3 *	2,4	0,8	R	89,6	MR	67	955,9 *
IAC 2279-5A	4	1,3	0,1	R	97,1	AR	155,3 *	2,0	0,2	R	97,4	AR	100	406,4 *
IAC 2279-5B	na							2,0	0,2	R	97,4	AR	100	351,1 *
MN	6	3,0	1,8	S	Padrão		8562,4	4,3	7,7	S	Padrão		0	12453,2

C= Classificação dos cafeeiros em AR= altamente resistente; R= resistente; MR= moderadamente resistente; S= suscetível.
 * = p < 0,05; ns= diferença não significativa; na= não avaliado. As médias de NOg⁻¹ dos tratamentos foram comparadas à média do controle suscetível Mundo Novo IAC 515-20 através do teste não paramétrico Mann-Whitney. n = número mudas clonais. A reação das progênies dos acessos foi avaliada em 15 plantas.



Figura 2. Sistemas radiculares de progênies S₂ dos cafeeiros silvestres de *Coffea arabica* IAC 2036-3B (A), IAC 2041-5A(B), IAC 2052-1C (C), IAC 2139-4A (D) e IAC 2279-5B (E) resistentes a *Meloidogyne paranaensis*. A escala (etiqueta de identificação) corresponde a cinco centímetros.

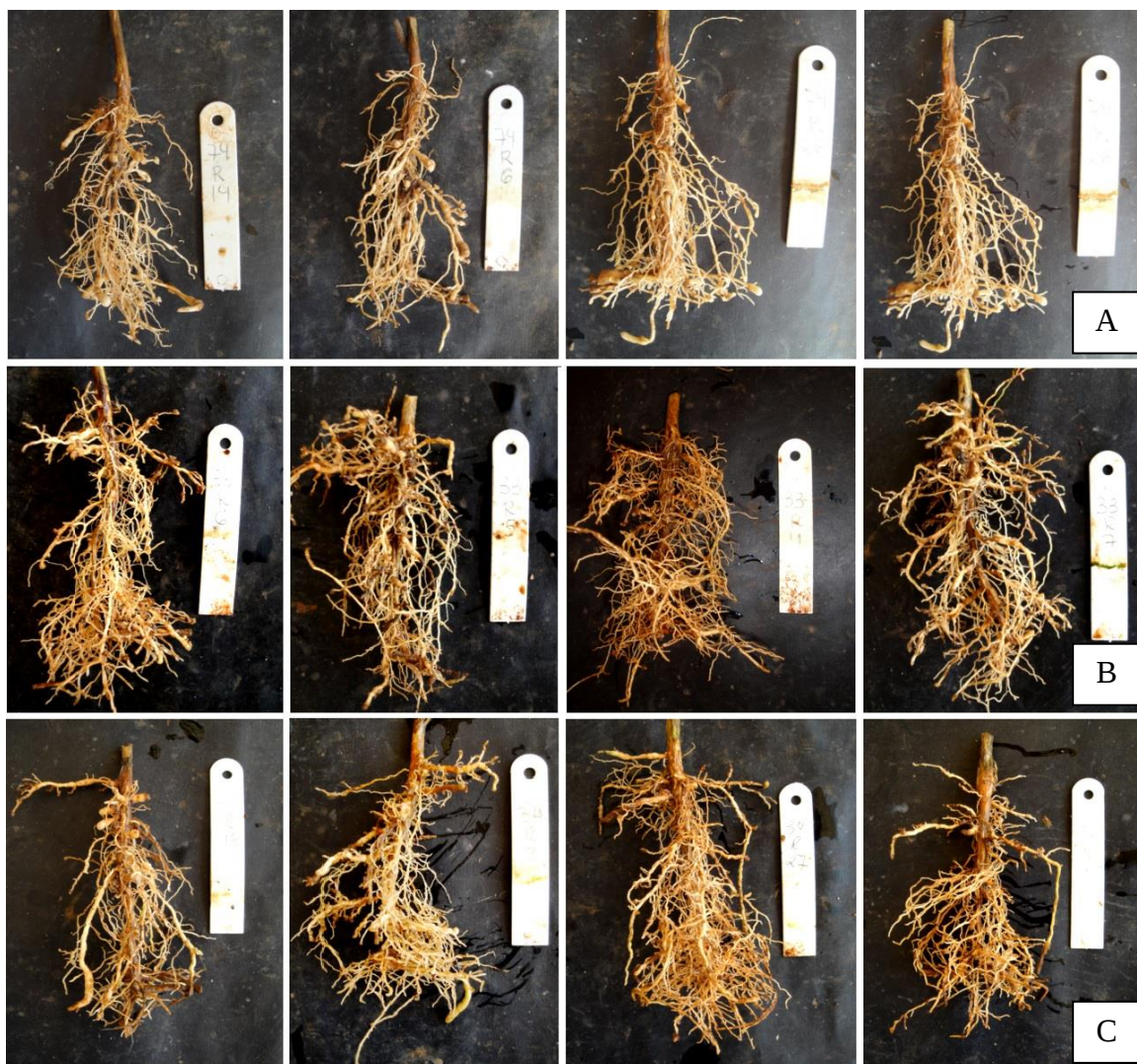


Figura 3. Sistemas radiculares do controle suscetível Mundo Novo IAC 515-20 (A) e das progênies S_2 dos cafeeiros silvestres de *Coffea arabica* IAC 2032-1A (B) e IAC 2031-1B (C) suscetíveis a *Meloidogyne paranaensis*. A escala (etiqueta de identificação) corresponde a cinco centímetros.

Dos 41 cafeeiros avaliados simultaneamente a partir de mudas clonais e de progênies de polinização aberta, 14 apresentaram reação diversa com segregação para a resistência a *M. paranaensis* em progênies S_2 , com porcentagem de plantas resistentes variando entre 13 e 80%.

Considerando-se a hipótese de ANZUETO et al. (2001) na qual a resistência de cafeeiros silvestres a *M. paranaensis* pode ser atribuída à expressão de um gene maior dominante (3R:1S em F_2) ou dois genes dominantes complementares (9R:7S em F_2), e que os acessos clonados são heterozigotos para a resistência, foi realizado um teste de qui-quadrado (χ^2) para confrontar as proporções observadas às esperadas, com base na respectiva hipótese do número de genes envolvidos no controle do caráter resistência (Tabela 3).

Tabela 3. Teste de qui-quadrado (χ^2) para número de plantas resistentes e plantas suscetíveis a *M. paranaensis* segundo a variável FR calculada para progênies de acessos silvestres de *C. arabica*.

Acesso	Número de plantas			Hipótese	χ^2
	Total	Resistentes	Suscetíveis		
IAC 2026-1C	15	12	3	3:1	0,20 ^{ns}
				9:7	3,44 ^{ns}
IAC 2026-4A	15	11	4	3:1	0,02 ^{ns}
				9:7	1,78 ^{ns}
IAC 2026-4B	15	9	6	3:1	0,20 ^{ns}
				9:7	0,08 ^{ns}
IAC 2026-6A	15	5	10	3:1	13,89**
				9:7	3,20 ^{ns}
IAC 2042-2A	15	6	9	3:1	9,80**
				9:7	1,61 ^{ns}
IAC 2075-6C	15	2	13	3:1	30,42**
				9:7	11,20**
IAC 2101-4A	15	9	6	3:1	1,80 ^{ns}
				9:7	0,08 ^{ns}
IAC 2111-2A	15	7	8	3:1	6,42*
				9:7	0,56 ^{ns}
IAC 2111-3A	15	12	3	3:1	0,20 ^{ns}
				9:7	3,44 ^{ns}
IAC 2111-3B	15	10	5	3:1	0,56 ^{ns}
				9:7	0,66 ^{ns}
IAC 2116-2A	15	9	6	3:1	1,80 ^{ns}
				9:7	0,08 ^{ns}
IAC 2166-4A	15	7	8	3:1	6,42*
				9:7	0,56 ^{ns}
IAC 2200-2B	15	10	5	3:1	0,56 ^{ns}
				9:7	0,66 ^{ns}
IAC 2200-4A	15	8	7	3:1	3,75 ^{ns}
				9:7	0,05 ^{ns}
Total	210	117	93	3:1	41,65**
				9:7	0,02 ^{ns}

χ^2 tabelado, com 1 GL (3,841). ^{ns} = Aceita-se a hipótese H₀; * ou ** = Rejeita-se a hipótese H₀ a p < 0,05 e p < 0,01, respectivamente.

Em nove acessos as hipóteses de segregação 3:1 e 9:7 não foram rejeitadas; em quatro acessos foi aceita a hipótese 9:7 e em apenas um acesso rejeitou-se ambas as pressuposições.

Analisando-se em conjunto a população formada por 210 plantas, ou seja, 14 progênies compostas de 15 plantas oriundas de matrizes que se revelaram resistentes, mas apresentaram progênies segregantes, 117 plantas foram classificadas como resistentes e 93 como suscetíveis segundo o FR.

3.2. Análise de expressão gênica

Os genes reguladores de funções básicas das células CELL DIV, BETA e DNAM não apresentaram expressão diferencial entre os genótipos resistente e suscetível, nem entre os tempos de coleta, com tendência de repressão entre 12 hai e 7 dai (Figura 4).

Os genes do metabolismo oxidativo APX, CAT e CaPrx apresentaram perfis de expressão distintos. APX foi reprimido no genótipo resistente a partir de 7 dai, e não apresentou alteração do perfil de expressão no genótipo suscetível. O gene CAT foi reprimido no genótipo suscetível às 12 hai, aproximando-se ao padrão observado na planta resistente. Já o gene CaPrx foi ativado às 12 hai em ambos os genótipos, sobretudo no suscetível, e posteriormente reprimido (Figura 4).

Em geral, os genes relacionados à resposta de defesa a patógenos em plantas apresentaram aumento da expressão entre 12 hai e 7 dai. Os genes EDS1 e PAD4, que atuam em conjunto no estímulo da produção de ácido salicílico e ocorrência de resposta de hipersensibilidade (FEYS et al., 2005; RIETZ, 2011) apresentaram aumento da expressão a partir das 12 hai e pico de expressão aos 7 dai. O mesmo padrão de expressão foi observado para o gene LTP, que codifica proteínas sinalizadoras auxiliando uma resposta de resistência sistêmica adquirida (SAR).

RAR1, que atua como regulador das respostas de defesa coordenando a degradação e *turnover* de proteínas envolvidas na sinalização de defesa (DICKINSON, 2003), apresentou tendência de aumento da expressão a partir de 7 dai, quando os genes de defesa começam a ser reprimidos.

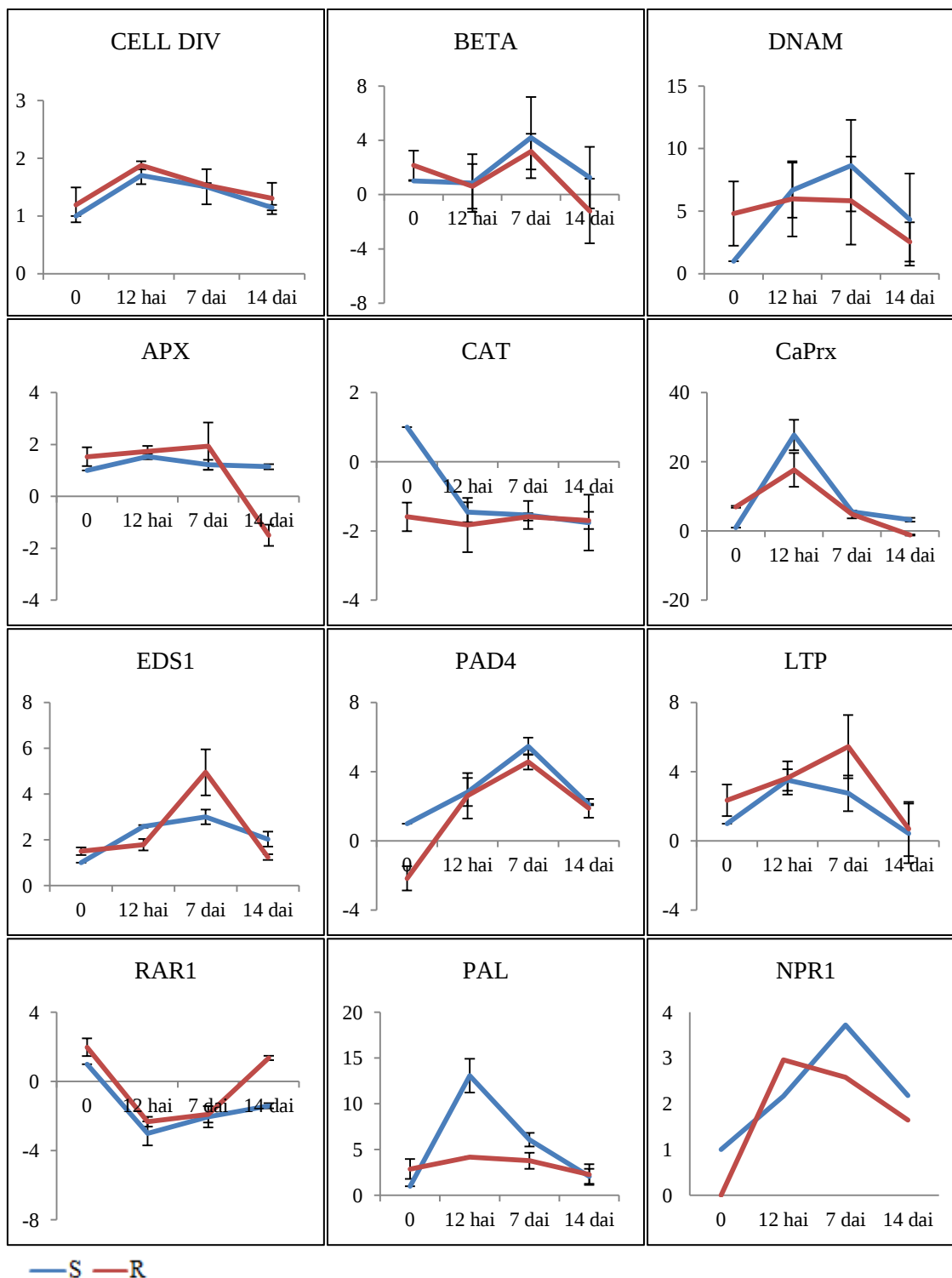


Figura 4. Expressão gênica relativa de cafeeiros de *C. arabica* resistente (IAC 2279-5B) e suscetível (Mundo Novo IAC 515-20) inoculados com o nematoide *M. paranaensis*.

O gene PAL codifica a fenilalanina amônia liase que é a primeira enzima na via de síntese do ácido salicílico a partir do ácido cinâmico (TAIZ & ZEIGER, 2004). Este gene apresentou maior expressão nos estágios precoces da infecção (12 hai) no genótipo suscetível, com posterior decréscimo até os 7 dai, enquanto que na planta resistente não foi observada alteração da expressão no decorrer da infecção dos nematoides.

NPR1 é um receptor do ácido salicílico (WU et al. 2012) e está envolvido na regulação da transcrição de inúmeros genes relacionadas à patogênese (PR) (PIETERSE et al. 1998), como os LTPs (PR-14). Também é um regulador positivo da resposta de defesa a estresses bióticos e é considerado o principal regulador da reação de defesa (BALDERAS-HERNÁNDEZ, 2013). Em nosso estudo, o gene NPR1 apresentou ativação antecipada no genótipo resistente às 12 hai.

4 DISCUSSÃO

Os resultados evidenciam a existência de pelo menos 47 acessos silvestres de *C. arabica* resistentes a *M. paranaensis* no BAG de *Coffea* do IAC. Como cada introdução originária da Etiópia conta com aproximadamente 18 cafeeiros, novas investigações das demais plantas das séries que se destacaram serão realizadas com o intuito de identificar maior número de plantas resistentes para posteriores análises, em campo, de características agronômicas, especialmente a produção de frutos.

A baixa correspondência observada (33%) entre a reação dos clones e das progênes a *M. paranaensis* deve ser atribuída à heterozigose dos genes de resistência nas plantas matrizes. Entretanto, dezoito cafeeiros (38%) pertencentes aos acessos IAC 2036, IAC 2041, IAC 2052, IAC 2101, IAC 2139, IAC 2163 e IAC 2279 parecem ser homozigotos para a resistência ao nematoide *M. paranaensis*, a julgar pela ocorrência de 100% de plantas resistentes nas progênes S_2 analisadas.

Mudas clonais foram avaliadas para que o nível de resistência por elas apresentado fosse usado como referência no estudo das progênes S_2 , uma vez que a origem silvestre destes cafeeiros poderia resultar em taxas mais altas de cruzamento do que as observadas em cultivares comerciais da espécie. Entretanto, a baixa e/ou inexistente segregação observada nos cafeeiros resistentes indica que certamente as progênes são oriundas de autofecundação.

Apesar da necessidade de uso de maior número efetivo de plantas para que as amostras sejam representativas do comportamento da planta matriz, a utilização de progênies S_2 permite a realização de inferências sobre a herança da resistência, assim como, o uso de mudas oriundas de sementes, mais facilmente obtidas.

Alguns cafeeiros como IAC 2032-1A e IAC 2032-1B revelaram-se tão suscetíveis quanto à cultivar Mundo Novo IAC 515-20 devido ao alto potencial de multiplicação de *M. paranaensis*, podendo ser considerados como controles suscetíveis em experimentos futuros, especialmente em função de maior semelhança com os cafeeiros do germoplasma em seleção. Estes cafeeiros suscetíveis podem ser utilizados em hibridações controladas com os acessos identificados como homozigotos resistentes em análises genéticas da herança da resistência ao nematoide.

A correlação positiva e significativa ($p < 0,01$) entre as variáveis ID e FR nas mudas clonais (0,71) e progênies (0,73) confirma a importância do método de seleção a partir da variável ID em *screenings* iniciais de elevado número de plantas, por ser eficiente, rápido e de fácil execução (REBEL & FAZUOLI, 1978; GONÇALVES & FERRAZ, 1987).

Os resultados relacionados à frequência de plantas resistentes e suscetíveis em progênies S_2 de cafeeiros silvestres de *C. arabica* sugerem a existência de dezoito progênies homozigotas para a resistência. No entanto, a maior parte das progênies segrega para a resistência ao nematoide *M. paranaensis*. A análise individual das progênies pelo teste de χ^2 não permite concluir se a herança da resistência é devida a expressão de um gene maior dominante ou dois genes dominantes e complementares como sugerido por ANZUETO et al. (2001). O número de indivíduos (15) de cada progênie pode ser uma das limitações para o teste. Assim, reunindo em duas classes, R e S, todos os 210 cafeeiros de 14 progênies segregantes, a frequência de plantas resistentes e suscetíveis se adapta melhor à segunda hipótese formulada pelos autores. O germoplasma avaliado constitui-se em material adequado para estudos dessa natureza.

ALOISE et al (2014) avaliaram os cafeeiros IAC 2036-3B, IAC 2041-5A, IAC 2052-1C, IAC 2139-4A e IAC 2279-5B classificados como resistentes a *M. paranaensis* quanto à resistência a *M. incognita* e *M. exigua*. Os autores confirmaram a resistência desses genótipos a *M. paranaensis* e observaram que os cafeeiros IAC 2036-3B, IAC 2139-4A e IAC 2279-5B apresentaram resistência múltipla às três espécies de *Meloidogyne* parasitas do cafeeiro, enquanto que IAC 2052-1C apresentou resistência a *M. incognita* e *M. paranaensis*.

A existência de cafeeiros com resistência múltipla a *M. paranaensis*, *M. incognita* e *M. exigua* ressalta o valor deste germoplasma para prospecção de novas fontes de resistência que podem ser utilizadas em programas de melhoramento de *C. arabica*.

A análise da expressão gênica de cafeeiros resistente e suscetível de *C. arabica* evidenciou que a maioria dos genes avaliados não apresentou expressão diferencial entre os genótipos resistente e suscetível inoculados com *M. paranaensis*. ALBUQUERQUE (2009) também observou que 47 genes, dos 90 que avaliou, não apresentaram alteração nos perfis de expressão durante a interação de cafeeiros resistentes e suscetíveis e *M. incognita*, e que aqueles que foram alterados sofreram ativação tanto na reação compatível como na incompatível.

A ativação e repressão gênica decorrente da interação molecular entre planta hospedeira e nematoide fazem parte de uma reprogramação geral da expressão genica da planta, necessária ao desenvolvimento dos sítios de alimentação (GHEYSEN & FENOLL, 2002).

Em ambos os genótipos não foram observadas alterações expressivas na expressão dos genes APX e CAT. Tal perfil não permite conclusões sobre a participação destes genes na resposta de defesa. A ativação de CaPrx às 12 hai, sobretudo no genótipo suscetível também observada por SEVERINO et al. (2012), pode estar relacionada à degradação do H₂O₂, ou a uma função antagonica aos genes APX e CAT, uma vez que algumas peroxidases apoplásticas podem participar da biossíntese de espécies reativas de oxigênio (DICKINSON, 2003). Estudos abordando a atividade das enzimas do metabolismo oxidativo e quantificação de H₂O₂ nos tecidos podem ser úteis no entendimento da função destes genes na interação cafeeiros x nematoides.

Ao contrário do observado por ALBUQUERQUE (2009), houve alteração do padrão da expressão do gene PAL nos dois genótipos. Ativação do gene PAL também foi observada na interação incompatível entre soja e *M. javanica* (BENEVENTI et al., 2013). Além do papel na biossíntese de AS, ligninas e flavonoides, proteínas codificadas pelo gene PAL podem atuar como inibidores da produção e detoxificação de H₂O₂ (TAKAHAMA & ONIKI, 1997), o que pode explicar o aumento na expressão observado às 12 hai.

A ativação dos genes de defesa EDS1, PAD4, LTP e NPR1 sugere que a resposta de defesa do cafeeiro a *M. paranaensis* está relacionada à via do ácido salicílico (AS). Este fitohormônio também é um importante componente da sinalização para a resistência de tomateiros a *M. javanica* mediada pelo gene *Mi-1*, associado à resposta de hipersensibilidade (BRANCH et al., 2004). O papel do AS na sinalização da resistência também foi evidenciado

em mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes no acúmulo e sinalização do AS que apresentaram aumento da suscetibilidade ao nematoide do cisto *Heterodera schachtii* (WUBBEN et al., 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, E.V.S. **Estudo da interação entre *Coffea arabica* e o nematóide da galha *Meloidogyne incognita*: identificação da resistência e caracterização por histopatologia e genômica funcional.** 2009. 249p. Tese (Doutorado) - UFRGS.
- ALOISE, G.S.; FATOBENE, B.J.R.; GUERREIRO FILHO, O.; SILVAROLLA, M.B.; GONÇALVES, W. Wild *Coffea arabica* trees with multiple resistance to *Meloidogyne* spp. In: International Conference on Coffee Science, 25, Armenia, **Proceedings**, p. 201, 2014.
- ANZUETO, F.; BERTRAND, B.; SARAH, J.L.; ESKES, A.B.; DECASY, B. Resistance to *Meloidogyne incognita* in Ethiopian *Coffea arabica* accessions. **Euphytica**, v.118, p.1-8, 2001.
- BALDERAS-HERNÁNDEZ, V.E.; ALVARADO-RODRÍGUEZ, M.; FRAIRE-VELÁZQUEZ, S. Conserved versatile master regulators in signalling pathways in response to stress in plants. **AoB PLANTS**, v. 5. Disponível em: <http://aobpla.oxfordjournals.org>. Acesso em 26 de Agosto de 2014.
- BENEVENTI, M.A.; SILVA JUNIOR, O.B.; SÁ, M.E.L.; FIRMINO, A.A.P.; AMORIM, R.M.S.; ALBUQUERQUE, E.V.S.; SILVA, M.C.M.; SILVA, J.P.; CAMPOS, M.A.; LOPES, M.J.C.; TOGAWA, R.C.; PAPPAS JR, G. GROSSI-DE-SÁ, M.F. Transcription profile of soybean-root-knot nematode interaction reveals a key role of phytohormones in the resistance reaction. **BMC Genomics**, v. 14:322, 2013.
- BERTRAND, B.; ANTHONY, F. Genetics of resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and breeding. In: Souza, R.M. (Ed). **Plant-Parasitic Nematodes of Coffee**. 1 ed. USA: APS Press & Springer, v.1, p.165-190, 2008.
- BERTRAND, B.; PEÑA DURÁN, M.X.; ANZUETO, F.; CILAS, C.; ETIENNE, H.; ANTHONY, F.; ESKES, A.B. Genetic study of *Coffea canephora* coffee tree resistance to *Meloidogyne incognita* nematodes in Guatemala and *Meloidogyne* sp. nematodes in El Salvador for selection of rootstock varieties in Central America. **Euphytica**, v.113, p.79-86, 2000.
- BOISSEAU, M.; ARIBI, J.; SOUSA, F.R.; CARNEIRO, R.M.D.G.; ANTHONY, F. Resistance to *Meloidogyne paranaensis* in wild *Coffea arabica*. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.1, p.38-41, 2009.
- BONETTI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p.553, 1981.
- BRANCH, C.; HWANG, C.F.; NAVARRE, D.A.; WILLIAMSON, V.M. Salicylic acid is part of the *Mi-1*-mediated defense response to root-knot nematode in tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, p. 351–356, 2004.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; COFCEWICZ, E.T. Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In: SOUZA, R.M. (Ed). **Plant-Parasitic Nematodes of Coffee**.

1 ed. USA: APS Press & Springer, 2008, v. 1, p. 87-122.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para a identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v.25, p. 35-44, 2001.

CARNEIRO, R.M.D.G.; CARNEIRO R.G.; ABRANTES, M.O.; SANTOS, M.S.N.A.; ALMEIDA, M.R.A. *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. **Journal of Nematology**, v.28, n.2, p.177-189, 1996.

CAMPOS, V.P.; SILVA, J.R.C. **Management of *Meloidogyne* spp. in Coffee Plantations**. In: SOUZA, R.M. (Ed). **Plant-Parasitic Nematodes of Coffee**. 1 ed. USA: APS Press & Springer, v.1, p.149-164, 2008.

CAMPOS, V.P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: LUC M.; SIKORA R. A.; BRIDGE J. (Eds.). **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.L.; MAXIMINIANO, C.; SILVA, J.R.C. Levantamento de fitonematoides em cafezais do Sul de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, v.32, p.56-64, 2008.

DICKINSON, M. **Molecular Plant Pathology**. London: BIOS Scientific Publishers, p. 193-216, 2003.

FEYS, B.J.; WIERMER, M.; BHAT, R.A.; MOISAN, L.J.; MEDINA-ESCOBAR, N.; NEU, C.; CRUZ-CABRAL, A.; PARKER, J.E. *Arabidopsis* SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 stabilizes and signals within an enhanced disease susceptibility1 complex in plant innate immunity. **Plant Cell**, v. 17, p. 2601-2613, 2005.

FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, R.G.; FERRÃO, M.A.G.; VERDIN FILHO, A.C; VOLPI, P.S.; BITTENCOURT, M.L.C. Jardins clonais, produção de sementes e mudas. In: FERRÃO, R.G; FONSECA, A.F.A.; BRAGANÇA, S.M.; FERRÃO, M.A.G.; De MUNER, L.H. (Eds.). **Café Conilon**. Vitória: Incaper, 2007, p.229-255.

GHEYSEN, G.; FENOLL, C. Gene expression in nematode feeding sites. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 191-219, 2002.

GONÇALVES, W.; FERRAZ, L.C.C.B.; LIMA, M.M.A.; SILVAROLLA, M.B. Avaliação precoce da reação de cafeeiros a *Meloidogyne incognita* raça 1. **Nematologia Brasileira**, v.19, p.21-28, 1995.

GONÇALVES, W.; FERRAZ, L.C.C.B. Resistência do cafeeiro à nematoides. II Testes de progênies e híbridos para *Meloidogyne incognita* raça 3. **Nematologia Brasileira**, v.11, p. 125-142, 1987.

HUSSEY, R. S.; JANSSEN, G. J. W. Root-knot nematode: *Meloidogyne* species. In: STARR, J. L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (Eds.) **Plant Resistance to Parasitic Nematodes**. Wallingford, UK: CAB International. p.43–70, 2002.

- HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Report**, p.1025-1028, 1973.
- MOURA, R.M.; RÉGIS, E.M.O. Reações de cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em relação ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* (Nematoda: Heteroderidae). **Nematologia Brasileira**, v. 6, p. 215-225, 1987.
- OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mededelingen Van De landbouwhogeschool Te Wageningen**, Nederland, v.66, n.4, p.1-46, 1966.
- PIETERSE, C.M.; VAN WEES, S.C.; VAN PELT, J.A.; KNOESTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, H.; WEISBEEK, P.J.; VAN LOON, L.C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 10, p. 1571–1580, 1998.
- REBEL, E.K.; FAZUOLI, L.C. Fontes de resistência de cafeeiros ao nematoide *Meloidogyne incognita*. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 11, Ribeirão Preto, **Resumos**, p. 187-191, 1978.
- RIETZ, S.; STAMM, A.; MALONEK, S.; WAGNER, S.; BECKER, D.; MEDINA-ESCOBAR, N.; VLOT, A.C.; FEYS, B.J.; NIEFIND, K.; PARKER, J.E. Different roles of enhanced disease susceptibility 1 (EDS1) bound to and dissociated from phytoalexin deficient 4 (PAD4) in Arabidopsis immunity. **New Phytologist**, v. 191, p. 107–119, 2011.
- SERA, G.H.; SERA, T.; ITO, D.S.; MATA, J.S.; DOI, D.S.; AZEVEDO, J.A.; RIBEIRO FILHO, C. Progenies de *Coffea arabica* IPR 100 resistentes ao nematoide *Meloidogyne paranaensis*. **Bragantia**, v.66, p.43-49, 2007.
- SEVERINO, F.E.; BRANDALISE, M.; COSTA, C.S.; WILCKEN, S.R.; MALUF, M.P.; GONÇALVES, W.; MAIA, I.G. CaPrx, a *Coffea arabica* gene encoding a putative class III peroxidase induced by root-knot nematode infection. **Plant Science**, v. 191-192, p. 35-42, 2012.
- SILVAROLLA, M. B.; GONÇALVES, W.; LIMA, M. M. A. ; GUERREIRO FILHO, O.; FAZUOLI, L. C.. Identificação de fontes de resistência a *Meloidogyne paranaensis* em germoplasma de *Coffea arabica* provenientes da Etiópia. In: Congresso Brasileiro de Nematologia, 21, 1998, Maringá - SP. **Resumos**, 1998. p. 56-57.
- STARR, J.L.; BRIDGE, J.; COOK, R. Resistance to plant-parasitic nematodes: history, current use and future potential . In: STARR J.L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (Eds). **Plant resistance to parasitic nematodes**. CAB International: Wallingford, p.1-22, 2002.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Ed. 4, Porto Alegre: Artmed, p. 819, 2009.
- TAKAHAMA, U.; ONIKI, T. A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. **Physiologia Plantarum**, v. 101, p. 845–852, 1997.
- TYAGI, S.; BRATU, D.P.; KRAMER, F.R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 49–53, 1998.

VILLAIN, L. Economic importance, epidemiology and management of *Pratylenchus* sp. in coffee plantations. In: SOUZA, R.M. (Ed). **Plant-Parasitic Nematodes of Coffee**. 1 ed. USA: APS Press & Springer, v. 1, p.65-84, 2008.

WU, Y.; ZHANG, D.; CHU, J.Y.; BOYLE, P.; WANG, Y.; BRINDLE, I.D.; DE LUCA, V.; Despres, C. The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. **Cell Reports**, v. 1, p. 639–647, 2012.

WUBBEN, M.J.; JIN, J.; BAUM, T.J. Cyst nematode parasitism of *Arabidopsis thaliana* is inhibited by salicylic acid (SA) and elicits uncoupled SA-independent pathogenesis-related gene expression in roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, 424-432, 2008.

CAPÍTULO 3

REAÇÃO DE CLONES E PROGÊNIES DO CAFEEIRO ICATU VERMELHO IAC 925 A
Meloidogyne paranaensis.

Reação de clones e progênies do cafeeiro Icatu Vermelho IAC 925 a *Meloidogyne paranaensis*

RESUMO

O germoplasma Icatu Vermelho IAC 925, obtido a partir da introgressão em *Coffea arabica* de genes de resistência à ferrugem provenientes da espécie *C. canephora*, apresenta resistência a *Meloidogyne paranaensis*. Entretanto, a origem interespecífica do material ocasiona, em alguns indivíduos, elevada taxa de fecundação cruzada e a consequente segregação para a resistência ao nematoide. O uso de técnicas de clonagem pode representar alternativa para multiplicação em larga escala de cafeeiros arábicos com genes de resistência a patógenos, mas que ainda segregam para a característica de interesse. Neste sentido, uma planta matriz da cultivar Icatu Vermelho IAC 925, selecionada em área infestada por *M. paranaensis*, foi avaliada em condições controladas a partir da reação de uma progênie de polinização aberta e de clones obtidos por embriogênese somática direta, para confirmação da resistência ao nematoide observada em condições de campo. A cultivar Mundo Novo IAC 515-20 de *C. arabica* foi utilizada como controle suscetível. A progênie sexual foi classificada respectivamente como suscetível e moderadamente resistente segundo as variáveis fator de reprodução (FR) e redução do fator de reprodução (RFR) em relação ao controle suscetível. Já os clones foram considerados resistentes e altamente resistentes segundo as mesmas variáveis. O NOg^{-1} foi oito vezes menor nas plantas obtidas por embriogênese somática em relação às plantas da progênie sexual, e 51 vezes menor que a média observada no controle suscetível Mundo Novo IAC 515-20. Estes resultados evidenciam que a obtenção de mudas a partir de embriogênese somática direta apresenta-se como uma alternativa ao longo e oneroso processo inerente à obtenção de uma cultivar resistente, com a vantagem de eliminar a etapa de fixação da resistência.

Palavras-chave: café, nematoides das galhas, resistência genética.

Reaction of clones and progenies of coffee Icatu Vermelho IAC 925 to *Meloidogyne paranaensis*

ABSTRACT

The coffee Icatu Vermelho IAC 925, selected from the introgression in *Coffea arabica* of resistance genes to the leaf rust from *C. canephora*, has resistance to *Meloidogyne paranaensis*. However, interspecific origin of this germplasm causes, in some plants, high outcrossing rate and the consequent segregation of resistance to the root-knot nematode. Use of clonal propagation techniques may represent an alternative for large-scale multiplication of Arabica coffee with resistance genes to pathogens, which may still segregate for the trait of interest. In this sense, a coffee mother plant of Icatu Vermelho IAC 925 cultivar, selected in areas naturally infested by *M. paranaensis*, was evaluated in controlled conditions through the evaluation of an open-pollinated progeny and clones obtained by direct somatic embryogenesis conditions, to confirm the resistance to this nematode observed under field conditions. The cultivar Mundo Novo IAC 515-20 of *C. arabica* was used as susceptible control. The sexual progeny was classified as susceptible and moderately resistant according to the variables reproduction factor (RF) and percentage of population reduction (PR), respectively. Clones were considered resistant and highly resistant according to the same variables. The number of eggs per grams of roots was eight times lower in the clones in relation to the sexual progeny plants, and 51 times lower than Mundo Novo IAC 515-20. These results show that seedlings from direct somatic embryogenesis represents an alternative to the time consuming and expensive process inherent to get a new resistant cultivar, with the advantage of eliminating the step necessary to fix resistance.

Keywords: coffee, root-knot nematodes, genetic resistance.

1 INTRODUÇÃO

Dentre os inúmeros problemas fitossanitários que acometem a cafeicultura, os nematoides das galhas, pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, representam séria ameaça em regiões produtoras de café arábica. A espécie *Meloidogyne paranaensis*, que ocorre no Brasil (CARNEIRO et al, 2004), Guatemala (CARNEIRO et al., 2004; VILLAIN et al., 2013), Havaí (CARNEIRO et al., 2004) e no México (LOPEZ-LIMA, 2014), destaca-se entre as demais espécies parasitas do cafeeiro devido a agressividade de seu parasitismo (CAMPOS & VILLAIN, 2005).

No Brasil, os problemas causados pelo parasitismo dessa espécie tem se intensificado com sua disseminação nos estados de São Paulo (KUBO et al., 1999; OLIVEIRA FILHO et al., 2001) e Minas Gerais (CASTRO et al, 2008), não se limitando à sua origem de identificação no Estado do Paraná (CARNEIRO et al., 1992; KRZYZANOWSKI et al., 2001). A agressividade de *M. paranaensis* se deve ao tipo de dano causado pelo parasito que não envolve a formação de galhas típicas, característica do gênero, e sim, a quebra e rachaduras no tecido cortical da raiz, principalmente na raiz principal, e lesões necróticas onde as fêmeas encontram-se inseridas devido à morte do tecido circundante às células gigantes (CARNEIRO et al., 1996).

As estratégias de controle e manejo dos nematoides das galhas não apresentam na cafeicultura a mesma eficiência alcançada em outros cultivos, provavelmente por tratar-se de uma cultura perene, a qual propicia condições para o aumento populacional dos nematoides durante quase o ano todo (GONÇALVES & SILVAROLLA, 2001), pela ineficácia do uso de nematicidas, pela inviabilidade prática de algumas táticas de manejo como a rotação de culturas (CAMPOS & VILLAIN, 2005) e, notadamente, pela intolerância das cultivares de *Coffea arabica* a *M. incognita* e *M. paranaensis*.

A resistência genética é considerada a forma mais eficiente de controle dos nematoides parasitos do cafeeiro (BERTRAND & ANTHONY, 2008) por tratar-se de uma tecnologia econômica e ambientalmente segura. Estudos acurados são necessários para a identificação e aproveitamento das fontes de resistência aos nematoides do gênero *Meloidogyne* devido à variabilidade intra e interespecíficas encontradas em suas populações (STARR et al, 2002). Esta tarefa é ainda mais complexa quando se trata do melhoramento genético de *C. arabica*, que assim como para a maioria das espécies perenes, caracteriza-se como um longo e trabalhoso processo.

Fontes de resistência a *M. paranaensis* já foram identificadas na espécie diploide *C. canephora* (BERTRAND et al., 2000), em cafeeiros silvestres de *C. arabica* da Etiópia (SILVAROLLA et al., 1998; ANZUETO et al., 2001; BOISSEAU et al., 2009), assim como, em cafeeiros arábicos derivados da introgressão de genes de *C. canephora*, como o Híbrido de Timor (BERTRAND et al., 2001; SALGADO et al., 2014) e o germoplasma Icatu (GONÇALVES & SILVAROLLA, 2007; MATA et al., 2000). A cultivar IPR 100, obtida a partir da hibridação da cultivar Catuaí Vermelho e da seleção BA10, com introgressão de genes de *C. liberica* (SHIGUEOKA et al., 2013; SERA et al., 2007) é a única cultivar de *C. arabica* resistente a *M. paranaensis* registrada e atualmente disponível.

Por ser uma espécie autógama, com aproximadamente 90% de autofecundação (CARVALHO & MÔNACO, 1962), as cultivares de *C. arabica* são comercialmente propagadas por sementes, o que implica que as estratégias de melhoramento utilizadas visem à obtenção de cultivares altamente homozigotas de comportamento uniforme (MEDINA FILHO, et al. 2008).

Para isto são necessários inúmeros ciclos de seleção para a fixação das características de interesse. Este processo é dificultado quando se realiza a introgressão de genes de outras espécies ou germoplasma exótico de *C. arabica*, visto que, além da seleção para a característica de principal interesse há a necessidade de se recuperar as características agronômicas da cultivar utilizada comercialmente, garantindo ainda que sua progênie apresente uniformidade.

Métodos de seleção precoce de plantas individuais a partir de avaliações fenotípicas em condições controladas (GONÇALVES et al., 1995), ou através de seleção assistida por marcadores moleculares (BERTRAND et al., 2001; NOIR et al., 2003; DINIZ et al., 2005) têm sido utilizados na tentativa de se abreviar o tempo necessário à obtenção de novas cultivares de *C. arabica* resistentes a nematoides.

A clonagem de genótipos heterozigotos superiores, extensivamente utilizada para multiplicação de plantas de culturas como a seringueira, o eucalipto e também da espécie *C. canephora*, representa alternativa para a multiplicação em larga escala de genótipos de *C. arabica* oriundos de hibridação para introgressão de genes de resistência a patógenos, que ainda segregam para a característica de interesse (CAIXETA et al., 2008).

Esta ferramenta foi utilizada para a clonagem de uma planta matriz do germoplasma Icatu Vermelho IAC 925 que apresenta algumas plantas resistentes a *M. paranaensis* em lavouras infestadas. A origem interespecífica do material ocasiona, em alguns indivíduos,

elevada taxa de fecundação cruzada (CARVALHO et al., 1983; FAZUOLI, 1991) e a consequente segregação da característica de resistência.

Assim, a resistência da planta matriz IAC 3 de Icatu Vermelho IAC 925, selecionada em áreas infestadas por *M. paranaensis*, foi avaliada em condições controladas para a confirmação da reação observada em campo. A magnitude da segregação genética da resistência no material foi avaliada através da reação de uma progênie de polinização aberta. Também foram avaliados clones obtidos por embriogênese somática direta para confirmação da resistência a *M. paranaensis* da planta matriz, assim como, para avaliação da viabilidade da técnica de clonagem para a propagação de cafeeiros resistentes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A reação de uma progênie de polinização aberta e de mudas clonais da matriz IAC 3 (Icatu Vermelho IAC 925) a *M. paranaensis* foi avaliada em casa de vegetação, nas dependências do Centro Experimental Central do Instituto Agrônomo, em Campinas, SP.

A população de *M. paranaensis* utilizada para inoculação das plantas, proveniente de raízes de cafeeiros cultivados em Cássia dos Coqueiros, SP, foi multiplicada em casa de vegetação, em vasos contendo cafeeiros da cultivar Mundo Novo IAC 515-20 e tomateiros suscetíveis. A conformação da espécie foi realizada através de identificação bioquímica dos perfis de esterase segundo método descrito por CARNEIRO & ALMEIDA (2001), sendo a população caracterizada como *M. paranaensis* fenótipo de esterase P1.

Progênie de polinização aberta de um cafeeiro de *C. canephora* cv. Robusta, resistente a diversas espécies de *Meloidogyne*, foi utilizada como controle resistente. Foram utilizadas dois controles suscetíveis, sendo a cultivar Mundo Novo IAC 515-20 de *C. arabica*, obtida naturalmente por sementes, e o clone IAC 1, um híbrido F₁ entre as cultivares Icatu Vermelho IAC 4045 e Obatã IAC 1669-20, resistente à ferrugem do cafeeiro e suscetível a *M. paranaensis*, obtido também por embriogênese somática direta. Este último tratamento foi incluído com o objetivo de se avaliar possíveis diferenças na reprodução dos nematoides em raízes de plantas obtidas por embriogênese somática direta.

Mudas de dois pares de folhas foram transplantadas para vasos plásticos de 500 ml contendo mistura de Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico Típico e areia 1:1 (v:v), esterilizada em autoclave e posteriormente fertilizada de acordo com recomendações para a cultura. As mudas foram inoculadas com 5000 ovos+J2 planta⁻¹ de *M. paranaensis* quando

atingiram quatro a cinco pares de folhas. O inóculo foi obtido pelo método de HUSSEY & BAKER (1973) modificado por BONETTI & FERRAZ (1981). O delineamento estatístico adotado foi o inteiramente casualizado, com 20 repetições e parcelas de uma planta.

A avaliação do experimento foi realizada 135 dias após a inoculação. Uma vez que *M. paranaensis* não ocasiona a formação de galhas típicas em cafeeiros, foi avaliado o índice de dano (ID) de acordo com escala adaptada de HUSSEY & JANSEN (2002) e de BERTRAND et al. (2000), onde 0 = sistemas radiculares totalmente íntegros; 1 = presença de raros e pequenos engrossamentos nas raízes secundárias; 2 = pequenos engrossamentos em porcentagem inferior a 25% do sistema radicular; 3 = engrossamentos e início de necrose em 25 a 50% do sistema radicular; 4 = perda de raízes secundárias decorrente de necrose observada em 51 a 75% do sistema radicular; e 5 = perda acentuada de raízes secundárias com destruição superior a 75 % do sistema radicular. As plantas foram consideradas resistentes quando $ID \leq 2$, e suscetíveis quando $ID > 2$.

A população final dos nematoides nas raízes dos cafeeiros foi quantificada a partir do número de ovos e J2 presentes em cada amostra, utilizando-se o mesmo método de obtenção do inóculo. O fator de reprodução (FR) foi estimado através da razão entre a população final e a população inicial ($FR = P_f/P_i$), sendo as plantas classificadas como resistentes ($FR < 1$) ou suscetíveis ($FR \geq 1$) (OOSTENBRINK, 1966). A partir do FR foi avaliado também o comportamento dos cafeeiros de acordo com porcentagem de redução do fator de reprodução em relação ao controle suscetível (RFR) adaptada de MOURA & RÉGIS (1987), segundo a qual os cafeeiros foram considerados imunes ($RFR = 100\%$), altamente resistentes ($RFR = 99,9$ a $95,1\%$), resistentes ($RFR = 95,0$ a $90,1\%$), moderadamente resistentes ($RFR = 90$ a $75,1\%$) ou suscetíveis ($RFR = 75,0$ a 0%). O número de ovos por grama de raiz fresca (NOg^{-1}) foi calculado para uma quantificação proporcional do número de nematoides por tratamento, visto que as plantas podem apresentar diferenças de massa do sistema radicular.

Uma vez que os dados de NOg^{-1} mesmo transformados em $\log(x+1)$ não apresentaram distribuição normal, foi realizada análise não paramétrica, comparando-se os tratamentos ao controle suscetível Mundo Novo IAC 515-20 através do teste de Mann-Whitney a 5% de probabilidade.

Com base na análise do FR, as plantas da progênie de polinização aberta IAC 3 foram classificadas como resistentes (R) ou suscetíveis (S) a *M. paranaensis*, sendo as proporções observadas nas classes R e S comparadas às esperadas por meio do teste de χ^2 com o objetivo de confrontar os resultados obtidos às hipóteses de que a resistência do cafeeiro a *M.*

paranaensis seria devida a expressão de um gene maior dominante ou dois genes dominantes e complementares (ANZUETO et al., 2001).

3 RESULTADOS

A progênie de polinização aberta da matriz IAC 3 foi considerada, em média, suscetível ao nematoide *M. paranaensis* segundo o FR (Tabela 1), apresentando segregação dos indivíduos na proporção 1R: 1S. O valor médio de NOg^{-1} na mesma progênie (2487) foi superior ao observado no controle resistente *C. canephora* cv. Robusta (821) e significativamente inferior ao do controle suscetível Mundo Novo IAC 515-20 (14826), com reação intermediária entre elas.

Tabela 1. Índice de dano (ID), número de ovos por grama de raiz (NOg^{-1}), fator de reprodução (FR), porcentagem de redução do fator de reprodução em relação ao controle suscetível *C. arabica* Mundo Novo IAC 515-20 (RFR) e porcentagem de plantas com FR menor que 1 (% R) dos tratamentos inoculados com *Meloidogyne paranaensis*.

Tratamentos	ID	NOg^{-1}	FR	C	RFR	C	% R
Progênie IAC 3	2,3	2487 *	2,5	S	78,9	MR	50
Clone IAC 3	1,4	291 *	0,2	R	98,3	AR	100
<i>C. canephora</i> cv. Robusta	1,5	821 *	0,7	R	94,1	R	75
Clone IAC 1	4,3	11575 ^{ns}	12,5	S	-	-	0
Mundo Novo IAC 515-20	4,2	14826	11,9	S	Padrão	-	0

C = Classificação dos tratamentos inoculados com *M. paranaensis* em: AR = altamente resistente; R = resistente; MR = moderadamente resistente; S = suscetível. * = $p < 0,05$; ns = diferença não significativa. As médias de NOg^{-1} dos tratamentos foram comparadas à média do controle suscetível Mundo Novo IAC 515-20 através do teste não paramétrico Mann-Whitney.

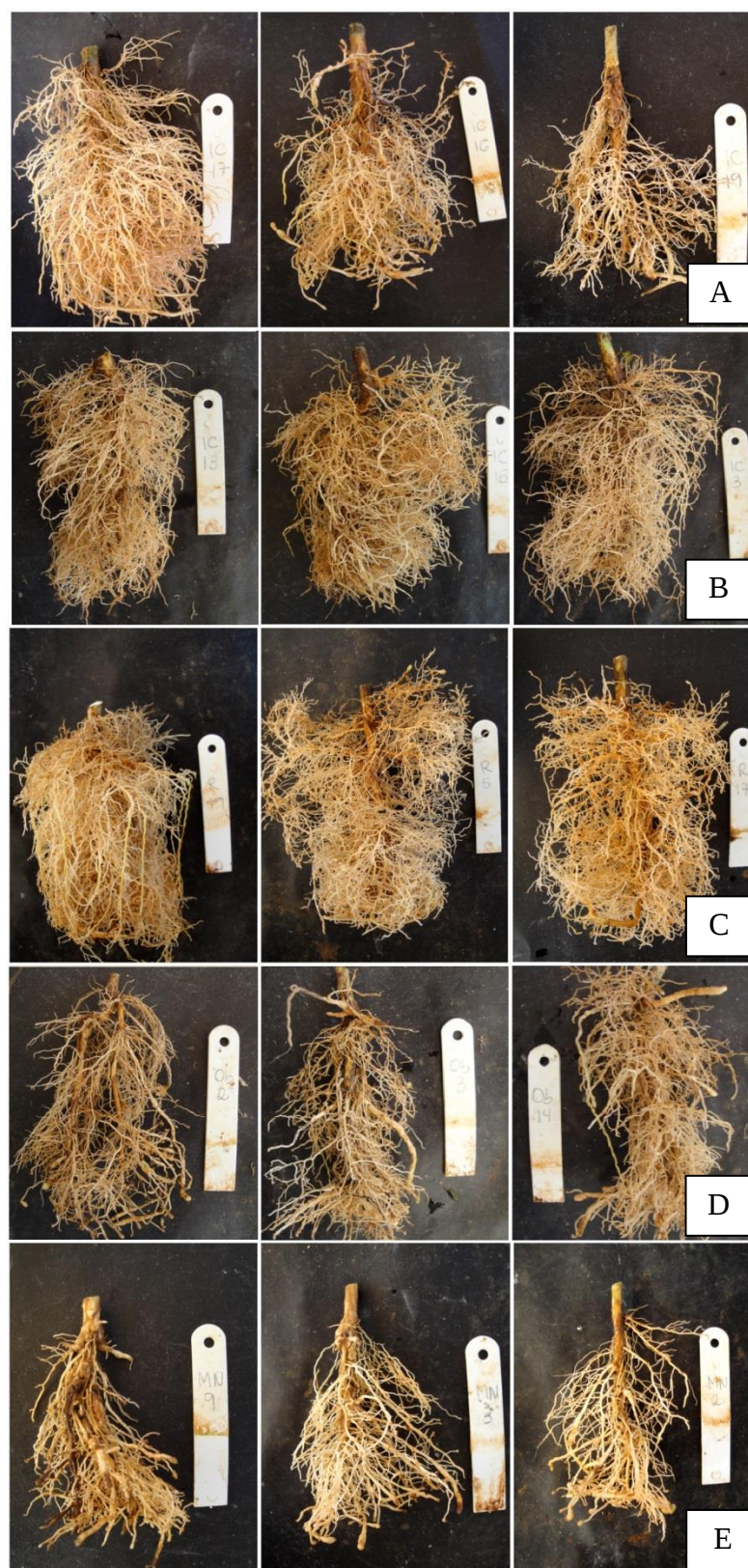


Figura 1. Sistemas radiculares das progênies (A) e dos clones (B) do cafeeiro IAC 3 do germoplasma Icatu Vermelho IAC 925, do controle resistente *C. canephora* cv. Robusta (C), e dos controles suscetíveis IAC 1 (D) e Mundo Novo IAC-515-20 (E) inoculados com *Meloidogyne paranaensis*. A escala (etiqueta de identificação) corresponde a cinco centímetros.

Já o clone IAC 3 apresentou valores reduzidos das variáveis FR e NOg^{-1} , inferiores até aos observados no controle resistente *C. canephora* cv. Robusta . Ao contrário da progênie IAC 3 e do controle resistente, que apresentaram respectivamente 50% e 75% de plantas com FR menor que 1, não foi observada segregação para a resistência ao nematoide *M. paranaensis* entre os cafeeiros do clone IAC 3. O clone IAC 3 apresentou enraizamento mais abundante e uniforme quando comparado à progênie IAC 3 (Figura 1).

Os controles suscetíveis comportaram-se como esperado, apresentando valores médios elevados de FR e 100% de plantas suscetíveis. Não foi observada diferença estatística entre o controle suscetível Mundo Novo IAC 515-20 e o clone IAC 1 (Tabela1, Figura 1).

4 DISCUSSÃO

O germoplasma Icatu tem origem em um cruzamento interespecífico entre o cafeeiro tetraploide Co 254 de *C. canephora* e o cafeeiro haploide duplicado Co 667da cultivar Bourbon Vermelho. Após duas gerações de retrocruzamentos do F_1 H2460-1 com a cultivar Mundo Novo IAC 379-19, o cafeeiro H4782-7-925 foi selecionado na geração $F_2\text{RC}_2$ em função de suas características agrônômicas favoráveis, como produção elevada de frutos, vigor vegetativo e resistência a *Hemileia vastatrix*. Progênies deste cafeeiro foram avaliadas em ensaios de campo instalados em diversas regiões produtoras, sendo a população selecionada nas gerações mais avançadas denominada Icatu Vermelho IAC 925 (FAZUOLI et al., 2008).

A partir da análise do sistema radicular de plantas selecionadas em áreas naturalmente infestadas, especialmente em solos arenosos, e da avaliação, em laboratório, do índice de massa de ovos e do número de ovos por grama de raiz, GONÇALVES et al. (1998) demonstraram ser este germoplasma, fonte de resistência ao nematoide *M. paranaensis*.

O avanço de seleção pelo método genealógico proporcionou ganhos importantes em relação à produção de frutos, mas progênies S_2 de cafeeiros resistentes ainda segregam para a resistência ao nematoide, indicando a propagação vegetativa como alternativa para a obtenção de cultivares resistentes homogêneas e estáveis. Nossos resultados, obtidos a partir da avaliação da progênie S_2 e dos clones derivados da matriz IAC 3, sustentam a hipótese apresentada.

Com FR médio igual a 2,5 a progênie de polinização aberta IAC 3 foi considerada suscetível a *M. paranaensis*. No entanto, dez plantas da progênie apresentaram valores médios

de FR igual a 0,5, sendo consideradas resistentes, enquanto que as plantas suscetíveis apresentaram FR médio de 4,5.

A reação apresentada pela progênie IAC 3 a partir da interpretação dos valores intermediários de NOg^{-1} , não deve ser considerada como uma resistência parcial ao patógeno, como aludido por ALPIZAR et al. (2007) para *M. exigua*, e sim, consequência da segregação genética, resultando em plantas altamente resistentes e suscetíveis em igual proporção (10R:10S) na progênie.

A frequência de plantas resistentes na progênie indica a possibilidade de seleção dentro do material para avanço do programa de melhoramento, com ganho significativo para a resistência ao nematoide.

Por outro lado, a clonagem da planta matriz IAC 3 resistente a *M. paranaensis* pode ser considerada alternativa viável à propagação destes cafeeiros, visto que as mudas clonais apresentaram excelente desempenho quanto ao impedimento da reprodução dos nematoides. Além disso, essa ferramenta poderá contribuir para abreviação do processo inerente à obtenção de uma cultivar resistente, com a vantagem de eliminar a etapa de fixação de genótipos com alta produtividade, resistência em condição de homozigose e boas características agronômicas.

A reprodução de nematoides em mudas do clone IAC 1 (FR=12,5) em nível similar ao observado em mudas da cultivar Mundo Novo IAC 515-20 de *C. arabica* (FR=11,9) evidencia a natureza genética da resistência, excluindo a hipótese de indução da resistência pelo processo de obtenção das plantas.

A produção de mudas clonais via embriogênese somática tem se mostrado promissora por permitir a produção de mudas em larga escala, as quais, em campo, apresentam comportamento semelhante às mudas obtidas por sementes, e por isso não apresentam limitação para o uso comercial (ETIENNE & BERTRAND, 2001; CARVALHO et al., 2011).

Apesar do custo de produção de mudas clonais ser superior ao valor de mudas convencionais, o valor agregado pela resistência ao nematoide pode compensar o investimento do produtor (CARVALHO et al., 2013) no plantio em áreas infestadas.

Finalmente, considerando-se a existência de apenas duas classes fenotípicas, a frequência de plantas resistentes (10) e suscetíveis (10) observada na análise do FR da progênie IAC 3 foi confrontada com as frequências teóricas esperadas, levando-se em conta as hipóteses de que a resistência do cafeeiro a *M. paranaensis* é consequência da expressão de um ou de dois genes (ANZUETO et al., 2001). Todos os casos possíveis de interação gênica foram considerados nos testes de χ^2 , sendo que diferenças não significativas foram notadas

apenas quando se considerou a hipótese de controle genético da resistência por dois genes complementares e dominantes. Uma análise genética clássica, conduzida pela hibridação de parentais homozigotos e contrastantes, seguida de autofecundação do F_1 e de cruzamentos teste ainda se faz necessária para o esclarecimento definitivo do assunto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALPIZAR, E.; ETIENNE, H.; BERTRAND, B. Intermediate resistance to *Meloidogyne exigua* root-knot nematode in *Coffea arabica*. **Crop Protection**, v.26, p.903-910, 2007.
- ANDREAZI, E.; SERA, G.H.; FARIA, R.T.; SERA, T.; SHIGUEOKA, L.H.; BRANDET, E.; CARVALHO, F.G.; CARDUCCI, F.C.; FORGERINI, R.R.C.; MARIUCCI JUNIOR, V. Resistência ao nematoide *Meloidogyne paranaensis* das cultivares de café IPR 100 e Apoatã IAC 2258 em diferentes níveis de inóculo. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, VIII, Salvador. **Resumos Expandidos...** Brasília: EMBRAPA, 2013. p. 515-518.
- ANZUETO, F.; BERTRAND, B.; SARAH, J.L.; ESKES, A.B.; DECASY, B. Resistance to *Meloidogyne incognita* in Ethiopian *Coffea arabica* accessions. **Euphytica**, v.118, p.1-8, 2001.
- BERTRAND, B.; ANTHONY, F. Genetics of resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and breeding. In: Souza, R.M. (Ed). **Plant-Parasitic Nematodes of Coffee**. 1 ed. USA: APS Press & Springer, v.1, p.165-190, 2008.
- BERTRAND, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P. Breeding for resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica* by introgression of resistance genes of *Coffea canephora*. **Plant Pathology**, v.50, p.637-643, 2001.
- BERTRAND, B.; PEÑA DURÁN, M.X.; ANZUETO, F.; CILAS, C.; ETIENNE, H.; ANTHONY, F.; ESKES, A.B. Genetic study of *Coffea canephora* coffee tree resistance to *Meloidogyne incognita* nematodes in Guatemala and *Meloidogyne* sp. nematodes in El Salvador for selection of rootstock varieties in Central America. **Euphytica**, v.113, p.79-86, 2000.
- BOISSEAU, M.; ARIBI, J.; SOUSA, F.R.; CARNEIRO, R.M.D.G.; ANTHONY, F. Resistance to *Meloidogyne paranaensis* in wild *Coffea arabica*. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.1, p.38-41, 2009.
- BONETTI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**. v.6, p.553, 1981.
- CAIXETA, E.T.; CARVALHO, C.H.S.; ZAMBOLIM, E.M.; PEREIRA, L.F.P.; SAKIYAMA, N.S. Biotecnologia aplicada ao melhoramento genético do cafeeiro. In: CARVALHO, C.H.S. (Ed). **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, p.103-127, 2008.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; CARNEIRO R.G.; ABRANTES, M.O.; SANTOS, M.S.N.A.; ALMEIDA, M.R.A. *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. **Journal of Nematology**, v.28, n.2, p.177-189, 1996.
- CARVALHO, A.; COSTA, W.M.; FAZUOLI, L.C. Auto-incompatibilidade, produtividade, ocorrência de sementes do tipo moca e mudas anormais no café Icatu. **Bragantia**, v.42, p.157-169, 1983.

CARVALHO, A.; MÔNACO, L.C. Natural cross pollination in *Coffea arabica*. Proc XVI International Horticulture Congress Brussels 4, p.447-449, 1962.

CARVALHO, C.H.S.; REZENDE, J.C.; ALMEIDA, G.R.R.; TEIXEIRA, J.B.; PADILHA, L. Características agronômicas e morfológicas de cafeeiro Catuaí Vermelho propagado por embriogênese somática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.4, p.378-383, 2011.

CARVALHO, C.H.S.; PAIVA, A.C.S.; SOUZA, D.S.; SILVA, E.Q.; CUSTÓDIO, A.A.; BORATO, P.B.; MARÇAL, G.A.; MARQUES, B.N. Custo de produção de mudas clonais de café arábica produzidas por embriogênese somática. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, VIII, Salvador, 2013.

CAMPOS, V.P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: LUC M.; SIKORA R. A.; BRIDGE J. (Eds.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CAB International, 2005. p.529-579.

CARNEIRO, R.G., ALTEIA, A.A.K.; BRITO, J.A. Levantamento da ocorrência e da frequência de espécies e de raças fisiológicas de *Meloidogyne* no Noroeste do Paraná. *Nematologia Brasileira*, v.16, p.88-89, 1992.

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

DINIZ, L.E.C.; SAKYYAMA, N.S.; LASHERMES, P., CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; ZAMBOLIM, E.M.; LOUREIRO, M.E.; PEREIRA, A.A.; ZAMBOLIM, L. Analysis of AFLP markers associated to the *Mex-1* resistance locus in Icatu progenies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.5, p.387-393, 2005.

ETIENNE, H.; BERTRAND, B. Trueness-to-type and agronomic characteristics of *Coffea arabica* Trees micropropagated by the embryogenic cell suspension technique. **Tree Physiology**, v.21, n.14, p.1031-1038, 2001.

FAZUOLI, L.C.; CARVALHO, C.H.S.; CARVALHO, G.R.; GUERREIRO FILHO, O.; PEREIRA, A.A.; BARTHOLO, G.F.; MOURA, W.M.; SILVAROLLA, M.B.; BRAGHINI, M.T. Cultivares de café arábica de porte alto. In: CARVALHO, C.H.S. (Ed.) **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, p. 245-249, 2008.

FAZUOLI, L.C. **Metodologias, critérios e resultados da seleção em progênes do café Icatu com resistência à *Hemileia vastatrix***. 1991. 322p. Tese (Doutorado) - UNICAMP, Campinas.

GONÇALVES, W.; SILVAROLLA, M.B. A luta contra a doença causada pelos nematoides parasitos do cafeeiro. **O Agrônomo**, v.59, p.54-56, 2007.

GONÇALVES, W., LIMA, M.M.A., SILVAROLLA, M.B., FAZUOLI, L.C., GUERREIRO FILHO, O. Cultivar Icatu Vermelho IAC 925: Fonte de resistência a nematoides do gênero *Meloidogyne*. In: Congresso Nacional de Genética, 44. Águas de Lindóia. Genetics and Molecular Biology. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, v.21, p.228, 1998.

GONÇALVES, W.; FERRAZ, L.C.C.B.; LIMA, M.M.A.; SILVAROLLA, M.B. Avaliação precoce da reação de cafeeiros a *Meloidogyne incognita* raça 1. **Nematologia Brasileira**, v.19, p.21-28, 1995.

HUSSEY, R. S.; JANSSEN, G. J. W. Root-knot nematode: *Meloidogyne* species. In: STARR, J. L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (Eds.) **Plant Resistance to Parasitic Nematodes**. Wallingford, UK: CAB International. p.43–70, 2002.

HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Report**, n.57, p.1025-1028, 1973.

KRZYŻANOWSKI, A.A.; FIGUEIREDO, R.; SANTIAGO, D.C.; FAVORETO, L. Levantamento de espécies e raças de *Meloidogyne* em cafeeiros no Estado do Paraná, SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, II, Vitória, (2001) p. 81.

KUBO, R.K.; INOMOTO, M.M.; OLIVEIRA, C.M.G.; ANTEDOMÊNICO, S.R. Ocorrência de fitonematoides em cafezais das regiões de Bauru e Marília. **Fitopatologia Brasileira**, v.24 (Supplement), p. 346, 1999.

LOPEZ-LIMA, D.; SÁNCHEZ-NAVA, P.; CARRION, G.; MONTEROS, A.E.; VILLAIN, L. Corky-root symptoms for coffee in central Veracruz are linked to the root-knot nematode *Meloidogyne paranaensis*, a new report for Mexico. **European Journal of Plant Pathology**, 2014. DOI 10.1007/s10658-014-0564-9.

MATA, J.S. Seleção para resistência ao nematoide *Meloidogyne paranaensis* EMN-95001: IAPARLN 94066 de Catuaí x Icatu em área naturalmente infestada. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Resumos Expandidos...** Brasília: EMBRAPA, 2000. p. 515-518.

MEDINA FILHO, H.P.; BORDIGNON, R.; CARVALHO, C.H.S. Desenvolvimento de novas cultivares de Café Arábica. In: Carvalho, C.H.S. (Ed.). Cultivares de café: origem, características e recomendações. Brasília: Embrapa Café, 2008. p. 79-102.

MOURA, R.M.; RÉGIS, E.M.O. Reações de cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em relação ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* (Nematoda: Heteroderidae). **Nematologia Brasileira**, v. 6, p. 215-225, 1987.

NOIR, S.; ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P. Identification of a major gene (*Mex-1*) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. **Plant Pathology**, v.52, p.97-103, 2003.

OLIVEIRA FILHO, N.L., de OLIVEIRA, J.C., OTOBONI, C.E.M.; SANTOS, J.M. Ocorrência de *Meloidogyne paranaensis* nos principais municípios produtores de café na área de abrangência do Escritório de Desenvolvimento Rural de Marília. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, XXIII, **Resumos...** Marília, SP, p. 149. (2001)

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mededelingen Van De landbouwhogeschool Te Wageningen**, Nederland, v.66, n.4, p.1-46, 1966.

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

SERA, G.H.; SERA, T.; ITO, D.S.; MATA, J.S.; DOI, D.S.; AZEVEDO, J.A.; RIBEIRO FILHO, C. Progenies de *Coffea arabica* IPR 100 resistentes ao nematoide *Meloidogyne paranaensis*. **Bragantia**, v.66, p.43-49, 2007.

SHIGUEOKA, L.H.; SERA, G.H.; SERA, T.; FONSECA, I.C.B; ANDREAZI, E.; CARVALHO, F.G.; AZEVEDO, J.A.; MACHADO, P.; FIORI, K.H.; CARDUCCI, F.C.; MARIUCCI JUNIOR, V. Desempenho de cultivares de café arábica em área infestada pelo nematoide *Meloidogyne paranaensis*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, VIII, Salvador. **Resumos Expandidos...** Brasília: EMBRAPA, 2013.

SILVAROLLA, M. B.; GONÇALVES, W.; LIMA, M. M. A. ; GUERREIRO FILHO, O.; FAZUOLI, L. C.. Identificação de fontes de resistência a *Meloidogyne paranaensis* em germoplasma de *Coffea arabica* provenientes da Etiópia. In: Congresso Brasileiro de Nematologia, 21, 1998, Maringá - SP. **Resumos**, 1998. p. 56-57.

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

VILLAIN, L.; SARAH, J.L.; HERNÁNDEZ, A.; BERTRAND, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P.; CHARMETANT, P.; ANZUETO, F.; CARNEIRO, R.M.D.G. Diversity of root-knot nematodes parasiting coffee in Central America. **Nematropica**, v. 43, p. 194-206, 2013.