



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

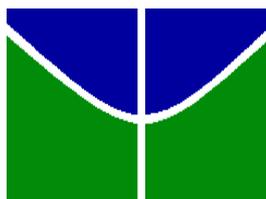
DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES SCAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Meloidogyne* DO CAFEEIRO E VARIABILIDADE GENÉTICA E AGRESSIVIDADE DE POPULAÇÕES DE *M. paranaensis* A GENÓTIPOS DE *Coffea* spp.

MARCILENE FERNANDES ALMEIDA DOS SANTOS

TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA

BRASÍLIA/DF

JUNHO/2016



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES SCAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Meloidogyne* DO CAFEEIRO E VARIABILIDADE GENÉTICA E AGRESSIVIDADE DE POPULAÇÕES DE *M. paranaensis* A GENÓTIPOS DE *Coffea* spp.

MARCILENE FERNANDES ALMEIDA DOS SANTOS

ORIENTADOR: JOSÉ RICARDO PEIXOTO

CO-ORIENTADORA: REGINA MARIA DE CHECHI GOMES CARNEIRO

PUBLICAÇÃO: 044D/2016

BRASÍLIA/DF

JUNHO/2016

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES SCAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Meloidogyne* DO CAFEIEIRO E VARIABILIDADE GENÉTICA E AGRESSIVIDADE DE POPULAÇÕES DE *M. paranaensis* A GENÓTIPOS DE *Coffea* spp.

MARCILENE FERNANDES ALMEIDA DOS SANTOS

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM AGRONOMIA NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE PRODUÇÃO VEGETAL.

APROVADO POR:

Eng. Agrônomo José Ricardo Peixoto, Doutor (UnB - FAV)
(Orientador) CPF: 354.356.236-34 E-mail: peixoto@unb.br

Eng. Agrônomo Marcelo Fagioli, Doutor (UnB-FAV)
(Examinador Interno) CPF: 729.409.306-78 E-mail: mfagioli@unb.br

Eng. Agrônomo Onivaldo Randig, Doutor (CNPq)
(Examinador Externo) CPF: 652.963.389-87 E-mail: orandig@cnpq.br

Eng. Agrônomo Jadir Borges Pinheiro, Doutor (Embrapa-CNPH)
(Examinador Externo) CPF: 947.451.616-20 E-mail: jadir.pinheiro@embrapa.br

Ciências Agrícolas, Valdir Ribeiro Correia, Doutor (IFTO)
(Examinador Externo) CPF: 033.326.546-75 E-mail: valdir.correia@ifto.edu.br

BRASÍLIA, 08 de JUNHO DE 2016.

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Marcilene Fernandes Almeida dos Santos

Desenvolvimento de marcadores scar para identificação de espécies de *Meloidogyne* do cafeeiro e variabilidade genética e agressividade de populações de *M. paranaensis* a genótipos de *Coffea* spp../ Marcilene Fernandes Almeida dos Santos

Orientação: José Ricardo Peixoto. Co-orientação: Regina M.D.G.Carneiro. Brasília, 2016. p. 124.

Tese de Doutorado - Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2016.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Santos, M.F.A. **Desenvolvimento de marcadores scar para identificação de espécies de *Meloidogyne* do cafeeiro e variabilidade genética e agressividade de populações de *M. paranaensis* a genótipos de *Coffea* spp..** Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília-Brasília, 2016; 124p. Tese de Doutorado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Marcilene Fernandes Almeida dos Santos

TÍTULO DA TESE DE DOUTORADO: **Desenvolvimento de marcadores scar para identificação de espécies de *Meloidogyne* do cafeeiro e variabilidade genética e agressividade de populações de *M. paranaensis* a genótipos de *Coffea* spp.**

GRAU: DOUTOR. ANO: 2016

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva os outros direitos de publicação e nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

À maior motivação da minha vida:

Bianca Fernandes de Freitas

Dedico

*Aos meus pais, Gilberto e Maria Suéleci,
por serem minha força!*

*E ao meu esposo, Guilherme,
grande incentivador!*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as oportunidades que tem me proporcionado, por todos os momentos que me deu forças nas minhas fraquezas, e por sua leal proteção. Glória a ti!

A minha família, por todo o alicerce, apoio e amor incondicional, principalmente a minha mãe, exemplo de coragem e dedicação, sem sua força não chegaria tão longe. Obrigada por acreditarem e se orgulharem de mim. Amo vocês!

Ao meu irmão, Marcelo! Sempre ao meu lado, me incentivando! À minha cunhada, Aline sempre me pasando força!

Aos meus familiares que me mesmo distantes me transmitem energias positivas.

Ao meu esposo, Guilherme, por me apoiar incondicionalmente nos momentos de desânimo e falta de estímulo com seu amor leal. Amo você!

À minha orientadora Dra. Regina Carneiro, grande incentivadora de todos os meus passos na área de Nematologia, exemplo de profissional, dedicada e competente, sem a sua inestimável orientação e apoio constante na realização deste trabalho, não chegaria aonde cheguei. Agradeço com muito carinho por todos os ensinamentos e mais ainda por ter acreditado em mim. Muito obrigada!

Ao professor José Ricardo, pelo apoio, orientação, acolhimento na Universidade de Brasília e ensinamentos proporcionados na área Agronômica.

Aos membros da banca examinadora, aos professores Marcelo Fagioli e Jean Kleber Mattos, e os Doutores Jadir Pinheiro, Onivaldo Randig e Valdir Correia pela predisposição em analisarem este trabalho.

Ao Doutor Jadir Pinheiro sempre disposto a contribuir, exemplo de profissional.

Em especial ao Onivaldo Randig por ter me proporcionado os primeiros ensinamentos na área de Biologia Molecular, és um grande contribuinte na minha trajetória. Obrigada.

Ao Doutor Valdir Correia, obrigada por todos os conhecimentos na área de Biologia Molecular, sempre me ensinando a cada dia, mesmo distante está sempre me auxiliando. Obrigada.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade de Brasília.

Aos companheiros de laboratório, que direta ou indiretamente, contribuíram na realização do trabalho, em destaque por todas as ajudas e contribuições no

desenvolvimento do mesmo, Vanessa, Jessica, Edriana, Mariana, Aldemiro, Joelma, Rita, Guilherme e Fábio agradeço muito a todos vocês!

À querida amiga, Vanessinha grande conselheira, companheira fiel e solidária, muito obrigada por todas as ajudas e conselhos de sempre!

À querida companheira dos últimos tempos, obrigada pela amizade, por todas as alegrias e força nos momentos difíceis que tenho passado.

Às amigas, que continuam fazendo parte da minha vida: Ana Paula Dantas, sempre me transmite força e conselhos! Fabiane de Castro, Natália e Joseane! Obrigada pelo incentivo de vocês! Vocês todas são especiais!

Às queridas e eternas amigas, Fátima Muniz pelo carinho e amizade de sempre. Em especial à Ana Cristina, querida amiga obrigada por todas as nossas conversas, conselhos, aprendo muito com você!

Aos meus companheiros de turma que compartilharam comigo momentos de alegrias e dificuldades.

À Universidade de Brasília pela oportunidade e à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Cenargen pela realização de todo o trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de Doutorado.

Aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia.

O meu sincero agradecimento a todos! Obrigada.

SUMÁRIO

1. Introdução geral.....	01
2. Objetivos.....	04
2.1. Geral.....	04
2.2. Específicos.....	04
3. Revisão de literatura.....	04
3.1. Cultura do café.....	04
3.1.2. Origem e classificação taxonômica do cafeeiro.....	04
3.1.3. Principais espécies de cafeeiro.....	05
3.1.3.1. Espécie <i>Coffea arabica</i> L.....	05
3.1.3.2. Espécie <i>Coffea canephora</i> Pierre.....	06
3.1.4. Importância da cafeicultura no desenvolvimento econômico do Brasil.....	07
3.2. Cultivares.....	08
3.2.1. Apatã IAC 2258.....	08
3.2.2. Amphillo.....	09
3.2.3. Catuaí.....	10
3.2.4. Catuaí Vermelho.....	10
3.2.5. Híbrido do Timor.....	11
3.2.6. "Clone 14".....	11
3.2.7. IPR 100.....	12
3.2.8. Mundo Novo.....	13
3.3. Classificação do gênero <i>Meloidogyne</i> spp.....	13
3.3.1. <i>Meloidogyne</i> spp. em cafeeiro.....	13
3.3.2. Biologia de <i>Meloidogyne</i> spp. em cafeeiro.....	15
3.4. Reação de hospedeiras diferenciadoras.....	17
3.5. Identificação bioquímica e molecular.....	18
3.6. Diversidade genética e filogenia de <i>Meloidogyne</i> spp.....	21
3.6.1. Marcadores moleculares: RAPD e AFLP.....	21
3.6.2. Marcadores moleculares: D2D3 e ITS do DNA ribossomal.....	23
3.7. Medidas de controle dos nematoides das galhas.....	25
3.8. Resistência genética do cafeeiro aos nematoides das galhas.....	25
3.9. Resistência genética do cafeeiro à espécie de <i>M. paranaensis</i>	28
4. Referências.....	30

Capítulo 1. Desenvolvimento de marcadores espécie específicos SCAR para identificação de <i>Meloidogyne arabicida</i> e <i>M. izalcoensis</i>	47
Resumo.....	48
Abstract	49
1. Introdução	50
2. Material e métodos.....	52
2.1.Populações de nematoides.....	52
2.2.Extração de DNA.....	52
2.3.Análise de PCR- RAPD.....	54
2.4.Desenvolvimento de marcadores SCAR.....	54
2.5.Análise de marcadores SCAR.....	55
3. Resultados.....	57
3.1. Caracterização das populações de <i>Meloidogyne</i> spp.....	57
3.2.Análise de PCR-RAPD.....	57
3.3.Análise de marcadores específicos SCAR para <i>M. arabicida</i> e <i>M. izalcoensis</i>	57
4. Discussão.....	60
5. Conclusão	61
6. Referências.....	62
Capítulo 2. Variabilidade genética e agressividade de populações de <i>M. paranaensis</i> à genótipos resistentes de cafeeiro de <i>Coffea</i> spp.....	67
Resumo	68
Abstract.....	70
1. Introdução	72
2. Material e métodos.....	74
2.1. Identificação das populações de <i>Meloidogyne</i> spp.....	74
2.2.Extração de juvenis de segundo estágio (J2) e ovos para análises moleculares.....	75
2.3.Extração de DNA de juvenis de segundo estágio (J2) e ovos para análises moleculares	76
2.4. Identificação molecular: marcador PCR-SCAR MULTIPLEX.....	77
2.5.Análise com marcador PCR- RAPD.....	78
2.6.Análise com marcador PCR-AFLP.....	79

2.7. Análise filogenética com marcadores moleculares RAPD e AFLP.....	80
2.8. Análise filogenética com marcadores moleculares D2D3 e ITS.....	80
2.9. Análise da reação de hospedeiras diferenciadoras.....	81
2.10. Avaliação da resistência genética de genótipos de <i>Coffea</i> spp. a populações de <i>M. paranaensis</i>	82
2.11. Análise estatística	83
3. Resultados	84
3.1. Análise bioquímica: Esterase (Est).....	84
3.2. Análise molecular: marcadores SCAR.....	85
3.3. Variabilidade genética: marcadores RAPD e AFLP.....	86
3.4. Análise filogenética de diferentes populações de <i>M. paranaensis</i> : marcadores D2D3 e ITS.....	88
3.5. Reação de diferentes populações de <i>M. paranaensis</i> em plantas hospedeiras diferenciadoras.....	90
3.6. Agressividade de diferentes populações de <i>M. paranaensis</i> a diferentes genótipos de <i>Coffea</i> spp.	90
4. Discussão.....	101
5. Conclusões.....	111
6. Referências.....	112

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES SCAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Meloidogyne* DO CAFEIEIRO E VARIABILIDADE GENÉTICA E AGRESSIVIDADE DE POPULAÇÕES DE *M. paranaensis* A GENÓTIPOS DE *Coffea* spp.

RESUMO GERAL

Os nematoides das galhas (NGs), *Meloidogyne* spp., estão entre os patógenos mais importantes economicamente por infectarem raízes de cafeeiro em vários países das Américas. Os objetivos do estudo foram desenvolver marcadores específicos do tipo SCAR para a detecção de duas espécies importantes do cafeeiro na América Central: *Meloidogyne arabicida* e *M. izalcoensis* (Tylenchida: Meloidogynidae), e avaliar a variabilidade genética e a agressividade de sete populações de *M. paranaensis*, uma das espécies de NGs mais destrutivas para o cafeeiro, em *Coffea* spp., com genes de resistência a *Meloidogyne* spp. No primeiro estudo, fragmentos polimórficos amplificados através de reações de PCR-RAPD foram selecionados e transformados em marcadores específicos do tipo SCAR. A amplificação dos primers desenvolvidos produziram fragmentos específicos de 300 pb e 670 pb para as espécies *M. arabicida* e *M. izalcoensis*, respectivamente. A especificidade dos primers também foi validada para um único indivíduo J2, macho ou fêmea, além de populações de campo, contendo mistura de espécies. Portanto, estes resultados demonstraram a eficácia destes marcadores SCAR para a identificação das espécies *M. arabicida* e *M. izalcoensis*, contribuindo para o diagnóstico específico dos NGs nas Américas. No segundo estudo, sete populações de *M. paranaensis* foram identificadas pela caracterização bioquímica e molecular. Os estudos filogenéticos mostraram que apesar da existência de três fenótipos de esterase (Est P1, P2 e P2a), uma baixa variabilidade genética foi observada, até mesmo em regiões distintas do DNA. A análise molecular mostrou que existe divergência genética na população de perfil P2a da Guatemala, em relação às populações do Brasil (Est P1 e P2). Essa população nos estudos de patogenicidade às cultivares suscetíveis de *C. arabica* mostrou-se uma das mais agressivas. Nos estudos de agressividade/virulência de *M. paranaensis* em *Coffea* spp. foram realizados dois ensaios. No primeiro, foram usadas duas cultivares, *C. arabica* (cv. Catuaí IAC 81) e *C. canephora* (cv. Clone 14), e foi confirmada a alta suscetibilidade da cv. Catuaí IAC 81

com FR > 30 e alta resistência da variedade clonal “Clone 14” com FR < 0,2, em relação a diferentes populações de *M. paranaensis*. Ou seja, nenhuma população foi virulenta ao ‘Clone 14’ e as populações Par 3 da Guatemala, Par 5 Piumbí-MG e Par 4 Rolândia- PR foram as mais agressivas ao ‘Catuaí IAC 81’. No segundo ensaio foram testados quatro padrões de resistência em relação a sete populações de *M. paranaensis*: Catuaí Vermelho x Amphillo MR2161 (*C. arabica*), porta enxerto Apatã IAC 2258 (*C. canephora*), Híbrido do Timor UFV 408-01(E1 6-6 II) e cv. IPR 100 (*C. arabica*), e o controle suscetível cv. ‘Mundo Novo 379-19’. Quanto à agressividade na cultivar Mundo Novo, as populações Par 2 Herculândia-SP, Par 3 da Guatemala e Par 5 Piumbí-MG foram as mais agressivas. Nenhuma população de *M. paranaensis* foi virulenta às quatro cultivares resistentes: Apatã IAC 2258, Catuaí Vermelho x Amphillo MR2161(E1 16-5 III), IPR 100 e Híbrido do Timor UFV 408-01 (E1 6-6 II), apresentando uma segregação de 15%, 0%, 26% e 31%, respectivamente. Esses resultados são promissores, pois validam a resistência de diferentes fontes genéticas de *Coffea* spp., para a espécie *M. paranaensis*.

Palavras-chave: marcadores moleculares, *Meloidogyne* spp., nematoides das galhas, resistência.

DEVELOPMENT OF SCAR MARKERS FOR IDENTIFICATION OF *Meloidogyne* SPECIES IN COFFEA AND GENETIC VARIABILITY AND AGGRESSIVENESS OF *Meloidogyne paranaensis* POPULATIONS IN *Coffea* spp. GENOTYPES.

ABSTRACT

Root-knot nematodes (RKN), *Meloidogyne* spp., are amongst the most economically important plant parasitic nematodes infecting coffee (*Coffea* spp.) in several countries in the Americas. The objectives of this study were to develop a polymerase chain reaction (PCR)-based assay for specific detection of two RKN species, *Meloidogyne arabicida* and *M. izalcoensis* (Tylenchida: Meloidogynidae), major pathogens of coffee crops in Central America and to assess the genetic variability and aggressiveness of seven populations of *M. paranaensis*, one of the most destructive RKN species in coffee, *Coffea* spp., which harbors resistance to *Meloidogyne* spp. In the first study Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fragments specific for these two species were converted into sequence characterized amplified region (SCAR marker). PCR amplification using SCAR primers produced a specific fragment of expected size (e.g., 300 base pairs and 670 bp) in *M. arabicida* and *M. izalcoensis*, respectively. SCAR primers also allowed successful amplification of DNA from single infective juveniles, males, females and on field-isolated populations, containing mixtures of species. Therefore, these results demonstrate the effectiveness of these SCAR markers developed for identification *M. arabicida* and *M. izalcoensis* species and may contribute to specific diagnosis of these RKN in the Americas. In the second study, seven populations of *M. paranaensis* were identified by biochemical and molecular characterization. Phylogenetic studies have shown that despite the existence of three esterase phenotypes (Est P1, P2, P2a), a low genetic variability was observed, even in different DNA regions. Molecular analysis showed that there is a genetic difference between population P2a from Guatemala compared to other *M. paranaensis* populations from Brazil containing Est P1 and P2 profiles. In addition, population P2a was the most aggressive in pathogenicity assays with susceptible *C. arabica* cultivars. Two assays were carried out to study the aggressiveness/virulence among *M. paranaensis* populations against *Coffea* genotypes. In the first assay using different *M. paranaensis*

populations against *C. arabica* (cv. Catuaí IAC 81) and *C. canephora* (cv. Clone 14), a high susceptibility pattern of cv. Catuaí IAC 81 was confirmed with RF > 30, as well as a high resistance phenotype for the clonal variety "Clone 14" with RF < 0.2 was observed. None of the populations was virulent to the resistant *Coffea* genotype 'Clone 14' and populations Par 3 Guatemala, Par 5 Piumbí-MG and Par 4 Rolândia- PR were the most aggressive against the susceptible control 'Catuaí IAC 81'. In the second assay, four resistant genotypes were tested against seven *M. paranaensis* populations: Catuaí Vermelho x Amphillo MR2161 (E1 16-5 III), *C. canephora* rootstock Apoatã IAC 2258, Timor Hybrid UFV 408-01 (E1 6-6 II) and IPR 100 (*C. arabica*), plus the susceptible control *C. arabica* cv. Mundo Novo 379-19. Populations Par 2 Herculândia-SP, Par 3 Guatemala and Par 5 Piumbí-MG were the most aggressive against the susceptible control cv. Mundo Novo 379-19. Not a single *M. paranaensis* population was virulent to all four resistant cultivars: Apoatã IAC 2258, Catuaí Vermelho x Amphillo MR2161 (E1 16-5 III), IPR 100 and Timor Hybrid UFV 408-01 (E1 6-6 II), exhibiting segregation rates of 15%, 0%, 26% and 31%, respectively. These are promising results due to the validation of resistance from different genetic sources in *Coffea* spp. against *M. paranaensis*.

Keywords: *Meloidogyne* spp., molecular markers, resistance, root-knot nematodes.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um dos principais produtores e exportadores de café (*Coffea arabica* L. e *C. canephora* Pierre) no mundo, e essa cultura pode ser atacada por diferentes patógenos, tais como fungos, bactérias e nematoides. Dentre os nematoides, as espécies pertencentes ao gênero *Meloidogyne* (nematóide das galhas) destacam-se nos cafezais brasileiros, devido à sua ampla distribuição, aliada à sua alta capacidade reprodutiva e agressividade. Essas características tornam esse grupo de nematoides, o responsável por 15% da redução total da produção brasileira de café, em relação aos 20% de prejuízos causados por todos os fitonematoides (GODOY et al., 1997).

Atualmente, 18 espécies já foram descritas parasitando o cafeeiro no mundo (CARNEIRO e COFCEWICZ, 2008; HUMPHREYS-PEREIRA et al., 2014). Entre as principais espécies desse gênero, destaca-se *M. paranaensis* (CARNEIRO et al., 1996b), devido aos danos causados e sua ampla ocorrência em áreas produtoras de café no Brasil, Guatemala, Hawaí e México (CARNEIRO et al., 2004; OLIVEIRA, 2006; LOPEZ-LIMA et al., 2015). Essa espécie é considerada uma das mais danosas ao cafeeiro, pela destruição do sistema radicular e devido à alta agressividade, podendo levar a planta à morte (CARNEIRO e COFCEWICZ, 2008). Outras duas espécies de importância na América Central são *M. arabicida* (LOPES e SALAZAR, 1989) e *M. izalcoensis* (CARNEIRO et al., 2005a), detectadas na Costa Rica e El Salvador, respectivamente (HERNANDEZ et al., 2004). *Meloidogyne izalcoensis* foi relatado recentemente na África (CARNEIRO et al., 2014a).

Dentre as principais táticas de manejo desses nematoides, a resistência genética de plantas é considerada a melhor, por ser um método econômico e eficaz (CAMPOS et al., 1990). A utilização de cultivares resistentes possibilita a manutenção de populações do nematóide abaixo do nível de dano econômico (COOK e EVANS, 1987) e tem sido usada principalmente para os nematoides das galhas, que apresentam uma interação especializada com seus hospedeiros (ROBERTS, 2002). Porém, a alta suscetibilidade e intolerância das cultivares de *C. arabica* a *Meloidogyne* spp. constitui fator limitante para a cafeicultura (SALGADO et al., 2011).

Uma planta considerada resistente a nematoides tem seus mecanismos de defesa expressos de modo a interferir nas diversas fases do ciclo de vida e do parasitismo, restringindo ou prevenindo a sua multiplicação. Porém, nas plantas que apresentam resistência a *Meloidogyne* spp., ocorre a penetração dos juvenis, mas seu

desenvolvimento ou a reprodução são prejudicados (ROBERTS, 2002). A resistência genética a *M. paranaensis* vem sendo encontrada em *C. canephora* (SERA et al., 2004a) e variedades clonais de *C. canephora* (LIMA et al. 2015a,b), *C. congensis* Froehner (GONÇALVES et al., 1988) e híbridos artificiais entre *C. arabica* e *C. canephora* (MATA et al., 2002; SERA et al., 2004b).

A estratégia de controle baseada na resistência genética é na maioria das vezes espécie-específica (CARNEIRO et al., 2000a). Estudo recente identificou o primeiro gene que confere resistência a *M. exigua* Goeldi, 1887 denominado *Mex-1* (NOIR et al., 2003). Fontes de resistência a outras espécies de *Meloidogyne* estão sendo investigadas (GONÇALVES et al., 1996). Atualmente, fontes de resistência múltipla foram identificadas em clones de *C. canephora* que permitem o controle das várias espécies do nematoide das galhas do cafeeiro (LIMA et al., 2015b).

A diversidade fisiológica nas populações de *Meloidogyne* do cafeeiro dificulta a seleção de fontes de resistência para este gênero (CARNEIRO e COFCEWICZ, 2008). Essa complexidade tem sido detectada pela variabilidade intraespecífica de populações de *Meloidogyne* spp. (RIBEIRO et al., 2005). A variação intraespecífica de *Meloidogyne* spp. em relação à interação planta-nematoide pode ser expressa em três diferentes níveis: hospedabilidade, agressividade e virulência. Nesse contexto, as espécies vegetais podem ser boas hospedeiras, más hospedeiras ou não hospedeiras de determinada espécie de *Meloidogyne* ou grupo de espécies. Diferenças encontradas no círculo de hospedeiras conduziram ao conceito das raças fisiológicas, que foram relatadas para algumas espécies do cafeeiro como *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood (SANTOS et al., 2012) e *M. exigua* (SILVA, 2005; MUNIZ et al., 2008).

A agressividade reflete a habilidade de reprodução dos nematoides em hospedeiras suscetíveis, enquanto que a virulência é a capacidade do patógeno em se reproduzir em uma hospedeira resistente (ROBERTS, 2002). Grande parte das informações sobre virulência em *Meloidogyne* spp. está relacionada com o gene *Mi* de resistência em tomate. A partir do ano de 1950, a ocorrência de quebras de resistência por isolados das espécies *M. incognita*, *M. javanica* (Treub 1885) Chitwood e *M. arenaria* (Neal 1889) Chitwood foram encontradas. Observou-se quebra de resistência em campo, inclusive, em populações não expostas anteriormente a cultivares resistentes (ROBERTS e THOMASON, 1989; HUSSEY e JANSSEN, 2002; MUNIZ et al., 2009).

A identificação correta das espécies de *Meloidogyne* também é um aspecto muito importante, tanto para os testes de resistência em programas de melhoramento vegetal, como para a escolha de medidas de controle mais adaptadas a cada situação (RANDIG et al., 2004). Essa caracterização de *Meloidogyne* spp. foi inicialmente baseada em características morfológicas (configuração perineal) e hospedeiros diferenciais (EISENBACK et al., 1981). Entretanto, devido à grande variação e subjetividade dessas características, outros critérios taxonômicos clássicos de maior complexidade foram propostos (EISENBACK e TRIANTAPHYLLOU, 1991), mas não resolveram ou simplificaram as identificações de *Meloidogyne* spp. Critérios com o emprego de marcadores enzimáticos (esterases e malato desidrogenase) são muito eficientes e utilizados na identificação de *Meloidogyne* spp. (CARNEIRO et al., 2000b), porém é uma técnica empregada somente para fêmeas em boas condições de conservação.

No entanto, o advento da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) fez progredir de maneira considerável os métodos de análise de DNA e levou à descrição de marcadores moleculares do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) e AFLP (Amplified fragment length polymorphism), que abriam novas perspectivas quanto aos estudos da variabilidade intraespecífica destes nematoides das galhas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; SEMBLAT et al., 1998; RANDIG et al., 2002; LAX et al., 2007). Uma outra classe de marcadores moleculares espécie-específico do tipo SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) foram propostos por vários autores (ZIJLSTRA, 2000a,b; RANDIG et al., 2004, CORREA et al., 2013; 2014), e se baseiam em um método de detecção rápido, aplicável a um só indivíduo, de qualquer estágio de desenvolvimento (RANDIG et al., 2004), e vem sendo a técnica mais interessante a ser utilizada em análise de rotina para identificação de *Meloidogyne* spp. (RANDIG et al., 2002; CORREA et al., 2013; 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver marcadores moleculares espécie-específico do tipo SCAR para identificar duas espécies de nematoides do cafeeiro, *M. arabicida* e *M. izalcoensis*, e estudar a variabilidade e agressividade de populações de *M. paranaensis* a diferentes genótipos de *Coffea* spp.

2.2 Específicos

Capítulo 1: Desenvolver marcadores moleculares do tipo SCAR para as espécies *M. arabicida* e *M. izalcoensis*, incluindo essas ao kit SCAR-café das Américas, assim como validar os marcadores já disponíveis para outras espécies do cafeeiro.

Capítulo 2: Avaliar a variabilidade genética intraespecífica e filogenia de populações de *M. paranaensis*, provenientes de diferentes regiões geográficas, com marcadores moleculares do tipo (RAPD e AFLP) e marcadores de regiões distintas do rDNA (D2D3 e ITS); Avaliar a agressividade ou virulência de diferentes populações de *M. paranaensis* em genótipos de *Coffea* spp. já previamente estudados quanto à resistência e suscetibilidade ao nematoide das galhas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cultura do café

3.1.2 Origem e classificação taxonômica

O café (*Coffea arabica* L.) é uma planta tropical de altitude, adaptada a clima úmido, de temperaturas amenas, condição que prevalece nos altiplanos da Etiópia, região considerada como a de origem do café (SILVA e BERBERT, 1999).

O cafeeiro pertence à divisão das Fanerógamas, classe Angiospermae, subclasse Eudicotiledônea, ordem Rubiales, família Rubiaceae, tribo Coffeae, subtribo Coffeinae, e gêneros *Coffea* e *Psilanthus* (CARVALHO, 2008).

Dentro do gênero *Coffea* encontram-se 103 espécies (DAVIS et al., 2006), que estão ordenadas em três seções (CHEVALIER, 1942): *Mascarocoffea*, com espécies encontradas em Madagascar e nas Ilhas Mascarenhas; *Mozambicoffea*, com espécies localizadas no leste africano; e *Eucoffea* (CHEVALIER, 1942; CROS, 1996), com espécies das regiões central e oeste africano.

A seção *Eucoffea* é ainda dividida em quatro subseções: *Erythrocoffea*, com frutos de coloração vermelha; *Melanocoffea*, com frutos pretos; *Nanocoffea*, com espécies pequenas e arbustivas; e *Pachycoffea*, com espécies arbóreas (CHEVALIER, 1947).

Na seção *Eucoffea* são encontradas as espécies mais importantes de cafeeiro, *C. arabica*, *C. canephora*, *C. liberica*, *C. dewevrei*, *C. klainii*, *C. congensis*, *C. racemosa*, *C. salvatrix*, *C. stenophylla*, *C. eugenoides*, *C. kapakata*, *C. humilis*, *C. sessiflora*, *C. heterocalyx*, *C. anthonyi*, dentre outras. Ainda que a diversidade seja expressiva, somente *C. arabica* e *C. canephora* são consideradas principais e cultivadas comercialmente (CARVALHO, 2008).

3.1.3 Principais espécies de cafeeiro

No gênero *Coffea* praticamente todo o café produzido, comercializado e consumido no mundo é produzido apenas com duas espécies, *C. arabica* e *Coffea canephora* (FERRAZ, 2008), que representam na produção mundial, aproximadamente, 70% e 30% do mercado cafeeiro, respectivamente (ICO, 2015).

3.1.3.1 Espécie *Coffea arabica* L.

A espécie *C. arabica* é nativa de uma região restrita, localizada entre o Sudoeste da Etiópia, Sudeste do Sudão e Norte do Quênia, numa faixa de altitude com variação de 1.000 a 2.000 metros (CARVALHO, 2008).

As variedades *Typica* e *Bourbon* são responsáveis pela maioria das cultivares de *C. arabica*. (ANTHONY et al., 2001). Há grande variabilidade morfológica nas cultivares arábicas, ainda que a base genética seja pouco diversificada (CHARRIER e BERTHAUD, 1985).

A espécie *C. arabica* é a única do gênero *Coffea* que além de ser tetraploide ($2n = 44$ cromossomos somáticos), é autógama, propaga-se por autofecundação em até 90 a 99% das flores (CARVALHO e MÔNACO, 1968). Não há registros de efeitos prejudiciais ao vigor e a produtividade do cafeeiro, proporcionado pelas sucessivas autofecundações, razão pela qual são utilizadas sementes na propagação e formação de cafeeiros dessa espécie. Apesar da pequena taxa de cruzamento entre as espécies e entre cultivares da mesma espécie, esta contribuiu para o surgimento de cultivares e híbridos

como, por exemplos, Mundo Novo e Híbrido do Timor (CHARRIER e BERTHAUD, 1985).

3.1.3.2 Espécie *Coffea canephora* Pierre ex. Froehner

A espécie *C. canephora* está distribuída por uma ampla área geográfica, na faixa ocidental, centro tropical e subtropical do continente africano, especificamente da Guiné até a República Democrática do Congo. Nessa região, o ambiente é quente, com alta umidade relativa e baixa altitude, embora sejam encontrados cafeeiros em até 1.300 m de altitude (CARVALHO, 1946).

Coffea canephora inclui inúmeras variedades, como: Conilon, Robusta, Sankuru, Bukaba, Niaculi, Uganda, Maclaud, Laurentti, Petit, Indénié, Nana, Polusperma, Oka, dentre outras (CHARRIER e BERTHAUD, 1988). Essa espécie é comumente denominada de “café robusta” devido à expressão de rusticidade e resistência às doenças de plantas, sendo considerado um material de café resistente.

A variedade Kouillou (Conilon) foi observada em seu estado selvagem, pelos franceses em 1880, entre Gabão e a embocadura do Rio Congo, principalmente junto ao ribeirão Kouilou, na África (CARVALHO, 1946). Foi então que em 1895, o botânico Louis Pierre descreveu o material como *C. canephora*.

A espécie *C. canephora* é diploide ($2n = 22$ cromossomos somáticos) e alógama, cuja propagação se dá por fecundação cruzada, em razão da auto-incompatibilidade gametofítica (CONAGIN e MENDES, 1961), que inibe o crescimento do tubo polínico e impede a fecundação da oosfera e formação do embrião. Em razão da fecundação cruzada há grande variabilidade genética, por isso não se devem utilizar sementes de uma única planta matriz, ainda que tenham características desejáveis.

Segundo Ferrão et al. (2009a) os clones das variedades Emcapa 8111, Emcapa 8121 e Emcapa 8131 podem ser distribuídos de forma aleatória (em mistura) no momento do plantio, devido seus clones possuírem maturação uniforme. Os clones das variedades Emcapa 8141 - Robustão Capixaba e Vitória Incaper 8142 devem ser plantados seguindo um esquema de linhas alternadas, clone a clone, porque não apresentam maturação na mesma época, porém, exista uniformidade de maturação dentro de cada um deles.

3.1.4 Importância da cafeicultura no desenvolvimento econômico do BRASIL

O café foi introduzido no Brasil no início do século XVIII e já na quarta década do século XIX superou o açúcar como o mais importante produto brasileiro de exportação (REIS e CUNHA, 2010). A partir daí, a cafeicultura se tornou importante no agronegócio do país (SILVA e BERBERT, 1999).

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, e segundo maior consumidor do produto, apresenta atualmente um parque cafeeiro estimado em 2,25 milhões de hectares. São cerca de 290 mil produtores, em aproximadamente 1.900 municípios que se distribuem em 15 Estados: Acre, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rondônia e São Paulo (BRASIL, 2016).

Em 2015, o país alcançou uma safra de 43,24 milhões de sacas de 60 kg de café. O cultivo majoritariamente está presente nos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Rondônia, Paraná e Goiás, que correspondem a cerca de 98,65% da produção nacional. Outros Estados produtores respondem por 1,35% da safra: Acre, Ceará, Pernambuco, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, Pará, Mato Grosso e Rio de Janeiro. A produção de café arábica foi de 32,05 milhões de sacas e de 11,19 milhões de café conilon, com uma área plantada de 2,25 milhões de hectares e uma produtividade estimada de 22,49 sacas por hectare (BRASIL, 2016).

A estimativa de produção da safra de 2016 está entre 49.126,1 a 51.943,9 milhões sacas beneficiadas de café. A área total utilizada para a produção deve ser de 1.977,5 mil hectares, um incremento esperado devido principalmente a bialidade positiva na maior parte dos estados produtores (CONAB, 2016).

O café arábica representa 76,8% da produção total (arábica e conilon) de café do país. Para a nova safra que é de ciclo de alta bialidade, estima-se que sejam colhidas entre 37,74 a 39,87 milhões de sacas. Tal resultado representa um acréscimo de 17,8% a 24,4%, que se deve principalmente ao aumento de 67.636 hectares da área em produção, à incorporação de novas áreas que se encontravam em formação e renovação decorrente de podas realizadas, e às condições climáticas mais favoráveis (CONAB, 2016).

A produção do *C. canephora* representa 23,2% da produção total (arábica e conilon) de café do país, estimada entre 11,39 e 12,08 milhões de sacas, representando um crescimento entre 1,8 a 8%. Este resultado se deve, sobretudo, à recuperação da produtividade nos estados do Espírito Santo, Bahia e em Rondônia, bem como ao

processo de maior utilização de tecnologias como o plantio de café clonal, e ao maior investimento nas lavouras (CONAB, 2016).

Sabe-se que as perspectivas de produção da safra 2016 ainda são preliminares, mas as condições climáticas vigentes permitem traçar expectativas de bons resultados. A frustração ocorrida nas duas últimas safras, no entanto, induz a projeções mais conservadoras, principalmente considerando que os próximos meses serão decisivos na formação e enchimento dos frutos do cafeeiro (CONAB, 2016).

Apesar das condições ambientais e climáticas favoráveis ao sucesso da cafeicultura no Brasil, a adversidade climática comprovou ser um dos fatores limitantes ao cenário da produção cafeeira. Dentre os vários problemas, os fitonematoides, microrganismos de solo capazes de parasitar o sistema radicular da planta durante praticamente todo o ciclo da cultura influenciam a colheita (FERRAZ, 2008) com redução produtiva de 20%, em destaque as espécies de *Meloidogyne* que são responsáveis por 75% desse total (LORDELLO, 1976).

3.2 Cultivares

3.2.1 Apatã IAC 2258

A cultivar Apatã IAC 2258, é originária da introdução de sementes de uma planta matriz do CATIE em Turrialba, Costa Rica, em 1974, e de cafeeiros derivados dessa introdução com resistência a vários nematoides (CARVALHO, 2008).

A progênie IAC 2258 vem sendo submetida à seleção de plantas resistentes em casa de vegetação ou viveiro e em áreas naturalmente infestadas por *M. incognita* e *M. paranaensis*, com eliminação das plantas suscetíveis. A frequência de plantas resistentes em relação a *M. incognita* da população original de IAC 2258 foi de aproximadamente 70%. Com essa seleção de população original de IAC 2258, tem se conseguido aumentar significativamente a frequência de plantas resistentes. A essa população de *C. canephora* de seleção mais avançada com grande quantidade de plantas resistentes a *M. incognita* e imunes a *M. exigua* atribuiu-se, em 1987, a denominação Apatã IAC 2258, palavra que em tupi-guarani significa “raiz forte” (CARVALHO, 2008).

Os cafeeiros da cultivar Apatã IAC 2258 se caracterizam por serem multicaules, muito vigorosos e possuem exuberante sistema radicular. Apresentam elevada resistência a algumas espécies de nematoides (*M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*) por isso tem sido utilizada como porta-enxerto da espécie *C. arabica* e

dessa maneira, viabiliza a cafeicultura em áreas infestadas por esses parasitas (CARVALHO, 2008).

É interessante ressaltar que cafeeiros enxertados poderão também ser plantados em áreas isentas de nematoides, com ganho significativo de produtividade e outras características agronômicas e fisiológicas em relação às mesmas cultivares não enxertadas (CARVALHO, 2008).

3.2.2 Amphillo

Segundo Fazuoli (1986), o cafeeiro Amphillo representa plantas originadas de sementes coletadas em Amphillo, na Etiópia, primeiramente estudada no Centro Agrônomico Tropical de Investigação e Educação Superior (CATIE). Em 1953, o Instituto Agrônomico (IAC) recebeu dos Estados Unidos 40 mudas de Amphillo e foi então estabelecido um experimento no IAC, onde a melhor planta dessa progênie recebeu a sigla de IAC 1167-19. Sementes coletadas dessa planta e as mudas originadas foram testadas no início da década de 1970 no Instituto Biológico (IB) e no IAC. Os testes em casa de vegetação revelaram certo nível de resistência a *M. incognita*, sem identificação da raça. O IAC testou também progênies dessa mesma planta em 1974, na cidade de Adamantina, em área infestada com *M. incognita*. O material no campo apresentou certa resistência, mas com baixa produção e este foi eliminado. Sementes também coletadas da mesma planta foram enviadas ao antigo Instituto Brasileiro de Café (IBC) de Maringá-PR, por volta do início de 1975. Em testes realizados em casa de vegetação com infecção artificial e em condições de campo, num trabalho em conjunto com o IBC e o IAC, verificou-se resistência desse material a *M. incognita*. Várias plantas foram selecionadas como resistentes a esse nematoide, mas que poderia ser na época *M. paranaensis*. Posteriormente, foram feitos vários cruzamentos e as sementes desses cruzamentos enviadas ao IAC, EPAMIG, IAPAR, Universidade de Londrina e de Maringá, entre outros locais. O IAC seguiu o trabalho avaliando esse material para a produção e para diversas características agronômicas, fazendo cruzamentos, porém esse trabalho não avançou, e várias seleções encontram-se hoje em campo.

3.2.3 Catuaí

A obtenção dos cultivares do grupo Catuaí iniciou-se com a intenção da Comissão de Café do IAC em transferir os alelos responsáveis pelo porte reduzido para o cultivar Mundo Novo. As primeiras hibridações foram realizadas no ano de 1949, utilizando a planta 47611 de ‘Caturra Amarelo’ e a linhagem CP 374-19. Esse cruzamento recebeu o prefixo H2077 e as três plantas resultantes foram plantadas em campo em 1952. A planta 2, que foi registrada como H2077-2, destacou-se pela capacidade produtiva e, principalmente, pelo tipo de grão (CARVALHO, 2008).

As progênes da planta H2077-2 foram plantadas em campo em um ensaio de competição de produtividade, onde foi selecionada a planta 5, a qual recebeu a identificação de H2077-2-5. A partir dessa planta, foram selecionadas as linhagens atuais de ‘Catuaí’, como ‘Catuaí Vermelho’ IAC 15, IAC 44, IAC 99 e IAC 144, além de ‘Catuaí Amarelo’ IAC 62, entre outras (MATIELLO et al., 2002).

A principal característica dos cultivares do grupo Catuaí é possuir internódios curtos, o que confere porte baixo, bem como abundante ramificação secundária. São vigorosos e apresentam altura média de 2,0 a 2,3 m e diâmetro da copa de 1,8 a 2,0 m, podendo atingir dimensões bem maiores em algumas regiões cafeeiras (MATIELLO et al., 2002).

Segundo Matiello et al. (2002) os cultivares de Catuaí são mais tolerantes à ferrugem, em relação ao ‘Mundo Novo’, e são mais exigentes em boro. Os genótipos de Catuaí não podem ser submetidos a condições de estresse em anos de alta carga, como deficiências nutricionais e alta incidência de doenças (principalmente ferrugem e cercosporiose) e de pragas. Sob esses estresses, as plantas podem apresentar acentuados sinais de depauperamento precoce, como seca de ramos produtivos e até morte de plantas, principalmente nas primeiras safras. Isso se deve provavelmente, a alguns alelos derivados da variedade Caturra, ainda mantidos em ‘Catuaí’, mesmo após vários ciclos de seleção.

3.2.4 Catuaí Vermelho

A cultivar originou-se da recombinação de um cruzamento artificial entre cafeeiros selecionados para produtividade, das cultivares Caturra Amarelo, IAC 476-11 e Mundo Novo IAC 374-19, de *C. arabica*. A hibridização que ocorreu na obtenção da cultivar Catuaí Vermelho foi a de transferir para a cultivar Mundo Novo o fator

dominante Caturra (*CtCt*) que confere porte baixo, por meio da redução do comprimento dos internódios (CARVALHO, 2008). Foram selecionadas plantas com frutos de cor vermelha na população F3, homozigotas para os alelos *CtCt*, e heterozigotas para *Xcxc*, responsável pela cor do exocarpo. Aos descendentes desses cafeeiros, na geração F4 e subsequentes deu-se a denominação de Catuaí Vermelho, caracterizados por serem vigorosos e altamente produtivos. A cultivar foi lançada em 1972, pelo IAC e registrada no Registro Nacional de Cultivares (RNC) em 1999.

Essa cultivar tem elevado vigor e excelente qualidade de bebida, no entanto, é suscetível à ferrugem do cafeeiro e aos nematoides (CARVALHO, 2008).

3.2.5 Híbrido de Timor

O Híbrido de Timor (HT) tem sua origem possivelmente em um cruzamento natural entre *C. arabica* e *C. canephora*. Esse híbrido foi identificado por volta de 1917, em uma plantação de *C. arabica* no Timor Português. Essa população passou a ser cultivada em seu local de origem na década de 1940. Mais tarde em 1976 a Universidade Federal de Viçosa iniciou estudos dessa população, e posteriormente em conjunto com a EPAMIG, até os dias de hoje esse material vem sendo estudado como fonte de resistência à ferrugem (CARVALHO, 2008).

O Híbrido de Timor apresenta grande importância para o melhoramento genético do cafeeiro, pois possui fonte de resistência a doenças; sendo constituído de genótipos com variabilidade genética para resistência à ferrugem, antracnose do cafeeiro, bacterioses e aos nematoides das galhas (CARVALHO, 2008).

3.2.6 “Clone 14”

Variedades clonais melhoradas são constituídas pelo agrupamento de clones que se destacaram para as características desejadas e foram definidos após uma série de procedimentos experimentais utilizadas na pesquisa científica. Essas variedades devem ser, portanto, cultivadas sob determinadas técnicas e condições de cultivo para que expressem seu potencial (FERRÃO et al., 2007).

Para a seleção de plantas matrizes de café Conilon em condições de propriedades agrícolas, tem se utilizado os critérios: potencial e estabilidade de produção, tolerância ao estresse hídrico e doenças, arquitetura da planta e uniformidade dos frutos e tipo do grão. Após as avaliações e o teste de compatibilidade genética, os

clones eleitos são agrupados de acordo com o objetivo para formação de uma variedade clonal (FERRÃO et al., 2007).

A utilização de variedades clonais para o cultivo de *C. canephora* (CHARMENTANT et al., 1990) não foi iniciada no Brasil. Muitos países há décadas utilizam clones para exploração econômica da espécie (CHARMENTANT et al., 1990). No Brasil, um dos aspectos importantes sobre o cultivo do café Conilon é a tolerância à seca apresentada por alguns clones. No estado do Espírito Santo o cultivo do café Conilon tem-se expandido para áreas onde a deficiência hídrica é o principal fator limitante à produção (FERRÃO et al., 2007).

O “Clone 14”, originário da variedade Emcapa 8141 - Robustão Capixaba, variedade clonal de café conilon tolerante à seca, desenvolvido para o estado do Espírito Santo (FERRÃO et al., 2009b) possui características importantes que levam a essa tolerância, como alta sensibilidade estomática à disponibilidade de água e baixas taxas de uso da mesma que postergam a desidratação dos seus tecidos, o que mantém o balanço hídrico favorável e, conseqüentemente, o vigor (DAMATTA, 2010). No entanto, clones com este comportamento, normalmente respondem de forma insatisfatória à irrigação e ainda que haja disponibilidade adequada de água no solo, seus estômatos se fecham em resposta à baixa umidade do ar. Esta estratégia favorece a sobrevivência, mas pode comprometer a produção (DAMATTA, 2010).

Apesar de algumas restrições, estudos recentes têm observado resistência genética do “Clone 14” a espécies de *Meloidogyne* que atacam a produção cafeeira, *M. paranaensis*, *M. exigua*, *M. incognita* (LIMA et al., 2015a) sobretudo como resistência múltipla a essas três espécies (LIMA et al., 2015b). Isto conduz a uma resistência duradoura no Clone 14 que combina além da resistência múltipla aos nematoides de galhas, a tolerância à seca numa única variedade clonal.

3.2.7 IPR 100

As cultivares de *C. arabica* disponíveis aos agricultores atualmente são suscetíveis a *M. paranaensis* e apresentam danos severos a partir do segundo ano no campo, inviabilizando economicamente a atividade. Recentemente foi lançado no mercado a primeira cultivar de *C. arabica* (IPR 100), resistente a *M. paranaensis* e *M. incognita* raças 1 e 2 (SERA et al., 2007). É uma cultivar que não necessita de enxertia, apresentando ainda alta produtividade e rusticidade (ITO et al., 2008).

A cultivar IPR 100 é originária do cruzamento realizado entre cafeeiro do germoplasma Catuaí (“Catuaí” x genótipo de café da série ‘BA-10’) e o portador de genes de resistência *C. liberica*. Essa espécie *C. liberica* é outro tipo de planta de café, além do *C. arabica* e *C. canephora*, original da Libéria, daí o nome, é uma planta mais resistente às pragas que os demais tipos, mas de qualidade muito inferior, limitando seu consumo e produção cafeeira (SERA et al., 2007).

A cultivar IPR 100 é indicada preferencialmente para regiões de cultivo ‘aptas quentes’, com temperatura média anual acima de 21,5 °C. Nas regiões aptas mais frias, com temperatura média anual abaixo de 20,5°C, a cultivar também apresenta alta produtividade, porém é indicada para áreas menos sujeitas às geadas de início de inverno (SERA et al., 2007).

3.2.8 Mundo Novo

Resultante do cruzamento natural entre as cultivares Sumatra e Bourbon Vermelho de *C. arabica*. Sementes desses cafeeiros foram plantadas no município de Mundo Novo, conhecido atualmente como Urupês (SP), e selecionadas plantas matrizes que deram origem a cultivar Mundo Novo (CARVALHO, 2008).

Tem se verificado ampla capacidade de adaptação das cultivares Mundo Novo, obtendo boas produções em quase todas as regiões cafeeiras do Brasil, com clima apropriado para a espécie *C. arabica*. Apresenta elevada produção de café beneficiado, ótimo vigor vegetativo, excelente qualidade de bebida, porém apresenta suscetibilidade a doenças, como a ferrugem do cafeeiro e aos nematoides (CARVALHO, 2008).

3.3 Classificação do gênero *Meloidogyne*

As espécies do gênero *Meloidogyne* constituem uma pequena parte do Filo Nematoda e estão incluídas dentro da classe Chromadorea, Ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Infraordem Tylenchomorpha, Superfamília Tylenchoidea e família Meloidogynidae (DE LEY e BLAXTER, 2002; KARSSSEN e MOENS, 2006).

3.3.1 *Meloidogyne* spp. em cafeeiro

Existem mais de 90 espécies descritas desse gênero, das quais 18 podem atacar o cafeeiro (CARNEIRO e COFCEWICZ, 2008). Destacando-se *M. paranaensis*, *M. incognita* e *M. exigua*, como as principais espécies no Brasil devido aos danos

causados e sua ampla ocorrência nas áreas produtoras de café (OLIVEIRA, 2006), além de *M. coffeicola* Lordello e Zamith 1960, de pouca ocorrência, encontrado somente nos Estados de São Paulo, Paraná (CAMPOS et al., 1997) e em Minas Gerais (CASTRO et al., 2004). As espécies menos disseminadas e de ocorrência pouco determinada incluem: *M. africana* Whitehead, 1960, *M. dacalineata* Whitehead, 1968, *M. megadora* Whitehead, 1968, *M. hapla* Chitwood, 1949, *M. kikuyensis* De Grisse, 1961, *M. inornata* Lordello, 1956, *M. javanica* (TREUB, 1885) Chitwood, 1949, *M. oteifae* Elmiligy, 1968 e *M. arenaria* (NEAL, 1889) Chitwood, 1949 (CAMPOS et al., 1997).

Meloidogyne paranaensis é a mais recente espécie de nematoides das galhas relatada parasitando o cafeeiro no Brasil, descrita como nova espécie por CARNEIRO et al. (1996b) a partir do conhecido biótipo IAPAR de *M. incognita*, cuja ocorrência até então estava limitada ao Estado do Paraná. Essa espécie pode ser identificada pelos fenótipos de esterase (Est P1 e Est P2) e marcadores moleculares do tipo SCAR (RANDIG et al., 2002; 2004). A disseminação é ampla nos Estados do Paraná e São Paulo, onde causa grandes prejuízos e torna inviável a atividade cafeeira (GONÇALVES e SILVAROLLA, 2007). Em Minas Gerais, principal polo do cafeeiro arábica do país, há relatos de sua ocorrência apenas em três municípios: Patrocínio e Serra do Salitre, na região do Alto Paranaíba (CASTRO et al., 2003) e Piumbí, no sul do Estado (CASTRO et al., 2008). Mais recentemente, foi detectado no município de Catalão, Estado de Goiás (SILVA et al., 2008), além dos quatro estados brasileiros, esse nematoide já foi detectado na Guatemala e nos Estados Unidos (Havaí) (CARNEIRO et al., 2004) e recentemente no México (LOPEZ-LIMA et al., 2015).

Outras duas espécies de importância para a América Central que vem causando danos à cultura do cafeeiro são *M. izalcoensis* (CARNEIRO et al., 2005) em El Salvador e *M. arabicida* na Costa Rica (LOPES e SALAZAR, 1989). A distribuição dessas espécies em cafeeiro está restrita a esses países nas Américas (HERNANDEZ et al., 2004; CARNEIRO et al., 2005). Porém, *M. izalcoensis* foi recentemente relatada na África (CARNEIRO et al., 2014a). Essas duas espécies podem ser diagnosticadas pelos perfis de esterase (Est I4) e (Est AR2), respectivamente (CARNEIRO e COFCEWICZ, 2008).

Mais recentemente, foi descrita uma nova espécie de *Meloidogyne* em cafeeiro, *M. lopezi* na Costa Rica, que difere das outras espécies pela morfologia e fenótipos

isoenzimáticos, além de apresentar relações filogenéticas muito próximas com *M. arabicida*, *M. izalcoensis* e *M. paranaensis* (HUMPHREYS-PEREIRA et al., 2014).

3.3.2 Biologia de *Meloidogyne* spp. em cafeeiro

O ciclo de vida de *Meloidogyne* inicia-se com a fêmea depositando seus ovos em um único local da raiz, formando uma massa de ovos envolta em uma matriz gelatinosa. Cada massa de ovos tem em média 400 a 500 ovos e pode formar-se em meio ao parênquima cortical (internas) ou sobre a superfície das raízes (externas). O desenvolvimento embrionário resulta no juvenil de primeiro estágio (J1) que passa por uma ecdise ainda no ovo, dando origem ao juvenil de segundo estágio (J2) (ABAD et al., 2009).

As formas pré-parasíticas (J2) eclodem dos ovos por força mecânica de seu estilete e também pela ação enzimática de quitinases, produzidas nas glândulas esofagianas e liberada via estilete (ABAD et al., 2009). Quando liberadas dos ovos, as formas J2 pré-infectivas migram pelo solo em direção às raízes de plantas hospedeiras, guiadas por exsudatos radiculares produzidos pelas raízes. Uma vez na superfície das raízes, os J2 munidos de um arsenal enzimático composto principalmente por enzimas degradadoras de parede celular, penetram nas raízes migrando intercelularmente em direção ao cilindro vascular, aonde estabelecem o seu sítio de alimentação com a formação de células gigantes (TAYLOR e SASSER, 1983).

No sítio de alimentação, o nematoide passa pela segunda (J2 > J3), terceira (J3 > J4) e quarta (J4 > fêmea jovem e macho) ecdises (EISENBACK e TRIANTAPHYLLOU, 1991). Quando a fêmea jovem é formada, inicia-se a fase sedentária do nematoide, a qual durará até o final de seu ciclo de vida com o desenvolvimento das fêmeas, formação e liberação de ovos. As células adjacentes às células gigantes sofrem distúrbio hormonal (hiperauxina), levando à hiperplasia e hipertrofia destas, dando origem às galhas, principal sintoma causado por nematoides desse gênero em plantas (MOENS et al., 2009). Durante esse desenvolvimento pós-embrionário, o sistema reprodutivo desenvolve-se e crescem as gônadas (EISENBACK e TRIANTAPHYLLOU, 1991).

A mudança de forma nos machos (piriforme para adulto vermiforme) ocorre durante o quarto estágio juvenil (J4). Nesse período, o J4 passa por uma metamorfose na qual o corpo se alonga, assumindo o macho uma forma vermiforme que emerge

inteiramente desenvolvido. Os machos adultos não se alimentam, saem da raiz e movem-se livremente no solo. Não há acasalamento, nas espécies partenogênicas permanecendo os machos no solo até a morte (EISENBACK e TRIANTAPHYLLOU, 1991).

A duração do ciclo de vida do nematoide das galhas é fortemente afetada pela temperatura, umidade e planta hospedeira. No geral, as fêmeas produzem ovos por três semanas, depois cessam a produção, podendo viver um pouco mais. Os machos vivem semanas e os J2 podem viver de poucos dias a meses (MOENS et al., 2009).

Em condições normais, a quase totalidade dos adultos formados é fêmea. Porém, em condições ambientais desfavoráveis, com elevada população de nematoides na raiz ou resistência da planta hospedeira, os juvenis que se desenvolveriam em fêmeas, tornam-se machos, pois seu primórdio sexual se desenvolve em testículos em vez de ovários. Tal fenômeno é conhecido por reversão sexual e é um dos mecanismos de sobrevivência desses nematoides, pois menos ovos serão produzidos e o parasitismo sobre a planta infectada será mais brando, garantindo a sobrevivência das poucas fêmeas formadas (FREITAS et al., 2006).

As fêmeas de *M. paranaensis* são observadas também em raízes mais velhas. Ao se alimentarem de células gigantes devido à intolerância do cafeeiro, os tecidos circundantes morrem levando raízes à morte e, conseqüentemente, reduzindo o sistema radicular. Em plantas infectadas por *M. paranaensis*, as massas de ovos são mais internas e as fêmeas desse nematoide são facilmente encontradas em manchas escuras em raízes descamadas (SALGADO et al., 2011).

Meloidogyne paranaensis é considerada uma das principais espécies para o café, devido a sua alta agressividade e persistência no solo e prejuízos pela destruição do sistema radicular do cafeeiro, causando danos na integridade das raízes, como escamações superficiais com aspecto de cortiça, descascamento, rachaduras e lesões necróticas (SALGADO et al., 2011). Na parte aérea os sintomas são clorose, desfolhamento, redução no crescimento e às vezes morte da planta (FERRAZ, 2008; CARNEIRO e COFCEWICZ, 2008).

A alta suscetibilidade e intolerância das cultivares de *C. arabica* a essa espécie constitui fator limitante para a cafeicultura (SALGADO et al., 2011). Em condição de alta infestação, *M. paranaensis* reduz a produtividade de cultivares suscetíveis, como

Mundo Novo e Catuaí, em níveis prejudiciais econômicos já na primeira produção (MATA et al., 2000).

3.4 Reação de hospedeiras diferenciadoras

O termo raça para o gênero *Meloidogyne* não tem a mesma conotação de raça fisiológica utilizada em fitopatologia. Por definição, raças são biótipos distinguidos por sua preferência de hospedeiro dentro de um grupo taxonômico. Nesse caso, os hospedeiros são cultivares de uma espécie de planta, diferentemente da usual separação de raças de *Meloidogyne* spp. que envolve plantas de diferentes espécies (MOURA, 1996).

As espécies de *Meloidogyne* apresentam preferências alimentares diferentes, porém, quando essas diferenças ocorrem dentro de uma mesma espécie, essas populações passam a ser denominadas como raças fisiológicas. As raças de uma mesma espécie de *Meloidogyne* não podem ser diferenciadas morfologicamente (FREITAS et al., 2006).

Em *Meloidogyne* spp., as raças parasitárias são diferenciadas através de reações positivas e negativas, verificadas em plantas de espécies diferentes, tomate (*Solanum lycopersicum* ‘Rutgers’), fumo (*Nicotiana tabacum* ‘NC 95’), algodão (*Gossypium hirsutum* ‘Deltapine 61’), pimentão (*Capsicum annuum* ‘Early California Wonder’), melancia (*Citrullus vulgaris* ‘Charleston Gray’) e amendoim (*Arachis hypogaea* ‘Florunner’) baseado no teste de hospedeiros diferenciadores da Universidade Estadual da Carolina do Norte (HARTMAN e SASSER, 1985). Não tem sido possível diferenciar raças parasitárias de *Meloidogyne* por outros métodos, a não ser através de reações diferenciadoras em plantas (MOURA, 1996). Apesar do conhecimento das raças serem de suma importância para caracterização de resistência para programas de melhoramento genético (FASSULIOTIS, 1985). Segundo Lordello e Lordello (1996), a identificação de raças em *Meloidogyne* spp. é essencial para o manejo em áreas infestadas, principalmente na recomendação de sistemas de rotação de culturas. A identificação de raças permite conhecer a distribuição destas e a importância de cada uma para a agricultura local, bem como fornecer populações para a avaliação de genótipos e progênies em programas de melhoramento.

Porém, o teste de hospedeiros diferenciadores da Carolina do Norte não distingue claramente algumas das importantes espécies descritas nas últimas décadas de

M. incognita, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla*. Embora o reconhecimento da variação na gama de hospedeiros seja importante, Moens et al. (2009), sugere que o uso formal do conceito de raças seja interrompido. Segundo o autor, desde a década de 1970 tem sido reconhecida a variação na preferência de hospedeiros dentro das quatro principais espécies de *Meloidogyne*, sobretudo para *M. incognita* e *M. arenaria* que apresenta quatro e duas raças, respectivamente (HATMAN e SASSER, 1985). Mais recentemente, esse conceito foi estendido para *M. javanica*, que hoje é reconhecida como variável no que diz respeito à reprodução em pimentão e amendoim. Isto compromete a teoria do uso do teste de hospedeiros diferenciadores como auxiliar na identificação de espécies. Esse problema é agravado com o aumento substancial do número de novas espécies descritas nos últimos anos.

Portanto, o conceito de raça baseado em hospedeiras diferenciadoras nunca foi universalmente aceito, em parte porque é medida apenas por uma pequena parcela da variação da capacidade parasitária. Dado ao grande número de hospedeiros de muitas espécies é improvável que toda a extensão da possível variação nunca seja adequadamente caracterizada por esse método (MOENS et al., 2009).

3.5 Identificação bioquímica e molecular

A primeira demonstração de que enzimas poderiam ser empregadas na identificação de espécies de *Meloidogyne* foi realizada por Dickson et al. (1971), seguido por Hussey et al. (1972), com base nos padrões das enzimas esterase, malato desidrogenase e α -glicerofosfato desidrogenase. Entretanto, esses autores não conseguiram determinar os padrões devido ao grande número de fêmeas utilizadas. Subsequentemente, Dalmaso e Berge (1978) identificaram *Meloidogyne* spp. a partir da extração de proteínas de fêmeas individuais e separação das mesmas em corrida eletroforética com gel ultrafino.

Dentre as isoenzimas estudadas, as esterases (EST) são as únicas espécie-específicas e utilizadas na identificação de *Meloidogyne* spp., com mais de 40 fenótipos descritos (BLOK e POWERS, 2009). Outras enzimas como malato-desidrogenase (MDH), superóxido dismutase (SOD) e glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) são com frequência incluídas em estudos de diversidade ou para confirmação de poucas espécies, previamente identificadas com as esterases (ESBENSHADE e TRIANTAPHYLLOU, 1985).

A técnica de eletroforese de isoenzimas consiste na avaliação da mobilidade relativa (R_m) das bandas polimórficas das isoenzimas. A mobilidade das enzimas em gel de poliacrilamida sob corrente elétrica varia de acordo com suas cargas elétricas e pesos moleculares, levando à visualização de bandas em diferentes posições no gel, as quais são específicas para a maior parte das espécies de *Meloidogyne*. As principais vantagens dessa técnica, incluem o reconhecimento de *Meloidogyne* spp., mesmo em população mista, caracterização de populações atípicas, eficiência, confiabilidade e rapidez (CARNEIRO et al., 2000b, BLOK e POWERS, 2009).

Um dos trabalhos mais relevantes do uso de fenótipos isoenzimáticos para diferenciar *Meloidogyne* spp. foi publicado por Esbenshade e Triantaphyllou (1985), que relataram padrões de esterase para 16 espécies de *Meloidogyne*, dentre elas, fenótipos para *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. hapla*. Mais de 300 populações originárias de vários países e continentes foram estudadas, confirmando serem as esterases as enzimas mais precisas na identificação das espécies e as malato-desidrogenases como critério auxiliar na diferenciação de espécies, cujas esterases são idênticas, como é o caso de *M. naasi* (FRANKLIN, 1965) e *M. exigua* (ESBENSHADE e TRIANTAPHYLLOU, 1990).

Estudos adicionais envolvendo fenótipos enzimáticos, especialmente os de esterase e malato desidrogenase, foram relatados por Carneiro et al. (1996a) em estudo de 90 populações brasileiras de *Meloidogyne* spp. Por este procedimento, foi possível identificar *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. exigua*, *M. hapla* e *M. graminicola* Golden e Birchfield, 1965. Em outro estudo, Carneiro et al. (2000b) utilizaram quatro enzimas distintas (esterase, malato desidrogenase, superóxido dismutase e glutamato oxaloacetato transaminase) na caracterização de mais de 100 populações originárias de diferentes estados do Brasil e países das Américas. Foi possível determinar 34 fenótipos enzimáticos para diferentes espécies de *Meloidogyne*, incluindo 18 fenótipos de esterase, 6 de malato desidrogenase, 5 de superóxido dismutase e 5 de glutamato oxaloacetato transaminase. As espécies identificadas pelas esterases foram *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. coffeicola*, *M. paranaensis*, *M. konaensis*, *M. exigua* e *M. enterolobii* (YANG e EISENBACK, 1983).

Em estudo realizado por Carneiro et al. (2004) com populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de cafezais de diferentes regiões do Brasil, América Central e Havaí, procedeu-se a identificação das populações com base nos fenótipos de esterase (EST),

tendo sido identificados: *M. incognita* (EST I1, I2), *M. paranaensis* (EST P1, P2), *M. arenaria*, (EST A2), *M. arabicida* (EST AR2), *M. exigua* (EST E1), *M. enterolobii*, (EST M2) e duas populações desconhecidas, (EST Sa2, Sa4), posteriormente descritas como *M. izalcoensis* (CARNEIRO et al., 2005).

Até o presente, não existem padrões enzimáticos para todas as espécies do gênero *Meloidogyne* descritas. Infelizmente, esses marcadores não podem ser utilizados nos estudos de variabilidade intraespecífica, que requerem níveis razoáveis de variabilidade (ARIAS et al., 2001). A variabilidade intraespecífica a nível enzimático é geralmente muito baixa, por serem as enzimas produzidas por meio da expressão de genes altamente conservados e representarem apenas uma fração muito pequena do genoma funcional, enquanto que as regiões não codantes são mais abundantes e submetidas a extensivas mudanças evolutivas (McLAIN et al., 1987).

Estudos baseados em análise de DNA aumentaram a partir de 1985 e, recentemente, foram desenvolvidos conjuntos de “primers” espécie-específicos que possibilitam a identificação rápida de algumas espécies do gênero *Meloidogyne* (ZIJLSTRA, 2000 a,b; RANDIG et al., 2002). A abordagem atual é a conversão dos marcadores de RAPD em SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), termo cunhado por Paran e Michelmore (1993) para definir marcadores RAPD, cuja sequência interna tenha sido determinada, permitindo compor primers mais longos, ricos em GC e de sequência específica.

Marcadores SCAR já foram desenvolvidos para identificar três espécies, *M. chitwoodi* e *M. fallax* Karsen (1995), ambos quarentenários, e *M. hapla* (ZIJLSTRA, 2000); ou ainda, para separar outras três espécies: *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, presentes principalmente em regiões tropicais e subtropicais, ou em plantios em sistemas protegidos (ZIJLSTRA et al., 2000; MENG et al., 2004). Foram desenvolvidos mais recentemente, para *M. enterolobii*, o nematoide das galhas da goiabeira (TIGANO et al., 2010), e *M. ethiopica* Whitehead, 1968 (CORREA et al., 2014).

Randig et al. (2002) estabeleceram marcadores SCAR-PCR para as três principais espécies de nematoides das galhas do cafeeiro ocorrentes no Brasil: *M. incognita*, *M. paranaensis* e *M. exigua*. Há alguns exemplos da utilização de vários primers-SCAR em conjunto em reação multiplex (ZIJLSTRA, 2000b; RANDIG et al., 2004). Essa técnica além de identificar as espécies, avalia o potencial de detecção de

misturas em amostras, possibilitando o diagnóstico rápido através da presença/ausência e tamanho de banda obtido (RANDIG et al., 2002; CORREA et al., 2013).

3.6 Diversidade genética e filogenia de *Meloidogyne* spp.

3.6.1 Marcadores moleculares: RAPD e AFLP

A utilização da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem trazido significativos avanços na implantação de novos marcadores moleculares que associados às técnicas de clonagem e sequenciamento de DNA, têm possibilitado rápido acúmulo de informações sobre a estrutura de genomas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

O desenvolvimento de técnicas moleculares abriu novas perspectivas quanto aos estudos de variabilidade intraespecífica dos nematoides de galhas do gênero *Meloidogyne*. Assim, estudos foram realizados a partir da análise de marcadores do tipo AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) com resultados significativos para a genética de populações (CURRAN et al., 1986; CASTAGNONE-SERENO et al., 1991; LAX et al., 2007) em análises de similaridade e distância genética.

A técnica RAPD é baseada na técnica de PCR, e é utilizada atualmente em estudos genéticos e na diferenciação de espécies de *Meloidogyne*, a partir de perfis gerados com o auxílio de *primers* aleatórios (CASTAGNONE-SERENO et al., 1994; BLOK et al., 1997; RANDIG et al., 2002). É baseada na utilização de pequenas quantidades de material genético (6 a 30 ng de material genômico), e não necessita do conhecimento prévio do genoma a ser estudado (WILLIAMS et al., 1990). A principal limitação dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informação genética por loco. Apenas um alelo é detectado, enquanto que as demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como um alelo nulo. Os marcadores RAPD, portanto, comportam-se como marcadores dominantes e os dados têm natureza binária (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A técnica de PCR-AFLP é baseada na amplificação de um subconjunto de fragmentos gerados a partir da digestão do DNA genômico com combinações de enzimas de restrição tipo II, que clivam o DNA em sítios específicos. A técnica baseia-se na propriedade de certas enzimas de restrição de deixar, após a clivagem do DNA, extremidades coesivas de sequência conhecida. Assim, é possível construir sequências

de nucleotídeos de fita dupla que se ligam às extremidades dos fragmentos de restrição, denominados adaptadores. Uma vez que a sequência dos adaptadores e a do sítio de restrição é conhecida, podem-se construir iniciadores específicos a essas sequências para pré-amplificação dos fragmentos de restrição (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

O primeiro estudo sobre diversidade de populações brasileiras de *Meloidogyne* spp. foi realizado por Randig et al. (2002) onde foram estudadas, através de PCR-RAPD, 18 populações de *Meloidogyne* spp., provenientes de diferentes regiões do Brasil. Nesse estudo, pode-se observar que as espécies de *Meloidogyne* se diferenciaram em grupos, de acordo com os perfis enzimáticos descritos para cada espécie. Esse estudo mostrou um alto grau de variabilidade intraespecífica em populações de *M. exigua*, *M. hapla* e *M. arenaria*, que apresentaram: 67,5%, 67,5% e 69,8% de fragmentos polimórficos. Diferentemente, populações de *M. incognita* e *M. javanica* apresentaram baixa variabilidade intraespecífica, 30% e 19% respectivamente.

Um estudo baseado em 18 populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de cafezais de diferentes regiões do Brasil, América Central e E.U.A, caracterizou a diversidade genética dos nematoides de galhas do café desses países em relação ao polimorfismo molecular. Os resultados obtidos com os marcadores tipo RAPD mostraram baixos níveis de polimorfismo intraespecífico detectados em *M. incognita* e *M. paranaensis*. Por outro lado, *M. exigua*, *M. arenaria* e *M. izalcoensis*, exibiram níveis altos de variabilidade intra-interespecífica (CARNEIRO et al., 2004).

As populações brasileiras de *M. paranaensis* foram muito próximas entre si e à população havaiana dessa espécie, mostrando uma variabilidade genética de apenas 9,8% e confirmando a detecção de *M. paranaensis* no Havaí. Outro fenótipo (Est P2) de *M. paranaensis* foi detectado na Guatemala, apresentando um polimorfismo de 20,3 % quando comparado às populações brasileiras (CARNEIRO et al., 2004).

Randig et al. (2002) estudando duas populações de *M. exigua* do café e seringueira mostraram uma variabilidade genética da ordem de 67,5 %, o que é extremamente alta para nematoides da mesma espécie. Em estudos realizados por Muniz et al. (2008) com 16 populações de *M. exigua*, as análises filogenéticas mostraram polimorfismo intraespecífico elevado (24,6-57,8%) para a espécie. Entretanto, todas as populações se agruparam com 100% bootstrap, o que mostra a consistência da caracterização da espécie. Esse estudo concluiu que embora exista

grande variabilidade intraespecífica dentro da espécie *M. exigua*, ela forma um grupo coeso, diferentemente de *M. arenaria* (CARNEIRO et al., 2008).

As espécies partenogênicas possuem geralmente baixa variabilidade genética. A partenogênese permite uma rápida reprodução, pois não há necessidade do encontro do macho com a fêmea como em espécies anfimíticas. Todavia, espécies de *Meloidogyne* caracterizadas por reprodução partenogênica como *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. incognita* possuem uma variação genética que permite uma rápida adaptação a ambientes desfavoráveis, como por exemplo, quando em solo cultivado com plantas hospedeiras resistentes (TRUDGILL e BLOK, 2001).

3.6.2 Marcadores moleculares: D2D3 e ITS do DNA ribossomal

O DNA ribossomal (rDNA) continua sendo uma das mais completas ferramentas para as investigações moleculares. As sequências de rDNA são responsáveis pela síntese de uma importante classe de moléculas, os RNAs ribossômicos (rRNAs), componentes essenciais na fisiologia celular, que interagem de modo específico com as proteínas ribossômicas para formar as unidades ribossomais que atuam na síntese de proteínas. Portanto, os rRNAs são o principal produto da transcrição em qualquer célula, constituindo em torno de 80 a 90% da massa de RNA total dos procariontes e eucariontes (ALBERTS et al., 2004).

O principal locus ribossomal em organismos eucarióticos consiste de três genes: 18S rDNA, 5.8S rDNA e 28S rDNA, os quais codificam, respectivamente, as subunidades ribossomais 18S, 5.8S e 28S. Estes três genes são transcritos em um único RNA, separados por duas regiões: os espaçadores internos transcritos (ITS) – ITS-1, entre os genes das subunidades 18S e 5.8S, e ITS-2, entre os genes das subunidades 5.8S e 28S - (HILLIS e DIXON, 1991). Os três genes estão repetidos em sequência, e entre cada grupo situa-se o espaçador intergênico (Figura 1).

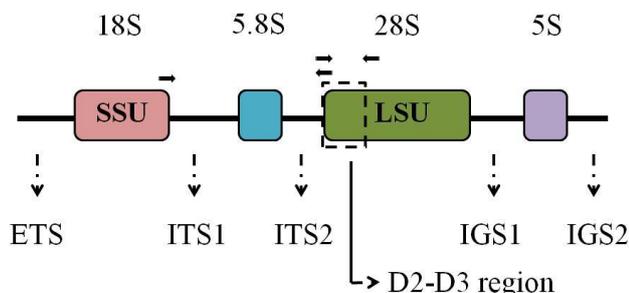


Figura 1: Regiões do DNA nuclear ribossomal e espaçadores internos transcritos. SSU = 18S - subunidade menor; LSU = 28S - subunidade maior; ITS1 e ITS2 espaçadores intergênicos transcritos; IGS1 e IGS2 espaçadores de regiões intergênicas; setas indicam possível ponto de partida para a amplificação do primer. caixa tracejada indica os segmentos de expansão D2- D3 do gene 28S (CARNEIRO et al., 2014b).

Estima-se que existam mais de 100 cópias dos genes ribossomais em um cromossomo e eles devem ser encontrados em mais de um cromossomo (WEN et al., 1974). A repetição é essencialmente uma etapa de pré-amplificação, a qual permite detectar esses genes facilmente em relação aos que estão presentes em cópia única.

Os genes ribossomais reúnem muitas características ideais de um marcador evolutivo, motivos pelos quais têm sido utilizados para analisar as relações em uma ampla categoria de táxons e níveis de divergências. Entretanto, também apresentam algumas características indesejáveis que podem afetar as análises filogenéticas e que devem ser levadas em conta. Entre elas, observa-se a variabilidade na taxa evolutiva entre táxons e entre os genes, as limitações estruturais e funcionais que geram diferenças na frequência das substituições entre as regiões dos genes, a ocorrência de mutações múltiplas em uma mesma região, que ocultam o caráter filogenético e o processo de recombinação genética durante a mitose das células germinativas (HILLIS et al., 1996).

Em geral, se considera que para resolver processos evolutivos em níveis profundos de divergência, são mais apropriados os genes 5,8S e 18S rRNA e as regiões mais conservadas das sequências do gene 28S. Para estudar níveis intermediários de divergência parece mais útil o gene 28S (regiões conservadas e segmentos de expansão) e, em alguns casos, as regiões variáveis do gene 18S (HILLIS et al., 1996).

Para caracterizar as regiões ITS é possível desenhar primers para PCR baseados nos genes mais conservados (28S, 5.8S e 18S) que flanqueiam os ITSs. As sequências amplificadas por esses iniciadores podem ser úteis para comparações filogenéticas entre táxons distantes, no entanto, as regiões ITS são muito úteis para distinção entre táxons muito próximos, já que evoluem mais rapidamente do que as regiões codificadoras (HILLIS e DIXON, 1991).

A partir do momento que uma região do rDNA tenham sido amplificadas com sucesso, estas podem ser analisadas por técnicas adicionais, possibilitando dessa forma as análises necessárias ao entendimento da similaridade ou divergência entre indivíduos (ALBERTS et al., 2004).

3.7 Medidas de controle dos nematoides das galhas

As consequências do impacto dos nematoides das galhas na produção nacional de café são altas, sendo o controle desses nematoides um desafio permanente, principalmente porque uma vez introduzido em uma área agrícola, sua erradicação é praticamente impossível (SALGADO et al., 2011).

A utilização de nematicidas, rotação de culturas, destruição das plantas atacadas, plantio em local isento dos fitonematoides, uso de mudas sadias, porta-enxerto resistente e o emprego de variedades resistentes, são táticas indicadas para o controle dos nematoides das galhas no cafeeiro (CAMPOS, 1997).

Apesar do controle do nematoide das galhas em cafeeiros ser realizado de diversos modos, com relação a *M. paranaensis*, a maioria deles vem apresentando baixa eficiência para lavouras instaladas em áreas com alta população inicial (MATA et al., 2002). A dificuldade do controle de *M. paranaensis* é que além da agressividade, possuem algumas características que dificultam ainda mais o controle, como o hábito de infectar a raiz principal do cafeeiro e alta gama de hospedeiros (SALGADO et al., 2011). Essa primeira característica dificulta a eficiência do controle químico, pois mesmo ocorrendo uma redução da população do nematoide no solo e nas raízes, o sistema radicular não mais consegue se recuperar dos danos causados por este patógeno e a ocorrência de mais de uma centena de plantas hospedeiras impede que se faça um controle efetivo desse nematoide através da rotação de cultura ou controle químico (SALGADO et al., 2011). Portanto, segundo Kanayama et al. (2009), o método de controle mais eficiente, econômico e ecologicamente correto de *Meloidogyne* spp. é o uso de cultivares resistentes.

3.8 Resistência genética do cafeeiro aos nematoides das galhas

Em termos gerais, a importância dos fitonematoides na produção brasileira de café é bastante variável e depende da espécie ou cultivar de cafeeiro plantado, das condições edafoclimáticas das regiões de cultivo, das práticas culturais adotadas e do nível populacional e espécie e ou raças dos nematoides presentes no solo (GONÇALVES et al., 2000).

Em termos simples, a resistência de plantas é considerada uma das principais táticas de manejo dos nematoides das galhas (ROBERTS, 2002). A resistência de plantas a nematoides varia de moderada a absoluta e pode ser específica a raça(s) e ou

espécie(s) (ROBERTS et al., 1998), o que com frequência ocorre em cafeeiros (GONÇALVES et al., 1998). Dessa maneira, torna-se de fundamental importância o conhecimento da reação dos cafeeiros selecionados como resistentes a determinada população do nematoide, em relação a diferentes variantes intraespecíficas de uma mesma espécie, assim como, entre as diferentes espécies de *Meloidogyne* que atacam o cafeeiro. Isto também evidencia a necessidade de uma identificação correta das populações de nematoides em estudos (SALGADO et al., 2011).

Em geral, na resistência de plantas a *Meloidogyne* spp., inicialmente ocorre a penetração dos juvenis, mas seu desenvolvimento ou a reprodução são prejudicados (ROBERTS, 2002). Já as plantas moderadamente resistentes permitem uma quantidade intermediária de reprodução. Enquanto plantas suscetíveis permitem normal desenvolvimento e reprodução do nematoide em suas raízes (ROBERTS, 2002). Os termos tolerância e intolerância são usados para descrever a habilidade da planta de suportar a infecção do nematoide. Plantas tolerantes permitem o desenvolvimento e reprodução do nematoide, mas não apresentam danos aparentes. Plantas intolerantes apresentam redução no crescimento ou morte e há menor reprodução do nematoide comparado às tolerantes (ROBERTS, 2002). Entretanto, resistência e tolerância, nem sempre estão juntas, e têm mostrado mecanismos genéticos separados nas interações planta-nematoide (EVANS e HAYDOCK, 1990).

A resistência no que se refere ao modo de herança pode ser monogênica, oligogênica ou poligênica. A resistência vertical ou qualitativa é normalmente controlada por um, até no máximo, três genes. Enquanto a resistência horizontal ou quantitativa é usualmente poligênica e herdada através de vários genes de efeitos menores e aditivos, que conferem níveis quantitativos de resistência (ROBERTS, 2002).

A reação de resistência pode ser pré-infectiva, ou seja, ocorre independente da infecção, impedindo o nematoide de penetrar na superfície da raiz. Ou pode ser pós-infectiva, ocorrendo em resposta à infecção pelo nematoide, como por exemplo, impedindo a formação ou a manutenção do sítio de alimentação (ROBERTS et al., 1998). Pelos resultados das pesquisas sabe-se que a resistência do cafeeiro aos nematoides do gênero *Meloidogyne* é do tipo pós-infectiva (ANTHONY et al., 2005; OLIVEIRA, 2006; LIMA et al., 2015a).

Roberts (2002) relatou que a tolerância combinada com a resistência é mais desejável do que a tolerância por si só; pois plantas tolerantes, com raízes abundantes e

suscetíveis, permitem o aumento da população do nematoide em altas taxas. Em plantas intolerantes, com sistema radicular pouco desenvolvido, a competição por sítios de alimentação e reservas de alimento é muito alta, levando a um declínio no número de nematoides.

Os recursos genéticos disponíveis nos bancos de germoplasma de café são as principais fontes de resistência a nematoides para serem usadas em programas de melhoramento. Aproximadamente 120 espécies do gênero *Coffea* já foram identificadas, e elas hibridizam umas com as outras. Desse modo, genes de resistência podem ser transferidos de plantas selvagens para cultivares, em qualquer nível intraespecífico ou interespecífico (BERTRAND e ANTHONY, 2008).

Uma vez que *C. arabica* apresenta qualidade de bebida superior à de *C. canephora*, o efeito das introgressões na composição bioquímica do grão deve ser avaliado em linhagens oriundas de cruzamentos interespecíficos (BERTRAND et al., 2003). Esses autores afirmaram que já é possível selecionar linhagens de *C. arabica* com boa qualidade de bebida e com características de resistência introgrididas de outras espécies, por exemplo o Híbrido de Timor.

Segundo Bertrand e Anthony (2008), os acessos resistentes podem ser usados como progenitores em cruzamentos com cultivares suscetíveis, com a finalidade de produzir populações segregantes. Tais populações são chaves para o entendimento da herança de resistência e para o uso em programas de melhoramento na obtenção de novas cultivares.

Até o momento, não foram encontrados cultivares promissores de *C. arabica* resistentes a nematoides do gênero *Meloidogyne*. Assim, 29 acessos silvestres desta espécie avaliados para resistência a *M. exigua* foram classificados como suscetíveis (BERTRAND et al., 2000). Por outro lado, na avaliação da resistência de 50 acessos de cafeeiros arábicos introduzidos da Etiópia e Sudão, observou-se que 40% destes foram resistentes a *M. incognita* (ANZUETO et al., 2001). No entanto, esses cafeeiros apresentam produções inferiores às dos cultivares Mundo Novo e Catuaí e pouca adaptação às condições brasileiras (CARVALHO, 2008), mas poderiam ser utilizados em programas de cruzamentos na introdução da resistência nas cultivares comerciais.

Fontes de resistência aos nematoides do gênero *Meloidogyne* estão presentes nas espécies diploides de *Coffea*. Do ponto de vista de aproveitamento como porta-enxerto ou para os trabalhos de melhoramento, as espécies *C. canephora*, *C. congensis* e *C.*

devewrei apresentam maior interesse. Isto ocorre porque a resistência aos nematoides está aliada a um sistema radicular mais desenvolvido nessas espécies, e porque estas apresentam resistência a outros patógenos, incluindo nematoides de outros gêneros, como *Pratylenchus* (VILLAIN et al., 2002; VILLAIN et al., 2004). Diversos autores têm reportado resistência de *C. canephora* e *C. congensis* a *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*. Com relação a essas duas últimas espécies de nematoides, trabalhos conduzidos em campo e casa de vegetação, sobre a reação desses cafeeiros a esses parasitos, revelaram plantas resistentes, porém a grande maioria segregando para a resistência (GONÇALVES e FERRAZ, 1987; GONÇALVES et al., 1996).

As combinações de *C. arabica* com *C. canephora*, como Icatu, Sarchimor, Catimor e outras vêm sendo intensivamente estudadas em relação ao agente causador da ferrugem *Hemileia vastatrix*, devido muitas plantas serem resistentes ao fungo. Têm-se verificado que essas populações apresentam também plantas resistentes a *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*, porém segregantes para essa característica (GONÇALVES et al., 1998; BERTHRAND et al., 1999).

Algumas populações derivadas do Híbrido do Timor x Catuai, em gerações F3, F4 e F5 são homozigotas para resistência a *M. exigua* e apresentam resistência também a ferrugem e boas características agronômicas (GONÇALVES e PEREIRA, 1998). Já existe também o exemplo da resistência a *M. exigua* presente em alguns cultivares de *C. arabica*, Catimores e Sarchimores. Observou-se que essa resistência é determinada por um gene mais importante oriundo de *C. canephora* e para qual foi identificado o locus Mex1 e marcadores AFLP associados, abrindo-se a perspectiva de uma possível seleção assistida (NOIR et al., 2003; DINIZ et al., 2005).

3.9 Resistência genética do cafeeiro à espécie *M. paranaensis*

Devido às perdas causadas por *M. paranaensis* na produção cafeeira e na economia brasileira, há uma demanda crescente de materiais resistentes para atender as necessidades dos produtores, e permitir o cultivo do café em áreas infestadas (SALGADO et al., 2011). Entretanto, existe certa dificuldade dado ao alto custo e a complicação dos programas de melhoramento para plantas perenes como o cafeeiro (BERTRAND e ANTHONY, 2008; SALGADO et al., 2011). A obtenção e disponibilização de cultivares resistentes irão garantir a sustentabilidade da produção cafeeira e a conservação das regiões nobres da cafeicultura no Brasil.

Certas combinações entre *C. arabica* e *C. canephora* dão origem a plantas resistentes a *M. paranaensis*, no entanto segregantes para tal característica (GONÇALVES e FERRAZ, 1987; GONÇALVES et al., 1996; GONÇALVES et al., 1998).

Em *C. arabica* todas as cultivares foram consideradas suscetíveis a *M. paranaensis*, no entanto numerosas plantas selvagens dessa espécie, introduzidas da Etiópia, foram consideradas resistentes. Além disso, vários acessos resistentes foram identificados em *C. canephora* e em progênies de híbridos interespecíficos entre *C. arabica* e *C. canephora* (BERTRAND e ANTHONY, 2008).

A resistência ao *M. paranaensis* vem sendo observada em *C. canephora* (GONÇALVES et al., 1988; SERA et al., 2004a, 2005) e *C. congensis* Froehner (GONÇALVES et al., 1988); e também em plantas do germoplasma Icatu, que é um híbrido artificial entre *C. arabica* e *C. canephora* (MATA et al., 2000, 2002; SERA et al., 2002, 2004b). Ademais, Mata et al. (2000), encontraram em área altamente infestada com *M. paranaensis* um genótipo de Catuaí, o qual originou a cultivar IPR-100, com todas as plantas resistentes a essa espécie.

Sera et al. (2007) na avaliação da resistência a *M. paranaensis* em progênies de *C. arabica* da mesma família da cultivar IPR-100, concluíram ser relativamente fácil selecionar para a resistência a essa espécie de nematoide. Os mesmos autores relataram que progênies resistentes da cultivar IPR-100 são bastante promissoras como novas cultivares de *C. arabica*.

4. REFERÊNCIAS

ABAD, P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; MARIE-NOËLLE, R.; ENGLER, J.A.; FAVERY, B. Invasion, feeding and development. In: PERRY, N.R.; MOENS, M.; STARR, J.L. (Eds.). **Root-knot nematodes**. Cambridge: CAB International, 2009. p.163-181.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTE, P. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1396p.

ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; QUIROS, O.; WILCHES, A.; LASHERMES, P.; BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. **Euphytica**, v.118, p.53-65, 2001.

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

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

ARIAS, M.C.; INFANTE-MALANCHIAS, M.E. AFLP: o emprego de enzimas de restrição para a detecção de polimorfismo no DNA. In: MATIOLI, S.R. (Ed.) **Biologia molecular e evolução**: São Paulo: Nobel, 2001, p.143-152.

BERTRAND, B.; PENA-DURAN, M.X.; ANZUETO, F.; CILAS, C.; ETIENNE, H.; ANTHONY, F.; ESKES, A. 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.

BERTRAND, B.; GUYOT, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P. Impact of *Coffea Canephora* gene introgression on beverage quality of *C. arabica*. **Tag Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, p. 387-394, 2003.

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**. New York: APS Press & Springer, 2008. p. 225-248.

BLOK, V.C.; PHILLIPS, M.S.; MCNICOL, J.W.; FARGETTE, M. Genetic variation in tropical *Meloidogyne* spp. as shown by RAPDs. **Fundamental and Applied Nematology**, v.20, p. 127–133, 1997.

BLOK, V.C.; POWERS, O. Biochemical and molecular identification. In: PERRY, R.; MOENS, M.; STARR, J.L (Eds.) **Root-knot Nematodes**. Cambridge, MA, USA, CABI International, 2009, p. 98-118.

BOISSEAU, M.; ARIBI, J.; SOUZA, 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.

BRASIL-Ministério da Agricultura. 2016. Café. Safra 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe/saiba-mais>. Consultado em: 15 de Abril de 2016.

CAMPOS, V.P.; SIVAPALAN, P.; GNANAPRAGASAM, N.C. Nematodes parasites of coffee, cocoa and tea. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Eds.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. London: CAB International, 1990. p. 387-430.

CAMPOS, V.P. Café (*Coffea arabica* L.) – Controle de doenças: doenças causadas por nematóides. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. (Eds.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: UFV, Departamento de Fitopatologia. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, p. 141-170, 1997. v.1

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; CARNEIRO, R.G. Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 19, p. 555-560, 1996a.

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

CARNEIRO, R.M.D.G.; RANDIG, O.; ALMEIDA, R.M.A.; CAMPOS, A.D. Resistance of vegetable crops to *Meloidogyne* spp.: suggestion for a crop rotation system. **Nematologia Brasileira**, v. 24, p. 49-54, 2000a.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. **Nematology**, v. 2, p. 645-654, 2000b.

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

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; GOMES, A.C.M.M.; HERNANDEZ, A. *Meloidogyne izalcoensis* n.sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in El Salvador. **Nematology**, v 7, p. 819-32, 2005.

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**. Springer, Holand, 2008, p.87-122.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; JUNIOR, A.J.; MATTOS, V.S.; CORREA, V.R.; COYNE, D. Characterization of *Meloidogyne* spp. From Uganda and Tanzania. **Annals of the 6th International Congress of Nematology**, p-178, 2014a.

CARNEIRO, R.M.D.G.; CORREA, V.R.; CASTAGNONE-SERENO, P. Practical aspects of biochemical and molecular diagnosis applied to *Meloidogyne* species. **Sanidade de raízes/NETFIT** - Núcleo de Estudos em Fitopatologia. 1ed. São Paulo, SP: Suprema Gráfica e Editora, 2014b. p. 79-98.

CARVALHO, A. Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial à espécie arábica. **Separata dos boletins da superintendência de serviços de café**. Campinas: IAC, 1946.

CARVALHO, A.; MÔNACO, L.C. Relaciones genéticas de espécies selecionadas de *Coffea*. **Café**. v.9, p.1-19, 1968.

CARVALHO, C.H.S. (Ed.). **Cultivares de café**: origem, características e recomendações. Brasília: Embrapa Café, 2008. 334p.

CASTAGNONE-SERENO, P.; PIOTTE, C.; ABAD, P.; BONGIOVANNI, M.; DALMASSO, A. Isolation of a repeated DNA probe showing polymorphism among populations. **Journal of Nematology**, v. 23, p. 316-320, 1991.

CASTAGNONE-SERENO, P.; VANLERBERGHE-MASUTTI, F.; LEROY, F. Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers. **Genome**, v.37, p. 904-909, 1994.

CASTRO, J.M.C.; NAVES, R.L.; CAMPOS, V.P. Ocorrência de *Meloidogyne paranaensis* em cafeeiro na região Alto Paranaíba em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v 28, p. 565, 2003.

CASTRO, J.M.; CAMPOS, V.P.; DUTRA, M.R. Ocorrência de *Meloidogyne coffeicola* em Cafeeiros do Município de Coromandel, Região do Alto Paranaíba em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**. v. 29, p. 227, 2004.

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.

CHARMETANT, P.; LEROY, T., BONTEMS, S.; DELSOL, E. Evaluation d'hybrides de *Coffea canephora* produits em champs semenciers em Côte D'Ivoire. **Café Cacao Thé**, v.34, n. 4, p. 257-264, 1990.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: CLIFFORD, M.M.; WILSON, K.C. (Eds.) **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. Westport: AVI, 1985. p.13-47.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Principles and methods in coffee plant breeding: *Coffea canephora* Pierre. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Eds.). **Coffee: agronomy**. London: Elsevier Applied Science. 1988. p.167-195.

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

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

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento 2016. **Acompimento da safra brasileira de café**, v. 2 – Safra 2016, n.1 - Primeiro Levantamento, Brasília: CONAB, 2016. 68p..

CONAGIN, C.H.T.M.; MENDES, A.J.T. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*: auto-incompatibilidade em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. **Bragantia**. v.20, p.787-804, 1961.

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

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

CORREA, V.R.; MATTOS, V.S.; SANTOS, M.F.A.; TIGANO, M.S.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R.M.D.G. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* and development of a species-specific SCAR marker for its diagnosis. **Plant Pathology**, v. 63, p. 476-483, 2014.

CROS, J. **Implications phylogénétiques des variations de l'ADN chloroplastique chez les caféiers (genres *Coffea* L. et *Psilanthus* Hook. F.)** 160f. Tese (Doutorado). Université Montpellier II, Montpellier, 1996. (Thèses et Documents Microfichés TDM, 147).

CURRAN, J.; MACCLURE, M.A.; WEBSTER, J.M. Genotypic differentiation of *Meloidogyne* populations by detection of restriction fragment length difference in total DNA. **Journal of Nematology** 18: 83-86, 1986.

DALMASSO, A.; BERGE, J.B. Molecular polymorphism and phylogenetic relationship in some *Meloidogyne* spp.: application to the taxonomy of *Meloidogyne*. **Journal of Nematology**, v 10, 323-332, 1978.

DAVIS, A.P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D.M.; STOFFELEN, P. An annotated checklist of the genus *Coffea* L. (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, p.465-512, 2006.

DE LEY, P.; BLAXTER, M.L. Systematic position and phylogeny. In: LEE, D.L. (Ed.) **The biology of nematodes**. London: Taylor and Francis, 2002. p. 1-30.

DICKSON, D.W.; HUISINGH, D.; SASSER, J.N. Dehydrogenases, acid and alkaline phosphatases, and esterases for chemotaxonomy of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera* and *Aphelenchus* spp. **Journal of Nematology**, v 3, p. 1-16, 1971.

DINIZ, L.E.C.; SAKIYAMA, 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**, Viçosa-MG, v. 5, n. 4, p. 387-393.

EISENBACK, J.D.; HIRSCHMANN, H.; SASSER, J.N.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. **A guide to the four most common species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.), with a pictorial key**. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, 48f, 1981.

EISENBACK, J.D.; TRIANTAPHYLLOU, H.H. Root-knot nematode: *Meloidogyne* spp. and races. In: NICKLE, W.R. (Ed.). **Manual of agricultural nematology**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 191-274.

ESBENSHADE, P.R.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, v .17, p. 6-20, 1985.

ESBENSHADE, P.R.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, v. 22, p. 10-15, 1990.

EVANS, K.; HAYDOCK, P.P.J. A review of tolerance by potato plants of cyst-nematode attack, with consideration of what factors may confer tolerance and methods of assaying and improving it in crops. **Annals of Applied Biology**, v. 117, p. 703-740, 1990.

FAZUOLI, L.C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: RENA, A.B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, N.; YAMADA, J. (Eds.). **Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade do cafeeiro**. Piracicaba: POTAFÓS, 1986. p.87-113.

FASSULIOTIS, G. The role of the nematologist on the development of resistant cultivars. In: Sasser JN, Carter CC, eds. An advanced treatise on *Meloidogyne*, biology and control. Raleigh: North Carolina State University Graphics., v.1 20, p. 233-240, 1985.

FERRAZ, L.C.B.F. World reports: Brazil. In: SOUZA, R.M. (Ed.) **Plant parasitic nematodes of coffee**. New York: APS Press & Springer, 2008. p.225-248.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220p.

FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A. da; FERRÃO, M.A.G.; De MUNER, L.H.; VERDIN FILHO, A.C.; VOLPI, P.S.; MARQUES, E.M.G.; ZUCATELI, F. **Café conilon: técnica de produção com variedades melhoradas**. 3.ed. Vitória: Incaper, 2007. 60p.

FERRÃO, M.A.; FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A.; VERDIN FILHO, A.C.; VOLPH, P.S.; SOUZA, E.M.R. Melhoramento do café conilon no Espírito Santo. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Tecnologias para produção do café conilon**. Viçosa: UFV, 2009a. p.153-173.

FERRÃO, M. A. G.; RIVA-SOUZA, E. M.; ATHAYDE, L. S.; FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; SPADETO, M.S. Divergência genética entre clones de *Coffea canephora* utilizando marcadores moleculares. In: Congresso Brasileiro DE Melhoramento de Plantas, 5. O melhoramento e os novos cenários da agricultura: **Anais**. Vitória: SBMP: Incaper, 2009b.

FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L.; FERRAZ, S. **Introdução à nematologia**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2006. p.83

GODOY, C.V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C.L. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 184-200.

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

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

GONÇALVES, W.; FERRAZ, L.C.C.B.; LIMA, M.M.A.; SILVAROLLA, M.B. Patogenicidade de *Meloidogyne exigua* e *M. incognita* raça 1 a mudas de cafeeiros. **Bragantia**, v 55, p. 89-93, 1996.

GONÇALVES, W.; PEREIRA, A. Resistência do cafeeiro a nematóides: IV Reação de cafeeiros derivados do Híbrido do Timor a *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 39-50, 1998.

GONÇALVES, W.; FAZUOLI, L.C.; LIMA, M.M.A. de; SILVAROLLA, M.B.; FAVORETO, A.J.; MOTTA FILHO, C.; GUERREIRO, G. Café IAC 4160 promissora fonte de resistência a *Meloidogyne paranaensis*. CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 21. Maringá, PR, 1998. **Anais**: Maringá, UEM/SBN, p. 53, 1998.

GONÇALVES, W.; SILVAROLLA, M.B.; GUERREIRO-FILHO, O.; FAZUOLI, L.C.; MEDINA-FILHO, H.P. Nematoides parasitos (*Meloidogyne* spp.) do cafeeiro: Manejo genético e químico no Brasil. In: **Mejoramiento sostenible del café Arábica por los recursos genéticos, asistido por los marcadores moleculares, con énfasis en la resistencia a los nematodos**. Turrialba, Costa Rica: CATIE-IRD, 2000. p. 49-54.

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

GONÇALVES, W.; SILVAROLA, M.B. A luta contra a doença causada pelos nematoides parasitos do cafeeiro. **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n.1, p. 54 – 57, 2007.

HARTMAN, R.M.; SASSER, J.N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: BARKER, K.R.; CARTER, C.C.; SASSER, J.N. (Eds.). **An advanced treatise on Meloidogyne**. Methodology. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, v. 2, 1985. p. 69-77.

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

HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review of Biology**, v.66, p. 411–453, 1991.

HILLIS, D.M., MORITZ, C. MABLE, B.K. **Molecular systematics**. 2.ed. Massachusetts, USA: Sinauer Associates, 1996. 665p.

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

HUSSEY, R.S.; SASSER, J.N.; HUISINGH, D. Disc-electrophoretic studies of proteins and enzymes of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. **Journal of Nematology**, v.4, p. 183-189, 1972.

HUSSEY, R.S.; JANSSEN, G.J.W. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: STARR, J.L.; COOK R.; BRIDGE, J. **Plant Resistance to Parasitic Nematodes**. CAB International, Wallingford. pp. 43-70. 2002.

ICO- International Coffee Organization 2015. Consultado em dezembro de 2015.

ITO, D. S.; SERA, G. H.; SERA, T.; SANTIAGO, D. C.; KANAYAMA, F. S.; DEL GROSSI, L. Progênies de café com resistência aos nematoides *Meloidogyne paranaensis* e raça 2 de *Meloidogyne incognita*. **Coffee Science**, Lavras, v.3, n.2, p. 156-163, 2008.

KANAYAMA, F.S.; SERA, G.H.; SERA, T.; MATA, J.S. ; RUAS, P.M.; ITO, D.S. Progênies de *Coffea arabica* cv. IPR 100 com resistência ao nematóide *Meloidogyne incognita* raça 1. **Ciência Agrotécnica**, v. 33, p. 1321- 1326, 2009.

KARSSSEN, G. Description of *Meloidogyne fallax* n.sp. (Nematoda: Heteroderidae), a root-knot nematode from the Netherlands. **Fundamental and applied Nematology**, v. 19, p.593-599, 1996.

LAX, P.; DUEÑAS, J.C.R.; GARDENAL, C.N.; DOUCET, M.E. Assessment of genetic variability in populations of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944) Nematoda: Pratylenchidae) from Argentina. **Nematology**, v.9, p.261-270, 2007.

LIMA, E.A; FURLANETTO, C.;NICOLE, M.; GOMES, A.C.M.M.; ALMEIDA, M.R.A.; ALDEMIRO,J.J.; CORREA, V.R.; SALGADO, S.M.; FERRÃO, M.A.G.; CARNEIRO, R.M.D.G. The multi-resistant reaction of drought –tolerant coffeea “conilon Clone 14” TO *Meloidogyne* spp. and late hypersensitive-like response in coffeea canephora. **Nematology**, v.105, n.6, p.805-814, 2015a.

LIMA, E.A.; CARNEIRO, F.A.; REGO, E.C.S.; COSTA, T.S.; COTTA, M.G.; JORGE-JUNIOR, A.; MARRACCINIS, P.; CARNEIRO, R.M.D.G.; ANDRADE, A.C. Caracterização molecular e seleção de genes candidatos à resistência do clone 14 de

Coffea canephora conilon a *Meloidogyne paranaensis*. In: Simpósio de pesquisa dos cafés do BRASIL, 9. 2015, Curitiba, PR, **Anais...** Brasília: Embrapa-café, 2015b.

LORDELLO, A.I.L.; LORDELLO, R.R.A. Identificação de raças de *Meloidogyne incognita* associada a algumas plantas. *Summa Phytopathologica*, 22: 43-45, 1996.

LORDELLO, L.G.E. Perdas causadas por nematóides. **Revista de Agricultura**, São Paulo, v.51,p.222,1976.

LOPES, R.; SALAZAR, L. *Meloidogyne arabicida* sp. n. (Nemata: Heteroderidae) nativo de Costa Rica: um nuevo y severo patógeno del cafeto. **Turrialba**, v.39, p. 313-323, 1989.

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 Mexico. **European Journal Plant Pathology**, v.141, p. 623-629, 2015.

MATA, J.S.; SERA, T.; AZEVEDO, J.A.; ALTÉIA, M.Z.; COLOMBO, L.A.; SANCHES, R.S.; PETEK, M.R.; FADELLI, S. Seleção para resistência ao nematoide *Meloidogyne paranaensis* EMN-95001: Iapar LN 94066 de "Catuaí x Icatu" em área altamente infestada. In: **Simpósio de Pesquisa dos cafés do Brasil**, 1, Poços de Caldas. Brasília: Embrapa Café, p.515-518, 2000.

MATA, J.S.; SERA, T.; ALTÉIA, M.Z.; AZEVEDO, J.A.; FADELLI, S.; PETEK, M.R.; TRILLER, C.; SERA, G.H. Resistência de genótipos de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) de São Jorge do Patrocínio ao nematoide *Meloidogyne paranaensis*. **Scientific Journal**, v.6, p. 34-36, 2002.

MATIELLO, J. B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A. W. R.; ALMEIDA, S. R.; FERNANDES, D. R. Podas. In: **Cultura de café no Brasil**: novo manual de recomendações. Rio de Janeiro: MAPA/ PROCAFÉ, 2002. p. 256-274.

MCLAIN, D.K.O.; RAI, K.S.; FRASER, J.M. Intraespecific and interspecific variation in the sequence and abundance of highly repeated DNA among Mosquitos of the *Aedes albopictus* subgroup. **Heredity**, v. 58, p.373-381, 1987.

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

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**. Cambridge: CABI North America Office, 2009. p. 1-17.

MOURA, R.M. Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v. 4, p. 209-245, 1996.

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

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

NOIR, S.; ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; COMBES, M.C. 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, A.C.B.; CAIXETA, E.T.; ZAMBOLIM, E.M.; DINIZ, L.E.C. Avanços tecnológicos em biologia molecular: marcadores de DNA no melhoramento do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Produção integrada de café**. Viçosa: UFV, v. 1, 2003, p. 247-278.

OLIVEIRA, D.S. **Patogenicidade de populações de *Meloidogyne incognita*, provenientes de Minas Gerais e São Paulo, ao cafeeiro.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006; 75f. Tese de Doutorado.

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

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.

REIS, P.R.; CUNHA, R.L. **Café arábica do plantio a colheita.** Lavras: EPAMIG, 2010. 896p. v.1.

RIBEIRO, R.C.F.; PEREIRA, A.A.; OLIVEIRA, C.F.; LIMA, R.D. Resistência de progênies de híbridos interespecíficos de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* a *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, v.29, p.11-16, 2005.

ROBERTS, P. A.; THOMASON, I. J. A review of variability in four *Meloidogyne* spp. measured by reproduction on several hosts including *Lycopersicon*. **Agricultural Zoology Reviews**, v. 3, p. 225–252, 1989.

ROBERTS, P.A.; MATTHEWS, W.C.; VEREMIS, J.C. Genetic Mechanisms of host plant resistance to nematodes. In: BARKER, K.R.; PEDERSON, G.A.; WINDHAM, G.L. (Eds.) **Plant Nematode Interactions**. Madison: American Society of Agronomy, 1998. p. 209-238.

ROBERTS, P.A. Concepts and consequences of resistance. In: STARR, J.L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (Eds.) **Plant resistance to parasitic nematodes**. Wallingford: CABI. 2002. p.23-42.

SALGADO, S.M.L.; CARNEIRO, R.M.D.G.; PINHO, R.S.C. Aspectos técnicos dos nematoides parasitas do cafeeiro. **Boletim Técnico**, n. 98. 60p, 2011.

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

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

SERA, T.; ALTÉIA, M.Z.; PETEK, M.R.; MATA, J.S. Novas cultivares para o modelo IAPAR de café adensado para o Paraná. In: **Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras**, 28. Caxambu. Rio de Janeiro: MAPA/PROCAFÉ, 2002. p.432-434.

SERA, T.; MATA, J.S.; SERA, G.; DOI, D.S.; ITO, D.S.; AZEVEDO, J.; COTARELLI, V.M. Frequência de plantas resistentes aos nematoides *Meloidogyne paranaensis* e *M. incognita* raças 2 e 1 em populações da cultivar porta-enxerto Apoatã de *Coffea canephora*. **Scientific Journal**, v.8, p. 17, 2004a.

SERA, T.; MATA, J.S.; ITO, D.S.; DOI, D.S.; SERA, G.H.; AZEVEDO, J.Á.; COTARELLI, V.M. Identificação de cafeeiros resistentes aos nematoides *Meloidogyne paranaensis* e *M. incognita* raças 2 e 1 em populações de Icatu (*Coffea arabica*). **Scientific Journal**, v.8, p. 20, 2004b.

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 *M. paranaensis* e *M. incognita* raças 2 e 1. In: **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 4., Londrina. **Anais...** Brasília: Embrapa Café, Londrina, 2005. 1 CD-ROM, 2005.

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

SILVA, J.S.; BERBERT, P.A. **Colheita, secagem e armazenagem de café**. Viçosa: UFV, 1999. 146p.

SILVA, R.V.; OLIVEIRA, R.D.L.; ZAMBOLIM, L. Primeiro Relato da Ocorrência de *Meloidogyne paranaensis* em Cafeeiro no Estado de Goiás. **Nematologia Brasileira**, v.33, p.187-190, 2008.

TAYLOR, D.T.; SASSER, J.N. **Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (*Meloidogyne* species)**. North Carolina State University and USA: A Coop. Public, 1983. 111p.

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

TRUDGILL, D.L.; BLOK, V.C. Apomitic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, p. 53-77, 2001.

VILLAIN, L.; BAUJARD, P.; ANZUETO, F., HERNANDEZ, A.; SARAH, J.L. Integrated protection of coffee plantings in Central America against nematodes. **Plante Recherche Développement** (Special issue: Research and coffee growing), p. 118-133, 2002.

VILLAIN, L. ; ANZUETO, F. ; SARAH, J.L. Resistance to root-lesion nematodes on *Coffea canephora*, In: COOK, R.; HUNT, D.J. (Eds.). Proceedings of the Fourth

International Congress of Nematology, 2002, Tenerife, Spain. **Nematology Monographs and Perspectives**, v.2, p. 289-302, 2004.

ZIJLSTRA, C. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, p. 283-290, 2000.

ZIJLSTRA, C.; DONKERS-VENNE DTHM, FARGETTE, M. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified regions (SCAR) based PCR assays. **Nematology**, v.2, p.847-53, 2000.

WEN, W.; LEON, P.E.; HAGUE, D.R. Multiple gene sites for 5S and 18 + 28S RNA on chromosomes of *Glyptotendipes barbipes* (Staeger). **The Journal of Cell Biology**, v. 62, p.132–144, 1974.

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

CAPÍTULO 1

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES SCAR ESPÉCIE-ESPECÍFICOS
PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Meloidogyne arabicida* E *M. izalcoensis***

Desenvolvimento de marcadores SCAR espécie-específicos para identificação de *Meloidogyne arabicida* E *M. izalcoensis*

RESUMO

A identificação de *Meloidogyne* spp., através de métodos convencionais tem sido difícil e pouco precisa devido a variação de caracteres morfológicos observados numa mesma espécie. De modo geral, a combinação de métodos bioquímicos e moleculares tem se mostrado eficiente na diagnose correta dos nematoides das galhas. Neste estudo foram desenvolvidos marcadores específicos do tipo SCAR para a detecção de duas espécies de nematoides economicamente importantes parasitas do cafeeiro na América Central: *Meloidogyne arabicida* e *M. izalcoensis* (Tylenchida: Meloidogynidae). Fragmentos polimórficos amplificados através de reações de PCR-RAPD foram selecionados e transformados em marcadores específicos do tipo SCAR. A amplificação dos primers desenvolvidos produziram fragmentos específicos de 300 pb e 670 pb para as espécies *M. arabicida* e *M. izalcoensis*, respectivamente, ao contrário das outras espécies associadas ao cafeeiro. A especificidade dos primers também foi validada para um único indivíduo J2, macho ou fêmea, além de populações de campo, contendo mistura de espécies. Portanto, o uso desses marcadores para estas duas espécies de nematoides, combinados aos marcadores existentes para *M. exigua*, *M. incognita*, *M. paranaensis*, *M. enterolobii* e *M. arenaria*, constituem uma ferramenta extremamente importante na diagnose molecular dos principais nematoides fitoparasitos do cafeeiro nas Américas.

Palavras-chave: identificação de *Meloidogyne* spp., marcadores moleculares SCAR, nematoides das galhas.

Development of species-specific SCAR markers for identification of *Meloidogyne arabicida* and *M. izalcoensis*

ABSTRACT

The identification of *Meloidogyne* spp. by means of conventional methods has been difficult and imprecise due to variation in morphology observed in the same species. In general, the combination of biochemical and molecular methods has proven effective in accurate diagnosis of nematodes. In this study was developed a polymerase chain reaction (PCR)-based assay for specific detection of two root-knot nematodes *Meloidogyne arabicida* and *M. izalcoensis* (Tylenchida: Meloidogynidae), major pathogens of coffee crops in Central America. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fragments specific for these two species were converted into sequence characterized amplified region (SCAR marker). PCR amplification using the SCAR primers produced a specific fragment of expected size (e.g., 300 base pairs and 670 bp) in *M. arabicida* and *M. izalcoensis*, respectively, in contrast with the other coffee-associated *Meloidogyne* spp. tested. SCAR primers also allowed successful amplification of DNA from single infective juveniles, males or females, in addition to field populations, containing a mixture of species. Thus, these results demonstrate the effectiveness of these SCAR markers and their multiplex use with those previously developed for *M. exigua*, *M. incognita*, *M. paranaensis*, *M. enterolobii* and *M. arenaria* may further contribute to specific diagnosis of the major root-knot nematodes infecting coffee in the Americas.

Keywords: identification of *Meloidogyne* spp., SCAR markers, root-knot nematode.

1. INTRODUÇÃO

Os nematoides das galhas (NGs), *Meloidogyne* spp., estão entre os patógenos mais importantes economicamente por infectarem raízes do cafeeiro (*Coffea* spp.) em vários países das Américas, incluindo o Brasil, El Salvador, Guatemala, Costa Rica, Hawaii e México (LOPEZ e SALAZAR, 1989; CAMPOS et al., 1990; CARNEIRO et al., 1996a; 2004; HERNANDEZ et al., 2004; CARNEIRO et al., 2005b, LOPEZ-LIMA et al., 2015). Das 18 espécies de *Meloidogyne* spp. que infectam o cafeeiro no mundo, sete destas espécies incluindo *M. exigua* Goeldi, *M. incognita* (Kofoid e White) Chitwood, 1949, *M. paranaensis* (CARNEIRO et al., 1996a), *M. konaensis* Eisenback, BERNARD e SMITT, 1994, *M. enterolobii* YANG e EISENBACK (1983), *M. arenaria* (Neal) Chitwood, 1949, *M. arabicida* LOPEZ e SALAZAR (1989) e *M. izalcoensis* CARNEIRO et al., 2005, foram encontradas infectando plantas de café nas Américas, reduzindo a produção com perdas econômicas significativas (CAMPOS et al., 1990; BARBOSA et al., 2004; CAMPOS e VILLAIN, 2005; VILLAIN et al., 2008). Além disso, algumas dessas espécies ainda estão restritas a certas áreas, por exemplo, *M. enterolobii* em Cuba (RODRIGUEZ et al., 1995), Costa Rica e Guatemala (HERNANDEZ et al., 2004; VILLAIN et al., 2013; LOPEZ-LIMA et al., 2015). *M. arabicida* na Costa Rica e *M. izalcoensis* em El Salvador (CARNEIRO e COFCEWICZ, 2008) e África (CARNEIRO et al., 2014). *Meloidogyne arabicida* causa severos danos à cultura do café, cujos sintomas caracterizam-se pela seca dos ponteiros e é frequentemente associada com o complexo de doenças do cafeeiro: necrose e morte de raízes (LOPEZ e SALAZAR, 1989).

Meloidogyne inornata Lordello foi detectado em café na Guatemala (CAMPOS e VILLAIN, 2005). Recentemente, esta espécie foi inoculada em cultivares suscetíveis de café (*Coffea arabica* cv. Mundo Novo e cv. Catuaí IAC 81), no entanto, não foi observada a reprodução do nematoide, indicando que o café não é um bom hospedeiro de *M. inornata*. Resultados similares foram observados para *M. javanica* (Treub) Chitwood (Carneiro, informação pessoal).

Meloidogyne konaensis (EISENBACK et al., 1995) foi descrito a partir de plantas de café no Havaí. Essa espécie apresenta quatro fenótipos de esterase (SIPES et al., 2005, CARNEIRO e COFCEWICZ, 2008) F1 (= P1, *M. paranaensis*), I1 (= *M. incognita*), F1I1 (= *M. paranaensis* + *M. incognita*) e K3 (= *M. konaensis*) (CARNEIRO et al., 2000). No entanto, apenas a população F1 (= P1) parece se

reproduzir em café (SIPES et al., 2005). Além disso, utilizando os marcadores específicos do tipo SCAR para nematoides do cafeeiro (RANDIG et al., 2002), a população F1 de *M. konaensis* foi revelada como *M. paranaensis* (RANDIG et al., 2004). Assim, a identidade de *M. konaensis* não está muito bem caracterizada, necessitando de estudos futuros para identificação dessa espécie.

Considerando a recente retirada de nematicidas químicos do mercado, o meio mais eficaz e único de controlar esses nematoides é através da utilização de cultivares resistentes. No entanto, a identificação precisa e rápida dessas espécies de nematoides é extremamente importante, não só para programas de melhoramento genético (seleção de cultivares resistentes), mas também para o estudo de variabilidade genética e biológica de populações. As espécies de *Meloidogyne* são altamente variáveis nos níveis genéticos, morfológicos e biológicos e a identificação por meio de métodos morfológicos clássicos é complexa e difícil. Além disso, em alguns casos, podem conduzir à identificações errôneas quando se utilizam os padrões perineais de fêmeas como único critério de identificação (CARNEIRO e COFCEWICZ, 2008).

Como alternativas práticas, a eletroforese de isoenzimas (Esterases) e as técnicas baseadas em PCR provaram ser confiáveis e rápidas para monitorar e caracterizar as *Meloidogyne* spp., tornando-se ferramentas confiáveis de identificação dessas espécies (ESBENSHADE e TRIANTAPHYLLOU, 1985, 1990; CARNEIRO et al., 1996b, 2000; BLOK e POWERS, 2009). O perfil de esterase é um dos métodos mais adequado para a identificação de *Meloidogyne* spp. do cafeeiro (CARNEIRO et al., 2000, 2004; HERNANDEZ et al., 2004; CARNEIRO e COFCEWICZ, 2008). No entanto, das 18 espécies de nematoides das galhas detectadas no café, apenas 12 têm seus fenótipos de esterase caracterizados (CARNEIRO e COFCEWICZ, 2008), e hoje alguns laboratórios são capazes de utilizar essa técnica de identificação, sem problemas.

Várias ferramentas de diagnóstico baseadas em PCR têm sido desenvolvidas para as espécies de *Meloidogyne* e constituem métodos rápidos, simples e confiáveis para identificação desses nematoides das galhas. A principal abordagem inclui marcadores SCAR obtidos a partir de fragmentos de DNA amplificados ao acaso (RAPD) e posterior conversão em primers espécie-específicos (ZIJLSTRA, 2000; ZIJLSTRA et al., 2000; RANDIG et al., 2002; TIGANO et al., 2010). Os marcadores do tipo SCAR têm sido desenvolvidos para diagnosticar as principais espécies de *Meloidogyne* associadas à cultura do café, incluindo *M. arenaria* (ZIJLSTRA et al.,

2000; MENG et al., 2004), *M. incognita* (RANDIG et al., 2002; MENG et al., 2004), *M. paranaensis*, *M. exigua* (RANDIG et al., 2002) e *M. enterolobii* (TIGANO et al., 2010). Estes marcadores foram validados em diversos estudos, utilizando DNA de um único juvenil (J2), ou em reações de multiplex-PCR contendo misturas de espécies, e tornaram-se um kit de diagnóstico prático e excelente na identificação de *Meloidogyne* spp. associadas ao cafeeiro (RANDIG et al., 2002, 2004; CARNEIRO et al., 2004, 2005b).

O objetivo do estudo foi desenvolver marcadores SCAR espécie-específico para o diagnóstico de dois nematoides das galhas associados ao café na América Central, *M. arabicida* e *M. izalcoensis*. Em combinação com outros marcadores SCAR descritos para outras espécies que parasitam o cafeeiro (ZIJLSTRA et al., 2000; RANDIG et al., 2002; TIGANO et al., 2010), esses dois novos marcadores podem contribuir para diagnosticar os (NGs) que parasitam o cafeeiro nas Américas e expandir o kit de marcadores SCAR disponíveis para a identificação de *Meloidogyne* spp.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Populações de nematoides

Foram utilizadas 13 populações de *Meloidogyne* spp., provenientes do Brasil (5), Costa Rica (5), El Salvador (2) e Vietnã (1) (Tabela 1). Além das duas espécies estudadas, foram incluídas cinco espécies-controles de NGs, que são frequentemente associadas com o café na América Latina. Os nematoides foram inoculados em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara) ou em cafeeiro (*Coffea arabica* cv. Mundo Novo) e mantidos em casa de vegetação por 90-180 dias. Os nematoides foram identificados através de perfis de esterase conforme Carneiro e Almeida (2001).

Tabela 1: Populações de *Meloidogyne* spp., origem geográfica e plantas hospedeiras.

Espécies	Origem Geográfica	Hospedeira
<i>M. arabicida</i>	Turrialba, Costa Rica	<i>Coffea arabica</i>
	Juan Vinas, Costa Rica - Localidade A	<i>C. arabica</i>
	Espírito Santo, Costa Rica	<i>C. arabica</i>
	Juan Vinas, Costa Rica - Localidade B	<i>C. arabica</i>
<i>M. izalcoensis</i>	El Salvador	<i>C. arabica</i>
	Vietnã	<i>Musa</i> sp.
<i>M. arenaria</i>	El Salvador	<i>C. arabica</i>
<i>M. exigua</i>	Lavras-MG, Brasil	<i>C. arabica</i>
	Bom Jesus da Itabapoara- RJ, Brasil	<i>C. arabica</i>
<i>M. incognita</i>	Londrina-PR, Brasil	<i>C. arabica</i>
	Avilândia- SP, Brasil	<i>C. arabica</i>
<i>M. enterolobii</i>	Costa Rica	<i>C. arabica</i>
<i>M. paranaensis</i>	Londrina-PR, Brasil	<i>C. arabica</i>

2.2 Extração de DNA

O DNA genômico de todas as populações foi extraído a partir de alíquotas de 200 a 300 µL de ovos, de acordo com a metodologia descrita por Randig et al. (2002). O DNA genômico também foi extraído de indivíduos incluindo fêmeas, machos e juvenis de segundo estágio (J2), utilizando um protocolo modificado descrito por Holterman et al. (2006). As massas de ovos foram retiradas manualmente de raízes infectadas e colocadas em funil de Baermann modificado para incubação. Cada J2 ou macho foi coletado e transferido para tubos de PCR de 0,2 mL contendo 25 µL de água deionizada estéril. Um volume igual do tampão de lise [0,2 M NaCl, 0,2 M Tris-HCl pH 8,1% (v / v) β-mercaptoetanol e 880 µg/mL de proteinase K] foi adicionado a cada tubo e mantido a 4°C. Fêmeas individualizadas foram coletadas manualmente sob microscópio de luz (Leica ®), utilizando agulha de injeção e transferidas para tubos de 2 mL contendo 25 µL de água estéril . Um volume igual de tampão de lise 4 °C foi adicionado a cada tubo e a fêmea foi macerada com auxílio de mini bastão de vidro. As amostras dos nematoides individuais foram incubadas em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc ®, Waltham, MA, EUA) a 65 °C, durante 2 h, seguidas de 10 min. de incubação a 95 °C e uma extensão final a 4 °C. Os DNAs lisados foram centrifugados a

2000 rpm durante 2 min. a 4 °C e diluídos para 4:1 (v / v) em água esterilizada. Posteriormente, foram armazenados em alíquotas a -20°C. Um a três microlitros dos lisados foram utilizados para as análises em PCR.

2.3 Análise de PCR-RAPD

As reações de PCR-RAPD foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 1X de tampão de reação de PCR (Phoneutria Biotecnologia & Serviços-pht[®], São Paulo, Brasil), 200 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) (Invitrogen[®], São Paulo, Brasil), 10 µM do primer (Operon Technologies, Alameda, CA, EUA), 1U de Taq DNA polimerase (pht[®]) e 6 ng de DNA genômico total. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research) com as seguintes condições: 5 min. a 94°C, 40 ciclos de 30 seg. a 94°C, 45 seg. a 36°C, 2 min. a 70°C e uma extensão final de 10 min. a 70°C (RANDIG et al., 2002). Foram utilizados na análise um total de 39 primers: OPA4, OPA7, OPA12, OPA18, OPB3, OPB4, OPB6, OPB7, OPB9, OPB11, OPB12, OPAB2, OPAB6, OPC2, OPD5, OPD13, OPF6, OPG2, OPG3, OPG4, OPG5, OPG13, OPJ10, OPJ20, OPK1, OPK9, OPK16, OPK10, OPK14, OPK20, OPM10, OPM20, OPN7, OPP1, OPP5, OPQ12, OPR3, OPR4 e OPR8. Os fragmentos amplificados foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TBE 0,5% (90 mM Tris-HCl, 89 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA), à uma corrente constante de 100 mA por cerca de 4 horas, corados com solução de brometo de etídio (0,3µg/mL) e visualizados sob luz UV.

2.4 Desenvolvimento de marcadores SCAR

As bandas de RAPD presentes apenas nas populações de *M. arabicida* e *M. izalcoensis* foram selecionadas, cortadas do gel de agarose utilizando o Wizard[®] SV Gel e PCR Clean Up System (Promega, São Paulo, Brasil), e clonadas com o Kit pGEM-T[®] Easy vector (Promega, Inc[®]), de acordo com as instruções do fabricante. Para cada fragmento clonado, o sequenciamento do inserto foi realizado em dois clones independentes pela Macrogen (Coréia do Sul). A partir de cada sequência obtida, um par de primers espécie-específico de temperatura de anelamento (T_m) elevada e maior quantidade de G + C foi estabelecido com base nas sequências de consenso, utilizando o software Primer3 v.4.0 (ROZEN e SKALETSKY, 2000) e sintetizados pela Sigma-

Aldrich. As sequências específicas dos primers SCAR com 20-24 pares de bases foram estabelecidas.

2.5 Análise dos marcadores SCAR

As reações para PCR-SCAR foram as mesmas descritas para a análise de RAPD. As amplificações foram realizadas em um termociclador PTC-100 (MJ Research) com as seguintes condições para *M. arabicida* (primers ar-A12F/R): 5 min. a 94 °C seguido de 30 ciclos de 30 seg. a 94°C, 45 seg. a 64 °C, 1 min. a 70 °C e uma extensão final de 8 min. a 70 °C. As condições para *M. izalcoensis* (primers iz-AB2F/R) foram as mesmas descritas para *M. arabicida*, exceto a temperatura de anelamento que foi de 67 °C. A especificidade dos marcadores SCAR desenvolvidos neste estudo para *M. arabicida* (ar-A12F/R) e *M. izalcoensis* (iz-AB2F/R) (Tabela 2) foram testados com quatro isolados de *M. arabicida* e dois isolados de *M. izalcoensis*, além de cinco espécies de *Meloidogyne*, normalmente associadas ao café. As condições de reação de PCR-SCAR utilizando os nematoides individuais (J2s, machos e fêmeas) foram as mesmas descritas acima nas duas espécies de nematoides, exceto o total de ciclos que foi 40 e o volume de Taq polimerase dobrado. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizados sob luz ultravioleta após coramento com solução de brometo de etídio (0,3µg/mL).

Tabela 2: Características dos marcadores moleculares SCAR desenvolvidos para as espécies de *Meloidogyne* associadas ao café.

Espécies	Primers SCAR	Sequências (5'→3')	Tamanho SCAR (pb)	Referência
<i>M. arabicida</i>	ar-A12F	TCGGCGATAGTACGTATTTAGCG	300	Este estudo
	ar-A12R	TAGTGATTTTCGGCGATAGGC		
<i>M. izalcoensis</i>	iz-AB2F	GGAAACCCCTAATTAGGATACAC	670	Este estudo
	iz-AB2R	CGCTTGATTTGAGCAGTAGG		
<i>M. exigua</i>	ex-D15F	CATCCGTGCTGTAGCTGCGAG	562	Randig et al. (2002)
	ex-D15R	CTCCGTGGGAAGAAAGACTG		
<i>M. incognita</i>	inc-K15F	GGGATGTGTAAATGCTCCTG	399	Randig et al. (2002)
	inc-k15R	CCCGCTACACCCTCAACTTC		
<i>M. paranaensis</i>	par-C09F	GCCCGA CTCCATTTGA CGGA	208	Randig et al. (2002)
	par-C09R	CCGTCCAGATCCATCGAAGTC		
<i>M. enterolobii</i>	MK7F	GATCAGAGGCGGGCGCATTGCGA	520	Tigano et al. (2010)
	MK7R	CGAACTCGCTCGAACTCGAC		

3.RESULTADOS

3.1 Caracterização das populações de *Meloidogyne* spp.

Todas as 13 populações de *Meloidogyne* spp. foram caracterizadas pelo perfil enzimático de esterase (Est) de acordo com Carneiro et al. (2004; 2005a) e Carneiro e Cofcewicz (2008). Essas espécies apresentaram fenótipos típicos de EST: *M. enterolobii* (Est M2, Rm: 0.7, 0.9), *M. paranaensis* (Est P1, Rm: 1.3), *M. incognita* (Est I1, Rm: 1.0), e *M. arenaria* (Est A2, Rm: 1.2, 1.3), *M. exigua* (Est E1, Rm: 1.5), *M. izalcoensis* (Est I4, Rm: 0.86, 0.96, 1.24, 1.30) e *M. arabicida* (Est AR2, Rm: 1.20, 1.40) (CARNEIRO e COFCEWICZ, 2008).

3.2 Análise PCR-RAPD

Foram testados 39 primers de RAPD para o polimorfismo de *M. arabicida* e *M. izalcoensis*. Destes 39, foram selecionados cinco primers candidatos (específicos por espécie) para cada uma das espécies alvo, *M. arabicida* (OPA7, OPA12, OPK10, OPK16 e OPP1) e *M. izalcoensis* (OPA7, OPB11, OPAB2, e OPK14 OPQ12), respectivamente.

3.3 Análise de marcadores SCAR específicos para *M. arabicida* e *M. izalcoensis*

Inicialmente, dos cinco primers RAPD selecionados para as duas espécies (*M. arabicida* e *M. izalcoensis*), foi selecionado um par de primers para cada espécie. Os primers ar-A12F/R e iz-AB2F/R (Tabela 2) foram novamente testados e produziram um único fragmento de aproximadamente 300 pb e 670 pb para *M. izalcoensis* e *M. arabicida*, respectivamente, ao contrário das outras espécies de *Meloidogyne* que não apresentava amplificação (Figura 1). O DNA sequenciado desses marcadores resultou nas mesmas sequências originais dos fragmentos clonados.

A especificidade e validação dos marcadores foram testadas com quatro isolados de *M. arabicida* e dois de *M. izalcoensis* e os resultados revelaram a amplificação nos tamanhos esperados (Figura 2). Esses primers também foram eficientes na amplificação de DNA de único indivíduo (J2, fêmea e macho) de ambas as espécies (Figura 3). E finalmente, o primer ar-A12F/R (específico=*M. arabicida*) foi testado em uma reação de multiplex-PCR, contendo misturas de DNA de 1:1 (v/v) (*M. arabicida* + *M. exigua*), e amplificado com sucesso no tamanho esperado para as duas espécies (Figura 4). Os

marcadores SCAR disponíveis para o diagnóstico das principais espécies de *Meloidogyne* associadas ao café na América Latina, também foi realizado o PCR-SCAR (individual ou multiplex) para *M. exigua*, *M. paranaensis*, *M. incognita* e *M. enterolobii* (Figura 4). Outras combinações de multiplex-PCR não foram realizadas, uma vez que essas misturas de nematoides não são comumente encontradas no campo.

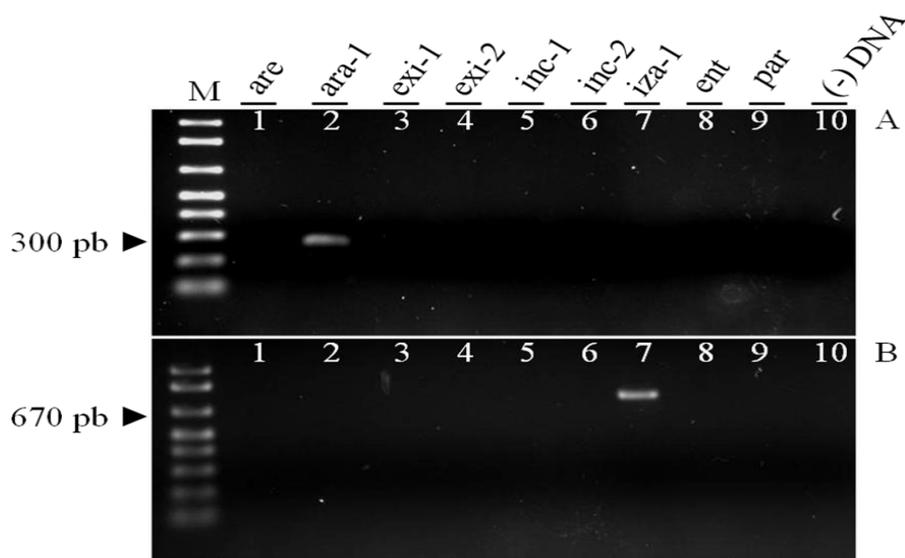


Figura 1: Padrões de amplificação de PCR em nove populações de *Meloidogyne* spp. gerados a partir dos marcadores específicos SCAR ar-A12F/R (A), e iz-AB2F/R (B), respectivamente. are: *M. arenaria*, ara-1: *M. arabicida*, exi 1 e 2: *M. exigua* (isolados virulentos e avirulentos), inc 1 e 2: *M. incognita* (raças 1 e 3), iza-1: *M. izalcoensis*, ent: *M. enterolobii* e par: *M. paranaensis*. (-) DNA: controle negativo. M: marcador 1kb DNA Plus. As amplificações foram feitas utilizando DNA purificado a partir de ovos.

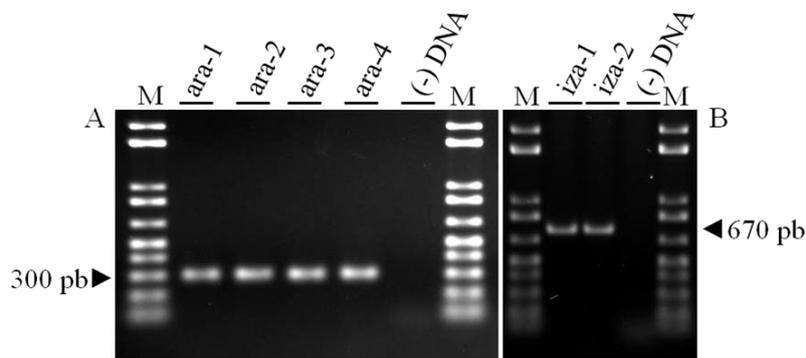


Figura 2: PCR-SCAR de isolados de *M. izalcoensis* e *M. arabicida* utilizando DNA purificado a partir de ovos. (A) *M. arabicida* (isolados 1-4) e (B) *M. izalcoensis*

(isolados 1 e 2). As espécies foram testadas com primers ar-A12F/R (*M. arabicida*) e iz-AB2F/R (*M. izalcoensis*). (-) DNA: controle negativo. M: marcador 1kb DNA Plus.

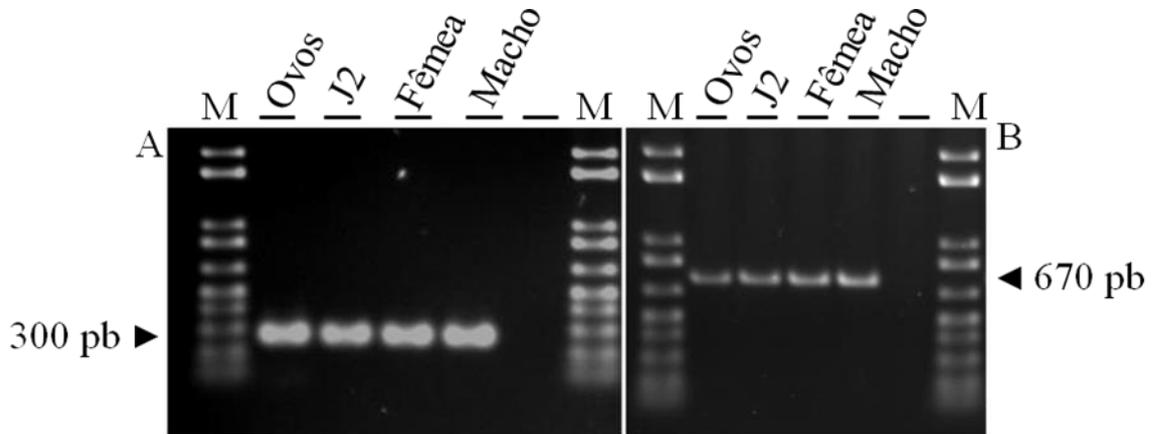


Figura 3: Padrões de amplificação de PCR em juvenil de segundo estágio, fêmea e macho. (A) *M. arabicida* (ara-1) amplificado com o par de iniciadores (ar-A12F/R) e (B) *M. izalcoensis* (iza-1) com (iz-AB2F/R). M: marcador 1kb DNA Plus. (-) DNA: controle negativo.

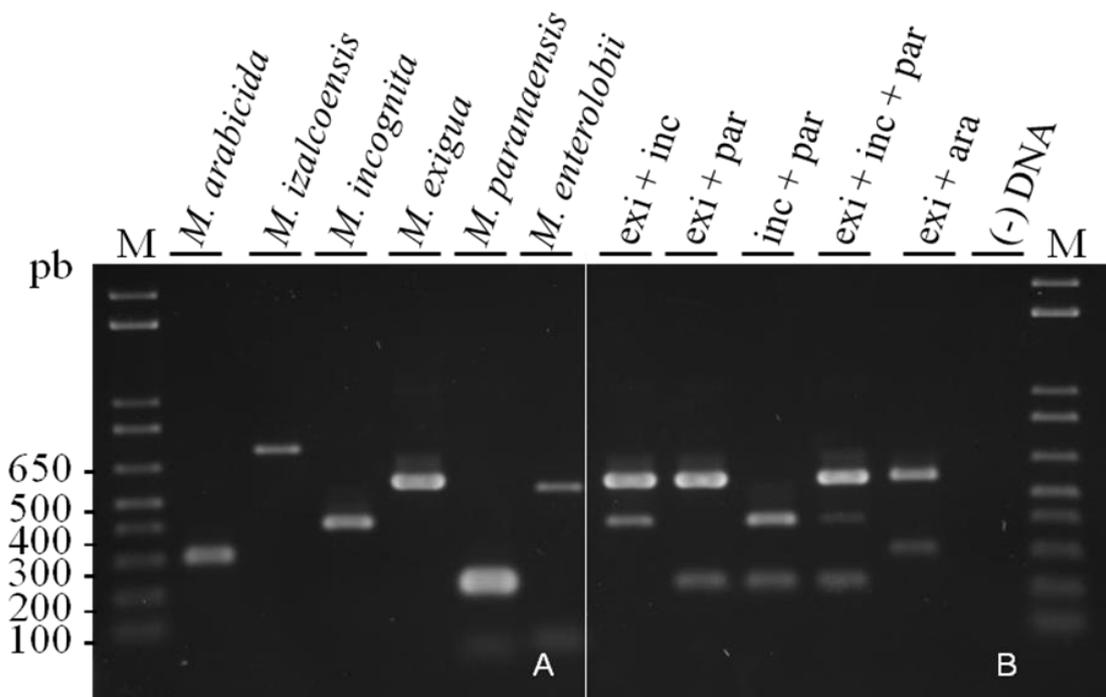


Figura 4: Padrões de amplificação de PCR-SCAR em simples (A) e multiplex (B) para as espécies de *Meloidogyne* do cafeeiro. *M. arabicida* (ara-1), *M. izalcoensis* (iza-1), *M.*

incognita (inc-1), *M. exigua* (exi-1), *M. paranaensis* (par) e *M. enterolobii* (ENT). (-) DNA: controle negativo. M: marcador 1kb DNA Plus.

4. DISCUSSÃO

O estudo desenvolveu sucessivamente dois marcadores espécie específicos do tipo SCAR para identificar duas importantes espécies de nematoides do cafeeiro, *M. arabicida* e *M. izarcoensis*. A especificidade desses marcadores foi validada em 13 populações de sete espécies de NGs associados ao café de diferentes localidades geográficas, incluindo o Brasil e a América Central. Foram também validados usando DNA de indivíduos (J2, machos e fêmeas), e de amostras de campo, que contêm misturas de espécies. Portanto, os dois novos marcadores SCAR representam mais uma ferramenta molecular na identificação de espécies de *Meloidogyne* do cafeeiro, que podem ser diagnosticadas rotineiramente por meio de técnicas moleculares, baseadas em PCR. Pesquisas de campo sobre essas duas espécies de nematoides são escassas. No entanto, a utilização de um método de identificação mais simples, baseado em PCR pode revelar a presença dessas duas espécies de nematoides em mais localidades na América Central e na África. Além disso, outras pesquisas na cultura do cafeeiro podem ser feitas nas Américas Central e do Sul para validar esses dois marcadores em condições de campo, como a pesquisa realizada por Carneiro et al. (2005b), que validou o kit SCAR (RANDIG et al., 2002) para populações brasileiras de NGs detectadas em café.

Os marcadores SCAR foram desenvolvidos também para outros NGs comuns associados com a cultura de café nas Américas, incluindo *M. arenaria* (ZIJLSTRA et al., 2000), *M. incognita* (RANDIG et al., 2002; MENG et al., 2004), *M. paranaensis*, *M. exigua* (RANDIG et al., 2002) e *M. enterolobii* (TIGANO et al., 2010). Juntamente com os marcadores SCAR desenvolvidos neste estudo, esses sete marcadores SCAR formam um excelente kit de diagnóstico que pode ser rotineiramente usado para identificar e monitorar as principais espécies de NGs do café na América Latina.

Enquanto os fenótipos isoenzimáticos de esterase são restritos à caracterização de fêmeas de espécies de *Meloidogyne* (CARNEIRO e COFCEWICZ, 2008), os métodos baseados em PCR são mais adequados para o diagnóstico de rotina. A PCR é rápida, e pode ser utilizada com um grande número de amostras, pois a detecção de espécies pode ser feita a partir de amostras de um único J2 do solo. Além disso, a

técnica não precisa da multiplicação de nematoides na planta hospedeira até atingir o estágio adulto (ESBENSHADE e TRIANTAPHYLLOU, 1985, 1990; CARNEIRO et al., 2000; CARNEIRO e ALMEIDA, 2001). No entanto, para as espécies atípicas de *Meloidogyne*, o uso de ferramentas integradas é sugerida para a identificação dessas espécies de nematoides, incluindo perfis enzimáticos, ferramentas moleculares baseadas em PCR e taxonomia morfológica (TAUTZ et al., 2003; BLOK e POWERS, 2009).

Este trabalho foi eficiente no desenvolvimento de dois marcadores SCAR para a detecção específica de *M. arabicida* e *M. izalcoensis* do cafeeiro. Estes resultados além de complementar o kit de marcadores moleculares espécie específicos desenvolvidos para o diagnóstico de rotina de *Meloidogyne* spp. do café, também contribuirá na detecção específica destas duas espécies de nematoides no país de origem e em outras regiões da América Latina, onde elas poderiam estar presentes. Desta maneira, o conhecimento da distribuição desses nematoides contribuirá para uma tomada de decisão mais eficaz em estratégias de manejo a serem adotadas. Além disso, especificamente, estes marcadores complementaram o “Kit diagnóstico café” desenvolvido por Randig et al. (2002) e disponível para identificação de *Meloidogyne* spp. que parasitam a cultura do café nas Américas.

5. CONCLUSÃO

Os marcadores SCAR espécie-específicos para a identificação de *M. arabicida* e *M. izalcoensis*, constituirão o Kit diagnóstico SCAR-café já disponível, capaz de identificar outras espécies de *Meloidogyne* ocorrentes nas Américas: *M. arenaria*, *M. exigua*, *M. paranaensis*, *M. incognita*, *M. enterolobii*.

6. REFERÊNCIAS

BARBOSA, D.H.S.G.; VIERA, H.D.; SOUZA, R.M.; VIANAAND, A.P.; SILCA, C.P. Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, v. 28, p. 49-54, 2004.

BLOK, V. C.; POWERS, O. Biochemical and molecular identification. In: PERRY, R., MOENS, M.; STARR, J.L. (Eds.). **Root knot nematodes**. Cambridge: CABI International, 2009. p. 98-118.

CAMPOS, V.P.; SIVAPALAN, P.; GNANAPRAGASAM, N.C. 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: CABI International, 1990. p. 387-430.

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

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

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; CARNEIRO, R. G. Enzyme phenotypes of Brazilian isolates of *Meloidogyne* spp. **Fundamental and Applied Nematology**, v.19, p. 555-560, 1996b.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. isolates. **Nematology**, v. 2, p. 645-654, 2000.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v. 25, p. 555-560, 2001.

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

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

CARNEIRO, R.M.D.G., RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A.; GONÇALVES, W. Identificação e caracterização de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiros nos Estados de São Paulo e Minas Gerais através dos fenótipos de esterase e SCAR-multiplex PCR. **Nematologia Brasileira**, v. 29, p.233-241, 2005b.

CARNEIRO, R.M.D.G.; COFCEWICZ, E.T. The taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. In: SOUZA, R.M. (Ed.) **Plant parasitic nematodes of coffee**. Dordrecht: Springer, 2008. p. 87-122.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; JUNIOR, A.J.; MATTOS, V.S.; CORREA, V.R.; COYNE, D. Characterization of *Meloidogyne* spp. from Uganda and Tanzania. **Annals of the 6th International Congress of Nematology**, p-178, 2014.

EISENBACK, J.D.; BERNARD, E.C.; SCHMITT, D.P. Description of the Kona coffee root-knot nematode, *Meloidogyne konaensis* n. sp. **Journal of Nematology**, v.26, p. 363-374, 1995.

ESBENSHADE, P.R.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. Identification of major *Meloidogyne* species employing enzyme phenotypes as differentiating characters. In:

SASSER, J.N.; CARTER, C.C. (Eds.) **An advanced treatise on *Meloidogyne***: biology and control. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. p. 135-140.

ESBENSHADE, P.R.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, v.22, p.10-15, 1990.

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

HOLTERMAN, M.; VAN DER WURFF, A.; VAN DEN ELSEN, S.; VAN MEGEN, H.; BONGERS, T.; HOLOVACHOV, O.; BARKKER, J.; HELDER, J. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, p. 1792-1800, 2006.

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 Mexico. **European Journal Plant Pathology**, v.141, p. 623-629, 2015.

LOPEZ, R.; SALAZAR, L. *Meloidogyne arabicida* sp. n. (Nemata: Heteroderidae) nativo de Costa Rica: um nuevo y severo patógeno del cafeto. **Turrialba**, v. 39, p. 313-323, 1989.

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

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

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.

RODRIGUEZ, M.G.; RODRIGUEZ, I.; SANCHEZ, L. Especies del genero *Meloidogyne* que parasitan el cafeto en Cuba: distribucion geografica y sintomatologia. **Revista de Proteccion Vegetal**, v.10, p.123-128, 1995.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Eds.) **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. Totowa: Humana Press, 2000. p.365-386.

SIPES, B.S.; SCHMITT, D. P.; Xu, K.; SERRACIN, M. Esterase polymorphism in *Meloidogyne konaensis*. **Journal of Nematology**, v. 37, p. 438-443, 2005.

TAUTZ, D.; ARCTANDER, P.; MINELLI, A.; THOMAS, R. H.; VOGLER, A.P.A plea for DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, p. 70-74, 2003.

TIGANO, M.S.; SIQUEIRA, K.; CASTAGNONE-SERENO, P.; MULET, K.; QUEIROZ, P.; SANTOS, M.; SILVA, J.; CARNEIRO, R. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* and development for SCAR marker for this guava-damaging species. **Plant Pathology**, v. 59, p. 1054-1061, 2010.

VILLAIN, L.; HERNANDEZ, A.; ANZUETO, F. Central America. In: SOUZA, R.M. (Ed.) **Plant parasitic nematodes of coffee**. Dordrecht: Springer, 2008. p. 261-275.

VILLAIN, L.; SARAH, J.L.; HERNANDEZ, A.; BERTRAND, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P. Diversity of root-knot nematodes parasitizing coffee in Central America. **Nematropica**, v. 43, p. 194-206, 2013.

YANG, B.; EISENBACK, J. D. *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing pacara earpod tree in China. **Journal of Nematology**, v. 15, p. 381-391, 1983.

ZIJLSTRA, C. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, p. 283-290, 2000.

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

CAPÍTULO 2

**VARIABILIDADE GENÉTICA E AGRESSIVIDADE DE
POPULAÇÕES DE *Meloidogyne paranaensis* A GENÓTIPOS
RESISTENTES DE CAFEIRO**

Variabilidade genética e agressividade de populações de *Meloidogyne paranaensis* a genótipos resistentes de cafeeiro

RESUMO

Meloidogyne paranaensis é uma das espécies de nematoides das galhas mais destrutivas para o cafeeiro. Os objetivos desse estudo foram avaliar a variabilidade genética e a agressividade de sete populações de *M. paranaensis* em *Coffea* spp., com genes de resistência a *Meloidogyne* spp. Todas as populações foram identificadas pela caracterização bioquímica e molecular. Os estudos filogenéticos mostraram que apesar da existência de três fenótipos de esterase (Est P1, P2 e P2a), uma baixa variabilidade genética foi observada, até mesmo em regiões distintas do DNA. A análise molecular mostrou que existe uma divergência genética na população de perfil P2a da Guatemala em relação às populações do Brasil (Est P1 e P2). Essa população nos estudos de patogenicidade a cultivares suscetíveis de *C. arabica* mostrou-se uma das mais agressivas. Nos estudos de agressividade/virulência de *M. paranaensis* em *Coffea* spp. foram realizados dois ensaios. No primeiro, foram usadas duas cultivares, *C. arabica* (cv. Catuaí IAC 81) e *C. canephora* (cv. Clone 14), e foi confirmada a alta suscetibilidade da cv. Catuaí IAC 81 com FR > 30 e alta resistência da variedade clonal “Clone 14” com FR < 0.2, em relação a diferentes populações de *M. paranaensis*. Ou seja, nenhuma população foi virulenta ao ‘Clone 14’ e as populações Par 3 da Guatemala, Par 5 Piumbí-MG e Par 4 Rolândia- PR foram as mais agressivas ao ‘Catuaí IAC 81’. No segundo ensaio foram testados quatro padrões de resistência em relação a sete populações de *M. paranaensis*: Catuaí Vermelho (CV) x Amphillo MR2161 (E₁ 16-5 III) (*C. arabica*), porta enxerto Apatã IAC 2258 (*C. canephora*), Híbrido do Timor UFV 408-01 (E₁ 6-6 II) e cv. IPR 100 (*C. arabica*), contrastando com o padrão de suscetibilidade ‘Mundo Novo 379-19’. Quanto à agressividade a cultivar Mundo Novo, as populações Par 2 Herculândia-SP, Par 3 Guatemala e Par 5 Piumbí-MG foram as mais agressivas. Nenhuma população de *M. paranaensis* foi virulenta às quatro cultivares resistentes: Apatã IAC 2258, CV x Amphillo MR2161 (E₁ 16-5 III), IPR 100 e Híbrido do Timor UFV 408-01 (E₁ 6-6 II), apresentando uma segregação de 15%, 0%, 26% e 31%, respectivamente. Esses resultados são promissores, pois validam a resistência de diferentes fontes genéticas de *Coffea* spp., mostrando que elas são

promissoras para incorporação desses genes em cultivares comerciais melhorados ou utilização como porta enxertos, como é caso do ‘Apoatã’ e ‘Clone 14’.

Palavras-chaves: *Coffea* spp., marcadores moleculares, *Meloidogyne* spp., nematoides das galhas, resistência.

Genetic variability and aggressiveness of *Meloidogyne paranaensis* populations to resistant coffee genotypes (*Coffea* spp.)

ABSTRACT

Meloidogyne paranaensis is one of the most destructive root-knot nematode species on coffee. The objectives of this study were to assess the genetic variability and aggressiveness of seven *M. paranaensis* populations in *Coffea* spp., which harbors resistance genes to *Meloidogyne* spp. All populations were identified by biochemical and molecular characterization. Phylogenetic studies have shown that despite the existence of three esterase phenotypes (Est P1, P2, P2a), a low genetic variability was observed, even in different DNA regions. Molecular analysis showed that there is a genetic difference between population P2a from Guatemala compared to other *M. paranaensis* populations from Brazil containing Est P1 and P2 profiles. In addition, population P2a was the most aggressive in pathogenicity assays with susceptible *C. arabica* cultivars. Two assays were carried out to study the aggressiveness/virulence among *M. paranaensis* populations against *Coffea* genotypes. In the first assay using different *M. paranaensis* populations against *C. arabica* cultivars (cv. Catuaí IAC 81) and *C. canephora* (cv. Clone 14), a high susceptibility pattern of cv. Catuaí IAC 81 was confirmed with RF > 30 as well as a high resistance phenotype for the clonal variety "clone 14" with RF < 0.2 was observed. None of the populations was virulent to the resistant *Coffea* genotype 'Clone 14' and populations Par 3 Guatemala, Par 5 Piumbí-MG and Par 4 Rolândia-PR were the most aggressive against the susceptible control Catuaí IAC 81. In the second assay, four resistant genotypes were tested against seven *M. paranaensis* populations: Catuaí Vermelho x Amphillo MR2161 (E1 16-5 III), *C. canephora* rootstock Apatã IAC 2258, Timor Hybrid UFV 408-01 (E1 6-6 II), IPR 100 (*C. arabica*) and the susceptible control *C. arabica* cv. Mundo Novo 379-19. Populations Par 2 Herculândia-SP, Par 3 Guatemala and Par 5 Piumbí-MG were the most aggressive against cultivar Mundo Novo 379-19. Not a single *M. paranaensis* population was virulent to all four resistant cultivars: Apatã IAC 2258, Catuaí Vermelho x Amphillo MR2161 (E1 16-5 III), IPR 100 and Timor Hybrid UFV 408-01 (E1 6-6 II), exhibiting segregation rates of 15%, 0%, 26% and 31%, respectively. These are promising results due to the validation of resistance from different genetic sources

in *Coffea* spp. against *M. paranaensis* which can be used in breeding programs or as rootstocks such as 'Apoatã' and 'Clone 14'.

Keywords: *Coffea* spp., molecular markers, *Meloidodyne* spp., root-knot nematodes, resistance.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os inúmeros problemas fitossanitários que acometem a cafeicultura, os nematoides das galhas (NGs) representam séria ameaça em regiões produtoras de café no mundo (CAMPOS e VILLAIN, 2005). A espécie *Meloidogyne paranaensis*, destaca-se entre as demais *Meloidogyne* spp. devido à agressividade de seu parasitismo, com severa destruição do sistema radicular, que não envolve diretamente a formação de galhas típicas, característica do gênero, e sim engrossamentos 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). Quadro irreversível que não permite a recuperação das plantas mesmo com a redução da população de nematoides no solo após o emprego de medidas de controle (GONÇALVES e SILVAROLLA, 2001; CAMPOS e VILLAIN, 2005).

A maioria das medidas de controle e manejo dos NGs não apresenta 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 todo ano (GONÇALVES e SILVAROLLA, 2001), pela ineficácia do uso de nematicidas, pela inviabilidade prática de algumas táticas de manejo como a rotação de culturas (CAMPOS e VILLAIN, 2005), e a alta suscetibilidade das cultivares de *Coffea arabica* L. a essa espécie, constituem fatores limitantes tanto na implantação de cafezais novos em áreas infestadas, quanto na manutenção dos cafezais já contaminados (GONÇALVES e SILVAROLLA, 2001).

A resistência genética é considerada a forma mais eficiente de controle dos nematoides parasitos do cafeeiro (BERTRAND e ANTHONY, 2008) por tratar-se de uma tecnologia econômica e ambientalmente segura; além disso, possibilita a manutenção de populações do nematoide abaixo do nível econômico (GONÇALVES e SILVAROLLA, 2001).

Fontes de resistência a *M. paranaensis* foram identificadas na espécie diploide de *C. canephora* (BERTRAND et al., 2000) e em cafeeiros silvestres de *C. arabica* da Etiópia (ANZUETO et al., 2001; BOISSEAU et al., 2009). Com exceção da cultivar IPR 100 originária do cruzamento realizado entre cafeeiro do germoplasma Catuaí e cafeeiro (“Catuaí” x genótipo de café da série ‘BA-10’) portador de genes de *C. liberica* (SERA et al., 2007), todas as cultivares comerciais de *C. arabica* são altamente

suscetíveis a *M. paranaensis*. Portanto, o cultivo de *C. arabica* só tem sido possível devido à utilização de mudas enxertadas em cafeeiro de *C. canephora* resistentes. A utilização de cultivares porta-enxerto Apatã IAC 2258 no Brasil e Nemaya, na América Central tem permitido a sobrevivência e competitividade da cafeicultura em regiões infestadas por *Meloidogyne* (CAMPOS e VILLAIN, 2005).

A variação fisiológica entre espécies ou populações de NGs pode ser expressa na interação planta-nematoide em três níveis: hospedabilidade ou não, agressividade e virulência (HUSSEY e JANSSEN, 2002). A agressividade reflete a capacidade de reprodução, tal como medida pelo fator de reprodução (FR), de nematoides em um hospedeiro suscetível (ROBERTS, 2002). A virulência é a capacidade do patógeno se reproduzir em uma hospedeira resistente. Nesta situação, há interação de genes de virulência do nematoide com genes de resistência da hospedeira (HUSSEY e JANSSEN, 2002; ROBERTS, 2002).

A existência de diversidade fisiológica (CARNEIRO e COFCEWICZ, 2008) e variabilidade intraespecífica nas populações de *Meloidogyne* spp. em genótipos de *Coffea* spp. dificultam a seleção de fontes de resistência, uma vez que diferentes espécies, raças e biótipos de nematoides podem ocorrer em mistura no solo, conforme a região (RIBEIRO et al., 2005).

Estudos aprofundados são necessários para a identificação e aproveitamento das fontes de resistência aos NGs, devido à complexidade encontrada nas populações de *Meloidogyne* spp. (STARR et al., 2002). Por essas razões, o desenvolvimento de técnicas moleculares abriu novas perspectivas quanto aos estudos de diversidade genética dos NGs. A partir de análises moleculares, tem se obtido resultados significativos para os estudos genéticos das populações de *Meloidogyne* spp. (CARNEIRO et al., 2004; MUNIZ et al., 2008; SANTOS, et al., 2012; CORREA et al., 2014; SILVA et al., 2014) e na identificação de espécies (RANDIG et al., 2002; CORREA et al., 2013, 2014), fatores cruciais na busca por fontes de resistência durável a esses nematoides.

Com base em análises de marcadores moleculares (RAPD e AFLP), uma baixa variabilidade intraespecífica de populações de *M. paranaensis* foi detectada, sendo os resultados congruentes com os fenótipos isoenzimáticos descritos para a espécie (CARNEIRO et al., 2004); no entanto, até o momento poucas populações foram avaliadas, sobretudo as com diferentes padrões de esterase. Além disso, não há relatos

de estudos da diversidade genética das espécies de *Meloidogyne* em regiões distintas do DNA ribossomal (LANDA et al., 2008). As análises do rDNA permitem resolver processos evolutivos em níveis profundos de divergência, sendo mais apropriados os espaçadores transcritos (ITS) dos genes 5,8S e 18S rRNA e as regiões mais conservadas das sequências do gene 28S (HILLIS et al., 1996).

Em cafezais, em diferentes regiões do estado de São Paulo foi observada uma grande diferença nas características das plantas de cafeeiros infectadas por *M. paranaensis*, levando a hipótese de que existia uma certa variabilidade na agressividade, observada com base no estado depauperado das plantas parasitadas por diferentes populações dessa espécie (Gonçalves, W. informação pessoal). Além disso, não há estudos prévios acerca da agressividade/virulência de diferentes populações de *M. paranaensis*, correlacionado esses parâmetros com a diversidade genética dentro dessa espécie.

Dessa maneira, objetivou-se estudar a variabilidade genética intraespecífica e filogenia de populações de *M. paranaensis*, provenientes de diferentes regiões geográficas, com marcadores moleculares do tipo (RAPD e AFLP) e marcadores de regiões distintas do rDNA (D2D3 e ITS); objetivou-se também, avaliar a agressividade ou virulência das mesmas populações de *M. paranaensis*, em genótipos de *Coffea* spp. já previamente estudados, quanto à resistência e suscetibilidade ao nematoide das galhas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Identificação das populações de *Meloidogyne* spp.

Foram utilizadas no estudo sete populações de *M. paranaensis* provenientes de diferentes regiões geográficas (Tabela 1). *Meloidogyne enterolobii* foi empregado como outgroup nas análises de variabilidade genética e *Pratylenchus neglectus* nas análises filogenéticas.

Todas as populações foram previamente identificadas pela caracterização enzimática de acordo com a metodologia descrita por Carneiro e Almeida (2001) e marcadores moleculares do tipo SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) segundo Randig et al. (2002) (Tabela 2).

As populações de *M. paranaensis* foram multiplicadas em tomateiro (*Solanum lycopersicum*, grupo Santa Cruz cv. Santa Clara) e cafeeiro (*C. arabica* cv. Mundo novo) em casa de vegetação, com controle de temperatura e umidade, por um período de 90 a 180 dias para a produção dos inóculos. Posteriormente, foram extraídos os ovos segundo o protocolo descrito por Hussey e Barker (1973) modificado por Bonetti e Ferraz (1987), para a instalação dos experimentos com os diferentes genótipos de *Coffea* spp. e para as análises moleculares segundo protocolo de Carneiro et al. (2004).

O descarte dos resíduos de raízes e solos infectados foi colocado em sacos de polipropileno para posterior esterilização à vapor em caldeira à temperatura de 90 a 92 °C por 3 horas.

Tabela 1: Código, origem geográfica, hospedeira e perfil enzimático das populações de *Meloidogyne* spp.

Tratamento ^a	Espécie	Origem geográfica	Hospedeira	Perfil enzimático (Esterase)
Par 1	<i>M. paranaensis</i>	Londrina- PR, Brasil	<i>Coffea arabica</i>	P2
Par 2		Herculândia-SP, Brasil	<i>C. arabica</i>	P2
Par 3		Guatemala	<i>C. arabica</i>	P2a
Par 4		Rolândia-PR, Brasil	<i>C. arabica</i>	P1
Par 5		Piumbí-MG, Brasil	<i>C. arabica</i>	P1
Par 6		São Paulo-SP, Brasil	<i>C. arabica</i>	P1
Par 7		Franca-SP, Brasil	<i>C. arabica</i>	P1
Ent 1	<i>M. enterolobii</i>	Petrolina-PE, Brasil	<i>Psidium guajava</i>	E4

^a Populações de *Meloidogyne* spp. utilizadas nas análises de diversidade genética e fisiológica em genótipos de *Coffea* sp.

2.2 Extração de juvenis de segundo estágio (J2) e ovos para análises moleculares

A extração de juvenis de segundo estágio (J2) foi realizada a partir de massas de ovos coletadas individualmente de raízes infestadas, e posteriormente colocadas em

funil de Baermann modificado para eclosão dos juvenis, segundo a metodologia descrita por Whitehead e Hemming (1965).

Para a extração de ovos foi realizada a metodologia descrita por Carneiro et al. (2004). As raízes foram lavadas cuidadosamente, cortadas em pequenos segmentos e trituradas em liquidificador com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,25% por 30 segundos. Em seguida, passadas por um conjunto de peneiras sobrepostas (20-100-500 mesh). Os resíduos das raízes e os ovos do nematoide coletados na peneira de 500 mesh foram lavados com água corrente para eliminar todo resíduo de NaOCl. A suspensão de ovos foi distribuída em tubos de 15 mL, adicionando-se caulim em cada tubo e homogeneizando-se a suspensão. Após a centrifugação dos ovos a 2000 rpm por cinco minutos, o sobrenadante foi eliminado. O volume dos tubos foi completado com solução de sacarose 30% a 4 °C e centrifugado a 2000 rpm por dois minutos. Em seguida, o sobrenadante foi vertido em uma peneira de 500 mesh e lavado com água destilada. Os ovos foram colocados em tubos de 15 mL, completando-se o volume com água estéril e centrifugados a 2000 rpm por três minutos. O sobrenadante foi vertido cuidadosamente e, com o auxílio de uma micropipeta, o pellet transferido para tubos “eppendorf” de 1,5 mL, calculando-se para um volume final de 200 a 300 µl de ovos/tubo. Sendo efetuada outra centrifugação a 10.000 rpm g por dois minutos para eliminar a água. Com o auxílio de uma micropipeta foi retirado o sobrenadante antes da armazenagem dos ovos a – 80 °C, para serem submetidos à extração de DNA.

2.3 Extração de DNA de juvenis de segundo estágio (J2) e ovos para análises moleculares

Para a extração do DNA genômico das populações de *M. paranaensis* a partir de juvenis (J2) foi utilizado o Kit de extração Quick-gDNATM e para alíquotas de 200 a 300 µL de ovos seguiu-se o método descrito por Randig et al. (2002).

Os ovos previamente extraídos e armazenados a -80 °C foram macerados em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido e recuperado em tubo “eppendorf” de 2 mL, ao qual adicionou-se 500 µL de tampão NIB (0,1 M NaCl; 30 mM Tris pH 8; 10 mM EDTA; 0,7 mM β mercaptoetanol; 5 mM Triton - NPHO). Efetuada a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm, por dois minutos e eliminado o sobrenadante. Esta operação de lavagem foi efetuada duas vezes. Em seguida acrescentados 800 µL de tampão de homogeneização (0,1 M NaCl; 0,2 M

sacarose; 10 mM EDTA) e 200 µL do tampão de lise (0,125 M EDTA; 0,5 M Tris pH 9,2; 2,3% SDS). Após homogeneização, as amostras foram incubadas a 55 °C por 30 minutos, seguido de 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionados 1 V de fenol, seguindo-se a homogeneização, centrifugação a 13.000 rpm por três minutos. O sobrenadante foi recuperado e depois misturado à ½ V de fenol + ½ V de clorofórmio, centrifugado a 13.000 rpm por três minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 200 µL de éter. Após centrifugação a 13.000 rpm por três minutos, o éter foi eliminado com auxílio de uma micropipeta.

Para precipitação do DNA, 2 V de etanol 100% foram adicionados ao sobrenadante, efetuando-se a homogeneização. O DNA foi recuperado com auxílio de uma pipeta Pasteur esterilizada de ponta fechada. Em seguida, o DNA recuperado foi lavado com etanol 70%, efetuando-se outra centrifugação a 13.000 rpm por cinco minutos. Após a eliminação do etanol 70%, o precipitado foi seco à temperatura ambiente, recuperado em 20 µL de água esterilizada e armazenado a -20 °C.

2.4 Identificação molecular: marcador PCR-SCAR multiplex

Os isolados de *M. paranaensis* foram testados com três pares de primers espécie-específicos do tipo SCAR descritos para a identificação das três principais espécies de nematoides que parasitam o café, *M. paranaensis* (par C09 F/R), *M. incognita* (inc K 14F/R) e *M. exigua* (ex D15 F/R), segundo a metodologia descrita por Randig et al. (2002) (Tabela 2), a fim de validar esses marcadores moleculares e confirmar a identificação dos isolados. A reação de PCR foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 5 µL de DNA lisado total, 1 µL de cada conjunto de primer (10µM), 4 µL dNTPs (Invitrogen), 2,5 µL de tampão 10X + MgCl₂ (Phoneutria Biotecnologia e Serviços-pht), 0,4 µL da enzima Taq DNA polimerase (pht) e 7,1 µL de água Milli-Q. Na amplificação foi utilizado um termociclador PTC-100 (MJ Research) programado de acordo com as condições descritas para o conjunto de três primers: desnaturação inicial do DNA por 10 min. a 94 °C, 30 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 45 seg. a 62 °C, 1 min. a 70°C e extensão final de 8 min. a 70 °C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídio a 0,3 µg/mL⁻¹.

Tabela 2: Características de marcadores SCAR espécie-específicos para *Meloidogyne paranaensis* (parC09F/R), *M. incognita* (incK14F/R) e *M. exigua* (exD15F/R) (RANDIG et al., 2002).

Primer SCAR	Sequência (5' → 3')	Fragmento amplificado (pb)
par-C09F	F GCC CGA CTC CAT TTG ACG GA	208
par-C09R	CCG TCC AGA TCC ATC GAA GTC	
inc-K14F	GGG ATG TGT AAA TGC TCC TG	399
inc-K14R	CCC GCT ACA CCC TCA ACT TC	
ex-D15F	CAT CCG TGC TGT AGC TGC GAG	562
ex-D15R	CTC CGT GGG AAG AAA GAC TG	

2.5 Análise com marcadores PCR-RAPD

Amostras de DNA de cada população foram amplificadas pela técnica de RAPD conforme Randig et al. (2002). As reações de amplificação foram feitas em um volume final de 13 µL, contendo: 3 µL de DNA total [3 ng/µL]; 0,4 µL do primer [10 µM]; 2 µL de dNTP [1,25 mM]; 1,3 µL Tampão 10X pht com MgCl₂; 0,2 µL da enzima Taq DNA polimerase (5U/µL) e 6,1 µL de água Milli-Q. Em cada reação foi adicionado uma gota de óleo mineral. As amplificações foram realizadas em termociclador (PTC-100, MJ Research) programado nas seguintes condições: 5 min. a 94 °C, 40 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 45 seg. a 36 °C, 2 min. a 70 °C, e uma extensão final de 10 min. a 70°C. Foi utilizado na análise um total de 30 primers: OPA4, OPA10, OPA12, OPA14, OPAB03, OPAB04, OPAQ12, OPAS08, OPB6, OPB12, OPD13, OPE15, OPE18, OPG4, OPG5, OPG13, OPH01, OPK1, OPK16, OPK19, OPK20, OPL08, OPM10, OPM20, OPN7,

OPP1, OPP5, OPR4, OPR7 e OPR8. A seleção dos primers de RAPD para este estudo foi baseada em trabalhos anteriores de variabilidade genética de espécies de *Meloidogyne* (TIGANO et al., 2010; SANTOS, 2012).

Os fragmentos amplificados foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5% (90 mM Tris-básico, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,3) a uma corrente constante de 100 mA por aproximadamente 3 horas e corado com brometo de etídio (0,2 µg/mL) e visualizados sob luz UV.

2.6 Análise com o marcador PCR-AFLP

A metodologia consiste em quatro etapas de acordo com o protocolo descrito por Suazo e Hall (1999). Na primeira etapa o DNA genômico extraído dos ovos foi clivado por duas enzimas de restrição (EcoRI e MseI). Na segunda etapa, adaptadores específicos foram ligados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem das enzimas. Os adaptadores EcoRI (upper e lower) foram aquecidos a 95°C durante 5 min no termociclador (PTC-100, MJ Research), e em seguida mantidos à temperatura ambiente durante cerca de 10 min.

A reação de ligação/digestão dos adaptadores ao DNA consistiu num volume final de 20 µL, contendo: 2 µL de Tampão da T4 DNA Ligase 10X, 2 µL de NaCl 0,5M, 0,5 µL de BSA, 2 µL de adaptadores EcoRI (25 µM), 0,5µL de cada enzima EcoRI (12 U/µL), 1µL T4 DNA Ligase (1 U/µL), 2 µL de água Milli-Q, 10 µL de DNA (100 ng/µL). Essa reação foi incubada a 37°C “overnight”. A partir de cada reação retirou se 5 µL para corrida em gel de agarose 1,5% a fim de se conferir o sucesso da digestão.

Após a verificação da digestão de cada amostra, o restante da reação (15 µL) foi diluído a um volume final de 150 µL para a realização das reações de PCR. Do total de 150 µL, foi utilizado 1µL do DNA digerido para cada reação. A reação de PCR com DNA digerido e ligado com adaptadores foi realizada em volume final de 25 µL, contendo: 1 µL de DNA total, 2,5 µL de tampão 10X, 1 µL de MgCl₂ [50mM], 1 µL do primer [10 µM], 0,5 µL dNTP [10 mM], 0,7 µL da enzima Taq DNA polimerase (5 U/µL), 18,3 µL de água Milli-Q e cada reação foi coberta com óleo mineral para evitar evaporação. O termociclador (PTC-100, MJ Research) foi programado para as seguintes condições: 1 min. a 95 °C; 37 ciclos de 1min. a 94 °C, 1 min. a 56 °C e 2 min. e 30 seg. a 72 °C; e um ciclo de extensão final de 5 min. a 72 °C. Foi utilizado na análise um total

de 13 primers: AFLP02, AFLP06, AFLP08, AFLP09, AFLP12, AFLP13, AFLP15, AFLP16, AFLP17, AFLP18, AFLP23, AFLP25 e AFLP30. A seleção dos primers AFLP foi baseada em trabalhos anteriores de variabilidade genética realizado com populações de *Meloidogyne* spp. (MATTOS, 2010; TIGANO et al., 2010).

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de alta resolução 1,5% agarose-synergel, sendo 0,7% agarose e 0,4% Synergel (Diversified Biotech Synergel™), a uma corrente constante de 100 mA por aproximadamente 3 horas. Para visualização, os géis foram corados com brometo de etídio (0,2 µg/mL) e visualizados sob luz UV.

2.7 Análise filogenética com marcadores moleculares RAPD e AFLP

Os fragmentos revelados dos dois marcadores moleculares RAPD e AFLP foram registrados como presentes ou ausentes. Para cada isolado, duas reações de PCR independentes foram corridas no mesmo gel, e apenas os fragmentos presentes em ambas repetições foram considerados. Os fragmentos de DNA então considerados presentes (1) ou ausentes (0) foram convertidos em uma matriz binária. Foi realizada uma análise de distância (Neighbour- joining) combinada de resultados de AFLP e RAPD com 1000 repetições de bootstrap para testar a significância do dendrograma obtido (FELSENSTEIN, 1985). Utilizou-se o método filogenético UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). A análise de UPGMA foi realizada utilizando o programa PAUP* v 4.0 (SWOFFORD, 2002).

2.8 Análise filogenética com marcadores moleculares D2D3 e ITS

Nas análises filogenéticas de regiões específicas do rDNA foram amplificadas a região ITS1-ITS2 entre o gene 5.8S (conjunto de primers: Forward 5-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3 e Reverse 5-TCCTCCGCTAAATGATATG-3 (SCHMITZ et al., 1998) e a expansão do fragmento D2D3 do gene 28S (conjunto de primer: Forward 5-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3 e Reverse 5-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3 (DE LEY et al., 1999) utilizando as condições de PCR descritas por SUBBOTIN et al. (2000). Os produtos de PCR foram cortados do gel de agarose utilizando o Wizard®SV Gel/PCR Clean Up Sistema (Promega, Inc®) e clonados com o Kit pGEM-T® Easy vector (Promega, Inc®), seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento do inserto foi realizado em dois clones independentes

pela MacroGen. As sequências de DNA de *M. paranaensis* foram alinhadas com outras sequências de *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus neglectus* (KP995311.1); *Meloidogyne incongnita* (Est S2) Garça, SP; *M. incognita* (Est I1) Londrina, PR e *M. incognita* (Est I2) Londrina, PR; *M. exigua* (Est E1) Lavras, MG e *M. exigua* (Est E2) Canãa, MG; obtidos a partir do banco de dados do NCBI usando ClustalX versão 1.83 com parâmetros padrão (THOMPSON et al., 1997), e a árvore filogenética foi gerada usando o UPGMA e o programa PAUP v 4.0 (SWOFFORD, 2002).

2.9 Análise da reação de hospedeiras diferenciadoras

A identificação da reação de hospedeiros diferenciadores das populações de *M. paranaensis* foi realizada conforme o teste proposto pela Universidade da Carolina do Norte com plantas hospedeiras diferenciadoras, de diferentes famílias botânicas: algodão, fumo, pimentão, melancia, amendoim e tomate (HARTMAN e SASSER, 1985).

Plântulas de cada espécie hospedeira foram transplantadas para vasos com capacidade de 3L, contendo uma mistura de solo e areia na proporção 2:1 e composto Bioplant, autoclavados a 120° C. A suspensão de ovos de cada população de *Meloidogyne* sp. foi obtida conforme a metodologia de Boneti e Ferraz (1987). Raízes infectadas foram lavadas cuidadosamente em água corrente para retirar partículas de solo aderidas, picadas em pedaços de aproximadamente 1 a 2 cm e trituradas em liquidificador com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,5% por 30 segundos. A suspensão de ovos e raízes foi vertida em peneiras sobrepostas de (20, 100 e 500 mesh) ficando os ovos retidos nesta última. A quantificação dos ovos foi feita em câmara de Peters, e a suspensão calibrada para 1.000 ovos/mL em microscópio de luz.

Cada plântula foi inoculada com 10.000 ovos de três populações de *M. paranaensis* (Par 1, 3 e 7) e para cada espécie vegetal diferenciadora foram utilizadas 3 repetições distribuídas ao acaso. Noventa dias após a inoculação, as raízes das diferentes espécies foram lavadas e coradas com Floxina B a 0.0015% (15 mg/ litro de água), durante 15-20 minutos, e o número de galhas e massas de ovos quantificados por sistema radicular; foram caracterizadas plantas diferenciadoras hospedeiras ou não, conforme a escala proposta por Taylor e Sasser (1978).

Foram consideradas hospedeiras suscetíveis as plantas que apresentaram índices de notas maiores do que 2 (mais de 11 galhas ou massas de ovos) e fator de reprodução

maior que 1 ($FR > 1$), e resistentes aquelas que apresentaram índices de notas ≤ 2 (0-10 número de galhas ou massa de ovos) e fator de reprodução menor que 1 ($FR < 1$) (TAYLOR e SASSER, 1978).

2.10 Avaliação da resistência de genótipos de *Coffea* spp. à populações de *M. paranaensis*

O experimento foi realizado em delineamento de blocos ao acaso. Foram estudadas as reações de sete genótipos de *Coffea* spp. em relação a sete populações de *M. paranaensis*, com seis a oito repetições. O estudo foi dividido em dois ensaios (Tabela 3), totalizando 49 tratamentos. No ensaio 1, onde foram avaliadas duas cultivares, cv. Catuai IAC 81 (*C. arabica*) e cv. Clone 14 (*C. canephora*). No ensaio 2, foram avaliados cinco genótipos: Catuai Vermelho x Amphillo MR2161 (E1 16-5 III) (*C. arabica*), Apatã IAC 2258 (*C. canephora*) e Híbrido do Timor UFV 408-01 (E1 6-6 II), e outras duas cultivares de *C. arabica*: IPR 100 e cv. Mundo Novo 379-19, sendo esta última utilizada como padrão de suscetibilidade. Os diferentes genótipos de *Coffea* spp. foram fornecidos pelo INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural), EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) e IAC (Instituto Agrônomo de Campinas). Plântulas de 15-30 cm de comprimento foram transferidas para vasos de 3L, contendo uma mistura esterilizada de substrato comercial Bioplant® e areia (1:1) e mantidos em casa de vegetação. Duas semanas após o plantio, os cafeeiros foram inoculados com suspensão de 10.000 ovos/planta. O inóculo de cada população de *M. paranaensis* foi obtido através do método de extração de ovos em hipoclorito de sódio 0,5% segundo Hussey e Barker (1973), usando liquidificador, ao invés de agitação manual. A concentração da suspensão de ovos foi determinada por contagem de 3 alíquotas de 1 mL em lâmina de Peters ao microscópio óptico.

A avaliação das plantas de *Coffea* spp. foi realizada oito meses após a inoculação, e o número total de ovos/planta/repetição foi avaliado como descrito por Hussey e Barker (1973) com NaOCl a 1%. O fator de reprodução (FR) de cada planta foi calculado, dividindo-se o número total de ovos/planta ou população final (PF) pelo número de ovos inoculados ou população inicial (PI = 10,000). As médias do FR foram transformadas em $\text{Log}_{10}(x+1)$ e após análise de variância as médias foram

comparadas pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade. As plantas foram classificadas de acordo com os seguintes conceitos: altamente resistentes (AR) quando os fatores de reprodução (FR) foram menores que 1 ($FR < 1$), resistente (R) quando os fatores de reprodução ficaram entre 1 e 2 ($FR = 1 \leq 2$) e suscetível (S) quando ($FR > 2.0$). Esses graus intermediários de suscetibilidade e resistência foram confirmados pelas análises estatísticas.

Tabela 3: Genótipos de *Coffea* spp. utilizados nos dois ensaios.

Ensaio	Genótipo
1	<i>Coffea arabica</i> (Catuai IAC 81)*
	<i>C. canephora</i> (Clone 14)**
Catuai Vermelho x Amphillo MR2161 (E ₁ 16-5 III)**	
<i>C. canephora</i> Apoatã IAC 2258**	
2	Híbrido do Timor UFV 408-01 – (E ₁ 6-6 II)**
	<i>C. arabica</i> (cv. IPR 100)**
	<i>C. arabica</i> (cv. Mundo Novo 379-19)*
Controle: *Suscetível e **Resistente.	

2.11 Análise estatística

Os dados experimentais foram analisados pelos programas estatísticos Genes (CRUZ, 1997) e SAS V.8 (SAS®), onde foram comparadas as diferenças das médias das variáveis número total de ovos/grama de raiz e Fator de Reprodução dos nematoides nos diferentes genótipos de café avaliados. As diferenças entre médias dos tratamentos foram obtidas pelo teste de Scott-Knott (1974), com dados transformados em $\log_{10}(x + 1)$.

3. RESULTADOS

3.1 Análise bioquímica: Esterase (Est)

Todas as populações de *M. paranaensis* foram caracterizadas pelo perfil enzimático de esterase (Est) de acordo com Carneiro et al. (2004 e 2005a) e Carneiro e Cofcewicz (2008). Três fenótipos enzimáticos de esterase (Est: P1, P2 e P2a) foram encontrados para as sete populações de *M. paranaensis* (Figura 1). O fenótipo Est P1 (Rm: 1.32) foi detectado nas populações Par 4-7 (Figura 1A), o fenótipo Est P2 (Rm: 1.0 e 1.32) nos isolados Par 1 e Par 2 (Figura 1B), enquanto o fenótipo Est P2a (Rm: 0.9 e 1.32), somente detectado na população Par 3 originária da Guatemala (Figura 1C).

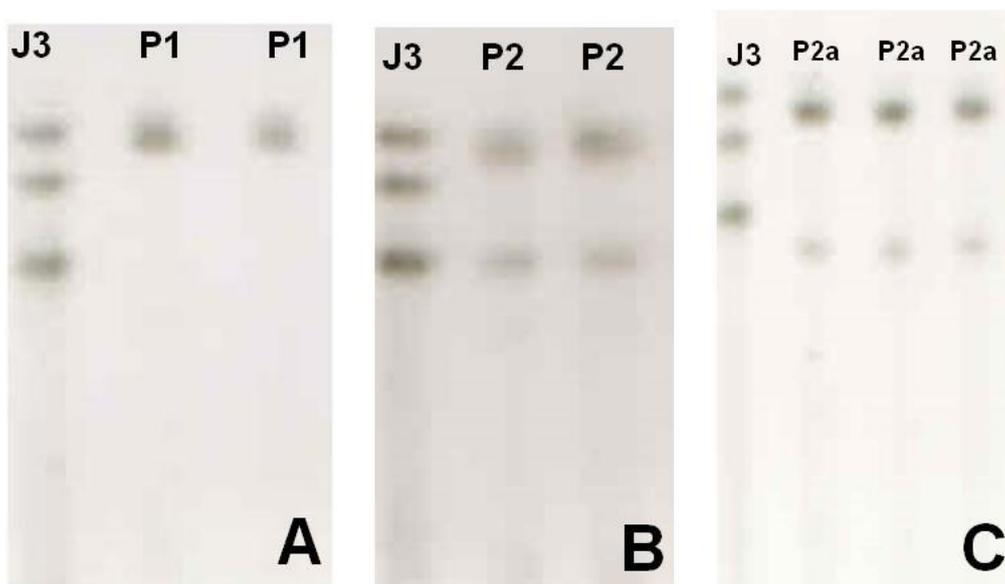


Figura 1: Fenótipos de esterase (Est) em diferentes populações de *Meloidogyne* spp. (A) *M. paranaensis* Est P1 (Par 4 a 7), (B) *M. paranaensis* Est P2 (Par 1 a 2) e (C) *M. paranaensis* Est P2a - (Par 3). *M. javanica* Est J3 foi usado como padrão de referência.

3.2 Análise molecular: marcadores SCAR

Na análise do marcador SCAR, todas as populações de *M. paranaensis* foram testadas com os marcadores espécie-específicos do tipo SCAR desenvolvidos para importantes espécies de nematoides do cafeeiro *M. incognita*, *M. paranaensis* e *M. exigua* (Figura 2). Um único fragmento de 208 pb foi obtido para as sete populações de *M. paranaensis* (Est P1, P2 e P2a) do Brasil e da Guatemala, não ocorrendo nenhum outro fragmento espécie específico e confirmando a identificação dessa espécie para os diferentes perfis de esterase encontrados nessas populações (Figuras 1 e 2).

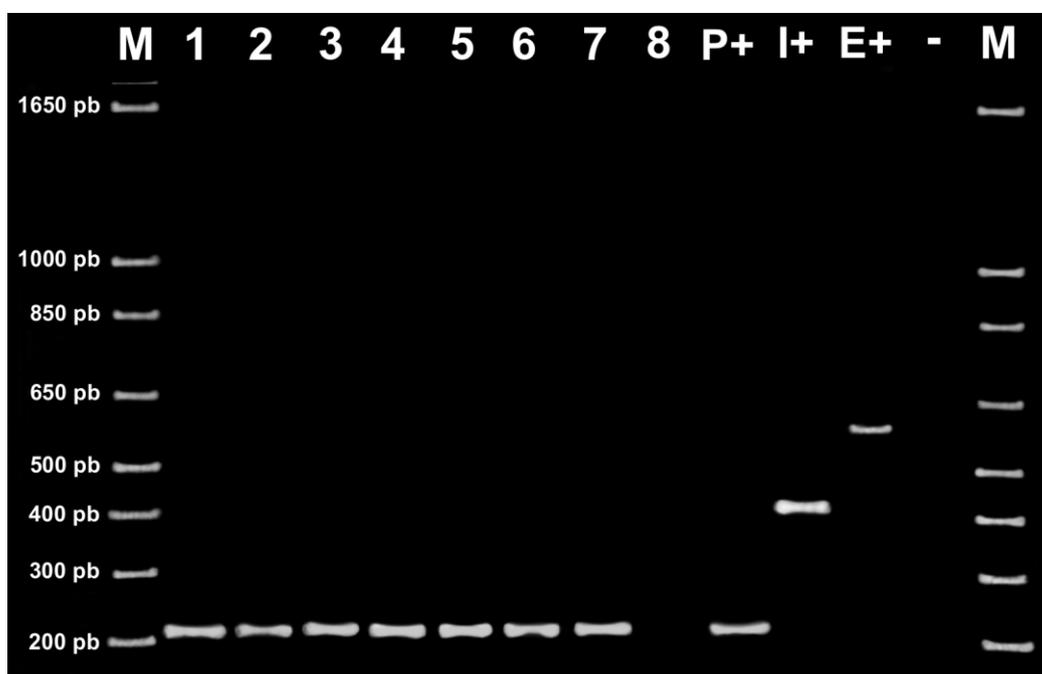


Figura 2: Padrões de amplificação de PCR-multiplex em onze populações de *Meloidogyne* spp. gerados a partir dos marcadores específicos SCAR (RANDIG et al., 2002). (1-7): *M. paranaensis*, (8): *M. enterolobii* e controles positivos (P +, I+ e E+) respectivamente, para *M. paranaensis*, *M. incognita* e *M. exigua*. (-) DNA: controle negativo. M: marcador 1kb DNA Plus (Invitrogen). As amplificações foram feitas utilizando DNA purificado a partir de juvenis.

3.3 Variabilidade genética: marcadores moleculares RAPD E AFLP

A variabilidade genética das sete populações de *M. paranaensis* foi analisada utilizando os marcadores moleculares RAPD e AFLP. Ao todo foram utilizados 43 primers, 30 RAPD e 13 AFLP. O número de fragmentos amplificados para os dois marcadores foi de 925 fragmentos, 748 RAPD e 177 AFLP. Os dois marcadores produziram um total de 404 fragmentos polimórficos, sendo 300 RAPD e 104 AFLP. O número de fragmentos amplificados por primer RAPD variou de 10 a 20 e tamanho de 200 a 4.500 pb (Figura 3A) e para AFLP variou de 10 a 20 e tamanho de 200 a 4.500 pb (Figura 3B).

A análise filogenética dos dados mostrou um único agrupamento das populações de *M. paranaensis* de perfis enzimáticos (Est P1 e P2) com 99% de similaridade, com a presença de subgrupos entre as populações e seus respectivos perfis enzimáticos. Exceto a população da Guatemala (Par 3) de Est P2a que se separou em outra clade (Figura 4).

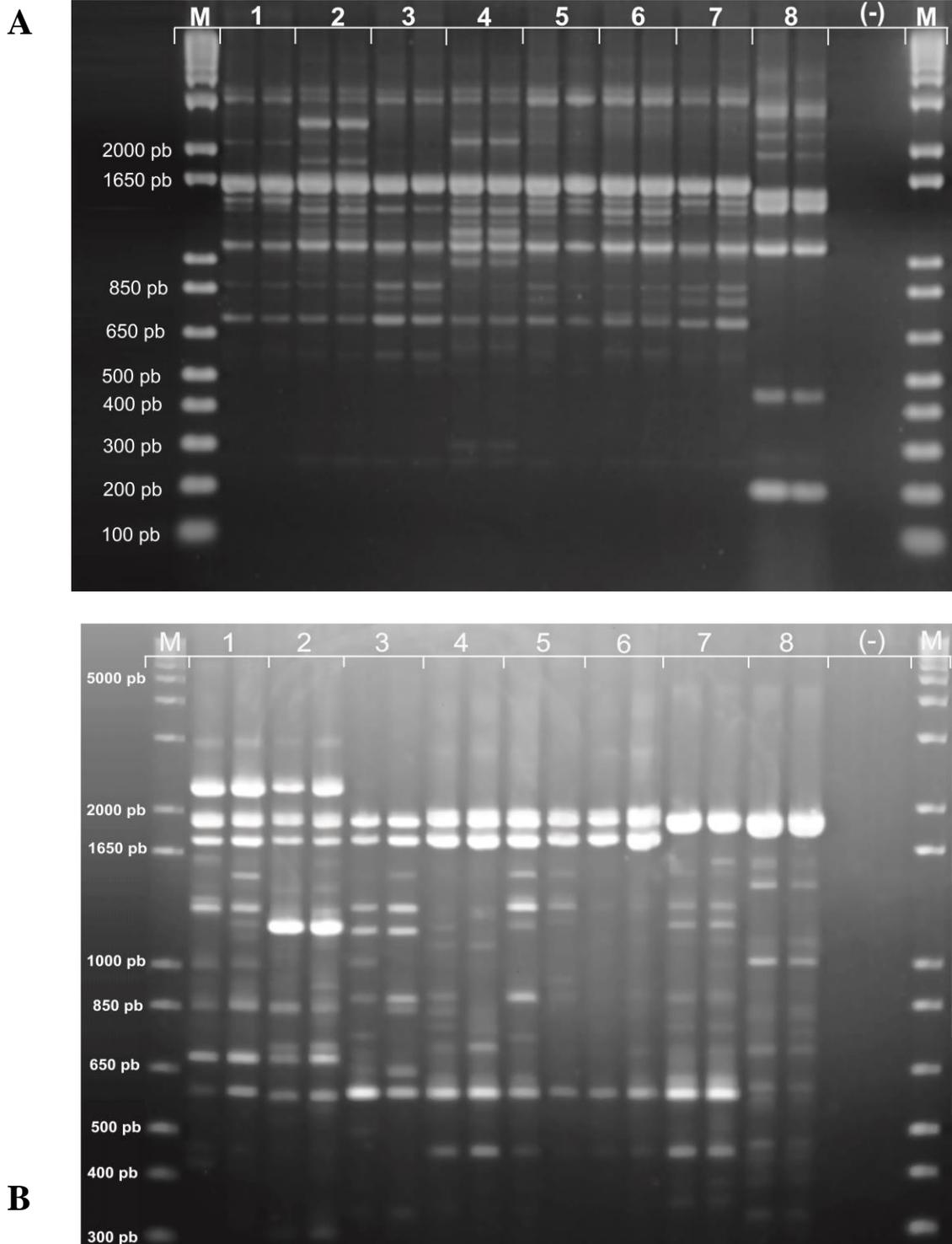


Figura 3: Polimorfismo de fragmentos de DNA de 8 populações de *Meloidogyne* spp. gerado pelos primers RAPD AQ12 (A) e AFLP 06 (B). Cada isolado foi analisado em duplicata. (-): reação controle sem DNA; (M): marcador de peso molecular 1kb DNA Plus (Invitrogen) . Números 1-7 (*M. paranaensis* Par 1-7), 8 (*M. enterolobii*).

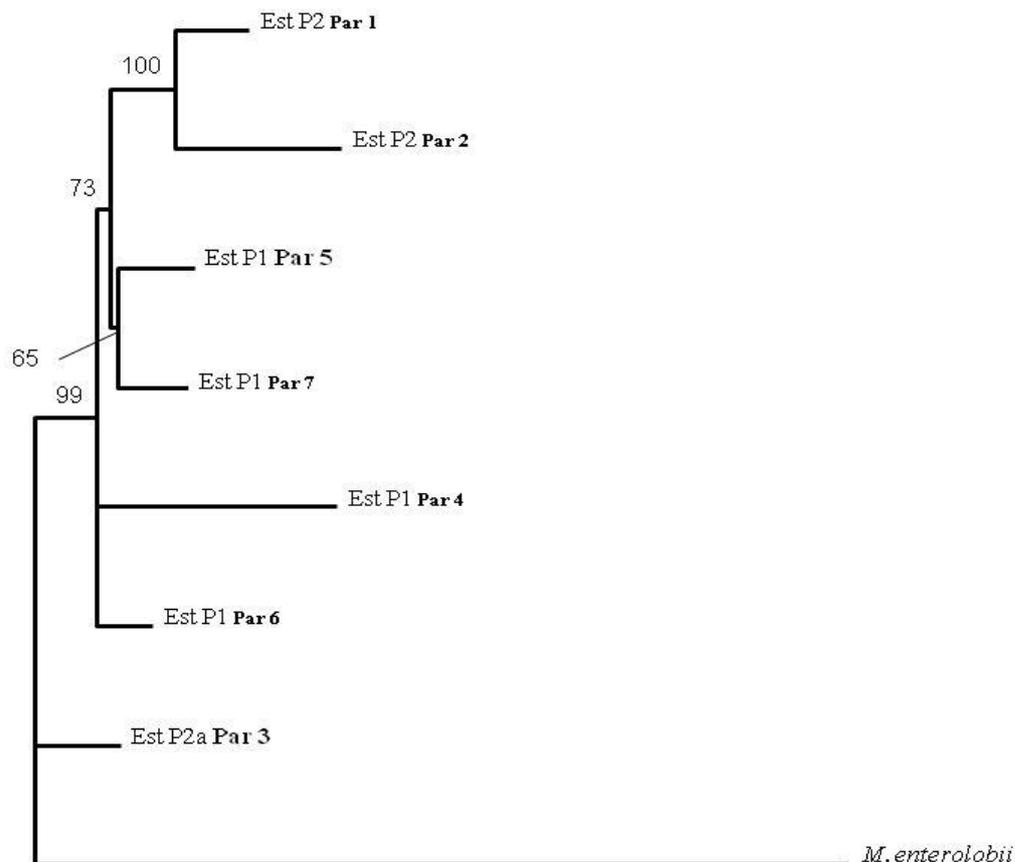


Figura 4: Dendrograma UPGMA gerado a partir da análise conjunta dos marcadores RAPD e AFLP com 8 populações de *Meloidogyne* spp. Somente valores de bootstrap acima de 50% são mostrados. Par 1-7: *M. paranaensis*, Est. Perfil de esterase. *Meloidogyne enterolobii* foi usado como controle.

3.4 Análise filogenética de diferentes populações de *M. paranaensis*: marcadores moleculares D2D3 E ITS

A análise filogenética de regiões distintas do rDNA (segmento ITS1- 5.8S- ITS2 e o fragmento D2D3 do gene 28S) de seis populações de *M. paranaensis* incluindo os três perfis enzimáticos típicos da espécie (P1, P2 e P2a) foram estudadas (Figura 5).

Na região D2D3, as populações de *M. paranaensis* (Par 1, 2, 3, 5, 6 e 7) referentes aos três perfis enzimáticos se agruparam com 100% de similaridade (Figura 5A), mostrando congruência com a identificação. Já na região intergênica, ITS, as populações dos perfis (Est P1 e P2) se agruparam com 77% de similaridade (Figura 5B), exceto a população Par 3 (Est P2a) proveniente da Guatemala, que se separou das

demais populações de *M. paranaensis* do Brasil. Estudos morfológicos são necessários para a confirmação da identidade taxonômica dessa espécie.

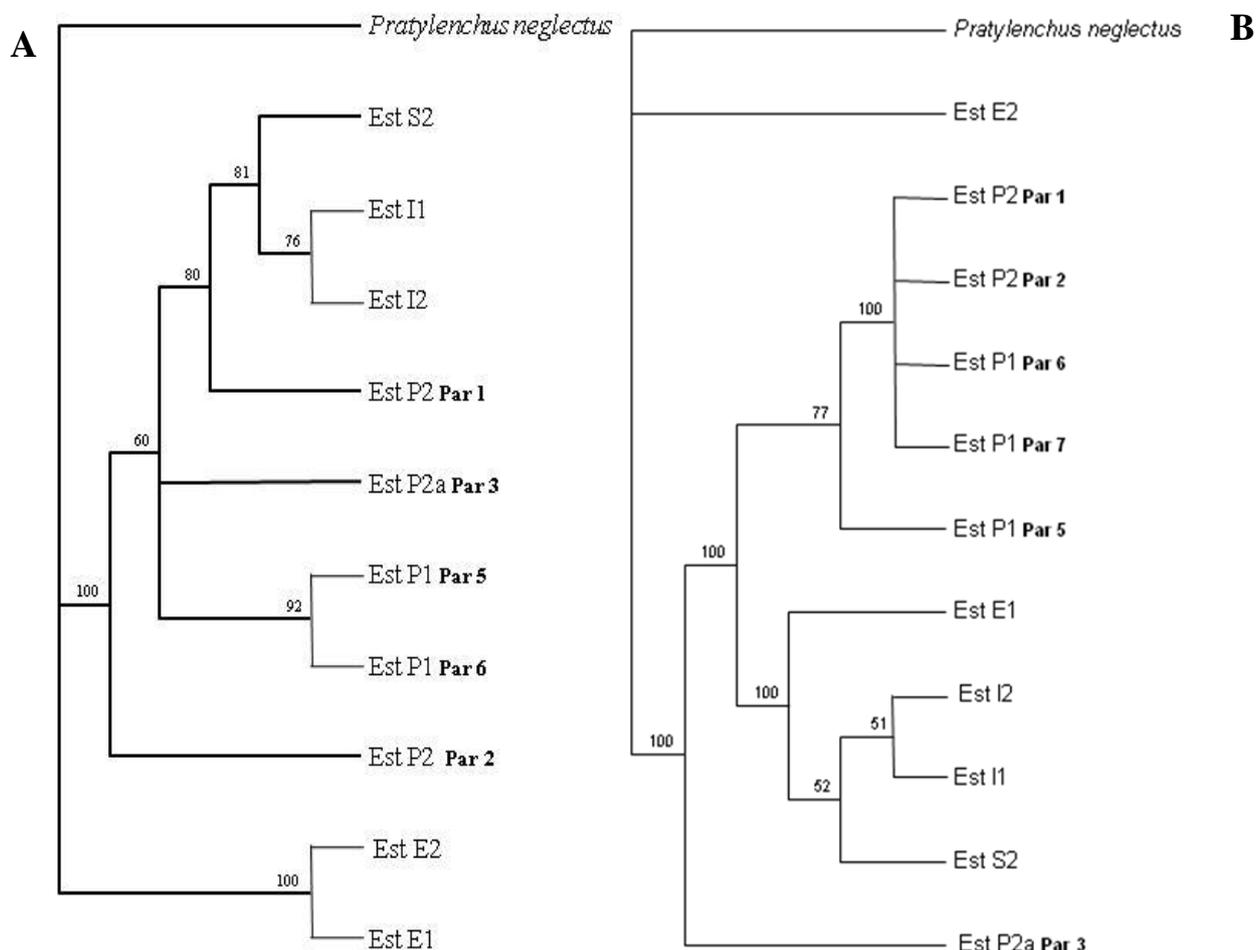


Figura 5: Dendrograma UPGMA de regiões do DNA ribossomal de *Meloidogyne* spp. **A**: Região do fragmento D2D3 do 28S rDNA e **B**: Segmento ITS1- 5.8S- ITS2. *Pratylenchus neglectus* (KP995311.1); *Meloidogyne incongnita* (Est S2) Garça, SP; *M. incognita* (Est I1) Londrina, PR e *M. incognita* (Est I2) Londrina, PR; *M. exigua* (Est E1) Lavras, MG e *M. exigua* (Est E2) Canãa, MG; Par 1 - *M. paranaensis* Est P2 Londrina, PR; Par 2 - *M. paranaensis* Est P2 Herculândia, SP; Par 3 - *M. paranaensis* Est P2a Guatemala; Par 5 - *M. paranaensis* Est P1 Piumbí, MG; Par 6 - *M. paranaensis* Est P1 São Paulo, SP e Par 7 - *M. paranaensis* Est P1 Franca, SP.

3.5 Reação de diferentes populações de *M. paranaensis* em plantas hospedeiras diferenciadoras

Três populações de *M. paranaensis* (Par 1, 3 e 7) de Londrina-PR, da Guatemala e de Franca-SP respectivamente, reproduziram-se em plantas de tomate 'Rutgers', melancia 'Charleston Gray' e fumo 'NC95', não sendo plantas hospedeiras de amendoim 'Florunner', de algodão 'Deltapine 61' e de pimentão 'Califórnia Wonder', ou seja, estando de acordo com a descrição de *M. paranaensis*, que apresenta a mesma reação de *M. javanica*.

3.6 Agressividade de diferentes populações de *M. paranaensis* a diferentes genótipos de *Coffea* spp.

Para a avaliação dos dois ensaios, os diferentes tratamentos (população de *M. paranaensis* X genótipos) foram classificados de acordo com os fatores de reprodução (FR) como altamente resistente (AR) quando $FR < 1$, resistente (R): $FR = 1 \leq 2$ e suscetível (S) quando $FR > 2.0$.

No primeiro ensaio *C. arabica* cv. Catuai IAC 81 foi usado como padrão de suscetibilidade e mostrou diferença na agressividade das diferentes populações de *M. paranaensis*, sendo a mais agressiva a população Par 3 da Guatemala (FR=53,47), seguidas pela população Par 4 de Rolândia-PR (FR=36,7), Par 5 de Piumbí-MG (FR=35,5), Par 1 de Londrina-PR (FR=29,2), Par 2 de Herculândia-SP (FR=16,3), Par 7 de Franca-SP (FR=8,71) e Par 6 de várias localidades do estado de São Paulo (FR=3,8) (Tabela 4). Quanto ao cultivar resistente de *C. canephora* 'Clone 14', produzida através de estacas, nenhuma população de *M. paranaensis* foi virulenta ($FR < 1$) a essa cultivar, mostrando que houve diferença estatística significativa apenas entre as duas cultivares suscetível e resistente a 5% de probabilidade pelo teste de médias de Scott-Knott para as sete populações de *M. paranaensis* estudadas (Par 1-7). Em relação ao peso das raízes, ambas as cultivares apresentaram um bom desenvolvimento radicular, em média 160,7g para a suscetível e 209,8g para a resistente, mostrando um notório sintoma de dano causado pelo nematoide no sistema radicular da suscetível (Figura 6). Quanto ao número total de ovos por grama de raiz, pode-se observar que essa variável está diretamente relacionada aos FRs tanto para a cultivar 'Catuai IAC 81' quanto para o 'Clone 14'.

No segundo ensaio, foram analisados os mesmos parâmetros analisados no primeiro ensaio, sendo que as plantas foram produzidas a partir de sementes e estavam um pouco mais jovens quando foram inoculadas. A cultivar Mundo Novo 379-19 foi usada como testemunha suscetível e apresentou certa variabilidade quanto à agressividade das diferentes populações testadas, sendo as mais agressivas: Par 2 de Herculândia-SP (FR=76,01), Par 3 da Guatemala (FR=60,6), Par 5 de Piumbí-MG (FR=56,9), Par 4 de Rolândia-PR (FR=47,3), Par 7 de Franca-SP (FR=28,7), Par 6 de várias localidades do estado de São Paulo (FR=28,2) e Par 1 de Londrina (FR=19,3) (Tabela 5). Quanto à agressividade as populações da Guatemala (Par 3- Est P2a) e de Herculândia-SP (Par 2- Est P2) foram as mais agressivas nas cultivares suscetíveis Catuaí IAC 81 e Mundo Novo 379-19, respectivamente (Figura 7). Considerando os dois ensaios, as três populações mais agressivas em Catuaí IAC 81 e Mundo Novo 379-19 foram Par 3 da Guatemala, Par 5 de Piumbí-MG e Par 4 Rolândia-PR. Quanto à virulência, nenhuma das populações quebrou a resistência presente nos genótipos: Clone 14, Apoatã, IPR 100, Híbrido do Timor UFV 408-01 (E₁ 6-6 II) e CV x Amphillo MR2161 (E₁ 16-5III), sendo que todos apresentaram comprovada resistência às sete populações testadas.

De uma maneira geral foi observada segregação de alguns genótipos na análise das variáveis: número médio total de ovos/g de raiz e fator de reprodução (FR). O Híbrido do Timor foi o que apresentou maior segregação, com 31%, seguido pelo IPR 100 26% e Apoatã 15%. O cruzamento de CV x Amphillo MR2161(E₁ 16-5III) não apresentou segregação quando foram consideradas as 42 plantas analisadas.

Com base na variável FR, com exceção da cultivar Mundo Novo 379-19, padrão de suscetibilidade (Figura 8A) com média de FR entre 19 e 76 nos sete tratamentos com diferentes populações de *M. paranaensis*, as cultivares Apoatã, IAC 2258, CV x Amphillo MR2161(E₁ 16-5III), Híbrido do Timor UFV 408-01 (E₁ 6-6 II) e IPR 100 diferiram estatisticamente (Figura 8B) do padrão de suscetibilidade, segundo o teste de médias de Scott-Knott a 5% de probabilidade. A cultivar Apoatã IAC 2258 foi resistente (R) para as populações Par 2 e Par 7, enquanto que para as outras cinco populações Par 1, 3, 4, 5 e 6 foi altamente resistente (AR), com valores de FR menores. E a cultivar do cruzamento CV x Amphillo MR2161(E₁ 16-5III) foi altamente resistente (AR) para todas as populações de *M. paranaensis*, sem ocorrência de segregação. Já o IPR 100 foi também altamente resistente (AR), apresentando uma

planta suscetível (S) segregante, em todos os tratamentos (Figura 9). Para a cultivar Híbrido do Timor UFV 408-01(E1 6-6 II), houve diferenças de reação de resistência para as populações de *M. paranaensis*, entre suscetível (S), resistente (R) e altamente resistente (AR), com ocorrência de segregação (Figura 10), em cinco dos sete tratamentos estudados: Par 1, 2, 3, 4 e 7.

Quanto ao desenvolvimento dos sistemas radiculares (peso fresco das raízes) pode-se observar que as plantas de café do primeiro ensaio (Tabela 4) por terem sido inoculadas tardiamente apresentaram um maior desenvolvimento médio: Catuaí IAC 81 (160,7g) e “Clone 14” (209,8 g). Já as plantas do segundo ensaio (Tabela 5) apresentaram sistemas radiculares três vezes menores, como é o caso do padrão de suscetibilidade Mundo Novo 379-19 (56,9g), IPR 100 (81,2g), CV x Amphillo MR2161 (23,3 g), Híbrido do Timor (22,7g) e Apoatã (10,1 g). Esse sistema radicular reduzido da cultivar Apoatã foi inesperado. O sistema radicular da espécie *C. canephora*, especialmente de plantas do tipo Robusta, entre as quais se encontra a cultivar Apoatã IAC 2258, é bastante denso e vigoroso. No entanto, existe um grave problema relacionado ao controle de pureza varietal da cultivar Apoatã IAC 2258. Nunca houve no país um controle rigoroso da produção e da comercialização de material propagativo da cultivar. Entretanto, essa deficiência aliada à natureza alógama da espécie, agrava o problema e faz com que parte ‘muito significativa’ do germoplasma chamado Apoatã, não tenha relação estreita com a cultivar originalmente selecionada.

Tabela 4: Reação de duas cultivares, *Coffea arabica* (cv. Catuai IAC 81) e *Coffea canephora* (cv. Clone 14) a sete populações de *M. paranaensis*.

Tratamento ¹ Código ¹	Cultivares ²	Peso fresco das raízes (g) ³	Nº total de ovos/g de raiz ^{4,5}	Total de ovos ⁴	Fator de reprodução (FR) ^{4,6}	Reação Final ⁷
<i>M. paranaensis</i> Londrina, PR (Est P2)						
Par 1	Catuai IAC 81 *	203,58	1525,06a	291500	29,15a	S
	Clone 14**	191,33	13,78b	2333,33	0,23b	AR
<i>M. paranaensis</i> Herculândia, SP (Est P2)						
Par 2	Catuai IAC 81 *	143,08	1175,07a	162888,9	16,29a	S
	Clone 14**	329,08	0,33b	111,11	0,01b	AR
<i>M. paranaensis</i> Guatemala (Est P2a)						
Par 3	Catuai IAC 81 *	146,08	4054,48a	534666,7	53,47a	S
	Clone 14**	150,33	16,08b	2222,22	0,22b	AR
<i>M. paranaensis</i> Rolândia, PR (Est P1)						
Par 4	Catuai IAC 81 *	189,83	1962,51a	367444,4	36,74a	S
	Clone 14**	149,83	3,20b	472,22	0,05b	AR
<i>M. paranaensis</i> Piumbí, MG (Est P1)						
Par 5	Catuai IAC 81 *	128,17	2015,47a	355166,66	35,52a	S
	Clone 14**	190,42	3,53b	500	0,05b	AR
<i>M. paranaensis</i> (Poll de populações) São Paulo, SP (Est P1)						
Par 6	Catuai IAC 81 *	183,58	216,57a	37876,67	3,79a	S
	Clone 14**	319,15	1,85b	333,33	0,03b	AR
<i>M. paranaensis</i> Franca, SP (Est P1)						
Par 7	Catuai IAC 81 *	130,42	658,93a	87111,11	8,71a	S
	Clone 14**	138,42	7,51b	944,44	0,09b	AR

¹ Tratamento/ Código das populações de *M. paranaensis*.

² Cultivares referente ao ensaio 1.

³ Média do peso fresco das raízes dos genótipos de *Coffea* spp. após inoculação das populações de *M. paranaensis*.

⁴ Os dados são médias de seis repetições.

⁵ A variável da média Nº total de ovos/g de raiz foi transformada em $\log_{10}(X+1)$, valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5%. CV_{Sem segregação}: 18.05% e Fcal: 229.11.

⁶ A variável da média Fator de reprodução (FR) foi transformada em $\log_{10}(x+1)$, valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5%. CV = 21.41% e Fcal. = 80.03.

⁷ (S) = Suscetível; (R) = Resistente; (AR) = Altamente Resistente.

* Padrão de suscetibilidade (PS).

** Padrão de resistência (PR).

Tabela 5: Reação de cinco cultivares, *Coffea arabica* cv. Mundo Novo 379-19, *C. canephora* Apoatã IAC 2258, Híbrido de Timor UFV 408-01 (E1 6-6 II), Catuaí Vermelho x Amphilo MR2161(E1 16-5 III) e IPR 100 a sete populações de *M. paranaensis*.

Cultivares ¹	Peso fresco das raízes (g) ²	Nº total de ovos/g de raiz	Nº total de ovos/g de raiz	Fator de reprodução (FR)	Fator de reprodução (FR)	Reação Final ⁶
		(Com segregação) ^{3,4}	(Sem segregação) ^{3,4}	(Com segregação) ^{3,5}	(Sem segregação) ^{3,5}	
<i>M. paranaensis</i> Londrina - PR (Est P2) Par 1						
MN 379-19*	47.71	1993.19	1993.19a	19.03	19.03a	S
Apoatã IAC 2258**	6.08	344.80	344.80b	0.36	0.36b	AR
HT (UFV 408-01)**	18.83	1276.65	402.57b	5.91	1.33b	R
C.V x Am MR2161**	19.17	30.47	30.47b	0.11	0.11b	AR
IAPAR 100**	71.17	482.83	41.83b	6.16	0.61b	AR
<i>M. paranaensis</i> Herculândia - SP (Est P2) Par 2						
MN 379-19*	58.87	6511.33	6511.33a	76.1	76.1a	S
Apoatã IAC 2258**	6.08	773.46	773.46b	1.04	1.04b	R
HT (UFV 408-01)**	19.08	855.85	716.95b	2.71	1.92b	R
C.V x AmMR2161**	25.66	181.13	181.13c	0.96	0.96b	AR
IAPAR 100**	68.9	733.69	88.89c	11.68	0.99b	AR
<i>M. paranaensis</i> Guatemala (Est P2a) Par 3						
MN 379-19*	71	7120.25	7120.25a	60.60	60.60a	S
Apoatã IAC 2258**	15.75	129.89	129.89b	0.18	0.18b	AR
HT (UFV 408-01)**	16.25	1405.47	63.79b	3.18	0.26b	AR
C.V x AmMR2161**	15.80	48.08	48.08b	0.20	0.20b	AR
IAPAR 100**	70.00	843.13	21.03c	11.22	0.37b	AR
<i>M. paranaensis</i> Rolândia - PR (Est P1) Par 4						
MN 379-19*	71	3401.65	3401.65a	47.31	47.31a	S
Apoatã IAC 2258**	8.4	929.48	929.48b	0.99	0.99b	AR
HT (UFV 408-01)**	34.6	195.42	28.22c	1.07	0.17b	AR
C.V x Am MR2161**	25.9	77.78	77.78c	0.19	0.19b	AR
IAPAR 100**	121.2	261.43	5.71d	5.31	0.08b	AR

<i>M. paranaensis</i> Piumbí - MG (Est P1) Par 5						
MN 379-19*	43.71	6228.24	6228.24a	56.90	56.90a	S
Apoatã IAC 2258**	11.16	195.94	195.94b	0.27	0.27b	AR
HT (UFV 408-01)**	25.75	63.79	63.79b	0.26	0.26b	AR
C.V x Am MR2161**	29	58.57	58.57b	0.27	0.27b	AR
IAPAR 100**	70.42	237.10	21.03c	4.00	0.37b	AR
<i>M. paranaensis</i> (Pool de populações) de São Paulo - SP (Est P1) Par 6						
MN 379-19*	70.92	2527.82	2527.82a	28.25	28.25a	S
Apoatã IAC 2258**	15.33	29.40	29.40b	0.07	0.07b	AR
HT (UFV 408-01)**	23.88	25.00	25.00b	0.11	0.11b	AR
C.V x Am MR2161**	24.91	0.00	0.00c	0.00	0.00b	AR
IAPAR 100**	45.2	343.59	0.00c	3.57	0.00b	AR
<i>M. paranaensis</i> Franca - SP (Est P1) Par 7						
MN 379-19*	44.64	4408.32	4408.32a	28.76	28.76a	S
Apoatã IAC 2258**	8.08	929.72	929.72b	1.50	1.50b	R
HT (UFV 408-01)**	21.66	1553.19	607b	6.47	0.99b	AR
C.V x Am MR2161**	22.83	36.33	36.33c	0.16	0.16b	AR
IAPAR 100**	121.7	653.83	36.03c	10.65	0.82b	AR

¹Cultivares referentes ao ensaio 2.

²Média do peso fresco das raízes dos genótipos de *Coffea* spp. após inoculação de *M. paranaensis*.

³Os dados são médias de oito repetições.

⁴A variável N° total de ovos/g de raiz foi transformada em $\log_{10}(X+1)$, valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5%. $CV_{Sem\ segregação}$: 49.05% e F_{cal} : 29.79.

⁵A variável Fator de reprodução (FR) foi transformada em $\log_{10}(X+1)$, valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5%. $CV_{Sem\ segregação}$: 56.64% e F_{cal} : 102.94.

⁶(S) = Suscetível;(R) = Resistente; (AR) = Altamente Resistente.

* Padrão de suscetibilidade (PS).

** Padrões de resistência (PR).

A



B



Figura 6: Ensaio 1: **A:** Raiz da cv. Catuaí IAC 81 (Testemunha suscetível). **B:** Raiz da cv. Clone 14 (Resistente). Raízes inoculadas com *M. paranaensis* de Herculândia-SP (Par 2).

A



Figura 7: **A**: Sintomas da agressividade e destruição total das raízes ocasionada pela população de *M. paranaensis* Herculândia-PR (Par 2- Est P2), em *C. arabica*. cv. Mundo Novo (379-19), mostrando necrose, rachaduras, descorticamento e engrossamentos nas poucas raízes laterais, repetição com FR=0,13.

A**B**

Figura 8: Ensaio 2: **A:** Raiz da cv. Mundo Novo (Testemunha suscetível). **B:** Raiz da cv. IPR 100 (Resistente). Raízes inoculadas com *M. paranaensis* de Herculândia-SP (Par 2).

A**B**

Figura 9: Ensaio 2: Raízes da cv. IPR 100. **A e B**: Com segregação. Raízes inoculadas com *M. paranaensis* de Herculândia-SP (Par 2).

A**B**

Figura 10: Ensaio 2: Raízes da cv. Híbrido do Timor (UFV 408-01- E1 6-6 II). **A e B**: Com segregação. Raízes inoculadas com *M. paranaensis* de Londrina-PR (Par 1).

4. DISCUSSÃO

O estudo avaliou a variabilidade genética e a agressividade de seis populações de *M. paranaensis* do Brasil e uma da Guatemala, em diferentes cultivares de *Coffea* spp., que apresentam genes de resistência ao nematoide das galhas (NGs). Em cafeeiro, estudos relacionando variabilidade genética de *M. paranaensis* e agressividade ou virulência dessas populações em diferentes cultivares resistentes de *Coffea* spp. são inexistentes. Não há relatos disponíveis sobre a extensão da variabilidade genética e fisiológica da espécie *M. paranaensis* (CARNEIRO et al., 2005).

Na busca por cafeeiros com resistência genética durável aos NGs devem ser consideradas as relações inter e intraespecífica das populações, uma vez que diferentes espécies, raças e biótipos de nematoides podem ocorrer em diferentes solos (ITO et al., 2013). Essa complexidade genética tem sido detectada pela variabilidade intraespecífica de populações de *Meloidogyne* spp. em genótipos do gênero *Coffea* (RIBEIRO et al., 2005). Os marcadores moleculares têm se mostrado valiosos na discriminação de diversidade genética de *Meloidogyne* spp., com resultados significativos (CASTAGNONE-SERENO et al., 1994; PERTERSEN et al., 1997; RANDIG et al., 2002; CARNEIRO et al., 2004; COFCEWICK et al., 2004; 2005; CARNEIRO et al., 2008; SANTOS et al., 2012; MATTOS, 2013), embora não possam ser correlacionados com a agressividade ou virulência das populações, como é o caso da população de *M. exigua* de Bom Jesus de Itabapoana que se agrupou com as demais populações de *M. exigua* e quebrou a resistência do gene *M. exi- 1* da cultivar IAPAR 59 (MUNIZ et al., 2008; 2009).

Neste estudo, apesar da existência de três perfis de esterase na espécie, uma baixa variabilidade genética foi observada entre as populações de *M. paranaensis*. Resultados semelhantes já foram relatados (CARNEIRO et al., 2004), e pode estar relacionado ao modo de reprodução partenogênico mitótico da espécie, que teoricamente gera descendentes clonais (TRANTAPHYLLOU, 1985). Filogeneticamente um único agrupamento foi formado com 99% de similaridade das populações de *M. paranaensis* de (Est P1e P2), exceto a população da Guatemala (Est P2a) que se separou das outras populações do Brasil e foi a mais agressiva aos genótipos suscetíveis. O fenótipo (Est P2a) nunca foi detectado no Brasil, o que sugere uma divergência genética dessa população em relação às outras populações do Brasil (CARNEIRO et al., 2004; HERNANDEZ et al., 2004). No estudo foi observada a

presença de grupos intraespecíficos com polimorfismo acima de 50% entre as populações de Est P1 e P2, contrariando estudos anteriores até então relatando médias de 5-20% dentro destes perfis típicos da espécie (CARNEIRO et al., 2004).

Análises de regiões do DNA ribossomal têm sido usualmente uma das mais extensivas ferramentas moleculares empregados na filogenia de *Meloidogyne* spp. (HILLIS e DIXON,1991; LANDA et al., 2008). Adicionalmente aos estudos moleculares mesmo com análises de regiões distintas do rDNA, D2D3 e ITS, uma alta homogeneidade foi mantida entre as populações de *M. paranaensis* dos perfis (Est P1 e P2), porém nos agrupamentos a população de Est P2a da Guatemala, se separou das outras populações de *M. paranaensis* do Brasil, seja pela distribuição geográfica ou pela variabilidade morfológica, que não foi avaliada neste trabalho. No entanto, pode se concluir que esses marcadores são altamente conservados para a distinção de variabilidade intraespecífica de *Meloidogyne* spp. Os resultados corroboram com outros marcadores moleculares que detectaram uma baixa diversidade genética da espécie (CARNEIRO et al., 2004). Segundo Hillis et al. (1996), a semelhança observada em nível intraespecífico nas análises filogenéticas do DNA ribossomal indicam que existe um mecanismo de homogeneização das múltiplas cópias dos genes ribossomais, chamado evolução estabelecida. Como este tipo de evolução também atua fixando as mutações dentro das unidades reprodutivas, um só indivíduo deveria ser típico de um grupo fechado onde se reproduzem entre si. O fato de que se observa pouca variação intraespecífica, constitui uma vantagem adicional, já que não é necessário sequenciar o DNA de vários indivíduos para se obter informações representativas de uma espécie.

Tenente et al. (2004) já havia relatado que os marcadores da região D2D3 são mais adequados para distinguir grupos de espécies ligados a uma determinada característica, como o agrupamento de espécies partenogênicas mitóticas (*M. incognita*, *M. paranaensis* e *M. konaensis*) do que variações intraespecíficas de espécies. E segundo Hillis e Dixon (1991) as sequências amplificadas por marcadores ITS, são úteis para comparações filogenéticas entre táxons distantes e mais ainda na distinção entre táxons muito próximos, já que evoluem mais rapidamente do que outras regiões. No estudo foi observado que ambos os marcadores de rDNA apresentaram discriminação na diversidade genética das principais espécies de *Meloidogyne* do cafeeiro, com grupos não só das populações de *M. paranaensis* mas também das populações de outras *Meloidogyne* spp. do NGs do cafeeiro. Portanto, o estudo seguiu o

que Hillis et al. (1996) recomendam para análises filogenéticas de estudos de espécies estreitamente relacionadas e populações, que seriam suficientemente informativas as regiões variáveis do gene 28S rDNA e os espaçadores internos, ITS, para a obtenção de informações da diversidade genética de *Meloidogyne* spp.

Embora a existência de três fenótipos da enzima esterase (P1, P2 e P2a) para *M. paranaensis*, o marcador SCAR desenvolvido para essa espécie permitiu a amplificação de um único fragmento específico para as sete populações de *M. paranaensis*, incluindo os três fenótipos de esterase como representantes dessa espécie, confirmando também a validação desse marcador como uma ferramenta confiável na identificação molecular, considerando que estudos anteriores tenham sido realizados para um pequeno número de populações dessa espécie (RANDIG et al. 2002). A identificação realizada através desses marcadores é simples, rápida e econômica, permitindo o processamento de um grande número de amostras ao mesmo tempo (MUNIZ et al. 2008), pois favorece um diagnóstico preciso a partir de um único juvenil ou fêmea aspectos que viabilizam a utilização da técnica em programas quarentenários ou para análise de J2s provenientes do solo (RANDIG et al., 2002, 2004).

Além disso, os marcadores do tipo SCAR são de suma importância na identificação e diferenciação de espécies individualizadas ou em misturas, em uma mesma reação, como ocorre frequentemente no cafeeiro (Carneiro et al., 2005). Esses marcadores são muito precisos, pois permitem uma detecção de cerca de 1% de misturas (RANDIG et al. 2002, 2004). É muito comum a ocorrência de misturas de espécies de *Meloidogyne*, em amostras oriundas de um mesmo cafezal, com predominância de *M. incognita* e *M. paranaensis* em cerca de 20 % das amostras (CARNEIRO et al. 2005). Isto dificulta o emprego de algumas estratégias de manejo, como resistência genética e rotação de culturas (GONÇALVES e SILVAROLLA, 2001). Ito et al. (2013) em um levantamento parcial de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiros no Estado do Paraná, relataram que 3.8% das amostras estavam misturadas: *M. incognita* e *M. paranaensis*.

O estudo com plantas hospedeiras diferenciadoras (HARTMAN e SASSER, 1985) demonstrou que não houve correlação entre fenótipos isoenzimáticos, filogenia e a especificidade parasitária de hospedeiras diferenciais para as sete populações de *M. paranaensis*, todas responderam em conformidade com a descrição da espécie (CARNEIRO et al., 1996). Estudos semelhantes desenvolvidos por Muniz et al. (2008, 2009) e Santos et al. (2012) também mostraram a inexistência de correlação entre os

perfis de esterase, filogenia e especificidade parasitária de *M. exigua* e *M. incognita* respectivamente. No entanto, essa caracterização é de suma importância em programas de melhoramento genético que visam à resistência a *Meloidogyne* spp. em cafeeiro (CASTRO et al., 2003). Mas por outro lado, o uso de hospedeiros diferenciadores não é considerado um critério consistente para a identificação da variabilidade intraespecífica dos nematoides das galhas (MOENS et al., 2009), pois a especificidade parasitária parece ser mais uma adaptação fisiológica do nematoide do que uma característica genética da população (CARNEIRO e COFCEWICZ, 2008).

A diversidade fisiológica nas populações de *Meloidogyne* spp. do cafeeiro dificulta a seleção de fontes de resistência (CARNEIRO e COFCEWICZ, 2008). Atualmente, existem poucos materiais genéticos resistentes à espécie *M. paranaensis* (SÁ, 2013), e testados com um grande número de populações da espécie. Apesar da existência de fontes de resistência a essa espécie já identificadas na espécie diploide de *C.canephora* (BERTRAND et al., 2000), e em cafeeiros de *C. arabica* da Etiópia (BOISSEAU et al., 2009), com exceção da cultivar IPR 100 (SERA et al., 2007), todas as cultivares comerciais de *C. arabica* são altamente suscetíveis a *M. paranaensis*. Neste trabalho mais um *C. arabica* foi adicionado à lista (CV x Amphillo MR2161) como fonte de resistência. Na prática, o cultivo de *C. arabica* só tem sido possível devido à utilização de mudas enxertadas em porta-enxertos de *C. canephora* resistentes (CAMPOS e VILLAIN, 2005).

Neste estudo, considerando as cultivares suscetíveis Catuaí IAC 81 e Mundo Novo 379-18, as populações de *M. paranaensis* da Guatemala (Par 3- Est P2a) com fator de reprodução FR= 53.47 e de Herculândia-SP (Par 2- Est P2) com FR= 76.1, foram as mais agressivas nos dois ensaios. A população da Guatemala foi a que mais se diferenciou nos estudos filogéticos e foi uma das mais agressivas. Portanto, embora não ocorra uma correlação estreita entre variabilidade genética e agressividade em todas as populações de *M. paranaensis*, a população da Guatemala se destacou como a mais diferente e mais agressiva ao cv. Catuaí IAC 81. Estudos correlacionando variabilidade genética e agressividade entre diferentes populações de *Meloidogyne* spp. já foram relatada por outros autores (MUNIZ et al., 2008; 2009; MATTOS, 2013, SILVA et al., 2014). Mas, nenhum desses autores observou correlação entre esses dois parâmetros para *Meloidogyne* spp. No caso de *M. exigua* devido à alta variabilidade intraespecífica se justifica a correlação encontrada com a virulência (MUNIZ et al. 2008; 2009) devido

ao modo de reprodução, partenogênese meiótica (TRANTAPHYLLOU, 1985), cujos mecanismos de recombinação genética podem ser responsáveis pelo aumento de agressividade (COOK e EVANS, 1987). Entretanto a existência de variabilidade em termos de agressividade para *M. paranaensis* não tem sido constatada com frequência, pois a espécie possui reprodução por partenogênese mitótica (TRANTAPHYLLOU, 1985), sem a ocorrência de recombinações genéticas, o que dificulta a interpretação da existência de diferentes graus de agressividade (TRUDGILL e BLOK, 2001). Segundo Machado et al. (2013), em estudo para avaliar a agressividade de três populações de *M. paranaensis* de dois perfis de esterase (Est P1 e P2) na cultivar suscetível Mundo Novo, com base no desenvolvimento das plantas e na reprodução do nematoide, concluíram que existe variabilidade entre populações de *M. paranaensis* em relação à capacidade de multiplicação em cafeeiros e tal variabilidade deve ser levada em consideração nos programas de melhoramento genético da cultura visando resistência aos nematoides.

Ao contrário do que aconteceu para *M. exigua*, em que a resistência da cultivar IAPAR 59 foi quebrada pela população de Bom Jesus de Itabapoana (MUNIZ et.al., 2009), nesse trabalho nenhuma população foi virulenta às diferentes fontes de resistência aqui estudadas. As espécies partenogenéticas exibem uma alta capacidade de responder as condições ambientais, e a sua capacidade de superar os genes de resistência de plantas tem sido demonstrado (ROBERTS, 1995). Grande parte das informações sobre virulência em *Meloidogyne* spp. está relacionada com o gene Mi de resistência em tomateiros (ROBERTS e THOMASON, 1989; HUSSEY e JANSSEN, 2002). Segundo Triantaphyllou (1987), mecanismos além da recombinação gênica devem ser responsáveis pela virulência encontrada nos NGs, e propôs que a ação de uma alta frequência de mutação em genes menores afetaria a virulência em *Meloidogyne* spp.

Como esperado, a cultivar Catuaí Vermelho IAC 81 que serviu como padrão de suscetibilidade no primeiro ensaio apresentou altos índices de reprodução nos sete tratamentos de *M. paranaensis* (Par 1-7), com média de FR > 27. Enfatizando à alta suscetibilidade de cultivares de *C. arabica* às espécies de *Meloidogyne* spp. de cafeeiro (CAMPOS e VILLAIN, 2005), apesar de ser uma das cultivares mais promissoras nas regiões produtoras café, pois alia estabilidade à alta produtividade e adaptabilidade em diversos ambientes não infestados por nematoide (BOTELHO et al., 2010).

Contrariamente, o “Clone 14” foi altamente resistente para todas as populações de *M. paranaensis* com fator de reprodução $FR < 1$, confirmando a resistência genética do “clone 14” a espécie. No trabalho de Lima et al. (2013), algumas variedades clonais se mostraram resistentes porém para uma única população de *M. paranaensis*. Até o momento, não existem muitos trabalhos de resistência de variedades clonais para *Meloidogyne* spp. do cafeeiro, sobretudo para *M. paranaensis* (CARNEIRO et al. 2009; FERRÃO et al., 2010; FATOBENE, 2014). Carneiro et al. (2009) já havia sugerido a existência de várias fontes de resistência a *Meloidogyne* spp. no cafeeiro “Clone 14” quando obteve altos índices de resistência para todas as populações de *M. incognita*, *M. exigua* e *M. paranaensis*. Lima et al. (2015a) detectou que existiam três mecanismos de resistência genética no “Clone 14” a *M. paranaensis*, um inicial, durante a migração dos J2 nas células corticais, com nítida reação de hipersensibilidade (HR) e morte celular, impedindo a migração do J2, e outros mais tardios, com morte celular muito intensa ao redor de fêmeas jovens e sítios de alimentação com vacuolização e degeneração citoplasmática interna das células gigantes. A resistência múltipla no “Clone 14” para as três principais espécies do cafeeiro, *M. incognita*, *M. exigua* e *M. paranaensis* foi relatada por Lima et al. (2015a) com indicação de que a resistência do clone 14 possivelmente é controlada por mais de um gene de resistência, e que esses genes atuam na produção de lignina e cisteína com grande expressão após vinte dias da inoculação o que coincide com o colapso do sítio de alimentação. Até o momento, conclui-se que existem perfis diferenciais de expressão de genes do “Clone 14”, com uma sobreposição temporal entre a expressão dos genes de resistência e os que codificam proteínas que atuam no processo de resistência. O primeiro grupo de genes atuaria no reconhecimento do patógeno (proteínas de resistência) e o segundo grupo na contenção e eliminação do mesmo (Lima et al., 2015b). Além da confirmação da resistência genética do “Clone 14” a todas as populações de *M. paranaensis* verificada neste estudo, segundo Ferrão et al. (2010), essa variedade está associada a características agronômicas tais como tolerância à seca, que é de interesse econômico da cafeicultura, no atual contexto de mudanças climáticas que vêm ocorrendo no meio ambiente.

No segundo ensaio, a cultivar Mundo Novo 379-19 de *C. arabica* apresentou médias elevadas de FR, confirmando sua eficiência como padrão de suscetibilidade por proporcionar reprodução satisfatória das sete populações de *M. paranaensis*. Essa cultivar é a mais plantada comercialmente, sendo reconhecida pelo seu elevado

potencial produtivo, e ampla adaptação a diferentes ambientes (CARVALHO et al. 1979; FAZUOLI et al., 2005), desde que cultivada em área isenta de *Meloidogyne* spp.

O cruzamento CV x Am MR2161 (E1 16-5 III), mostrou-se altamente resistente para todas as populações de *M. paranaensis*, sem segregação. Confirmando estudos anteriores da resistência genética desse cruzamento com a espécie *M. paranaensis*, mas somente testado para poucas populações (PERES, 2013; SALGADO et al., 2014) e corroboram com os resultados de Sá (2013) que detectou acessos provindos do cruzamento CV x Am MR 2161, com resistência a espécie *M. paranaensis*, além do grande potencial produtivo das plantas. Salgado et al. (2011) também relataram um bom vigor dos “Amphillos” em área infestada por *M. paranaensis*. Até o momento existem poucos relatos sobre essa variedade, mas sabe-se que a resistência do cruzamento, possivelmente, provém da variedade Amphillo, que além de possuir grande potencial de resistência a *M. paranaensis* e à seca, uma vez que apresenta um sistema radicular robusto (SERA et al., 2006), sendo promissor para o melhoramento genético (GONÇALVES et al., 1996).

Na cultivar Híbrido do Timor UFV 408-01 (E1 6-6 II) houve uma variação na resposta de resistência entre resistente e altamente resistente com relação às sete populações de *M. paranaensis*, com ocorrência de segregação de 31%. Fonte de resistência em cafeeiros arábicos derivados da introgressão de genes de *C. canephora*, como o Híbrido de Timor já foi identificada para a espécie *M. paranaensis* (LASHERMES et al., 1999; GONÇALVES e SILVAROLLA, 2007; RIBEIRO et al., 2005). A resistência genética desse acesso já havia sido relatada em estudo anterior, mas somente testado para uma população de *M. paranaensis* (PERES, 2013), no entanto, o estudo confirma a resistência genética nesse acesso do Híbrido do Timor para a espécie *M. paranaensis*, e reafirma a existência de segregação para essa característica assim como outros autores (GONÇALVES e SILVAROLLA, 2007; RIBEIRO et al., 2005). O HT é um híbrido que se originou a partir de um cruzamento natural entre *C. arabica* e *C. canephora*, sendo que sua resistência é determinada por um gene principal de *C. canephora*, e para o qual foi identificado o locus *Mex-1* (NOIR et al., 2003). Apesar da ocorrência de segregação, ainda é considerada uma valiosa fonte de resistência aos NGs, e promissor em programas de melhoramento genético visando resistência a esse grupo de nematoides (SALGADO et al., 2002), pois essa ocorrência se deve possivelmente a

pequena taxa de cruzamentos que pode ocorrer em híbridos (CHARRIER e BERTRAUD, 1985).

Apesar de existirem fontes de resistência a *M. paranaensis*, poucas são as cultivares de café arábica resistentes. Até o momento a cultivar IPR 100, obtida a partir da hibridação da cultivar Catuaí Vermelho e da seleção BA10, com introgressão de genes de *C. liberica* (SERA et al., 2007; SHIGUEOKA, 2014) é a única cultivar de *C. arabica* resistente a *M. paranaensis* registrada, e atualmente disponível. A cultivar IPR 100 foi utilizada neste estudo como uma das cultivares resistentes, e essa característica foi certificada nos baixos valores do fator de reprodução para todas as populações de *M. paranaensis*, se apresentando como altamente resistentes na reação final, embora tenha ocorrido uma segregação de 26%. Estes resultados corroboram com os estudos anteriores que afirmam a resistência da cultivar a *M. paranaensis* (MATA et al., 2000; SERA et al., 2007; ITO et al., 2008; SERA et al., 2009) e que provavelmente, a fonte de resistência é originada de *C. liberica* (GONÇALVES e SILVAROLLA, 2007). Apesar de diversos trabalhos relatarem a resistência da cultivar IPR 100 aos NGs, no entanto, uma pequena porcentagem de plantas segregantes para essa característica tenha ocorrido (SERA et al. 2007), contrariando estudos de não ocorrência de segregação na cultivar IPR 100 (PERES, 2013; SHIGUEOKA, 2014). Neste estudo, constata-se a ocorrência de segregação da cultivar IPR nos sete tratamentos das populações de *M. paranaensis*, com cerca de uma planta suscetível segregante por tratamento, e isto pode ter ocorrido devido à taxa de fecundação cruzada natural que ocorre em *C. arabica* (ANDREAZI et al., 2013), indicando possivelmente que a resistência a *M. paranaensis* não está em condição homozigótica. Isso indica que esses genótipos não estão estáveis e, que ainda há variabilidade dentro dos materiais para a resistência genética em cafeeiro (PERES, 2013). Vários trabalhos demonstraram que existe segregação em progênies de cafeeiros, mesmo em gerações avançadas, tanto para a característica de resistência aos NGs, como para outras características agrônômicas (LIMA et al., 1987 e GONÇALVES et al., 1996).

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

necessários inúmeros ciclos de seleção para a fixação das características de interesse, dificultando, portanto esse processo 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 (FATOBENE, 2014).

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.

Como não se recomenda 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 e FRANCO, 1973), como exemplo porta-enxerto Apoatã IAC 2258, que tem demonstrado resistência a *M. paranaensis* (SERA et al., 2006; FONSECA et al., 2008), além de outras duas espécies importantes para a cafeicultura *M. exigua* (FAZUOLI et al., 1987; SALGADO et al., 2005) e *M. incognita* (FAZUOLI et al., 1987; SERA et al., 2006).

Este estudo reafirma a resistência da cultivar Apoatã IAC 2258 para as diferentes populações de *M. paranaensis*, com ocorrência de pouca segregação. A

resistência do porta-enxerto é derivada do clone T3561 da coleção de germoplasma do CATIE da Costa Rica (BERTRAND e ANTHONY, 2008), mas sabe-se que apesar da resistência genética aos NGs, existem alguns inconvenientes do uso de porta enxertos em comparação aos cultivares de *C. arabica*, como a segregação para suscetibilidade (cerca de 10 a 15%), devido à fecundação cruzada da espécie *C. canephora* (GONÇALVES e SILVAROLLA, 2007). Pode ocorrer, também, quebra do cavaleiro na região da enxertia, com maior porcentagem de replantio (GONÇALVES e SILVAROLLA, 2007), além do custo das mudas enxertadas ser maior quando comparado com mudas de pé franco restringindo sua utilização (BERTRAND e ANTHONY, 2008). No entanto, a utilização de porta-enxertos, no Brasil, tem permitido a sobrevivência e competitividade da cafeicultura em regiões infestadas por *Meloidogyne* (CAMPOS e VILLAIN, 2005). Por isso, 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 (CAMPOS e VILLAIN, 2005).

O conhecimento da diversidade genética de *M. paranaensis* neste estudo contribuirá de uma maneira geral com os programas de melhoramento genético, que têm encontrado um grande entrave ao realizar os ‘screenings’ para resistência a *Meloidogyne* spp., que é a variabilidade patogênica de várias populações do nematoide dentro da mesma espécie (GUIMARÃES et al., 2002) e a ocorrência de mais de uma espécie de *Meloidogyne* na mesma área (CARNEIRO et al., 2005). A resistência genética a diferentes populações de *M. paranaensis* parece ser mais frequente em *Coffea* spp. do que a resistência a diferentes populações de *M. incognita*, como foi demonstrado no presente estudo e no trabalho realizado por Lima et al. (2015a).

É indiscutível a importância do melhoramento genético do cafeeiro como ferramenta de suporte para seleção e obtenção de cultivares superiores, seja para produtividade ou para outras características, como no caso do presente trabalho, resistência a *M. paranaensis*. A demanda por medidas eficazes e ambientalmente aceitáveis no manejo dos NGs tem sido detectada entre os produtores e pesquisadores, que demonstram a necessidade de alternativas tecnicamente viáveis, para sustentabilidade da cultura cafeeira nas propriedades infestadas. Acredita-se que as cultivares resistentes de cafeeiros deste estudo apresentem um grande potencial para uso em programas de melhoramento genético, pois foram consideradas variações

intraespecíficas, portanto são promissoras na obtenção de gerações avançadas desses materiais, para alcançar a estabilidade genotípica para essa característica de resistência e futuro lançamento de outras cultivares resistentes.

5. CONCLUSÕES

- ✓ Apesar da existência de três perfis enzimáticos típicos da espécie *M. paranaensis* (Est P1, P2 e P2a), uma baixa variabilidade genética foi encontrada (RAPD, AFLP), e somente a população da Guatemala (Par 3) apresentou divergência genética em relação às demais.
- ✓ Os marcadores moleculares de regiões distintas do rDNA foram altamente conservados para as diferentes populações de *M. paranaensis*, mostrando que se trata de uma espécie coesa.
- ✓ Na reação das hospedeiras diferenciadoras, todas as populações de *M. paranaensis* se comportaram como a população da descrição da espécie, ou seja, reação igual a *M. javanica*.
- ✓ As cultivares Catuaí IAC 81 e Mundo Novo 379-19 foram altamente suscetíveis nos dois ensaios, sendo as populações Par 3 da Guatemala e Par 2 de Herculândia-SP as mais agressivas às duas cultivares, respectivamente.
- ✓ A população de *M. paranaensis* da Guatemala (Par 3) apresentou divergência genética em relação às demais e foi uma das mais agressivas aos cultivares padrões de suscetibilidade: Catuaí IAC 81 e Mundo Novo 379-19.
- ✓ Nenhuma população de *M. paranaensis* foi virulenta às diferentes cultivares testadas e todas se mostraram altamente resistentes ou resistentes: Apatã IAC 2258, CV x Amphillo MR2161(E1 16-5III), IPR 100 e Híbrido do Timor UFV 408-01 (E1 6-6 II).
- ✓ As cultivares Apatã, IPR 100, Híbrido do Timor UFV 408-01 (E1 6-6 II) e Amphillo CV x Amphillo MR2161(E1 16-5III) foram resistentes às sete populações de *M. paranaensis*, apresentando segregação de 15%, 26%, 31% e 0%, respectivamente.

6. REFERÊNCIAS

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.; JUNIOR, V. M. 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**, 8. Salvador, BA. Anais... Brasília: Embrapa-café, 2013.

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.

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.; 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, 2008. p.165-190.

BOISSEAU, M.; ARIBI, J.; SOUSA, F. R. de, 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.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, 1987.

BOTELHO, C. E.; REZENDE, J. C.; CARVALHO, G. R.; CARVALHO, A. M.; ANDRADE, V.T.; BARBOSA, C. R. Adaptabilidade e estabilidade fenotípica de

cultivares de café arábica em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.12, p.1404-1411, 2010.

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, 2008. p.103-127.

CAMPOS, V.; VILLAIN, L. Nematode parasites of *Coffee* and *Cocoa*. In: LUC, M.; SKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Eds). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**, 2.ed. CABI Bioscience: UK, 2005. p. 529-580.

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

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

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

CARNEIRO, R.M.D.G.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A.; GONÇALVES, W. Identificação e caracterização de *Meloidogyne* spp. em cafeeiro nos Estados de São Paulo e Minas Gerais através do fenótipos das esterases e SCAR-PCR Multiplex. **Nematologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 33-41, 2005.

CARNEIRO, R.M.D.G.; COFCEWICZ E. T. The taxonomy of *Meloidogyne* spp. from coffee. In: SOUZA, R.M. (Ed). **Plant parasitic nematodes of coffee**. New York, USA: APS Press & Springer, 2008. p. 87-122.

CARNEIRO, R.M. D. G.; COSTA, S. B.; SOUSA, F. R.; SANTOS, D. F.; ALMEIDA, M. R. A.; SANTOS, M. F. A.; SIQUEIRA, K.M.S.; TIGANO, M.S.; FONSECA, A.F.A. Reação de cafeeiros 'conilon' a diferentes populações de *Meloidogyne* spp. In: **Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil**, 6. Vitória, ES. Anais....Brasília: Embrapa café, 2009.

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

CARVALHO, A. M.; MÔNACO, L. C.; FAZUOLI, L. C. Melhoramento do café: estudos de progênies e híbridos de café Catuaí. **Bragantia**, v.38, n. 22, p. 202-216, 1979.

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.

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

CASTRO, J.M.C.; NAVES, R.L.; CAMPOS, V.P. Ocorrência de *Meloidogyne paranaensis* em cafeeiro na região Alto Paranaíba em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.565. 2003.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: CLIFFORD, M.M.; WILSON, K.C. (Eds.) **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. Westport: AVI, 1985. p.13-47.

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

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

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

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

CORREA, V.R.; MATTOS, V.S.; SANTOS, M.F.A.; TIGANO, M.S.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R.M.D.G. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* and development of a species-specific SCAR marker for its diagnosis. **Plant Pathology**, v. 63, p. 476-483, 2014.

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

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.

FATOBENE, B.J.R. **Seleção de cafeeiros com resistência múltipla a nematoides do gênero *Meloidogyne***. Campinas, SP: Instituto Agronômico curso de Pós-Graduação em agricultura tropical e subtropical, Universidade de Campinas, 2014; 82f. Tese de Doutorado.

FAZUOLI, L. C.; LIMA, M. M. A.; GONÇALVES, W.; COSTA, W. M. Melhoria do cafeeiro visando resistência a nematoides: utilização de porta-enxerto resistente. In: Congresso paulista de agronomia, 6, Piracicaba. **Anais...** São Paulo, AEASP. p. 171-180, 1987.

FAZUOLI, L. C.; FILHO-GUERREIRO, O; SILVAROLLA, M.B.; MEDINA-FILHO, H.P.; CARVALHO, A. Avaliação das cultivares Mundo Novo, Bourbon Amarelo e Bourbon Vermelho de *Coffea arabica* em Campinas, SP. **Bragantia**. v. 64, n.4, p. 533-546, 2005.

FAZUOLI, L.C. **Metodologias, critérios e resultados da seleção em progênies do café Icatu com resistência à *Hemileia vastatrix***. Campinas, SP: Universidade de Campinas, 1991; 322f. Tese de Doutorado.

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

FONSECA, A. F. A. da.; FERRÃO, R. G.; FERRÃO, M. A. G.; VOLPI, P. S.; VERDIN FILHO, A. C.; FAZUOLI, L. C. Cultivares de café Robusta. In: CARVALHO, C. H. S. de. **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, 2008. p.255-280.

FERRÃO, M. A. G.; FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; VERDIN FILHO, A. C.; VOLPI, P. S. Origem, dispersão geográfica, taxonomia e diversidade genética de *Coffea canephora*. In: FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; BRAGANÇA, S. M.; FERRÃO, M. A. G.; MUNER, L. H. **Café conilon**. Vitória: Incaper, 2010. p. 65-92.

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.; LIMA, M.M.A.; SILVAROLLA, M.B. Reações de cafeeiros às raças 1, 2 e 3 de *Meloidogyne incognita*. **Summa Phytopathologica**, v. 22, n. 2, p.172-177, 1996.

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

GONÇALVES, W.; SILVAROLLA, M. B. A luta contra a doença causada pelos nematoides parasitos do cafeeiro. **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 54-56. 2007.

GUIMARÃES, R.J.; MENDES, A.N.G.; SOUZA, C.A.S. **Cafeicultura**. Lavras: UFLA. FAEPE, 2002. 317p.

HARTMAN, R.M.; SASSER, J.N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: BARKER, K.R.; CARTER, C.C.; SASSER, J.N. (Eds.). **An advanced treatise on Meloidogyne**. Methodology. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, v. 2, 1985. p. 69-77.

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

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

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

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

HUSSEY, R.S.; JANSSEN, G.J.W. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: STARR, J.L.; COOK R.; BRIDGE, J. **Plant Resistance to Parasitic Nematodes**. CAB International, Wallingford. 2002, pp. 43-70.

ITO, D. S.; MACHADO, A. C. Z.; SILVA, S. A.; DORIGO, O, F.; GARDIANO, C. G.; MATTEI, D. Levantamento parcial de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiros na região do arenito (noroeste) do Estado do Paraná. In: Simpósio de pesquisa dos cafés do BRASIL, 8. Salvador, **Anais...** Brasília: Embrapa-café, 2013.

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

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

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, Campinas. **Trabalhos Apresentados...** Rio de Janeiro: IBC, p.87-88, 1987.

LIMA, E. A. de.; FURLANETTO, C.; SOUSA, M. G.; MENEZES, A. C. M.; SOUSA, F. R.de.; ALMEIDA, M. R. A.; SERGIO JÚNIOR, A.; FERRÃO, M. A.; CARNEIRO, R. M. D.G. Resistência múltipla e resposta de hipersensibilidade do cafeeiro 'Conilon

14' a *Meloidogyne* spp.. In: Simpósio de pesquisa dos cafés do BRASIL, 8. 2013, Salvador, BA. **Anais...** Brasília: Embrapa-café, 2013.

LIMA, E.A; FURLANETTO, C.;NICOLE, M.; GOMES, A.C.M.M.; ALMEIDA, M.R.A.; ALDEMIRO,J.J.; CORREA, V.R.; SALGADO, S.M.; FERRÃO, M.A.G.; CARNEIRO, R.M.D.G. The multi-resistant reaction of drought –tolerant coffeea “conilon Clone 14” to *Meloidogyne* spp. and late hypersensitive-like response in coffeea canephora. **Nematology**, v.105, n.6, p.805-814, 2015a.

LIMA, E.A.; CARNEIRO, F.A.; REGO, E.C.S.; COSTA, T.S.; COTTA, M.G.; JORGE-JUNIOR, A.; MARRACCINIS, P.; CARNEIRO, R.M.D.G.; ANDRADE, A.C. Caracterização molecular e seleção de genes candidatos à resistência do clone 14 de *Coffea canephora* conilon a *Meloidogyne paranaensis*. In: Simpósio de pesquisa dos cafés do BRASIL, 9. 2015, Curitiba, PR, **Anais...** Brasília: Embrapa-café, 2015b.

MACHADO, A.C.Z.; ITO, D.S.; SILVA, S.A.; DORIGO, O. F. Agressividade de populações de *Meloidogyne paranaensis* em cafeeiro ‘Mundo Novo’. In: **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 8. Salvador, BA. Anais... Brasília: Embrapa-café, 2013.

MATTOS, V.S. **VARIABILIDADE GENÉTICA E AGRESSIVIDADE A SOJA [*Glycine max* (L.) MERRILL] DE POPULAÇÕES DE *Meloidogyne* spp. DO CERRADO E DE ÁREAS DE CULTIVO**. Brasília, DF: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013; 81f. Dissertação de Mestrado.

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.

MOENS, M.; PERRY, R.; STARR, J. *Meloidogyne* species- a diverse group of novel and important plant parasites. In: PERRY, R. N; MOENS, M.; STARR, J. L. (Eds.). **Root-knot nematodes**. Wallingford: UK. 2009, p. 483.

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

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

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

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

PERES, A.C.J. **Seleção de genótipos de Coffea arabica L. com resistência a Meloidogyne spp. em condições de casa de vegetação e a campo**. Brasília, DF: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013; 93f. Dissertação de Mestrado.

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

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.

RIBEIRO, R.C.F.; PEREIRA, A.A.; OLIVEIRA, C.F., LIMA, R.D. Resistência de progênies de híbridos interespecíficos de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* a *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.29, n.1, p.11-16, 2005.

ROBERTS, P. A.; THOMASON, I. J. A review of variability in four *Meloidogyne* spp. measured by reproduction on several hosts including *Lycopersicon*. **Agricultural Zoology Reviews**, v. 3, p. 225–252, 1989.

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, pp. 25-41.

SÁ, L.A. **Seleção de cafeeiros em área infestada por *Meloidogyne paranaensis***. Lavras : MG. Universidade Federal de Lavras, 2013; 73 f. Dissertação de Mestrado.

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

SALGADO, S. M. L.; CAMPOS, V. P.; RESENDE, M.L.; KRYZANOWSKI, A.A. Reprodução de *Meloidogyne exigua* em cafeeiros IAPAR 59 e Catuaí. **Nematologia Brasileira**, v. 26, p. 205-207, 2002.

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

SALGADO, S.M.L. de; CARNEIRO, R.M.D.G.; PINHO, R.S.C. de. Aspectos técnicos dos nematóides parasitas do cafeeiro. **Boletim Técnico**. v.98. Lavras: EPAMIG, 2011. p.60.

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.

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

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

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

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

SERA, G.H.; SERA, T.; MATA, J.S.; ALEGRE, C.R.; FONSECA, I.C.B.; ITO, D.S.; KANAYAMA, F.S.; BARRETO, P.C. Reaction of coffee cultivars Tupi IAC 1669-33 and IPR 100 to nematode *Meloidogyne paranaensis*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, p. 293-298, 2009.

SHIGUEOKA, L. H. **Genótipos de café arábica com resistência ao nematoide *Meloidogyne paranaensis***. Londrina, PR: Universidade de Londrina, 2014; 51f. Dissertação de mestrado.

SILVA, E.H.; MATTOS, V.S.; FURLANETTO, C.; GIBAND, M.; BARROSO, P.A.V.; MOITA, A.W.; JORGE-JUNIOR, A.; CORREA, V.R.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R.M.D.G. Genetic variability and virulence of *Meloidogyne incognita*

populations from Brazil to resistant cotton genotypes. **European Journal of Plant Pathology**, v. 139, n. 1, p. 195-204, 2014.

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

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

SWOFFORD, D.L. **PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1998.

TENENTE, G.C.M.V.; DE LEY, P.; DE LEY, I.T.; KARSSSEN, G.;VANFLETEREN, J.R. Sequence analysis of the D2/D3 region of the large subunit rDNA from different *Meloidogyne* isolates. **Nematropica**, v. 34, p. 1–12, 2004.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The ClustalX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.25, p. 4876-4882, 1997.

TRUDGILL, D.L.; BLOK, V.C. Apomitic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, p. 53-77, 2001.

TRIANAPHYLLOU, A.C. Cytogenetics, taxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. In: CARTER,C.C.; SASSER, J. N. (Eds.). **An advanced treatise on Meloidogyne**, vol. I, Biology and control. Raleigh, North Carolina State University Graphics, 1985, p. 113 – 126.

TRANTAPHYLLOU, A.C. Genetics of nematode parasitism on plants. In: VEECH, J.A.; DICKSON D. (Eds.). **Vistas on Nematology**. Society of Nematologists, Hyattsville (MD) EUA, 1987, p. 354-363.