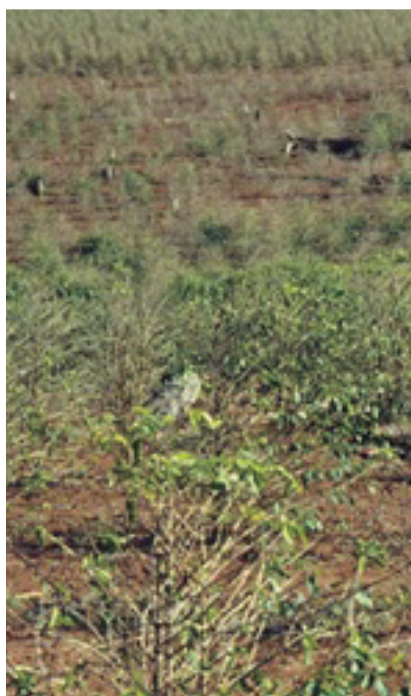


Variabilidade genética e agressividade de
populações de *Meloidogyne paranaensis*
em genótipos de *Coffea* spp.



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
340**

**Variabilidade genética e agressividade de
populações de *Meloidogyne paranaensis*
em genótipos de *Coffea* spp.**

*Marcilene Fernandes Almeida dos Santos
Vanessa da Silva Mattos
Joelma Gardênia Pereira da Silva
Antônio Williams Moita
Sônia Maria de Lima Salgado
Philippe Castagnone-Sereno
Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro*

***Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2018***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-4700
Fax: +55 (61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Marília Lobo Burle

Secretário-Executivo
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Membros
*Antonietta Nassif Salomão; Bianca Damiani
Marques; Diva Maria Alencar Dusi; Francisco
Guilherme V. Schmidt; João Batista Tavares da
Silva; João Batista Teixeira;
Maria Cléria Valadares Inglis; Rosameres
Rocha Galvão; Tânia da Silveira Agostini Costa*

Supervisão editorial
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Revisão de texto
Regina Maria D. G. Carneiro

Normalização bibliográfica
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Tratamento das ilustrações
Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Adilson Werneck

Foto da capa
*Rui Gomes Carneiro (área infestada por
Meloidogyne paranaensis em Astorga-PR)*

1ª edição
1ª impressão (ano): tiragem

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Variabilidade genética e agressividade de populações de *Meloidogyne*
paranaensis em genótipos de *Coffea* spp. / Marcilene Fernandes Almeida dos
Santos ... [et al.] - Brasília, DF : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,
2018.

52 p. il. color. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / Boletim de
Pesquisa Desenvolvimento, 340)

ISSN: 0102-0110

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: World Wide Web

1. Marcadores moleculares. 2. Nematóide das galhas. I. Santos, Marcilene
Fernandes Almeida dos. II. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Sumário

Resumo4

Abstract6

Introdução.....7

Material e Métodos9

Resultados e Discussão14

Conclusões.....32

Referências33

Variabilidade genética e agressividade de populações de *Meloidogyne paranaensis* em genótipos de *Coffea* spp.

Marcilene Fernandes Almeida dos Santos¹

Vanessa da Silva Mattos²

Joelma Gardênia Pereira da Silva³

Antônio Williams Moita⁴

Sônia Maria de Lima Salgado⁵

Philippe Castagnone-Sereno⁶

Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro⁷

Resumo – *Meloidogyne paranaensis* é uma das espécies de nematoides das galhas mais destrutivas ao 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 e mostrou uma divergência genética na população de perfil P2a da Guatemala em relação às populações do Brasil (Est P1 e P2). Essa população da Guatemala 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

¹ Bióloga, Pós Doc, bolsista do INCT/Café/CNPq na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,

² Agrônoma, Pós Doc, bolsista do CNPq na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Bióloga, mestre, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Matemático, mestre, pesquisador da Embrapa Hortaliças

⁵ Agrônoma, doutora, pesquisadora da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais

⁶ Agrônomo, doutor, pesquisador do Instituto do INRA, Sophia Antipolis - FR.

⁷ Agrônoma, doutora, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

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 2 Herculândia-SP, Par 3 Guatemala e Par 4 Rolândia- PR foram as mais agressivas a ‘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 Apoatã 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 a agressividade à 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: CV x Amphillo MR2161(E1 16-5 III), Apoatã IAC 2258, Híbrido do Timor UFV 408-01 (E1 6-6 II) e IPR 100, apresentando uma segregação de 2,4%, 12%, 26% e 29%, respectivamente. Esses resultados são promissores, pois validam a resistência de diferentes fontes genéticas de *Coffea* spp. a *M. paranaensis*, mostrando que esses genes podem ser incorporados em cultivares comerciais melhoradas ou utilização como porta enxertos, como é caso de ‘Apoatã’ e ‘Clone 14’.

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

Genetic variability and aggressiveness of *Meloidogyne paranaensis* populations on *Coffea* genotypes

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 on *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 Coffee genotypes. In the first assay using different *M. paranaensis* populations against *C. arabica* cultivars (cv. Catuaí IAC 81) and *C. canephora* (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 were observed. None of the populations was virulent to the resistant Coffee genotype 'Clone 14', and populations Par 2 Herculândia-SP, Par 3 Guatemala 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), 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 cv. Mundo Novo 379-19. No *M. paranaensis* populations was virulent to all four resistant cultivars: Catuaí Vermelho x Amphillo MR2161 (E1 16-5 III), Apoatã IAC 2258, Timor Hybrid UFV 408-01 (E1 6-6 II) and IPR 100, exhibiting segregation rates of 2,4%, 12%, 26% e 29%, 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'.

Key words: *Coffea* spp., molecular markers, *Meloidogyne* spp., root-knot nematodes, resistance.

Introdução

Dentre os inúmeros problemas fitossanitários que a cometem 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* Carneiro et al. (1996), destaca-se entre as demais *Meloidogyne* spp. devido à agressividade de seu parasitismo, com severa destruição do sistema radicular. 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 *M. paranaensis*, 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 se tratar de uma tecnologia econômica e ambientalmente segura; além disso, possibilita a manutenção de populações do nematoide abaixo do nível de dano econômico (Gonçalves e Silvarolla, 2001).

Fontes de resistência a *M. paranaensis* foram identificadas na espécie diploide *C. canephora* Pierre (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') e portadora de genes de *C. liberica* Bull. Ex. Hiern (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 do porta-enxerto Aboatã 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 existência de variabilidade intraespecífica nas populações de *Meloidogyne* spp. (Carneiro e Cofcewicz, 2008) 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 essa razão, o desenvolvimento de técnicas moleculares abriu novas perspectivas quanto aos estudos de diversidade genética dos NGs. A partir de análises moleculares, tem se obtidos 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 de fontes de resistência durável a esses nematoides. Com base nas análises de marcadores moleculares, 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.

Em cafezais no Estado de São Paulo foi observado que existia uma grande diferença nas características dos cafeeiros infectados por *M. paranaensis*, levando a hipótese de que existia uma certa variabilidade na agressividade das populações do nematoide. Objetivou-se estudar a variabilidade genética intraespecífica de populações de *M. paranaensis*, provenientes de diferentes regiões geográficas e avaliar a agressividade ou virulência de diferentes populações de *M. paranaensis* em genótipos de *Coffea* spp. previamente estudados quanto à resistência e suscetibilidade ao nematoide das galhas.

Material e Métodos

Identificação das populações de *Meloidogyne* spp.

Foram utilizadas 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* (KP995311.1) nas análises filogenéticas.

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

Populações ^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.

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).

Tabela 2: Características dos marcadores SCAR espécie-específicos para *Meloidogyne paranaensis* (parC09F/R), *M. incognita* (incK14F/R) e *M. exigua* (exD15F/R), segundo protocolo de 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	

As populações de *M. paranaensis* foram multiplicadas em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L., 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). 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).

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 *Meloidogyne* que parasitam o café com maior frequência no Brasil, *M. paranaensis* (par C09 F/R), *M. incognita* (Kofoid e White, 1919), Chitwood, 1949, (inc K 14F/R) e *M. exigua* Goeldi, 1887 (ex D15 F/R) (Tabela 2), segundo a metodologia descrita por Randig et al. (2002), a fim de validar esses marcadores moleculares e confirmar a identificação dos isolados.

Análise da diversidade genética com marcadores PCR-RAPD

Amostras de DNA de cada população foram amplificadas pela técnica de RAPD conforme Randig et al. (2002). Foram utilizados 30 primers selecionados em estudos anteriores: A4, A10, A12, A14, AB03, AB04, AQ12, AS08, B6, B12, D13, E15, E18, G4, G5, G13, H01, K1, K16, K19, K20, L08, M10, M20, N7, P1, P5, R4, R7 e R8 (Tigano et al., 2010; Santos, 2012). Os fragmentos amplificados foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose, corados com brometo de etídio (0,2 µg/ ml) e visualizados sob luz UV.

Análise da diversidade genética com o marcador PCR-AFLP

A metodologia consiste em quatro etapas de acordo com o protocolo descrito por Suazo e Hall (1999). Foram utilizados 13 primers no estudo, e os fragmentos amplificados foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose-synergel, sendo 0,7% agarose e 0,4% Synergel (Diversified Biotech Synergel™), corados com brometo de etídio (0,2 µg/ml) e visualizados sob luz UV.

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) com o programa PAUP* v 4.0 (Swofford, 2002).

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).

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 foram lavadas e coradas com Floxina B a 0,0015% (15 mg/litro de água), para a quantificação do número de galhas e massas de ovos, e posteriormente o fator de reprodução.

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).

Avaliação da resistência de genótipos de *Coffea* spp. a populações de *Meloidogyne 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 Clone 14 (*C. canephora*). No ensaio 2, foram avaliados cinco genótipos: Catuaí Vermelho x Amphilho MR2161 (E1 16-5 III) (*C. arabica*), Apoatã 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 Agronômico de Campinas). Plântulas de 15-30 cm de comprimento foram transferidas para vasos de 3 l,

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 10000 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 = 10000 e 5000 referente aos ensaios 1 e 2 respectivamente. As médias do FR foram transformadas em $\log_{10}(x+1)$ 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 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 ($FR > 2$). 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> (Catuaí IAC 81)*
	<i>C. canephora</i> (Clone 14)**
2	<i>C. arabica</i> Catuaí Vermelho x Amphillo MR2161 (E1 16-5 III)**
	<i>C. canephora</i> Apoatã IAC 2258**
	<i>C. arabica</i> Híbrido do Timor UFV 408-01 (E1 6-6 II)**
	<i>C. arabica</i> (cv. IPR 100)**
	<i>C. arabica</i> (cv. Mundo Novo 379-19)*

Controle: *Suscetível e **Resistente.

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 $\log 10(x + 1)$.

Resultados e Discussão

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, 2005) 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 (Figura1A), o fenótipo Est P2 (Rm: 1,0 e 1,32) nos isolados Par 1 e Par 2 (Figura1B), enquanto o fenótipo Est P2a (Rm: 0,9 e 1,32), somente detectado na população Par 3 originária da Guatemala (Figura1C). É importante ressaltar que a banda principal de *M. paranaensis* (Rm:1,32) está sempre presente nos dois variantes Est P2 e Est P2a.

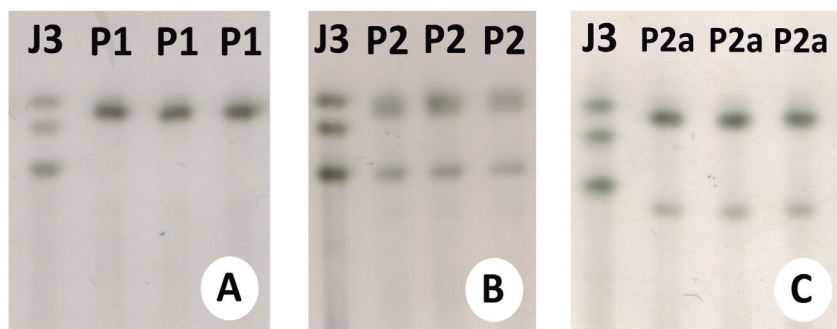


Figura 1: Fenótipos de esterase (Est) de populações de *Meloidogyne paranaensis*. A: Par 4-7 (Est P1); B: Par 1 e Par 2 (Est P2); C: Par 3 (Est P2a). *M. javanica* (Est J3) padrão de referência.

Análise molecular: marcadores SCAR

Na análise de 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 com base nos diferentes perfis de esterase encontrados nessas populações.

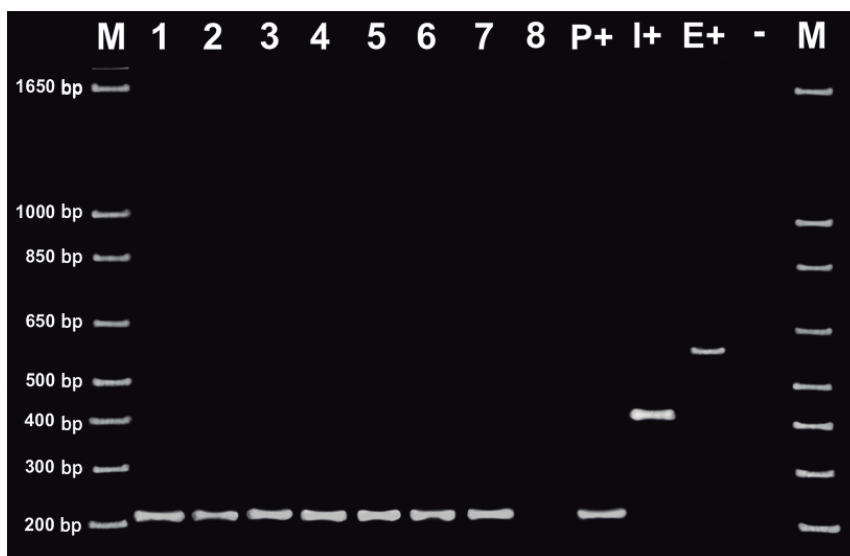


Figura 2: Padrões de amplificação de PCR-multiplex em onze populações de *Meloidogyne* spp. gerados a partir dos marcadores específicos SCAR (Randig et al., 2002). (1-7): *M. paranaensis*, (8): *M. enterolobii* e controles positivos (P +, I+ e E+) respectivamente, para *M. paranaensis*, *M. incognita*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

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 4500 pb (Figura 3A) e para AFLP variou de 10 a 30 e tamanho de 200 a 5000 pb (Figura 3B).

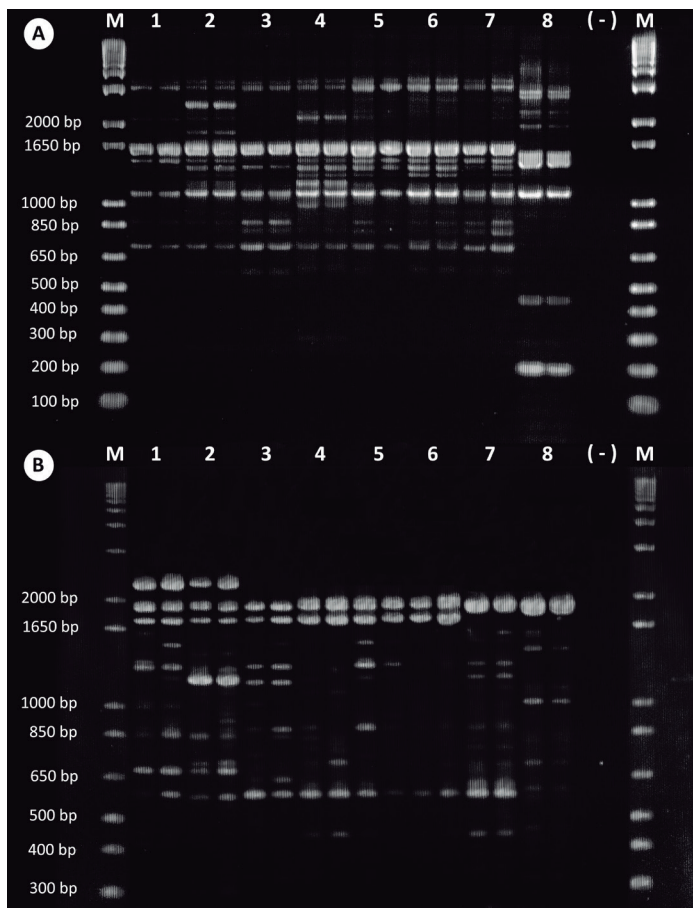


Figura 3: Variabilidade genética de populações de *M. paranaensis* analisadas com os primer RAPD AQ12 (A) e AFLP 06 (B). (1-7): *M. paranaensis*, (8): *M. enterolobii* (outgroup), (M): 1kb DNA plus (Invitrogen) e (-): reação controle sem DNA. Cada isolado foi analisado em duplicata.

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).

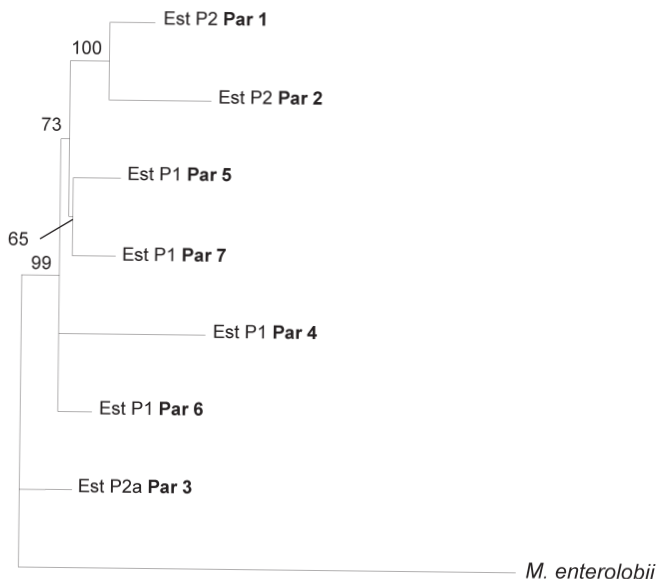


Figura 4: Dendrograma mostrando as relações das populações de *M. paranaensis* usando dados concatenados dos marcadores RAPD e AFLP. Somente valores de bootstrap acima de 50% são mostrados. Os códigos das populações estão na tabela 1.

Reação de diferentes populações de *Meloidogyne paranaensis* em plantas hospedeiras diferenciadoras

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

Agressividade de diferentes populações de *Meloidogyne 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 2 de Herculândia-SP (FR=66,2), Par 3 da Guatemala (FR=53,4), 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=29,1), Par 6 de várias localidades do estado de São Paulo (FR=3,7) e a Par 7 de Franca-SP (FR=8,7) (Tabela 4). Quanto à 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 209,8 g para a resistente, mostrando notórios sintomas causados pelo nematoide no sistema radicular da cultivar suscetível.

No segundo ensaio, foram analisados os mesmos parâmetros do primeiro ensaio, sendo que as plantas foram produzidas a partir de sementes e estas estavam um pouco mais jovens quando foram inoculadas. A cultivar Mundo Novo 379-19 foi usada como testemunha suscetível e apresentou variabilidade quanto à agressividade das diferentes populações testadas, sendo as mais agressivas: Par 2 de Herculândia-SP (FR=76,0), 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=19,0) (Tabela 5).

Com base na variável FR, com exceção da cultivar Mundo Novo 379-19, padrão de suscetibilidade 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 do padrão de suscetibilidade, segundo o teste de médias de Scott-Knott a 5% de probabilidade. A cultivar Apoatã IAC 2258 mostrou-se resistente (R) às 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. A cultivar do cruzamento CV x Amphillo MR2161(E1 16-5III) foi altamente resistente (AR) a todas as populações de *M. paranaensis*. A cv. IPR 100 foi também altamente resistente (AR), apresentando uma planta suscetível (S) segregante, em todos os tratamentos. Para o Híbrido do Timor UFV 408-01(E1 6-6 II), houve diferenças de reação de resistência para as populações de *M. paranaensis*, entre resistente (R) e altamente resistente (AR), com ocorrência de segregação, em cinco dos sete tratamentos estudados: Par 1, 2, 3, 4 e 7.

Em relação aos dois ensaios, 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 (Tabela 6). Quanto à virulência, nenhuma das populações quebrou a resistência nos genótipos: Clone 14, CV x Amphillo MR2161 (E1 16-5III), Apoatã, Híbrido do Timor UFV 408-01 (E1 6-6 II) e IPR 100, sendo que todos apresentaram comprovada resistência às sete populações de *M. paranaensis* testadas. De maneira geral essas cultivares de café resistentes exibiram variação na segregação de 0%, 2,4%, 12%, 26% e 29% sendo Clone 14, CV x Amphillo MR2161(E1 16-5III), Apoatã IAC 2258, Híbrido do Timor UFV 408-01 (E1 6-6 II) e IPR 100 respectivamente.

Quanto ao desenvolvimento dos sistemas radiculares (peso fresco das raízes) pode-se observar que as plantas de café do primeiro ensaio 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 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.

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 fisiológica da espécie *M. paranaensis* (Carneiro et al., 2005).

Na busca por cafeeiros com resistência genética durável aos NGs deve ser considerada 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; Petersen et al., 1997; Randig et al., 2002; Carneiro et al., 2004; Cofcewicz 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 partenogenético mitótico da espécie, que teoricamente gera descendentes clonais (Triantaphyllou, 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 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).

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).

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 três populações de *M. paranaensis* testadas de diferentes perfis enzimáticos (Est P1, Est P2 e Est P2a), 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 a resistência a *Meloidogyne* spp. em cafeeiro (Castro et al., 2003). Mas por outro lado, o uso de hospedeiras diferenciadoras 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), testados com um grande número de populações da espécie. Apesar da existência de fontes de resistência a essa espécie já identificadas na espécie diploide *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 uma cultivar de *C. arabica* foi adicionada 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 portaenxertos de *C. canephora* resistentes (Campos e Villain, 2005).

Neste estudo, considerando as cultivares suscetíveis Catuaí IAC 81 e Mundo Novo 379-18, a populações de *M. paranaensis* da Guatemala (Par 3- Est P2a) com fator de reprodução $FR = 53,4$ 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 filogenéticos e foi uma das mais agressivas. Portanto, embora não haja uma estreita correlação 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 à 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 essas duas variáveis para *Meloidogyne* spp. No caso de *M. exigua* devido à alta variabilidade intraespecífica há maior possibilidade de correlação com a virulência (Muniz et al., 2008, 2009) devido ao modo de reprodução, partenogênese meiótica (Triantaphyllou, 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, uma vez que a espécie possui reprodução por partenogênese

mitótica (Triantaphyllou, 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), no presente estudo nenhuma população foi virulenta às diferentes fontes de resistência aqui estudadas. As espécies partenogenéticas exibem uma alta capacidade de responder às 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 > 30. Enfatizando a 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 de café, pois alia estabilidade à alta produtividade e adaptabilidade a diversos ambientes não infestados por nematoides (Botelho et al., 2010).

Contrariamente, o “Clone 14” foi altamente resistente a todas as populações de *M. paranaensis* com fator de reprodução FR < 1, confirmando a resistência genética do “clone 14” à espécie. No artigo 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 a *Meloidogyne* spp. do cafeeiro, sobretudo a *M. paranaensis* (Carneiro et al. 2009; Ferrão et al., 2010; Fatobene, 2014). Carneiro et al. (2009) já haviam 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*. Segundo Lima et al. (2015a) 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 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 seja 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 agrônômicas tais como tolerância à seca, que é de interesse econômico da cafeicultura, no atual contexto de mudanças climáticas que vêm ocorrendo no 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 por 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 a todas as populações de *M. paranaensis*, com segregação de 2,4%. Confirmando estudos anteriores da resistência genética desse cruzamento à espécie *M. paranaensis*, mas somente avaliado para poucas populações do nematoide (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 *M. paranaensis*, além do grande potencial produtivo das plantas. Salgado et al. (2011) também relataram um bom vigor dos “Amphillos” em área infestada com *M. paranaensis*. Até o momento existem poucos relatos sobre essa cultivar, mas sabe-se que a resistência desse 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 promissora ao melhoramento genético (Gonçalves et al., 1996).

No 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 26%. 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 à 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 29%. 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 seja 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 percentagem 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 estejam 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; Gonçalves et al., 1996).

A clonagem de genótipos heterozigotos superiores, extensivamente utilizada para multiplicação de plantas de culturas como *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 apresentou 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, o porta-enxerto Aboatã 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 Aboatã IAC 2258 para as diferentes populações de *M. paranaensis*, com baixa taxa de segregação (12%). 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 às 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 percentagem 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 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 estudo, 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 do nematoide, 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.

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

Populações ¹ Código ¹	Cultivares ²	Peso fresco das Raízes (g) ³	Nº 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*	203,5	1525,0a	291500	29,1a	S
	Clone 14**	191,3	13,7b	2333,3	0,2b	AR
<i>M. paranaensis</i> Herculândia, SP (Est P2)						
Par 2	Catuai IAC 81*	143,0	1175,0a	162888,9	66,2a	S
	Clone 14**	329,0	0,3b	111,1	0,01b	AR
<i>M. paranaensis</i> Guatemala (Est P2a)						
Par 3	Catuai IAC 81*	143,0	1175,0a	162888,9	66,2a	S
	Clone 14**	329,0	0,3b	111,1	0,01b	AR
<i>M. paranaensis</i> Rolândia, PR (Est P1)						
Par 4	Catuai IAC 81*	189,8	1962,5a	367444,4	36,7a	S
	Clone 14**	149,8	3,2b	472,2	0,0b	AR
<i>M. paranaensis</i> Piumbi, MG (Est P1)						
Par 5	Catuai IAC 81*	128,1	2015,4a	355166,6	35,5a	S
	Clone 14**	190,4	3,5b	500	0,0b	AR
<i>M. paranaensis</i> (Pool de populações) São Paulo, SP (Est P1)						
Par 6	Catuai IAC 81*	183,5	216,5a	37876,6	3,7a	S
	Clone 14**	319,1	7,5b	944,4	0,0b	AR
<i>M. paranaensis</i> Franca, SP (Est P1)						
Par 7	Catuai IAC 81*	130,4	658,9a	87111,11	8,7a	S
	Clone 14**	138,4	7,5b	944,4	0,0b	AR

^a Código das populações de *M. paranaensis*.^b Cultivares referente ao ensaio 1.^c Média do peso fresco das raízes dos genótipos de *Coffea* spp. após inoculação das populações de *M. paranaensis*.^d Os dados são médias de seis repetições, e a população inicial foi de 10000 ovos.^e 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%. CVSem segregação: 18,05% e Fcal: 229,11.

^f 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.

^g (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, *C. arabica* Híbrido de Timor UFV 408-01 (E1 6-6 II), *C. arabica* Catuaí Vermelho x Amphiló MR2161(E1 16-5 III) e *C. arabica* IPR 100 a sete populações de *Meloidogyne paranaensis*.

Cultivares ¹	Peso fresco das Raízes (g) ²	Nº de ovos/g de raiz ^{3,5} (Com segregação) ^{3,4}	Nº de ovos/g de raiz (Sem segregação) ^{3,4}	Fator de Reprodução (FR) (Com segregação) ^{3,5}	Fator de Reprodução (FR) (Sem segregação) ^{3,5}	Reação Final ⁶
<i>M. paranaensis</i> Londrina - PR (Est P2) Par 1						
MN 379-19*	47,7	1993,1	1993,1a	19,0	19,0a	S
Apoatã IAC2258**	6,0	344,8	344,8b	0,3	0,3b	AR
HT (UFV 408-01)**	18,8	1276,6	402,5b	5,9	1,3b	S
C.V x Am MR2161**	19,1	30,4	30,4b	0,1	0,1b	AR
IAPAR 100**	71,1	482,8	41,8b	6,1	0,61b	AR
<i>M. paranaensis</i> Herculândia - SP (Est P2) Par 2						
MN 379-19*	58,8	6511,3	6511,3a	76,1	76,1a	S
Apoatã IAC 2258**	6,0	773,4	773,4b	1,04	1,0b	R
HT (UFV 408-01)**	19,0	855,8	716,9b	2,71	1,9b	R
C.V x AmMR2161**	25,6	181,1	181,1c	0,96	0,9b	AR
IAPAR 100**	68,0	733,6	88,8c	11,68	0,9b	AR
<i>M. paranaensis</i> Guatemala (Est P2a) Par 3						
MN 379-19*	71	7120,2	7120,2a	60,6	60,6a	S
Apoatã IAC 2258**	15,7	129,8	129,8b	0,1	0,1b	AR
HT (UFV 408-01)**	16,2	1405,4	63,7b	3,1	0,2b	AR
C.V x AmMR2161**	15,8	48,0	48,0b	0,2	0,2b	AR
IAPAR 100**	70,0	843,1	21,0c	11,2	0,3b	AR
<i>M. paranaensis</i> Rolândia - PR (Est P1) Par 4						
MN 379-19*	71	3401,6	3401,6a	47,3	47,3a	S
Apoatã IAC 2258**	8,4	929,4	929,4b	0,9	0,9b	AR
HT (UFV 408-01)**	34,6	195,4	28,2c	1,0	0,1b	AR
C.V x Am MR2161**	25,9	77,7	77,7c	0,1	0,1b	AR
IAPAR 100**	121,2	261,4	5,7d	5,3	0,0b	AR
<i>M. paranaensis</i> Piumbi - MG (Est P1) Par 5						
MN 379-19*	43,7	6228,2	6228,2a	56,9	56,9a	S
Apoatã IAC 2258**	11,1	195,9	195,9b	0,2	0,2b	AR
HT (UFV 408-01)**	25,7	63,7	63,7b	0,2	0,2b	AR
C.V x Am MR2161**	29,0	58,5	58,5b	0,2	0,2b	AR
IAPAR 100**	70,4	237,1	21,0c	4,0	0,3b	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*	44,6	4408,3	4408,3a	28,7	28,7a	S
Apoatã IAC 2258**	8,0	929,7	929,7b	1,5	1,5b	R
HT (UFV 408-01)**	21,6	1553,1	607,0b	6,4	0,9b	AR
C.V x Am MR2161**	22,8	36,3	36,3c	0,1	0,1b	AR
IAPAR 100**	121,7	653,8	36,0c	10,6	0,8b	AR

*Cultivares referentes ao ensaio 2.

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

^c Os dados são médias de oito repetições, e a população inicial foi de 5000 ovos.

^d A 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%. CVSem segregação: 49,05% e Fcal: 29,79.

^e A 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%. CVSem segregação: 56,64% e Fcal: 102,94.

^f (S) = Suscetível; (R) = Resistente; (AR) = Altamente Resistente.

* Padrão de suscetibilidade (PS).

** Padrões de resistência (PR).

Tabela 6: Fatores de reprodução (FR) de diferentes populações de *Meloidogyne paranaensis* usadas no estudo para avaliar a agressividade dessas populações à genótipos suscetíveis de *Coffea arabica*: primeiro e segundo ensaios.

Populações/ Fenótipo de Esterase (Est) ^a	Origem	FR	
		‘Catuaí IAC 81’ ^b	‘Mundo Novo’ ^b
Par 1 (P2)	Londrina- PR, Brasil	29,1b	19,0c
Par 2 (P2)	Herculândia-SP, Brasil	66,2a	76,0a
Par 3 (P2a)	Guatemala	53,4a	60,6a
Par 4 (P1)	Rolândia-PR, Brasil	36,7b	47,3b
Par 5 (P1)	Piumbi-MG, Brasil	35,5b	56,9a
Par 6 (P1)	São Paulo-SP, Brasil	3,7c	28,2c
Par 7 (P1)	Franca-SP, Brasil	8,7c	28,7c

^a Isolados usados para avaliar a agressividade das populações de *M. paranaensis* à genótipos de *Coffea arabica*.

^b Valores médios dos fatores de reprodução de oito repetições (n = 6) transformadas em log10 (x+1). As letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott Knott (P < 0,05).

Conclusões

O estudo confirmou que apesar da existência de três perfis enzimáticos típicos da espécie *M. paranaensis* (Est P1, P2 e P2a), uma baixa variabilidade genética foi observada, e somente a população da Guatemala (Par 3) apresentou divergência genética em relação às demais do Brasil.

Nenhuma população de *M. paranaensis* foi virulenta às diferentes cultivares testadas e todas se mostraram altamente resistentes ou resistentes: 'Clone 14 INCAPER', CV x Amphillo MR2161 (E1 16-5III), Apatã IAC 2258, Híbrido do Timor UFV 408-01 (E1 6-6 II) e IPR 100, apresentando segregação de 0%, 2,4%, 12%, 26% e 29% respectivamente.

Houve variação na agressividade entre as populações de *M. paranaensis*, sendo mais agressivas as populações Par 2 (Est P2 - Herculândia-SP) e Par 3 (Est P2a- Guatemala) nas duas cultivares suscetíveis estudadas, e podem ser recomendadas para uso em novas seleções para obtenção de novas fontes de resistência no germoplasma de café. A descrição e caracterização apropriadas de populações altamente agressivas de *M. paranaensis* são importantes não apenas para os programas de melhoramento futuros, mas também para a elaboração de outras estratégias de manejo apropriadas.

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., 2013. Salvador, BA. Anais... Brasília: Embrapa-Café.

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

BERTRAND, B.; PEÑA DURÁN, M. X.; ANZUETO, F.; CILAS, C.; ETIENNE, H.; ANTHONY, F.; ESKES, A. B. Genetic study of *Coffea canephora* coffee tree resistance to *Meloidogyne incognita* nematodes in Guatemala and *Meloidogyne* sp. nematodes in El Salvador for selection of rootstock varieties in Central America. **Euphytica**, 113, p.79-86, 2000.

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. Nematodes 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.; 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.; 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 *coffea* in from Brazil. **Journal of Nematology**, v. 28, p.177-189, 1996.

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. 2009. Vitória, ES. **Anais....Brasília: Embrapa-Café**.

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 dos fenótipos das esterases e SCAR-PCR Multiplex. **Nematologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 33-41, 2005.

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.

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-specifics 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.

CRUZ, C. D. **Programa Genes**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV. 1997. 442 p.

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. 82 f. (**Tese de Doutorado**).

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**).

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.; LIMA, M. M. A.; GONÇALVES, W.; COSTA, W. M. Melhoramento do cafeeiro visando resistência a nematoides: utilização de porta-enxerto resistente. In: **CONGRESSO PAULISTA DE AGRONOMIA**, 6, 1987. Piracicaba-SP. Anais... São Paulo, AEASP. p. 171-180.

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

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 (Ed). **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. (Eds). **Café conilon**. Vitória: Incaper, 2010. p. 65-92.

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**, 22, 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*. Raleigh: **Department of Plant Pathology**, 1985. v.2. 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.

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. (Eds.). **Plant Resistance to Parasitic Nematodes**. CAB International, Wallingford. 2002, pp. 43-70.

ITO, K.; SUGAWARA, T.; SHIROISHI, M.; TOKUDA, N.; KUROKAWA, A.; MISAKA, T.; MAKYIO, H.; YURUGI-KOBAYASHI, T.; SHIMAMURA, T.; NOMURA, N.; MURATA, T.; ABE, K.; IWATA, S.; KOBAYASHI, T. Advanced method for high-throughput expression of mutated eukaryotic membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 371, 2008, pp.841-50.

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, 2013.. Salvador- BA. Anais... Brasília: Embrapa-Café, 2013.

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 CAFEIEIRAS, 14.; CONGRESSO LATINOAMERICANO DE TECNOLOGIA CAFEIEIRA, 1., 1987, **Trabalhos Apresentados...** Rio de Janeiro: IBC, 1987. 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.; FERRAO, M. A. G.; 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. **Sustentabilidade e inclusão Social**. Brasília, DF: Embrapa Café, 2013.

LIMA, E. A.; FURLANETTO, C.; NICOLE, M.; GOMES, A. C. M. M.; ALMEIDA, M. R. A.; JORGE-JÚNIOR, A.; CORREA, V. R.; SALGADO, S. M.; FERRAO, M. A. G.; CARNEIRO, R. M. D. G. The multi-resistant reaction of drought-tolerant coffee 'Conilon Clone 14' to *Meloidogyne* spp. and late hypersensitive-like response in *Coffea canephora*. **Phytopathology**, v. 105, n. 6, p. 805-14, 2015a.

LIMA, E. A. de; CARNEIRO, F. de A.; RÊGO, E. C. S.; COSTA, T. S.; COTTA, M. G.; JORGE JÚNIOR, A.; MARRACCINI, 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. **Anais...** Brasília, DF: 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., 2013, Salvador. **Sustentabilidade e inclusão Social**. Brasília, DF: Embrapa Café, 2013.

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: lapar LN 94066 de "Catuaí x Icatu" em área altamente infestada. In: **SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL**, 1., 2000, Pocos de Caldas. Resumos expandidos. Brasília: Embrapa Café/MINASPLAN, 2000. v.1, p. 515-518.

MATTOS, V. da S. Variabilidade genética e agressividade a soja [*Glycine max* (L.) Merrill] de populações de *Meloidogyne* spp. do Cerrado e de áreas de cultivo. 2013. 81 f., il. **Dissertação** (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

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. (Ed.). **Root-knot nematodes**. Wallingford: CABI, 2009, p. 1-17.

MORAES, M. V. de; FRANCO, C. M. **Método expedito para enxertia em café**. Rio de Janeiro: IBC, 1973.

MUNIZ, M. de F. S.; CAMPOS, V. P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CASTRO, J. M. da C. e; ALMEIDA, M. R. A.; CARNEIRO, R. M. D. G. Diversity of *Meloidogyne exigua* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations from coffee and rubber tree. **Nematology**, v. 10, n. 6, p. 897-910, 2008.

MUNIZ, M. de F. S.; CAMPOS, V. P.; MOITA, A. W.; GONÇALVES, W.; ALMEIDA, M. R. A.; SOUSA, 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, n. 6, p. 370-378, 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. 2013. 94 f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília.

PETERSEN, S. A., FETTER, R. D., NOORDERMEER, J. N., GOODMAN, C. S., DIANTONIO, A. Genetic analysis of glutamate receptors in *Drosophila*

reveals a retrograde signal regulating presynaptic transmitter release. *Neuron*, v. 19, p. 1237-1248, 1997.

RANDIG, O.; BONGIOVANNI, M.; CARNEIRO, R. M.; 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*, v. 29, p. 11-16, 2005.

ROBERTS, P. A. Concepts and consequences of resistance. In: STARR, J. L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant resistance to parasitic nematodes**. Wallingford: CABI Publishing: 2002. p. 25-41.

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.

SÁ, L. A. de. Seleção de cafeeiros em área infestada por *Meloidogyne paranaensis*. 2013. 73 p. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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. de L.; CARNEIRO, R. M. D. G.; PINHO, R. S. C. de. Aspectos técnicos dos nematoides parasitas do cafeeiro. Belo Horizonte: EPAMIG, 2011. 60 p. (**Boletim Técnico**, 98).

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

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

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

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, 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. Progenies of *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. da; ALEGRE, C. R.; FONSECA, I. C. de 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, n. 4, p. 293-298, 2009.

SHIGUEOKA, L. H. Genótipos de café arábica com resistência ao nematoide *Meloidogyne paranaensis*. 2014. 51f. **Dissertação** (Mestrado) - Universidade de Londrina, Londrina.

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. (Ed.). **Plant resistance to parasitic nematodes**. Wallingford: CAB, 2002. p. 1-22.

SUAZO, A.; HALL, H. G. Modification of the AFLP protocol applied to honey bee (*Apis mellifera* L.). **DNA. Bio-Techniques**, v. 26, p. 704-709, 1999.

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

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

TIGANO, M. S.; SIQUEIRA, K. de; CASTAGNONE SERENO, P.; MULET, K.; QUEIROZ, P. R.; SANTOS, M. dos; TEIXEIRA, C.; ALMEIDA, M. R. A.; CARNEIRO, R. M. D. G. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* and development of a SCAR marker for this guava-damaging species. **Plant Pathology**, v. 59, n. 6, 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.

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

TRIANANTAPHYLLOU, A. C. Genetics of nematode parasitism on plants. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. (Ed.). Vistas on nematology. Hyattsville: **Society of Nematologists**, 1987. p. 354-363.

WHITEHEAD, A. C.; HEMMING, J. R. Comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. **Annals of Applied Biology**, v. 55, p. 25-28, 1965.



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*

CGPE: 14775