



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**PRIMEIRO RELATO DE *Meloidogyne izalcoensis* NO BRASIL E
AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ESSA ESPÉCIE E A *M.*
exigua EM GENÓTIPOS DE *Coffea* spp.**

DANIELA ROSSATO STEFANELO

BRASÍLIA – DF

2019

DANIELA ROSSATO STEFANELO

**PRIMEIRO RELATO DE *Meloidogyne izalcoensis* NO BRASIL E AVALIAÇÃO DA
RESISTÊNCIA A ESSA ESPÉCIE E A *M. exigua* EM GENÓTIPOS DE *Coffea* spp.**

Tese apresentada à Universidade de Brasília
como requisito parcial para obtenção do título
de Doutor em Fitopatologia pelo Programa de
Pós-graduação em Fitopatologia.

Orientador

Prof. Juvenil Enrique Cares

Coorientadora

Dra. Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro

BRASÍLIA – DF

2019

*A toda minha família, em especial aos meus queridos
avós Ricardo e Paulina Stefanello e Achilles e Irma Rossato,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é o Senhor de todas as coisas, por nunca ter me abandonado, por ser minha força e luz.

Aos meus pais Luiz Carlos Stefanelo e Lizete Rossato Stefanelo, às minhas irmãs Daiane e Luciana, aos meus cunhados Tiago e Cleiton, às minhas queridas afilhadas Luiza e Cecília e à minha tia Rosalina Stefanelo, por todo carinho, incentivo, auxílio e por serem a minha riqueza.

Aos meus sogros Carlos Guilherme e Maria da Graça, aos meus cunhados Carlos Guilherme e Jonathan e à minha cunhada Ana Júlia pelo carinho e por torcerem por mim.

Ao meu esposo Luís Gustavo, por todo amor, companheirismo e suporte em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis.

À minha mãe e ao meu esposo, que me acompanharam durante meu tratamento de saúde, minha eterna gratidão por me ajudarem a encarar meus processos com fé e dignidade. Agradeço também à minha família, amigos, orientadores e colegas por todo apoio e ajuda.

Aos médicos Rui Gilberto Pereira, Marcos Magnus Sampaio, Nivaldo Dias Romão e Alice Zelmanowicz, à enfermeira Wanessa Oliveira, aos fisioterapeutas Lizete Rossato Stefanelo, Gustavo Sauerbronn e Daiane Stefanelo Scherer e à equipe do Hospital Amparo, de Goiânia, gratidão a todos.

Gratidão aos meus mestres na nematologia, Regina Dechechi Gomes Carneiro e Juvenil Enrique Cares pela orientação nesse trabalho e por todos os ensinamentos, auxílio e suporte, sem os quais não seria possível realizar esse trabalho. Deus os abençoe hoje e sempre.

Aos queridos colegas e amigos da nematologia Carina Lopes, Caio Rosado, Guilherme Feitosa, Jessica Monteiro, Jório Saraiva, Juliane Schmitt, Juliane Carneiro, Kamila Araújo, Larissa Caixeta, Marcilene Fernandes, Márcia Gabriel, Maira Soares, Micheline Amaral,

Nancy Castaneda, Ramon Lira, Raycene Rosa, Reinaldo Pimentel, Vanessa Mattos e demais colegas, muito obrigada pelo companheirismo, auxílio, ensinamentos e pelos bons momentos.

Aos amigos Justino Dias Neto, Sebastião Dias, Carina Lopes, Débora Guterres, Samuel Elias, Pollyane Hermenegildo, Marcilene Fernandes, Vanessa Mattos gratidão pela amizade e auxílio, especialmente nos momentos difíceis.

Aos colegas do GEPPLANT (Grupo de Estudos em Patologia de Plantas do Departamento de Fitopatologia da UnB), o qual tive a alegria de ajudar a criar, e demais colegas do Departamento de Fitopatologia da UnB, muito obrigada pela convivência.

Aos professores e funcionários do departamento de Fitopatologia da UnB, gratidão por todos os ensinamentos e convivência.

Aos pesquisadores Márcio Moretzohn, Lorena Mata, Adriana Custódio e Naiara Carvalho do Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Cenargen pelo auxílio no trabalho com os microssatélites.

À Dra. Sônia Maria Salgado, pesquisadora da Epamig- Lavras /MG, pelo fornecimento das sementes dos genótipos e suporte na pesquisa, muito obrigada.

Aos consultores Durval Costa Souza, José do Espírito Santo, Marcos Alvarenga e Paulo Roberto Barbosa pelo auxílio nos trabalhos de campo.

À Universidade do Estado da Bahia, campus IX – Barreiras, pela concessão de licença, e aos meus colegas e alunos.

Aos amigos de Barreiras, Viviany e Cléber, Sandra e Maria Clara (afilhada), Elvira, Reneu e Pedro Lucas (afilhado), Juarez e Laíse, Giancarlo, Vivian e Denis, e Jandira, obrigada por ajudarem a cuidar da minha casa e do Guri. Aos amigos de Brasília, Wendy e Luciana, Pedro (afilhado), Miguel, Vanderson e Suzane, Christian, Noah, obrigada por cederem suas casas e pela amizade.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão das bolsas.

À EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia e ao Departamento de Fitopatologia da UnB, pelo suporte à minha pesquisa.

Agradecimento especial aos membros da banca examinadora, Professor Adalberto Corrêa Café Filho, Professor Marcelo Fagioli, Pesquisadora Dra. Sônia Maria de Lima Salgado, gratidão por contribuírem com meu trabalho.

A todas as pessoas com as quais eu convivi nesse tempo, vocês foram luz para meu caminho. Gratidão!

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob orientação do Prof. **Juvenil Enrique Cares** e coorientação da **Dra. Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro**, com apoio institucional e financeiro da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

PRIMEIRO RELATO DE *Meloidogyne izarcoensis* NO BRASIL E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ESSA ESPÉCIE E A *M. exigua* EM GENÓTIPOS DE *Coffea* spp.

DANIELA ROSSATO STEFANELO

Tese aprovada em 11 de julho de 2019 por:

Prof. Adalberto Corrêa Café Filho
Examinador Interno

Prof. Marcelo Fagioli
Examinador Externo

Dra. Sônia Maria de Lima Salgado
Examinador Externo

Prof. Juvenil Enrique Cares
Orientador (Presidente)

BRASÍLIA – DF

2019

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO GERAL	v
GENERAL ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVO GERAL	4
REVISÃO DE LITERATURA	5
Cultura do cafeeiro	5
<i>Meloidogyne</i> spp. na cultura do cafeeiro	7
Resistência a <i>Meloidogyne</i> spp. em cafeeiros	13
Resistência genética a <i>Meloidogyne</i> spp.	17
Marcadores microssatélites (SSR) na detecção da resistência genética	21
CAPÍTULO 1 - Primeiro relato da espécie <i>Meloidogyne izalcoensis</i> em cafezal do Estado de Minas Gerais e levantamento de espécies de <i>Meloidogyne</i> presentes em cafeeiros do Triângulo Mineiro	24
RESUMO	25
ABSTRACT	26
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1. Detecção de <i>Meloidogyne izalcoensis</i>	28
2.2. Levantamento de espécies de <i>Meloidogyne</i> no Triângulo Mineiro	29
2.2.1. Descrição das áreas de coleta de amostras de raízes	29
2.2.2. Análise baseada em Marcadores Enzimáticos e Moleculares	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1. Detecção de <i>M. izalcoensis</i>	33
3.2. Identificação de espécies de <i>Meloidogyne</i> em cafeeiros no Triângulo Mineiro	37
4. CONCLUSÕES	43
CAPÍTULO 2 – Resposta de genótipos de cafeeiro à inoculação com <i>Meloidogyne izalcoensis</i> .	44
RESUMO	45
ABSTRACT	46
1. INTRODUÇÃO	47
2. MATERIAL E MÉTODOS	48

2.1. Estudos de resistência genética.....	48
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4. CONCLUSÕES.....	56
CAPÍTULO 3 - Validação de marcadores microssatélites associados a genes de resistência a <i>Meloidogyne exigua</i> em cafeeiro.....	
	57
RESUMO.....	58
ABSTRACT.....	59
1. INTRODUÇÃO.....	60
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
4. CONCLUSÕES.....	68
CONCLUSÕES GERAIS.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Café arábica e conilon: áreas em produção e produção nos principais estados produtores na safra 2018.	6
Tabela 2. Identificação das áreas de coleta de amostras de solo e raízes de cafeeiros nos municípios de Araguari e Indianópolis, região do Triângulo Mineiro, MG.	31
Tabela 3. Marcadores SCAR espécie-específicos para <i>Meloidogyne paranaensis</i> (parC09F/R), <i>M. incognita</i> (incK14F/R) e <i>M. exigua</i> (exD15F/R) (RANDIG <i>et al.</i> , 2002).	33
Tabela 4. Espécies de <i>Meloidogyne</i> parasitando cafeeiros nos municípios de Araguari e Indianópolis - MG, detectadas por esterase e marcadores SCAR-PCR.	37
Tabela 5. Reação de cinco genótipos de cafeeiro a uma população de <i>Meloidogyne izarcoensis</i> , avaliação aos 300 dias após a inoculação.	50
Tabela 6. Reação de cinco genótipos de cafeeiro a uma população de <i>Meloidogyne izarcoensis</i> . Avaliação aos 240 dias após a inoculação.	52
Tabela 7. Sequências dos <i>primers</i> microssatélites utilizados na avaliação de genótipos de cafeeiros a <i>Meloidogyne exigua</i>	62
Tabela 8. Alelos amplificados de seis genótipos de cafeeiros analisados por meio de marcadores microssatélites polimórficos.	64
Tabela 9. Avaliação de marcadores microssatélites (SSRCafé) polimórficos associados à resistência a <i>Meloidogyne exigua</i> em genótipos de cafeeiro.	65

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** a) Fenótipo Esterase de *Meloidogyne izalcoensis* (Est I4) coletada em cafeeiro, Indianópolis, MG, Brasil. *M. javanica* (Est J3) foi usada como referência. b) SCAR-PCR de populações de *M. izalcoensis* de diferentes países: 1) El Salvador, Izalco; 2) Benin, Cotonou; 3) Quênia, Kabete; 4) Tanzânia, Tindini (não houve amplificação de fragmento); 5) Brasil, Indianópolis, MG; C- controle negativo; M- marcador 1 kb DNA Plus. Amostras caracterizadas com primers ar-A12F / R (Correa *et al.*, 2013). 34
- Figura 2.** Sintomas causados por *Meloidogyne izalcoensis* em raízes de cafeeiro (*Coffea arabica*) cv. Mundo Novo. a) visão geral de sistema radicular infectado por *M. izalcoensis*. b-d) Pequenas galhas redondas e massas de ovos externas induzidas pelo nematoide. Seta indica necrose na ponta da raiz. Fotos: Cláudio Bezerra. 36
- Figura 3.** A) Declínio causado por *Meloidogyne exigua* em plantas de cafeeiro cv. Catuaí Amarelo Araguari - MG, B) Raízes de cafeeiro cv. Catuaí Amarelo com pequenas galhas redondas induzidas por *M. exigua*, Araguari – MG, C) Descorticação e rachaduras em raiz infectada por *M. paranaensis*, cultivar IBC 12, Indianópolis –MG, D) Lavoura de cafeeiros da cv. Catuaí Vermelho 99, com severo dano produzido por *M. paranaensis*, Indianópolis- MG. 38
- Figura 4.** Fenótipos de esterase (Est) em diferentes populações de *Meloidogyne* spp. do Triângulo Mineiro. A) *M. exigua* fenótipo de esterase (Est E2); B) *M. paranaensis* fenótipo de esterase (Est P1). *M. javanica* (Est J3) foi usado como padrão de referência..... 39
- Figura 5.** Amplificações SCAR- PCR para *Meloidogyne* spp. parasitas do cafeeiro nos municípios de Araguari e Indianópolis, MG. A) *M. paranaensis* (208 pb) B) *M. incognita* (399 pb), *M. exigua* (562 pb). (-) DNA: controle negativo, M: marcador 1kb DNA Plus..... 40
- Figura 6.** Sintomas típicos de *Meloidogyne izalcoensis* em genótipos de cafeeiro aos 240 dias após a inoculação. A) Catuaí Amarelo 62, B) Porta-enxerto Cv. Apatã IAC2258, C) Híbrido do Timor HT UFV 408-01 MG 0294 pl.1 R1 (6-I-III), D) Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 MG 0179 pl3 R1 (28-2-II), E) Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 MG 0179 pl1 R1 (16-5-III), F) Cv. IPR 100..... 53
- Figura 7.** Marcadores SSR testados com vistas à resistência a *Meloidogyne exigua* em genótipos de cafeeiro: 1 - SSR 20, 2 - SSR 40, 3 - SSR 15, 4 - SSR 4 e 5 - SSR 13. H= Híbrido do Timor 440-10 (resistente), C= Catuaí Vermelho IAC 86. 67

RESUMO GERAL

STEFANELO, Daniela Rossato. **Primeiro relato de *Meloidogyne izalcoensis* em cafeeiros no Brasil e avaliação da resistência a essa espécie e a *M. exigua* em genótipos de *Coffea* spp.** 2019. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Os nematoides das galhas (NGs), *Meloidogyne* spp., estão entre os patógenos mais relevantes à cultura do cafeeiro, pois podem provocar desde redução na produtividade até a morte das plantas. Os objetivos desta pesquisa foram (i) verificar inequivocamente a identidade de uma espécie de *Meloidogyne* em café ainda não registrada no Brasil, (ii) identificar espécies de *Meloidogyne* presentes em cafezais no Triângulo Mineiro, (iii) avaliar a reação dos genótipos de cafeeiros a *M. izalcoensis* e (iv) validar 11 marcadores moleculares microssatélites (SSR), previamente estudados, em diferentes genótipos de cafeeiros, que apresentam genes de resistência a *M. exigua*. Com auxílio dos métodos bioquímicos baseados em eletroforese de isoenzimas (esterase, Est) e marcadores moleculares espécie-específicos (PCR-SCAR) foi possível identificar corretamente *M. izalcoensis* e outras espécies como: *M. exigua*, *M. paranaensis*, *M. incognita*, bem como a ocorrência da mistura dessas espécies em plantio de café. Quanto à reação dos genótipos de cafeeiro a *M. izalcoensis* foram realizados dois experimentos, no primeiro e no segundo experimento foram avaliados os genótipos: Catuaí Amarelo 62 (suscetível), Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 (28-2-II), Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 (16-5-III), IPR100, Híbrido do Timor UFV 408-01 MG (6-I-III) e o porta- enxerto cv. Apoatã IAC 2258. No primeiro experimento foi observada a reação de suscetibilidade dos genótipos Catuaí Amarelo 62, Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 (28-2-II), IPR 100 e Híbrido do Timor UFV 408-01 MG (6-I-III). O genótipo Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 (16-5-III) apresentou-se como moderadamente resistente e o porta-enxerto cv. Apoatã IAC 2258 como resistente. No segundo experimento, os genótipos Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 (28-2-II) e o porta enxerto cv. Apoatã IAC 2258 foram

classificados como moderadamente resistente e resistente, respectivamente. Os demais genótipos apresentaram reação de suscetibilidade ao patógeno. Apenas o porta-enxerto cv. Apoatã IAC foi considerado resistente a *M. izalcoensis*, nos dois experimentos. O estudo de validação dos marcadores microssatélites foi realizado em duas etapas. Na primeira, foram avaliados os 11 marcadores nos genótipos: Híbrido de Timor UFV 408-01 (036), UFV 408-01 (090), IPR100 e 83-3, linhagem do IPR 100 e Catuaí IAC 62 (suscetível). Na segunda etapa, foram avaliados os marcadores SSR Café 4, 13, 15, 20 e 40 nos genótipos Híbrido do Timor 440-10 e Catuaí IAC 86 (suscetível). Na primeira etapa, quatro marcadores mostraram-se polimórficos: SSR Café 4, 13, 15 e 41. Dois marcadores foram monomórficos, SSR Café 14 e 37 e cinco não amplificaram nenhum fragmento: SSR Café 19, 20, 32, 39 e 40. Na segunda etapa, três marcadores SSR Café 13, 20 e 40 mostraram-se polimórficos e SSR Café 15 mostrou-se monomórfico nos genótipos do Híbrido de Timor 440-10 (resistente) e Catuaí vermelho IAC 86 (suscetível). Com base nos resultados, conclui-se que marcadores microssatélites SSR Café 13, 20 e 40 podem ser utilizados com maior segurança apenas na seleção de progênies resistentes resultantes de cruzamentos com o Híbrido de Timor 440-10. Em relação aos outros marcadores mais estudos serão necessários para sua validação.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, resistência a nematoides.

GENERAL ABSTRACT

STEFANELO, Daniela Rossato. **First report of *Meloidogyne izarcoensis* on coffee in Brazil and evaluation of resistance to this species and *M. exigua* in genotypes of *Coffea* spp.** 2019. Thesis (Doctorate in Plant Pathology) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

The root-knot nematodes (RKNs), *Meloidogyne* spp., are among the most relevant pathogens to the coffee crop, since they can cause reduced yield to plant death. The objectives of this study were to perform the first report of the nematode *M. izarcoensis* on coffee in Brazil; to identify *Meloidogyne* species present in coffee plantations in the Triângulo Mineiro; to evaluate the reaction of coffee genotypes to *M. izarcoensis*, and to validate 11 microsatellite markers (SSR) in different coffee genotypes, which present resistance genes to *M. exigua*. With the help of biochemical methods based on isoenzyme electrophoresis (Est-Esterase), and species-specific molecular markers (PCR-SCAR), it was possible to correctly identify *M. izarcoensis* and other species such as: *M. exigua*, *M. paranaensis*, *M. incognita*, as well as, the occurrence of mixed populations of these species in coffee plantations. As for the reaction of the coffee genotypes to *M. izarcoensis*, two experiments were carried out. In both experiments the following genotypes were evaluated: Catuaí Amarelo 62 (susceptible), Catuai Vermelho x Amphillo 2-161 (28-2-II), Catuai Vermelho x Amphillo 2-161 (16-5-III), IPR100, Hybrid of Timor UFV 408-01 MG (6-I-III) and the rootstock Cv. Apoatã IAC 2258. In the first experiment a susceptible reaction was observed for the genotypes Catuaí Amarelo 62, Catuai Vermelho x Amphillo 2-161 (28-2-II), IPR 100 and Hybrid of Timor UFV 408-01 MG (6-I-III). The Catuai Vermelho x Amphillo 2-161 (16-5-III) genotype was moderately resistant, and the rootstock Cv. Apoatã IAC 2258 was resistant. In the second experiment, the Catuai Vermelho x Amphillo 2-161 (28-2-II) and Cv. Apoatã IAC 2258 genotypes were moderately resistant and resistant, respectively, while the other genotypes presented susceptibility reaction to the pathogen. Only the rootstock Cv. Apoatã IAC was considered resistant to *M. izarcoensis* in both experiments. The study for validation of the microsatellite markers was

performed in two phases. In the first, the 11 markers were evaluated on the genotypes: Hybrids of Timor UFV 408-01 (036), UFV 408-01 (090), IPR100 and 83-3, lineage of the IPR 100, and Catuaí IAC 86 (susceptible). In the second phase, SSRCafé markers 4, 13, 15, 20 and 40 were evaluated on the genotypes Hybrid of Timor 440-10, and Catuaí IAC 86 (susceptible). In the first phase, four markers were polymorphic: SSRCafé 4, 13, 15 and 41. Two markers were monomorphic, SSRCafé 14 and 37, and five did not amplify any fragment: SSRCafé 19, 20, 32, 39 and 40. In the second phase, three SSRCafé markers 13, 20 and 40 were polymorphic, and SSRCafé 15 showed to be monomorphic in the hybrid genotypes of Timor 440-10 (resistant) and Catuaí red IAC 86 (susceptible). Based on the results, it is concluded that microsatellite markers SSRCafé 13, 20 and 40 can be used with greater confidence only in the selection of resistant progenies resulting from crosses with the Hybrid of Timor HT440-10. In relation to the other markers, more studies will be necessary for their validation.

Keywords: *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, resistance to nematodes.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, com produção no ano de 2018 de 47,5 milhões de sacas beneficiadas de *Coffea arabica* L. e 14,2 milhões de sacas beneficiadas de *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, apresentando atualmente um parque cafeeiro estimado em 2,2 milhões de hectares (CONAB, 2019). 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). Os principais estados produtores são Minas Gerais e Espírito Santo, com 33,4 e 13,7 milhões de sacas em 2018, respectivamente (CONAB, 2019).

No entanto, essa cultura pode ser afetada por diferentes patógenos, tais como fungos, bactérias e nematoides. Dentre os nematoides, as espécies pertencentes ao gênero *Meloidogyne* Göldi, 1887 (nematóide das galhas, NGs) destacam-se como as de maior ocorrência 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 de café brasileira, em relação aos 20% de prejuízos causados por todos os fitonematoídeos (AMORIM *et al.*, 2016).

Atualmente, em torno de 18 espécies já foram descritas parasitando o cafeeiro no mundo (CARNEIRO & COFCEWICZ, 2008; HUMPHREYS-PEREIRA *et al.*, 2014). Entre as principais espécies desse gênero destacam-se, no Brasil, *Meloidogyne paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes & Almeida, 1996 e *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood (1949) as mais danosas e agressivas e *M. exigua* Göldi, 1887, originalmente a mais disseminada (OLIVEIRA, 2006).

As espécies *M. paranaensis* e *M. incognita* são consideradas as duas mais danosas ao cafeeiro, pela destruição do sistema radicular e devido à alta agressividade, podendo levar a planta à morte (CARNEIRO & COFCEWICZ, 2008). A alta suscetibilidade e intolerância das cultivares de *C. arabica* a *M. incognita* e *M. paranaensis* constitui fator limitante tanto na implantação de cafezais novos em áreas infestadas, quanto na manutenção dos cafezais já contaminados (GONÇALVES & SILVAROLLA, 2001). Recentemente, a espécie *Meloidogyne izalcoensis* Carneiro, Almeida, Gomes & Hernandez, 2005, foi detectada no Brasil (Cap. 2 desta tese), parasitando o cafeeiro na região do Triângulo Mineiro (STEFANELO *et al.*, 2019). Existem poucas pesquisas acerca da distribuição dessa espécie no Brasil e de resistência genética em fontes de resistência previamente estudadas para outras espécies de *Meloidogyne*.

A adoção de medidas de controle, sobretudo químico, de *Meloidogyne* spp. em lavouras cafeeiras, em áreas com alta população inicial do nematoide, vem apresentando baixa eficiência. Nesse aspecto, a resistência de plantas é considerada como uma das principais táticas de manejo dos nematoides, por ser mais eficaz, em áreas já infestadas pelo nematoide. Essa técnica possibilita a manutenção de populações do nematoide abaixo do nível econômico de dano (GONÇALVES & SILVAROLLA, 2001).

Os estudos de genotipagem de plantas resistentes aos NGs vem avançando lentamente nos últimos anos. Essa técnica se baseia em marcadores moleculares conhecidos como microsátélites (SSR), que selecionam progênies que são resistentes a *Meloidogyne* spp. e são uma alternativa ao método clássico de avaliação por fenotipagem, que é trabalhoso e demorado (JENKINS *et al.*, 2012), ainda mais em plantas perenes como o cafeeiro.

A identificação de fontes de resistência aos NGs é necessária, devido à complexidade de populações encontrada em *Meloidogyne* spp. (STARR *et al.*, 2002) do cafeeiro. Essa diversidade genética tem sido detectada sobretudo nas três espécies de maior ocorrência no

Brasil, em *M. exigua* (MUNIZ *et al.*, 2008), *M. incognita* (SANTOS *et al.*, 2012) e *M. paranaensis* (SANTOS *et al.*, 2018a). A agressividade dessas espécies em genótipos de *Coffea* spp. também foi estudada e quantificada (MUNIZ *et al.*, 2009, SANTOS *et al.*, 2018a).

Assim, mais pesquisas são necessárias no sentido de estabelecer a distribuição de *Meloidogyne* spp. nos cafezais brasileiros, identificando e caracterizando corretamente as espécies, sobretudo *M. izalcoensis*, recentemente detectado no Brasil. Além disso, ressalta-se a necessidade de se estudar as reações de resistência ou suscetibilidade de cafeeiros já selecionados como resistentes a outras espécies do nematoide das galhas.

OBJETIVO GERAL

Fazer a identificação e o relato de uma nova espécie de nematoide das galhas no Brasil, estudar a reação de resistência ou suscetibilidade em cultivares de cafeeiro a *M. izarcoensis* e validar marcadores microssatélites quanto à resistência a *M. exigua*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Proceder o primeiro relato da espécie *M. izarcoensis*, ocorrente no Estado de Minas Gerais, e identificar espécies de *Meloidogyne* presentes no Triangulo Mineiro, utilizando marcadores enzimáticos e moleculares (Capítulo 1).

- Avaliar a reação dos genótipos de cafeeiros Catuaí Amarelo 62, Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 (28-2-II), Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 (16-5-III), IPR100, Híbrido do Timor UFV 408-01 MG (6-I-III), porta-enxerto cv. Apatã IAC 2258 a *M. izarcoensis* (Capítulo 2).

- Validar onze marcadores moleculares microssatélites (SSR) em diferentes cultivares de cafeeiros, tais como o Híbrido do Timor UFV 408-01 (036 e 090), IPR100, 83-3 (linhagem do IPR 100), Catuaí Vermelho x Amphillo MR 2161(E1 16-5III) que apresentam genes de resistência a *Meloidogyne exigua* do cafeeiro (Capítulo 3).

REVISÃO DE LITERATURA

Cultura do cafeeiro

O café foi introduzido originalmente no Brasil em 1727, proveniente de Caiena, Capital da Guiana Francesa, pelo oficial Francisco de Mello Palheta, a pedido do Governador Geral da capitania do Maranhão, capitão João Maia da Gama. As sementes e plantas pertenciam a espécie *Coffea arabica* L., originária do cultivo da planta no ‘Jardin des Plantes’ de Paris. No entanto, anteriormente a planta havia sido classificada como *Jasminium arabicum* Juss. da família das oleáceas. Em 1735, Linnaeus publicou em seu livro ‘Systema Naturae’ a reclassificação da espécie como sendo *Coffea arabica*, apesar desta ter como centro de origem os planaltos da Etiópia (MARTINS, 2008; REIS *et al.*, 2010).

Os cafeeiros pertencem à divisão das Fanerógamas, Classe Angiosperma, Subclasse Eudicotiledonea, ordem Rubiales, família Rubiaceae, tribo Coffeae, Sub-tribo Coffeinae, Gêneros *Coffeae* e *Psilanthus*. A seção Eucoffea reúne as espécies mais importantes de cafeeiros, como por exemplo, *C. arabica* e *C. canephora* (CARVALHO *et al.*, 2008).

A espécie *C. arabica* é originária da região montanhosa de clima ameno da Etiópia, resultante do cruzamento natural de duas espécies, *C. eugenoides* S. Moore (2n) e *C. canephora* (2n) (LASHERMES *et al.*, 1999, 2008). Esse cruzamento originou uma espécie tetraploide (4n) que se reproduz por autofecundação. Essa característica confere ao cafeeiro Arábica uma variabilidade genética restrita. As mudas são produzidas a partir de sementes que também apresentam certa homogeneidade, o que permite a manutenção das características genéticas desejáveis economicamente mas, por outro lado, carregam características de susceptibilidade a pragas e doenças (FERRÃO *et al.*, 2010).

O cafeeiro da espécie *Coffea canephora* Pierre ex Froehn, conhecido como café Conilon, originário do Congo, é um diploide que possui fecundação cruzada e produz um café

com altos teores de cafeína (1,5-2,8% por peso seco do grão) e sólidos solúveis, características que são menos agradáveis ao paladar (LEROY *et al.*, 2011). No entanto, essa espécie possui maior variabilidade genética que o cafeeiro arábico. As mudas são variedades clonais de vários indivíduos selecionados pela superioridade em determinadas características agronômicas, tais como resistência a patógenos como *Hemileia vastatrix* Berk & Broome, fungo causador da ferrugem do cafeeiro, *Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge, fungo causador da Coffee Berry Disease e nematoides do gênero *Meloidogyne* (LASHERMES *et al.*, 2008).

A área total cultivada com café no país é de 2,16 milhões de hectares (CONAB, 2019). Na Tabela 1 estão relacionados os principais estados e regiões produtoras de café no Brasil, com as respectivas produções. O estado de Minas Gerais é o maior produtor brasileiro, com produção de 33 milhões de sacas de arábica e 391 mil sacas de conilon na safra de 2018.

Tabela 1. Café arábica e conilon: áreas em produção e produção nos principais estados produtores na safra 2018.

Estados e Regiões	Produção (1.000 sacas)		Área em produção (ha)	
	Arábica	Conilon	Arábica	Conilon
Minas Gerais				
Sul e Centro Oeste	17.896	-	514.193	-
Triângulo, Alto Paranaíba e Noroeste	7.138	-	189.183	-
Zona da Mata, Rio Doce e Central	7.310	254	270.354	8.457
Norte, Jequitinhonha e Mucuri	627	137	21.854	4.554
Espírito Santo	4.751	8.988	156.603	231.323
São Paulo	6.302	-	202.581	-
Bahia				
Cerrado	497	-	11.300	-
Planalto	1.383	-	71.000	-
Atlântico	-	2.670	-	47.700
Rondônia	-	1.978	-	63.879
Paraná	1.000	-	37.500	-
Rio de Janeiro	346	-	12.030	-
Goiás	195	-	5.905	-
Mato Grosso	1	103	45	9.265
Brasil	47.484	14.174	1.497.059	367.264

Fonte: adaptado de CONAB, 2019.

A cultura do cafeeiro é afetada durante todo seu ciclo por algumas doenças. A principal doença fúngica é a ferrugem do cafeeiro causada por *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br., favorecida por temperaturas de 22-26 °C, molhamento foliar por no mínimo 8h, alta umidade relativa e carga de frutos pendentes e alto teor de nitrogênio nas folhas. As cultivares Araçuaia MG, Catiguá MG1, MG2, MG3, Paraíso MG H419-1, Pau-Brasil MG1, Sacramento MG1, Oeiras MG 6851, Tupi, Obatã, Catucaí Vermelho e Amarelo são opções de cultivares resistentes a essa doença (ZAMBOLIM, 2015).

Outras doenças fúngicas como a mancha olho pardo causada por *Cercospora coffeicola* Berk. Cooke, mancha de phoma (*Phoma* spp.), mancha de ascochyta (*Ascochyta coffeae*), mancha manteigosa (*Colletotrichum gloesporioides*), antracnose (*Colletotrichum* spp.), roseliniose (*Rosellinia* spp.), rizoctoniose (*Rizoctonia* spp.) e fusariose (*Fusarium* spp.), doenças bacterianas como a mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garçae*) e viroses como a mancha anular (*Coffee ringspot virus* (CoRSV)) também provocam prejuízos à cultura (ZAMBOLIM, 2015; MESQUITA *et al.*, 2016).

Fitonematoides, especialmente os do gênero *Meloidogyne*, podem acarretar sérios prejuízos à cultura do cafeeiro, principalmente nos anos de baixa produção.

***Meloidogyne* spp. na cultura do cafeeiro**

As espécies do gênero *Meloidogyne* pertencem ao Filo Nematoda e estão incluídas na classe Chromadorea, ordem Rhabditida, subordem Tylenchina, infraordem Tylenchomorpha, superfamília Tylenchoidea e família Meloidogynidae (DE LEY & BLAXTER, 2002; MOENS *et al.*, 2009).

Existem mais de 100 espécies de *Meloidogyne* descritas (KARSSSEN *et al.*, 2013), sendo que destas, 18 podem atacar o cafeeiro (CARNEIRO & COFCEWICZ, 2008; HUMPHREYS-PEREIRA *et al.*, 2014). De acordo com o modo de parasitismo, *Meloidogyne*

spp., também conhecidos como nematoides das galhas, são endoparasitas sedentários, pois passam grande parte da sua vida alimentando-se na raiz no mesmo local (sítio de alimentação) (SALGADO & REZENDE, 2010). O sítio de alimentação dos nematoides das galhas é formado por um conjunto de células hipertrofiadas, multinucleadas e de citoplasma denso, denominadas células gigantes. Esse grupo de células é responsável pela nutrição do patógeno durante todo seu ciclo de vida, permitindo seu desenvolvimento e reprodução. A formação das células gigantes ocorre devido à introdução por meio do estilete de secreções produzidas pelas glândulas esofagianas do nematoide, e é um processo importante na interação planta-nematoide (ABAD *et al.*, 2003).

O ciclo de vida dos nematoides inicia-se com o desenvolvimento embrionário dentro do ovo e a formação do primeiro estágio juvenil (J1). Com a primeira ecdise, o nematoide atinge o segundo estágio (J2) dentro do ovo. Na sequência, por ação de diversos fatores físicos e químicos, ocorre a eclosão e o J2 movimenta-se à procura de raízes novas, onde penetra próximo à sua extremidade iniciando o parasitismo. Os juvenis J3 e J4 desprovidos de estilete permanecem no interior da raiz sem se alimentar. As fêmeas produzem centenas de ovos e permanecem internamente nas raízes até sua morte. As fêmeas de *M. exigua* localizam-se mais internamente nas raízes, enquanto que as de *M. paranaensis* são encontradas em manchas escuras em raízes descamadas (CARNEIRO *et al.*, 1996a). Os machos saem das raízes e passam a viver no solo.

A interação planta nematoide na cultura do cafeeiro resulta em galhas típicas no caso de *M. exigua* e *M. izalcoensis*, enquanto que *M. paranaensis* induz formação de galhas radiculares no início da infecção (Sônia Salgado, informação pessoal), posteriormente provocam sintomas semelhantes a *M. incognita* que não induz a formação de galhas, apenas engrossamento, necroses e rachaduras nas raízes, diferentemente do que ocorre em outras culturas (CARNEIRO *et al.*, 1996a).

Das 18 espécies de *Meloidogyne* que infectam cafeeiro em todo o mundo, apenas cinco têm causado perdas econômicas significativas: *M. exigua*, *M. incognita*, *M. paranaensis* (CARNEIRO *et al.*, 1996b), *M. arabicida* Lopez & Salazar, 1989 e *M. izalcoensis* (CAMPOS *et al.*, 1990; BARBOSA *et al.*, 2004; CAMPOS & VILLAIN 2005; CARNEIRO *et al.*, 2005b VILLAIN *et al.*, 2008).

De acordo com Salgado & Rezende (2010), dentre as espécies que provocam prejuízos em cafeeiros no Brasil, *M. exigua* é a mais disseminada, endêmica, nas áreas produtoras de café, juntamente com *M. incognita*, *M. paranaensis*, *M. coffeicola* Lordello & Zamith, 1960 e *M. hapla* Chitwood, 1949, sendo que as duas últimas são de ocorrência rara.

Meloidogyne exigua, induz a formação de galhas típicas nas raízes sem, necessariamente destruir o sistema radicular, principalmente em cafezais instalados em solos férteis. Entretanto, embora não seja tão destrutiva quanto outras espécies de *Meloidogyne*, talvez *M. exigua* seja o fitonematoide que causa as maiores perdas totais à cafeicultura brasileira em função de se encontrar amplamente disseminado nas lavouras das principais regiões produtoras de café (GONÇALVES & SILVAROLLA, 2007). A espécie *M. exigua* encontra-se distribuída nas Américas do Sul e Central e se caracteriza pela baixa severidade de danos provocados (CAMPOS & VILLAIN, 2005; BERTRAND & ANTHONY, 2008).

Meloidogyne paranaensis e *M. incognita* são as espécies mais agressivas, podendo levar as plantas à morte, em decorrência da destruição do sistema radicular.

O primeiro relato de *M. incognita* em cafeeiro da espécie *C. arabica* foi feito por Chitwood & Berger (1960) na Guatemala. No Brasil, a primeira ocorrência deste nematoide em cafeeiros foi observada no município de Pindorama, Estado de São Paulo (LORDELLO & MELLO FILHO, 1970).

Meloidogyne paranaensis é uma das espécies mais agressivas de nematoides das galhas relatada parasitando o cafeeiro no Brasil, descrita como nova espécie por Carneiro *et al.*

(1996a) a partir do conhecido biótipo IAPAR ou raça 5 de *M. incognita*, cuja ocorrência até então estava limitada ao Estado do Paraná. Porém, essa espécie está presente em outros estados brasileiros como São Paulo (CARNEIRO *et al.*, 2005a), Minas Gerais, Goiás e Espírito Santo (BARROS *et al.*, 2011). Esse nematoide já foi detectado na Guatemala e nos Estados Unidos (Havaí) (CARNEIRO *et al.*, 2004) e no México (LOPEZ-LIMA *et al.*, 2014).

Meloidogyne izalcoensis foi primeiramente identificada e descrita por Carneiro *et al.* (2005b), parasitando cafeeiros na região do vulcão Izalco, Sonsonate, El Salvador. Esse nematoide também foi identificado em raízes infectadas de cafeeiro no Kenya (Kabete) e na Tanzânia (Mufindi), tornando-se o primeiro relato dessa espécie nesses países e no continente africano (JORGE JÚNIOR *et al.*, 2016). Além dessas hospedeiras, *M. izalcoensis* também foi detectada em repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) no Benin (Cotonou) e em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.) em Tindini e Kianga (Tanzania), respectivamente (JORGE JÚNIOR *et al.*, 2016).

Em relação a hospedeiras diferenciadoras, a população proveniente de *C. arabica* em Izalco, El Salvador, reproduziu-se em tomateiro cv. Rutgers, tabaco cv. NC95, pimentão cv. California Wonder e melancia cv. Charleston Gray. Não foi observada reprodução em algodão cv. Deltapine 61 e amendoim cv. Florunner (CARNEIRO *et al.*, 2005b). Embora a espécie tenha sido descrita em 2005, todos os estudos relativos à resistência de diferentes acessos já estudados para outras espécies terão que ser ainda realizados para *M. izalcoensis*.

Posteriormente, foi descrita uma nova espécie de *Meloidogyne* em cafeeiro, *M. lopezi* Humphreys–Pereira, Flores–Chaves, Gómez, Salazar, Gómez Alpizar & Elling, 2014, na Costa Rica, que difere das outras espécies pela morfologia e fenótipos isoenzimáticos. No entanto essa espécie, apresenta relações filogenéticas muito próximas com *M. arabicida* López & Salazar, 1989, *M. izalcoensis* e *M. paranaensis* (HUMPHREYS-PEREIRA *et al.*, 2014). Estudos realizados por Carneiro *et al.* (2004) usando primers RAPD mostraram que as

espécies *M. izalcoensis* e *M. lopezi* são muito próximas, se agrupando com 100% de bootstrap e se separando completamente das demais espécies do cafeeiro: *M. arabicida*, *M. paranaensis*, *M. incognita* e *M. exigua*, entre outras, o que pode indicar co-identidade entre elas.

Os sintomas induzidos pelo nematoide das galhas no cafeeiro variam dependendo da espécie de *Meloidogyne* envolvida. *Meloidogyne exigua* e *M. izalcoensis* produzem galhas arredondadas, porém, *M. exigua* produz massas de ovos internas, enquanto que *M. izalcoensis* produz massas de ovos externas ao sistema radicular e necroses nas extremidades das raízes (MENDES *et al.*, 1977; CARNEIRO *et al.*, 2005b).

Meloidogyne coffeicola não induz galhas, apenas engrossamentos e rachaduras no tecido radicular (CARNEIRO *et al.*, 1996a; SOUZA, 2008). *Meloidogyne paranaensis* induz galhas no início da infecção, porém não arredondadas típicas de *M. exigua* (Sônia Salgado, informação pessoal). *Meloidogyne incognita* provoca sintomas semelhantes a *M. paranaensis*.

A determinação das raças parasitárias de *Meloidogyne* do cafeeiro é feita através dos hospedeiros diferenciadores: 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’) (HARTMAN & SASSER, 1985). No entanto, apesar dessa técnica ter sido usada no passado para identificação de espécies, ela possui limitações, pois algumas espécies de *Meloidogyne* apresentam a mesma gama de hospedeiros diferenciadores, como por exemplo, *M. javanica* e *M. paranaensis*, podendo acarretar erros na caracterização (CARNEIRO *et al.*, 2016).

A técnica de identificação através da enzima esterase é uma das mais precisas na identificação de espécies de *Meloidogyne* presentes nos cafezais (CARNEIRO *et al.*, 2005c), comprovando a eficiência da utilização da técnica de eletroforese a partir da verificação da especificidade dos perfis de esterase na confirmação de espécies de nematoides das galhas do

cafeeiro. Os perfis obtidos foram os seguintes: *M. incognita* (Est I₁, Rm: 1,0 e Est I₂, Rm: 1,55 e 2,05), *M. paranaensis* (Est P₁, Rm: 1,36), *M. exigua* (Est E₁, Rm: 1,55; E₂, Rm: 1,55, 2,05), *M. izalcoensis* (Est I₄) com quatro bandas (Rm: 0,86, 0,96, 1.24, 1.30) (ESBENSHADE & TRIANTAPHYLLOU, 1985).

Villain *et al.* (2013), analisando 11 perfis de esterase, identificaram 9 espécies de *Meloidogyne* parasitando cafeeiros: *M. exigua*, *M. arabicida*, *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949, *M. hapla*, *M. izalcoensis*, *M. paranaensis*, *M. morocciensis* Rammah & Hirschmann, 1990, *M. enterolobii* Yang & Eisenback, 1983. Essas espécies foram identificadas em diferentes regiões produtoras da América Central: Guatemala, Costa Rica, El Salvador e Honduras.

Para estudos da diversidade de *Meloidogyne* spp., a identificação das espécies através dos perfis de esterase constitui-se numa das etapas iniciais do processo. Além da identificação, é possível verificar a presença de misturas de espécies e realizar a sua purificação. As fêmeas são recuperadas para eletroforese e as respectivas massas de ovos são colocadas em solução salina (1%) e, posteriormente, multiplicadas em um hospedeiro suscetível como, por exemplo, o tomateiro (CARNEIRO & ALMEIDA, 2001; CARNEIRO *et al.*, 2016).

Outra técnica importante na diagnose de espécies do nematoide das galhas é a técnica PCR-SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) (BLOK & POWERS, 2009). Essa técnica é uma ferramenta que permite a identificação precisa das principais espécies dos nematoides das galhas na cultura do cafeeiro do Brasil, mesmo em mistura na amostra e a partir de poucos indivíduos (CARNEIRO *et al.*, 2005c). Atualmente a identificação das espécies é facilitada por reações em multiplex, usando o Kit diagnóstico SCAR/Café que foi desenvolvido por Randig *et al.* (2002, 2004) para as espécies mais importantes de *Meloidogyne* que parasitam o cafeeiro no Brasil (CARNEIRO *et al.*, 2016). Esse kit foi

acrescido de mais duas espécies (*M. arabicida* e *M. izalcoensis*), confirmando a sua utilização para as espécies que ocorrem nas Américas (CORREA *et al.*, 2013).

A diagnose correta das espécies é de fundamental importância, pois permite a escolha de estratégias de manejo mais adequadas.

Resistência a *Meloidogyne* spp. em cafeeiros

A resistência genética é uma importante ferramenta no controle de nematoides, a exemplo, os do gênero *Meloidogyne*. A resistência pode ser pré ou pós infeccional, sendo que a segunda é mais frequente. No caso da resistência pós infeccional, apesar de os nematoides penetrarem na raiz, há uma redução no seu desenvolvimento e reprodução (ROBERTS, 2002; SALGADO, 2011).

Existem várias linhagens selecionadas do grupo Mundo Novo, que reúnem cultivares com elevado potencial produtivo aliado ao alto vigor vegetativo. Esse grupo de cultivares teve origem no cruzamento natural entre as cultivares Sumatra e Bourbon Vermelho, relatada no município de Mineiros do Tietê, SP. Mundo Novo refere-se ao local em que as sementes de um dos cafeeiros selecionados foram plantadas, situado no município de Urupês – SP. Seleções entre e dentro das progênes também foram realizadas com o objetivo de eliminar os defeitos do material original e as progênes selecionadas foram repassadas aos agricultores. No entanto, as cultivares do grupo Mundo Novo tem a desvantagem de serem suscetíveis à ferrugem, aos nematoides e a outras doenças (PEREIRA & BAIÃO, 2015).

As cultivares do grupo Catuaí originaram-se da hibridação artificial de Caturra Amarelo IAC 476-11 com Mundo Novo IAC 374-19. O cruzamento foi realizado no IAC em 1949, com o objetivo de transmitir os alelos responsáveis pelo porte reduzido de Caturra Amarelo (CtCt) para a cultivar Mundo Novo. O termo Catuaí, em Tupi-Guarani, tem significado de “muito bom”. Frutos de cor vermelha e de cor amarela encontradas na progênie H2077-2-5

deram origem às cultivares Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo. Assim como as cultivares do grupo Mundo Novo, as do grupo Catuaí também são suscetíveis à ferrugem e aos nematoides (PEREIRA & BAIÃO, 2015).

A cultivar Apatã IAC 2258 apresenta sistema radicular robusto (em Tupi-Guarani, apatã significa “raiz forte”), se caracteriza por ser multicaule e é recomendada para uso como porta-enxerto em áreas infestadas por nematoides (CARVALHO *et al.*, 2008). Oriunda de uma população de *C. canephora* da Costa Rica, planta matriz 2258 do Centro Agronômico Tropical de Investigação e Educação Superior (CATIE), a cultivar foi avaliada no Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e apresentou grande quantidade de plantas resistentes a *M. exigua* (SALGADO *et al.*, 2005; FERRÃO *et al.*, 2015) e a *M. incognita* e *M. paranaensis* (SERA *et al.*, 2006; FONSECA *et al.*, 2008; FERRÃO *et al.*, 2015). Essa cultivar confirmou a resistência quando submetida a sete populações de *M. paranaensis*, apresentando um nível de segregação de 12% (SANTOS *et al.*, 2018a).

O grupo Amphilo é proveniente da Etiópia e foi primeiramente estudado no CATIE e posteriormente no IAC, onde a melhor progênie foi identificada como IAC 1167-19. Inicialmente, em experimentos em casa de vegetação e campo, foi verificada certa resistência a *M. incognita*, no entanto, sem a identificação da raça. Posteriormente, sementes dessa progênie foram testadas no antigo Instituto Brasileiro do Café (IBC), em conjunto com o IAC. Verificou-se a resistência desse acesso a *M. incognita* (o que poderia ser *M. paranaensis*) tanto em casa de vegetação (infecção artificial) quanto em campo. Após esse estudo foram feitos vários cruzamentos e os materiais resultantes foram enviados para diversas instituições: IAC, EPAMIG, IAPAR, Universidade Estadual de Londrina e Universidade Estadual do Paraná em Maringá (FAZOULI, 1986).

No trabalho desenvolvido por Peres *et al.* (2017) foram testados 18 genótipos de *C. arabica* pertencentes ao Banco de Germoplasma da EPAMIG – Lavras MG. Desse total, seis

acessos pertencentes ao grupo Amphilo, cinco resultantes do cruzamento entre Catuaí Vermelho x Amphillo MR 2-161 e um resultante do cruzamento de Catuaí Vermelho x Amphillo MR 2-474 foram resistentes a *M. incognita* raça 1. Em relação à resistência a *M. paranaensis*, quatro acessos resultantes do cruzamento de Catuaí Vermelho x Amphillo MR 2-161 e um acesso resultante do cruzamento de Catuaí Vermelho x Amphillo MR 2-474 foram resistentes a esse nematoide.

Outra cultivar importante é a IPR100, originária do cruzamento entre Catuaí e um genótipo resultante de Catuaí X BA10. A série BA10 contém os genes da espécie *C. liberica* Hiem. Em 1977, essa espécie foi introduzida no IAPAR, onde foi melhorada até a sexta geração. Essa cultivar é melhor adaptada a solos mais pobres, com alto potencial produtivo, e ampla adaptação às principais regiões cafeeiras do país. Outras características herdadas são adaptação ao calor e à seca e também a resistência a *M. paranaensis* devido à presença de genes de *C. liberica* (PEREIRA & BAIÃO, 2015).

IAPAR 59 foi a primeira cultivar comercial derivada da população de Sarchimor. Desenvolvida a partir do Híbrido CIFC H361/4 (resultante de Villa Sarchi CIFC 971/10 com o Híbrido de Timor CIFC 832/2, introduzida, inicialmente no IAC, com a designação de LC 1669). Plantas de café oriundas das sementes recebidas pelo IAPAR, em 1975, foram estudadas em vários ensaios em municípios do Paraná, posteriormente sendo denominada IAPAR 59. Essa cultivar apresenta resistência completa ao fungo *Hemileia vastatrix*, por manter-se resistente há mais de trinta anos no campo. É indicada para cultivos adensados e superadensados, adaptando-se a regiões frias e chuvosas. Essa cultivar é considerada resistente a várias populações de *M. exigua*. No entanto, no ano de 2007, essa resistência foi quebrada por uma única população de *M. exigua* proveniente de Bom Jesus de Itabapoana/RJ (MUNIZ *et al.*, 2009).

O Híbrido de Timor é outro genótipo interessante para o melhoramento genético pois apresenta resistência à ferrugem, antracnose, bacterioses e ao nematoide *M. exigua*. Originalmente foi resultante de um cruzamento natural entre *C. arabica* e *C. canephora*, identificado por volta de 1917 em uma plantação de *C. arabica*, no Timor Leste. Essa população começou a ser cultivada no seu local de origem em 1940 e mais tarde, em 1976, passou a ser estudada na Universidade Federal de Viçosa, em conjunto com a EPAMIG. Esses materiais vêm sendo estudados como fonte de resistência a *M. exigua* e *M. paranaensis* (CARVALHO *et al.*, 2008).

No trabalho desenvolvido por Silva *et al.* (2007) as progênies do Híbrido do Timor UFV 981, UFV 1266 e UFV 1848 não foram infectadas por nenhuma das populações de *M. exigua* avaliadas, sendo classificadas como imunes. Em outro estudo foram testados os genótipos contendo Híbridos de Timor: H 4782-7-585, H 4782-7-785, H 4782-7-925, que são resistentes ao fungo da ferrugem do cafeeiro (*H. vastatrix*) e apresentaram também resistência a *M. exigua*. Os autores relataram que tais híbridos conferiram resistência a *M. incognita* e a *M. paranaensis*, porém apresentaram segregação para essa característica (GONÇALVES & PEREIRA, 1998).

No estudo desenvolvido por Albuquerque *et al.* (2010) o genótipo 'UFV 408-28' de *C. arabica* mostrou-se moderadamente resistente a *M. incognita* raças 1, 2 e 3, apresentando índice de galhas (IG) = 2 e fator de reprodução (FR) = 7,0. No entanto, esse genótipo foi suscetível às espécies *M. exigua* e *M. paranaensis*, apresentando IG = 5 e 4 e FR = 80,0 e 18,0, respectivamente. As progênies classificadas como resistentes nesse trabalho também apresentaram resistência completa à ferrugem, provavelmente herdada do cafeeiro da série BA10 de *Coffea liberica* que apresenta o gene SH3.

Santos *et al.* (2018a) verificaram que os materiais genéticos Clone 14 INCAPER, Catuaí Vermelho x Amphillo MR2161 (E1 16-5 III), porta-enxerto Cv. Apoatã IAC 2258,

Híbrido do Timor UFV 408-01 (E1 6-6 II) e IPR 100 apresentaram resistência a sete populações de *M. paranaensis* mas exibiram segregação para resistência nas taxas de 0%, 2,4%, 12%, 26% e 29%, respectivamente.

Resistência genética a *Meloidogyne* spp.

Segundo Roberts (2002), nas plantas resistentes a *Meloidogyne* spp., apesar da penetração dos juvenis, tanto o seu desenvolvimento quanto a sua reprodução são prejudicados.

Plantas altamente resistentes suportam pequena reprodução dos nematoides (< 10% do genótipo suscetível) (HUSSEY & JANSSEN, 2012) ou apresentam fatores de reprodução menores que 1,0 (OOSTENBRINK, 1966). Plantas moderadamente resistentes permitem uma quantidade intermediária de reprodução e suscetíveis permitem desenvolvimento e reprodução normais do nematoide em suas raízes. Plantas tolerantes permitem o desenvolvimento e a reprodução do nematoide, mas não apresentam danos aparentes. Plantas intolerantes apresentam redução no crescimento ou morte, havendo menor reprodução do nematoide quando comparado às tolerantes (ROBERTS, 2002).

A reação de resistência pré-infectiva ou constitutiva ocorre quando há impedimento da penetração do nematoide nas raízes. A reação também pode ser pós-infectiva, ocorrendo em resposta à infecção pelo nematoide, impedindo a formação ou a manutenção do sítio de alimentação (ROBERTS *et al.*, 1998) a ponto de suprir a necessidade das fêmeas para boa reprodução. O reconhecimento específico do patógeno pela planta pode levar a uma reação de resistência conhecida como resposta de hipersensibilidade (HR), acompanhada de morte celular rápida em torno do local inicial da infecção (LAM *et al.*, 2001; ALBUQUERQUE *et al.*, 2010). Alves *et al.* (2019) verificaram resistência do genótipo '16 -6-1 ', derivado do germoplasma Amphillo de *Coffea arabica* a *M. paranaensis*. A reação de hipersensibilidade no genótipo resistente foi verificada aos dois dias após a inoculação, sendo também observada

resposta tardia envolvendo a degradação da célula gigante a partir dos 14 DAI no genótipo resistente. No genótipo suscetível, o desenvolvimento das células gigantes e do nematoide ocorreu normalmente. Estudos anteriores apontaram que a resistência do cafeeiro aos nematoides do gênero *Meloidogyne* é do tipo pós-infectiva (ANTHONY *et al.*, 2005; OLIVEIRA, 2006; LIMA *et al.*, 2015).

A resistência, de acordo com o modo de herança, pode ser monogênica, oligogênica ou poligênica. A resistência vertical ou qualitativa é controlada por um, até no máximo, três genes. 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). Resistência a *M. exigua* em *C. canephora* é determinada pelo gene de resistência o Mex-1, que reduz a penetração e desenvolvimento dos nematoides e consequentemente o número de galhas (ALPIZAR *et al.*, 2007). O locus Mex-1 está localizado em uma região do cromossomo 3 que abriga o gene SH3, que também confere resistência à ferrugem da folha do cafeeiro (SAUCET *et al.*, 2016).

Seleções resistentes a *M. exigua* em *C. canephora* são comumente usadas como porta-enxertos na cultura do café. As populações derivadas de cruzamentos entre *C. arabica* e *C. canephora*, como Icatu, Sarchimor e outras têm sido estudadas em relação à reação ao agente causador da ferrugem *H. vastatrix*, tendo sido identificadas plantas resistentes ao fungo. Igualmente, tem-se verificado que essas populações apresentam também plantas resistentes e/ou tolerantes a *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaenses*. No entanto, ainda apresentam segregação para essa característica (GONÇALVES & SILVAROLLA, 2007).

Cultivares altamente resistentes ou resistentes a *M. exigua*, incluem Catucaí 785/15 (Icatu x Catuaí), Acauã (Sarchimor x Mundo Novo), Paraíso (Catuaí Amarelo IAC 30 x Híbrido do Timor UFV 445-46), Catiguá MG3 (Catuaí Amarelo IAC 86 x Híbrido de Timor UFV 440-10), Iapar 59 e Tupi RN IAC 1669/19 (PADILHA *et al.*, 2009).

Carvalho *et al.* (2015) avaliaram 23 progênies de café arábica derivadas do cruzamento “Catuaí” x (“Catuaí” x “cafeeiro da série BA10”), resistentes ao fungo da ferrugem do cafeeiro (*H. vastatrix*). As progênies IAPAR 13168, IAPAR 13173, IAPAR 13157, IAPAR 13156, IAPAR 13169 e IAPAR 13166 apresentaram resistência múltipla a *M. paranaensis* e *M. incognita*; a progênie IAPAR 13165 foi resistente a *M. paranaensis* e as progênies IAPAR 13159, IAPAR 13162, IAPAR 13163 e IAPAR 13164 apresentaram resistência completa a *M. incognita*. Esses materiais foram considerados promissores pois a resistência possivelmente foi herdada da série BA10 de *C. liberica* que apresenta o gene SH3.

A seleção de fontes de resistência em *Coffea* spp. é dificultada pela variabilidade intraespecífica em populações de *Meloidogyne* ssp. (CARNEIRO & COFCEWICZ, 2008). Santos *et al.* (2018a) confirmaram uma baixa variabilidade genética em *M. paranaensis* apesar da existência de três perfis de esterase na espécie (Est P1, P2 e P2a), exceto para a população Est P2a da Guatemala, que foi geneticamente diferente das outras populações (Est P1 e P2). As populações Est P2a e Est P2 (Herculândia, SP, Brasil) foram as mais agressivas nas duas cultivares suscetíveis de *C. arabica* sob condições de casa de vegetação. Nenhuma das populações de *M. paranaensis* foi virulenta, confirmando a resistência dos genótipos de cafeeiro às sete populações de *M. paranaensis*.

No genótipo Híbrido do Timor UFV408-28 foi observada resistência moderada a várias populações de *M. incognita*, envolvendo a indução de uma resposta de tipo HR inicial, em que o ciclo do nematoide é interrompido após a penetração na raiz ou durante a migração e etapas iniciais de alimentação (ALBUQUERQUE *et al.*, 2010; SAUCET *et al.*, 2016).

Salgado *et al.* (2014), testando progênies derivadas do cruzamento da cultivar Catuaí Vermelho e Amphillo MR 2161 e do genótipo Híbrido do Timor 408-01, verificaram reação de resistência a *M. paranaensis*.

No trabalho desenvolvido por Carneiro & Cofcewicz (2008), a progênie H 419-5-4-5-2 derivada da hibridização entre Catuaí Amarelo “IAC 30” x seleção do Híbrido do Timor UFV 445-46 foi resistente a *M. exigua* e *M. enterolobii* (FR<1) e suscetível a *M. incognita*, *M. paranaensis*, *M. arabicida* e *M. izalcoensis*.

Quatro genótipos de *C. arabica* (Catuaí, Sarchimor, e dois genótipos selvagens da Etiópia (ET15 e ET28) foram testados quanto à resistência a *Meloidogyne* sp. 2 e *Meloidogyne* sp. 4, ambas identificadas posteriormente como *M. izalcoensis* por Carneiro *et al.* (2005b). *Meloidogyne* sp. 1 (= *M. paranaensis*), isolado da Guatemala, multiplicou-se em baixas taxas na cv. Sarchimor, porém não se multiplicou nos genótipos ET15 e ET28. *Meloidogyne* sp. 4 (= *M. izalcoensis*) de El Salvador multiplicou-se em alta taxa no genótipo ET15. Todos os isolados multiplicaram-se na cultivar Catuaí. *Meloidogyne exigua* multiplicou-se bem tanto na cultivar Sarchimor quanto nos genótipos selvagens da Etiópia (ET15 e ET8) (HERNANDEZ *et al.*, 2004).

Lima *et al.* (2015), testando genótipos clonais de café, verificaram que o 'Clone 14' (tolerante à seca) apresentou resistência múltipla a *M. paranaensis*, a *M. incognita* raças 1 e 3 e a *M. exigua* virulento e avirulento.

Noir *et al.* (2003) determinaram o modo de herança da resistência a *M. exigua* introgridida em *C. arabica*, mediante a transferência de genes de um acesso de *C. canephora* (IF200). A partir da análise dos dados de segregação da descendência F2 derivada de um cruzamento entre a linhagem de introgressão resistente (T5296) e um acesso suscetível (Et6), foi verificado que a resistência a *M. exigua* é controlada por um gene principal (locus Mex-1).

De acordo com Bertrand & Anthony (2008), os acessos resistentes podem ser usados como progenitores em cruzamentos com cultivares suscetíveis, com a finalidade de produzir populações segregantes. Essas populações poderiam ser empregadas em programas de melhoramento na obtenção de novas cultivares.

Marcadores microssatélites (SSR) na detecção da resistência genética

Os estudos de genotipagem de plantas resistentes aos nematoides das galhas têm como ferramenta chave a utilização de marcadores moleculares, dentre eles os microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats). Estes selecionam progênies que são resistentes a *Meloidogyne* spp. e são uma alternativa ao método clássico de avaliação por fenotipagem (JENKINS *et al.*, 2012). No algodoeiro esses marcadores são muito eficientes e amplamente utilizados na genotipagem da resistência a *M. incognita* (JENKINS *et al.*, 2012). Infelizmente, até o momento são escassos marcadores comprovadamente eficientes para a detecção de resistência a nematoides em diferentes cultivares de cafeeiro resistentes.

Os marcadores moleculares, como microssatélites ou SSR, são sequências curtas de DNA (1 a 6 pb) repetidas em tandem distribuídas aleatoriamente no genoma dos eucariotos (TAUTZ & RENZ, 1984; WANG *et al.*, 1994; ROVELLI *et al.*, 2000). Esses marcadores apresentam altos níveis de polimorfismo e são codominantes. A aplicação da técnica é simples, rápida e apresenta alto poder de resolução (VIEIRA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2017). Os marcadores microssatélites são importantes, pois auxiliam na verificação de regiões altamente variáveis do genoma, entre indivíduos ou populações da mesma espécie (PONCET *et al.*, 2006; AGGARWAL *et al.*, 2007; MISSIO *et al.*, 2009a, 2010). No estudo desenvolvido por Silva *et al.* (2019) foram analisadas por meio de marcadores moleculares microssatélites a estrutura populacional e relações genéticas entre genótipos de *Coffea arabica* etíopes e brasileiros. Nesse mesmo estudo foi realizada uma análise comparativa das distâncias genéticas entre acessos de *C. arabica* e seus dois diploides ancestrais, *C. canephora* e *C. eugenioides*.

Os microssatélites podem ser empregados na caracterização de germoplasmas. Souza *et al.* (2013) caracterizaram acessos representativos do germoplasma de *C. canephora* conservado e cultivado no Brasil. Um total de 130 acessos de bancos de germoplasma do IAC

(São Paulo), UFV (Minas Gerais) e também coletados em plantios do Espírito Santo e Rondônia foram avaliados com um conjunto de 20 primers microssatélites. Alto nível de polimorfismo e dois grandes *clusters* de diversidade foram identificados. O primeiro agrupamento foi composto pelos acessos conservados nas coletas IAC e UFV e o segundo foi formado pelos acessos coletados nas áreas cultivadas. Acessos do Espírito Santo e Rondônia foram claramente separados, compondo dois subclusters.

Microssatélites podem fornecer um número razoável de marcadores genéticos e têm sido utilizados em diversas culturas. No trabalho realizado por Missio *et al.* (2009a) foram desenvolvidos 17 marcadores EST-SSR com objetivo de avaliar seu potencial para identificar cultivares e auxiliar programas de melhoramento. Os maiores polimorfismos foram constatados dentro de *C. canephora* (88,2%) e em variedades resistentes à ferrugem (35,3%). Cinco dos 17 marcadores analisados distinguiram *C. arabica* dos genótipos com Híbridos do Timor, sendo possível identificar os mais próximos e os mais distantes de *C. arabica*. Em seis marcadores distinguiram-se quatro variedades resistentes à ferrugem (MISSIO *et al.*, 2009a).

Pinto *et al.* (2007) selecionaram 32 sequências microssatélites expressas (EST) em folhas de café relacionado a mecanismos de defesa, visando identificar marcadores do tipo microssatélite (SSR), associados à resistência ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*). Nesse caso, não foram identificados alelos polimórficos associados à resistência ao bicho-mineiro, sugerindo que seleção assistida por marcadores, em café, deve ser realizada em cruzamentos iniciais, nos quais a variabilidade genética é maior.

Em outro trabalho, trinta e três primers SSR para o gênero *Coffea* foram analisados em 24 acessos de cafeiros. Vinte e dois primers foram polimórficos entre os acessos. Os maiores valores médios de PIC (Polymorphism Information Content) foram encontrados para *C. canephora* (0,46), e os menores valores para acessos de *C. arabica* (0,22) e triploides (0,22). Os marcadores SSR polimórficos utilizados nesse trabalho foram capazes de detectar

diferenças entre populações de *C. arabica* e *C. canephora* e cultivares de *C. arabica* resistentes à ferrugem (MISSIO *et al.*, 2010).

No trabalho desenvolvido por Pereira *et al.* (2016) foram avaliados marcadores microssatélites associados com a resistência a *M. exigua* em progênies resultantes do cruzamento do Híbrido do Timor 440-10 e Catuaí Amarelo. Nesse trabalho foram selecionados 11 marcadores que apresentaram um padrão polimórfico com um número médio de 4,5 alelos por marcador, demonstrando que os marcadores microssatélites representam um método potencial para selecionar progênies resistentes a nematoides em programas de melhoramento de café.

CAPÍTULO 1

Primeiro relato da espécie *Meloidogyne izalcoensis* em cafezal do Estado de Minas Gerais e levantamento de espécies de *Meloidogyne* presentes em cafeeiros do Triângulo Mineiro

Primeiro relato da espécie *Meloidogyne izarcoensis* em cafezal do Estado de Minas Gerais e levantamento de espécies de *Meloidogyne* presentes em cafeeiros do Triângulo Mineiro

RESUMO

Neste capítulo foi realizada a identificação de uma população de *Meloidogyne* sp. detectada no Triângulo Mineiro em plantas de cafeeiro e também um levantamento de outras espécies de *Meloidogyne* ocorrentes nessa região. Para tanto, foram empregadas técnicas bioquímicas, a partir dos fenótipos da enzima esterase (Est), e técnicas moleculares, a partir dos marcadores moleculares espécie-específicos do tipo SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions). A utilização dessas técnicas permitiu a identificação de *M. izarcoensis* que havia sido encontrada pela primeira vez em El Salvador parasitando plantas de cafeeiro. Além dessa espécie, também foram encontradas outras três espécies de *Meloidogyne* parasitando cafeeiros no Triângulo Mineiro, *M. exigua*, *M. paranaensis* e *M. incognita*. Em amostras de dois locais foram detectadas misturas de *M. exigua* e *M. paranaensis* e uma amostra apresentou populações mistas de *M. exigua* e *M. incognita*. Os fenótipos de Esterase e os marcadores moleculares SCAR foram eficientes na identificação de espécies de *Meloidogyne* que ocorreram no café no Triângulo Mineiro. Esse é o primeiro relato de *M. izarcoensis* no Brasil.

Palavras-chave: *Coffea arabica*; diagnose; espécie de nematoide.

First report of *Meloidogyne izarcoensis* on coffee in Minas Gerais and survey of *Meloidogyne* species on coffee in Triângulo Mineiro

ABSTRACT

In this chapter, a population of *Meloidogyne* sp. found on coffee in Triângulo Mineiro was identified; thus, a survey of *Meloidogyne* species occurring in this location was also performed. Biochemical techniques based on esterase (Est) enzyme phenotypes, in addition to species-specific molecular techniques based on Sequence Characterized Amplified Regions (SCAR) revealed, for the first time, *M. izarcoensis* parasitizing coffee plants in Brazil. This species was first described in El Salvador. Besides *M. izarcoensis*, three other species were found parasitizing coffee plants in Triângulo Mineiro: *M. exigua*, *M. paranaensis*, and *M. incognita*. In samples from two locations, mixtures of *M. exigua* and *M. paranaensis* were detected; and one sample had mixed populations of *M. exigua* and *M. incognita*. Esterase phenotypes and SCAR molecular markers were efficient in identifying *Meloidogyne* species occurring on coffee in Triângulo Mineiro.

Keywords: coffee; diagnosis; nematode species.

1. INTRODUÇÃO

Meloidogyne spp. são os nematoides parasitas de plantas mais prejudiciais do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Dezoito espécies de *Meloidogyne* foram relatadas parasitando café em todo o mundo (SOUZA, 2008; HUMPHREYS-PEREIRA *et al.*, 2014). Nos últimos 20 anos, quatro novas espécies de nematoides das galhas radiculares (RKN) associadas ao café foram descritas. Destas, *M. paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes & Almeida, 1996; *M. izalcoensis* Carneiro, Almeida, Gomes & Hernandez, 2005 e *M. lopezi* Humphreys–Pereira, Flores–Chaves, Gómez, Salazar, Gómez -Alpizar & Elling, 2014 foram descritas do Brasil, El Salvador e Costa Rica, respectivamente. Além disso, *Meloidogyne konaensis* Eisenback, Bernard & Schmitt, 1994 foi descrita como uma espécie parasitando cafeeiros no Havaí. Entretanto, como recentemente demonstrado por Monteiro *et al.* (2016), este nematoide não infecta plantas de café e a espécie RKN que infecta o cafeeiro no Havaí é *M. paranaensis*.

No Brasil, quatro espécies principais de nematoides das galhas foram detectadas em cafeeiro, incluindo *M. exigua* Göldi, 1887, *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, *M. paranaensis* e *M. coffeicola* Lordello & Zamith, 1960 (CARNEIRO & COFCEWICZ, 2008; FERRAZ, 2008). *Meloidogyne exigua* é amplamente distribuída e adaptada a várias regiões, especialmente o Estado de Minas Gerais. Como o maior produtor brasileiro de café, o estado de Minas Gerais está em risco a partir da introdução de espécies mais agressivas de RKN, como *M. paranaensis* e *M. incognita*, o que pode levar a perdas substanciais de rendimento (FERRAZ, 2008).

Meloidogyne izalcoensis é um parasita do café, registrado pela primeira vez em El Salvador e descrito por Carneiro *et al.* (2005b). O diagnóstico de *M. izalcoensis*, no entanto, é difícil devido à semelhança do seu padrão perineal com os de *M. incognita* e *M. paranaensis*. Bioquimicamente, o fenótipo da esterase (Est) é único e pode ser usado para diferenciar *M. izalcoensis* de outras espécies descritas de café (CARNEIRO & COFCEWICZ, 2008).

Marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) foram também obtidos para essa espécie e possibilitaram que cinco espécies de *Meloidogyne* parasitas de cafeeiro nas Américas fossem diferenciadas: *Meloidogyne exigua*, *M. paranaensis*, *M. incognita*, *M. arabicida* e *M. izalcoensis* (CORREA *et al.*, 2013).

Recentemente, *M. izalcoensis* foi identificada a partir de amostras provenientes de raízes de cafeeiro do Quênia (Kabete) e da Tanzânia (Mufindi), e a mesma espécie também foi detectada em repolho (*Brassica* sp.) originário do Benim (Cotonou), e em tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.) originários, respectivamente, de Tindini e Kianga, na Tanzânia (JORGE JÚNIOR *et al.*, 2016).

Em 2016, uma amostra contendo raízes de café galhadas da região de Indianópolis, MG, foi enviada à Embrapa Cenargen (Brasília, DF) e inoculada diretamente em cafeeiro cultivar Mundo Novo. As plantas de café infectadas em campo nesta região apresentaram folhas cloróticas na cv. Mundo Novo e folhas verdes intensas na cv. IAC 125 RN (resistente a *M. exigua*) cultivada na mesma área. Raízes da cv. Mundo Novo apresentaram pequenas galhas e necroses, enquanto nenhum sintoma de galha foi observado na cv. IAC 125 RN.

O objetivo deste capítulo foi identificar essa população de *Meloidogyne* sp. detectada no Triângulo Mineiro e fazer um levantamento rápido de outras espécies de *Meloidogyne* ocorrentes nessa região, utilizando os fenótipos da enzima esterase (Est) e marcadores SCAR-PCR.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Detecção de *Meloidogyne izalcoensis*

Para determinar a identidade da espécie de *Meloidogyne* da amostra proveniente de Indianópolis, as fêmeas foram extraídas das raízes de cafeeiro e caracterizadas utilizando-se fenótipos de esterase (CARNEIRO & ALMEIDA, 2001; CARNEIRO *et al.*, 2016). As raízes

remanescentes foram usadas para extração de ovos (CARNEIRO *et al.*, 2004). O DNA genômico total foi extraído de 200 a 300 µl de ovos do nematoide usando o método de extração fenol-clorofórmio como descrito por Randig *et al.* (2002), e as reações de PCR foram realizadas de acordo com Correa *et al.* (2013). Para os dados morfológicos e morfométricos foi utilizada a metodologia desenvolvida por Carneiro *et al.* (2005b).

Para satisfazer os postulados de Koch, plantas de café cv. Mundo Novo foram cultivadas em sacos plásticos de polietileno com dimensões de SBP 20x40x0,015 cm e capacidade para 5 litros preenchidos com uma mistura (1:1) de solo autoclavado e substrato para mudas Bioplant®. As plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação. Três mudas com seis pares de folhas foram inoculadas com 10.000 ovos de *Meloidogyne* (isolado de Indianópolis, MG). No preparo do inóculo, foi realizada extração a partir de raízes infectadas de cafeeiro cv. Mundo Novo, utilizando 0,5% de NaOCl e trituração em liquidificador por 30 segundos de acordo com Hussey & Barker (1973). Após a inoculação as plantas foram mantidas sob condições de estufa a 25-30 °C, com rega e adubação, conforme necessário.

Doze meses após a inoculação, o sistema radicular foi enxaguado com água da torneira e pesado; então os índices de galhas e de massa de ovos (IG, IMO) foram avaliados (HARTMAN & SASSER 1985). Os ovos foram extraídos como mencionado acima, usando NaOCl a 1% e quantificados sob um microscópio de luz com auxílio de lâmina de Peter para realização da contagem. O fator de reprodução (FR) foi calculado como $FR = PF/PI$, onde PF = população final do nematoide e PI = população inicial de nematoide (PI = 10.000).

2.2. Levantamento de espécies de *Meloidogyne* no Triângulo Mineiro

2.2.1. Descrição das áreas de coleta de amostras de raízes

Para a detecção de *Meloidogyne* spp. foram realizadas coletas em oito talhões de cafezais localizados nos municípios de Araguari e Indianópolis, ambos pertencentes à região

do Triângulo Mineiro. O clima segundo Köppen corresponde ao subtropical de altitude, com inverno seco e verão ameno (Cwb). A temperatura média do mês mais quente é inferior a 22 °C (EMBRAPA, s/d). Os solos predominantes são representados por Latossolo Vermelho distrófico e Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, e a vegetação é predominantemente de cerrado.

Os primeiros cafeicultores a se instalarem no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, principalmente nos municípios de Araguari e Patrocínio, foram alemães vindos do Paraná que contribuíram para a expansão do cultivo do café no cerrado mineiro (DO VALE *et al.*, 2014). A cafeicultura do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba caracteriza-se pelo elevado investimento em adubação, correção do solo, irrigação e mecanização, especialmente na colheita (CARNEIRO *et al.*, 2005a). A área em produção na região do Triângulo Mineiro, Alto Paranaíba e Noroeste de Minas é de 189.183 hectares, com produtividade média de 37,73 scs/ha (CONAB, 2019).

Na Tabela 2 estão relacionadas as áreas pertencentes à região do Triângulo Mineiro onde foram coletadas amostras de solo e de raízes. Em cada talhão amostrado foi coletada uma amostra composta de solo (aprox. 2000 cm³) e raízes (aprox. 200g) a uma profundidade que variou de 0-60 cm. Todas as amostras foram coletadas com o devido cuidado de se realizar a limpeza dos instrumentos utilizados, a fim de evitar a disseminação dos fitonematoides entre áreas e propriedades e a contaminação das amostras. As coordenadas geográficas e a altitude foram registradas com auxílio de um GPS de Navegação.

Tabela 2. Identificação das áreas de coleta de amostras de solo e raízes de cafeeiros nos municípios de Araguari e Indianópolis, região do Triângulo Mineiro, MG.

Área	Características do cultivo	Município	Coordenadas geográficas	Altitude (m)
A17	Cultivo de Cafeeiro (irrigado). Área do talhão: 16 ha. Cv. Catuaí.	Araguari	18°38'19" S, 48°15'16" W	909
A18	Cultivo de Cafeeiro (sequeiro). Área do talhão: 1ha. Cv. Acauã (3 anos).	Araguari	18°46'07" S, 48°00'55" W	941
A19	Cultivo de Cafeeiro (irrigado). Área do talhão: 11ha. Cv. Mundo Novo (15 anos).	Araguari	18°46'11" S, 48°00'59" W	934
A20	Cultivo de Cafeeiro (sequeiro). Área do talhão: 12 ha. Cultivar IBC 12 (8 anos).	Indianópolis	19°00'05" S, 47°53'36" W	923
A21	Cultivo de Cafeeiro (irrigado). Área do talhão: 28 ha. Cv. Catuaí 99 (12 anos).	Indianópolis	18°54'17" S, 47°54'33" W	951
A22	Cultivo de Cafeeiro (sequeiro). Área do talhão: 25 ha. Cv. Catuaí 99 e Topázio (20 anos).	Araguari	18°47'35" S, 48°02'24" W	909
A23	Cultivo de Cafeeiro (irrigado). Área do talhão: 6 ha. Cv. Mundo Novo (20 anos).	Araguari	18°31'17" S, 48°14'49" W	922
A24	Cultivo de Cafeeiro (irrigado). Área do talhão: 9 ha. Cv. Catuaí 99 (15 anos).	Araguari	18°31'36" S, 48°14'45" W	932

2.2.2. Análise baseada em Marcadores Enzimáticos e Moleculares

Partes das raízes provenientes de amostras de cafeeiros dos municípios de Araguari e Indianópolis, no Triângulo Mineiro, foram usadas para identificação de *Meloidogyne* spp. com base no fenótipo de esterase (CARNEIRO & ALMEIDA, 2001), conforme descrito anteriormente. O restante das raízes foi utilizado para extração de ovos pelo método de Hussey & Barker (1973). A suspensão de ovos foi colocada em um funil de Baermann modificado de acordo com Whitehead & Hemming (1965) para eclosão e obtenção dos juvenis.

O DNA genômico foi extraído conforme o método descrito por Randig *et al.* (2002). Primeiramente, realizou-se a maceração dos ovos (previamente extraídos e armazenados a -80 °C) em nitrogênio líquido e recuperados em microtubos de 2 ml. Adicionou-se 500 µl de tampão NIB (0,1 M NaCl; 30m M Tris pH 8; 10 mM EDTA; 0,7 mM βmercaptoetanol; 5 mM Triton – NPHO). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 13.000 rpm por dois minutos, e eliminado o sobrenadante. Esse processo foi realizado duas vezes.

Após, foram acrescentados 800 µl de tampão de homogeneização (0,1 M NaCl; 0,2M de sacarose; 10 mM EDTA) e 200 ml do tampão de lise (0,125 M EDTA; 0,5 M Tris PH 9,2, 2,3%SDS). Após a homogeneização, as amostras foram incubadas a 55 °C por 30 minutos, seguido de 10 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida, foi adicionado 1 V de fenol e realizada homogeneização, centrifugação a 13.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi recuperado e depois misturado à ½ V de fenol + ½ V de clorofórmio, centrifugado a 13.000 por três min. Ao sobrenadante foi adicionado 200 µl de éter. Após a centrifugação a 13.000 rpm por três minutos, o éter foi eliminado com auxílio de uma micropipeta. Na precipitação do DNA, 2V de etanol 100% foram adicionados ao sobrenadante, homogeneizando-se. O DNA foi recuperado com auxílio de uma micropipeta e, em seguida, foi lavado com etanol a 70%. O precipitado foi seco a temperatura ambiente, recuperado em 20 µl de água esterilizada e armazenado a -20 °C.

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. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research) nas seguintes condições: 5 minutos a 94 °C, 40 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 45 segundos a 36 °C, 2 minutos a 70 °C e uma extensão final de 10 minutos a 70 °C (RANDIG *et al.*, 2002). 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. A amplificação SCAR-Multiplex-PCR foi realizada, empregando-se os primers SCARCafé desenvolvidos por Randig *et al.* (2002) (Tabela 3).

Tabela 3. 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 *R: CCG TCC AGA TCC ATC GAA GTC	208
inc-K14F	F: GGG ATG TGT AAA TGC TCC TG R: CCC GCT ACA CCC TCA ACT TC	399
ex-D15R	F: GGG ATG TGT AAA TGC TCC TG R: CCC GCT ACA CCC TCA ACT TC	562

*F: Forward; R: Reverse.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Detecção de *M. izalcoensis*

O fenótipo da esterase (Est I4, Rm: 0,86, 0,96, 1,24, 1,30) foi utilizado para a identificação de *M. izalcoensis* (Figura 1a) (CARNEIRO *et al.*, 2005b) e também confirmar a pureza desta população. Para confirmar a identificação da espécie, a PCR usando primers SCAR amplificou um fragmento específico de tamanho esperado (por exemplo, 670 pb) típico de *M. izalcoensis* (Figura 1b) (CORREA *et al.*, 2013). Na amostra proveniente da Tanzânia (coluna 4) não houve a amplificação de fragmento, possivelmente devido à degradação do DNA da amostra, conforme observado em estudos posteriores.

A identidade da espécie foi também confirmada por características morfológicas segundo Carneiro *et al.* (2005b), apresentando dados morfométricos nos intervalos descritos para *M. izalcoensis*. Neste estudo, 50 indivíduos de cada estágio de vida (fêmeas, machos, juvenis) foram considerados. O estilete da fêmea apresentou-se robusto, com 15,0-16,0 µm de comprimento, e com o DEGO (dorsal esophageal gland orifice) entre 4,5-6,0 µm. Os machos apresentaram região anterior arredondada e alta, contínua com o contorno do corpo, e o disco labial fundido com os lábios medianos formando uma estrutura alongada. A região da cabeça não é marcada por anelações incompletas. O estilete dos machos é robusto, com comprimento de 23,0 a 26,0 µm, apresentando bulbos basais arredondados posteriormente, e DEGO de 4,0-7,0 µm. O estilete dos juvenis de segundo estágio mediu de 12,0-13,0 µm de comprimento e o

DEGO correspondeu a 3,0-4,0 μm . A cauda mediu de 45-48 μm de comprimento, apresentando formato conóide com um término arredondado.

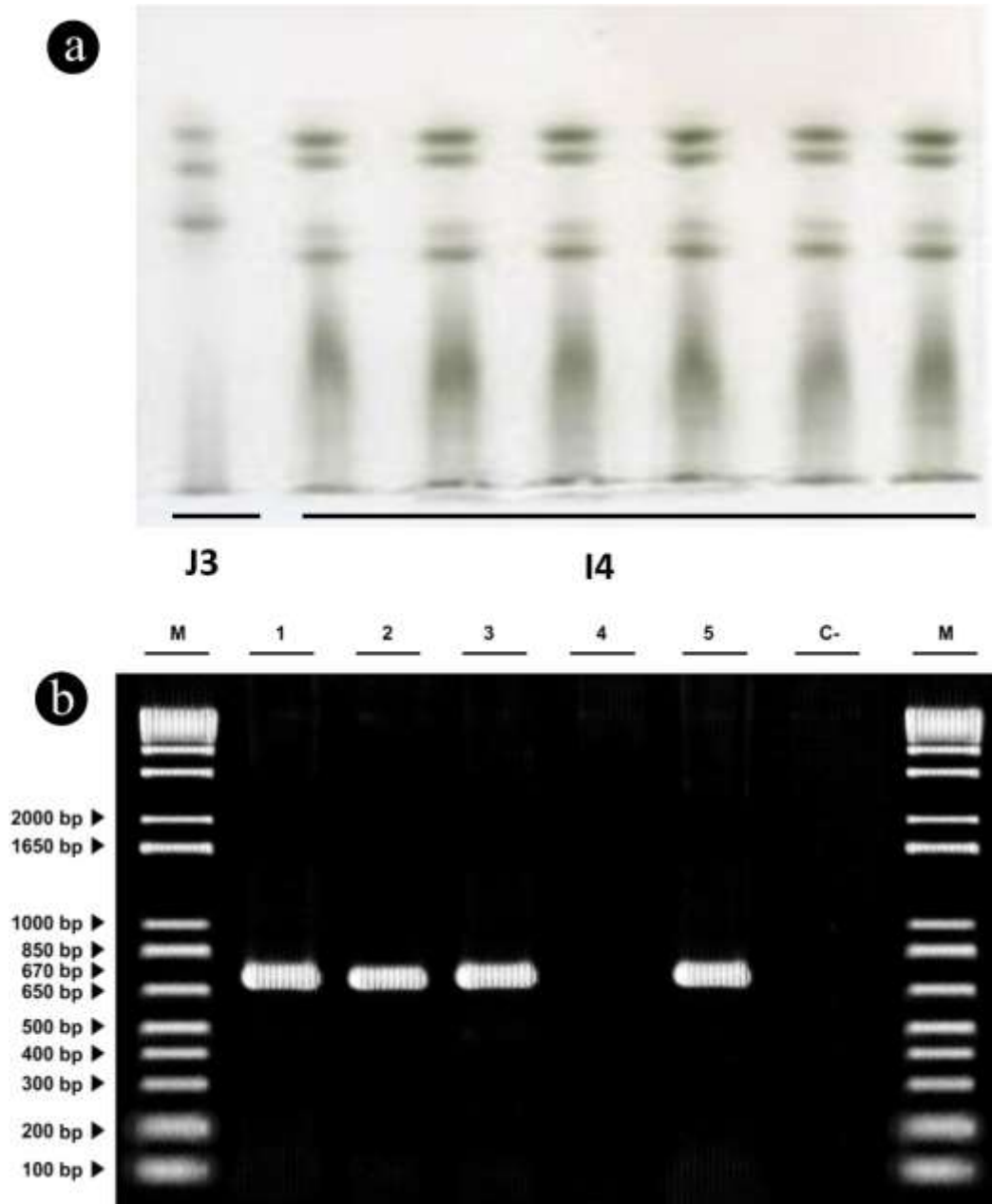


Figura 1. a) Fenótipo Esterase de *Meloidogyne izalcoensis* (Est I4) coletada em cafeeiro, Indianópolis, MG, Brasil. *M. javanica* (Est J3) foi usada como referência. b) SCAR-PCR de populações de *M. izalcoensis* de diferentes países: 1) El Salvador, Izalco; 2) Benin, Cotonou; 3) Quênia, Kabete; 4) Tanzânia, Tindini (não houve amplificação de fragmento); 5) Brasil, Indianópolis, MG; C- controle negativo; M- marcador 1 kb DNA Plus. Amostras caracterizadas com primers ar-A12F / R (Correa *et al.*, 2013).

Meloidogyne izalcoensis causa destruição severa da raiz, matando frequentemente cafeeiros em El Salvador (Carneiro *et al.*, 2005b). No Brasil, os cafeeiros infectados por esse nematoide na fazenda em Indianópolis (18° 53' 52,84" S, 47° 54' 21,00" W, elevação 968 m) foram erradicados anteriormente à realização dessa detecção, sendo substituídos pela cultura da soja, que foi plantada na área infestada. Esta espécie foi detectada primeiramente em Araguari, MG, utilizando o fenótipo da esterase (Est S4) em melão de são caetano (*Momordica indica* L.), mas a espécie permaneceu não identificada pois os autores não tinham o conhecimento do perfil de enzima (CARNEIRO, 2014).

As raízes de café infectadas com *M. izalcoensis* produziram galhas relativamente pequenas (Figura 2a). Foram observadas massas de ovos formadas externamente às raízes em grandes quantidades (Figura 2b-c) e a presença de tecidos necróticos nas extremidades das raízes (Figura 2d). Cada galha foi caracterizada por uma única fêmea expondo externamente a massa de ovos na galha. Nenhuma rachadura na superfície da raiz, tipicamente causada por *M. paranaensis* ou *M. incognita* foi observada. As galhas causadas por *M. exigua* são maiores e podem conter algumas fêmeas pequenas no interior, apresentando massas de ovos, em geral, dentro das raízes.

Os sintomas da raiz causados por *M. izalcoensis* em cafeeiro são completamente diferentes daqueles causados por *M. paranaensis*, *M. incognita*, *M. arabicida* e *M. exigua* (CAMPOS & VILLAIN, 2005), mas idênticos aos de *M. lopezi* (HUMPHREYS-PEREIRA *et al.*, 2014). Estas duas espécies, *M. izalcoensis* e *M. lopezi* (Est S4 e Est S2, respectivamente) foram coletados em diferentes fazendas na mesma região em El Salvador (HERNANDEZ *et al.*, 2004). Elas mostraram-se intimamente relacionadas em análise de DNA (CARNEIRO *et al.*, 2004). O fenótipo SA2 foi descrito como *M. lopezi* (HUMPHREYS-PEREIRA *et al.*, 2014) a partir de cafeeiros no sul da Costa Rica.



Figura 2. Sintomas causados por *Meloidogyne izalcoensis* em raízes de cafeeiro (*Coffea arabica*) cv. Mundo Novo. a) visão geral de sistema radicular infectado por *M. izalcoensis*. b-d) Pequenas galhas redondas e massas de ovos externas induzidas pelo nematoide. Seta indica necrose na ponta da raiz. Fotos: Cláudio Bezerra.

No teste realizado em casa de vegetação, as plantas de café arábica mostraram sintomas de *M. izalcoensis* (Figura 2) semelhantes àqueles observados no campo. Esta população se reproduziu bem em plantas de café, apresentando Fator de reprodução (FR) = 56,6, com coeficiente de variação (CV) = 25,4, Índice de galhas (IG) = 5 e Índice de massa de ovos (IMO) = 5. Estes resultados confirmaram a patogenicidade da população brasileira desta espécie em plantas de cafeeiro "Mundo Novo" suscetíveis, sendo possível completar os postulados de Koch.

Este é o primeiro registro de *M. izalcoensis* ocorrendo em cafeeiros no Brasil. Embora com ocorrência global, a distribuição geográfica dessa espécie no Brasil ainda não é conhecida, portanto, sua ocorrência no cafeeiro indicaria uma ameaça potencialmente

importante para o cultivo comercial de café, especialmente no estado de Minas Gerais. Considerando esta nova informação, deve ser dada prioridade à caracterização precisa de espécies de *Meloidogyne* em diferentes áreas de cultivo de café. Esta informação será de grande interesse para o desenvolvimento de variedades com resistência duradoura adaptadas ao complexo de espécies de nematoides das galhas do cafeeiro detectadas no Brasil. A ocorrência deste parasita no Brasil foi notificada ao Ministério da Agricultura do Brasil, documento n ° 214/2018 / DSV - MAPA.

3.2. Identificação de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiros no Triângulo Mineiro

Do total de oito áreas amostradas, cinco apresentaram as espécies *M. paranaensis*, *M. exigua* e em uma foi detectada *M. incognita*. Foram detectadas misturas de espécies em três áreas amostradas (A20, A21 e A23), duas com *M. paranaensis* e *M. exigua* (A20 e A21) e uma área com *M. incognita* e *M. exigua* (A23) (Tabela 4). Não foi detectada a presença de *M. izarcoensis* nas áreas amostradas.

Tabela 4. Espécies de *Meloidogyne* parasitando cafeeiros nos municípios de Araguari e Indianópolis - MG, detectadas por esterase e marcadores SCAR-PCR.

Áreas	Município	Espécies	
		Esterase (EST)	SCAR-PCR
A17	Araguari	<i>M. paranaensis</i>	<i>M. paranaensis</i>
A18*	Araguari	-	<i>M. paranaensis</i>
A19	Araguari	<i>M. paranaensis</i>	<i>M. paranaensis</i>
A20	Indianópolis	<i>M. paranaensis</i> e <i>M. exigua</i>	<i>M. exigua</i>
A21	Indianópolis	<i>M. paranaensis</i> e <i>M. exigua</i>	<i>M. paranaensis</i> e <i>M. exigua</i>
A22	Araguari	<i>M. exigua</i>	<i>M. exigua</i>
A23	Araguari	<i>M. incognita</i> e <i>M. exigua</i>	<i>M. incognita</i> e <i>M. exigua</i>
A24	Araguari	<i>M. exigua</i>	<i>M. exigua</i>

* raízes muito degradadas.

Sintomas típicos de *M. exigua* e *M. paranaensis* nas raízes e parte aérea das plantas de diferentes cultivares de cafeeiro semelhantes aos relatados por Salgado *et al.* (2011) foram verificados nas lavouras de Araguari e Indianópolis –MG (Figura 3).



Figura 3. A) Declínio causado por *Meloidogyne exigua* em plantas de cafeeiro cv. Catuaí Amarelo Araguari - MG, B) Raízes de cafeeiro cv. Catuaí Amarelo com pequenas galhas redondas induzidas por *M. exigua*, Araguari – MG, C) Descorticamento e rachaduras em raiz infectada por *M. paranaensis*, cultivar IBC 12, Indianópolis – MG, D) Lavoura de cafeeiros da cv. Catuaí Vermelho 99, com severo dano produzido por *M. paranaensis*, Indianópolis- MG.

A identificação correta das espécies presentes nas áreas foi possível devido ao uso combinado de eletroforese de isoenzimas (Est- Esterase) e marcadores moleculares espécie-específicos (PCR-SCAR).

O fenótipo Est E2 (Rm 1,1 e 1,9) foi detectado em todas as populações de *M. exigua* (Figura 4A). As populações de *M. paranaensis* apresentaram o fenótipo Est P1(Rm: 1.32) (Figura 4B). Foi detectada uma população de *M. incognita* com fenótipo Est I1 (Rm:1,03), de acordo com Carneiro *et al.* (2000, 2004, 2005c) e Carneiro & Cofcewicz (2008). Somente em uma das amostras (A18) não foi possível realizar a identificação mediante esterase devido à destruição das raízes, em decorrência do parasitismo por *M. paranaensis*.

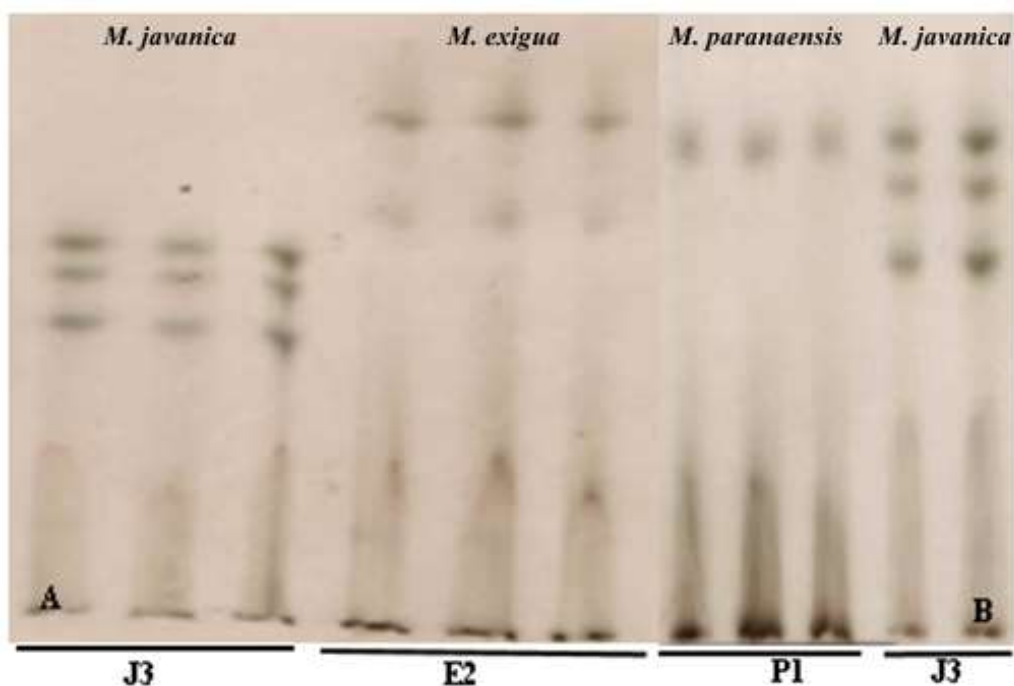


Figura 4. Fenótipos de esterase (Est) em diferentes populações de *Meloidogyne* spp. do Triângulo Mineiro. A) *M. exigua* fenótipo de esterase (Est E2); B) *M. paranaensis* fenótipo de esterase (Est P1). *M. javanica* (Est J3) foi usado como padrão de referência.

Na análise dos marcadores espécie-específicos do tipo SCAR desenvolvidos para as espécies de nematoides do cafeeiro *M. incognita*, *M. paranaensis* e *M. exigua*, um único fragmento de 208 pb foi obtido para as cinco populações de *M. paranaensis* (Est P1); um fragmento de 399 pb foi obtido para uma população de *M. incognita* (Est I1) e um fragmento

de 562 pb para as cinco populações de *M. exigua* (Est E2) foi amplificado (Figura 5). Esses dados confirmaram a identificação dessas espécies segundo os perfis de esterase.

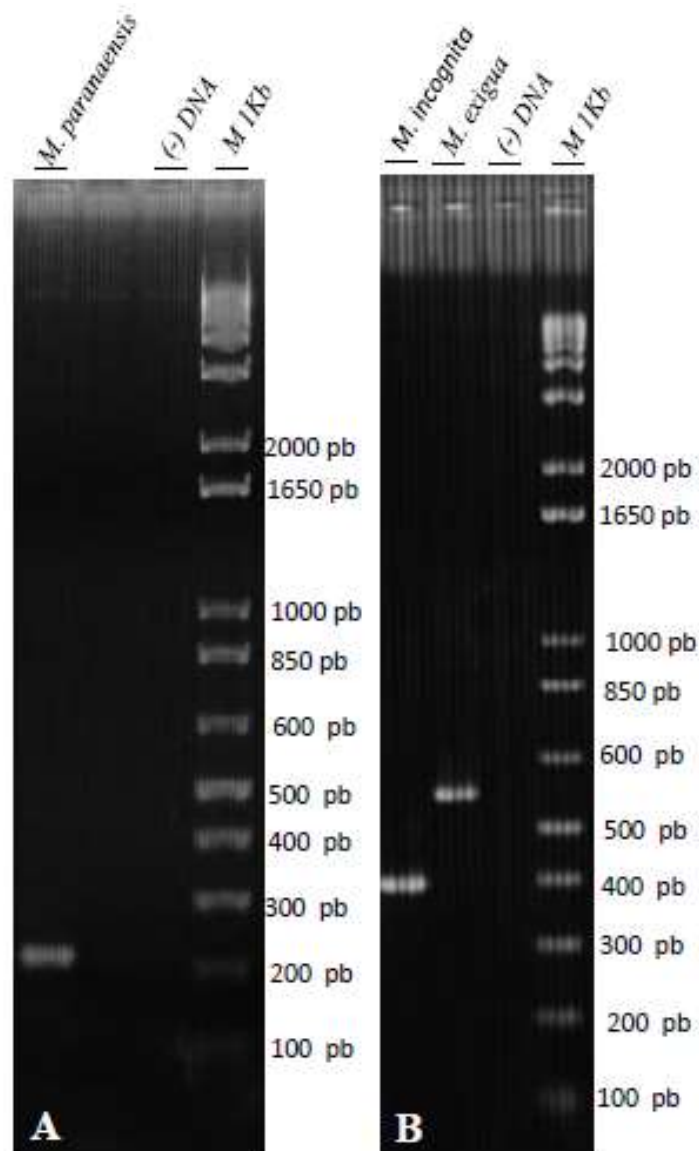


Figura 5. Amplificações SCAR- PCR para *Meloidogyne* spp. parasitas do cafeeiro nos municípios de Araguari e Indianópolis, MG. A) *M. paranaensis* (208 pb) B) *M. incognita* (399 pb), *M. exigua* (562 pb). (-) DNA: controle negativo, M: marcador 1kb DNA Plus.

Os marcadores SCAR foram eficientes na diferenciação das espécies de *Meloidogyne* presentes nas amostras de cafeeiro do Triângulo Mineiro. Esses dados corroboraram com os obtidos por Carneiro *et al.* (2005c), que identificaram misturas de espécies de *Meloidogyne* em 24% de um total de 54 amostras, observando a predominância de *M. incognita* e *M. paranaensis*. Neste estudo, foi observada também a mistura das espécies *M. exigua* e *M. paranaensis* em 25% das amostras e *M. incognita* e *M. exigua* em 13% das amostras.

Recentemente, Santos *et al.* (2018b), na região Sul de Minas Gerais, importante pólo produtor de café, confirmaram a espécie *M. exigua* amplamente distribuída naquela região, e *M. paranaensis* restrita a um município (Três Pontas), enquanto *M. incognita* ocorreu em três municípios (Aguanil, Coqueiral e Três Pontas), sendo o primeiro relato da espécie parasitando cafeeiro na região do Sul do estado de Minas Gerais. O levantamento da ocorrência de *Meloidogyne* e *Pratylenchus* em cafeeiros de Minas Gerais realizado por Bell *et al.* (2018) mostrou a presença de *P. brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 e *P. coffeae* (Zimmermann, 1898) Goodey, 1959 em 37 e 7% das amostras, respectivamente, enquanto que *M. exigua*, *M. paranaensis* e *M. incognita* foram observadas em 35, 27 e 17% das amostras, respectivamente. No presente trabalho, as espécies *M. exigua*, *M. paranaensis* e *M. incognita* foram encontradas em maior frequência.

No estudo realizado por Terra *et al.* (2018) foram analisadas 2.830 amostras de mudas de cafeeiros, provenientes de viveiros comerciais localizados em 84 municípios das regiões Sul e Zona da Mata de Minas Gerais. *Meloidogyne* spp. foram identificadas em 11 amostras em viveiros dos municípios mineiros de Rosário da Limeira, Muriaé, Carangola e Cabo Verde, *Pratylenchus* spp. em 281 amostras (11,6%) e *Rotylenchulus reniformis* Limford & Oliveira, 1940 foi identificada em 47 amostras.

Carneiro (2014) em um levantamento realizado em 18 cafezais do município de Araguari-MG detectou, com auxílio de eletroforese de isoenzimas e caracteres morfológicos,

M. incognita, *M. exigua* e *M. paranaensis* em 50%, 28% e 17% das amostras, respectivamente. Na planta daninha melão-de-são-caetano (*Momordica indica* L.), presente em um dos cafezais amostrados, foi detectada uma espécie de *Meloidogyne* sp. que apresentou o fenótipo da esterase (Est S4). Essa espécie foi posteriormente identificada como *M. izalcoensis* conforme foi descrito neste capítulo.

Salgado *et al.* (2014a) constataram a presença de *M. exigua* em 92,95%, *M. paranaensis* em 4,22% e *M. exigua* e *M. paranaensis* em mistura em 2,81% das detecções de um total 165 amostras coletadas em lavouras cafeeiras na região Sul de Minas Gerais. Para *M. exigua* os fenótipos de esterase (Est) E1 e E2 foram encontrados, no entanto, este último foi encontrado na maioria dos municípios amostrados (Guaxupé, Monte Belo, Monte Santo de Minas, Muzambinho e São Pedro da União). O fenótipo Est (P1) de *M. paranaensis* foi detectado parasitando cafeeiros nos municípios de Alpinópolis e Coqueiral, causando dano severo às plantas.

Estudos de diversidade genética foram desenvolvidos por Muniz *et al.* (2008, 2009), com quinze populações de *M. exigua* (três raças) presentes em cafeeiros do Brasil, Bolívia e Costa Rica e uma população obtida de seringueira no Brasil. Nesses estudos as identificações das espécies foram realizadas com marcadores izoenzimáticos e moleculares. Foram detectados quatro fenótipos de esterase (E1, E2, E2a e E3) e três de malato-desidrogenase (N1, N1a e N2). Os primers SCAR multiplex-PCR possibilitaram a identificação de todas as populações de *M. exigua*. Além disso, verificou-se alto grau de polimorfismo intra-específico (25,9-59,6%) em todas as populações estudadas. Os mesmos autores detectaram uma população de *M. exigua* proveniente de Bom Jesus de Itabapoana –RJ altamente virulenta à cultivar IAPAR 59 (FR=396,2) e ao genótipo H 419-5-4-5-2 (FR=396,2), que até então, eram consideradas resistentes a *M. exigua*.

4. CONCLUSÕES

Os métodos utilizados permitiram a detecção misturas de espécies em três áreas amostradas, duas com *M. paranaensis* e *M. exigua* e uma com *M. incognita* e *M. exigua*.

Os métodos bioquímicos e moleculares, juntamente com a realização dos postulados de Koch permitiram proceder o primeiro relato de *M. izalcoensis* parasitando cafeeiros no Brasil e a sua publicação em periódico especializado (STEFANELO *et al.*, 2019).

CAPÍTULO 2

Resposta de genótipos de cafeeiro à inoculação com *Meloidogyne izalcoensis*

Resposta de genótipos de cafeeiro à inoculação com *Meloidogyne izarcoensis*

RESUMO

O uso da resistência genética é uma das alternativas mais eficazes no controle de nematoides das galhas do cafeeiro. Neste capítulo, buscou-se avaliar a reação de diferentes genótipos de cafeeiros a uma população de *Meloidogyne izarcoensis*, recentemente detectada no Brasil, na região do Triângulo Mineiro. Para isso, foram conduzidos dois experimentos ambos com a mesma concentração de inóculo e os mesmos genótipos (IPR 100, Híbrido do Timor UFV408-01 MG 0294 pl.1 R1 (6-I-III), Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 MG 0179 pl3 R1 (28-2-II), Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 MG 0179 pl1 R1 (16-5-III), Catuaí Amarelo 62 e o porta- enxerto Cv. Apatã IAC 2258). O primeiro experimento foi avaliado aos 300 dias após a inoculação e o segundo aos 240 dias após a inoculação. De maneira geral, nos dois experimentos foi verificada suscetibilidade dos acessos avaliados, exceto para a cv. Apatã IAC 2258 que apresentou resistência. Mais estudos deverão ser realizados no sentido de confirmar a segregação da cultivar Apatã IAC 2258.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, nematoides das galhas, resistência genética.

Reaction of coffee genotypes to *Meloidogyne izalcoensis*

ABSTRACT

Genetic resistance is one of the most efficient alternatives for controlling the root-knot nematodes on coffee. In this chapter, the reaction of different coffee genotypes to infection by a population of *Meloidogyne izalcoensis*, recently detected in the Triângulo Mineiro region, Brazil. For this, two separated assays were performed, both using the same inoculum concentration and the same genotypes (IPR 100, Hybrid of Timor UFV408-01 MG 0294 pl.1 R1 (6-I-III), Catuai Vermelho x Amphillo 2-161 MG 0179 pl3 R1 (28-2-II), Catuai Vermelho x Amphillo 2-161 MG 0179 pl1 R1 (16-5-III), Catuaí Amarelo 62 and the rootstock Cv. Apoatã IAC 2258). The first assay was evaluated 300 days after inoculation, and the second, 240 days after inoculation. In general, in both experiments, it was verified susceptibility of the accesses tested, except for cv. Apoatã IAC 2258 which was shown to be resistant. Further studies should be carried out in order to prove the segregation of the cultivar Apoatã IAC 2258.

Keywords: *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, root-knot nematodes, genetic resistance

1. INTRODUÇÃO

Os nematoides das galhas das raízes (RKN) estão entre os patógenos mais importantes do cafeeiro, causando perdas de rendimento de aproximadamente 36% em todo o mundo (HEIN & GATZWEILER, 2006; FATOBENE *et al.*, 2017). O uso da resistência genética da planta resulta na redução da densidade populacional de nematoides no solo, proporcionando a manutenção aceitável da produção em áreas infestadas (SALGADO *et al.*, 2014).

A grande maioria das fontes de resistência a *Meloidogyne* spp. foi identificada em *C. canephora* (BERTRAND *et al.*, 2000) e em cafeeiros silvestres de *C. arabica* da Etiópia (ANZUETO *et al.*, 2001; BOISSEAU *et al.*, 2009). No entanto, com exceção da cultivar IPR 100, originária do cruzamento entre cafeeiro do germoplasma “Catuai” x genótipo da série ‘BA10’, portador de genes de *C. liberica* Bull ex Hiern (SERA *et al.*, 2007), todas as cultivares comerciais de *C. arabica* são altamente suscetíveis a *Meloidogyne* spp. Recentemente, Santos *et al.* (2018a) relataram a resistência genética dessa cultivar de *C. arabica* a sete populações de *M. paranaensis* provenientes de diferentes localidades do Brasil e de outros países. Foram estudados três perfis enzimáticos típicos da espécie (Est P1, P2 e P2a) e a resistência confirmou-se com baixos índices de segregação.

Várias linhagens derivadas de cruzamentos interespecíficos entre *C. arabica* e *C. canephora* (Híbrido do Timor) mostraram resistência a *M. exigua* semelhante à observada em *C. canephora* (SILVAROLLA *et al.*, 1998; BERTRAND *et al.*, 2001; MUNIZ *et al.*, 2009). Porém, não foi ainda verificada a resistência a *M. izarcoensis* em cultivares de cafeeiro com genes de resistência a outras espécies de *Meloidogyne*.

O objetivo deste capítulo foi avaliar a reação de diferentes genótipos de cafeeiros a *M. izarcoensis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Estudos de resistência genética

Foram utilizados inóculos de *M. izalcoensis* provenientes de cafeeiro de Indianópolis, MG, reproduzidos em tomateiros ou cafeeiros. Os ovos dos sistemas radiculares foram extraídos segundo o protocolo descrito por Hussey & Barker (1973) modificado por Bonetti & Ferraz (1981), três meses e oito meses após a inoculação para os tomateiros e cafeeiros, respectivamente.

Plantas de cafeeiro com 4 a 6 pares de folhas cultivadas em sacos de polietileno com dimensões de 20x40x0,015 cm e capacidade para 5 litros preenchidos com uma mistura (1:1) de solo autoclavado e substrato para mudas Bioplant® foram inoculadas com 10.000 ovos/planta. Foram desenvolvidos dois experimentos, sendo o primeiro implantado no dia 27/3/2018 e o segundo em 11/4/2018. O primeiro experimento foi avaliado aos 300 dias após a inoculação, enquanto o segundo experimento foi avaliado aos 240 dias após a inoculação. Os experimentos foram mantidos em diferentes casas de vegetação, ambos implantados com os mesmos genótipos e a mesma concentração de inóculo.

Os genótipos utilizados foram Catuaí Amarelo IAC 62 (como testemunha suscetível), Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 (28-2-II) (*Coffea arabica*), Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 (16-5-III) (*Coffea arabica*), IPR100, Híbrido do Timor UFV 408-01 MG (6-I-III) e Apoatã IAC 2258 (*Coffea canephora*) (como resistente). Na avaliação dos experimentos foram determinadas as seguintes variáveis: peso fresco das raízes, índice de galhas (IG), número total de ovos por grama de raiz, número total de ovos, fator de reprodução e reação final.

Na determinação do peso fresco, raízes inteiras foram cuidadosamente lavadas para retirar o solo aderido e, após removido o excesso de água, foram pesadas com auxílio de balança de precisão. Após a pesagem, as raízes foram coradas com Floxina B a 0,0015% (15

mg/litro de água), durante 15-20 minutos, e o índice de galhas quantificado por sistema radicular. O índice de galhas (IG) foi obtido por meio de uma escala de grau ou nota, de 0 a 5, em função do número de galhas (0 = nenhuma galha, 1 = 1-2 galhas, 2 = 3-10, 3 = 11-30, 4 = 31-100, 5 = maior que 100 galhas), seguindo a metodologia de Hartman & Sasser (1985).

A extração de ovos foi realizada conforme os métodos referidos acima, usando 1% de NaOCl. A avaliação do número total de ovos foi realizada em lâminas de Peter em tríplice contagem, multiplicando a média das contagens pelo valor da diluição utilizada (10X) e pelo volume da amostra (100mL).

O número de ovos por grama de raiz foi obtido pela razão entre número total de ovos e o peso fresco da raiz. O fator de reprodução (FR) foi calculado da seguinte forma: $FR = \text{População final} / \text{População inicial}$, de acordo com Oostenbrink (1966).

Para a obtenção da reação final, os genótipos foram classificados usando quatro critérios em conjunto: a) altamente resistentes (AR), tratamentos para os quais $FR < 1$; b) resistentes (R), tratamentos para os quais $FR \geq 1$ e que apresentaram FRs com uma redução maior que 80 % em relação à testemunha e diferença estatística comprovada; c) moderadamente resistentes (MR), tratamentos com redução de FR menor que 80% e diferença estatística comprovada; d) suscetíveis (S) com FRs equivalentes estatisticamente à testemunha. As análises de variância foram realizadas transformando-se as médias em $\log(x+1)$ pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$), para facilitar o processo de separação dos níveis de resistência.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento (Tabela 5) para a variável massa fresca de raiz houve diferença estatística entre as cultivares IPR 100 e o porta-enxerto Apatã IAC 2258. Os genótipos restantes não diferiram entre si e nem da cultivar suscetível Catuaí Amarelo 62. A

diferença observada era esperada por se tratarem de cultivares com características genéticas próprias.

Quanto às variáveis número de ovos por grama de raiz e número de ovos, houve diferença estatística entre Catuaí Amarelo 62, que apresentou maior número de ovos (cerca de 2190), e as cultivares Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 (16-5-III) e Apoatã IAC 2258 que apresentaram aproximadamente 493 e 343 ovos, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Reação de cinco genótipos de cafeeiro a uma população de *Meloidogyne izealcoensis*, avaliação aos 300 dias após a inoculação.

Espécies	Genótipos	Peso Fresco das Raízes (g) ²	Índice de Galhas (IG)	Nº total de ovos/g de raiz ³	Nº Total de ovos ⁴	Fator de reprodução (FR) ⁵	Reação Final
<i>Coffea arabica</i> L.	Catuaí Amarelo 62 ⁶	29,6 AB ¹	5	7856,7 A	2189,5 A	21,9 A	S ⁷
<i>C. arabica</i> x <i>C. liberica</i>	IPR 100	44,8 A	5	4415,2 ABC	1789,8 A	17,9 A	S
<i>C. arabica</i> x <i>C. canephora</i> (Pierre ex Froehn)	Híbrido de Timor UFV 408-01 MG 0294 pl.1 R1 (6-I-III)	28,7 AB	5	6826,4 AB	1625,3 A	16,9 A	S
<i>C. arabica</i>	Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 MG 0179 p13 R1 (28-2-II)	33,3 AB	5	5029,0 ABC	1484,8 A	15,3 A	S
<i>C. arabica</i>	Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 MG 0179 p11 R1 (16-5-III)	30,9 AB	5	1813,7 C	493,3 B	5,1 B	MR ⁸
<i>C. canephora</i>	porta-enxerto Cv. Apoatã IAC 2258	16,1 B	5	3209,0 BC	342,9 C	3,7 C	R ⁹

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott Knott a 5% de probabilidade, (CV= coeficiente de variação); ²Peso fresco das raízes foi transformado para (peso raiz fresca +0,5)^{1/2}, CV= 21,21%; ³Nº total de ovos/g de raiz foi transformado para $\sqrt{(\text{ovos g raiz})}$, CV= 43,65%; ⁴Nº total de ovos foi transformado para Log₁₀(Massa de ovos+1), CV= 11,31%; ⁵Fator de reprodução (FR) foi transformado para Log₁₀ (FR+1), CV = 26,62%; ⁶Padrão de suscetibilidade (PS); ⁷(S) = Suscetível; ⁸(MR) = Moderadamente resistente; ⁹(R) = Resistente.

Os parâmetros mais adequados para a análise da resistência genética são o Fator de Reprodução (FR) e o número total de ovos; esses dois parâmetros estão altamente correlacionados (LIMA *et al.*, 2015). Para essa última variável, os genótipos Híbrido do

Timor, Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 (28-2-II) e a cultivar IPR100 não diferiram de Catuaí Amarelo 62 (testemunha). Por outro lado, o genótipo Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 (16-5-III), diferiu estatisticamente da cultivar testemunha e da cultivar Apatã IAC 2258.

Em relação ao fator de reprodução, as cultivares IPR 100, Híbrido do Timor UFV 408-01 MG e Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 (28-2-II) não diferiram estatisticamente do tratamento testemunha (padrão de suscetibilidade) e foram consideradas suscetíveis (Tabela 5). O genótipo Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 (16-5-III) diferiu estatisticamente da cultivar testemunha Catuaí Amarelo 62 e foi considerado moderadamente resistente (MR). A cultivar Apatã IAC 2258 diferiu da testemunha e das outras cultivares e foi considerada resistente (82,74 % de redução populacional) a *M. izalcoensis*.

No experimento 2 (Tabela 6), para a variável massa fresca de raiz os resultados foram semelhantes ao experimento 1 (Tabela 6). Houve diferença estatística entre a cultivar IPR 100 e a cultivar Apatã IAC 2258. Os demais genótipos não diferiram entre si e da cultivar suscetível Catuaí Amarelo 62.

Quanto ao número de ovos por grama de raiz, houve diferença estatística significativa entre as cultivares Catuaí Amarelo (testemunha) e cultivar Apatã IAC 2258 (Tabela 6). Os demais genótipos não diferiram da cultivar suscetível Catuaí Amarelo 62. Para o número total de ovos, os genótipos Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 MG 0179 pl3 R1 e Apatã IAC 2258 diferiram estatisticamente dos demais genótipos (Tabela 6).

Em relação ao fator de reprodução (Tabelas 5 e 6), as cultivares IPR100, Híbrido do Timor HT UFV 408-01 (6-I-III) e Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 (16-5-III) não diferiram estatisticamente da cultivar testemunha Catuaí Amarelo 62. A cultivar Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 (28-2-II) diferiu estatisticamente da testemunha e foi considerada moderadamente resistente (MR) neste ensaio (redução de FR < 80%). Apatã IAC 2258 diferiu estatisticamente da cultivar suscetível Catuaí Amarelo 62, sendo considerada

altamente resistente (FR<1,0), enquanto que no ensaio anterior foi considerada apenas resistente.

Tabela 6. Reação de cinco genótipos de cafeeiro a uma população de *Meloidogyne izarcoensis*. Avaliação aos 240 dias após a inoculação.

Espécies	Genótipos	Peso Fresco das Raízes (g) ²	Índice de Galhas (IG)	Nº total de ovos/g de raiz ³	Nº Total de ovos ⁴	Fator de reprodução (FR) ⁵	Reação Final
<i>Coffea arabica</i> L.	Catuai Amarelo 62 ⁶	27,7 AB ¹	5	5807,7 A	1231,8 A	13,0 A	S ⁷
<i>C. arabica</i> x <i>C. liberica</i>	IPR 100	37,2 A	5	3412,7 AB	1202,8 A	12,1 A	S
<i>C. arabica</i> x <i>C. canephora</i> (Pierre ex Froehn)	Híbrido do Timor HT UFV 408-01 MG 0294 pl.1 R1 (6-I-III)	30,3 AB	5	2361,4 AB	612,7 A	6,8 A	S
<i>C. arabica</i>	Catuai Vermelho x Amphillo 2- 161 MG 0179 pl3 R1 (28-2-II)	22,0 AB	5	1998,1 AB	376,4 B	4,0 B	MR ⁸
<i>C. arabica</i>	Catuai Vermelho x Amphillo 2-161 MG 0179 pl1 R1 (16-5-III)	24,0 AB	5	3200,2 AB	721,5 A	7,2 A	S
<i>C. canephora</i>	porta-enxerto Cv. Apoatã IAC 2258	16,1 B	4	677,3 B	8,4 B	0,8 C	AR ⁹

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott Knott a 5% de probabilidade, (CV= coeficiente de variação); ²Peso fresco das raízes foi transformado para (peso raiz fresca +0,5)^{1/2}, CV= 23,65%; ³ Nº total de ovos/g de raiz foi transformado para $\sqrt{\text{ovos g /raiz}}$, CV= 36,70%; ⁴Nº total de ovos foi transformado para $\log_{10}(\text{número total de ovos}+1)$, CV= 25,27%; ⁵Fator de reprodução (FR) foi transformado para $\log_{10}(\text{FR}+1)$, CV=33,02%; ⁶Padrão de suscetibilidade (PS); ⁷(S) = Suscetível; ⁸(MR) = Moderadamente resistente; ⁹(AR) = Altamente resistente.

O índice de galhas foi igual (IG=5) para todos os genótipos nos dois experimentos, exceto para a cultivar Apoatã IAC 2258 (IG=4) no experimento 2 (Tabela 6).

Todas as cultivares e genótipos de cafeeiro testados apresentaram sintomas característicos de *M. izarcoensis*: presença de galhas pequenas arredondadas, geralmente em maior número nas raízes mais jovens, necrose na ponta da raiz e massas de ovos externas induzidas pelo nematoide. No entanto, a cultivar Apoatã IAC 2258, apresentou sintomas típicos de *M. izarcoensis* em algumas plantas avaliadas, enquanto que no restante das plantas

esses sintomas não foram observados (Figura 6 A-F). Esse comportamento está provavelmente relacionado à segregação presente nessa cultivar, que não foi possível quantificar neste trabalho.



Figura 6. Sintomas típicos de *Meloidogne izarcoensis* em genótipos de cafeeiro aos 240 dias após a inoculação. A) Catuaí Amarelo 62, B) Porta-enxerto Cv. Apoatã IAC2258, C) Híbrido do Timor HT UFV 408-01 MG 0294 pl.1 R1 (6-I-III), D) Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 MG 0179 pl3 R1 (28-2-II), E) Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 MG 0179 pl1 R1 (16-5-III), F) Cv. IPR 100.

De maneira geral, todos os genótipos avaliados (Catuaí Amarelo 62, IPR 100, Híbrido do Timor HT UFV 408-01 MG 0294 pl.1 R1 (6-I-III), Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 MG 0179 pl3 R1 (28-2-II), Catuaí Vermelho x Amphillo 2-161 MG 0179 pl1 R1 (16-5-III)) apresentaram suscetibilidade a *M. izarcoensis*, exceto Apoatã IAC 2258, que apresentou

resistência, com algumas plantas segregando para essa característica. Santos *et al.* (2018a) também observaram segregação dessa cultivar de cerca de 12% para reação a *Meloidogyne paranaensis*.

Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho para o Híbrido do Timor UFV 408-01 foram relatados por Carneiro *et al.* (2008), testando a progênie H419-5-4-5 obtida do cruzamento artificial entre a cultivar Catuaí Amarelo IAC 30, com a seleção do Híbrido de Timor UV 445-46, que foi suscetível a *M. izarcoensis* (FR= 71,9) mas resistente a *M. exigua* (FR=0,9). Hernandez *et al.* (2004) não observaram resistência a *M. izarcoensis* (Est SA4) em cultivares de *C. arabica* provenientes da Etiópia e com resistência a *M. paranaensis* (Boisseau *et al.*, 2009). Até o momento, esses dois primeiros trabalhos foram pioneiros na seleção de genótipos de cafeeiro resistentes a *M. izarcoensis*.

Em relação aos genótipos estudados nesse capítulo, alguns já foram testados para outras espécies de *Meloidogyne*. Cafeeiros do genótipo Híbrido do Timor UFV 408-01 e progênies F₄ resultantes do cruzamento entre Catuaí Vermelho e Amphillo MR 2-161 foram os mais promissores em ensaios realizados em casa de vegetação para *M. incognita* e *M. paranaensis* (PERES *et al.*, 2017), e em áreas infestadas por *M. paranaensis* (SALGADO *et al.*, 2014b). Entretanto, neste estudo os dois materiais genéticos acima citados foram suscetíveis a *M. izarcoensis*. Provavelmente, fontes de resistência provenientes de *C. arabica* ‘Amphillo’ não são eficientes no controle desse nematoide.

Treze clones de *Coffea canephora* oriundos de variedades promissoras utilizadas em programas de melhoramento do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) foram avaliados para resistência a cinco populações de *Meloidogyne*. A variedade clonal “Clone 14” apresentou múltipla resistência a *M. exigua*, *M. incognita* (raça 3 e raça 1) e *M. paranaensis* (LIMA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2018a).

Novos ensaios deverão ser realizados com materiais genéticos originários de *C. canephora*, entre eles o ‘Clone 14’, para comprovar a resistência a *M. izarcoensis*.

Em estudos de diversidade genética de nematoides das galhas do cafeeiro, *M. izarcoensis* (Est SA4) separou-se filogeneticamente de todas as outras espécies (*M. exigua*, *M. paranaensis*, *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. enterolobii*) exceto *M. lopezi* (EstSA2), com grande distância genética (Carneiro *et al.*, 2004). Dessa maneira, é de se esperar que as fontes de resistência genética também sejam diferentes. Este estudo mostrou que algumas fontes de resistência existentes, tais como o Híbrido do Timor, Amphillo e IPR 100 apresentaram suscetibilidade a *M. izarcoensis*, mas somente *C. canephora* (Apoatã) apresentou resistência de forma mais consistente.

O uso de cultivares ou porta-enxertos resistentes constitui um método de controle de baixo custo, ambientalmente correto e eficiente. Em comparação com vírus, bactérias ou fungos, os nematoides do gênero *Meloidogyne* são caracterizados por baixa dispersão natural e baixa diversidade genética entre as populações, o que sugere que genes duráveis de resistência podem ser obtidos em plantas cultivadas (McDONALD & LINDE, 2002; SANTOS *et al.*, 2012). A adoção de cultivares multirresistentes como é o caso da Apoatã IAC 2258 como porta enxerto é justificada, pois em condições de campo, mais de uma espécie de *Meloidogyne* pode ocorrer, simultaneamente, como já foi demonstrado por Carneiro *et al.* (2005c). A resistência do Apoatã IAC 2258 a *M. izarcoensis* deve ser avaliada em ensaios futuros, para corroborar os resultados obtidos nesses dois ensaios. Trabalhos futuros deverão ser realizados no sentido de testar outras fontes de resistência, e um projeto recentemente aprovado pelo Consórcio Brasileiro do Café tem esse objetivo.

4. CONCLUSÕES

As fontes de resistência do cafeeiro a *M. izarcoensis* não são exatamente as mesmas já relatadas para *M. paranaensis*, *M. incognita* e *M. exigua*.

Cultivares cuja fonte de resistência é *Coffea canephora* são promissoras para estudar a resistência a *M. izarcoensis*.

Mais repetições deverão ser incluídas em trabalhos futuros de seleção de resistência de cafeeiros a *M. izarcoensis*, para ser possível detectar a segregação das cultivares estudadas.

A cultivar IPR 100 não confere resistência a *M. izarcoensis*.

O porta-enxerto Apoatã IAC 2258 foi o único que apresentou resistência nos dois ensaios realizados.

CAPÍTULO 3

Validação de marcadores microssatélites associados a genes de resistência a *Meloidogyne exigua* em cafeeiro

Validação de marcadores microssatélites associados a genes de resistência a *Meloidogyne exigua* em cafeeiro

RESUMO

Marcadores microssatélites (SSR) associados à resistência a *Meloidogyne exigua* em cafeeiro foram obtidos para o Híbrido do Timor HT440-10 e podem auxiliar na seleção de plantas resistentes portadoras dos mesmos genes de resistência. Assim, objetivou-se avaliar 11 marcadores recentemente identificados em genótipos de cafeeiro. O experimento foi conduzido em duas etapas. Na primeira, foram avaliados os 11 marcadores nos genótipos Híbridos do Timor UFV 408-01 (036) e UFV 408-01 (090), IPR100 e linhagem 83-3do IPR 100 (resistentes) e Catuaí IAC 62. Na segunda etapa, foram testados uma subamostra dos 11 marcadores originais mais promissores, os marcadores: SSRCafé 4, 13, 15, 20 e 40 nos genótipos Híbrido do Timor 440-10 e Catuaí IAC 86. Na primeira etapa, quatro marcadores (36,4%) mostraram-se polimórficos: SSRCafé 4, 13, 15 e 41. Dois marcadores foram monomórficos, SSRCafé 14 e 37 e cinco não amplificaram nenhum fragmento: SSRCafé 19, 20, 32, 39 e 40. Para os quatro locos polimórficos, a heterozigiosidade observada (H_o) foi maior do que a esperada (H_e), resultando em um coeficiente de endogamia negativo. Na segunda etapa, três marcadores (27,2%) SSRCafé 13, 20 e 40 mostraram-se polimórficos e SSRCafé 15 mostrou-se monomórfico nos genótipos do Híbrido do Timor 440-10 e Catuaí amarelo IAC 86. Com base nos resultados, conclui-se que os marcadores microssatélites SSRCafé 13, 20 e 40 podem ser utilizados apenas na seleção de progênies resistentes resultantes de cruzamentos com o Híbrido do Timor HT440-10. Em relação aos outros marcadores, mais estudos serão necessários para sua validação.

Palavras-chave: genotipagem, nematoide das galhas, *Coffea arabica*.

Validation of microsatellite markers associated with *Meloidogyne exigua* resistance genes in coffee

ABSTRACT

Microsatellite markers (SSR) associated with resistance to *Meloidogyne exigua* in coffee were obtained for the Hybrid of Timor HT440-10 and may aid in the selection of resistant plants bearing the same resistance genes. Thus, it was aimed to evaluate 11 recently published markers on coffee genotypes. The experiment was carried out in two phases. In the first, the 11 markers were evaluated on the genotypes: hybrids of Timor UFV 408-01 (036), UFV 408-01 (090), IPR100 and 83-3, lineage of the IPR 100, and Catuaí IAC 62 (susceptible). In the second phase, SSRCafé markers 4, 13, 15, 20 and 40 were tested on the genotypes: Hybrid of Timor 440-10 and Catuaí IAC 86 (susceptible). In the first phase, four markers (36.4%) were polymorphic: SSRCafé 4, 13, 15 and 41. Two markers were monomorphic, SSRCafé 14 and 37 and five did not amplify any fragment: SSRCafé 19, 20, 32, 39 and 40. For the four polymorphic loci, the observed heterozygosity (H_o) was higher than the expected (H_e), resulting in a negative inbreeding coefficient. In the second phase, three markers (27.2%) SSRCafé 13, 20 and 40 showed to be polymorphic, and SSRCafé 15 was monomorphic on the genotypes Hybrid of Timor 440-10 (resistant) and Catuaí Vermelho IAC 86 (susceptible). From present results, it is concluded that microsatellite markers SSRCafé 13, 20 and 40 can be used with greater confidence only in the selection of resistant progenies resulting from crosses with the Hybrid of Timor HT440-10. In relation to the other markers, more studies will be necessary for their validation.

Keywords: genotyping, root-knot nematode, *Coffea arabica*.

1. INTRODUÇÃO

Marcadores moleculares, como microssatélites ou repetições de sequências simples (SSR) usados para selecionar progênies resistentes a *Meloidogyne exigua* devem ainda ser validados em uma população de cafeeiro segregante para resistência ao nematoide. Para isso, é necessária a avaliação e validação dos marcadores em uma população de cafeeiro segregante para resistência ao nematoide. Caso a associação com a resistência ao nematoide seja estabelecida e confirmada, esses marcadores podem ser usados para avaliar um alto número de progênies em um curto período de tempo (JENKINS *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*; 2016).

Recentemente, Pereira *et al.* (2016) identificaram onze marcadores microssatélites polimórficos, dos quais nove estavam correlacionados negativamente com o fator de reprodução e o índice de galhas para *M. exigua*. Nesse trabalho, foram testadas progênies F₅ de café derivadas de um cruzamento entre o Híbrido do Timor 440-10 e Catuaí Amarelo IAC 86. Em cafeeiro, até então, só haviam sido identificadas associações de marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) com resistência genética, sendo um marco importante essa interação com marcadores microssatélites (NOIR *et al.*, 2003; DINIZ *et al.*, 2005).

Os marcadores microssatélites são de natureza codominante e essa característica constitui uma vantagem sobre os marcadores AFLP e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (dominantes). Em relação aos RFLPs, apresentam algumas vantagens, pois são baseados em PCR, menos laboriosos, e não dependem do uso da radioatividade (BUSO *et al.*, 2003). Além disso, os marcadores são multialélicos e dispersos uniformemente ao longo do genoma das plantas, podendo ser utilizados para diversas finalidades, como avaliação da variabilidade em coleções de germoplasma, mapeamento genético e físico de genomas, identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações

(FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998), GUPTA & VARSHNEY; 2000; MORETZSOHN *et al.*, 2004).

Estudos aprofundados para validar os marcadores microssatélites para identificar resistência genética a *M. exigua* se fazem necessários em importantes genótipos de cafeeiro, tais como os híbridos do Timor UFV 408-01 (036) e UFV 408-01 (090), a cultivar IPR100 e o genótipo 83-3, linhagem do IPR 100, que apresentam genes de resistência genética às principais espécies de *Meloidogyne* do cafeeiro.

O objetivo desse capítulo foi testar a associação da resistência a *M. exigua* a marcadores microssatélites presentes em genótipos de cafeeiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento de validação dos marcadores microssatélites foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa, foram testados os onze marcadores microssatélites identificados como polimórficos por Pereira *et al.* (2016): SSR Café 4, SSR Café 13, SSR Café 14, SSR Café 15, SSR Café 19, SSR Café 20, SSR Café 32, SSR Café 37, SSR Café 39, SSR Café 40 e SSR Café 41 (Tabela 7). Esses marcadores foram testados nos genótipos IPR100, linhagem 83-3 do IPR 100, Híbrido do Timor UFV 408-01 (036) e Híbrido do Timor UFV 408-01 (090), todos considerados resistentes a *M. exigua* (dados não publicados), e nos padrões de suscetibilidade Catuaí Amarelo 62 e Mundo Novo.

A extração de DNA total foi realizada segundo a metodologia descrita por Inglis *et al.* (2018), a partir de folhas jovens de uma planta de cada genótipo. Posteriormente, as amostras de DNA foram quantificadas usando um espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis, Thermo Scientific, Wilmington, USA), e por comparação com DNA de concentração conhecida (lambda DNA standard), em gel de agarose a 1,2%. As amostras foram padronizadas a 3 ng/ µl para as análises moleculares posteriores.

Tabela 7. Sequências dos *primers* microssatélites utilizados na avaliação de genótipos de cafeeiros a *Meloidogyne exigua*.

Códigos	Sequência (3'→5')	Tamanho dos alelos (bp)	Referências
SSRCafé-4	F: TCACTCTCGCAGACACACTAC R: GCAGAGATGATCACAAGTCC	143	Missio <i>et al.</i> (2009b)
SSRCafé-13	F:GATCAGAACTTTGAGCTCAGCA R: AATGTGGCACGCTAGAAGTG	182	Cristancho & Gaitan (2008)
SSRCafé-14	F: GCGTCCACGTGTTAAGTCTT R: TCAAGTGGCAGACATGTCAC	155	Cristancho & Gaitan (2008)
SSRCafé-15	F:GGGAAGGAATTCTTTCAACTCT R: CTTGGAATTACCATGCAACC	134	Cristancho & Gaitan (2008)
SSRCafé-19	F: TTAAGACATCGGTGCATTCA R: TGTGTACTGGGTTTTTTGATGT	135	Cristancho & Gaitan (2008)
SSRCafé-20	F: GGCTCGAGATATCTGTTTAG R: TTTAATGGGCATAGGGTCC	132-166	Combes <i>et al.</i> (2000)
SSRCafé-32	F: CCTATCAAACGCATCATGT R: CTGTAGGATTGGGTCATTTC	96	Rovelli <i>et al.</i> (2000)
SSRCafé-37	F: GGAAATCCGGAAACATACA R: GGTGCAGTGTATCAGTTTCA	278	Rovelli <i>et al.</i> (2000)
SSRCafé-39	F: ACCAATTCCTGTCAGTCAGG R: TGGCCATGAGAATAGGCATC	180	López-Gartner <i>et al.</i> (2009)
SSRCafé-40	F: TAAAGTGGATGCGTCTCCCA R: GGATAAGCAAGGAGCTGCAA	300	López-Gartner <i>et al.</i> (2009)
SSRCafé-41	F: CCATTCTAACCAAACCTGTCC R: CTCAAACACTTGGGTGTGCA	125	López-Gartner <i>et al.</i> (2009)

As reações de amplificação dos marcadores SSR foram realizadas em um volume de 13 µl, contendo 10 ng de DNA, 2,9 µl de H₂O, 1,3µl de tampão de reação 10X + MgCl₂, 1,3 µl de BSA (2,5 mg/ml) (New England Biolabs, MA, USA), 1,3 µl de dNTP 2,5 mM, 3,0 µl dos primers microssatélites a 1 µM e 0,2 µl (5U) de *Taq* DNA polimerase. As condições da PCR foram: 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos a 95 °C por 1 minuto de desnaturação, 52 °C – 58 °C por 1 minuto para anelamento dos primers, extensão a 72 °C por 1 minuto e uma extensão final a 72 °C durante 20 minutos. A temperatura de anelamento foi otimizada para

cada par de primers, com a finalidade de produzir amplificação das bandas de DNA com maior nitidez.

Os produtos da PCR foram desnaturados e fracionados por eletroforese capilar em um sequenciador automático de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, EUA). As amostras continham 1 µl do produto da PCR diluído 1:20 em água ultra pura, 8 µl de Hi-Di formamida (Applied Biosystems, Foster City, EUA), 0,4 µl de padrões de tamanho ROX e 0,6 µl de água ultra pura. O tamanho do alelo dos dados eletroforéticos foi obtido usando o software GeneMapper v.4.1 (Applied Biosystems, Foster City, EUA) de acordo com Moretzsohn *et al.* (2013). Esses dados foram exportados para o Microsoft Excel® para formatar os arquivos de entrada utilizados na análise estatística.

Na segunda etapa do experimento, foram testados os marcadores SSR Café 4, 13, 15, 20 e 40 nos genótipos Híbrido do Timor 440-10, no qual foram identificados os marcadores associados à resistência, e Catuaí Vermelho IAC 86 (suscetível). Os produtos da PCR foram amplificados (nas condições acima citadas) e separados em géis de poliacrilamida (5%) a 90V, durante uma hora. As bandas foram visualizadas usando-se coloração com nitrato de prata, de acordo com o método descrito por Creste *et al.* (2001). Posteriormente, o gel foi seco a temperatura ambiente e digitalizado.

A análise dos fragmentos foi estimada pela comparação com marcador de 10 bp DNA *ladder standard* (Gibco/BRL, MD, USA). A heterozigozidade, o número de alelos por loco e o coeficiente de endogamia foram obtidos com auxílio do software GDA v.1.0 (LEWIS & ZAYKIN, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira etapa, quatro marcadores (36,4%) mostraram-se polimórficos: SSR Café 4, 13, 15 e 41, com 3, 3, 2 e 3 alelos por loco, respectivamente (Tabela 8). Dois marcadores

foram monomórficos, SSRCafé 14 e 37 e cinco não amplificaram nenhum fragmento: SSRCafé 19, 20, 32, 39 e 40.

Tabela 8. Alelos amplificados de seis genótipos de cafeeiros analisados por meio de marcadores microssatélites polimórficos.

Genótipos	Marcadores Microssatélites											
	SSRCafé 4		SSRCafé 13		SSRCafé 14		SSRCafé 15		SSRCafé 37		SSRCafé 41	
83-3 linhagem do IPR 100	115*	130	175	189	142	155	-	-	-	-	108	122
IPR 100	115	130	175	179	155	155	158	183	258	258	108	122
Híbrido do Timor UFV 40801(36)	121	130	-	-	155	155	158	183	258	258	108	122
Híbrido do Timor UFV 40801(90)	115	121	175	179	155	155	158	183	-	-	108	124
Catuaí Amarelo 62	115	130	175	179	155	155	-	-	258	258	108	122
Mundo Novo	115	130	175	179	155	155	158	183	258	258	-	-

*pares de bases amplificados.

Para os quatro locos polimórficos, a heterozigosidade observada (H_o) foi maior do que a esperada (H_e), resultando em um coeficiente de endogamia negativo (Tabela 9). Isso significa que a proporção de indivíduos heterozigotos excedeu à esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Obviamente, esses dados devem ser vistos com cuidado, em razão do pequeno número de indivíduos analisados.

O resultado do número de marcadores polimórficos em genótipos de *C. arabica* foi semelhante ao relatado por Combes *et al.* (2000), que identificaram cinco microssatélites polimórficos em onze testados. Cristancho & Gaitan (2008) verificaram que de um total de doze marcadores SSR desenvolvidos, cinco marcadores microssatélites foram polimórficos em genótipos tetraploides de *Coffea*, enquanto que nos genótipos diploides foram detectados nove marcadores SSR polimórficos.

Tabela 9. Avaliação de marcadores microssatélites (SSRCafé) polimórficos associados à resistência a *Meloidogyne exigua* em genótipos de cafeeiro.

Marcador (SSR)	Pb (Tamanho dos fragmentos obtidos)	A (Número de alelos por loco)	He (Heterozigidade esperada)	Ho (Heterozigidade observada)	F (Coeficiente de Endogamia)
SSRCafé 4	115-130	3	0,7111	1.000	-0,4814
SSRCafé13	175-189	3	0,6785	1.000	-0,6000
SSRCafé15	158-183	2	0,5714	1.000	-1,0000
SSRCafé41	108-124	3	0,6444	1.000	-0,6666

Hendre & Aggarwal (2014) analisaram 44 marcadores EST-SSR e 25 SSRs genômicos em genótipos de *C. arabica* e *C. robusta*. A maioria dos marcadores polimórficos (>83%) apresentou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, enquanto que um número relativamente pequeno dos marcadores mostrou excesso de heterozigotos nos genótipos testados, diferentemente dos resultados obtidos neste trabalho.

Missio *et al.* (2009a), utilizando 17 marcadores EST-SSR, investigaram a diversidade genética entre e dentro de populações de *C. canephora* e *C. arabica*, verificando que todos os marcadores mostraram polimorfismo entre os genótipos avaliados. Os maiores polimorfismos foram encontrados dentro de *C. canephora* (88,2%) e em variedades de *C. arabica* resistentes à ferrugem (35,3%). Dos marcadores analisados, cerca de 29,4% diferenciaram *C. arabica* dos Híbridos do Timor, sendo possível identificar os mais próximos e os mais distantes de *C. arabica*.

Para confirmação da associação dos marcadores à resistência a *M. exigua* identificados por Pereira *et al.* (2016) esperava-se que fossem detectados alelos exclusivos nos genótipos resistentes (cv. IPR100, linhagem 83-3 de IPR100, Híbridos do Timor UFV 408-01 (036) e UFV 408-01 (090)) e contrastantes aos alelos obtidos nos genótipos suscetíveis (Catuaí Amarelo 62 e Mundo Novo). Isso não foi observado em nenhum dos quatro locos polimórficos (Tabela 8).

Pesquisas envolvendo o uso de marcadores microssatélites associados à resistência a *M. exigua* são escassas. Até o momento, somente o trabalho desenvolvido por Pereira *et al.* (2016) foi publicado. Nesse trabalho, dos 44 marcadores microssatélites testados, onze apresentaram padrão polimórfico, com número médio de 4,5 alelos por marcador. Destes onze, quatro apresentaram correlação negativa em relação ao fator de reprodução de *M. exigua* (SSRCafé 13 alelo 1, SSRCafé 15 alelo 3, SSRCafé 20 alelo 3, SSRCafé 40 alelo 2) e cinco marcadores apresentaram correlação negativa para o índice de galhas (SSRCafé 13 alelo 2, SSRCafé 15 alelo 3, SSRCafé 19 alelo 3, SSRCafé 20 alelo 3, SSRCafé 40 alelo 2). Os marcadores SSRCafé 15 alelo 3, SSRCafé 20 alelo 3, SSRCafé 40 alelo 2 foram os mais promissores, apresentando-se negativamente correlacionados com o fator de reprodução e o índice de galhas de *M. exigua*.

Na segunda etapa, três marcadores (27,2%) SSRCafé 13, 20 e 40 mostraram-se polimórficos nos genótipos de Híbrido do Timor 440-10 (resistente a *M. exigua*) e Catuaí Vermelho IAC 86 (Figura 7), confirmando os resultados obtidos por Pereira *et al.* (2016), com exceção do loco SSRCafé 15 que se mostrou monomórfico (Figura 7). No trabalho de Pereira *et al.* (2016), o marcador SSRCafé 15 alelo 3 foi correlacionado negativamente com o fator de reprodução e o índice de galhas de *M. exigua*.

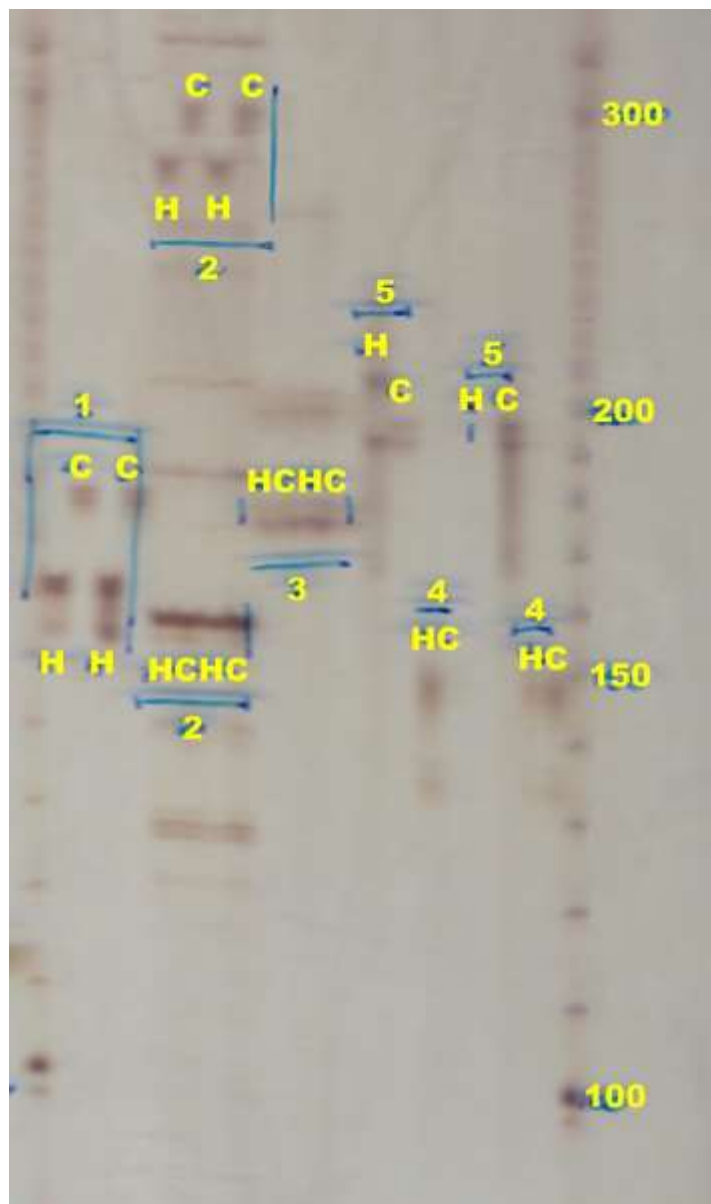


Figura 7. Marcadores SSR testados com vistas à resistência a *Meloidogyne exigua* em genótipos de cafeeiro: 1 - SSR 20, 2 - SSR 40, 3 - SSR 15, 4 - SSR 4 e 5 - SSR 13. H= Híbrido do Timor 440-10 (resistente), C= Catuaí Vermelho IAC 86.

4. CONCLUSÕES

São necessários mais estudos para se verificar a eficiência dos marcadores SSR Café 4, SSR Café 14, SSR Café 15, SSR Café 19, SSR Café 32, SSR Café 37, SSR Café 39, e SSR Café 41 na identificação de genótipos resistentes a *M. exigua*.

Marcadores SSR Café 13, 20 e 40 podem ser usados com maior segurança apenas para seleção de progênies resistentes resultantes de cruzamentos com o Híbrido do Timor HT440-10. Para outros genótipos resistentes (Híbrido do Timor UFV 40801(36) e Híbrido do Timor UFV 40801(90) são necessários novos estudos de associação em populações de mapeamento segregantes para essa característica.

CONCLUSÕES GERAIS

As técnicas bioquímicas e moleculares utilizadas foram eficientes na detecção e identificação de *M. izarcoensis*, possibilitando a realização do primeiro relato dessa espécie no Brasil.

No levantamento realizado no Triângulo Mineiro, foi possível identificar as espécies *M. paranaensis* e *M. exigua* e as misturas *M. paranaensis* e *M. exigua* e *M. incognita* e *M. exigua* por meio de técnicas bioquímicas e moleculares.

O porta-enxerto cultivar Apatã IAC 2258 representa uma importante fonte de resistência a *M. izarcoensis*. Como se trata de *C. canephora*, outras fontes de resistência com base nessa espécie deverão ser investigadas.

Os marcadores microssatélites SSR Café 13, 20 e 40 podem auxiliar na seleção de genótipos resistentes a *M. exigua* resultantes de cruzamentos com o Híbrido do Timor HT440-10. Nenhum dos onze marcadores microssatélites analisados podem ser usados para identificação de outros genótipos de cafeeiro resistentes a *M. exigua*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, P.; FAVERY, B.; ROSSO, M.N.; CASTAGNONE-SERENO, P. (2003) Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology* 4:217-224.
- AGGARWAL, R.K, HENDRE, P.S.; VARSHNEY, R.K.; BHAT, P.R.; KRISHNAKUMAR, V.; SINGH, L. (2007) Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of *Coffea* and related species. *Theoretical and Applied Genetics* 114:359-372.
- ALBUQUERQUE, E.V.S.; CARNEIRO, R.M.D.G.; COSTA, P.M.; GOMES, A.C.M.M.; SANTOS, M.; PEREIRA, A.A; NICOLE, M.; FERNANDEZ, D; GROSSI-DE-SÁ, M.F. (2010) Resistance to *Meloidogyne incognita* expresses a hypersensitive-like response in *Coffea arabica*. *European Journal of Plant Pathology* 127:365-373.
- ALPIZAR, E.; ETIENNE, H.; BERTRAND, B. (2007) Intermediate resistance to *Meloidogyne exigua* root-knot nematode in *Coffea arabica*. *Crop Protection* 26:903-910.
- AMORIM, L; REZENDE, J.A.M; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, L.E.A. (2016) Doenças do cafeeiro. In: Zambolin, L. (Ed) Manual de Fitopatologia v. 2 Doenças das Plantas Cultivadas. Ouro Fino, MG, Agronômica Ceres, p. 193-213.
- ANTHONY, F.; TOPART, P.; MARTINEZ, A.; SILVA, M.; NICOLE, M. (2005) Hypersensitive-like reaction conferred by the *Mex-1* resistance gene against *Meloidogyne exigua* in coffee. *Plant Pathology* 54:476-482.
- ANZUETO, F.; BERTRAND, B.; SARAH, J.L.; ESKES, A.B.; DECASY, B. (2001) Resistance to *Meloidogyne incognita* in Ethiopian *Coffea arabica* accessions. *Euphytica* 118:1-8.
- BARBOSA, D.H.S.G.; VIEIRA, H.D.; SOUZA, R.M.; VIANA, A.P.; SILVA, C.P. (2004) Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. *Nematologia Brasileira* 28:49-54.
- BARROS, A.F.; OLIVEIRA, R.D.L.; ZAMBOLIM, L.; FERREIRA, A.O.; COUTINHO, R.R. (2011) *Meloidogyne paranaensis* attacking coffee trees in Espírito Santo State, Brazil. *Australasian Plant Disease Notes* 6:43-45.
- BELL, C.A.; ATKINSON, H.J.; ANDRADE, A.C.; NGUYEN, H.X.; SWIBAWA, I.G.; LILLEY, C.J.; McCARTHY, J.; URWIN, P.E. (2018) A high-throughput molecular pipeline reveals the diversity in prevalence and abundance of *Pratylenchus* and *Meloidogyne* species in coffee plantations. *Phytopathology* 108:641-650.
- BERTRAND, B; ANTHONY, F. (2008) Genetics of resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and breeding. In: Souza, R.M (Ed.) Plant-parasitic nematodes of coffee. Dordrecht, NL., Springer Science Business, p.165-190.

- BERTRAND, B.; PENA-DURAN, M.X.; ANZUETO, F.; CILAS, C.; ETIENNE, H.; ANTHONY, F.; ESKES, A. (2000) 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* 113:79-86.
- BOISSEAU, M.; ARIBI, J.; SOUZA, F.R.; CARNEIRO, R.M.D.G.; ANTHONY, F. (2009) Resistance to *Meloidogyne paranaensis* in wild *Coffea arabica*. *Tropical Plant Pathology* 34:38-41.
- BONETTI, J.I.; FERRAZ, S. (1981) Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 6:533.
- BLOK, V.C.; POWERS, T.O. (2009) Biochemical and molecular identification. In: Perry, R.N.; Moens, M.; Starr, J. (Eds). Root-knot nematodes. Lincoln, CAB International, p. 98-112.
- BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V. (2003) Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 30:46-50.
- 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. (1990) 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, p. 387-430.
- CAMPOS, V.; VILLAIN, L. (2005) Nematode parasites of coffee and cocoa. In: Luc, M.; Skora, R.A.; Bridge, J. (Eds) Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 2nd ed. Egham, UK, CABI Biosciences, p. 529-580.
- CARNEIRO, F.A. (2014) Espécies de *Meloidogyne* Goeldi em cafeeiro no município de Araguari, MG. (Dissertação Mestrado), Universidade de Botucatu, 50 p.
- CARNEIRO, P.A.S.; FONTES, M. P. F.; FONTES, R.; KER, J.C.T. (2005a) Transformações sócio-regionais decorrente da consolidação e modernização da cultura do café no cerrado mineiro. *Geografia* 30(3):491-505.
- CARNEIRO, R.M.D.; MONTEIRO, J.M.S.; SILVA, U.C.; GOMES, G. (2016) O gênero *Meloidogyne*: Diagnose através da eletroforese de isoenzimas e marcadores SCAR. In: Oliveira, C.M.G.; Santos, M.A.; Castro, L.H.S. Diagnose de fitonematoides. Campinas, SP, Editora Millennium, p. 46-70.

- CARNEIRO, R.G.; COFCEWICZ E.T. (2008) The taxonomy of *Meloidogyne* spp. from coffee. In : Souza, R.M. (Ed.). Plant parasitic nematodes of coffee. Dordrecht, NL., Springer Science Business, p. 165-190.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; MESQUITA, L.F.G.; GONÇALVES, W.; PEREIRA, A.A. (2008) Pathogenicity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) from Brazil and Central America on two genotypes of *Coffea arabica*. *Tropical Plant Pathology* 33:309-312.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; GOMES, A.C.M.M.; HERNANDEZ, A. (2005b) *Meloidogyne izalcoensis* n.sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in El Salvador. *Nematology* 7:819–832.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A.; GONÇALVES, W. (2005c) 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* 29:33-241.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; TIGANO, M.S.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M.R.A.; SARAH, J.L. (2004) Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology* 6: 287-298.
- CARNEIRO, R.M.D.; ALMEIDA, M.R.A. (2001) Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécie. *Nematologia Brasileira* 25:35-44.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; QUÉNÉHERVÉ, P. (2000) Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology* 2:645-654.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; CARNEIRO, R.G.; ABRANTES, M.O.; SANTOS, M.S.N.A.; ALMEIDA, M.R. (1996a) *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. *Journal of Nematology* 28:177-189.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; CARNEIRO, R.G. (1996b) Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. *Fundamental and Applied Nematology* 19:555-560.
- CARVALHO, A.M.; SALGADO, S.M.L.; MENDES, A.N.G.; PEREIRA, A.A.; BOTELHO, C.E.; TASSOME, G.A.T.; LIMA, R.R. (2017) Caracterização de genótipos de *Coffea arabica* L. em área infestada pelo nematoide *Meloidogyne paranaensis*. *Coffee Science* 12(1):1-8.
- CARVALHO, C.H.S.; FAZOULI, L. C.; CARVALHO, G.R. (2008) Cultivares de café arábica de porte baixo. In: CARVALHO, C.H.S. (Ed). Cultivares de café: origem, características e recomendações. Brasília: Embrapa Café, p. 157-226.
- CARVALHO, F.G.; SERA, G.H.; SERA, T.; ITO, D.S.; BRANDET, E.; SHIGUEOKA, L.H.; ANDREAZI, E.; CHAMLET, D.; CARDUCCI, F.C.; SANTOS, W.G. (2015) Identificação de progênies de *Coffea arabica* com resistência simultânea à *Meloidogyne*

paranaensis e *M. incognita*. IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil 24 a 26 de junho de 2015, Curitiba – PR.

- CHITWOOD, B.G.; BERGER, C.A. (1960) Nematodes parasites of coffee in Guatemala. *Phytopathology* 50:631.
- COMBES, M.C.; ANDRZEJEWSKI, S.; ANTHONY, F.; BERTRAND, B. (2000) Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. *Molecular Ecology* 9:1178-1180.
- CONAB (2019). Acompanhamento da safra brasileira de café – Safra 2019, v. 5, n. 2, maio 2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>. Acesso em 1/6/2019.
- CORREA, V.F.; SANTOS, M.F.A.; ALMEIDA, M.R.A.; PEIXOTO, J.R.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R.M.D.G. (2013) Species-specific DNA markers for identification of two root-knot nematodes of coffee: *Meloidogyne arabicida* and *M. izalcoensis*. *European Journal of Plant Pathology* 137:305–313.
- CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. (2001) Detection of simple sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biological Report* 19(4): 299-306.
- CRISTANCHO, M.A.; GAITÁN, A.L. (2008) Isolation, characterization and amplification of simple sequence repeat loci in coffee. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 8:321-329.
- DA SILVA, B. S.R.; SANT'ANA, G.C.; CHAVES, C.L.; ANDROCIOLI, L.G.; FERREIRA, R.V.; SERA, G.H.; CHARMETANT, P.; LEROY, T.; POT, D.; DOMINGUES, D.S.; PEREIRA, L.F.P. (2019) Population structure and genetic relationships between Ethiopian and Brazilian *Coffea arabica* genotypes revealed by SSR markers. *Genetica* 147(2):205-216.
- DE LEY, P.; BLAXTER, M.L. (2002) Systematic position and phylogeny. In: Lee, D.L.(Ed.); *The Biology of Nematodes*. London, Taylor and Francis, p. 1-30.
- 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. (2005) Analysis of AFLP markers associated to the Mex-1 resistance locus in Icatu progenies. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 5:387-393.
- DO VALE, A.R.; CALDERARO, R.A.P.; FAGUNDES, F.N. (2014) A cafeicultura em Minas Gerais: Estudo comparativo entre as regiões Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba e Sul/Sudoeste. *Campo-território*, p. 1-23.
- EMBRAPA (s/d). Clima. Disponível em: <http://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/clima.htm>. Acesso em: maio de 2018.
- ESBENSHADE P. R.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. (1985) Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 17(1):6-20.

- FATOBENE, B.J.R.; ANDRADE, V.T.; ALOISE, G.S.; SILVAROLLA, M.B.; GONÇALVES, W.; GUERREIRO FILHO, O. (2017) Wild *Coffea arabica* resistant to *Meloidogyne paranaensis* and genetic parameters for resistance. *Euphytica* 213:196.
- FAZOULI, L.C. (1986) 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, p.87-113.
- FERRAZ, L.C.C.B. (2008) Plant parasitic nematodes of coffee in Brazil. In: Souza, R.M. (Ed) *Plant parasitic nematodes of coffee*. New York, APS Press & Springer, p. 225–248.
- FERRÃO, R.G.; FERRÃO, M.A.G.; FONSECA, A.F.A.; MISTRO, J.C.; VOLPI, P.S.; VERDIN FILHO, A.C.; MAURI, A.L.; LANI, J.A. (2015) Cultivares. In: FONSECA, A.; SAKIYMA, N.; BORÉM, A. (Eds.) *Café Conilon do plantio à colheita*. Viçosa Editora UFV, p. 29-49.
- FERRÃO, M.A.G.; FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A.; VERDIN FILHO, A.C.V.; VOLPI, P.S. (2010) 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, BR. INCAPER, p. 67-91.
- FONSECA, A.F.A. da.; FERRÃO, R.G.; FERRÃO, M.A.G.; VOLPI, P.S.; VERDIN FILHO, A.C.; FAZUOLI, L.C. (2008) Cultivares de café Robusta. In: Carvalho, C.H.S. (Ed). *Cultivares de café: origem, características e recomendações*. Brasília, Embrapa Café, p.255-280.
- FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. (1998) Marcadores baseados na amplificação de microssatélites. In: Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. (Eds). *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília, Embrapa Cenargen, p.55-62.
- GONÇALVES, W.; PEREIRA, A.A. (1998) Resistência de cafeeiro a nematoides IV. Reação do cafeeiro derivados do híbrido de Timor a *Meloidogyne exigua*. *Nematologia Brasileira* 22:39-49.
- GONÇALVES, W.; SILVAROLLA, M.B. (2001) Nematoides parasitos do cafeeiro. In: Zambolim, L. (Ed.). *Tecnologias de produção de café com qualidade*. Viçosa, Editora UFV, p. 199-267.
- GONÇALVES, W., SILVAROLLA, M.B. (2007) A luta contra a doença causada pelos nematoides parasitos do cafeeiro. *O Agrônomo* 59(1):54-57.
- GUPTA, P.K.; VARSHNEY, R.K. (2000) The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113:163-185.
- HARTMAN, R.M.; SASSER, J.N. (1985) Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: Barker, K.R.; Carter, C.C.; Sasser, J.N. (Eds). *An advanced treatise on Meloidogyne*. v. 2. Methodology. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, p. 69-77.

- HENDRE, P.S.; AGGARWAL, R.K. (2014) Development of genic and genomic SSR markers of Robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre Ex A. Froehner). *PLoS ONE* 9(12): e113661.
- HERNANDEZ, A.; FARGETTE, M.; SARAH, J.L. (2004) Pathogenicity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) isolates from Central America and Brazil on four genotypes of *Coffea arabica*. *Nematology* 6:205-213.
- HEIN, L.; GATZWEILER, F. (2006) The economic value of coffee (*Coffea arabica*) genetic resources. *Ecol Econ* 60:176–185.
- HUMPHREYS-PEREIRA, D.A.; FLORES-CHAVES, L.; GOMEZ, M.; SALAZAR, L.; GOMES-ALPIZAR, L.; ELLING, A.A. (2014) *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* 16: 643-661.
- HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A. (1973) Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease* 57:1025-1028.
- HUSSEY, R.S.; JANSSEN, G.J.W. (2012) Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: Starr, J.L.; Cook, R.; and Bridge, J. (Eds) *Plant Resistance to parasitic nematodes*. Wallingford, UK, CAB International, p. 43-70.
- INGLIS, P.W.; PAPPAS, M.C.R.; RESENDE, L.V.; GRATTAPAGLIA, D. (2018) Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high quality DNA and RNA from challenging plant and fungal samples for high-throughput SNP genotyping and sequencing applications. *PLoS ONE* 13(10):e0206085.
- JENKINS J.N.; MCCARTY JR, J.C.; WUBBEN M.J.; HAYES R. (2012) SSR markers for marker assisted selection of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) resistant plants in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Euphytica* 183:49-54.
- JORGE JUNIOR, A.S.; CARES, J.E.; MATTOS, V.S.; COYNE, D.; SANTOS, M.F.A.; CARNEIRO, R.M.D.G. (2016) First report of *Meloidogyne izalcoensis* (Nematoda: Meloidogynidae) on coffee, cabbage, and other crops in Africa. *Plant Disease* 100: 2173.
- KARSSSEN, G. W.; ESEMAEL, W.; MOENS, M. (2013) Root-knot nematodes. In: Perry RN, Moens M (Eds) *Plant Nematology*. 2nd edition, CAB International, Wallingford, UK, 73–108.
- LAM, E., KATO, N.; LAWTON, M. (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411: 848–853.
- LASHERMES, P., ANDRADE, A.C., ETIENNE, H. (2008) Genomics of coffee, one of the world's largest traded commodities. In: Moore, P.H.; Ming, R. (Eds) *Genomics of tropical crop plants*. New York, US. Springer, p. 203-226.

- LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. (1999) Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular Genetics and Genomics* 261:259-266.
- LEROY, T.; BELLIS, F.; LEGNATE, H.; KANANURA, E.; GONZALES, G.; PEREIRA, L.F.; ANDRADE, A.C.; CHARMETANT, P.; MONTAGNON, C.; CUBRY, P.; MARRACINI, P.; POT, D.; KOCHKO, A. (2011) Improving the quality of African robustas: QTLs for yield- and quality related traits in *Coffea canephora*. *Tree Genetics & Genomes* 7:781-798.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. (2001) Genetic Data Analysis: computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0.
- 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. (2015) The multi-resistant reaction of drought –tolerant coffeea “conilon Clone 14” to *Meloidogyne* spp. and late hypersensitive-like response in *Coffea canephora*. *Nematology* 105:805-814.
- LÓPEZ-GARTNER, G.; CORTINA, H.; MCCOUCH, S.R.; MONCADA, M.D.P. (2009) Analysis of genetic structure in a sample of coffee (*Coffea arabica* L.) using fluorescent SSR markers. *Tree Genetics & Genomes* 5:435-446.
- LOPEZ-LIMA, D.; SÁNCHEZ-NAVA, P.; CARRION, G.; DE LOS MONTEROS, A.E.; VILLAIN, L. (2014) Corky-root symptoms for coffee in central Veracruz are linked to the root-knot nematode *Meloidogyne paranaensis*, a new report for Mexico. *European Journal of Plant Pathology* 141:623-629.
- LORDELLO, L.G.E.; MELLO FILHO, A.T. (1970) Mais um nematoide ataca o cafeeiro. *Revista de Agricultura* 45:102.
- MACHADO, E.L.; Da SILVA, S.O.A.; SANTOS, A.S.; BASTOS, L.A.; PESTANA, C.N.; Dos SANTOS, K.S.; FERREIRA, C.; DIAMANTINO, M.S.A.S. (2013) Dissimilaridade genética entre cultivares de mamoneira por meio de marcadores RAPD *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 48:342-345.
- MARTINS, A.L. (2008) História do Café. São Paulo, Contexto, 316 p.
- McDONALD, B.A.; LINDE, C. (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual review of Phytopathology* 40(1):349-379.
- MENDES, B.V.; FERRAZ, S.; SHIMOYA, C. (1977). Observações histopatológicas de raízes de cafeeiro parasitadas por *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887. *Nematologia Brasileira* 2:207- 229.
- MESQUITA, C.M.; REZENDE, J.E.; CARVALHO, J.S.; FABRI JÚNIOR, M.A.; MORAES, N.C.; DIAS, P.T.; De CARVALHO, R.M.; De ARAÚJO, W. G. (2016) Manual do café: distúrbios fisiológicos, pragas e doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.), Belo Horizonte: EMATER-MG, 62 p.

- MISSIO, R.F.; CAIXETA, E.T.; ZAMBOLIM, E.M.; ZAMBOLIM, L.; CRUZ, C.D.; SAKIYAMA, N.S. (2010) Polymorphic information content of SSR markers for *Coffea* spp. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 10: 89-94.
- MISSIO, R.F.; CAIXETA, E.T.; ZAMBOLIM, E.M.; PENA, G.F.; RIBEIRO, A.P.; ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, A.A.; SAKIYAMA, N.S. (2009a) Assessment of EST-SSR markers for genetic analysis on coffee. *Bragantia* 68: 573-581.
- MISSIO, R.F.; CAIXETA, E.T.; ZAMBOLIM, E.M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N.S. (2009b) Development and validation of SSR markers for *Coffea arabica* L. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 9: 361-371.
- MOENS, M.; PERRY, R.N.; STARR, J.L. (2009) *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, p. 1-17.
- MONTEIRO, J.M.S.; CARES, J.E.; GOMES, A.C.M.M.; CORREA, V.R.M.V.S.; SANTOS, M.F.A.; ALMEIDA, M.R.A.; SANTOS, C.D.G.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R.M.D. (2016) First report of, and additional information on, *Meloidogyne konaensis* (Nematoda: Meloidogyninae) parasitising various crops in Brazil. *Nematology* 18:831–844.
- MORETZSOHN, M.; HOPKINS, M. S.; MITCHELL, S. E., KRESOVICH, S.; VALLS, J. F.; FERREIRA, M. E. (2004). Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *BMC plant biology*, 4:11. doi:10.1186/1471-2229-4-11
- MORETZSOHN, M. C.; GOUVEA, E.G.; INGLIS, P.W.; LEAL- BERTIOLI, S.C.M.; VALLS, J.F.M.; BERTIOLI, D.J. (2013) A study of the relationships of cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) and its most closely related wild species using intron sequences and microsatellite markers. *Annals of Botany* 111: 113–126.
- MUNIZ, M.F.S.; CAMPOS, V.P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CASTRO, J.M.C.; ALMEIDA, M.R.A.; CARNEIRO, R.M.D.G.(2008) Diversity of *Meloidogyne exigua* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations from coffee and rubber tree. *Nematology* 10: 897-910.
- MUNIZ, M.F.S.; CAMPOS, V.P.; MOITA, A.W.; GONÇALVES, W; ALMEIDA, M.R.A.; SOUZA, F.R.de; CARNEIRO, R.M.D.G. (2009) Reaction of coffee genotypes to different populations of *Meloidogyne* spp.: detection of a naturally virulent *M. exigua* population. *Tropical Plant Pathology* 34:379-378.
- NOIR, S.; ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; COMBES, M.C.; LASHERMES, P. (2003) Identification of major gene (Mex-1) from *Coffea canephora* conferring resistance to *M. exigua* in *Coffea arabica*. *Plant Pathology* 52:97-103.
- OLIVEIRA, D.S. Patogenicidade de populações de *Meloidogyne incognita* provenientes de Minas Gerais e de São Paulo ao cafeeiro. 2006. 75f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

- OOSTENBRINK, M. (1966) Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mededelingen, Van De Landbouwhogeschool* 66: 1-46.
- PADILHA, L.; GARCIA, A.L.A.; RABELLO Jr., C.A.M.; CARVALHO, C.H.S. (2009) Comportamento de cultivares de café na presença do *Meloidogyne exigua*. In: VIº Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Anais. Vitória, BR. Consórcio Pesquisa Café.
- PEREIRA, A.A.; BAIÃO, A.C. (2015) Cultivares. In: Sakiyama, N.; Martinez, H.; Tomaz, M.; Borém, A.; (Eds). *Café arábica do plantio à colheita*. Viçosa, MG: Ed. UFV, 316 p.
- PEREIRA, T.B.; SETOTAW, T.A.; SANTOS, D.N.; MENDES, A.N.G.; SALGADO, S.M.L.; CARVALHO, G.R.; REZENDE, R.M. (2016) Identification of microsatellite markers in coffee associated with resistance to *Meloidogyne exigua*. *Genetics and Molecular Research* 15:1-13.
- PERES, A.C.J.; SALGADO, S.M.L.; CORREA, V.R.; SANTOS, M.F.A.; MATTOS, V.S.; MONTEIRO, J.M.S.; CARNEIRO, R.M.D.G. (2017) Resistance of *Coffea arabica* genotypes against *Meloidogyne paranaensis* and *M. incognita* under controlled and field conditions. *Nematology* 19:617-627.
- PINTO, O.F.; MALUF, M.P.; GUERREIRO-FILHO, O. (2007) Study of simple sequence repeat markers from coffee expressed sequences associated to leaf miner resistance. *Pesquisa agropecuária brasileira* 42 (3):377-384.
- PONCET, V.; RONDEAU, M.; TRANCHANT, C.; CAYREL, A.; HAMON, S. De KOCHKO, A.; HAMON, P. (2006) SSR mining in coffee tree EST databases: potential use of EST-SSRs as markers for the *Coffea* genus. *Molecular Genetics and Genomics* 276: 436-449.
- RANDIG, O.; BONGIOVANNI, M.; CARNEIRO, R.M.D.G.; CASTAGNONE-SERENO, P. (2002) Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome* 45:862-870.
- RANDIG, O.; CARNEIRO, R.M.D.G.; CASTAGNONE-SERENO, P. (2004) Identificação das principais espécies de *Meloidogyne* parasitas do cafeeiro no Brasil com marcadores SCAR-CAFÉ em Multiplex-PCR. *Nematologia Brasileira* 28:1-10.
- REIS, P.R.; CUNHA, T.E.L. da; CARVALHO, G.R. (2010) *Café Arábica: do plantio à colheita*. Lavras: U.R. EPAMIG, MG, v. 1, 896 p.
- RIBEIRO, R.C.F.; PEREIRA, A.A.; OLIVEIRA, C.F.; LIMA, R.D. (2005) Resistência de progênies de híbridos interespecíficos de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* a *Meloidogyne exigua*. *Nematologia Brasileira* 29: 11-16.
- ROBERTS, P.A. (2002) Concepts and consequences of resistance. In: Starr, J.L.; Cook, R.; Bridge, J. (Eds.) *Plant resistance to parasitic nematodes*. Wallingford, CAB International, p.23-42.

- ROBERTS, P.A.; MATTHEWS, W.C.; VEREMIS, J.C. (1998) Genetic mechanisms of host plant resistance to nematodes. In: Barker, K.R.; Pederson, G.A.; Windham, G.L. (Eds) *Plant and Nematode Interactions*. Madison, US. American Society of Agronomy, p. 209-238.
- ROVELLI, P.; METTULIO, R.; ANTHONY, F.; ANZUETO, F.; LASHERMES, P.; GRAZIOSI, G. (2000) Microsatellites in *Coffea arabica* L. In: Sera, T.; Soccol, C.R.; Pandey, A.; Roussos, S. (Eds) *Coffee Biotechnology*. Londrina, Brazil. Springer-Science, Business Media, B.V., p.123-133.
- SALGADO, S.M.L.; CARNEIRO, R.M.D. CANUTO, R.S. (2011) Aspectos técnicos dos nematoides parasitas do cafeeiro. Belo Horizonte: EPAMIG, 2011. 60 p. – (EPAMIG. Boletim Técnico, 98).
- SALGADO, S.M.L.; REZENDE, J.C. (2010) Manejo de fitonematoídes em cafeeiro. In: Café arábica do plantio à colheita. Lavras: U.R. EPAMIG, MG, v.1. p.757-804.
- SALGADO, S.M.L.; RESENDE, M.L.V.; CAMPOS, V.P. (2005) Reprodução de *Meloidogyne exigua* em cultivares de cafeeiros resistentes e suscetíveis. *Fitopatologia Brasileira* 30(4):413-415.
- SALGADO, S.M.L.; GUIMARÃES, N.M.R.B.; BOTELHO, C.E.; Guilherme A.T.; TASSONE, G.A.T.; MARCELO, A.L.; SOUZA, S.R.; OLIVEIRA, R.D.L.; FERREIRA, D.F.F. (2014a) *Meloidogyne paranaensis* e *Meloidogyne exigua* em lavouras cafeeiras na região sul de Minas Gerais. *Coffee Science* 10 (4): 475 – 481.
- SALGADO, S.M.L.; REZENDE, J.C.; NUNES, J.A.R. (2014b) Selection of coffee progenies for resistance to nematode *Meloidogyne paranaensis* in infested area. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 14: 94-101.
- SANTOS, M.F.A.; CORREA, V R.; PEIXOTO, J.R.; MATTOS, V.S.; SILVA, J.G.P.; MOITA, A.W.; SALGADO, S.M.L.; CASTAGNONE-SERENO, F.; CARNEIRO, R.M.D.G. (2018a) Genetic variability of *Meloidogyne paranaensis* populations and their aggressiveness to susceptible coffee genotypes. *Plant Pathology* 67:193-201.
- SANTOS, M.F.A.; SALGADO, S.M.L.; SILVA, J.G.P.; CORREA, V.R.; CARNEIRO, R.M.D.G. (2018b) First report of *Meloidogyne incognita* parasitizing coffee plants in southern Minas Gerais, Brazil. *Tropical Plant Pathology* 43(1):95-98.
- SANTOS, M.F.A.; FURLANETTO, C.; ALMEIDA, M.R.A.; CARNEIRO, M.D.G.; MOTA, F.C.; SILVEIRA, N.O.R.; SILVA, J.G.P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; TIGANO, M.S.; CARNEIRO, R.M.D.G. (2012) Biometrical, biological and molecular characteristics of *Meloidogyne incognita* isolates and related species. *European Journal Plant Pathology* 134:671-684.
- SAUCET, S. B.; GHELDER, C. V.; ABAD, P.; DUVAL, H.; ESMENJAUD, D. (2016) Resistance to root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. in woody plants. *New Phytologist* 1:41-56.

- SERA, G.H.; SERA, T.; AZEREDO, J.A.; MATA, J.S.; RIBEIRO FILHO, C.; DOI, D.S.; ITO, D.S.; FONSECA, I.C.B. (2006) Robusta coffee rootstocks resistant to *Meloidogyne paranaensis* and *M. incognita* races 1 and 2. *Semina* 27(2):171-184.
- SERA, G.H.; SERA, T.; ITO, D.S.; MATA, J.S.; DOI, D.S.; AZEVEDO, J.A.; RIBEIRO FILHO, C. (2007) Progenies de *Coffea arabica* cv IPR-100 resistentes ao nematoide *Meloidogyne paranaensis*. *Bragantia* 66:43-49.
- STEFANELO, D.R.; SANTOS, M.F.A.; MATTOS, V.S.; MASSAKO, T. B.; MENDONÇA, J.S.F.; CARES, J.E.; CARNEIRO, R.M.D.G. (2019) *Meloidogyne izarcoensis* parasitizing coffee in Minas Gerais state: the first record in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 44:209-212.
- SILVA, R.V., OLIVEIRA, R.D.L., PEREIRA, A.A.; SÊNI, D.J. (2007) Respostas de genótipos de *Coffea* spp. a diferentes populações de *Meloidogyne exigua*. *Fitopatologia Brasileira* 32:205-212.
- SILVAROLLA, M.B.; GONÇALVES, W.; LIMA, M.M.A. (1998) Resistência do cafeeiro a nematoides V – reprodução de *Meloidogyne exigua* em cafeeiros derivados da hibridização de *Coffea arabica* com *C. canephora*. *Nematologia Brasileira* 22:51-59.
- SOUZA, R.M. (Ed.) (2008). Plant-parasitic nematodes of coffee. Berlin, Germany, Springer. 342p.
- SOUZA, F.F.; CAIXETA, E.T.; FERRÃO, L.F.V.; PENA, G.F.; SAKIYAMA, N.S.; ZAMBOLIM, E.M.; ZAMBOLIM, L.; CRUZ, C.D. (2013) Molecular diversity in *Coffea canephora* germplasm conserved and cultivated in Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 13:221-227.
- STARR, J.L.; BRIDGE, J.; COOK, R. (2002) 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. Wallingford, CAB International, p. 1-22.
- TAUTZ, D.; RENZ, M. (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 25 12(10):4127-38.
- TERRA, W.C.; SILVA, J.C.P.; CAMPOS, V.P.; SALGADO, S.M.L. (2018) Root-knot and lesion nematodes in coffee seedlings produced in the State of Minas Gerais, Brazil. *Coffee Science* 13 (2):178-186.
- VILLAIN, L.; HERNANDEZ, A.; ANZUETO, F. (2008). Central America. In: Souza, R.M (Ed), Plant parasitic nematodes of coffee. Dordrecht, NL., Springer Science Business, p. 261-275.
- VILLAIN, L.; SARAH J.L.; HERNÁNDEZ, A.; BERTAND, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P.; CHARMENTANT, P.; ANZUETO, F.; FIGUEROA, P.; CARNEIRO, R.M.D.G. (2013) Diversity of root-knot nematodes associated with coffee orchards in Central America. *Nematropica* 43:194-206.

- ZAMBOLIM, L. (2015) Manejo de Doenças In: Sakiyama, N.; Martinez, H.; Tomaz, M.; Borém, A.; (Eds). Café arábica do plantio à colheita. Viçosa, MG: Ed. UFV, 316 p.
- WANG, T.; LUO, Y.; SMALL, G.M. (1994) The POX1 gene encoding peroxisomal acyl-CoA oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* is under the control of multiple regulatory elements. *Journal Biol. Chem.* 269(39):24480-24485.
- WHITEHEAD, A.G.; HEMMING, J.R. (1965) A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Annals of Biology* 55:25-38.