

DAGOBERTO SAUNDERS DE OLIVEIRA

**PATOGENICIDADE DE POPULAÇÕES DE *Meloidogyne incognita*,
PROVENIENTES DE MINAS GERAIS E SÃO PAULO, AO
CAFEIEIRO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

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

T

O48p
2006

Oliveira, Dagoberto Saunders de, 1977-
Patogenicidade de populações de
Meloidogyne incognita, provenientes de Minas Gerais e
São Paulo, ao cafeeiro / Dagoberto Saunders de Oliveira.
– Viçosa : UFV, 2006.
viii, 75f. : il. col.; 29cm.

Orientador: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Café - Resistência a *Meloidogyne incognita*.
2. *Meloidogyne incognita* - Populações.
3. *Meloidogyne incognita* - Patogênese. 4. Nematóide-
das-galhas. 5. Pragas - Controle. 6. Histopatologia.
7. Adaptação (Fisiologia). 8. *Coffea arabica*.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 633.7396257

DAGOBERTO SAUNDERS DE OLIVEIRA

**PATOGENICIDADE DE POPULAÇÕES DE *Meloidogyne incognita*,
PROVENIENTES DE MINAS GERAIS E SÃO PAULO, AO
CAFEIRO**

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

APROVADA: 28 de março de 2006.

Prof. Leandro Grassi de Freitas
(Conselheiro)

Dr. Antônio Alves Pereira

Prof^ª. Renata Maria Strozi Alves Meira

Prof. Fabrício de Ávila Rodrigues

Prof^ª. Rosângela D'Arc de Lima Oliveira
(Orientadora)

AGRADECIMENTO

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

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

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

Aos membros da banca examinadora, cujas sugestões e críticas auxiliaram a redação final deste trabalho.

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

Ao pesquisador Wallace Gonçalves (IAC), pelo envio de materiais indispensáveis para a realização deste trabalho.

Aos professores Fabrício de Ávila Rodrigues e Renata Maria Strozi Alves Meira, pelo auxílio na condução do experimento de histopatologia.

À Débora Gonçalves Silva, pela grande contribuição para a realização deste trabalho.

CONTEÚDO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO 1	
Caracterização de populações de <i>Meloidogyne incognita</i> de Minas Gerais e de São Paulo.....	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO 2	
Patogenicidade de populações de <i>Meloidogyne incognita</i> ao cafeeiro	19
1. INTRODUÇÃO	20
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
CAPÍTULO 3	
Avaliação da supressividade de solo de cafezal de Minas Gerais a <i>Meloidogyne incognita</i>	31
1. INTRODUÇÃO	32
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

CAPÍTULO 4

Penetração e desenvolvimento pós-infectivo de *Meloidogyne incognita* em cafeeiro.. 44

1. INTRODUÇÃO 45
2. MATERIAL E MÉTODOS 46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 47
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 50

CAPÍTULO 5

Histopatologia de raízes de cafeeiros inoculadas com populações de *Meloidogyne incognita* 53

1. INTRODUÇÃO 54
2. MATERIAL E MÉTODOS 55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 57
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 65

CAPÍTULO 6

Perda de patogenicidade de *Meloidogyne incognita* ao cafeeiro 67

1. INTRODUÇÃO 68
2. MATERIAL E MÉTODOS 69
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 70
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 74

CONCLUSÕES GERAIS 75

RESUMO

OLIVEIRA, Dagoberto Saunders, D.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2006.
Patogenicidade de populações de *Meloidogyne incognita*, provenientes de Minas Gerais e São Paulo, ao cafeeiro. Orientadora: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira.
Conselheiros: Leandro Grassi de Freitas e Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

As quatro raças de *Meloidogyne incognita* apesar de presentes em outras culturas e plantas daninhas em Minas Gerais, não são detectadas em cafeeiros no Estado, diferentemente do que ocorre em outras áreas produtoras de café no Brasil, onde esta espécie de nematóide das galhas é um dos principais fatores limitantes para cafeicultura. Os motivos que explicam este fato ainda são desconhecidos, pois as principais cultivares de cafeeiro (Catuaí e Mundo Novo) plantadas em Minas Gerais são comprovadamente suscetíveis a todas as raças deste nematóide. Assim, o presente trabalho teve como objetivo determinar quais são os fatores responsáveis pelo não estabelecimento de *M. incognita* em cafezais de Minas Gerais. Inicialmente, as populações de *M. incognita* de Minas Gerais foram comparadas com as populações de São Paulo que são comprovadamente patogênicas ao cafeeiro. Pela análise conjunta de características morfológicas, fisiológicas, isoenzimáticas e moleculares foi possível confirmar que as populações de nematóides das galhas de ambos Estados pertencem à espécie *M. incognita*. Portanto, a diferença observada na patogenicidade ao cafeeiro entre as populações de Minas Gerais e de São Paulo não pode ser explicada pela identificação imprecisa do nematóide. Ao ser confirmada a identificação das populações de *M. incognita* de Minas Gerais, realizaram-se avaliações para comprovar a não-patogenicidade dessas populações ao cafeeiro. Populações das quatro raças de *M. incognita* coletadas em Minas Gerais foram inoculadas em mudas de cafeeiro sob diferentes temperaturas, diferentes concentrações de inóculo, mudas em diferentes estádios de desenvolvimento e em diferentes genótipos de cafeeiro.

As quatro raças de *M. incognita* de Minas Gerais foram incapazes de se reproduzir nas mudas de cafeeiro, independente da concentração de inóculo, da temperatura, do estágio de desenvolvimento e do genótipo de cafeeiro. Constatada a incapacidade destas populações em infectar o cafeeiro, tentou-se elucidar os mecanismos envolvidos nessa interação incompatível. Para isso foi avaliada a penetração, o desenvolvimento pós-infectivo e as alterações histológicas provocadas por uma dessas populações não-patogênicas em raízes de cafeeiro. Os mecanismos que conferiram incompatibilidade entre a população de *M. incognita* de Minas Gerais e o cafeeiro atuaram principalmente na fase de penetração da forma infectiva do nematóide, o que ocasionou uma baixa penetração e uma significativa emigração dos J₂ das raízes do cafeeiro. Além disso, a ação de mecanismos de resistência pós-penetração impediu que os J₂ dessas populações induzissem a formação de células gigantes, o que preveniu o desenvolvimento do nematóide em cafeeiro. Com base nos resultados obtidos conclui-se que as populações de *M. incognita* de Minas Gerais pertencem a um biótipo diferente daquele encontrado em outras áreas produtoras de café no Brasil.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Dagoberto Saunders, D.S., Universidade Federal de Viçosa, March, 2006.
Pathogenicity of populations of *Meloidogyne incognita*, original from Minas Gerais and São Paulo, to coffee. Adviser: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira.
Committee Members: Leandro Grassi de Freitas and Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

The four existing races of *Meloidogyne incognita*, although infecting various crops and weeds in the Minas Gerais State, have not been detected in coffee trees, differently from what happens in other coffee producing areas of Brazil, in which the root-knot nematode is one of the main limiting factors for the coffee cultivation. The reasons that explain such phenomenon are still unknown, because the most common coffee cultivars (Catuaí and Mundo Novo) in Minas Gerais are susceptible to all races of these nematode species. For this reason, the objective of this work was to study possible factors responsible for the non-establishment of *M. incognita* in coffee plantations in Minas Gerais. Initially, populations of *M. incognita* original from Minas Gerais were compared to populations original from São Paulo, which are proved to be pathogenic to coffee. They were all identified as *M. incognita* by morphological, physiological, molecular and isozyme analysis, hence, the observed difference in the pathogenicity of the populations of the two States was not due to previous misidentification of the species. After the identity confirmation of the Minas Gerais nematode populations, the lack of pathogenicity of them was evaluated by inoculating populations of the four races of *M. incognita* under different temperature regimes, different inoculum densities, in plantlets of different developmental stages and in different coffee genotypes. The four *M. incognita* races original from Minas Gerais were incapable of reproducing in the coffee plantlets, independently of the inoculum concentration, temperature, plant stage and coffee genotype. Since the Minas Gerais populations incapacity of infection was confirmed, the mechanisms involved in this

incompatible interaction were tried to be elucidated, evaluating the root penetration, the post-infective nematode development and the root histological alterations caused by one of the non-pathogenic population. The mechanisms that conferred incompatibility between Minas Gerais population of *M. incognita* and coffee actuated primarily in the juvenile penetration phase, causing reduction in the penetration and evasion of the juvenile from coffee roots. Furthermore, post-penetration mechanisms prevented giant cell formation, impeding the nematode development in the coffee tree. The results lead to the conclusion that the Minas Gerais populations of *M. incognita* belong to a biotype different from those found in other coffee producing areas in Brazil.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o maior produtor e exportador de café (CONAB, 2006). A cadeia produtiva brasileira de café movimentada, anualmente, cerca de 3,4 bilhões de dólares. Além disso, a cafeicultura representa uma das atividades agrícolas que mais geram empregos, sendo responsável por cerca de 9 milhões de empregos diretos e indiretos (CAIXETA, 2001).

O Estado de Minas Gerais é o principal produtor de café no Brasil, com a safra 2006/2007 estimada em 22,1 milhões de sacas de 60 Kg, o que equivale a 50,8% da produção nacional (CONAB, 2006). Além da quantidade, esse Estado se destaca pela excelente qualidade de seus cafés, que alcançam valor diferenciado no mercado, principalmente o internacional.

Dentre os fatores que ocasionam redução na produção de café, os de natureza fitossanitária merecem especial atenção. Destes se destacam os danos causados por fitonematóides que reduzem a produtividade e, em alguns casos, acarretam o abandono da atividade cafeeira (CARNEIRO, 1995).

A primeira referência de parasitismo de nematóides em cafeeiros foi feita em 1878 por M. C. Jobert na antiga província do Rio de Janeiro. Em 1887, E. A. Goeldi, ao estudar a doença referida por Jobert, denominou o agente causal de *Meloidogyne exigua* Goeldi (MOURA, 1998). Desde então, mais de quarenta espécies, pertencentes a 31 gêneros de fitonematóides já foram encontradas em associação com raízes de cafeeiros no Brasil (CAMPOS, 1997; MONTEIRO et al., 2001). Entre estas espécies, as do gênero *Meloidogyne* são as que causam os maiores prejuízos à cafeicultura no Brasil.

Das mais de 80 espécies descritas de *Meloidogyne*, 18 infectam o cafeeiro em todo o mundo (CAMPOS, 1997). Destas, *M. exigua*, *M. javanica* (Treub.) Chitwood, *M. hapla* Chitwood, *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *M. paranaensis* Carneiro, Carneiro,

Abrantes, Santos & Almeida e *M. coffeicola* Lordello & Zamith já foram encontradas infectando cafeeiro no Brasil (LORDELLO e ZAMITH, 1960; LORDELLO e MELLO FILHO, 1970; PONTE e FREIRE, 1971; LORDELLO e MONTEIRO, 1974; CARNEIRO et al., 1996).

Meloidogyne incognita é considerada a espécie de nematóides das galhas mais prejudicial ao cafeeiro, pois além da sua agressividade, possui algumas características que dificultam seu controle, como ampla gama de hospedeiras (ROBERTS, 1995), alta persistência no solo na ausência de plantas hospedeiras (REBEL et al., 1976), existência de raças fisiológicas (HARTMAN e SASSER, 1985) e o hábito de infectar a raiz principal do cafeeiro (LORDELLO e MELLO FILHO, 1970). Esta última característica dificulta a eficiência do controle químico, pois mesmo ocorrendo uma redução na população do nematóide no solo e nas raízes, o sistema radicular do cafeeiro não mais consegue se recuperar dos danos causados por este patógeno (CURI et al. 1977; FERRAZ et al., 1983).

O primeiro relato de *M. incognita* em cafeeiro da espécie *Coffea arabica* L. foi feito por CHITWOOD e BERGER (1960) na Guatemala, e segundo os mesmos autores, tratava-se de um patógeno agressivo à cultura. No Brasil, a primeira ocorrência deste nematóide em cafeeiros foi observada no município de Pindorama, Estado de São Paulo por LORDELLO e MELLO FILHO (1970). Em Minas Gerais, esta espécie foi assinalada em cafeeiros nos anos 80, nos municípios de São Tomaz de Aquino, Nova Resende e Uberaba (CAMPOS e MELLES, 1982; GUERRA NETO e D'ANTÔNIO, 1984). Após a constatação desta espécie, tais lavouras foram erradicadas.

Levantamentos de fitonematóides em cafezais dos principais Estados produtores evidenciaram a diferença na ocorrência e na distribuição de espécies de *Meloidogyne*. Em São Paulo, quatro espécies foram encontradas infectando cafeeiros, e destas *M. incognita* foi a que apresentou maior distribuição, seguida por *M. exigua*, *M. paranaensis* e *M. coffeicola* (KUBO et al., 2001; LORDELLO e LORDELLO, 2001). Já no Paraná, *M. paranaensis* foi a espécie predominante, seguida por *M. incognita* (KRZYZANOWSKI et al., 2001). Em Minas Gerais, com exceção dos relatos em áreas restritas de *M. paranaensis* (CASTRO et al., 2003) e *M. coffeicola* (CASTRO et al., 2004), apenas *M. exigua* foi encontrada em cafezais do Estado (NAVES et al., 2001; PINHEIRO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2005).

Populações das quatro raças fisiológicas de *M. incognita*, apesar de presentes em outras culturas e plantas daninhas em Minas Gerais, não são detectadas em cafeeiros no Estado, diferentemente do que ocorre em São Paulo e no Paraná, onde este fitonematóide é

um dos mais comprometedores para a cafeicultura. Os motivos que explicam este fato ainda são desconhecidos, pois as principais cultivares de cafeeiro (Catuaí e Mundo Novo) plantadas em Minas Gerais são também utilizadas em São Paulo e no Paraná, e são comprovadamente suscetíveis a todas as raças deste nematóide (LORDELLO e LORDELLO, 1987; GONÇALVES et al., 1990; JAEHN, 1990).

O entendimento de possíveis fatores que estejam impedindo o estabelecimento de *M. incognita* em cafezais de Minas Gerais poderá fornecer importantes ferramentas para impedir que este patógeno venha a se tornar problema a cafeicultura do Estado, bem como estender os conhecimentos adquiridos, no desenvolvimento de estratégias de controle deste nematóide em locais onde o mesmo é problema. Assim, o objetivo geral do presente trabalho foi determinar quais são os fatores responsáveis pelo não estabelecimento de *M. incognita* em cafezais de Minas Gerais.

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivos específicos:

- 1) comparar populações de *M. incognita* de Minas Gerais e de São Paulo por meio de características morfológicas, fisiológicas, isoenzimáticas e moleculares;
- 2) avaliar a patogenicidade de populações de *M. incognita* de Minas Gerais ao cafeeiro nas seguintes condições: diferentes temperaturas, diferentes concentrações de inóculo, mudas em diferentes estádios de desenvolvimento e em diferentes genótipos de cafeeiro;
- 3) verificar se solos de cafezais de Minas Gerais são supressivos a populações de *M. incognita*;
- 4) comparar a penetração e o desenvolvimento pós-infectivo de populações de *M. incognita* de Minas Gerais e de São Paulo em mudas de cafeeiros;
- 5) comparar a histopatologia de raízes de cafeeiros inoculadas com populações de *M. incognita* de Minas Gerais e de São Paulo e;
- 6) verificar se populações de *M. incognita* oriundas de cafeeiro perdem a capacidade de infectar esta cultura, quando multiplicadas por sucessivas gerações em tomateiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAIXETA, G.Z.T. Gerenciamento da cafeicultura em época de crise. In: Zambolim, L. (Ed.). Tecnologias de produção de café com qualidade. Viçosa: Editora UFV. 2001. pp.1-24.
- CAMPOS, V.P. Café (*Coffea arabica* L.). Controle de doenças: Doenças causadas por nematóides. In: Vale, F.X.R., Zambolim, L. (Eds.). Controle de doenças de plantas: grandes culturas. Viçosa, UFV, v.1. 1997. pp.141-180.
- CAMPOS, V.P., MELLES, C.C.A. Ocorrência e distribuição de espécies de *Meloidogyne* em cafezais dos Campos das Vertentes e do Sul de Minas. Nematologia Brasileira 11:233, 1982.
- CARNEIRO, R.G. Reação de progênies de café 'Icatu' a *Meloidogyne incognita* raça 2, em condições de campo. Nematologia Brasileira 19:53, 1995.
- CARNEIRO, R.M.D.G., CARNEIRO, R.G., ABRANTES, I.M.O., SANTOS, M.S.N.A., ALMEIDA, M.R.A. *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee em Brazil. Journal of Nematology 28:177, 1996.
- CASTRO, J.M.C., CAMPOS, V.P., NAVES, R.L. Ocorrência de *Meloidogyne paranaensis* em cafeeiros na região do Alto Paranaíba em Minas Gerais. Fitopatologia Brasileira 28:565, 2003.
- CASTRO, J.M.C., CAMPOS, V.P., DUTRA, M.R. Ocorrência de *Meloidogyne coffeicola* em cafeeiros do município de Coromandel, região do Alto Paranaíba em Minas Gerais. Fitopatologia Brasileira 29:227, 2004.
- CHITWOOD, B.G., BERGER, C.A. Nematodes parasites of coffee in Guatemala. Phytopathology 50:631, 1960.
- CONAB: Convênio Ministério da Agricultura – Secretaria da Produção e Comercialização. Previsão da safra brasileira de café 2006/2007, primeira estimativa. Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.conab.gov.br>. Última atualização em 20 de fevereiro de 2006.

- CURI, S.M., SILVEIRA, S.G.P., ELIAS, E.G. Resultados de produção e da proteção do sistema radicular de cafeeiros sob controle químico do nematóide *Meloidogyne incognita* em condições de campo. *Nematologia Brasileira* 2:93, 1977.
- FERRAZ, L.C.C.B., ROCHA, A.D., BRANCALION, A.M., MARCONATO, A.R. Considerações sobre a viabilidade do controle de *Meloidogyne incognita* visando a recuperação de cafezais infestados. *Nematologia Brasileira* 6:117, 1983.
- GONÇALVES, W., RAMOS, L.C.S., FERNANDES, J.A.R., KASAI, F.S. Avaliação da resistência de dois cultivares de *Coffea canephora* a *Meloidogyne incognita* raça 2. *Nematologia Brasileira* 14:45, 1990.
- GUERRA NETTO, E.G., D'ANTONIO, A.M., ALMEIDA, S.R., LORDELLO, L.G.E. Ocorrência do nematóide *Meloidogyne coffeicola* Lordello & Zamith, 1960, em lavoura de café no sul do estado de Minas Gerais. *Revista de Agricultura* 58:45, 1983.
- HARTMAN, K.M., SASSER, J.N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: Barker, K.R., Carter, C.C., Sasser, J.N. (Eds.). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. North Carolina: North Carolina State University, v.2, 1985. pp. 69-77.
- JAEHN, A. Desenvolvimento de *Meloidogyne incognita* raça 2 em cafeeiro, afetado pela temperatura. *Nematologia Brasileira* 14:89, 1990.
- KRZYZANOWSKI, A.A., FIGUEIREDO, R., SANTIAGO, D.C., FAVORETO, L. Levantamento de espécies e raças de *Meloidogyne* em cafeeiros no Estado do Paraná. *Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil* 2:81, 2001.
- KUBO, R.K., INOMOTO, M.M., OLIVEIRA, C.M.G., ANTEDOMÊNICO, S.R., MONTEIRO, A.R. Nematóides associados a cafeeiros do Estado de São Paulo. *Congresso Brasileiro de Nematologia* 23:91, 2001.
- LORDELLO, L. G. E. e MELLO FILHO, A T. Mais um nematóide ataca o cafeeiro. *Revista de Agricultura* 45:102, 1970.
- LORDELLO, L.G.E., MONTEIRO, A.R. Informação preliminar sobre um nematóide nocivo ao cafeeiro. *Nematologia Brasileira* 1:13, 1974.
- LORDELLO, L.G.E., ZAMITH, A.P.L. *Meloidogyne coffeicola* sp. n., a pest of coffee trees in the State of Paraná, Brazil (Nematoda, Heteroderidae). *Revista Brasileira de Biologia* 20:375, 1960.
- LORDELLO, R.R.A., LORDELLO, A.I.L. Avaliação da resistência de cafeeiros às raças de *Meloidogyne incognita*. *Bragantia* 46:59, 1987.
- LORDELLO, A.I.L., LORDELLO, R.R.A. Nematóides encontrados em cafezais do Estado de São Paulo. *Congresso Brasileiro de Nematologia* 23:85, 2001.

MONTEIRO, A.R., ANTEDOMÊNICO, S.R., FERRAZ, L.C.C.B., INOMOTO, M.M., KUBO, R.K., OLIVEIRA, C.M.G. Primeira ocorrência de *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen, 1951, em cafeeiro. *Nematologia Brasileira* 23:88, 2001.

MOURA, R.M. Reedição do relatório sobre a moléstia do cafeeiro na província do Rio de Janeiro, 1887, Emilio Augusto Göeldi. Recife, UFRPE. 1998. 121p.

NAVES, R. L., CAMPOS, V. P., DUTRA, M. R., COIMBRA, J. L., ANDRADE JUNIOR, V. C. Ocorrência de nematóides em cafezais do sul de Minas Gerais. *Nematologia Brasileira*, 23:89, 2001.

OLIVEIRA, D.S., OLIVEIRA, R.D.L., FREITAS, L.G., SILVA, R.V. Variability of *Meloidogyne exigua* on coffee crops in the Zona da Mata of Minas Gerais State, Brazil. *Journal of Nematology* 37:323, 2005.

PINHEIRO, J.B., SANTOS, M.A., SANTOS, C.M., LELLES, A.M. Ocorrência de fitonematóides em amostras oriundas de cafezais do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. *Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil* 1:257, 2000.

PONTE, J.J., FREIRE, F.C.O. *Coffea arabica* L. – a new host of *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. *Boletim Cearense de Agronomia* 12:1, 1971.

REBEL, E.K., JAEHN, A., VIANNA, A.S. Testes de sobrevivência do nematóide *Meloidogyne incognita* em solo, na ausência de plantas hospedeiras. *Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras* 4:85, 1976.

ROBERTS, P.A. Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance. *Annual Review of Phytopathology* 33:199, 1995.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE *Meloidogyne incognita* DE MINAS GERAIS E DE SÃO PAULO

RESUMO

As quatro raças de *Meloidogyne incognita* apesar de presentes em outras culturas e plantas daninhas em Minas Gerais, não são detectadas em cafeeiros no Estado, diferentemente do que ocorre em outras áreas produtoras de café no Brasil, como em São Paulo, onde esta espécie de nematóide das galhas é um dos principais fatores limitantes para a cafeicultura. Assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar se a diferença na patogenicidade ao cafeeiro apresentada por populações de *M. incognita* de Minas Gerais e de São Paulo poderia ser explicada pela identificação imprecisa de populações de *Meloidogyne* spp. presentes nos dois Estados. Para isso, duas populações identificadas como *M. incognita* de Minas Gerais e duas de São Paulo foram submetidas à caracterização morfológica, ao teste de hospedeiros diferenciadores, à análise isoenzimática e à caracterização pelo marcador molecular SCAR-café específico para populações de *M. incognita*. As configurações perineais das quatro populações avaliadas apresentaram características típicas de *M. incognita*, ou seja, arco dorsal alto e trapezoidal, estrias onduladas e bifurcações na região dos campos laterais. As quatro populações apresentaram os perfis I1, N1, I2 e N1 para as isoenzimas esterase, malato desidrogenase, superóxido dismutase e glutamato-oxaloacetato transaminase, respectivamente. Apenas um fragmento de DNA de 399 pb foi amplificado pelo primer SCAR-café nas populações testadas. Pela análise conjunta das características das configurações perineais, do teste de hospedeiros diferenciadores, dos perfis isoenzimáticos e de amplificação pelo primer SCAR-café foi possível confirmar que as populações de nematóides das galhas de Minas Gerais e de São Paulo estudadas pertencem à espécie *M. incognita*. Assim, a diferença observada na patogenicidade ao cafeeiro entre populações dos dois Estados não pode ser explicada pela identificação imprecisa do nematóide, pelo menos pelo uso das técnicas de diagnose mais confiáveis até o momento.

Palavras-chave: cafeeiro, nematóide das galhas, variabilidade intraespecífica.

1. INTRODUÇÃO

A identificação precisa das espécies de *Meloidogyne* Goeldi é difícil e, muitas vezes, baseada apenas em variáveis subjetivas. Além disto, a diagnose é bastante dificultada pelo elevado número de espécies, e pela existência de variabilidade intraespecífica em alguns caracteres taxonômicos (ROBERTS, 1995; TRUDGILL, 1991).

Entre os métodos empregados na diagnose de *Meloidogyne* spp. podem-se citar: análise da configuração perineal de fêmeas (TAYLOR e NETSCHER, 1974); morfologia da região labial e do estilete de juvenis de segundo estágio, de machos e de fêmeas; teste de hospedeiros diferenciadores (HARTMAN e SASSER, 1985); caracterização citogenética (TRANTAPHYLLOU, 1985); eletroforese de isoenzimas (ESBENSHADE e TRIANTAPHYLLOU, 1985) e caracterização molecular (CURRAN et al., 1985).

A eletroforese de isoenzimas tem se destacado como a técnica mais confiável para a caracterização e identificação de *Meloidogyne* spp., por apresentar alta eficiência na diferenciação das principais espécies, ainda que elas ocorram em mistura. Além disso, é eficiente na identificação de populações atípicas, sua execução é rápida e o custo é relativamente baixo.

As primeiras técnicas moleculares aplicadas à identificação de fitonematóides envolveram a análise do polimorfismo de fragmentos obtido pela digestão do DNA total com enzimas de restrição (“*Restriction Fragment Length Polymorphisms – RFLP*”) (CURRAN et al., 1985). Mas foi somente com o desenvolvimento da técnica de amplificação de DNA por PCR (“*Polymerase Chain Reaction*”) que uma melhor discriminação interespecífica foi obtida, como, por exemplo, pela amplificação de regiões de DNA mitocondrial (POWERS e HARRIS, 1993) ou ribossômico (PETERSEN et al., 1997).

O método de RAPD (“*Random Amplified Polymorphic DNA*”) tem sido utilizado em muitos estudos de caracterização de *Meloidogyne* spp. (WILLIAMS et al., 1990; WELSH e MCCLELLAND, 1990), uma vez que é uma técnica sensível, rápida e relativamente simples, além de não requerer informações acerca da seqüência nucleotídica do DNA genômico. Uma abordagem mais recente é a conversão dos marcadores de RAPD em SCAR (“*Sequence Characterized Amplified Regions*”), termo cunhado por PARAN e MICHELMORE (1993) para definir marcadores RAPD cuja seqüência interna tenha sido determinada, permitindo compor primers mais longos, ricos em guanina e citosina e de seqüência específica.

Em nematóides das galhas, marcadores SCAR já foram desenvolvidos para separar as espécies *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (ZIJLSTRA, 2000). Mais recentemente, marcadores SCAR espécie-específicos foram desenvolvidos para as três principais espécies de *Meloidogyne* parasitas de cafeeiro no Brasil: *M. incognita*, *M. exigua* e *M. paranaensis* (RANDIG et al., 2002).

Até meados da década de 90, a diagnose das espécies de *Meloidogyne* foi feita quase que exclusivamente pela análise da configuração perineal de fêmeas. Entretanto, esta característica é muito subjetiva e o surgimento de populações com configurações atípicas e o grande número de espécies desse gênero dificulta sua utilização isoladamente.

Um exemplo da subjetividade e da baixa confiabilidade deste tipo de análise foi à descrição de *M. paranaensis*. Populações desta espécie foram detectadas no Paraná e a análise da configuração perineal conduzia à identificação de *M. incognita*. Porém, os sintomas apresentados pelo cafeeiro e a agressividade dessas populações faziam-nas diferentes de *M. incognita*. Assim, por falta de técnicas de diagnose mais precisas, ela foi denominada de *M. incognita* biótipo IAPAR por cerca de 22 anos. Em 1996, esse biótipo foi reavaliado e descrito como uma nova espécie com base principalmente no fenótipo de esterase (CARNEIRO et al., 1996).

O primeiro registro de *M. mayaguensis* Rammah & Hirschmann no Brasil é um outro exemplo da baixa confiabilidade da diagnose feita por meio da análise da configuração perineal. Sintomas severos de meloidoginose em goiabeira (*Psidium guajava* L.) foram primeiramente assinalados no Brasil em 1989, e a diagnose pela análise da configuração perineal apontava como agente etiológico a espécie *M. incognita* (MOURA e MOURA, 1989). No entanto, em 2001, após análise dos perfis enzimáticos de esterase e malato desidrogenase, e de estudos morfológicos complementares, populações da mesma região e causadoras da mesma sintomatologia em goiabeira foram identificadas como *M. mayaguensis* (CARNEIRO et al., 2001).

Informações sobre a ocorrência e distribuição de nematóides das galhas em cafezais brasileiros são oriundas na sua grande maioria da década de 80, e geralmente baseadas em análises de caracteres morfológicos. Assim, as informações sobre ocorrência e distribuição de *M. incognita* em cafezais podem ser imprecisas, o que poderia explicar a diferença na patogenicidade ao cafeeiro apresentada por populações de *M. incognita* de Minas Gerais e de São Paulo. Logo, o objetivo do presente trabalho foi verificar, por meio de técnicas mais precisas, se populações identificadas como *M. incognita* em Minas Gerais e São Paulo realmente pertencem a esta espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Em um estudo preliminar, populações das quatro raças de *M. incognita* coletadas em Minas Gerais foram inoculadas em mudas de cafeeiros ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ e ‘Mundo Novo’, e após 120 dias da inoculação nenhuma reprodução do nematóide foi observada (OLIVEIRA et al., 2002). Duas dessas populações não-patogênicas ao cafeeiro foram selecionadas para representar as populações de Minas Gerais. Essas populações foram inicialmente obtidas de tomateiro (raça 1) e quiabeiro (raça 2). Já as populações de São Paulo foram provenientes de cafeeiro (raças 1 e 2). As raças 1 e 2 foram selecionadas por serem as mais comuns desta espécie de nematóide das galhas (HARTMAN e SASSER, 1985), e também por serem consideradas as mais prejudiciais ao cafeeiro (LORDELLO e LORDELLO, 1987). As populações de *M. incognita* de Minas Gerais foram multiplicadas em mudas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Santa Cruz ‘Kada’), e as de São Paulo em mudas de cafeeiro (*C. arabica* ‘Catuaí Vermelho IAC 44’). Após 120 dias de multiplicação em casa de vegetação, cada população foi submetida à caracterização morfológica, fisiológica, isoenzimática e molecular.

2.1. Caracterização morfológica das populações de *Meloidogyne incognita*

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

2.2. Caracterização fisiológica das populações de *Meloidogyne incognita*

Cada população foi submetida à diferenciação pelo teste de hospedeiros diferenciadores da Universidade Estadual da Carolina do Norte (HARTMAN e SASSER, 1985). Assim, empregaram-se mudas de tomate (*Lycopersicon esculentum* ‘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’). As sementes dessas espécies foram semeadas, separadamente, em bandejas contendo substrato tratado com brometo de metila (100 cm³/m³). As mudas foram transplantadas no estágio de dois a três

pares de folhas definitivas para vasos de argila (2 L), contendo uma mistura de solo e areia na proporção 2:1, tratada com brometo de metila.

Após uma semana do transplântio, procedeu-se a inoculação com 5.000 ovos de cada população de *M. incognita*. Para cada planta diferenciadora foram utilizadas seis repetições. As médias das temperaturas máxima e mínima durante a realização do experimento foram de 28,6 e 19,6^oC, respectivamente. A avaliação das plantas diferenciadoras foi realizada 60 dias após a inoculação, quantificando-se o número de galhas por sistema radicular. Com base no número de galhas foram atribuídas notas de 0 a 5, segundo a escala de TAYLOR e SASSER (1978). As plantas que obtiveram nota igual ou inferior a 2 (número de galhas ≤ 10) foram consideradas resistentes, e as plantas com nota maior que 2 (número de galhas > 10) foram consideradas suscetíveis.

2.3. Caracterização isoenzimática das populações de *Meloidogyne incognita*

As análises foram conduzidas no Laboratório de Nematologia da Universidade Federal de Viçosa. Fêmeas, branco-leitosas, de cada amostra, foram retiradas individualmente do interior das raízes de tomateiro ou cafeeiro com o auxílio de estiletos, sob microscópio estereoscópio, e transferidas para microtubos contendo 10 µL de solução-tampão para extração de proteínas (20% de sacarose, 2% de Triton 100X, 0,01% de azul de bromofenol e 78% de água destilada). Empregou-se a técnica de DAVIS (1964) que consiste no método descontínuo de eletroforese vertical em géis de poliacrilamida.

Os géis de empilhamento e de corrida foram preparados nas concentrações 4 e 8%, respectivamente. A primeira e a última cavidade de cada gel sempre continha a amostra padrão, *M. javanica* oriunda de populações puras e fenótipo isoenzimático conhecido. A eletroforese foi conduzida a 4^oC, sob voltagem constante de 80 V na corrida de empilhamento (15 minutos) e a 200 V para a etapa de separação (30-45 minutos).

Ao final da corrida, os géis foram retirados das placas e mergulhados em soluções preparadas imediatamente antes do seu uso, visando à revelação dos perfis de esterase, malato desidrogenase, superóxido dismutase e glutamato-oxaloacetato transaminase (ALFENAS et al., 1991). Em seguida, os géis foram lavados em água destilada e colocados em solução fixativa (45% de metanol, 9% de ácido acético e 45% de água destilada). Para a secagem dos géis foi utilizado o método do bastidor descrito por ALFENAS e BRUNE (1998). Os perfis isoenzimáticos das diferentes populações foram interpretados segundo ESBENSHADE e TRIANTAPHYLLOU (1985).

2.4. Caracterização molecular das populações de *Meloidogyne incognita*

As análises foram conduzidas no Laboratório de Genômica da Universidade Federal de Viçosa. O DNA genômico de cada população de *M. incognita* foi submetido à reação de PCR com um par de primer SCAR-café específico para populações de *M. incognita* de cafeeiro (RANDIG et al., 2002).

2.4.1. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de alíquotas de 200 a 300 µL de ovos de cada uma das quatro populações de *M. incognita*. Os ovos foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e macerados em nitrogênio líquido. Ao macerado foram adicionados 100 µL de solução NIB (NaCl 100 mM; Tris 30 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM; β-Mercaptoethanol 0,7 µL/mL; Triton 5,6 µL/mL) para posterior centrifugação a 10.000 xg por 2 minutos.

Ao pellet foram adicionados 15 µL de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM, pH 9,0; KCl 50 mM; MgCl 1,5 mM; 0,1% Triton 100X; BSA 0,2 mg/mL; Proteinase K 120 mg/mL) e após homogeneização, a suspensão foi incubada por 2 h a 55⁰C. Em seguida, o volume foi completado para 100 µL com TE 1X (Tris 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0). O DNA obtido foi purificado com um volume de fenol seguido de um volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e precipitado com dois volumes de etanol 70%, seco e ressuspendido em 10 µL de água bi-destilada esterilizada.

2.4.2. Amplificação SCAR-PCR

Foi utilizado o par de primer SCAR-café (inc-K14-F e inc-K14-R) específico para populações de *M. incognita* de cafeeiro (RANDIG et al., 2002). As reações foram realizadas em volume final de 25 µL contendo: 5 ng de DNA; 0,5 U da Taq DNA Polimerase; 1 X tampão de reação Taq DNA polimerase; 20 mM de cada trifosfato de desoxinucleotídeo e 40 pM do primer SCAR-café.

Para as amplificações foi utilizado um termociclador programado nas seguintes condições: desnaturação inicial do DNA por 5 min a 94⁰C; 25 ciclos de 30 s a 94⁰C, 45 s a 64⁰C, e 1 min a 70⁰C, e um período final de extensão de 8 min a 70⁰C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,4% e visualizados sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise das configurações perineais das quatro populações do nematóide das galhas, observou-se que as características eram típicas de *M. incognita*, ou seja, arco dorsal alto e trapezoidal, estrias onduladas e bifurcações na região dos campos laterais.

As populações da raça 1 de Minas Gerais e de São Paulo foram capazes de infectar plantas de tomate, pimentão e melancia, já as da raça 2 infectaram além dessas, as plantas de fumo (Tabela 1). Assim, as quatro populações estudadas foram identificadas como *M. incognita* de acordo com o teste de hospedeiros diferenciadores proposto por HARTMAN e SASSER (1985).

Tabela 1. Reação das plantas no teste de hospedeiros diferenciadores quando inoculadas com as populações de *Meloidogyne incognita* de Minas Gerais e de São Paulo

População	Plantas diferenciadoras					
	Tomate	Algodão	Fumo	Pimentão	Melancia	Amendoim
Minas Gerais						
Raça 1	+	-	-	+	+	-
Raça 2	+	-	+	+	+	-
São Paulo						
Raça 1	+	-	-	+	+	-
Raça 2	+	-	+	+	+	-

+, - = reação de suscetibilidade e resistência, respectivamente, segundo escala proposta por TAYLOR e SASSER (1978).

As populações de *M. incognita* de Minas Gerais e de São Paulo apresentaram os mesmos perfis para as quatro isoenzimas analisadas (Figura 1). O fenótipo de esterase encontrado foi o I1 (Figura 1A), que se caracteriza pela presença de uma banda de igual mobilidade em relação àquela primeira banda de *M. javanica*, utilizada como padrão de comparação. Já para as isoenzimas malato desidrogenase (MDH), superóxido dismutase (SOD) e glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT), as populações apresentaram os fenótipos N1, I2 e N1, respectivamente (Figura 1B, C e D).

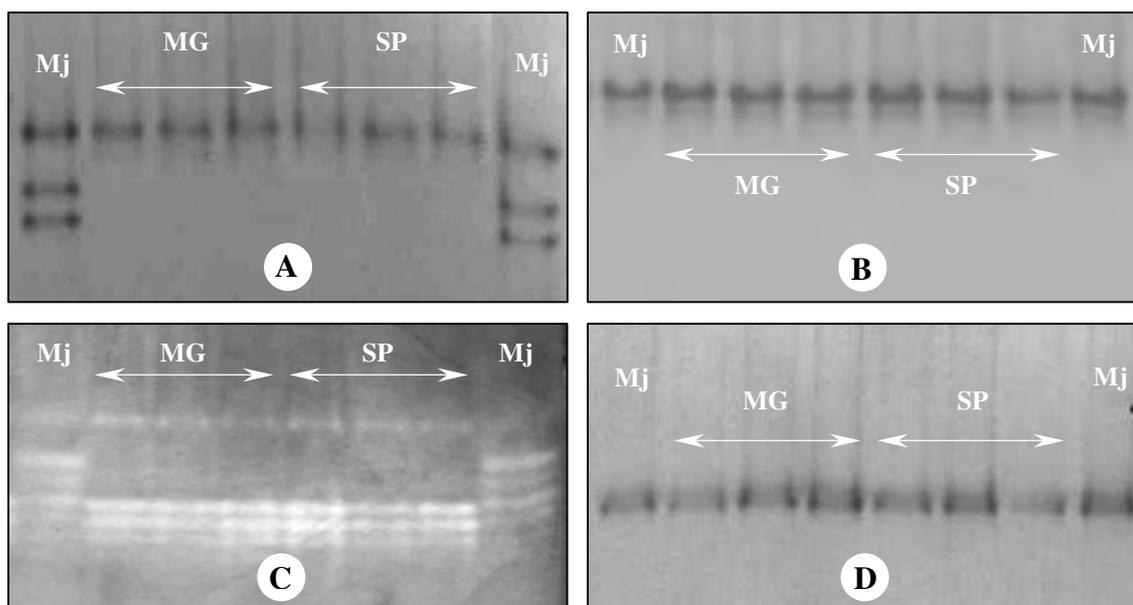


Figura 1. Fenótipos isoenzimáticos de populações de *Meloidogyne incognita* de Minas Gerais e de São Paulo. A: fenótipo I1 de esterase; B: fenótipo N1 de malato desidrogenase; C: fenótipo I2 de superóxido dismutase e D: fenótipo N1 de glutamato-oxaloacetato transminase. Mj: fenótipo de *M. javanica* utilizado como padrão de comparação; MG: população da raça 1 de Minas Gerais e SP: população da raça 1 de São Paulo.

O fenótipo de esterase I1 é o mais comum em *M. incognita* (ESBENSHADE e TRIANTAPHYLLOU, 1985). Além desse fenótipo, outros dois são conhecidos nessa espécie de nematóides das galhas, o I2 que se diferencia do I1 pela presença de uma segunda banda com mobilidade relativa de 1,12 (SANTOS e TRIANTAPHYLLOU, 1992; CARNEIRO et al., 2000), e o S1 que possui uma banda de menor mobilidade em relação à primeira banda de *M. javanica* (ESBENSHADE e TRIANTAPHYLLOU, 1985; OLIVEIRA et al., 2005). Esses três fenótipos de esterase já foram detectados em populações de *M. incognita* no Brasil, e aparentemente não existe nenhuma relação destes com a capacidade do nematóide parasitar o cafeeiro ou qualquer outra planta hospedeira.

Apesar das isoenzimas MDH, SOD e GOT apresentarem um menor grau de polimorfismo e especificidade para as espécies de *Meloidogyne*, quando comparadas com a esterase, estas possuem extrema importância na identificação de algumas espécies deste gênero. Um exemplo é a isoenzima MDH que é utilizada para separar as espécies *M. exigua* e *M. naasi*, cujos fenótipos de esterase são idênticos.

A análise isoenzimática não permitiu detectar diferenças entre as populações de *M. incognita* de Minas Gerais e de São Paulo, entretanto, a caracterização por estas enzimas permitiu confirmar a diagnose destas populações, uma vez que as quatro populações estudadas apresentaram os fenótipos típicos de *M. incognita* para cada isoenzima (ESBENHADE e TRIANTAPHYLLOU, 1985; CARNEIRO et al., 2000).

Nenhuma diferença foi observada nos perfis amplificados pelo primer SCAR-café, independente da origem ou da raça das populações de *M. incognita*. Apenas um fragmento de DNA de 399 pb foi amplificado nas populações testadas (Figura 2). O produto amplificado foi semelhante ao encontrado por RANDIG et al. (2002) em populações de *M. incognita* de cafeeiro.

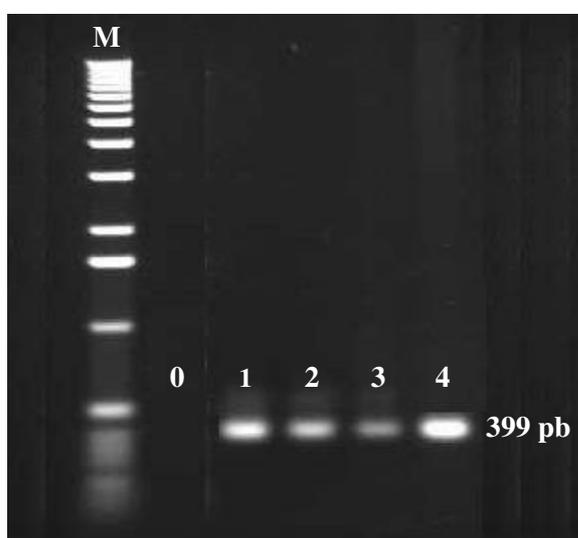


Figura 2. Perfis de amplificação do DNA de ovos de quatro populações de *Meloidogyne incognita* utilizando o par de primer SCAR-café (inc-K14-R e inc-K14-F), específico para essa espécie. M: marcador de peso molecular; pb: pares de bases; 0: controle negativo; 1 e 2: populações das raças 1 e 2 de Minas Gerais; respectivamente; 3 e 4: populações das raças 1 e 2 de São Paulo, respectivamente.

RANDIG et al. (2004) avaliaram o potencial de uso de marcadores SCAR na diagnose de populações de *Meloidogyne* spp. parasitas do cafeeiro no Brasil, América Central e Havaí. Os primers SCAR-café em condição multiplex-PCR permitiram a identificação segura das três espécies parasitas de cafeeiro no Brasil a partir da amplificação de um fragmento de tamanho específico para cada espécie: 562 pb para *M. exigua*, 399 pb para *M. incognita* e 208 pb para *M. paranaensis*. Os mesmos fragmentos

também foram amplificados de maneira específica quando o DNA de duas ou três espécies foi misturado em diferentes proporções.

Segundo ZIJLSTRA et al. (2000), o uso de marcadores SCAR gera uma resposta do tipo positiva ou negativa, ou seja, o peso molecular do fragmento amplificado por um determinado primer-SCAR é específico para cada espécie de *Meloidogyne*, o que permitiu confirmar a diagnose das populações de *M. incognita* estudadas no presente trabalho.

Pela análise conjunta das características das configurações perineais, do teste de hospedeiros diferenciadores, dos perfis isoenzimáticos e de amplificação pelo primer SCAR-café foi possível confirmar que as populações de nematóides das galhas de Minas Gerais e de São Paulo estudadas pertencem à espécie *M. incognita*. Assim, a diferença observada na patogenicidade ao cafeeiro entre populações dos dois Estados não pode ser explicada pela identificação imprecisa do nematóide, pelo menos pelo uso das técnicas de diagnose mais confiáveis até o momento.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C., BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: Alfenas, A.C. (Ed.). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. pp. 107-114.

ALFENAS, A.C., PETERS, L., BRUNE, W., PASSADOR, G.C. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa, UFV. 242p. 1991.

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

CARNEIRO, R.M.D.G., ALMEIDA, M.R.A., QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. Nematology 2:645, 2000.

CARNEIRO, R.M.D.G., MOREIRA, W.A., ALMEIDA, M.R.A., GOMES, A.C.M.M. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Brasil. Nematologia Brasileira 25:223, 2001.

CURRAN, J., BAILLIE, D.L., WEBSTER, J.M. Use of restriction fragments length differences in genomic DNA to identify nematodes species. Parasitology 90:137, 1985.

DAVIS, B.J.B. Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Annals of the New York Academy of Sciences 121:404, 1964.

ESBENSHADE, P.R., TRIANTAPHYLLOU, A.C. Electrophoretic methods for the study of root-knot nematodes enzymes. In: Barker, K.R., Carter, C.C., Sasser, J.N. (Eds.). An

Advanced Treatise on *Meloidogyne*. North Carolina: North Carolina State University, v.2, 1985. pp. 115-123.

HARTMAN, K.M., SASSER, J.N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: Barker, K.R., Carter, C.C., Sasser, J.N. (Eds.). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. North Carolina: North Carolina State University, v.2, 1985. pp. 69-77.

LORDELLO, R.R.A., LORDELLO, A.I.L. Avaliação da resistência de cafeeiros às raças de *Meloidogyne incognita*. *Bragantia* 46:59, 1987.

MOURA, R.M., MOURA, A.M. Meloidoginose da goiabeira: doença de alta severidade no estado de Pernambuco, Brasil. *Nematologia Brasileira* 13:13, 1989.

OLIVEIRA, D.S., OLIVEIRA, R.D.L., SILVA, R.V., PEREIRA, A.A. Ausência de genes de virulência em raças de *Meloidogyne incognita* ao cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 27:193, 2002.

OLIVEIRA, D.S., OLIVEIRA, R.D.L., GONÇALVES, R.D.L. Fenótipo S1 de esterase em *Meloidogyne incognita* no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 30:153, 2005.

PARAN, I., MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85:985, 1993.

PETERSEN, D.J., ZIJLSTRA, C., BLOK, V., VRAIN, T.C. Species probes efficiently distinguish root-knot nematodes species using signatures in the ribosomal intergenic spacer. *Fundamental and Applied Nematology* 20:619, 1997.

POWERS, T.O., HARRIS, T.S. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 25:1, 1993.

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

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

ROBERTS, P.A. Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance. *Annual Review of Phytopathology* 33:199, 1995.

SANTOS, J.M., TRIANTAPHYLLOU, H.H. Determinação dos fenótipos isoenzimáticos e estudos comparativos da morfologia de 88 populações de *Meloidogyne* spp., parasitas do cafeeiro. *Nematologia Brasileira* 16:88, 1992.

TAYLOR, D.P., NETSCHER, C. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. *Nematropica* 20:268, 1974.

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

TRIANAPHYLLOU, A.C. Cytological method for the study of oogenesis and reproduction of root-knot nematodes. In: Barker, K.R., Carter, C.C., Sasser, J.N. (Eds.). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. North Carolina: North Carolina State University, v.2, 1985. pp. 107-114.

TRUDGILL, D.L. Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. Annual Review of Phytopathology 29:167, 1991.

WELSH, J., MCCLELLAND, M. Fingerpring genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research 18:7213, 1990.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.L., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18:6531, 1990.

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

CAPÍTULO 2

PATOGENICIDADE DE POPULAÇÕES DE *Meloidogyne incognita* AO CAFEIEIRO

RESUMO

No Brasil, *Meloidogyne incognita* é considerada a espécie de fitonematóide mais agressiva ao cafeeiro. Entretanto, estudos preliminares demonstraram que populações deste nematóide, coletadas em Minas Gerais, foram incapazes de infectar os cafeeiros ‘Catuaí’ e ‘Mundo Novo’ que são comprovadamente suscetíveis a essa espécie de nematóide das galhas. Considerando que os vários fatores bióticos e abióticos que podem influenciar diferentemente o desenvolvimento dos fitonematóides, o objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito da temperatura, da concentração de inóculo, da idade e do genótipo do hospedeiro sobre a patogenicidade de populações de *M. incognita* de Minas Gerais ao cafeeiro. Populações das quatro raças de *M. incognita* oriundas de Minas Gerais foram inoculadas em mudas de cafeeiro nas temperaturas de 18, 22, 26 e 30⁰C; nos estádios “orelha de onça”, dois, seis, dez e quinze pares de folhas definitivas; nas concentrações de inóculo de 2.500, 5.000, 10.000, 20.000, 40.000 e 100.000 ovos por muda e em 25 genótipos de cafeeiros. A avaliação dos diferentes experimentos foi realizada 120 dias após a inoculação, medindo-se o fator de reprodução no nematóide. As quatro raças de *M. incognita* de Minas Gerais foram incapazes de se reproduzir nas mudas de cafeeiro, independente da concentração de inóculo, da temperatura, do estágio de desenvolvimento e do genótipo de cafeeiro utilizado. Assim, a diferença observada nas informações a respeito da ocorrência e dos danos causados por *M. incognita* ao cafeeiro em Minas Gerais e em São Paulo, deve-se à incapacidade das populações desse nematóide presentes em Minas Gerais em parasitar cafeeiros, ou seja, uma variação intrínseca do nematóide e não a fatores ambientais ou da planta hospedeira.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, nematóides das galhas, variabilidade intraespecífica.

1. INTRODUÇÃO

As quatro raças de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood apesar de presentes em outras culturas e plantas daninhas em Minas Gerais, não são detectadas em cafeeiros no Estado, diferentemente do que ocorre em outras áreas produtoras de café no Brasil, onde esta espécie de nematóide das galhas é um dos principais fatores limitantes para cafeicultura (KRZYZANOWSKY et al., 2001; LORDELLO e LORDELLO, 2001). Os motivos que explicam este fato ainda são desconhecidos, pois as principais cultivares de cafeeiro (Catuaí e Mundo Novo) plantadas em Minas Gerais são comprovadamente suscetíveis a todas as raças deste nematóide (LORDELLO e LORDELLO, 1987).

Na presença de hospedeiros suscetíveis, o fator mais importante para o estabelecimento de espécies de nematóides das galhas é a temperatura do solo (TAYLOR e SASSER, 1978). Para a maioria dos fitonematóides, a faixa de temperatura ótima varia de 15 a 30⁰C, podendo os mesmos se tornarem inativos ou exibir atividade reduzida entre 5 a 10⁰C e 30 a 40⁰C. Abaixo ou acima desses limites, as temperaturas podem ser letais, dependendo do tempo de exposição (VAN GUNDY, 1985).

A temperatura pode influenciar a distribuição geográfica (CANTO-SÁENZ, 1985), embriogênese (VRAIN e BARKER, 1978), eclosão (BARKER et al, 1969), mobilidade e penetração (JATALA e RUSSELL, 1972), desenvolvimento pós-infectivo (DAVIDE e TRAIANTAPHYLLOU, 1967), reprodução (NARDACCI e BARKER, 1979) e a sobrevivência (BERGESON, 1959) dos nematóides.

Dentre as espécies de nematóides das galhas, *M. incognita* é a que apresenta maior distribuição geográfica, causando prejuízos em áreas localizadas entre as latitudes 40⁰N e 33⁰S, nas mais variadas condições ambientais (TAYLOR et al., 1982). JAEHN (1991) estudou a duração do ciclo de vida das raças 1, 2 e 4 de *M. incognita* em raízes de cafeeiro ‘Mundo Novo’, em câmaras de crescimento a 20, 24, 28 e 30⁰C. O autor observou que a duração do ciclo de vida das diferentes raças foi menor na temperatura de 30⁰C.

Além de influenciar o nematóide, a temperatura também afeta o crescimento do hospedeiro, produzindo modificações morfológicas e fisiológicas. Alterações na expressão da resistência genética da planta podem ocorrer com a variação da temperatura do solo. Em temperaturas muito elevadas, cultivares de tomate (HOLTZMANN, 1965), batata (JATALA e RUSSEL, 1972) e feijão (FASSULIOTIS, 1985), resistentes aos nematóides das galhas, tornaram-se suscetíveis.

O fato das plantas se tornarem hospedeiros eficientes em altas temperaturas é provavelmente devido a três fatores: alta temperatura é uma condição ótima para atividade do nematóide; o estresse causado por altas temperaturas torna as plantas mais vulneráveis ao ataque do nematóide e compostos químicos responsáveis pela defesa da planta podem não ser produzidos ou serem neutralizados a alta temperatura (CANTO-SÁENZ, 1985).

Além da temperatura, a patogenicidade dos nematóides das galhas pode ser influenciada pelo estágio de desenvolvimento da planta, pela concentração do inóculo inicial e pelo genótipo do hospedeiro.

Na maioria dos patossistemas, os estádios iniciais de desenvolvimento da planta são os mais vulneráveis ao ataque de espécies de nematóides das galhas (EAPEN, 1992; KHAN e HUSAIN, 1991). Entretanto, a espécie *M. coffeicola* Lordello & Zamith praticamente não infecta mudas de cafeeiro, e seu parasitismo só foi observado em plantas adultas (LORDELLO e ZAMITH, 1960).

Alta concentração de inóculo inicial de nematóides influencia negativamente a tolerância de plantas hospedeiras (BARILLAS et al., 1993; NIBLACK et al., 1986). Já no caso de plantas não-hospedeiras dos nematóides das galhas, a alta densidade populacional do nematóide na área aumenta a probabilidade de seleção de indivíduos patogênicos, provenientes de mecanismos geradores de variabilidade como a mutação (TRANTAPHYLLOU, 1987).

Considerando a influência de vários fatores bióticos e abióticos no desenvolvimento dos fitonematóides, o objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito da temperatura, da concentração de inóculo, da idade e do genótipo do hospedeiro sobre a patogenicidade de populações de *M. incognita* de Minas Gerais a cafeeiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Influência da temperatura na patogenicidade de populações de *M. incognita* de Minas Gerais ao cafeeiro

O experimento foi conduzido em câmaras de crescimento do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizadas mudas de cafeeiro ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ e de tomateiro Santa Cruz ‘Kada’ com dois pares de folhas definitivas e uma população das raças 1, 2, 3 e 4 de *M. incognita* de Minas Gerais. Foram empregadas as seguintes temperaturas: 18, 22, 26 e 30°C.

Sementes do cafeeiro foram semeadas em bandejas contendo areia previamente tratada com brometo de metila ($100 \text{ cm}^3/\text{m}^3$). Quando as plântulas atingiram o estágio de “palito de fósforo” foram transplantadas para vasos de argila de 2 L de capacidade, contendo uma mistura de solo e areia (2:1), igualmente tratada.

Quando as mudas apresentaram o segundo par de folhas definitivas foi realizada a inoculação com 10.000 ovos por muda. O inóculo foi colocado em dois orifícios feitos ao lado de cada muda. Para a verificação da viabilidade do inóculo, também foi feita a inoculação de mudas de tomateiro, mas apenas com 5.000 ovos por muda.

O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4 temperaturas x 4 raças de *M. incognita*), com oito repetições. A avaliação foi realizada aos 90 dias da inoculação nas mudas de tomateiro e aos 120 dias nas mudas de cafeeiro. O sistema radicular de cada muda foi analisado para se verificar a presença de sintomas do ataque de *M. incognita*, e em seguida foi determinado o número de ovos por sistema radicular. Essa variável foi usada para a determinação do fator de reprodução do nematóide ($\text{FR} = \text{população final} / \text{população inicial}$) (OOSTENBRINK, 1966).

2.2. Influência da concentração de inóculo na patogenicidade de populações de *M. incognita* de Minas Gerais a cafeeiro

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizadas mudas de cafeeiro ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ e de tomateiro Santa Cruz ‘Kada’ com dois pares de folhas definitivas e uma população de cada raça de *M. incognita* de Minas Gerais. De cada uma das quatro raças foram utilizadas as seguintes concentrações de inóculo: 2.500, 5.000, 10.000, 20.000, 40.000 e 100.000 ovos por muda.

O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (6 concentrações de inóculo x 4 raças de *M. incognita*), com oito repetições. As médias das temperaturas máxima e mínima durante a realização do experimento foram de 29,6 e 17,6^oC, respectivamente. Para a verificação da viabilidade do inóculo, também foi feita a inoculação de mudas de tomateiro. O preparo das mudas, a inoculação e a avaliação foram realizadas como descrito no item 2.1.

2.3. Influência do estágio de desenvolvimento de mudas de cafeeiro na patogenicidade de populações de *M. incognita* de Minas Gerais

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Foi utilizada uma população de cada raça de *M. incognita* de Minas Gerais, mudas de tomateiro Santa Cruz 'Kada' com dois pares de folhas definitivas e mudas de cafeeiro 'Catuaí Vermelho IAC 44' nos seguintes estádios de desenvolvimento: folhas cotiledonares ("orelha de onça"), dois, seis, dez e quinze pares de folhas definitivas.

O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (5 estádios de desenvolvimento x 4 raças de *M. incognita*), com oito repetições. As médias das temperaturas máxima e mínima durante a realização do experimento foram de 27,6 e 19,6 °C, respectivamente. Para a verificação da viabilidade do inóculo, também foi feita a inoculação de mudas de tomateiro. O preparo das mudas, a inoculação e a avaliação foram realizadas como descrito no item 2.1.

2.4. Influência do genótipo de cafeeiro na patogenicidade de populações de *M. incognita* de Minas Gerais e de São Paulo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizadas mudas de tomateiro Santa Cruz 'Kada' com dois pares de folhas definitivas, uma população de cada raça de *M. incognita* de Minas Gerais e duas populações de *M. incognita* (raças 1 e 2) de São Paulo provenientes de cafeeiro. Os genótipos de cafeeiro empregados foram: Híbridos de Timor (UFV 1262, Ufv 1266, Ufv 1292, Ufv 1680, Ufv 1682, Ufv 1804, Ufv 1824, Ufv 1825, Ufv 1848, Ufv 1959 e Ufv 2389), Catuaí x Híbrido de Timor (H493, H498 e H518), Catimor (UFV 922, Ufv 6869, Ufv 7577 e Ufv 7595), Sarchimor (UFV 963 e Ufv 981), Cavimor (UFV 1076), Icatu (Icatu 39), *C. canephora* (Robusta T3580 e Apoatã IAC 2258) e *C. arabica* (Catuaí Vermelho IAC 44).

O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (25 genótipos de cafeeiro x 6 populações de *M. incognita*), com seis repetições. As médias das temperaturas máxima e mínima durante a realização do experimento foram de 33,3 e 19,8°C, respectivamente. Para a verificação da viabilidade do inóculo, também foi feita a inoculação de mudas de tomateiro. O preparo das mudas, a inoculação e a avaliação foram realizadas como descrito no item 2.1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A viabilidade do inóculo nos diferentes experimentos foi confirmada pela elevada reprodução das populações de *M. incognita* em tomateiro (Tabelas 1 e 2). As quatro raças de *M. incognita* de Minas Gerais foram incapazes de se reproduzir nas mudas de cafeeiro (FR=0), independente da concentração de inóculo, da temperatura, do estágio de desenvolvimento e do genótipo de cafeeiro. Além disso, nenhum sintoma do ataque de *M. incognita* foi observado nas mudas de cafeeiro, quando inoculadas com essas populações de Minas Gerais.

Tabela 1. Fator de reprodução (FR) em mudas de tomateiro Santa Cruz 'Kada' (testemunha), 90 dias após a inoculação com as raças de *Meloidogyne incognita* de Minas Gerais, em diferentes temperaturas

<i>M. incognita</i>	Temperatura (°C)			
	18	22	26	30
Raça 1	27,2 ¹	25,6	164,9	69,1
Raça 2	54,1	60,5	122,9	62,9
Raça 3	37,2	79,2	107,3	89,4
Raça 4	22,0	62,1	94,5	86,1

¹Médias de seis repetições. FR=população final / população inicial do nematóide.

Tabela 2. Fator de reprodução (FR) em mudas de tomateiro Santa Cruz 'Kada' (testemunha), 90 dias após a inoculação com as raças de *Meloidogyne incognita* de Minas Gerais, nos experimentos com diferentes concentrações de inóculo, estágios de desenvolvimento e genótipos

Experimento	<i>M. incognita</i>			
	Raça 1	Raça 2	Raça 3	Raça 4
Concentrações de inóculo	89,4 ¹	86,9	74,3	34,5
Estádios de desenvolvimento	37,1	58,9	38,2	109,5
Genótipos	41,6	30,4	65,2	61,4

¹Médias de seis repetições. FR=população final/população inicial do nematóide.

No experimento com diferentes genótipos de cafeeiro em que foram utilizadas as populações de *M. incognita* de São Paulo, 22 genótipos foram considerados suscetíveis (FR>1) e três imunes (FR=0) (Tabela 3). As cultivares de *C. canephora* Robusta T3580 e Apoatã IAC 2258, e a progênie UFV 1680 (Híbrido de Timor) além de não terem permitido a reprodução do nematóide, também não apresentaram sintomas do ataque dessa espécie de nematóide das galhas.

Não houve diferença significativa na reprodução das distintas raças de *M. incognita* de Minas Gerais mantidas às temperaturas de 18, 22, 26 e 30⁰C. Embora a cultivar ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ seja suscetível a *M. incognita*, não se observou interação compatível das raças de Minas Gerais com essa planta. Alterações na expressão da resistência genética de plantas podem ocorrer com a variação da temperatura do solo (HOLTZMANN, 1965; JATALA e RUSSEL, 1972; FASSULIOTIS, 1985). Entretanto, o fator temperatura não influenciou a reação das mudas de ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ às populações de *M. incognita* de Minas Gerais, mesmo na temperatura de 30⁰C, que é a ideal para o desenvolvimento desse nematóide em cafeeiro (JAEHN, 1991). No caso de cafeeiros, a temperatura parece não ter influência na expressão da resistência a *Meloidogyne* spp., pois plantas matrizes de *C. canephora* selecionadas em áreas naturalmente infestadas por estes nematóides e em regiões de temperaturas elevadas, vêm apresentado resistência por um período superior a 15 anos (GONÇALVES e SILVAROLLA, 2001).

Tabela 3. Fator de reprodução (FR) em mudas de diferentes genótipos de cafeeiro, 120 dias após a inoculação com populações de *Meloidogyne incognita* de São Paulo

Genótipo de cafeeiro	Raça 1		Raça 2	
	Raça 1	Reação	Raça 2	Reação
<i>C. arabica</i>				
Catuaí Vermelho IAC 44	9,4 ¹	S	13,5	S
Híbrido de Timor (HT)				
UFV 1262	1,7	S	1,1	S
UFV 1266	6,7	S	3,6	S
UFV 1292	5,3	S	2,5	S
UFV 1680	0,0	I	0,0	I
UFV 1682	3,2	S	1,6	S
UFV 1804	1,1	S	2,3	S
UFV 1824	4,5	S	2,6	S
UFV 1825	2,2	S	4,2	S
UFV 1848	8,3	S	5,4	S
UFV 1959	9,1	S	6,4	S
UFV 2389	2,9	S	3,9	S
Sarchimor				
UFV 963	5,2	S	7,2	S
UFV 981	2,9	S	1,2	S
Cavimor				
UFV 1076	2,4	S	3,5	S
Catimor				
UFV 922	4,7	S	2,6	S
UFV 6869	2,8	S	2,4	S
UFV 7577	7,8	S	5,3	S
UFV 7595	1,5	S	2,3	S
Icatu				
Icatu 39	2,8	S	4,7	S
Catuaí x HT				
H493	1,4	S	2,6	S
H498	1,7	S	4,1	S
H518	1,3	S	2,4	S
<i>C. canephora</i>				
Robusta T3580	0,0	I	0,0	I
Apoatã IAC 2258	0,0	I	0,0	I

¹Médias de seis repetições. FR=população final / população inicial do nematóide. S e I = reação de suscetibilidade e imunidade, respectivamente.

Diferente do que foi observado em *M. coffeicola*, cujo parasitismo está restrito a mudas mais velhas e plantas adultas de cafeeiro (LORDELLO e ZAMITH, 1960), o estágio de desenvolvimento do cafeeiro não teve influência na patogenicidade das populações de *M. incognita* de Minas Gerais, e todos os estágios de crescimento da planta mostraram-se não hospedeiros dessas populações. Mesmo nas mudas mais novas, estágio “orelha de onça”, em que a constituição dos tecidos favorece o parasitismo de nematóides (EAPEN, 1992; KHAN e HUSAIN, 1991), as populações de *M. incognita* foram incapazes de estabelecer uma relação parasítica.

A alta densidade populacional de nematóides, em áreas cultivadas com plantas resistentes, aumenta a probabilidade de seleção de indivíduos patogênicos ao longo do tempo. Esses indivíduos são oriundos de mecanismos geradores de variabilidade genética, que no caso de nematóides das galhas, a mutação é o principal (TRIANAPHYLLOU, 1987; CASWELL e ROBERTS, 1987). Mesmo com uma alta concentração de inóculo, 100.000 ovos por muda, nenhum indivíduo patogênico ao cafeeiro da cultivar Catuaí Vermelho IAC 44 foi observado dentro das populações de *M. incognita* de Minas Gerais, o que evidencia a ausência ou baixa frequência de indivíduos patogênicos ao cafeeiro nessas populações. Caso houvesse algum ou poucos espécimes patogênicos nessas populações, o período de quatro meses seria suficiente para que esses atingissem a fase reprodutiva, pois o ciclo de vida dessa espécie de nematóide em cafeeiro é de aproximadamente 30 dias (JAEHN, 1991).

Variabilidade intraespecífica na capacidade reprodutiva de populações de *Meloidogyne* spp. tem sido observada em genótipos de *Coffea* spp. (GONÇALVES e PEREIRA, 1998; RIBEIRO et al., 2005; SILVA et al., 2005). Entretanto, independente da raça de *M. incognita* de Minas Gerais, todos as cultivares ou progênies mostraram-se não-hospedeiras (FR = 0) das populações encontradas nesse Estado, demonstrando que essas populações de Minas Gerais são incapazes de parasitar diferentes genótipos de cafeeiro, e não só as cultivares Catuaí e Mundo Novo como observado por OLIVEIRA et al. (2002).

A progênie UFV 1680 é um descendente do Híbrido de Timor (cruzamento natural entre *C. arabica* e *C. canephora*). Esta se comportou como imune às populações de *M. incognita* de Minas Gerais, como as demais progênies aqui estudadas, mas o fato relevante a considerar é a sua reação imune também às raças 1 e 2 de *M. incognita* provenientes de São Paulo. Fontes de resistência a *M. incognita* já foram relatadas em cultivares de *C. canephora* (GONÇALVES e FERRAZ, 1987; GONÇALVES et al., 1996). Entretanto, esse é o primeiro relato de imunidade a *M. incognita* em cafeeiros derivados do Híbrido de

Timor. Cafeeiros derivados desse híbrido têm apresentado resistência a *Hemileia vastatrix* (SILVA et al., 2000) e a *M. exigua* (GONÇALVES e PEREIRA, 1998). Além disso, progênies de híbridos de ‘Catuaí’ e ‘Mundo Novo’ com Híbrido de Timor também podem apresentar produtividade semelhante a de cultivares comerciais de *C. arabica* (A. A. PEREIRA, comunicação pessoal). Assim, a constatação de imunidade a *M. incognita* na progênie UFV 1680 abre grandes perspectivas para os programas de melhoramento do cafeeiro que visam resistência conjunta aos principais patógenos dessa cultura.

A diferença observada nas informações a respeito da ocorrência e dos danos causados por *M. incognita* ao cafeeiro em Minas Gerais e em São Paulo, deve-se à incapacidade das populações desse nematóide presentes em Minas Gerais em parasitar cafeeiros, ou seja, existe uma variação intrínseca do nematóide e não uma influência de fatores ambientais ou da planta hospedeira.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARILLAS, J.R., LAWRENCE, G.W., MCLEAN, K.S. Effect of initial population density of *Meloidogyne incognita* race 3 on the growth of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Nematropica* 23:1, 1993.
- BARKER, K.R., NUSBAUM, C.J., NELSON, L.A. Seasonal population dynamics of selected plant-parasitic nematodes as measured by three extraction procedures. *Journal of Nematology* 1:232, 1969.
- BERGESON, G.B. The influence of temperature on the survival of some species of the genus *Meloidogyne*, in the absence of a host. *Nematologica* 4:344, 1959.
- CANTO-SÁENZ, M. The nature of resistance to *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949. In: Sasser, J.N., Carter, C.C. (Eds.). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. North Carolina: North Carolina State University, v.1, 1985. p. 225-231.
- CASWELL, E.P., ROBERTS, P.A. Nematode population genetics. In: Veech, J.A. & Dickson, D. (Eds). *Vistas on Nematology*. Hyattsville MD, USA, Soc. Nematologists. 1987. pp. 390-397.
- DAVIDE, R.G., TRIANTAPHYLLOU, A.C. Influence of the environment on development and sex differentiation of root-knot nematodes. I. Effect of infection density, age of the host plant and soil temperature. *Nematologica* 13:102, 1967.
- EAPEN, S.J. Influence of plant age on root-knot nematode development in Cardamom. *Nematologia Mediterranea* 20:193, 1992.

FASSULIOTIS, G. The role of the nematologist in the development of resistant cultivars. In: Sasser, J.N., Carter, C.C. (Eds.). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. North Carolina: North Carolina State University, v.1, 1985. p. 233-240.

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

GONÇALVES, W., LIMA, M.M.A., FAZUOLI, L.C. Resistência do cafeeiro a nematóides – III: avaliação da resistência de espécies de *Coffea* e de híbridos interespecíficos a *Meloidogyne incognita* raça 3. Nematologia Brasileira 12:47, 1988.

GONÇALVES, W., PEREIRA, A.A. Resistência do cafeeiro a nematóides IV – reação de cafeeiros derivados do Híbrido de Timor a *Meloidogyne exigua*. Nematologia Brasileira 22:39, 1998.

GONÇALVES, W., SILVAROLLA, M.B. Nematóides parasitos do cafeeiro. In: Zambolim, L. (Ed.) Tecnologias de produção de café com qualidade. Viçosa: Editora UFV. 2001. pp.109-267.

HOLTZMANN, O.V. Effect of soil temperature on resistance of tomato to root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). Phytopathology 55:990, 1965.

JAEHN, A. Determinação da constante térmica das raças 1, 2 e 4 de *Meloidogyne incognita* em cafeeiro. Nematologia Brasileira 15:135, 1991.

JATALA, P., RUSSELL, C.C. Nature of sweet potato resistance to *Meloidogyne incognita* and the effects of temperature on parasitism. Journal of Nematology 4:1, 1972.

KHAN, T.A., HUSAIN, S.I. Effects of age of papaya seedlings on the development of disease complex caused by *Meloidogyne incognita* and *Fusarium solani*. Nematologia Mediterranea 19:327, 1991.

KRZYZANOWSKI, A.A., FIGUEIREDO, R., SANTIAGO, D.C., FAVORETO, L. Levantamento de espécies e raças de *Meloidogyne* em cafeeiros no Estado do Paraná. Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil 2:81, 2001.

LORDELLO, A.I.L., LORDELLO, R.R.A. Nematóides encontrados em cafezais do Estado de São Paulo. Congresso Brasileiro de Nematologia 23:85, 2001.

LORDELLO, L.G.E., ZAMITH, A.P.L. *Meloidogyne coffeicola* sp. n., a pest of coffee trees in the State of Paraná, Brazil (Nematoda, Heteroderidae). Revista Brasileira de Biologia 20:375, 1960.

LORDELLO, R.R.A., LORDELLO, A.I.L. Avaliação da resistência de cafeeiros às raças de *Meloidogyne incognita*. Bragantia 46:59, 1987.

NARDACCI, J.F., BARKER, K.R. The influence of temperature on *Meloidogyne incognita* on soybean. Journal of Nematology 11:62, 1979.

NIBLACK, T.L., HUSSEY, R.S., BOERMA, H.R. Effects of environments, *Meloidogyne incognita* inoculum levels, and *Glycine max* genotype on root-knot nematode-soybean interactions in field microplots. *Journal of Nematology* 18:338, 1986.

OLIVEIRA, D.S., OLIVEIRA, R.D.L., SILVA, R.V., PEREIRA, A.A. Ausência de genes de virulência em raças de *Meloidogyne incognita* ao cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 27:193, 2002.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Meded. Landbouw Hogeschool Wageningen* 66:4, 1966.

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

SILVA, R.V., OLIVEIRA, R.D.L., PEREIRA, A.A., JESUS, D.S. Intra-specific variability in *Meloidogyne exigua* on *Coffea* spp. genotypes. Annual meeting of the Organization of Nematologist of Tropical America 27:57, 2005.

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

TAYLOR, A.L., SASSER, J.N., NELSON, L.A. Relationship of climate and soil characteristics to geographical distribution of *Meloidogyne* species in agricultural soils. Coop. Publ. Dep. Plant Pathology, North Carolina State University, and U.S. Agency Int. Dev. Raleigh, N.C. 65 p., 1982.

TRIANANTAPHYLLOU, A.C. Genetics of nematode parasitism on plants. In: Veech, J.A. & Dickson, D. (Eds). *Vistas on Nematology*. Hyattsville MD, USA, Soc. Nematologists. 1987. pp. 354-363.

VAN GOUNDY, S.D. Ecology of *Meloidogyne* spp. – emphasis on environmental factors affecting survival and pathogenicity. In: Sasser, J.N., Carter, C.C. (Eds.). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. North Carolina: North Carolina State University, v.1, 1985. pp. 177-182.

VRAIN, T.C., BARKER, K.R. Influence of low temperature on development of *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* eggs in egg masses. *Journal of Nematology* 10:311, 1978.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA SUPRESSIVIDADE DE SOLO DE CAFEZAL DE MINAS GERAIS A *Meloidogyne incognita*

RESUMO

As quatro raças de *M. incognita* apesar de presentes em outras culturas e plantas daninhas em Minas Gerais, não são detectadas em cafeeiros no Estado, diferentemente do que ocorre em outras áreas produtoras de café no Brasil, onde esta espécie de nematóide das galhas é um dos principais fatores limitantes para cafeicultura. Os motivos que explicam este fato ainda são desconhecidos, pois as principais cultivares de cafeeiro plantadas em Minas Gerais são comprovadamente suscetíveis a todas as raças deste nematóide. Assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar se solos de cafezais de Minas Gerais são supressivos a populações de *M. incognita*. Para isso, a reprodução em cafeeiro de quatro populações desse nematóide foi comparada em solos provenientes de cafezais de Minas Gerais e de São Paulo, submetidos ou não a tratamento térmico (100⁰C/2h). As populações de *M. incognita* de Minas Gerais foram não-patogênicas ao cafeeiro, independente da origem do solo ou do tratamento térmico. A procedência e o tratamento do solo também não afetaram a capacidade reprodutiva das populações de São Paulo, e estas apresentaram fatores de reprodução superiores a 5,6. Além disso, essas populações causaram danos severos as mudas de cafeeiro ‘Catuaí IAC 44’. Assim, a incapacidade das populações de *M. incognita* de Minas Gerais em infectar o cafeeiro não pode ser relacionada a características físicas, químicas ou microbiológicas do solo que pudessem exercer um efeito supressivo a este nematóide.

Palavras-chave: solos supressivos, nematóide das galhas, cafeeiro.

1. INTRODUÇÃO

A menor incidência de fitopatógenos habitantes do solo num dado campo, em comparação com áreas próximas, é um fato freqüentemente observado. Entretanto, este fenômeno tem recebido pouca atenção por parte dos fitopatologistas que, de modo geral, dedicam maior atenção ao estudo de áreas onde estão ocorrendo danos econômicos às culturas. Nestes solos, denominados supressivos (BAKER e COOK, 1974), o desenvolvimento de doenças é suprimido mesmo se o patógeno for introduzido na presença do hospedeiro suscetível.

Quando solos supressivos são identificados, deve-se estudar os fatores que determinam esta característica para utilizar tais informações na indução de supressividade de solos problemáticos (RODRÍGUEZ-KÁBANA e CALVET, 1994). A indução pode ser realizada por meio da incorporação de antagonistas ou estímulo da sua população, tratos culturais ou outras medidas de manejo. Segundo LINDERMAN et al. (1983), nos solos supressivos o patógeno não se estabelece; se estabelece, mas não provoca doença, ou se estabelece e causa doença por um determinado período, porém sofre um declínio com o tempo.

Vários solos supressivos a nematóides foram identificados (WEIBELZAHN-FULTON et al., 1996; WESTPHALL e BECKER, 2001; PYROWOLAKIS et al., 2002). Estes solos são caracterizados pela redução ou pela incapacidade de aumento da população de fitonematóides, mesmo na presença de hospedeiro suscetível e de condições ambientais favoráveis.

A maior parte dos solos supressivos a fitonematóides tem como fator determinante a presença de microrganismos antagonistas. Um exemplo particularmente bem documentado de solo supressivo a fitonematóides foi o declínio natural de populações de *Heterodera avenae* Woll. na Inglaterra (KERRY et al., 1980). Nestes solos, os autores observaram um intenso parasitismo de fêmeas de *H. avenae* pelo fungo *Nematophthora gynophila* Kerry & Crump. Em adição, *Pochonia chlamydosporia* (= *Verticillium chlamydosporium*) também foi encontrado parasitando ovos deste nematóide. A combinação da atividade parasítica dos dois fungos foi considerado o fator da supressão natural de *H. avenae* nestes solos.

A bactéria parasita de nematóides formadora de endósporo, *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr é amplamente distribuída em solos em todo o planeta, e contribui para o controle natural de nematóides, principalmente de *Meloidogyne* spp. (BROWN et

al., 1985). Em 1994, na Flórida, foi identificado um solo supressivo a *Meloidogyne* spp. (CHEN et al., 1994). Este solo foi cultivado continuamente com fumo (*Nicotiana tabacum* L.) por mais sete anos, e nenhuma prática de manejo de fitonematóides foi aplicada na área durante este tempo. Severos danos ocasionados por *M. incognita* raça 1 e *M. javanica* foram relatados nesta área nos primeiros anos de cultivo. Entretanto, ao longo dos anos foi observada uma redução dos danos causados por estes nematóides, ao ponto de se observar pouca diferença na produção do fumo suscetível ‘Coker 371 Gold’ e do resistente ‘Northrup King 326’. Após análise detalhada da microbiota do solo, endósporos de *P. penetrans* foram encontrados em fêmeas e aderidos aos juvenis de segundo estágio de ambas as espécies de nematóide coletadas nestes campos.

As quatro raças de *M. incognita* apesar de presentes em outras culturas e plantas daninhas em Minas Gerais, não são detectadas em cafeeiros no Estado, diferentemente do que ocorre em outras áreas produtoras de café no Brasil, onde esta espécie de nematóide das galhas é um dos principais fatores limitantes para cafeicultura (KRZYZANOWSKY et al., 2001; LORDELLO e LORDELLO, 2001). Os motivos que explicam este fato ainda são desconhecidos, pois as principais cultivares de cafeeiro (Catuaí e Mundo Novo) plantadas em Minas Gerais são comprovadamente suscetíveis a todas as raças deste nematóide (LORDELLO e LORDELLO, 1987). Logo, o objetivo do presente trabalho foi verificar se um solo de cafezal de Minas Gerais é supressivo a populações de *M. incognita*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os solos empregados no experimento foram coletados em cafezal do município de Viçosa, Minas Gerais, sem *Meloidogyne* spp.; em cafezal de Duartina, São Paulo, onde *M. incognita* tem causado danos; e em seringal de Duartina, sem *Meloidogyne* spp. Parte dos solos do cafezal de Minas Gerais e o de São Paulo foi submetida a tratamento térmico (100°C/2h). Os solos foram submetidos à análise química, física, nematológica e microbiológica, antes da realização do experimento de avaliação da capacidade supressiva do solo de cafezal de Minas Gerais a *M. incognita*.

2.1. Análises química e física

As análises química e física dos solos foram realizadas pelo Laboratório de análise de solos, Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa.

2.2 Análise nematológica

A análise nematológica foi realizada no Laboratório de Nematologia da Universidade Federal de Viçosa. Utilizou-se o método da flutuação centrífuga em solução de sacarose (JENKINS, 1964). Assim, retirou-se uma alíquota de 100 cm³ de cada amostra de solo, homogeneizou-se bem em um recipiente com água, de tal forma que os torrões fossem desagregados para a liberação dos nematóides para a suspensão. A suspensão foi deixada em repouso por 20 segundos e em seguida esta foi vertida em uma peneira de malha de 20 mesh (0,84 mm) para retirada de impurezas de maior tamanho. O líquido resultante foi vertido em uma peneira de 400 mesh (0,037 mm), e com o auxílio de uma piseta a suspensão retida na peneira foi colocado em tubos de centrífugas com capacidade de 50 mL. A suspensão de cada amostra foi centrifugada por quatro minutos a uma velocidade de 1750 rpm. Transcorrido o tempo, retiraram-se os tubos e eliminou-se o sobrenadante. Adicionou-se a solução de sacarose (454 g de açúcar dissolvido em 1 L de água) e centrifugou-se novamente na mesma rotação, mas apenas por 1 minuto. Em seguida, o sobrenadante foi vertido em uma peneira de 400 mesh, e com o auxílio de uma piseta recolheram-se os nematóides em um béquer.

Para facilitar a identificação e contagem dos nematóides, os mesmos foram mortos em água aquecida a 55⁰C por cinco minutos. A contagem e identificação dos gêneros de nematóides presentes nos solos foram realizadas em microscópio de luz e, ou microscópio estereoscópio.

Para comprovação da ausência de *Meloidogyne* spp., mudas de tomateiro Santa Cruz 'Kada' foram transplantadas para vasos contendo parte dos diferentes solos, e após 60 dias verificou-se a presença de galhas em suas raízes.

2.3. Análise microbiológica

A análise das populações microbianas dos solos foi realizada no Laboratório de Nematologia da Universidade Federal de Viçosa, pelo método da contagem de células viáveis em placas contendo meios seletivos. Foram quantificadas colônias de fungos, bactérias e actinomicetos. Alíquotas de 1 g de cada solo foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina esterilizada (NaCl a 0,85% p/v), e em seguida homogeneizadas em agitador tipo vórtex. Em seguida foram realizadas diluições em série até 10⁻⁶.

Empregaram-se as diluições 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} para bactérias, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} para fungos, e 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} para actinomicetos. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram transferidas, assepticamente, para placas contendo 25 mL de meios de cultura seletivos. Os meios seletivos utilizados foram ágar nutriente, ágar caseína e Martin para bactérias, actinomicetos e fungos, respectivamente. As placas foram mantidas a 25⁰C, em fotoperíodo de 12 h. O crescimento das colônias foi acompanhado por uma semana. As diluições fora do limite de 30 a 300 colônias/placa foram descartadas. O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (5 solos x 3 microrganismos), com três repetições.

O número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de solo seco foi determinado pela seguinte relação: $UFC = NC \times FD / VAL \times MS$. Onde NC = número de colônias contadas na placa, FD = fator de diluição (inverso da diluição da qual foi retirada a amostra plaqueada), VAL = volume da alíquota plaqueada e MS = massa de solo seco. Os números de colônias por grama de solo seco foram transformados em $\log(x+1)$ e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

2.4. Avaliação da capacidade supressiva do solo de cafezal de Minas Gerais a *Meloidogyne incognita*

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizadas mudas de cafeeiro ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ e de tomateiro Santa Cruz ‘Kada’ com dois pares de folhas definitivas. Duas populações de *M. incognita* de Minas Gerais e duas de São Paulo foram selecionadas para a realização dos estudos. As populações de Minas Gerais foram obtidas de tomateiro (raça 1) e quiabeiro (raça 2). Já as populações de São Paulo foram provenientes de cafeeiro (raças 1 e 2).

Sementes do cafeeiro foram semeadas em bandejas contendo areia previamente tratada com brometo de metila ($100 \text{ cm}^3/\text{m}^3$). Quando as plântulas atingiram o estágio de “palito de fósforo” foram transplantadas para vasos de argila de 2 L de capacidade, contendo os seguintes solos: (1) solo de cafezal de Minas Gerais, (2) solo de cafezal de Minas Gerais com tratamento térmico, (3) solo de cafezal de São Paulo, (4) solo de cafezal de São Paulo com tratamento térmico e (5) solo de seringal de São Paulo.

Quando as mudas de cafeeiro apresentaram o segundo par de folhas definitivas, elas foram inoculadas com 10.000 ovos de cada uma das populações de *M. incognita*. O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (5 solos x 4 populações de *M. incognita*), com oito repetições. Para verificação da viabilidade do inóculo, mudas de tomateiro foram inoculadas com 5.000 ovos. Mudas de cafeeiro não inoculadas foram mantidas nos diferentes solos para efeito de comparação. As médias das temperaturas máxima e mínima durante a realização do experimento foram de 30,6 e 19,2^oC, respectivamente.

A avaliação foi realizada aos 90 dias após a inoculação nas mudas de tomateiro, e aos 120 nas mudas de cafeeiro. Nas mudas de cafeeiro foram avaliadas as seguintes variáveis: massa da matéria seca da parte aérea (MSPA), massa da matéria fresca de raízes (MFR) e o número de ovos por sistema radicular. Os dados de número de ovos foram transformados em \sqrt{x} , e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os solos coletados no Estado de São Paulo apresentaram textura franco-arenosa, enquanto o solo de Minas Gerais foi classificado como muito argiloso. Outra diferença marcante observada foi quanto a quantidade de matéria orgânica, cujo teor foi quase cinco vezes maior no solo de Minas Gerais (Tabela 1).

Tabela 1. Análise física e teor de matéria orgânica (MO) dos solos provenientes de cafezal de Minas Gerais e de cafezal e seringal de São Paulo

Amostra de solo	Areia grossa	Areia fina	Silte	Argila	Classe textural	MO
	dag/Kg					dag/Kg
Cafezal de MG	25	7	7	61	Muito Argilosa	5,83
Cafezal de SP	51	28	4	17	Franco-Arenosa	1,00
Seringal de SP	52	31	3	14	Franco-Arenosa	1,76

O solo proveniente de seringal de São Paulo foi o que apresentou maior número de espécimes, tanto de fitonematóides, quanto de nematóides de vida livre (Tabela 2). Os solos de cafezais apresentaram o mesmo número de nematóides de vida livre, mas

diferiram qualitativamente, pois no de Minas Gerais foram encontrados cinco gêneros de fitonematóides, enquanto no de São Paulo, apenas dois. A ocorrência de *Meloidogyne* spp. nesses solos foi descartada pela não constatação de juvenis de segundo estágio nas suspensões obtidas pela extração do solo e também pela ausência de sintomas nas mudas de tomateiro utilizadas no teste biológico.

Tabela 2. Número e tipos de nematóides presentes em 100 cm³ de solos coletados em Minas Gerais e em São Paulo

Tipo de nematóide	Local de coleta do solo		
	Cafezal/MG	Cafezal/SP	Seringal/SP
<i>Helicotylenchus</i>	06	01	08
<i>Rotylenchulus</i>	04	00	09
<i>Tylenchus</i>	03	07	06
<i>Xiphinema</i>	01	00	01
<i>Pratylenchus</i>	02	00	00
Vida Livre	26	26	75
Total	42	34	99

Nos solos de cafezais de Minas Gerais e de São Paulo, submetidos ao tratamento térmico, não foi observado crescimento de colônias fúngicas, bacterianas e de actinomicetos. O número de colônias bacterianas no solo de Minas Gerais não submetido ao tratamento térmico foi superior ($P \leq 0,05$) ao encontrado nos solos de São Paulo (Tabela 3). Entretanto, no solo de cafezal de São Paulo, não submetido a tratamento térmico, foi verificado um maior ($P \leq 0,05$) número de colônias de actinomicetos. Quanto ao crescimento de fungos, os solos não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$).

Tabela 3. Número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de solos coletados em Minas Gerais e São Paulo

Microrganismo	UFC/g de solo seco ¹				
	Cafezal MG	Cafezal MG (TT)*	Cafezal SP	Cafezal SP (TT)*	Seringal SP
Bactérias	1,34 x 10 ⁷ a	0 c	1,46 x 10 ⁶ b	0 c	3,13 x 10 ⁶ b
Fungos	4,52 x 10 ⁴ a	0 b	7,69 x 10 ⁴ a	0 b	4,66 x 10 ⁴ a
Actinomicetos	6,87 x 10 ³ b	0 c	1,08 x 10 ⁴ a	0 c	4,69 x 10 ³ b

*TT = solos submetidos a tratamento térmico (100°C/2h). ¹Média de três repetições. Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não houve interação significativa ($P > 0,05$) entre solo e população de *M. incognita* para as variáveis massa da matéria seca da parte aérea (MSPA) e massa da matéria fresca de raízes (MFR). O fator solo não interferiu ($P > 0,05$) na produção de MSPA e MFR nos diferentes tratamentos.

As populações de *M. incognita* de São Paulo, independente do solo utilizado, reduziram significativamente ($P \leq 0,05$) a produção de MSPA (Figura 1) e de MFR (Figura 2), quando comparadas com as populações de Minas Gerais e com a testemunha não inoculada.

As quatro populações de *M. incognita* conseguiram se reproduzir nas mudas de tomateiro, o que confirma a viabilidade do inóculo (Figura 3). A interação dos fatores população e solo não foi significativa ($P > 0,05$) para a variável número de ovos por sistema radicular. Além disso, o fator solo não interferiu ($P > 0,05$) na reprodução das populações de *M. incognita*. As populações de Minas Gerais não conseguiram se reproduzir nas mudas de cafeeiro nos solos avaliados, e nenhum sintoma do ataque de *M. incognita* foi observado nas mudas de cafeeiro (Figura 5B) quando inoculadas com estas populações, independente da raça utilizada.

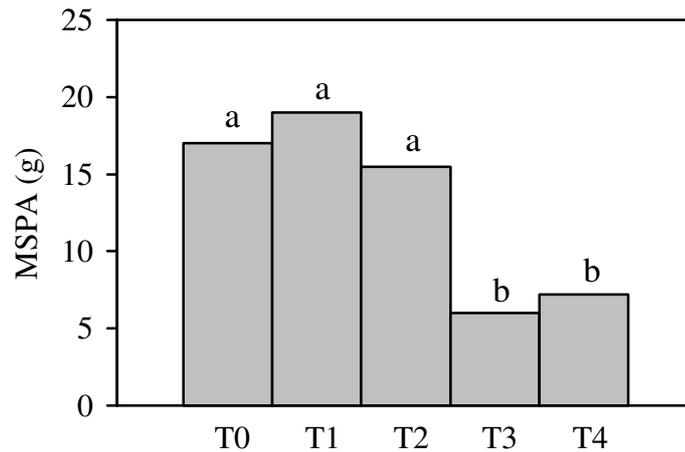


Figura 1. Médias de massa da matéria seca da parte aérea (MSPA) de mudas de cafeeiro ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ em cinco diferentes solos, 120 dias após a inoculação com populações de *Meloidogyne incognita*. T0: testemunha sem inoculação; T1 e T2: *M. incognita* raças 1 e 2 de Minas Gerais, respectivamente; T3 e T4: *M. incognita* raças 1 e 2 de São Paulo, respectivamente. Colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV = 13,69%.

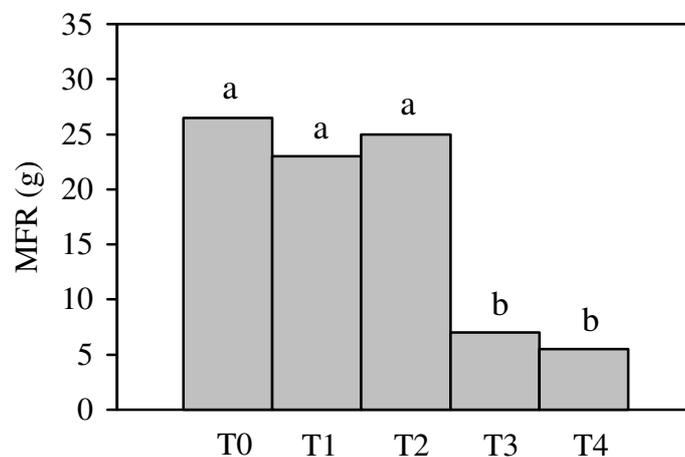


Figura 2. Médias de massa da matéria fresca de raízes (MFR) de mudas de cafeeiro ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ em cinco diferentes solos, 120 dias após a inoculação com populações de *Meloidogyne incognita*. T0: testemunha sem inoculação; T1 e T2: *M. incognita* raças 1 e 2 de Minas Gerais, respectivamente; T3 e T4: *M. incognita* raças 1 e 2 de São Paulo, respectivamente. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV = 22,19%.

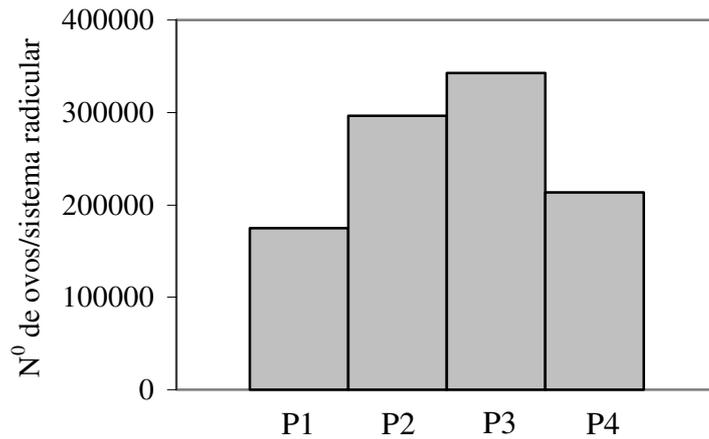


Figura 3. Média do número de ovos por sistema radicular de mudas de tomateiro Santa Cruz 'Kada' (testemunha), 90 dias após a inoculação com populações de *Meloidogyne incognita* de Minas Gerais e de São Paulo. P1 e P2: populações das raças 1 e 2 de Minas Gerais, respectivamente; P3 e P4: populações das raças 1 e 2 de São Paulo, respectivamente. CV = 82,34%.

Já as populações de *M. incognita* de São Paulo apresentaram alta capacidade reprodutiva (Figura 4), e extrema agressividade as raízes de cafeeiro nos diferentes solos. As raízes atacadas por estas populações mostraram reduzida produção de raízes laterais, engrossamentos semelhantes a galhas, rachaduras e descorticamento (Figura 5C).

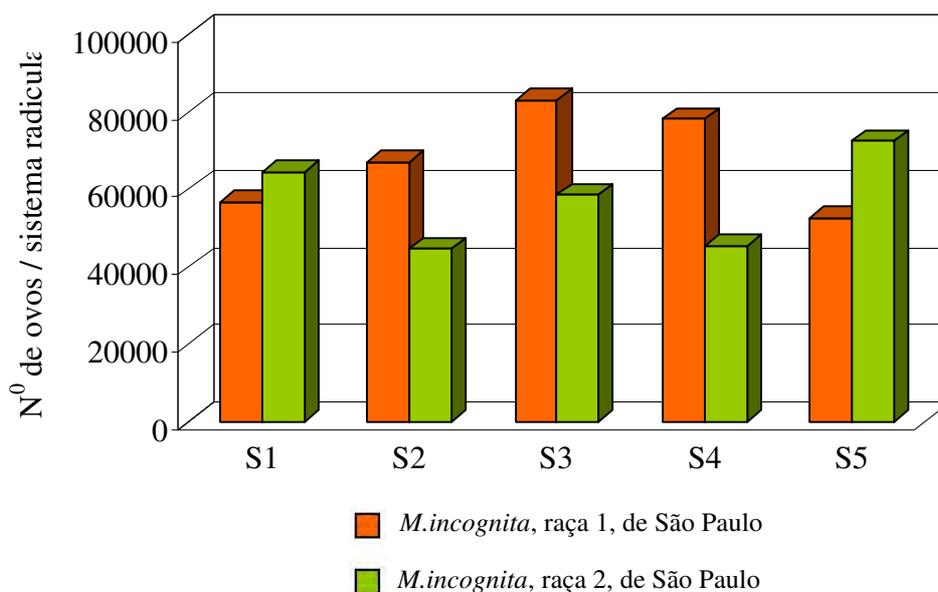


Figura 4. Média do número de ovos por sistema radicular de mudas de cafeeiro ‘Catuaí Vermelho IAC 44’, 120 dias após a inoculação com populações de *Meloidogyne incognita* de São Paulo. S1 e S2: solos provenientes de cafezal de MG, sem e com tratamento térmico, respectivamente; S3 e S4: solos de cafezal de SP, sem e com tratamento térmico, respectivamente; S5: solo de seringal de SP. C.V. = 71,59%.

Nenhuma atividade biológica supressiva a *M. incognita* foi observada nos solos de Minas Gerais, pois as populações de São Paulo apresentaram reprodução semelhante em solos submetidos, ou não, ao tratamento térmico. A natureza biológica da supressividade de um determinado solo a fitopatógenos pode ser avaliada pela comparação da incidência ou severidade de determinada doença em plantas cultivadas em porções deste solo, submetidas ou não a tratamento térmico (WESTPHAL, 2005).

Os fatores físicos e químicos do solo do cafezal de Minas Gerais também não influenciaram a reprodução das populações de *M. incognita* em mudas de cafeeiro. Em solos arenosos e com menor teor de matéria orgânica, como nos coletados em São Paulo, geralmente se tem observado os maiores prejuízos deste nematóide em cafeeiro (GONÇALVES et al., 1995). Entretanto, como observado no presente trabalho, estas características não foram limitantes para que as populações de *M. incognita* de São Paulo ocasionassem severos danos às mudas de cafeeiro.

A incapacidade das populações de *M. incognita* de Minas Gerais em infectar o cafeeiro não pode ser relacionada a características físicas, químicas ou microbiológicas do solo que pudessem ter um efeito supressivo a este nematóide.



Figura 5. Raízes de mudas de cafeeiro ‘Catuaí Vermelho IAC 44’, 120 dias após inoculação com populações de *Meloidogyne incognita*. A: testemunha não inoculada; B: raiz inoculada com a população da raça 1 de Minas Gerais e C: raiz inoculada com a população da raça 1 de São Paulo.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER, R., COOK, J. Biological control of plant pathogens, San Francisco. W.H. Freeman, 1974.

BROWN, S.M., KEPNER, J.L., SMART, G.C. Increase of crop yields following application of *Bacillus penetrans* to field plots infested with *Meloidogyne incognita* Soil Biology and Biochemistry 17:483, 1985.

CHEN, S., DICKSON, D.W., WHITTY, E.B. Response of *Meloidogyne* spp. to *Pasteuria penetrans*, fungi, and cultural practices in tobacco. Journal of Nematology 26:620, 1994.

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

- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report* 48:692, 1964.
- KERRY, B.R., CRUMP, D.H., MULLEN, L.A. Parasitic fungi, soil moisture and multiplication of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae*. *Nematologica* 26:57, 1980.
- KRZYZANOWSKI, A.A., FIGUEIREDO, R., SANTIAGO, D.C., FAVORETO, L. Levantamento de espécies e raças de *Meloidogyne* em cafeeiros no Estado do Paraná. *Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil* 2:81, 2001.
- LINDERMAN, R.G., MOORE, L.W., BAKER, K.F., COOKSEY, D.A. Strategies for detecting and characterizing systems for biological control of soil-borne plant pathogens. *Plant Disease* 67:1058, 1983.
- LORDELLO, A.I.L., LORDELLO, R.R.A. Nematóides encontrados em cafezais do Estado de São Paulo. *Congresso Brasileiro de Nematologia* 23:85, 2001.
- LORDELLO, R.R.A., LORDELLO, A.I.L. Avaliação da resistência de cafeeiros às raças de *Meloidogyne incognita*. *Bragantia* 46:59, 1987.
- PYROWOLAKIS, A., WESTPHAL, A., SIKORA, R.A., BECKER, J.O. Identification of root-knot nematode suppressive soils. *Applied Soil Ecology* 19:51, 2002.
- RODRIGUEZ-KÁBANA, R., CALVET, C. Capacidad del suelo para controlar enfermedades de origen edáfico. *Fitopatologia Brasileira* 19:129, 1994.
- WEIBELZAHN-FULTON, E., DICKSON, D.W., WHITTY, E.B. Suppression of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* by *Pasteuria penetrans* in field soil. *Journal of Nematology* 28:43, 1996.
- WESTPHAL, A. Detection and description of soil with specific nematode suppressiveness. *Journal of Nematology* 37:121, 2005.
- WESTPHAL, A., BECKER, J.O. Components of soil suppressiveness against *Heterodera schachtii*. *Soil Biology & Biochemistry* 33:9, 2001.

CAPÍTULO 4

PENETRAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-INFECTIVO DE *Meloidogyne incognita* EM CAFEIEIRO

RESUMO

No Brasil, *Meloidogyne incognita* é considerada a espécie de fitonematóide mais agressiva ao cafeeiro. Entretanto, populações desse nematóide presentes em Minas Gerais são incapazes de infectar cafeeiros. Com o objetivo de elucidar os mecanismos envolvidos nesta interação incompatível, comparou-se a penetração e o desenvolvimento pós-infectivo de uma população de *M. incognita* de Minas Gerais com uma população patogênica ao cafeeiro, proveniente de São Paulo. Mudanças de cafeeiro *C. arabica* ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ (suscetível) e de *C. canephora* ‘Apoatã IAC 2258’ (resistente) com um par de folhas definitivas foram inoculadas com 10.000 juvenis de segundo estágio (J₂) de cada população de *M. incognita*. Após 48h da inoculação, as mudas foram removidas do substrato e suas raízes lavadas para eliminar J₂ que ainda não tinham penetrado, para padronizar a idade de infecção em dois dias. Três mudas de cada tratamento foram colhidas a cada dois dias, do primeiro ao décimo dia, e a cada cinco dias, do décimo ao quadragésimo dia após a inoculação para serem submetidas à coloração com fucsina ácida. A penetração de J₂ da população de *M. incognita* de São Paulo foi maior do que a apresentada pela população de Minas Gerais, tanto em cafeeiro suscetível, quanto no resistente. Além disso, ocorreu maior penetração de J₂ das duas populações no cafeeiro suscetível. Nas avaliações posteriores, somente foi observado desenvolvimento pós-infectivo nos indivíduos pertencentes à população de *M. incognita* de São Paulo em cafeeiro ‘Catuaí’. Os mecanismos que conferiram incompatibilidade entre populações de *M. incognita* de Minas Gerais e o cafeeiro atuaram principalmente na fase de penetração da forma infectiva, mas também foi acompanhada pela ação de fatores de resistência pós-penetração que ocasionaram uma significativa emigração do J₂ e impediram o estabelecimento do nematóide.

Palavras-chave: patogênese, nematóide das galhas, mecanismos de resistência, *Coffea* spp.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood é considerada a espécie de fitonematóide mais agressiva ao cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Entretanto, estudos demonstraram que populações desse nematóide, coletadas em Minas Gerais, foram incapazes de infectar cafeeiros ‘Catuaí’ e ‘Mundo Novo’ (OLIVEIRA et al., 2002) que são comprovadamente suscetíveis a essa espécie de nematóides das galhas (LORDELLO e LORDELLO, 1987).

A resistência de plantas pode ser expressa durante a penetração, desenvolvimento ou na reprodução do nematóide (ANWAR et al., 1994). A penetração de juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne* spp., em plantas resistentes ou suscetíveis, pode acontecer de forma equivalente (SCHNEIDER, 1991; MOURA et al., 1993; WINDHAN e WILLIAMS, 1994), ser maior na planta suscetível (LAWRENCE e CLARK, 1986) ou até mesmo maior nas plantas resistentes (HERMAN et al., 1991). Os mecanismos que limitam a penetração dos nematóides das galhas incluem fatores morfológicos pré-existentes, ou a produção de exsudados radiculares que não atraem ou repelem os J₂ (JATALA e RUSSELL, 1972).

Já o desenvolvimento pós-penetração (fase pós-infectiva) de *Meloidogyne* spp. é afetado pela ativação de processos fisiológicos da planta que previnem ou atrasam o desenvolvimento dos J₂, ou limitam a reprodução das fêmeas (ANWAR et al., 1994). Estudos têm demonstrado diversos mecanismos de resistência pós-infecção em plantas parasitadas pelos nematóides das galhas, entre eles, a reação de hipersensibilidade (DROPKIN, 1969; PAULSON e WEBSTER, 1972), acúmulo de compostos fenólicos (SINGH e CHOUDHURY, 1973), formação de fitoalexinas (VEECH, 1982) e a atividade da enzima fenilalanina amônia liase (GIEBEL, 1982).

A reação de hipersensibilidade é considerada o mecanismo de resistência pós-penetração mais comum em interações incompatíveis envolvendo *Meloidogyne* spp. (ANWAR e MCKENRY, 2000). As células do cilindro central, próximas ao local de penetração do estilete do nematóide, exibem um processo de morte celular programada, o que impede o estabelecimento ou o desenvolvimento do nematóide. Em cafeeiro, este mecanismo de resistência já foi observado em raízes das cultivares resistentes Iapar 59 (ANTHONY et al., 2005) e Catimor (RODRIGUES et al., 2000) após inoculação com populações de *M. exigua*.

Com o objetivo de elucidar os mecanismos envolvidos na interação incompatível entre as populações de *M. incognita* de Minas Gerais e o cafeeiro, avaliou-se a penetração e o desenvolvimento pós-infectivo destas populações de nematóide em cafeeiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento com temperatura regulada para 26^oC. Foram utilizadas mudas de cafeeiros *C. arabica* ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ (suscetível) e *C. canephora* ‘Apoatã IAC 2258’ (resistente) com dois pares de folhas definitivas; duas populações de *M. incognita*, uma proveniente de quiabeiro de Minas Gerais e a outra de cafeeiro de São Paulo, ambas da raça 2.

Sementes dos cafeeiros foram semeadas em bandejas contendo areia previamente tratada com brometo de metila (100 cm³/m³). Quando as plântulas atingiram o estágio de “palito de fósforo”, as mesmas foram transplantadas para tubetes de 100 mL de capacidade contendo areia esterilizada.

Quando as mudas apresentaram o segundo par de folhas definitivas foi realizada a inoculação com 10.000 J₂ de cada uma das populações de *M. incognita*. Após 48 h da inoculação, as mudas foram removidas dos tubetes e suas raízes lavadas para eliminar J₂ que ainda não tinham penetrado, afim de padronizar a idade de infecção em dois dias. Em seguida, cada muda foi transplantada para copos plásticos com 500 mL de capacidade, preenchidos com um mistura de solo e areia (2:1) previamente esterilizada. Para verificação da viabilidade do inóculo, mudas de tomateiro Santa Cruz ‘Kada’ foram inoculadas com 2.000 J₂ de cada população de *M. incognita*.

O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 populações de *M. incognita* x 2 espécies de cafeeiro x 11 épocas de avaliação), com 3 repetições. Três mudas de cada tratamento foram colhidas de dois em dois dias até o décimo dia. A partir do décimo dia, a cada cinco dias até o quadragésimo dia após a inoculação.

A localização *in situ* dos diferentes estádios de desenvolvimento do nematóide nas raízes de cafeeiro foi realizada pela coloração com fucsina ácida (BYRD et al., 1983). Assim, as raízes das mudas foram retiradas cuidadosamente dos copos plásticos, lavadas e cortadas em seções de aproximadamente 1 a 2 cm. Em seguida, essas amostras foram mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% durante 6 minutos. Após esse período, as raízes foram lavadas em água corrente por 30 a 45 segundos para retirar o

excesso de hipoclorito de sódio e colocadas em água por 15 minutos. As raízes foram transferidas para um recipiente contendo 30 mL de água e 1 mL de solução corante (75 mL de água destilada, 25 mL de ácido acético glacial e 350 mg de fucsina ácida) e aquecidas, marcando-se 30 segundos após fervura. Depois de esfriar até a temperatura ambiente, as raízes foram lavadas em água corrente para remover o excesso de corante e colocadas em 20 a 30 mL de glicerol acidificado com algumas gotas de ácido clorídrico (HCl 5N), e novamente foram colocadas para ferver.

Avaliou-se ao microscópio estereoscópico, o número e o estágio de desenvolvimento dos nematóides no interior das raízes. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As populações de *M. incognita* de Minas Gerais e de São Paulo apresentaram fatores de reprodução de 12,4 e 16,5 em raízes de tomateiro, respectivamente, o que comprovou a viabilidade do inóculo. A penetração dos J₂ da população de *M. incognita* de São Paulo, patogênica ao cafeeiro, foi maior ($P < 0,05$) do que a apresentada pela população de Minas Gerais, tanto em cafeeiro suscetível, quanto no resistente. Além disso, ocorreu maior penetração ($P < 0,05$) dos J₂ das duas populações no cafeeiro suscetível (Tabela 1).

A partir do quarto dia da inoculação ocorreu uma significativa redução ($P < 0,05$) no número de nematóides nas raízes do cafeeiro resistente ‘Apoatã IAC 2258’ em relação à primeira avaliação, independente da população de *M. incognita*. O mesmo foi observado na cultivar suscetível ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ quando inoculado com a população de Minas Gerais ($P < 0,05$). Já a partir do oitavo dia da inoculação, nenhum indivíduo de *M. incognita* de Minas Gerais foi detectado nas raízes de cafeeiro ‘Apoatã IAC 2258’, e o mesmo foi observado em raízes de ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ a partir do décimo dia (Tabela 1).

O completo desenvolvimento pós-infectivo foi observado apenas nos indivíduos pertencentes à população de *M. incognita* de São Paulo, quando inoculados em cafeeiro ‘Catuaí Vermelho IAC 44’. Apenas J₂ vermiformes foram encontrados até o sexto dia da inoculação. A partir do oitavo dia, 68% dos J₂ estavam alargados, um indicativo que estes conseguiram estabelecer sítios de alimentação. Aos 15 dias, aproximadamente 54% dos

indivíduos já estavam no estágio J₃ ou J₄. A presença de fêmeas no início da postura de ovos foi observada no vigésimo quinto dia da inoculação (Tabela 1).

Tabela 1. Número médio de nematóides em diferentes estádios de desenvolvimento das populações de *Meloidogyne incognita* de São Paulo (SP) e de Minas Gerais (MG) em cafeeiros ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ e ‘Apoatã IAC 2258’ até 40 dias após a inoculação

Dias após a inoculação	Estádio do nematóide	Tratamento ¹			
		SP - Catuaí	SP - Apoatã	MG - Catuaí	MG - Apoatã
2	J2	430 Aa	220 Ab	45 Ac	16 Ad
	J3/J4	0	0	0	0
	Fêmea	0	0	0	0
4	J2	365 Aa	115 Bb	23 Bc	4 Bd
	J3/J4	0	0	0	0
	Fêmea	0	0	0	0
6	J2	472 Aa	86 Bb	27 Bc	4 Bd
	J3/J4	0	0	0	0
	Fêmea	0	0	0	0
8	J2	384 Aa	31 Cb	11 Bb	0 Cc
	J3/J4	0	0	0	0
	Fêmea	0	0	0	0
10	J2	448 Aa	6 Db	0 Cc	0 Cc
	J3/J4	0	0	0	0
	Fêmea	0	0	0	0
15	J2	251	0	0	0
	J3/J4	134	0	0	0
	Fêmea	0	0	0	0
20	J2	83	0	0	0
	J3/J4	246	0	0	0
	Fêmea	0	0	0	0
25	J2	23	0	0	0
	J3/J4	295	0	0	0
	Fêmea	48	0	0	0
30	J2	34	0	0	0
	J3/J4	102	0	0	0
	Fêmea	145	0	0	0
35	J2	25	0	0	0
	J3/J4	54	0	0	0
	Fêmea	154	0	0	0
40	J2	31	0	0	0
	J3/J4	26	0	0	0
	Fêmea	162	0	0	0

¹Média de três repetições. Médias seguidas da mesma letra minúscula, na linha, e maiúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A penetração dos J₂ da população de Minas Gerais foi em média 89,5 e 92,7% menor do que a apresentada pela população de *M. incognita* de São Paulo, em cafeeiros ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ e ‘Apoatã IAC 2258’, respectivamente. Assim, a incompatibilidade apresentada por *M. incognita* de Minas Gerais e cafeeiros pode, em parte, ser explicada pela existência de mecanismos de resistência que reduzem a penetração da forma infectiva do nematóide, como a existência de barreiras morfológicas ou a produção de exsudados radiculares que não atraem ou repelem os J₂ dessa população (NIBALCK et al., 1986; POTENZA et al., 1996).

A atração dos J₂ pela planta hospedeira ocorre em resposta aos sinais emitidos pelas raízes, na forma de compostos orgânicos como exsudados, secreções e mucilagens que são perceptíveis aos órgãos sensoriais dos J₂, como os anfídeos e as papilas labiais (COOMANS, 1979; PROT, 1980). Além disso, fatores de natureza física nas raízes, como gradiente de temperatura, pH, umidade, presença de gases como o oxigênio e o CO₂ e fatores de natureza biológica, como a colonização por microrganismos, afetam a atração dos fitonematóides em direção ao sistema radicular (BIRD, 1959; OOSTENDORP e SIKORA, 1990; GOURD et al., 1993).

Redução na penetração de J₂ de nematóides das galhas, como um mecanismo de resistência, já foi observado em cafeeiro. ANTHONY et al. (2005) ao estudarem a penetração e o desenvolvimento de populações de *M. exigua* em cafeeiros suscetível (‘Caturra’) e resistente (‘Iapar 59’) verificaram uma redução de 28% na penetração dos J₂ nas raízes do cafeeiro resistente quatro dias após a inoculação. ARAYA e CASWELL-CHEN (1995) verificaram que cafeeiros ‘Caturra’ e ‘Catuaí’ foram não-hospedeiros de populações de *M. javanica* da Califórnia, e o fator determinante para o não estabelecimento desse nematóide foi a baixa penetração dos J₂. Apenas 2% dos juvenis inoculados conseguiram penetrar nas raízes desses cafeeiros.

A emigração da forma infectiva de *M. incognita*, em resposta aos mecanismos de resistência da planta hospedeira, já foi verificada em raízes de algodoeiro (MCCLURE et al., 1974), de alfafa (REYNOLDS et al., 1970) e de soja resistentes (HERMAN et al., 1991). Este fenômeno poderia explicar a redução no número de nematóides encontrados nas raízes de cafeeiro ao longo das avaliações.

Os mecanismos que conferiram incompatibilidade entre populações de *M. incognita* de Minas Gerais e o cafeeiro atuaram principalmente na fase de penetração da forma infectiva, mas também foi acompanhada pela ação de fatores de resistência pós-

penetração que ocasionaram uma significativa emigração do J₂ e impediram o estabelecimento do nematóide.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANWAR, S.A., MCKENRY, M.V. Penetration, development and reproduction of *Meloidogyne arenaria* on two new resistant *Vitis* spp. *Nematropica* 30:9, 2000.

ANWAR, S.A., TRUDGILL, D.L., PHILLIPS, M.S. The contribution of variation in invasion and development rates of *Meloidogyne incognita* to host status differences. *Nematologica* 40:579, 1994.

ARAYA, M., CASWELL-CHEN, E.P. *Coffea arabica* cvs, Caturra and Catuaí nonhosts to a California isolate of *Meloidogyne javanica*. *Nematropica* 25:165, 1995.

BIRD, A.F. The attractiveness of roots to the plant parasitic nematodes *Meloidogyne javanica* and *M. hapla*. *Nematologica* 4:322, 1959.

BYRD, J.D.W., KIRKPATRICK, J., BARKER, K.R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15:142, 1983.

COOMANS, A. The anterior sensilla of nematodes. *Revue de Nématologie* 2:259, 1979.

DROPKIN, V.H. The necrotic reaction of tomatoes and other host resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. *Phytopathology* 59:1632, 1969.

ENDO, B.Y., Pathogenesis of nematode-infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 13:213, 1975.

GHEYSEN, G., FENOLL, C. Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology* 40:191, 2002.

GIEBEL, J. Mechanism of resistance to plant nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 20:257, 1982.

GOURD, T.R., SCHMITT, D.P., BARKER, K.R. Penetration rates by second-stage juveniles of *Meloidogyne* spp. and *Heterodera glycines* into soybean roots. *Journal of Nematology* 25:38, 1993.

GRIFFIN, G.D., WAITE, W.W. Attraction of *Ditylenchus dipsaci* and *Meloidogyne hapla* by resistant and susceptible alfalfa seedlings. *Journal of Nematology* 3:215, 1971.

- HERMAN, M., HUSSEY, R.S., BOERMA, H.R. Penetration and development of *Meloidogyne incognita* on roots of resistant soybean genotypes. *Journal of Nematology* 23:155, 1991.
- JATALA, P., RUSSELL, C.C. Nature of sweet potato resistance to *Meloidogyne incognita* and the effects of temperature on parasitism. *Journal of Nematology* 4:1, 1972.
- KLINGLER, J. On the orientation of plant nematodes and of some other soil animals. *Nematologica* 11:4, 1965.
- LAWRENCE, G.W., CLARK, C.A. Infection and morphological development of *Meloidogyne incognita* in roots of susceptible and resistant sweet potato cultivars. *Plant Disease* 70:545, 1986.
- LORDELLO, R.R.A., LORDELLO, A.I.L. Avaliação da resistência de cafeeiros às raças de *Meloidogyne incognita*. *Bragantia* 46:59, 1987.
- MCCLURE, M.A., ELLIS, K.C., NIGH, E.L. Post-infectious development and histopathology of *Meloidogyne incognita* in resistant cotton. *Journal of Nematology* 6:21, 1974.
- MOURA, R.M., DAVIS, E.L., LUZZI, B.M., BOERMA, H.R., HUSSEY, R.S. Post-infectious development of *Meloidogyne incognita* on susceptible and resistant soybean genotypes. *Nematropica* 23:7, 1993.
- NIBALCK, T.L., HUSSEY, R.S., BOERMA, H.R. Effects of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne incognita* on early growth of soybean. *Journal of Nematology* 18:444, 1986.
- OLIVEIRA, D.S., OLIVEIRA, R.D.L., SILVA, R.V., PEREIRA, A.A. Ausência de genes de virulência em raças de *Meloidogyne incognita* ao cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 27:193, 2002.
- OOSTENDORP, M., SIKORA, R.A. In-vitro interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera*. *Revue de Nématologie* 13:269, 1990.
- PAULSON, R.E., WEBSTER, J.M. Ultrastructure of the hypersensitive reaction in roots of tomato, *Lycopersicon esculentum* L., to infection by the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Physiological Plant Pathology* 2:227, 1972.
- PLOT, J.C. Migration of plant-parasitic nematodes towards. *Revue de Nématologie* 3:305, 1980.
- POTENZA, C.L., THOMAS, S.H., HIGGINS, E.A., SENGUPTA-GOPLAN, C. Early root response *Meloidogyne incognita* in resistant and susceptible alfalfa cultivars. *Journal of Nematology* 28:475, 1996.
- REYNOLDS, H.W., CARTER, W.W., O'BANNON, J.H. Symptom less resistance of alfalfa to *Meloidogyne incognita acrita*. *Journal of Nematology* 2:131, 1970.

RODRIGUES, A.C.F.O., ABRANTES, I.M.O., MELILLO, M.T., BLEVEZACHEO, T. Ultrastructural response of coffee roots to root-knot nematodes, *Meloidogyne exigua* and *M. megadora*. *Nematropica* 30:201, 2000.

SCHNEIDER, S.M., Penetration of susceptible and resistant tobacco cultivars by *Meloidogyne* juveniles. *Journal of Nematology* 23:225, 1991.

SINGH, B., CHOUDHURY, B. The chemical characteristics of tomato cultivars resistant to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Nematologica* 19:443, 1973.

VEECH, J.A. Phytoalexins and their role in the resistance of plants to nematodes. *Journal of Nematology* 14:2, 1982.

WINDHAM, G.L., WILLIAMS, W.P. Penetration and development of *Meloidogyne incognita* in roots of resistant and susceptible corn genotypes. *Journal of Nematology* 26:80, 1994.

ZHAO, X., SCHIMITT, M., HAWES, M.C. Species-dependent effects of border cell and root tip exudates on nematode behavior. *Phytopathology* 90:1239, 2000.

CAPÍTULO 5

HISTOPATOLOGIA DE RAÍZES DE CAFEEIROS INOCULADAS COM POPULAÇÕES DE *Meloidogyne incognita*

RESUMO

Meloidogyne incognita é considerada a espécie de fitonematóide mais agressiva ao cafeeiro no Brasil. Estudos preliminares demonstraram que populações deste nematóide oriundas de Minas Gerais foram incapazes de infectar cafeeiros das cultivares ‘Catuaí’ e ‘Mundo Novo’. Com o objetivo de elucidar os mecanismos envolvidos nesta interação incompatível, comparou-se a histopatologia de raízes de cafeeiros inoculadas com uma população patogênica e outra não-patogênica ao cafeeiro. Mudas de cafeeiro ‘Catuaí’ (suscetível) e ‘Apoatã’ (resistente) foram inoculadas com 10.000 juvenis de segundo estágio de cada população de *M. incognita*. Três mudas de cada tratamento foram colhidas a cada dois dias, do primeiro ao décimo dia, e a cada cinco dias, do décimo ao quadragésimo dia após a inoculação para serem submetidas à coloração com fucsina ácida e posterior preparo de cortes histopatológicos. A indução de células gigantes e o desenvolvimento do nematóide somente foram observados em cafeeiro ‘Catuaí’ inoculado com a população patogênica. Não foi observado nenhum indício de formação de células de alimentação em ‘Apoatã’ e nem em ‘Catuaí’ inoculado com a população não-patogênica. Essa informação confirma a incapacidade das populações de *M. incognita* de Minas Gerais em infectar cafeeiros suscetíveis.

Palavras-chave: nematóide das galhas, células gigantes, mecanismos de resistência

1. INTRODUÇÃO

Em uma interação compatível, espécies de nematóides das galhas induzem a rediferenciação das células das raízes da planta hospedeira, as quais formarão os sítios de alimentação, que são essenciais para o seu desenvolvimento e reprodução (WILLIAMSON, 1999). Os juvenis de segundo estágio (J₂), que são a forma infectiva desses nematóides, penetram na raiz do hospedeiro e migram intercelularmente em direção ao cilindro vascular, onde é formado o sítio de alimentação, que consiste de várias células gigantes originárias da rediferenciação de células parenquimáticas do cilindro vascular (WYSS et al., 1992).

A formação de células gigantes é o resultado da ativação de genes da planta e da reativação do ciclo celular, induzida por secreções do nematóide (WILLIAMSON e HUSSEY, 1996). Essas células sofrem sucessivas divisões nucleares sem ocorrência de citocinese, tornando-se multinucleadas. O citoplasma dessas células torna-se denso, com grande número de mitocôndrias, e as paredes celulares tornam-se invaginadas, aumentando a superfície de absorção de fotoassimilados, minerais e outros metabólitos. Tanto a indução, quanto a manutenção das células gigantes, depende do contínuo estímulo do nematóide, sem o qual essas células atrofiam-se e degeneram-se (REDDIGARI et al., 1985). Ao redor dos sítios de alimentação ocorre a divisão de células corticais, dando origem às típicas galhas induzidas por *Meloidogyne* spp. (WILLIAMSON e GLEASON, 2003).

Já, na maioria das interações incompatíveis, as células do cilindro central próximas ao local de penetração do estilete do nematóide exibem um processo de morte celular programada conhecido como reação de hipersensibilidade (“*Hypersensitive Response*”, HR). Esta reação ocorre a partir de oito a 12 horas após a inoculação das raízes com J₂, impedindo o estabelecimento de sítios de alimentação, e, conseqüentemente o desenvolvimento do nematóide (DROPKIN, 1969).

Além da reação de hipersensibilidade, estudos têm mostrado que a resistência em plantas parasitadas por nematóides das galhas pode ocorrer por diversos mecanismos como a produção de fitoalexinas (VEECH, 1982); acúmulo de compostos fenólicos (SINGH e CHOUDHURY, 1973); atividade da enzima fenilalanina amonialiase (GIEBEL, 1982); acúmulo de peroxidases (MOLINARI, 1991), polifenoloxidasas (MAZZAFERA et al., 1989), superóxido dismutase (GHEYSEN e FENOLL, 2002), inibidores de proteinases (GHEYSEN e FENOLL, 2002) e quitinases (QIU et al., 1997).

Desde 1960, técnicas histopatológicas são empregadas nos estudos da interação *Meloidogyne* ssp. e planta hospedeira, permitindo elucidar vários mecanismos envolvidos tanto nas reações suscetíveis quanto nas de resistência (DROPKIN e NELSON, 1960). Entretanto, estas técnicas têm algumas limitações, principalmente no que se refere a seleção da parte do tecido vegetal a ser examinado, sobretudo em casos em que o processo infeccioso é assintomático, demandando o emprego de grande número de amostras, de material e de tempo para o sucesso da análise.

O nematóide das galhas, *M. incognita*, é um patógeno que causa grande perda à cultura do cafeeiro no Brasil. Entretanto, populações desse nematóide presentes em Minas Gerais são incapazes de infectar cafeeiros (OLIVEIRA et al., 2002), e os mecanismos envolvidos nesta interação incompatível ainda são desconhecidos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a histopatologia de raízes de cafeeiro inoculadas com populações de *M. incognita* de Minas Gerais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Avaliação da eficiência da localização *in situ* de nematóides, previamente ao emprego das técnicas de histopatologia

Como as populações de *M. incognita* de Minas Gerais não causam sintomas no cafeeiro, avaliou-se a eficiência da localização *in situ* de nematóides, previamente ao emprego de técnicas de histopatologia. Para isso, mudas de tomateiro Santa Cruz 'Kada' e cafeeiro 'Catuaí Vermelho IAC 44' com dois pares de folhas definitivas foram inoculadas com 10.000 J₂ de uma população de *M. incognita* raça 2 de São Paulo. Após 15 dias da inoculação, amostras das raízes de parte das mudas foram submetidas à coloração com fucsina ácida para localização *in situ* do nematóide (BYRD et al., 1983). Raízes não submetidas ao referido tratamento foram utilizadas como testemunhas. Amostras destas raízes foram incluídas em parafina ou em resina para a obtenção de cortes histológicos.

Para inclusão em parafina, seções das raízes foram fixadas em formalina neutra tamponada, por 24 h, mantidas em frascos submetidos a vácuo. Depois de fixadas, as amostras foram desidratadas em série etílica-butílica (JOHANSEN, 1940). O corante eritrosina foi adicionado na primeira transferência para álcool etílico absoluto com o objetivo de se visualizar o material após a inclusão em parafina. Na última transferência para álcool butílico terciário puro foi adicionado igual volume de parafina fundida. Após

12 horas, este volume foi substituído por parafina pura e deixado em estufa a 68⁰C. Em seguida, as amostras foram emblocadas em formas apropriadas, com uma mistura de parafina (92%) e cera de abelha fundida (8%). Foram obtidos cortes transversais das raízes com 10 µm de espessura em micrótomo rotatório manual. Os cortes foram corados com uma solução de fucsina básica 1% em solução alcoólica (50%) por 30 minutos, e em seguida, em azul de astra em ácido tartárico 2% por 15 minutos (Kraus & Ardium, 1997). As lâminas foram montadas com solução de glicerina (50%) e observadas em microscópio de luz.

Para inclusão em resina, as seções de raízes foram fixadas em glutaraldeído 2,5% preparado em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por 12 horas . Após esse período, as amostras foram lavadas no mesmo tampão para retirar o excesso do fixativo. Em seguida, realizou-se a desidratação em série alcoólica etílica (30, 50, 70, 80, 95 e 100%). Em seguida, realizou-se a infiltração das amostras em resina Spurr:etanol. Após a infiltração, as raízes foram dispostas em moldes plásticos planos contendo resina pura e levadas para polimerização em estufa (65⁰C/12 horas). Foram obtidos cortes transversais das raízes, com espessura variando de 0,5 a 1,5 µm, em ultramicrótomo. Os cortes semifinos foram corados com azul de toluidina 0,05% em tampão acetato, pH 4,7 para observação ao microscópio de luz.

2.2. Histopatologia de raízes de cafeeiros inoculadas com *Meloidogyne incognita*

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento com temperatura regulada para 26⁰C. Foram utilizadas mudas de cafeeiros *Coffea arabica* ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ (suscetível) e *C. canephora* ‘Apoatã IAC 2258’ (resistente) com dois pares de folhas definitivas; duas populações de *M. incognita*, uma proveniente de quiabeiro de Minas Gerais e a outra de cafeeiro de São Paulo, ambas pertencentes à raça 2.

Sementes dos cafeeiros foram semeadas em bandejas contendo areia previamente tratada com brometo de metila (100 cm³/m³). Quando as plântulas atingiram o estágio de “palito de fósforo”, as mesmas foram transplantadas para tubetes de 100 mL de capacidade contendo areia esterilizada.

Quando as mudas apresentaram o segundo par de folhas definitivas foi realizada a inoculação com 10.000 J₂ de cada uma das populações de *M. incognita*. Após 48 h da inoculação, as mudas foram removidas dos tubetes e suas raízes lavadas com água destilada para eliminar J₂ que ainda não tinham penetrado, a fim de padronizar a idade de

infecção em dois dias. Em seguida, cada muda foi transplantada para copos plásticos com 500 mL de capacidade, com uma mistura de solo e areia (2:1) previamente esterilizada. Para a verificação da viabilidade do inóculo, mudas de tomateiro Santa Cruz 'Kada' foram inoculadas com 2.000 J₂ de cada população de *M. incognita*.

O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 populações de *M. incognita* x 2 espécies de cafeeiro x 11 épocas de avaliação), com 3 repetições. Três mudas de cafeeiro de cada tratamento foram colhidas a cada dois dias, do primeiro ao décimo dia, e a cada cinco dias, do décimo ao quadragésimo dia após a inoculação. As raízes dessas mudas foram submetidas à coloração com fucsina ácida (BYRD et al., 1983) para localização *in situ* do nematóide, previamente ao preparo das amostras para inclusão em resina e obtenção do laminário histológico, conforme descrito no item 2.1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Avaliação da eficiência da localização *in situ* de nematóides, previamente ao processamento para obtenção do laminário

Independente da técnica de histopatologia empregada, nenhuma diferença foi observada entre os tratamentos submetidos a coloração prévia com fucsina ácida e as testemunhas não tratadas. Tanto em tomateiro, quanto em cafeeiro, as células de alimentação induzidas por *M. incognita* apresentaram características típicas de uma interação compatível (Figuras 1 e 2), e tais características não sofreram alterações devido ao tratamento prévio com a fucsina ácida.

Comparando-se os cortes obtidos de amostras incluídas em parafina (Figura 1) com aqueles em resina (Figura 2) pode-se notar os mesmos detalhes estruturais, visíveis na resolução do microscópio de luz.

A coloração com fucsina básica e azul de astra realizada nos cortes inclusos em parafina gerou um bom contraste da parede celular com o conteúdo citoplasmático das células gigantes. A fucsina básica tem afinidade por paredes celulares lignificadas e suberificadas, material nuclear e proteínas. Esse corante corou de róseo o citoplasma e os vários núcleos nas células gigantes, e também o nematóide. Já o corante azul de astra, cuja afinidade é por parede celular celulósica, evidenciou o aumento da espessura das paredes das células gigantes (Figura 1).

Nos cortes semifinos de material incluso em resina, a coloração com azul de toluidina também permitiu contrastar a parede celular do conteúdo citoplasmático das células gigantes (Figura 2). Entretanto, a maior vantagem da utilização desse corante é sua afinidade por compostos fenólicos. Estes compostos estão envolvidos em respostas de defesa de plantas resistentes a nematóides (MAZZAFERA et al., 1989; ANTHONY et al., 2005). Assim, sua utilização é recomendada para estudos que visam elucidar os mecanismos envolvidos em interações incompatíveis entre nematóide e planta hospedeira. Além disso, a integridade apresentada pelos cortes semifinos após a coloração prévia com fucsina ácida indica uma possibilidade de aplicação dessa adaptação em estudos ultraestruturais.

O tratamento prévio com fucsina ácida não interferiu na qualidade dos cortes histopatológicos e seu emprego facilitou a localização dos sítios de infecção de *M. incognita* em raízes de tomateiro e de cafeeiro. Com isso, houve redução no tempo e na quantidade de material utilizado no preparo dos cortes. Além de auxiliar na localização dos sítios de infecção de *Meloidogyne* spp. em raízes assintomáticas, esta coloração prévia também pode ser indicada para a histopatologia de raízes parasitadas por nematóides migradores que são de difícil localização em cortes histológicos.

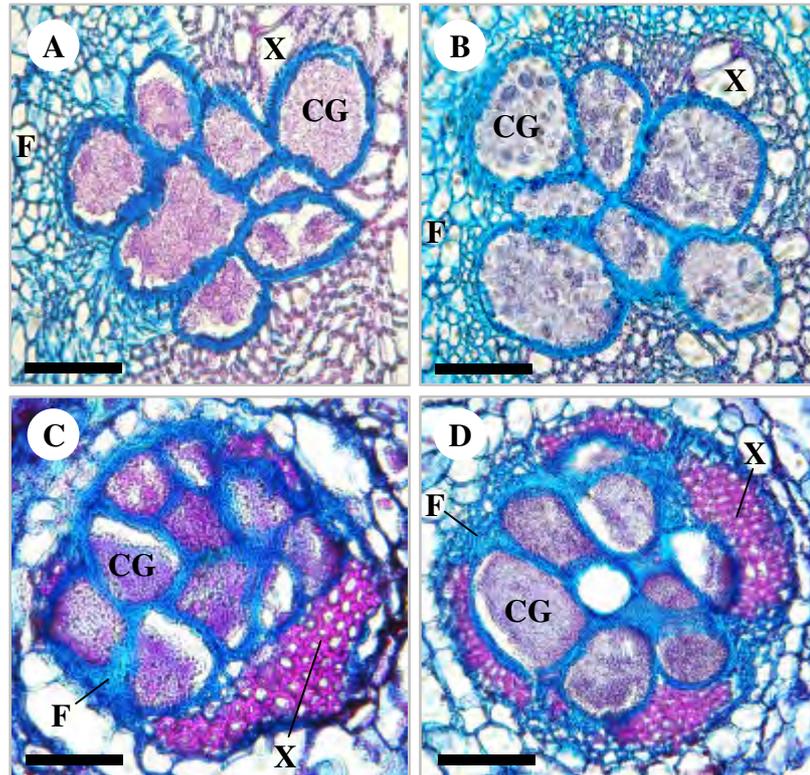


Figura 1. Cortes transversais de raízes de tomateiro e de cafeeiro parasitadas por *Meloidogyne incognita* após inclusão em parafina. A e B: células gigantes (CG) em raízes de tomateiro Santa Cruz 'Kada' com e sem tratamento prévio com fucsina ácida, respectivamente; C e D: células gigantes em raízes de cafeeiro 'Catuaí Vermelho IAC 44' com e sem tratamento prévio com fucsina ácida, respectivamente. X = Xilema, F = Floema. Barra = 100 μ m.

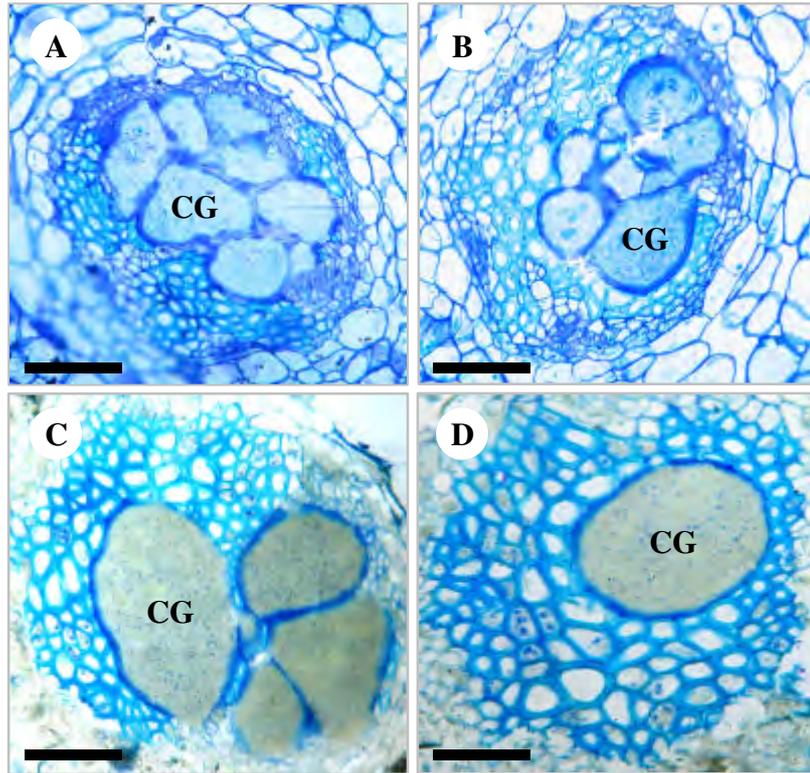


Figura 2. Cortes transversais de raízes de tomateiro e cafeeiro parasitadas por *Meloidogyne incognita* após inclusão em resina. A e B: células gigantes (CG) em raízes de tomateiro Santa Cruz 'Kada' com e sem tratamento prévio com fucsina ácida, respectivamente; C e D: células gigantes em raízes de cafeeiro 'Catuaí Vermelho IAC 44' com e sem tratamento prévio com fucsina ácida, respectivamente. Barra = 100 μm .

2.2. Histopatologia de raízes de cafeeiros inoculadas com *Meloidogyne incognita*

As populações de *M. incognita* de Minas Gerais e de São Paulo apresentaram fatores de reprodução de 18,6 e 21,3 em raízes de tomateiro, respectivamente, o que comprovou a viabilidade do inóculo utilizado. As coletas foram realizadas nas 11 épocas determinadas para os diferentes tratamentos, mas a partir da segunda coleta, quatro dias após a inoculação, poucos nematóides foram observados nos tratamentos em que foi inoculada a população de *M. incognita* de Minas Gerais, e naqueles com cafeeiro ‘Apoatã IAC 2258’, independente da população do nematóide utilizada. Já no sexto dia após a inoculação, mesmo com a coloração com fucsina ácida não foi possível detectar nematóides nestes tratamentos, o que limitou a análise histopatológica para estes tratamentos até o quarto dia após a inoculação.

Aos dois dias da inoculação, os J₂ das duas populações de *M. incognita* encontravam-se no córtex (Figura 3A), tanto na cultivar Catuaí, quanto na Apoatã. As células próximas aos nematóides não apresentaram ruptura da parede celular ou tecido necrótico, um indicativo que os J₂ migraram por entre as células. No quarto dia, os J₂ da população de São Paulo já tinham alcançado o cilindro vascular das raízes do cafeeiro ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ (Figura 3B), enquanto que nos outros tratamentos, os J₂ permaneceram no córtex. A partir do sexto dia, apenas as raízes do cafeeiro ‘Catuaí’ inoculadas com a população de São Paulo foram preparadas para análise histopatológica, pois nos demais tratamentos não foram visualizados nematóides, mesmo com o emprego da coloração com fucsina ácida. A partir desse dia, os primeiros indícios da indução de células de alimentação foram observados nas raízes do cafeeiro ‘Catuaí’ inoculadas com a população de *M. incognita* de São Paulo. Assim, algumas células do parênquima do floema próximas ao nematóide apresentaram aumento na densidade do conteúdo citoplasmático e a presença de 2 a 4 núcleos (Figura 3C). Já a partir do oitavo dia, as células gigantes apresentaram características típicas para uma interação compatível, ou seja, células multinucleadas, com parede espessa e invaginada, citoplasma denso com poucas inclusões (Figura 3D). Nessa avaliação foi observada a presença de alguns J₂ alargados (salsichas), um indicativo do início do processo parasítico. O número de células gigantes em cada sítio de alimentação variou de quatro a oito, o que propiciou o rápido desenvolvimento do nematóide. No décimo quinto dia foram observados os primeiros J₃ e J₄ e nenhum adulto foi observado até o vigésimo dia. No vigésimo quinto dia da inoculação foi possível visualizar fêmeas do nematóide no início da postura (Figura 3E). Do oitavo até o trigésimo

quinto dia, nenhuma diferença perceptível em microscopia de luz foi observada nas células gigantes. Contudo, aos 40 dias após a inoculação, algumas células gigantes apresentaram dissolução de sua parede (Figura 3F), indicando o início do processo de degeneração dos sítios de alimentação que foi acompanhado pelo final do ciclo de vida do nematóide.

Nos cortes histopatológicos realizados aos 2 e 4 dias da inoculação não foi observado nenhum indício de formação de células gigantes em raízes de ‘Apoatã’ e nem em ‘Catuaí’ inoculadas com a população de *M. incognita* de Minas Gerais (Figura 3A). O mesmo foi observado nas raízes de ‘Apoatã’ inoculadas com a população de São Paulo. Sem a formação de células gigantes, os J₂ destas populações não conseguiram se estabelecer, e conseqüentemente emigraram das raízes, o que explica o baixo número de indivíduos nas raízes, já a partir do quarto dia da inoculação. A emigração da forma infectiva de *M. incognita*, em resposta aos mecanismos de resistência da planta hospedeira, já foi verificada em raízes de algodoeiro (MCCLURE et al., 1974), de alfafa (REYNOLDS et al., 1970) e de soja resistentes (HERMAN et al., 1991).

Nas interações incompatíveis entre cafeeiro e *Meloidogyne* spp., o principal mecanismo de resistência pós-penetração é o desencadeamento da reação de hipersensibilidade. Segundo RODRIGUES et al. (2000) a resistência genética do cafeeiro ‘Catimor’ (*C. arabica* ‘Caturra’ x Híbrido do Timor) a *M. exigua* e *M. megadora* foi explicada pela ocorrência de necrose celular ao redor dos sítios de alimentação, o que impediu a nutrição do nematóide nessas células. Com isso, ocorreu uma paralisação no desenvolvimento dos nematóides ainda no segundo estágio de desenvolvimento. Este mesmo mecanismo de resistência também foi observado por ANTHONY et al. (2005) em raízes de cafeeiro ‘Iapar 59’, portador do gene de resistência *Mex-1*, após inoculação com *M. exigua*.

Entretanto, nenhum indício de reação de hipersensibilidade foi observado nas raízes de cafeeiros inoculadas com a população de *M. incognita* de Minas Gerais. Possivelmente outro mecanismo de resistência da planta foi o responsável pelo não estabelecimento e desenvolvimento dos J₂ deste nematóide. Além da reação de hipersensibilidade, a resistência de plantas aos nematóides das galhas também já foi associada à produção de fitoalexinas (VEECH, 1982), acúmulo de compostos fenólicos (SINGH e CHOUDHURY, 1973), atividade da enzima fenilalanina amonialiase (GIEBEL, 1982), acúmulo de peroxidases (MOLINARI, 1991), polifenoloxidasas (MAZZAFERA et al., 1989), superóxido dismutase (GHEYSEN e FENOLL, 2002), inibidores de proteinases (GHEYSEN e FENOLL, 2002) e quitinases (PUNJA e ZHANG, 1993).

ANZUETO et al. (2001) estudaram os mecanismos de resistência de acessos de *C. arabica* da Etiópia a *M. incognita*, e constataram que a resistência a esse nematóide também não estava associada à reação de hipersensibilidade, mas sim ao menor e anormal desenvolvimento das células de alimentação que impediram o desenvolvimento do nematóide. No presente estudo, não foi observada qualquer formação de células de alimentação, indicando assim que outro mecanismo impediu o estabelecimento dos juvenis no tecido do hospedeiro.

A indução de células gigantes e o completo desenvolvimento do nematóide somente foram verificados em mudas do cafeeiro ‘Catuaí’ inoculadas com a população de *M. incognita* de São Paulo. A indução de células gigantes por essa população no cilindro vascular provocou visível compressão dos elementos de vaso do xilema, resultando em completa desorganização do cilindro vascular (Figura 3B-G). A obliteração do cilindro vascular exerce importante interferência nos fluxos de água, de nutrientes e de fotoassimilados, o que explica o grande prejuízo causado por essa espécie de nematóide ao cafeeiro.

As populações de *M. incognita* de Minas Gerais e de São Paulo não diferiram quanto a capacidade de causar alterações histopatológicas em raízes do cafeeiro resistente ‘Apoatã’, ou seja, as duas populações foram incapazes de induzir a formação de células de alimentação. Entretanto, os mecanismos que impediram o estabelecimento dessas populações nesse cafeeiro parecem ser distintos, pois a penetração dos J₂ da população de São Paulo foi em média 92,7% maior do que a apresentada pelos J₂ da população de *M. incognita* de Minas Gerais.

Os mecanismos que conferiram incompatibilidade entre a população de *M. incognita* de Minas Gerais e o cafeeiro atuaram principalmente na fase de penetração da forma infectiva do nematóide, o que ocasionou uma baixa penetração e uma significativa emigração dos J₂ das raízes da planta. Além disso, a ação de mecanismos de resistência pós-penetração impediram que os J₂ dessa população induzissem a formação de células gigantes, o que preveniu o desenvolvimento do nematóide em cafeeiro.

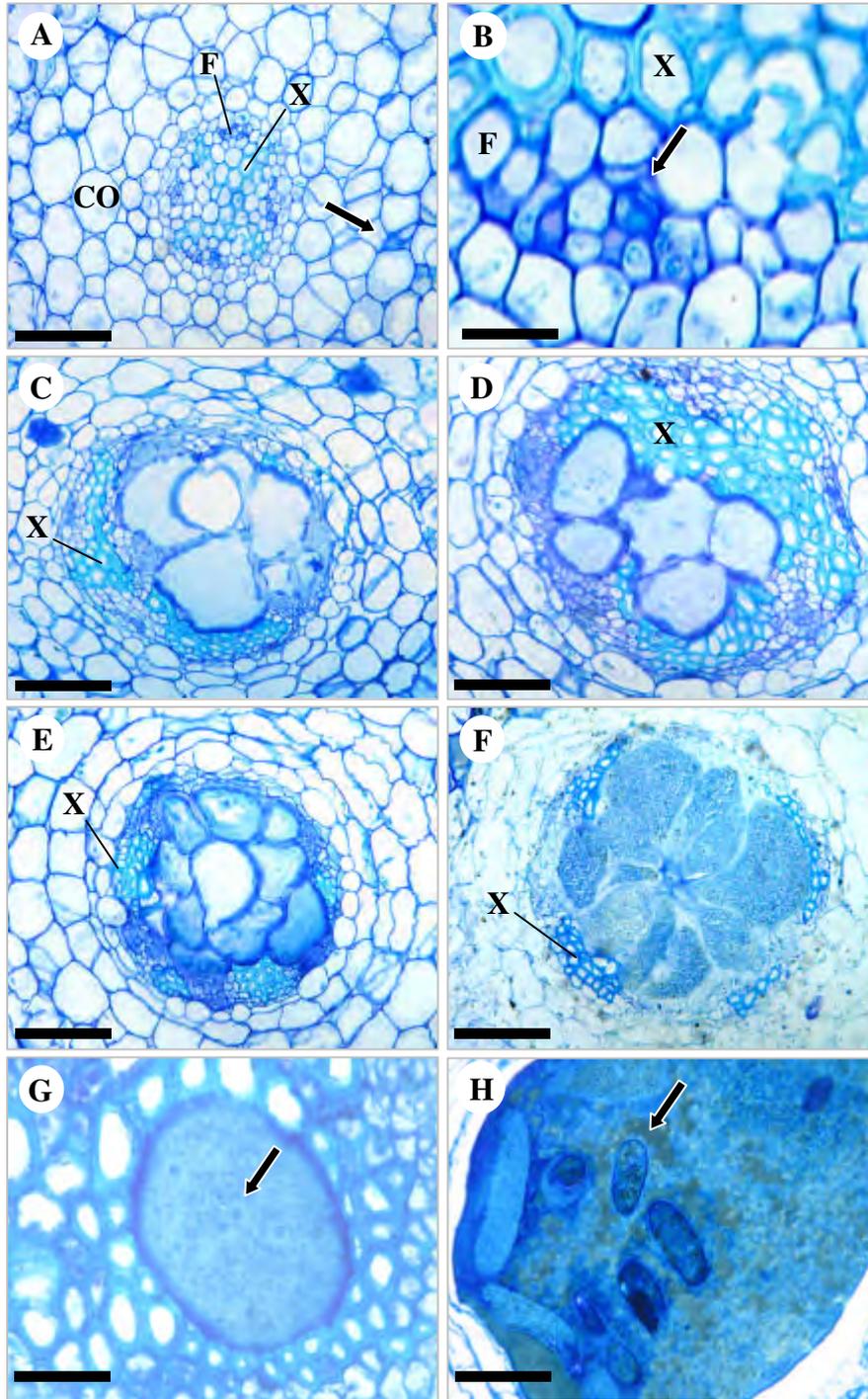


Figura 4. Cortes transversais de raízes de cafeeiro ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ parasitadas por populações de *Meloidogyne incognita* obtidos de amostras incluídas em resina. A: juvenil de segundo estágio (seta) da população de Minas Gerais no córtex, dois dias após a inoculação (DAI); B: primórdios de células gigantes induzidas por J₂ (seta) da população de São Paulo 6 DAI; (C), (D), (E) e (F): células gigantes induzidas pela população de São Paulo aos 8, 15, 20 e 40 DAI, respectivamente; (G): detalhe dos vários núcleos (seta) em uma célula gigante induzida pela população de São Paulo; (H) fêmea da população de São Paulo, após 25 dias da inoculação, no início da postura de ovos (seta). CO = Córtex, X = Xilema, F = Floema. Barras: A, C, D, E, F e H = 100 µm; B e G = 30 µm.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTHONY, F., TOPART, P., MARTINEZ, A., SILVA, M., NICOLE, M. Hypersensitive-like reaction conferred by the *Mex-1* resistance gene against *Meloidogyne exigua* in coffee. *Plant Pathology* 54:476, 2005.
- ANZUETO, F., BERTRAND, B., SARAH, J.L., ESKES, A.B., DECASY, B. Resistance to *Meloidogyne incognita* in Ethiopian *Coffea arabica* accessions. *Euphytica* 118:1, 2001.
- BYRD, J.D.W., KIRKPATRICK, J., BARKER, K.R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15:142, 1983.
- DROPKIN, V.H., NELSON, P.E. The histopathology of root-knot nematode infections in soybeans. *Phytopathology* 50:442, 1960.
- DROPKIN, V.H. The necrotic reaction of tomatoes and other host resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. *Phytopathology* 59:1632, 1969.
- GHEYSEN, G., FENOLL, C. Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology* 40:191, 2002.
- GIEBEL, J. Mechanism of resistance to plant nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 20:257, 1982.
- HERMAN, M., HUSSEY, R.S., BOERMA, H.R. Penetration and development of *Meloidogyne incognita* on roots of resistant soybean genotypes. *Journal of Nematology* 23:155, 1991.
- JOHANSEN, D. A. *Plant Microtechnique*. New York: Mc Graw-Hill Book Co. Inc. 1940. 523p.
- KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro: EDUR. 1997. 198p.
- MCCLURE, M.A., ELLIS, K.C., NIGH, E.L. Post-infectious development and histopathology of *Meloidogyne incognita* in resistant cotton. *Journal of Nematology* 6:21, 1974.
- MAZZAFERA, P., GONÇALVES, W., FERNANDES, J.A.R. Fenóis, peroxidase e polifenoxidase na resistência do cafeeiro a *Meloidogyne incognita*. *Bragantia* 48:131, 1989.
- MOLINARI, S. Induction of isoperoxidases in resistant and susceptible tomato cultivars by *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 23:254, 1991.
- NEGRÓN, J.A., ACOSTA, N. Studies on host-parasite relationships of *Meloidogyne incognita* and *Coffea arabica* cv. Borbon. *Nematopica* 17:71, 1987.
- O'BRIEN, T.P., FEDER, N., MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59:368, 1964.

OLIVEIRA, D.S., OLIVEIRA, R.D.L., SILVA, R.V., PEREIRA, A.A. Ausência de genes de virulência em raças de *Meloidogyne incognita* ao cafeeiro. Fitopatologia Brasileira 27:193, 2002.

OLIVEIRA, D.S., OLIVEIRA, R.D.L., SILVA, D.G., SOARES, J.M., RODRIGUES, F.Á. Coloração *in situ* de nematóides como auxílio nas técnicas de histopatologia. Congresso Brasileiro de Nematologia 26:58, 2006.

PUNJA, Z.K., ZHANG, Y.Y. Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. Journal of Nematology 25:526, 1993.

QIU, J., HALLMANN, J., KOKALIS-BURELLE, N., WEAVER, D.B., RODRIGUEZ-KÁBANA, R., TUZUN, S. Activity and differential induction of chitinase isozymes in soybean cultivars resistant or susceptible to root-knot nematodes. Journal of Nematology 29:523, 1997.

REDDIGARI, S.R., SUNDERMANN, C.A., HUSSEY, R.S. Isolation of subcellular from second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology 17:482, 1985.

REYNOLDS, H.W., CARTER, W.W., O'BANNON, J.H. Symptom less resistance of alfafa to *Meloidogyne incognita acrita*. Journal of Nematology 2:131, 1970.

RODRIGUES, A.C.F.O., ABRANTES, I.M.O., MELILLO, M.T., BLEVEZACHEO, T. Ultrastructural response of coffee roots to root-knot nematodes, *Meloidogyne exigua* and *M. megadora*. Nematropica 30:201, 2000.

SINGH, B., CHOUDHURY, B. The chemical characteristics of tomato cultivars resistant to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Nematologica 19:443, 1973.

VEECH, J.A. Phytoalexins and their role in the resistance of plants to nematodes. Journal of Nematology 14:2, 1982.

WILLIAMSON, V.M. Plant nematode resistance genes. Current Opinion in Plant Biology 2:327, 1999.

WILLIAMSON, V.M., GLEASON, C. Plant nematode interactions. Current Opinion in Plant Biology 6:1, 2003.

WILLIAMSON, V.M., HUSSEY, R.S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. Plant Cell 8:1735, 1996.

WYSS, U., GRUNDLER, F.M.W., MUNCH, A. The parasitic behavior of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. Nematologica 38:89, 1992.

CAPÍTULO 6

PERDA DE PATOGENICIDADE DE *Meloidogyne incognita* AO CAFEIEIRO

RESUMO

No Brasil, *Meloidogyne incognita* é considerada a espécie de fitonematóide mais agressiva ao cafeeiro. Entretanto, populações desse nematóide presentes em Minas Gerais são incapazes de infectar cafeeiros suscetíveis. Uma das possíveis explicações para esse fato é que essas populações de *M. incognita* de Minas Gerais tenham perdido a patogenicidade ao cafeeiro na ausência dessa planta hospedeira. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo verificar se populações de *M. incognita* oriundas de cafeeiro perdem a patogenicidade a esta cultura quando multiplicadas em outra planta hospedeira. Assim, duas populações de *M. incognita* (raças 1 e 2) patogênicas ao cafeeiro foram multiplicadas sucessivamente em tomateiro Santa Cruz 'Kada'. A cada três meses, por um período de 30 meses, essas populações foram comparadas com populações mantidas em cafeeiro quanto a capacidade de reprodução em mudas de 'Catuaí Vermelho IAC 44'. Após 450 dias em tomateiro, aproximadamente 15 gerações do nematóide, a população de *M. incognita* da raça 1 apresentou uma redução significativa na capacidade reprodutiva em cafeeiro 'Catuaí'. Já para a população da raça 2, foram necessários aproximadamente 540 dias para ocorrer uma redução significativa na reprodução em cafeeiro. A capacidade reprodutiva das populações de *M. incognita* em cafeeiro foi reduzida em aproximadamente 95% após 30 meses de multiplicação em tomateiro. Indivíduos patogênicos ao cafeeiro continuaram presentes, mesmo que em baixa proporção, até a última avaliação. Provavelmente após mais gerações em tomateiro ou em outra planta hospedeira estas populações perderiam totalmente a capacidade de parasitar o cafeeiro, o que poderia explicar a inabilidade das populações de *M. incognita* de Minas Gerais em infectar cafeeiro.

Palavras-chave: adaptabilidade, *Coffea arabica*, nematóide das galhas, seleção.

1. INTRODUÇÃO

A reprodução de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood ocorre por partenogênese mitótica obrigatória, o que teoricamente deveria manter forte estabilidade genética. Mesmo assim, variabilidade genética é observada dentro dessa espécie, que é refletida na habilidade de reprodução em espécies vegetais distintas (TRANTAPHYLLOU, 1987).

Estudos com populações de *M. incognita* sempre revelaram informações contraditórias com plantas mostrando-se ora suscetíveis, ora resistentes. Para esclarecer essas e outras dúvidas referentes a essa espécie e outras do gênero *Meloidogyne*, foi criado o “*International Meloidogyne Project*” na década de 70. Várias populações de *M. incognita* foram coletadas em diferentes países, e determinou-se uma gama de hospedeiros diferenciadores para essa espécie. Assim, populações de *M. incognita* foram agrupadas em quatro raças fisiológicas de acordo com a capacidade de reprodução em fumo (*Nicotiana tabacum* L. ‘NC 95’) e algodão (*Gossypium hirsutum* L. ‘Deltapine 16’) (HARTMANN e SASSER, 1985). Contudo, estas raças não revelaram toda a variação fisiológica dessa espécie.

Estudos sobre variabilidade em *M. incognita* foram intensificados após a constatação da capacidade de populações desse nematóide suplantarem a resistência conferida pelo gene dominante *Mi* em tomateiro (ROBERTS, 1995).

De acordo com a resposta de tomateiros resistentes, as populações de *M. incognita* podem ser divididas em três grupos: (i) populações avirulentas que são incapazes de se reproduzir em tomateiros com gene *Mi*, mesmo quando submetidas a uma pressão de seleção por esse gene (CASTAGNONE-SERENO et al., 1994), (ii) populações avirulentas que ao serem submetidas à pressão pelo gene *Mi*, tornam-se virulentas (SEMBLAT et al., 2000) e (iii) populações designadas “naturalmente virulentas”, que são capazes de se reproduzir em tomateiro com o gene *Mi*, em proporções equivalentes ao conseguido em cultivares suscetíveis (ROBERTS, 1995). Essas populações são encontradas em campos que aparentemente nunca se cultivou material portador do gene *Mi*, pelo menos em épocas recentes, embora ao longo do processo evolutivo tal convívio não possa ser descartado. Vale salientar que nenhuma relação é observada entre esses três grupos com as raças propostas no “*International Meloidogyne Project*”. TRIANTAPHYLLOU (1987) sugeriu

que mutações em indivíduos de *M. incognita* estejam envolvidas na mudança de fenótipo de avirulência para o de virulência a tomateiro com gene *Mi*.

Populações de *M. incognita* não-patogênicas ao cafeeiro foram relatadas em Minas Gerais. OLIVEIRA et al. (2002) avaliaram a penetração e reprodução das quatro raças de *M. incognita* provenientes de outras culturas que não o cafeeiro, nas cultivares ‘Catuaí’ e ‘Mundo Novo’. Apesar de ter ocorrido penetração de juvenis de segundo estágio nas raízes dos cafeeiros, nenhuma reprodução foi observada. Uma das explicações dada pelos autores é que essas populações de *M. incognita* podem ter perdido a patogenicidade ao cafeeiro por terem sido coletadas em outras culturas que não o cafeeiro, e por terem sido multiplicadas por sucessivas gerações em tomateiro.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo verificar se populações de *M. incognita* oriundas de cafeeiro podem perder a patogenicidade a esta cultura, quando multiplicadas por sucessivas gerações em tomateiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizadas mudas de tomateiro Santa Cruz ‘Kada’, mudas de cafeeiro ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ e duas populações de *M. incognita* (raças 1 e 2) provenientes de cafeeiros de São Paulo.

Parte do inóculo de cada população de *M. incognita* foi multiplicado em mudas de cafeeiro, doravante chamadas de “populações de cafeeiro” e a outra parte em mudas de tomateiro, denominadas de “populações de tomateiro”. A cada 90 dias, por um período de 30 meses, a capacidade reprodutiva das “populações de tomateiro” em cafeeiro foi comparada com a das “populações de cafeeiro”.

Para isso, sementes do cafeeiro foram semeadas em bandejas contendo areia previamente tratada com brometo de metila ($100 \text{ cm}^3/\text{m}^3$). Quando as plântulas atingiram o estágio de “palito de fósforo” foram transplantadas para vasos de argila de 2 L de capacidade, contendo uma mistura de solo e areia (2:1), igualmente tratada.

Quando as mudas apresentaram o segundo par de folhas definitivas foi realizada a inoculação com 10.000 ovos por muda. O inóculo foi colocado em dois orifícios feitos ao lado de cada muda. O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4 populações de *M. incognita* x 10 épocas de avaliação), com 10 repetições. Após 120 dias da inoculação foi avaliada a reprodução das populações pelo

número de ovos por sistema radicular. Esses dados foram transformados em \sqrt{x} , e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A capacidade reprodutiva das populações de *M. incognita* em mudas de cafeeiro diminuiu significativamente após sucessivas gerações em tomateiro (Tabela 1). Interação significativa ($P < 0,05$) foi observada entre população de *M. incognita* e época de avaliação. Até a quarta avaliação (12 meses), nenhuma diferença foi observada entre as “populações de tomateiro” e as “populações de cafeeiro”, quanto à capacidade de produção de ovos em mudas de cafeeiro ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ (Tabela 1).

A partir dos 450 dias de multiplicação em tomateiro foi observada uma redução significativa ($P < 0,05$) na produção de ovos pela “população de tomateiro” da raça 1 em cafeeiro. A redução foi de aproximadamente 81%, quando comparada com a reprodução da população da mesma raça mantida em cafeeiro. A partir dos 630 dias, a reprodução desta população da raça 1 multiplicada em tomateiro manteve-se constante ao longo das avaliações, mas com redução média de 95% em relação aquela da mesma raça mantida em cafeeiro. Na “população de tomateiro”, raça 2, somente foi observada redução na produção de ovos em cafeeiro a partir dos 540 dias. E a partir desta avaliação, não houve mais diferença ($P > 0,05$) entre as raças da “população de tomateiro” (Tabela 1). Nenhuma diferença significativa ($P > 0,05$) foi observada na reprodução das “populações de cafeeiro” ao longo das avaliações, independente da raça fisiológica, o que evidencia a adaptabilidade dessas populações de *M. incognita* ao cafeeiro.

Perda de patogenicidade ou virulência já foram verificadas em populações de *M. incognita* a diferentes hospedeiros. ROBERTS et al. (1995) multiplicaram populações de *M. incognita* virulentas a feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] com o gene de resistência *Rk* por 20 gerações em tomateiro. Após esse período verificaram uma diminuição de 82% na capacidade reprodutiva dessas populações em caupi portador do gene *Rk*.

Populações de *M. incognita* raça 2 e *M. paranaensis* oriundas de cafeeiro foram multiplicadas durante dois anos em tomateiro. Após esse período, essas populações foram inoculadas em mudas de cafeeiro e foi observada uma redução significativa na reprodução dessas espécies de nematóides das galhas nesse hospedeiro (CARNEIRO e JORGE, 2001).

Segundo os autores, essas populações de nematóides são polimórficas nos locus de virulência, de maneira que reinoculações sucessivas em tomateiro selecionaram, ao longo do tempo, indivíduos patogênicos a essa planta, restando poucos indivíduos patogênicos ao cafeeiro. Para *M. incognita*, a pressão de seleção exercida pelo tomateiro foi mais acentuada do que para *M. paranaensis*. Como observado no presente estudo e no desenvolvido por CARNEIRO e JORGE (2001), indivíduos da espécie *M. incognita*, inicialmente patogênicos ao cafeeiro, reduziram sua capacidade reprodutiva nesta planta após sucessivas gerações em tomateiro, isto é, na ausência de pressão de seleção exercida pelo cafeeiro. Isto sugere que a manutenção da patogenicidade a cafeeiro tenha um custo na adaptabilidade, com conseqüente eliminação de indivíduos patogênicos ao cafeeiro quando estas populações são multiplicadas em tomateiro.

A adaptabilidade de um determinado organismo é determinada pelo número de descendentes gerados, e a probabilidade desses descendentes sobreviverem até a idade reprodutiva (CASWELL e ROBERTS, 1987). Seleção para virulência em populações de *M. incognita* pode acarretar prejuízos na adaptabilidade desse nematóide a tomateiro suscetível (sem gene *Mi*) e a outras espécies vegetais. CASTAGNON-SERENO et al. (1992) verificaram que populações de *M. incognita* virulentas ao tomateiro com gene *Mi*, selecionadas em condições controladas, tiveram sua capacidade de reprodução diminuída em pimentão (*Capsicum annuum*) e tomateiro sem o gene *Mi*. Os mesmos autores especularam que tal mudança poderia ser o resultado de uma possível perda de cromossomo(s), fato conhecido em patógenos que tiveram sua gama de hospedeiros diminuída.

No presente estudo foram necessárias aproximadamente 15-18 gerações em tomateiro para que populações de *M. incognita* reduzissem significativamente a patogenicidade ao cafeeiro. Indivíduos patogênicos ao cafeeiro continuaram presentes, mesmo que em baixa proporção, até a última avaliação. Provavelmente após mais gerações em tomateiro ou em outra planta hospedeira estas populações perderiam totalmente a capacidade de parasitar o cafeeiro, o que poderia explicar a inabilidade das populações de *M. incognita* de Minas Gerais em infectar o cafeeiro.

Esses resultados também são de extrema importância para os programas de melhoramento que visam a seleção de cafeeiros resistentes a *Meloidogyne* spp. já que na maioria dos casos, a avaliação dos genótipos de cafeeiro é feita com inóculo proveniente de tomateiro, o que poderia comprometer a eficiência de possíveis materiais resistentes quando lançados em condição de campo. Assim, o ideal seria a utilização de inóculo

proveniente do próprio cafeeiro, ou então a partir de populações mantidas por poucas gerações em tomateiro. Além disso, torna-se necessário o emprego de cafeeiros suscetíveis como testemunhas durante a seleção dos materiais resistentes para comprovar a viabilidade do inóculo.

Tabela 1. Valores médios do número de ovos de *Meloidogyne incognita* multiplicadas sucessivamente em cafeeiro ou tomateiro, presentes no sistema radicular de cafeeiro ‘Catuaí Vermelho IAC 44’

População de <i>Meloidogyne incognita</i>	Tempo de multiplicação (dias)									
	90 ¹	180	270	360	450	540	630	720	810	900
Multiplicada em cafeeiro										
raça 1	114.400 Aa	81.680 Aa	66.620 Aa	83.400 Aa	126.400 Aa	78.120 Aa	103.180 Aa	97.260 Aa	81.360 Aa	105.940 Aa
raça 2	91.200 Aa	108.960 Aa	51.680 Aa	58.480 Aa	114.400 Aa	94.900 Aa	87.200 Aa	105.300 Aa	74.890 Aa	76.250 Aa
Multiplicada em tomateiro										
raça 1	82.530 Aa	72.600 Aa	74.320 Aa	53.450 Aa	23.450 Ab	16.380 Bb	3.920 Cb	5.540 Cb	2.720 Cb	7.120 Cb
raça 2	137.500 Aa	98.530 Aa	65.430 Aa	71.620 Aa	61.740 Aa	24.460 Bb	4.207 Cb	3.800 Cb	6.900 Cb	8.960 Cb

¹Média de dez repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, e minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV = 80,83%.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONETI, J.I.S., FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira 6:553, 1981.

CARNEIRO, R.M.D.G., JORGE, C.L. Seletividade fisiológica de populações de *Meloidogyne incognita* e *M. paranaensis* quando multiplicadas durante sucessivas gerações em tomateiro e cafeeiros. Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil 2:1207, 2001.

CASTAGNONE-SERENO, P., WAJNBERG, E., BONGIOVANNI, M., LEROY, F., DALMASSO, A. Reproduction of virulent isolates of *Meloidogyne incognita* on susceptible and *Mi*-resistant tomato. Journal of Nematology 26:324, 1994.

CASWELL, E.P., ROBERTS, P.A. Nematode population genetics. In: Veech, J.A. & Dickson, D. (Eds). Vistas on Nematology. Hyattsville MD, USA, Soc. Nematologists. 1987. pp. 390-397.

HARTMAN, K.M., SASSER, J.N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: Barker, K.R., Carter, C.C., Sasser, J.N. (Eds.). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. North Carolina: North Carolina State University, v.2, 1985. pp. 69-77.

OLIVEIRA, D.S., LIMA, R.D., SILVA, R.V., PEREIRA, A.A. Ausência de genes de virulência em raças de *Meloidogyne incognita* ao cafeeiro. Fitopatologia Brasileira 27:193, 2002.

ROBERTS, P.A. Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance. Annual Review of Phytopathology 33:199, 1995.

SEMLAT, J.P., BONGIOVANNI, M., WAJNBERG, E., DALMASSO, A., ABAD, P., CASTAGNONE-SERENO. Virulence and molecular diversity of parthenogenetic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. Heredity 84:81, 2000.

TRANTAPHYLLOU, A.C. Genetics of nematode parasitism on plants. In: Veech, J.A. & Dickson, D. (Eds). Vistas on Nematology. Hyattsville MD, USA, Soc. Nematologists. 1987. pp. 354-363.

CONCLUSÕES GERAIS

- 1) A análise conjunta das configurações perineais, do teste de hospedeiros diferenciadores, dos perfis isoenzimáticos e de amplificação pelo primer SCAR-café confirmou que as populações de nematóides das galhas de Minas Gerais e de São Paulo estudadas pertencem à espécie *M. incognita*. Assim, a diferença observada na patogenicidade a cafeeiro entre as populações dos dois Estados não pode ser explicada pela identificação imprecisa do nematóide;
- 2) As quatro raças de *M. incognita* de Minas Gerais foram incapazes de infectar cafeeiros, independente da temperatura, da concentração de inóculo, do estágio de desenvolvimento e do genótipo de cafeeiro utilizado, confirmando a natureza não patogênica dessas populações a essa planta;
- 3) Nenhuma atividade supressiva à *M. incognita* foi observada nos solos de cafezais de Minas Gerais;
- 4) Os mecanismos que conferiram incompatibilidade entre as populações de *M. incognita* de Minas Gerais e o cafeeiro atuaram principalmente na fase de penetração da forma infectiva do nematóide, o que ocasionou uma baixa penetração e uma significativa emigração dos juvenis de segundo estágio das raízes do cafeeiro. Além disso, a ação de mecanismos de resistência pós-penetração impediu que os J₂ dessas populações induzissem a formação de células gigantes, o que preveniu o desenvolvimento do nematóide em cafeeiro;
- 5) Populações de *M. incognita* patogênicas ao cafeeiro tiveram sua capacidade reprodutiva diminuída significativamente a esse hospedeiro após 15 a 18 gerações em tomateiro;
- 6) Populações de *M. incognita* de Minas Gerais pertencem a um biótipo diferente daquele encontrado em outras áreas produtoras de café no Brasil.