



**SELEÇÃO DE ACESSOS SILVESTRES DE *Coffea arabica* COM RESISTÊNCIA MÚTIPLA A
Meloidogyne spp.**

Giulia Stefania **Aloise**¹; Bárbara Joana dos Reis **Fatobene**²; Oliveira **Guerreiro Filho**³

Nº 14111

RESUMO - A resistência de acessos silvestres de *C. arabica* a diferentes espécies de *Meloidogyne* spp. tem sido relatada por diversos autores. Esses acessos representam importante fonte de variabilidade no melhoramento da espécie, dada à maior facilidade de hibridação com as cultivares comerciais e a consequente transferência de genes de resistência, assim como, à recuperação mais rápida de caracteres agrônômicos desejáveis do parental recorrente. Entretanto, poucos acessos foram investigados em relação à resistência às diversas variações interespecíficas encontradas nas populações de *Meloidogyne* spp. parasitas de cafeeiros, sendo isto, de extrema importância visto a especificidade dos genes de resistência encontrada em *Coffea* e a frequente ocorrência de populações poliespecíficas nas regiões cafeeiras. O uso de cafeeiros arábicos com resistência múltipla às espécies de *Meloidogyne* spp. em conjunto com outras técnicas de manejo de fitonematoides constituirá maneira de aprimorar o sistema de implantação da cafeicultura em áreas infestadas por esses parasitas, por tratar-se de tecnologia adequada, eficiente, com boa relação custo-benefício e não poluente. Assim, com base em informações prévias obtidas a partir de seleção de grande número de acessos de cafeeiros oriundos da Etiópia em relação à resistência a *M. paranaensis*, cinco dos mais resistentes acessos foram avaliados em relação à sua reação quando inoculados também com populações de *M. exigua* e *M. incognita* presentes em importantes regiões cafeeiras brasileiras. Os acessos IAC 2036-3B, IAC 2139-4A e IAC 2279-5B apresentam resistência múltipla às três espécies de *Meloidogyne* parasitas dos cafeeiros.

Palavras-chaves: Cultivares resistentes, nematoides, cafeeiros.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, PUCC, Campinas-SP; giulia.aloise@hotmail.com

2 Colaborador, Bolsista de Doutorado Fapesp: Pós-Graduação IAC em Agricultura Tropical e Subtropical, Campinas-SP.

3 Orientador: Pesquisador do Instituto Agrônomo, Centro de Café 'Alcides Carvalho', Campinas-SP; oliveiro@iac.sp.gov.br



ABSTRACT- *Resistance of wild C. arabica accessions to Meloidogyne spp. has been reported by several authors. These plants represent an important source of variability for resistance to root-knot nematodes, given the facility of cross with commercial cultivars, as well as, the faster recovery of agronomic characters of the recurrent parent. However, few accessions were investigated about resistance to different interspecific variations found in populations of Meloidogyne spp. parasites of coffee. This is of extreme importance, since the specificity of the resistance genes found in Coffea and the frequent occurrence of polyspecific populations in the coffee plantations. The use of C. arabica cultivars with multiple resistance to Meloidogyne species, associated to other management techniques may help to improve the implantation of coffee production system in infected areas, because it is proper, efficient, not expensive e environmentally safe. Based on previous information from screening of numerous accessions of Ethiopian coffee trees in relation to its resistance to M. paranaensis, five of the most resistant accessions have been evaluated for their reaction to M. exigua and M. incognita. IAC 2036-3B, IAC 2139-4A and IAC 2279-5B accesses exhibit multiple resistance to three species of Meloidogyne parasites of coffee tree.*

Key-words: resistant cultivars, nematodes, coffee trees.

1 INTRODUÇÃO

Os nematoides formadores de galhas, pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, constituem um dos principais problemas fitossanitários que acometem a cafeicultura, uma vez que seu parasitismo resulta em aumento do custo de produção e diminuição de sua competitividade econômica. O cafeeiro é uma planta perene, característica que facilita o desenvolvimento e o aumento da população de nematoides no solo e dificulta o controle do parasita.

Das dezessete espécies desse gênero relatadas como parasitas de cafeeiros em diversas partes do mundo, seis ocorrem no Brasil (Carneiro & Cofcewicz, 2008), sendo que três delas se destacam como as mais frequentes em nossos cafezais: *M. exigua*, que produz considerável quantidade de galhas, *M. incognita* e *M. paranaensis*, espécies mais agressivas que destroem quase todo sistema radicular (Gonçalves et al., 1995).

Os nematoides do gênero *Meloidogyne* são endoparasitos, ou seja, alojam-se no interior do tecido radicular estabelecendo íntima relação com a planta hospedeira. Os juvenis de segundo estágio penetram pelas extremidades das raízes, migram até o cilindro vascular onde iniciam a



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

alimentação estimulando a formação das células nutridoras. Este processo é desencadeado por secreções da glândula esofagiana dos juvenis que induzem reprogramação do desenvolvimento das células radiculares com alteração na expressão gênica do hospedeiro. Assim, os mRNAs da planta hospedeira passam a produzir proteínas que promovem alterações morfológicas e fisiológicas em células da região meristemática. As células são induzidas a sucessivas divisões mitóticas sem a concomitante citocinese, resultando em estruturas hipertrofiadas e multinucleadas, com alta atividade metabólica e secretora, os chamados sítios de alimentação que desviam fotoassimilados para a nutrição dos nematoides durante todo seu ciclo de vida (Berg et al. 2009).

O controle destes parasitas é uma operação difícil, já que a erradicação de uma área contaminada é praticamente impossível (Gonçalves et al., 2004). Entre as estratégias – genética, cultural, biológica e química – disponíveis para o controle dos nematoides no solo a resistência de plantas é considerada a tecnologia mais adequada (Bertrand & Anthony, 2008). Entretanto, a detecção de fontes de resistência requer estudos acurados devido à variabilidade intra e interespecífica encontrada nas populações de nematoides (Starr et al., 2002), incluindo aquelas parasitas do cafeeiro (Randig et al., 2002; Carneiro et al., 2004), e também quanto à especificidade de ação dos genes de resistência às diferentes raças dos parasitos (Block et al., 1979).

Fontes de resistência a *Meloidogyne* estão presentes especialmente nas espécies diploides de *Coffea*. Entretanto, diversos trabalhos têm relatado a resistência de acessos silvestres de *C. arabica* a espécies de *Meloidogyne* (Anzueto et al., 2001; Boisseau, 2009). Estes acessos representam importantes fontes de variabilidade para a resistência a nematoides, dada à maior facilidade de hibridação com as cultivares comerciais de *C. arabica* e à transferência dos genes de resistência, assim como, na recuperação mais rápida dos caracteres agronômicos do parental recorrente, contribuindo para abreviação do tempo e economia de recursos investidos no melhoramento tradicional da espécie.

Apesar de diversos trabalhos terem sido realizados no sentido de selecionar fontes de resistência aos nematoides das galhas, poucos foram os que avaliaram a reação de uma mesma fonte de resistência às diversas variações intra e interespecíficas encontradas nas populações de *Meloidogyne* spp. parasitas de cafeeiros, sendo isto de extrema importância visto a especificidade dos genes de resistência encontrada em *Coffea* (Carneiro et al., 2009).

O uso de cafeeiros arábicos com resistência múltipla às espécies e raças de *Meloidogyne*, em conjunto com outras técnicas de manejo de fitonematoides constituirá maneira de aprimorar o sistema de implantação da cafeicultura em áreas infestadas por esses parasitas, por tratar-se de uma tecnologia adequada, não poluente, eficiente e com boa relação custo/benefício.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

O objetivo deste trabalho foi identificar acessos silvestres de *C. arabica* com resistência múltipla a *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*, para serem utilizados em hibridações com cultivares comerciais de *C. arabica* visando ao desenvolvimento de de novas cultivares da espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para realização da pesquisa foram selecionados cinco acessos silvestres de *C. arabica* oriundos da Etiópia e presentes no BAG de *Coffea* do IAC (IAC 2036-3B, IAC 2041-5A, IAC 2052-1C, IAC 2139-4A e IAC 2279-5B) previamente selecionados quanto a resistência a *M. paranaensis* por Fatobene et al. (2012). Progênies de polinização aberta foram utilizadas para avaliação da reação destes acessos a *M. paranaensis*, *M. incognita* e *M. exigua*. A cultivar Mundo Novo IAC 515-20 de *C. arabica* foi utilizada como testemunha suscetível.

As sementes dos acessos foram germinadas em germinador de areia, sendo as plântulas, no estágio cotiledonar, transplantadas para vasos plásticos de 300 ml contendo mistura de Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico Típico e areia 1:1 (v:v), esterilizada em autoclave e posteriormente fertilizada de acordo com recomendações técnicas para a formação de mudas.

As populações de *M. paranaensis*, *M. exigua* raça 2 e *M. incognita* raça 3 mantidas no Centro de Café Alcides Carvalho foram caracterizadas para confirmação da espécie e pureza das amostras. Para isto realizou-se a identificação morfológica dos indivíduos a partir dos padrões da região perineal de fêmeas, a identificação bioquímica dos fenótipos de esterase e também, o teste de hospedeiros diferenciadores para caracterização de raças fisiológicas. Assim, populações puras das três espécies de *Meloidogyne* foram multiplicadas em tomateiros e cafeeiros suscetíveis. O inóculo foi obtido a partir de raízes de tomateiros altamente infestados utilizando-se o método de extração de Hussey & Baker (1973) modificado por Bonetti & Ferraz (1987). As plantas foram inoculadas com 5000 ovos e/ou juvenis de segundo estágio (J2).

A avaliação dos experimentos foi realizada 120 dias após a inoculação. A população final (Pf) dos nematoides nas raízes dos cafeeiros foi quantificada a partir do número de ovos e J2 presentes em cada amostra, segundo o método de obtenção do inóculo. O fator de reprodução (FR) foi estimado através da razão entre a população final e a população inicial ($FR = Pf/Pi$), sendo as plantas classificadas como resistentes ($FR < 1$) ou suscetíveis ($FR \geq 1$) (Oostenbrink, 1966). A partir do FR foi avaliado também o comportamento dos cafeeiros de acordo com os critérios estabelecidos por Moura (1997) para classificação de hospedeiros, baseados na redução do fator de reprodução em relação à testemunha suscetível (RFR). Os cafeeiros foram classificados conforme sistema adaptado de Moura (1997), segundo o qual a planta pode ser considerada imune



(RFR=100%), altamente resistente (RFR= 99,9 a 95,1%), resistente (RFR= 95,0 a 90,1 %), moderadamente resistente (RFR= 90 a 75,1 %) e suscetível (RFR= 75,0 a 0%). O número de ovos por grama de raiz fresca (NO.g^{-1}) foi calculado de modo a permitir uma quantificação proporcional do número de nematoides por tratamento, visto que, as plantas podem apresentar diferenças de massa do sistema radicular.

Foram realizados três experimentos, sendo um para cada espécie de *Meloidogyne*. Os tratamentos foram avaliados em 10 repetições e parcelas de uma planta em delineamento experimental inteiramente casualizado. Para análise de variância das variáveis Pf e NO.g^{-1} os dados foram transformados em $\log(x+1)$, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste t a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando inoculados com *M. paranaensis* todos os acessos foram classificados como resistentes e altamente resistentes segundo as variáveis FR e RFR. Os acessos apresentaram reduzidos valores de população final (Pf) e número de ovos por grama de raiz (NO.g^{-1}). O número de plantas com $\text{FR}>1$ indica que não houve segregação genética da resistência dos acessos a *M. paranaensis*. Estes resultados confirmam os obtidos por Fatobene et al. (2012) que selecionaram estes cinco acessos silvestres como os mais promissores em relação a resistência a esta espécie (Tabela 1).

Tabela 1. População final (Pf), número de ovos por grama de raiz (NO.g^{-1}), fator de reprodução (FR), redução do fator de reprodução (RFR) e número de plantas com $\text{FR} > 1$ dos tratamentos inoculados com *M. paranaensis*.

Tratamento	Pf*	NOg^{-1} *	FR	C	RFR(%)	C	Plantas $\text{FR}<1$ (n°)
IAC 2036-3B	376,0 c	229,6 c	0,1	R	96	AR	10
IAC 2041-5A	496,0 bc	164,5 bc	0,1	R	96	AR	10
IAC 2052-1C	440,0 c	181,9 c	0,1	R	96	AR	10
IAC 2139-4A	384,0 c	358,7 bc	0,1	R	96	AR	10
IAC 2279-5B	952,0 b	447,9 b	0,2	R	92	R	10
MN IAC 515-20	13248,0 a	5910,8 a	2,6	S	Padrão	-	0
CV (%)	28,74	29,94					

C= Classificação dos tratamentos inoculados com *M. paranaensis*; AR= altamente resistente; R= resistente; MR= moderadamente resistente; S= suscetível. *Médias de tratamentos seguidas por uma mesma letra minúscula não apresentam diferenças significativas quando comparadas pelo teste t a 5% de probabilidade.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Quando inoculados com *M. incognita* os acessos de melhor desempenho em relação às variáveis Pf e NO.g⁻¹ foram IAC 2279-5B, IAC 2052-1C e IAC 2036-3B. Todos os acessos foram considerados resistentes segundo o fator de reprodução (FR), exceção feita ao acesso IAC 2041-5A, no qual se observou importante segregação genética para a resistência, demonstrada pela igual proporção de plantas resistentes e suscetíveis na progênie (Tabela 2).

Tabela 2. População final (Pf), número de ovos por grama de raiz (NO.g⁻¹), fator de reprodução (FR), redução do fator de reprodução (RFR) e número de plantas com FR > 1 dos tratamentos inoculados com *M. incognita*.

Treatamento	Pf*	NOg ⁻¹ *	FR	C	RFR (%)	C	Plantas FR<1 (n°)
IAC 2036-3B	1504,0 cd	953,6 cd	0,3	R	85	MR	10
IAC 2041-5A	7104,0 ab	2073,7 ab	1,4	S	30	S	05
IAC 2052-1C	2328,0 cd	935,0 cd	0,5	R	75	S	09
IAC 2139-4A	2888,0 bc	1294,4 bc	0,6	R	70	S	08
IAC 2279-5B	1297,8 d	608,4 d	0,3	R	85	MR	10
MN IAC 515-20	9911,1 a	3210,6 a	2,0	S	Padrão	-	0
CV (%)	11,91	9,89					

C= Classificação dos tratamentos inoculados com *M. incognita*; AR= altamente resistente; R= resistente; MR= moderadamente resistente; S= suscetível. *Médias de tratamentos seguidas por uma mesma letra minúscula não apresentam diferenças significativas quando comparadas pelo teste t a 5% de probabilidade.

Os acessos IAC 2036-3B, 2139-4A e 2279-5B apresentaram o melhor desempenho em relação à resistência a *M. exigua*, sendo que a frequência de plantas resistentes nas progênies variou entre 70% (2139-4A) e 100% (IAC 2036-3B). O acesso IAC 2041-5A foi considerado suscetível a *M. exigua*, assim como, a *M. incognita* (Tabela 2) O acesso 2052-1C, também suscetível, apresentou elevados valores de Pf e NO.g⁻¹, não diferindo da testemunha suscetível.

Tabela 3. População final (Pf), número de ovos por grama de raiz (NO.g⁻¹), fator de reprodução (FR), redução do fator de reprodução (RFR) e número de plantas com FR > 1 dos tratamentos inoculados com *M. exigua*.

Treatamento	Pf**	NOg ⁻¹ **	FR	C	RFR (%)	C	Plantas FR<1 (n°)
IAC 2036-3B	2032,0 b	957,8 d	0,4	R	92	R	10
IAC 2041-5A	4776,0 b	1191,2 cd	1,0	S	80	MR	0
IAC 2052-1C	14288,0 a	4337,7 a	2,9	S	42	S	01
IAC 2139-4A	3592,0 b	2472,8 b	0,7	R	86	MR	07
IAC 2279-5B	3816,0 b	2215,8 bc	0,8	R	84	MR	08
MN IAC 515-20	25080,0 a	5935,8 a	5,0	S	Padrão	-	0
CV (%)	11,61	10,69					

C= Classificação dos tratamentos inoculados com *M. exigua*; AR= altamente resistente; R= resistente; MR= moderadamente resistente; S= suscetível. *Médias de tratamentos seguidas por uma mesma letra minúscula não apresentam diferenças significativas quando comparadas pelo teste t a 5% de probabilidade.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

A análise em conjunto dos três experimentos sugere que os acessos IAC 2036-3B, IAC 2139-4A e IAC 2279-5B apresentam resistência múltipla às três espécies de *Meloidogyne* parasitas dos cafeeiros, enquanto que o acesso IAC 2052-1C apresentou resistência a *M. incognita* e *M. paranaensis*.

A variabilidade de resposta dos acessos às populações utilizadas no estudo evidenciam a participação de diferentes genes na expressão da resistência à cada uma das espécies do patógeno.

4 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa concedida à G.S. Aloise (Processo CNPq N°126.132/2013-5) e a O. Guerreiro Filho (Processo CNPq N°313.796/2009-2); à FAPESP pela bolsa de doutorado concedida à B.J.R. Fatobene (Processo FAPESP N°2010/15.416-0) e ao Centro de Café Alcides Carvalho pela oportunidade de estágio.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ARRUDA, H.V.; REIS, J. Redução nas duas primeiras colheitas de café devido ao parasitismo de nematoide. **O Biológico**, v.28, n.12, p.349, 1962.

BERTRAND, B.; ANTHONY, F. Genetics of Resistance to Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.) and Breeding. In: Souza, R.M. (Ed). **Plant-Parasitic Nematodes of Coffee**. 1 ed. USA: APS Press & Springer, 2008, v.1, p.165-190.

BERG, R.H.; FESTER, T.; TAYLOR, C.G. Development of the root-knot nematodes feeding sites. In: BERG, R.H. & TAYLOR, C.G. (Eds). **Cell Biology of Plant Nematode Parasitism**. Springer, 2009, p.115-152.

BLOCK, V.C.; PHILLIPS, M.S.; MCNICOL, J.W.; FARGETTE, M. Genetic variation in tropical *Meloidogyne* species as shown by RAPDs. **Fundamental and Applied Nematology**, v.20, p.127-133, 1979.

BOISSEAU, M.; ARIBI, J.; SOUSA, F.R.; CARNEIRO, R.M.D.G.; ANTHONY, F. Resistance to *Meloidogyne paranaensis* in wild *Coffea arabica*. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.1, p.38-41, 2009.

BONETTI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**. v.6, p.553,1981.

CARNEIRO, R.M.D.G.; COSTA, S.B.; SOUSA, F.R.; SANTOS, D.F.; ALMEIDA, M.R.A.; SIQUEIRA, K.M.; SANTOS, M.F.A.; TIGANO, M.; FONSECA, A.F.A. Reação de cafeeiros conilon a diferentes populações de



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Meloidogyne spp. In: VI SIMPÓSIO DOS CAFÉS DO BRASIL, 2009, Vitória. **Anais...** Brasília, DF: Consórcio Pesquisa-Café, v.6., 2009.

CARNEIRO, R.M.D.G.; COFCEWICZ, E.T. Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In: Souza, R.M. (Ed). **Plant-Parasitic Nematodes of Coffee**. 1 ed. USA: APS Press & Springer, 2008, v. 1, p. 87-122.

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

FATOBENE, B.J.R.; GONCALVES, W.; GUERREIRO-FILHO, O. Selection of wild *Coffea Arabica* accessions resistant to *Meloidogyne paranaensis*. In: 24th International Conference on Coffee Science, 2013, San Jose, Costa Rica. **Proceedings** of 24th International Conference on Coffee Science. Paris: Association for Science and Information on Coffee, 2013. v. 24. p. 1359-1361.

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

GONÇALVES, W.; MAZZAFERA, P.; FERRAZ, L.C.C.B.; SILVAROLLA, M.B.; LIMA, M.M.A. Biochemical basis of tree resistance to *Meloidogyne incognita*. **Plant Research and Development**, v.2, p.54-60, 1995.

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

MOURA, R.M. O gênero *Meloidogyne* e a meloidogynose. Parte II. In: LUZ, W.C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: Gráfica e Editora Pe. Berthier, v. 5, p. 281-315, 1997.

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

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

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