

DIVERSIDADE E AGRESSIVIDADE DE *Meloidogyne* spp. DO CAFEIEIRO: RESISTÊNCIA MÚLTIPLA EM *Coffea canephora* E MANEJO EM ÁREAS INFESTADAS. DIVERSITY AND AGRESSIVITY OF *Meloidogyne* spp. FROM COFFEE: MULTIPLE RESISTANCE IN *Coffea canephora* AND MANAGEMENT IN INFESTED AREAS. **Carneiro, R.M.D.G.¹, M.F.A. Santos¹, I. M. Lima²**. ¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Nematologia, CP 02372, CEP 70849-970 Brasília-DF, Brasil; ²INCAPER – CRDR Centro Norte BR 101 Norte, Km 151, CP 62, CEP 29915-140, Linhares – ES.

Os nematoides das galhas (NG) são uma das principais ameaças para as plantações de café em várias regiões produtoras. A identificação das principais espécies de *Meloidogyne* do café é agora possível usando os fenótipos de esterase e marcadores SCAR específicos das espécies (Carneiro et al., 2016). Durante a última década, levantamentos realizados no Brasil e nas Américas mostraram algumas espécies parasitando a cultura do cafeeiro, incluindo as três principais: *M. exigua*, *M. paranaensis* e *M. incognita*, e outras tais como *M. konaensis*, *M. arabicida* e *M. izalcoensis* e, mais recentemente, *M. lopezi* (Humphreys-Pereira et al., 2014), que estão restritas ao Havaí, Costa Rica e El Salvador.

Recentemente, em um levantamento de *Meloidogyne* spp. em diferentes culturas de 11 municípios do estado do Ceará, por meio do método de eletroforese de isoenzimas, caracterizaram-se quatro populações atípicas de *Meloidogyne*, que apresentaram um perfil de esterase diferente de todos já detectados no Brasil. Estudos morfológicos mostraram características típicas das fêmeas, machos e juvenis de segundo estágio (J2) de *M. konaensis*, a espécie que parasita o cafeeiro no Havaí, USA. Nesse trabalho foi demonstrado que o padrão de esterase K3 é espécie-específico de *M. konaensis*, com três bandas principais (Rm: 1,0, 1,17, 1,27) e uma banda secundária (Rm: 1,10). Alguns equívocos a respeito da verdadeira identidade dessa espécie foram esclarecidos neste estudo, inclusive as suas diferenças em relação a *M. paranaensis*. Um marcador SCAR espécie-específico desenvolvido para *M. paranaensis* foi testado em *M. konaensis* e não foi observada amplificação de nenhum fragmento. Em análise Neighbour-Joining nas árvores das sequências (ITS1-ITS2 e D2-D3) do rDNA, *M. konaensis* do Brasil apareceu claramente separado de *M. paranaensis*. Testes com plantas hospedeiras mostraram que o cafeeiro (*Coffea arabica* L.) não é hospedeiro de *M. konaensis*, como foi relatado na descrição original da espécie. A partir desse trabalho pode-se comprovar que o nematoide que parasita os cafeeiros no Havaí é *M. paranaensis* (Monteiro et al., 2016).

O controle genético do nematóide das galhas constitui uma estratégia essencial para o manejo integrado. Dessa maneira, os estudos de variabilidade genética e agressividade de diferentes populações de *Meloidogyne* spp. são essenciais para estudos do espectro de resistência de *Coffea* spp. a diferentes espécies de *Meloidogyne*. Estudos isoenzimáticos e técnicas moleculares (SCAR e RAPD-PCR) foram realizados em 15 populações de três raças de *M. exigua*, parasitas do cafeeiro no Brasil, Bolívia e Costa Rica. Esses estudos revelaram quatro fenótipos de esterase (E1, E2, E2a e E3) e três de malato-desidrogenase (N1, N1a e N2). Os primers SCAR, em condição multiplex-PCR permitiram a identificação de todas as populações de *M. exigua*. Análises filogenéticas mostraram alto polimorfismo intra-específico (25,9-59,6%) para todas as populações estudadas. Entretanto, todas as populações agruparam-se com 100% de bootstrap mostrando ser uma espécie coesa, que se reproduzem por partenogênese meiótica (Muniz et al. 2008), sendo *M. exigua* 1 e *M. exigua* 3, as mais agressivas à cultivar suscetível IAC 144 e *M. exigua* 3 virulenta ao cafeeiro IAPAR 59, portador do gene de resistência Mex-1 (Muniz et al., 2009). Entretanto, estudos posteriores demonstraram um grande número de cultivares resistentes a essa população virulenta em *Coffea canephora* (Lima et al., 2015).

Observou-se baixa variabilidade genética em populações de *M. incognita* do cafeeiro (RAPD, AFLP) que se reproduzem por partenogênese mitótica (Santos et al., 2012), e não foram observadas diferenças na agressividade entre as duas populações estudadas por Muniz et al., 2009. Mais estudos a cerca de *M. incognita* do cafeeiro são necessários.

A variabilidade intraespecífica de sete isolados de *M. paranaensis*, provenientes de diferentes regiões geográficas do Brasil e uma da Guatemala, com perfis de esterase típicos da espécie (P1, P2 e P2a) foram estudadas recentemente, com dois marcadores moleculares, RAPD e AFLP. Quarenta e três primers foram avaliados e 635 fragmentos selecionados para a análise dos resultados. A análise filogenética dos dados mostrou uma baixa variabilidade intraespecífica entre os isolados de *M. paranaensis*, que se agruparam de acordo com o perfil enzimático P1 e P2 em dois grupos com similaridade de 99% e 100% respectivamente, exceto o isolado de perfil enzimático P2a da Guatemala que se agrupou separadamente de todos os outros isolados de *M. paranaensis*. O conhecimento da diversidade genética de *M. paranaensis* foi correlacionado com a agressividade dessas populações, em cafeeiros resistentes a essa espécie. No caso de *M. paranaensis* do cafeeiro, que se reproduz também por partenogênese mitótica, nenhuma virulência relacionada a diferentes populações foi observada em cafés resistentes. As populações Est P2a (Guatemala) e Est P2 (Herculândia, SP, Brasil) foram as mais agressivas em relação às duas cultivares suscetíveis (Catuaí IAC 81 e Mundo Novo 379-19) de *C. arabica*. Foi confirmada a resistência de cinco genótipos às sete populações de *M. paranaensis*. As cultivares de café resistentes, INCAPER Clone 14, Catuaí Vermelho x Amphillo MR2161 (E1 16-5 III), Apoatã IAC 2258, Híbrido do Timor UFV 408-01 (E1 6-6 II) e IPR 100, exibiram segregação para resistência na proporção de 0%, 2,4%, 12%, 26% e 29%, respectivamente. Isso demonstra que a variabilidade quanto à resistência ocorrente no campo, é devida sobretudo à segregação do material genético e não à variabilidade intraespecífica de *M. paranaensis* (Santos et al., 2017).

Outros estudos no Brasil avaliaram a resistência múltipla de genótipos de *Coffea canephora* (clones) a *Meloidogyne* spp. Utilizaram-se genótipos lançados pela INCAPER sensíveis e tolerantes à seca para medir a sua resistência em relação a *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*, usando o fator de reprodução (FR) dos nematoides nos diferentes clones. Vários clones foram resistentes a *M. exigua* avirulento e virulento. Os clones 14 (resistente à seca) e ESN2010-04 foram os únicos genótipos altamente e moderadamente resistentes, apresentando resistência múltipla às três espécies do cafeeiro. Estudaram-se histologicamente o Clone 14 (resistente) e o Clone 22 (suscetível) durante o processo de parasitismo por *M. incognita* raça 3 e *M. paranaensis*. Quatro mecanismos de resistência foram observados no 'Clone 14': redução da penetração dos juvenis de segundo estágio (J2) dentro das raízes, reação de hipersensibilidade (RH) precoce e intensa e RH tardia com morte celular e fêmeas jovens degeneradas e células gigantes degradadas (Lima et al., 2015). Estes resultados fornecem bases racionais para estudos futuros, incluindo prospecção, caracterização e expressão de genes envolvidos tanto na tolerância à seca, como na resistência a ao nematoide das galhas. Estudos realizados por Lima et al., 2016 mostraram que o Clone C14, quando usado como porta-enxerto, apresentou compatibilidade com os diferentes clones de Conilon, mas, não acrescentou vantagens significativas ao crescimento, produtividade e as trocas gasosas do enxerto. *M. paranaensis* foi capaz de causar danos severos aos clones suscetíveis de *C. canephora* na fase vegetativa e reprodutiva. Todavia o Clone 14, caracterizado como resistente, apresentou excelentes características para o uso como porta-enxerto ou para cultivo em áreas infestadas (Lima, 2016).

O controle químico, rotação de culturas, matéria orgânica e controle biológico têm se mostrado ineficiente no controle dos nematoides do cafeeiro, sobretudo *M. incognita* e *M. paranaensis*, devido à destruição de grande parte do sistema radicular e impossibilidade de recuperação das raízes. Para outros nematoides que induzem formação de galhas como *M. exigua* esses métodos de manejo são mais efetivos em decrescer a população de nematoides. Áreas infestadas com *M. exigua* e tratadas com nematicidas por pelo menos 5 anos apresentaram uma produtividade superior a 30,9% (Campos & Villain, 2008). A limpeza de áreas infestada com o NG com sucessão de culturas não hospedeiras foi obtida com sucesso para *M. exigua* que apresenta gama restrita de hospedeiros. Já para *M. paranaensis* em experimentos realizados em solos arenoso e argiloso, estudou-se o efeito da integração de sucessão de culturas, resistência genética (Icatu H4782-7-925) e controle biológico com a bactéria *Pasteuria penetrans* no controle do nematoide na cultura de café. A sucessão de culturas utilizada foi aveia preta, amendoim, e mucuna cinza (não

hospedeiras de *M. paranaensis*). A inoculação com a bactéria foi feita com 10⁸ esporos/cova. Verificou-se que a sucessão de culturas foi altamente eficiente (>90% de controle) na redução das populações do nematoide nas duas áreas experimentais. A sucessão de culturas foi eficiente nos três primeiros anos e a variedade Icatu embora tenha apresentado segregação para a resistência, foi o único tratamento que se manteve eficiente até seis anos após o plantio. A bactéria desapareceu completamente da área tratada, dois anos após o plantio não exercendo nenhum controle (Carneiro et al., 2013).

Dessa maneira, a utilização de cultivares resistentes ou porta enxertos de *Coffea canephora* tais como ‘Apoatã’ (Campos & Vilain, 2005) e mais recentemente INCAPER Clone 14 são as únicas medidas de controle eficientes para o manejo a longo prazo de *Meloidogyne* spp. em áreas infestadas pelos nematoides de galhas.

Referências:

- CAMPOS, V., VILLAIN, L. (2005). Nematode parasites of *Coffee* and *Cocoa*. In: LUC, M.; SKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Eds). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**, 2.ed. CABI Bioscience: UK. p. 529-580.
- CARNEIRO, R.M.D.G., MONTEIRO, J.M.S, SILVA, U.C. & GOMEZ, G. (2016). Gênero *Meloidogyne*: diagnose através de eletroforese das isoenzimas e marcadores SCAR. In: OLIVEIRA, C.M.G., DOS SANTOS, M.A. & CASTRO, L.H.S. (EDS). **Diagnose de Fitonematóides**. Millennium Editora Ltda, Campinas, SP, Brasil p. 47-70.
- CARNEIRO, R.G., SOUSA, M.G., MOITA, A.W., CORREA, V.R. & CARNEIRO, R.M.D.G. (2013). Manejo integrado de *Meloidogyne paranaensis* em cafeeiros usando sucessão de culturas, resistência genética e controle biológico. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** nº296, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 24 p.
- HUMPHREYS-PEREIRA, D.A., FLORES CHAVES, L., GÓMEZ, M., SALAZAR, L, GÓMEZ-ALPIZAR, L. & ELLING, A.A. (2014). *Meloidogyne lopezi* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a new root-knot nematode associated with coffee (*Coffea arabica* L.) in Costa Rica, its diagnosis and phylogenetic relationship with other coffee-parasitising *Meloidogyne* species. **Nematology**, v. 16 (6), p. 643 – 661.
- LIMA, E.A., FURLANETTO, C., NICOLE, M., GOMES, A.C.M.M., ALMEIDA, M.R.A., ALDEMIRO, J.J., CORREA, V.R., SALGADO, S.M., FERRÃO, M.A.G., CARNEIRO, R.M.D.G. (2015). The multi-resistant reaction of drought tolerant coffee “conilon Clone 14” to *Meloidogyne* spp. and late hypersensitive-like response in *Coffea canephora*. **Phytopathology**, v.105, n.6, p.805-814.
- LIMA, I.M. (2016). Crescimento vegetativo, trocas gasosas e produtividade de clones de cafeeiro conilon suscetíveis e resistentes à *Meloidogyne incognita* e *M. paranaensis*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, 61 pp.
- MONTEIRO, J.M.S., CARES, J.E., GOMES, A.C.M.M., CORREA, V.R., MATTOS, V.S., SANTOS, M. F.A., ALMEIDA, M.R.A., SANTOS, C.D.G., CASTAGNONE-SERENO, P. & CARNEIRO, R.M.D.G. (2016). First report of, and additional information on, *Meloidogyne konaensis* (Nematoda: Meloidogyninae) parasitizing various crops in Brazil. **Nematology**, v.18, p. 831-844.
- MUNIZ, M.F.S., CAMPOS, V.P., CASTAGNONE-SERENO, P., CASTRO, J.M.C., ALMEIDA, M.R.A., CARNEIRO, R.M.D.G. (2008). Diversity of *Meloidogyne exigua* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations from coffee and rubber tree. **Nematology**, v.10, p. 897-910.
- MUNIZ, M.F.D.; CAMPOS, V.P.; MOITA, A.W.; GONÇALVES, W; ALMEIDA, M.R.A.; SOUZA, F.R.de; CARNEIRO, R.M.D.G. (2009) Reaction of coffee genotypes to different populations of *Meloidogyne* spp.: detection of a naturally virulent *M. exigua* population. **Tropical Plant Pathology**, v.34, p.379-378.
- SANTOS, M.F.A.; FURLANETTO, C.; CARNEIRO, M. D. G.; ALMEIDA, M. R.A.; MOTA, F.C.; GOMES, A.C.M.M.; SILVEIRA, N.O.R.; SILVA, J.G.P.; CASTAGNONE-SERENO, P.;

TIGANO, M. S.; CARNEIRO, R.M.D.G. Biometrical, biological, biochemical and molecular characteristics of *Meloidogyne incognita* isolates and related species. **European Journal of Plant Pathology**, v. 134, p. 671–684, 2012.

SANTOS, M.F.A., CORREA, V.R., PEIXOTO, J.R.V.S., MATTOS, V. S SILVA, J.G.P., MOITA, A.W., SALGADO, S. M. L, CASTAGNONE-SERENO, P.& CARNEIRO, R.M.D.G. (2017) Genetic variability of *Meloidogyne paranaensis* populations and their aggressiveness to susceptible coffee genotypes. **Plant Pathology**, Doi: 10.1111/ppa.12718.