

**RODRIGO VIEIRA DA SILVA**

**Produção de inóculo e diferenciação de raças de *Meloidogyne exigua* em  
*Coffea* spp.**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2005**

A Deus,  
Aos meus pais Heitor e Zélia,  
Aos meus irmãos.  
A Brenda, uma pessoa que tem me dado  
felicidade pelo simples fato de estar na minha  
vida.

## **AGRADECIMENTOS**

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Rosângela D’Arc de Lima Oliveira, pela orientação, dedicação, ensinamentos e amizade.

Aos professores Leandro Grassi de Freitas, Fabrício de Ávila Rodrigues e Ney Sussumu Sakiyama, pelas sugestões e informações necessárias à correção deste trabalho.

Aos pesquisadores Wallace Gonçalves (IAC) e Regina Carneiro (EMBRAPA), pelo envio de materiais indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao pesquisador Antônio Alves Pereira (EPAMIG), pelas sugestões e apoio na realização deste trabalho.

Ao Secretário de Pós-Graduação do DFP Délio Duarte pela amizade e ajuda nos momentos em que foi solicitado.

Aos bolsistas Dalila Seni de Jesus, Débora Gonçalves Silva, pela ajuda no desenvolvimento dos experimentos.

Aos estudantes de doutorado Dagoberto Saunders de Oliveira e Reginaldo Mafia pela amizade e grande contribuição na realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

RODRIGO VIEIRA DA SILVA, filho de Heitor Ladeira da Silva e Zélia de Jesus Vieira, nasceu em 21 de fevereiro de 1979, em Viçosa, Estado de Minas Gerais.

Em 1998, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (MG), onde graduou-se em março de 2003.

Em março do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa (MG).

## CONTEÚDO

	Páginas
RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
Introdução Geral .....	1
Referências Bibliográficas .....	7
CAPÍTULO 1 .....	10
Otimização da produção de inóculo de <i>Meloidogyne exigua</i> em mudas de Cafeeiro	
Introdução .....	11
Material e Métodos .....	13
Resultados e Discussão .....	17
Referências Bibliográficas .....	27
CAPÍTULO 2 .....	30
Diferenciação de raças de <i>Meloidogyne exigua</i> em <i>Coffea</i> spp.	
Introdução .....	31
Material e Métodos .....	33
Resultados e Discussão .....	36
Referências Bibliográficas .....	45
CONCLUSÕES GERAIS .....	48

## RESUMO

SILVA, Rodrigo Vieira da, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2005.  
**Produção de inóculo e diferenciação de raças de *Meloidogyne exigua* em *Coffea* spp.**  
Orientadora: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira. Conselheiros: Leandro Grassi de Freitas e Antônio Alves Pereira.

*Meloidogyne exigua*, um dos principais patógenos do cafeeiro, é espécie na qual já foram observadas variabilidade bioquímica, morfológica e fisiológica. Para propor uma série de plantas diferenciadoras de raças dessa espécie dentro do gênero *Coffea*, estudou-se o efeito de populações distintas de *M. exigua* em 25 genótipos de cafeeiro. Para estabelecer as melhores condições para a produção de inóculo e realização do teste, mudas de cafeeiro foram estudadas quanto à temperatura, ao estágio de desenvolvimento e à época de avaliação. A temperaturas de 26°C foi a melhor para a formação de galhas, produção de ovos e da matéria seca da parte aérea das mudas de cafeeiro. O estágio das mudas de cafeeiro com seis pares de folhas definitivas e a avaliação aos 120 dias após a inoculação foram os que mais favoreceram a reprodução de *M. exigua*. A análise conjunta dos dados permitiu concluir que os ensaios para seleção de genótipos de cafeeiros resistentes ao nematóide e multiplicação de inóculo devem ser avaliados a partir de 90 dias após a inoculação. A série diferenciadora das populações de *M. exigua*, utilizando-se os genótipos UFV 1959, H493-1, 'Catuaí Vermelho IAC 44' e 'Apoatã IAC 2258' é proposta nesse estudo. Contudo, para a validação desses genótipos como possíveis diferenciadores de raças, um número maior de populações deve ser testado. Caso os genótipos ainda estejam segregando, como foi constatado para alguns deles, a reprodução deverá ser obtida por enraizamento de estacas.

## ABSTRACT

SILVA, Rodrigo Vieira da, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2005.  
**Inoculum production of *Meloidogyne exigua* and race differentiation in *Coffea* spp.**  
Adviser: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira. Committee members: Leandro Grassi de Freitas e Antônio Alves Pereira.

One among significant pathogens of the coffee plant, *Meloidogyne exigua* is a nematode species for which biochemical, morphological and physiologic variability has been reported. In an attempt to set up a useful series of differentials within the genus *Coffea*, several *M. exigua* populations were studied on 25 distinct coffee genotypes. Inoculated young coffee plants were examined growth stage, and under varying greenhouse temperature and evaluation intervals to find out which was the best for the inoculum production and to the assays purposes. The temperature of 26°C it went the best to the galls formation, egg production and to the matter dry of the aerial part of the young coffee plants. Its reproduction rate was the greatest at 6-leaf-pair growth stage, the oldest tested coffee plants in the assay. A united analysis allows to end that the rehearsals for selection of coffee genotypes resistant to the nematode and in the inoculum production they should be appraised starting from 90 days after the inoculation. Results from this study suggest that the differential series UFV 1959, H493-1, 'Catuaí Vermelho IAC 44' and 'Apoatã IAC 2258' is adequate to distinguish within the *M. exigua* populations. However, to fully validate such set of differentials a larger than the available number of *M. exigua* populations is needed. It is also recommended that in cases when coffee genotypes are still segregating, as verified in our assays, rooted stems should be adopted instead of coffee seedlings.

## INTRODUÇÃO GERAL

O cafeeiro é uma espécie exótica, tendo como provável centro de origem a Etiópia. O cultivo no Brasil teve início com a introdução das primeiras mudas e sementes vindas da Guiana, em 1727 (Carvalho, 1993). Atualmente constitui um dos principais produtos agrícolas do mercado internacional. Este é cultivado em cerca de 72 países, em quatro dos cinco continentes do planeta. O Brasil se destaca por deter o status de maior produtor e exportador mundial de café e por participar com um terço da oferta global, além de ocupar a segunda posição entre os maiores consumidores (Conab, 2005).

A cultura assume um papel de grande importância na geração de empregos e divisas para o país (Caixeta, 2001). A safra de café estimada para 2004/2005 é de aproximadamente 38 milhões de sacas, das quais cerca de 78% são de *Coffea arabica*. O Estado de Minas Gerais lidera a produção brasileira de café, contribuindo com aproximadamente 50% da produção nacional (Conab, 2004).

Dentre os fatores que limitam a produção agrícola, merecem atenção especial as doenças causadas pelos fitonematóides, pois causam perdas estimadas em 12,3%, o que representa cerca de 100 bilhões de dólares de prejuízo anual, em todo o mundo (Sasser & Freckman, 1987).

Muitos nematóides fitoparasitas têm sido encontrados associados a rizosfera do cafeeiro, e no Brasil, destacam-se os gêneros *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Rotylenchulus*, *Xiphinema*, *Criconemela* e *Helicotylenchus* (Sharma & Sher, 1973; Ferraz, 1980; Lordello, 1984; Campos, 1997).



Os nematóides formadores de galhas radiculares, pertencentes ao gênero *Meloidogyne* Goeldi 1887, constituem o grupo de maior importância econômica na agricultura. Características como agressividade, ampla gama de hospedeiros e distribuição mundial, os colocam entre os primeiros patógenos responsáveis pela limitação da produtividade agrícola mundial (Sasser & Carter, 1985).

As perdas ocorrem principalmente devido a mudanças anatômicas nas raízes, como o desenvolvimento de células gigantes e, ou a formação galhas, resultado da hipertrofia de células do cilindro central que comprimem os vasos do xilema, reduzindo assim a absorção e transporte de água e nutrientes (Kirkpatrick et al., 1991). Assim às espécies de *Meloidogyne* são responsáveis por 15% da redução total da produção brasileira de café em relação aos 20% de perdas causadas pelos fitonematóides (Lordello, 1984)

Atualmente, são relatadas mais de 80 espécies de *Meloidogyne* infectando plantas de interesse econômico em diversas partes do mundo. Dentre elas, 17 foram detectadas em associação com raízes do cafeeiro, das quais 7 são encontradas no Brasil, como: *M. arenaria* (Neal) Chitwood, *M. exigua* Goeldi, *M. javanica* (Treub.) Chitwood, *M. hapla* Chitwood, *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *M. paranaensis* Carneiro et al. e *M. coffeicola* Lordello & Zamith (Campos, 1997).

Dentre as espécies de nematóides das galhas que atacam o cafeeiro, *M. exigua* é uma das que mais prejuízo causa a nossa cafeicultura, pois tem sua disseminação generalizada nos cafezais, apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo nas principais regiões cafeeiras do país (Campos et al., 1985; Gonçalves & Pereira, 1998; Gonçalves & Silvarolla, 2001; Oliveira et al., 2001). Apesar de não ser a espécie mais agressiva, o efeito do processo infeccioso de *M. exigua* nas produções iniciais do cafeeiro arábica já chegou a causar perdas da ordem de 50 a 68,2% (Arruda & Reis, 1962; Guerra Neto et al., 1985). Em um trabalho mais recente, Barbosa et al. (2004) verificou redução de produtividade da ordem de 45% em lavouras de café, decorrentes do ataque de *M. exigua*.

*Meloidogyne exigua* constitui-se também num sério problema na cultura da seringueira (*Hevea brasiliensis*), na qual ocorre de forma endêmica na Amazônia (Santos, 1995). Esta espécie se encontra disseminada no município de São José do Rio Claro, Mato Grosso (Bernado et al., 2003), Estado este que possui a maior área cultivada com esta cultura no Brasil, e que participa com cerca de 22,0% do látex coagulado produzido no país (Anônimo, 2001).

A utilização de cultivares de cafeeiros resistentes, na forma de porta enxerto ou em pé franco, constitui-se atualmente em uma das principais formas de controle de *Meloidogyne* spp. O sucesso desta prática vai depender do conhecimento das espécies ou raças presentes na área, pois a resistência é na maioria das vezes específica (Gonçalves & Silvarolla, 2001).

Em *C. canephora*, *C. congensis* e *C. dewevrei*, têm-se encontrado gene(s) de resistência permitindo o uso de plantas dessas espécies como porta-enxertos e doadoras de genes para espécies suscetíveis, porém produtivas (Curi et al., 1970; Fazuoli & Lordello, 1977; Gonçalves & Silvarolla, 2001). Híbridos de *C. arabica* x *C. canephora*, como por exemplo, H4782-7-585 e H4782-7-785 que são resistentes à ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*), apresentaram também resistência a *M. exigua*, *M. incognita* e, ou *M. paranaensis*, como H4782-7-925, porém esses híbridos têm segregado para essa característica (Gonçalves et al., 1998). Algumas seleções de Híbridos Timor e Catimor, que foram consideradas imunes e homozigotas para resistência a *M. exigua*, apresentaram também boas características agrônômicas (Gonçalves et al., 1998; Gonçalves & Silvarolla, 2001).

Recentemente, foi identificado o gene *Mex-1* em *C. canephora* o qual quando transferido para *C. arabica confere* resistência a *M. exigua* (Noir et al., 2003). Essa descoberta certamente contribuirá para o avanço das pesquisas direcionadas para o desenvolvimento de cultivares de café arábica resistentes a este patógeno (Noir et al., 2003).

Em estudos visando ao uso da resistência no controle de *Meloidogyne* spp., a origem da população do nematóide é um fator primordial, pois a variabilidade genética intraespecífica tem sido observada em populações coletadas em diferentes localidades (Davis et al., 1996; Carneiro & Almeida, 2000; Silva et al., 2003).

Nos últimos anos, estudos com populações de *M. exigua* oriundas de cafeeiro e seringueira, têm revelado diferenças bioquímicas no padrão isoenzimático para a enzima esterase com a detecção de quatro fenótipos, a saber: E1 (Rm 1,60), E1a (Rm 1,60 e 1,90), E2 (Rm 1,60 e 1,90) e E1b (Rm 1,10 e 1,60). A diferença entre E1a e o E2, está na intensidade das bandas, pois em E1 a primeira banda (Rm 160) é a de intensidade mais forte, enquanto que no E2 é a segunda banda (Rm 1,90) (Figura 1) (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Carneiro & Almeida, 2000; Oliveira et al., 2001).

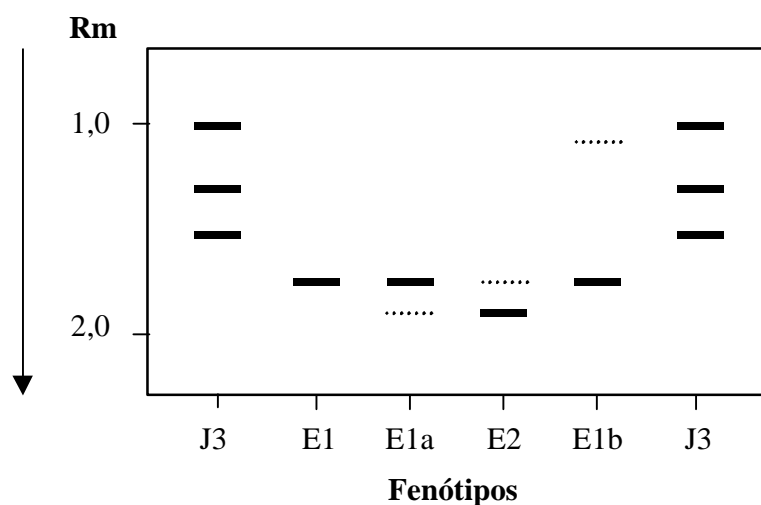


Figura 1 – Fenótipos de esterase detectados em *Meloidogyne exigua*. E1 (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985), E1a e E1b (Carneiro & Almeida, 2000) e E2 (Oliveira et al., 2001). J3 = *M. javanica* utilizada como padrão de comparação; Rm = mobilidade relativa.

Em estudos morfológicos de populações de *Meloidogyne* spp., coletadas em cafeeiros da Zona da Mata de Minas Gerais, observaram-se que as fêmeas de algumas populações oriundas do município de São João do Manhuaçu apresentaram configurações perineais semelhantes a *M. arenaria*, mas nos estudos isoenzimáticos de esterase, todas apresentaram o fenótipo típico de *M. exigua* (Oliveira et al., 2001).

Embora ocorra reprodução de *M. exigua* em diversas espécies botânicas, a capacidade reprodutiva tem-se mostrado diferenciada diante de alguns hospedeiros. No laboratório de Nematologia da Universidade Federal de Viçosa, tem sido observado que populações oriundas de diferentes localidades cafeeiras da Zona da Mata de Minas Gerais têm mostrado comportamento diferente em relação ao tomateiro, planta na qual a maioria das populações se reproduz, exceto uma população coletada no município de Canaã - MG.

Carneiro & Almeida (2000) propuseram a separação de “raças fisiológicas” de *M. exigua* com base na capacidade de reprodução de diversas populações em plantas de diferentes espécies botânicas. A raça 1, é constituída por indivíduos que infectam o pimentão e o cafeeiro, mas não conseguem infectar o tomateiro. Indivíduos da raça 2

infectam o tomateiro, o pimentão e o cafeeiro, e à raça 3, pertencem os indivíduos que não infectam o tomateiro, o pimentão e nem o cafeeiro, mas atacam a seringueira.

Tabela 1 - Raças de *Meloidogyne exigua* provenientes de cafeeiro e seringueira, adaptado de Carneiro & Almeida (2000)

<i>M. exigua</i>	Tomate	Pimentão	Café	Seringueira
<b>Raça 1</b>	-	+	+	-
<b>Raça 2</b>	+	+	+	-
<b>Raça 3</b>	-	-	-	+

IG = índice de galhas, R = reação (-) e (+) indica hospedeiro resistente e suscetível, respectivamente, segundo a escala de Taylor & Sasser (1978).

Um estudo envolvendo técnicas moleculares tem também mostrado essa variabilidade. Randig et al. (2002), por meio da técnica de RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), detectou alto nível de polimorfismo intraespecífico (67,5%) entre populações de *M. exigua* coletadas de cafeeiros e de seringueira.

Variabilidade genética existe praticamente em todas as populações de nematóides. Essa variabilidade já é conhecida para as espécies do gênero *Meloidogyne* (Caswell & Roberts, 1987). A variabilidade é consequência possivelmente da forma de reprodução desses nematóides que pode ocorrer por anfimixia, partenogênese facultativa ou obrigatória; ao grau de ploidia que vai desde haplóide até vários níveis de poliploidia; incluindo também as variações no número de cromossomos somáticos, que variam de 14 a 74 (Caswell & Roberts, 1987). A constatação dessa variação tem sido averiguada de diversas formas, tais como: preferência em relação à(s) planta(s) hospedeira(s) ou raças fisiológicas do patógeno, padrão izoenzimático e análises do DNA (Caswell & Roberts, 1987).

A espécie *M. exigua* se reproduz por partenogênese meiótica facultativa. Este modo de reprodução apresenta menor estabilidade genética comparada às espécies de

*Meloidogyne* que reproduzem por partenogênese mitótica (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985).

Apesar da variabilidade fisiológica ocorrer em *M. exigua*, sua constatação não é tarefa fácil, pois necessita de quatro espécies botânicas, dentre elas a seringueira, que é de difícil aquisição em várias regiões do país e suas sementes apresentam um curto período de viabilidade. Essas diferenças fisiológicas não atendem por completo ao conceito de “raças”, que são biótipos distinguidos por sua preferência de hospedeiro dentro de um grupo taxonômico, geralmente cultivares de uma espécie de planta, diferentemente da usual separação de raças de *Meloidogyne* spp. que envolve plantas de diferentes espécies.

Além disso, a expressão desta variabilidade em genótipos de cafeeiro não é conhecida. Sabe-se apenas que em estudos preliminares, populações de *M. exigua* apresentaram diferentes comportamentos reprodutivos, em relação à progênie de cafeeiro UFV 1262 (Silva et al., 2003). Tal fato mostrou a possibilidade de se criar uma série diferenciadora de raças de *M. exigua* dentro, pelo menos, do gênero *Coffea*. Um estudo dessa natureza poderia servir de suporte para as pesquisas, em especial as de melhoramento, tendo em vista a obtenção de plantas resistentes a *M. exigua* e facilitar os trabalhos de diagnose na rotina dos laboratórios de nematologia.

Em função do exposto, este trabalho teve como objetivos:

- 1- Avaliar a capacidade reprodutiva de populações de *M. exigua* em cafeeiros sob diferentes temperaturas, usando-se mudas de diferentes estádios de desenvolvimento e em diferentes épocas de avaliação;
- 2- Estudar a diferenciação de raças de *M. exigua* em genótipos de cafeeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANÔNIMO. 2001. Anuário da Agricultura Brasileira, Agriannual. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 545p.
- ARRUDA, H.V. 1962. Redução nas duas primeiras colheitas de café, devido ao parasitismo de nematóide. *O Biológico*, 2: 349.
- BARBOSA, D.H.S.G., VIEIRA, H.D., SOUZA, R.M., VIANA, A.P. & SILVA, C.P. 2004. Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. *Nematologia Brasileira*, 28: 49-54.
- BERNADO, E.R.A., SANTOS, J.M., SILVA, R.A., NETO, D.C., SANTOS, S.S., DELMADI, L. & ROCHA, V.F. 2003. Levantamento de *Meloidogyne exigua* na cultura da seringueira em São José do Rio Claro, MT, Brasil. *Ciência Rural*, 33: 157-159.
- CAIXETA, G.Z.T. 2001. Gerenciamento da cafeicultura em época de crise. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) *Tecnologias de produção de café com qualidade*. Viçosa: Editora UFV, p. 1-24.
- CAMPOS, V.P., LIMA, R.D. & ALMEIDA, V.F. 1985. Nematóides parasitas do cafeeiro. *Informe Agropecuário*, 11: 50-58.
- CAMPOS, V.P. 1997. 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, 1: 141-180.
- CARNEIRO, R.M.D.G & ALMEIDA, M.R.A. 2000. Caracterização isoenzimática e variabilidade intraespecífica dos nematóides de galhas do cafeeiro no Brasil. In: *Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*. Anais, Poços de Caldas, MG. p.280-282.

- CARVALHO, A. 1993. Histórico do desenvolvimento do cultivo do café no Brasil. Campinas, Instituto Agrônomo, 7 p. (Documentos do IAC, 34).
- CASWELL, E.P. & ROBERTS, P.A. 1987. Nematode population genetics. In: Veech, J.a. & Dickson, D. (Eds). Vistas on Nematology. Hyattsville MD, USA, Soc. Nematologists, p. 390-397.
- CONAB. 2005. Companhia Nacional de Abastecimento – Secretaria da Produção e Comercialização/CONAB. Safra brasileira de café estimada 2004/2005. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/spc.htm> > Acesso 20 fevereiro de 2005.
- CURI, S.M., CARVALHO, A., MORAES, F.P., MONACO, L.C & ARRUDA, H.V. 1970. Novas fontes de resistência genética de *Coffea* no controle do nematóide do cafeeiro, *Meloidogyne exigua*. O Biológico, 36: 41- 44.
- DAVIS, E.L., KOENNING, S.R., BURTON, J.W. & BARKER, K.R. 1996. Greenhouse evaluation of selected soybean germplasm for resistance to North Carolina populations of *Heterodera glycines*, *Rotylenchulus reniformis*, and *Meloidogyne* species. Journal of Nematology, 28: 590-598.
- ESBENSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Electrophoretic methods for the study of root-knot nematode enzymes. In: BARKER, K.R., CARTER, C.C., SASSER, J.N. (Eds.) An advanced treatise on *Meloidogyne*. North Carolina State University Graphics, p.115-123.
- FAZUOLI, L.C & LORDELLO, R.R.A. 1977. Resistência de *Coffea liberica* e *C. dewevrei* a *Meloidogyne exigua*. Nematologia Brasileira, 2: 197-199.
- FERRAZ, S. 1980. Reconhecimento das espécies de fitonematóides presentes nos solos do Estado de Minas Gerais. Experientiae, 26 11: 255-328.
- GONÇALVES, W. & PEREIRA, A.A. 1998. Resistência de cafeeiro a nematóides IV Reação do cafeeiro derivados do híbrido de Timor a *Meloidogyne exigua*. Nematologia Brasileira, 22: 39-49.
- GONÇALVES, W. & SILVAROLLA, M.B. 2001. Nematóides parasitos do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) Tecnologias de produção de café com qualidade. Viçosa: Editora UFV, p.199-267.
- GUERRA NETTO, E.G., D'ANTONIO, A.M. & FREIRE, A.C.F.E. 1985. Influência de *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887, no desenvolvimento de lavoura de *coffea arabica* L., variedade Mundo Novo. In: XII Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras. Resumos, Caxambu, MG. p. 36-37.
- KIRKPATRICK, T.L., OOSTERHUIS, D.M. & WULLSCHLEGER, S.D. 1991. Interaction of *Meloidogyne incognita* and water stressin two cotton cultivars. Journal Nematology, 23:462-467.

- LORDELLO, L.G.E. 1976. Perdas causadas por nematóides. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, 51: 180.
- LORDELLO, L.G.E. 1984. *Nematóides das plantas cultivadas*. 8 ed. São Paulo: Nobel, 314p.
- NOIR, S., ANTHONY, F., BERTRAND, B., COMBES, M. C. & LASHERMES, P. 2003. Identification of a major gene (*Mex-1*) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. *Plant Pathology*, 52: 97-103.
- OLIVEIRA, D.S., LIMA, R.D., ROESE, A.D & SILVA, R.V. 2001. Caracterização morfológica e bioquímica de populações de *Meloidogyne* spp. em cafeeiros na Zona da Mata de Minas Gerais. In: II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Anais, Vitória, ES, pp. 1072-1077.
- RANDIG, O., BONGIOVANNI, M., CARNEIRO, R.M.D.G & CASTAGNONE SERENO, P. 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome*, 45:862-870.
- SANTOS, J.M.1995. *Meloidogyne exigua* e *Botryodiplodia theobromae*, principais componentes biótipos de uma doença complexa da seringueira em Mato Grosso. *Fitopatologia Brasileira*, 28: 341.
- SANTOS, J.M. 1997. Estudo das principais espécies de *Meloidogyne* Goeldi que infectam o cafeeiro no Brasil com descrição de *Meloidogyne goeldi* sp. n. Botucatu, FCA, UNESP, 153 p. (Tese de Doutorado).
- SASSER, J. N. & CARTER, C.C. 1985. Overview of international *Meloidogyne* project 1975-1984. In: SASSER, J. N., CARTER, C.C (Eds.). *An Advanced treatise on Meloidogyne*, North Carolina State University, 2:19-24.
- SASSER, J. N. & FRECKMAN, D. W. 1987. A world perspective nematology: the role of the society. In: VEECH, J., DICKSON, D. W., ed. *Vistas on Nematology*. The Society of Nematologists, 7-14.
- SHARMA, R. D. & SHER, S. A. 1973. Nematodes associated with coffee in Bahia, Brazil. *Arquivo do Instituto Biológico*, 40: 131-135.
- SILVA, R.V., OLIVEIRA, R.D., PEREIRA, A.A & PINTO, F.S. 2003. Variabilidade de *Meloidogyne exigua* em genótipos de cafeeiro. In: XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Resumo, Uberlândia, MG, 28: 293.



## **CAPÍTULO 1**

### **Otimização da produção inóculo de *Meloidogyne exigua* em mudas de cafeiro**

## INTRODUÇÃO

O café constitui um dos principais produtos agrícolas do mercado internacional. O Brasil destaca-se por deter o status de maior produtor e exportador mundial, ao participar com um terço da oferta global de café. Além disso, ocupa a segunda posição entre os maiores consumidores (Conab, 2005).

*Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887, embora não seja a mais agressiva dentre as espécies dos nematóides das galhas que atacam o cafeeiro, provavelmente é a espécie que causa mais danos a nossa cafeicultura. Essa consideração advém de sua disseminação generalizada nos cafezais e uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo nas principais regiões cafeeiras do país (Campos et al., 1985; Gonçalves & Pereira, 1998; Gonçalves & Silvarolla, 2001; Oliveira et al., 2001). Esta espécie chegou a causar em cafezais em fase de produção, perdas de produtividade da ordem de 45% (Barbosa et al., 2004).

Nos últimos anos, estudos com populações de *M. exigua* oriundas de cafeeiro e seringueira, têm revelado diferenças bioquímicas no padrão isoenzimático para a enzima esterase com a detecção de quatro fenótipos, tais como, E1 (Rm 1,60), E1a (Rm 1,60 e 1,90), E2 (Rm 1,60 e 1,90) e E1b (Rm 1,10 e 1,60). A diferença entre E1a e o E2, está na intensidade das bandas, pois em E1 a primeira banda (Rm 1,60) é a de intensidade mais forte, enquanto que no E2 é a segunda banda (Rm 1,90) (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Carneiro & Almeida, 2000; Oliveira et al., 2001). Carneiro & Almeida (2000) propuseram a separação de “raças fisiológicas” de *M. exigua* com base na capacidade de reprodução de diversas populações em plantas de diferentes espécies botânicas. A raça 1, é constituída por indivíduos que infectam o pimentão e o cafeeiro, mas não conseguem infectar o tomateiro. Indivíduos da raça 2 infectam o tomateiro, o pimentão e o cafeeiro, e a raça 3, pertencem os indivíduos que não infectam o tomateiro, o pimentão e nem o cafeeiro, mas atacam a seringueira.

A temperatura é o fator ambiental mais importante no ciclo de vida dos nematóides (Taylor & Sasser, 1978). Para a maioria deles, a temperatura ótima varia entre 15 e 30°C (Taylor & Sasser, 1978). Estudos sobre a interação *M. exigua* - *Coffea arabica* revelaram também forte influência da temperatura na taxa reprodutiva do nematóide e no desenvolvimento do hospedeiro (Tronconi et al., 1986). No entanto, nesse trabalho os

autores utilizaram apenas uma população de *M. exigua*, a qual foi proveniente do município de Ervália - MG.

Estudos sobre as interações patógeno-hospedeiro têm mostrado que a idade da planta afeta principalmente a reprodução do organismo e o nível de dano causado à mesma (Almeida & Silveira, 1983). Apesar de conhecida a influência do estágio de desenvolvimento da planta na interação *Meloidogyne*-planta hospedeira, existem poucos estudos do efeito desse fator na interação. Em um dos poucos trabalhos sobre o assunto realizado no Brasil, Lordello et al. (1977) observaram maior quantidade de *M. exigua* nas mudas de cafeeiro no estágio de “orelha de onça” do que no estágio de “palito de fósforo”. Vários pesquisadores têm se dedicado aos estudos envolvendo a interação cafeeiro-*M. exigua*, como aqueles que buscam selecionar fontes de resistência à esse nematóide (Lordello et al., 1977; Gonçalves et al., 1996; Gonçalves & Pereira, 1998; Silva et al., 2003). Entretanto, esses trabalhos apresentam algumas diferenças na metodologia empregada, principalmente no que diz respeito ao estágio de desenvolvimento do cafeeiro na ocasião da inoculação e das épocas de avaliação. Dessa forma, tem ocorrido muita variação no fator de reprodução, em especial nos genótipos suscetíveis (Gonçalves & Pereira, 1998; Silva et al., 2003; Ribeiro et al., 2005), o que dificulta fazer uma análise conclusiva acerca de quais genótipos apresentam resistência ou suscetibilidade, ou mesmo, da ocorrência de variabilidade nas populações estudadas.

O conhecimento e a quantificação dos fatores que afetam a reprodução de *M. exigua* são imprescindíveis para o sucesso nos trabalhos de seleção de genótipos resistentes ao nematóide, na produção de inóculo, na condução de ensaios de pesquisa e, inclusive na identificação de raças fisiológicas. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da temperatura, estágio de desenvolvimento e época de avaliação na reprodução de diferentes biótipos de *M. exigua* em mudas de cafeeiro ‘Catuaí Vermelho IAC 44’.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Informações gerais

Foram estudadas quatro populações de *Meloidogyne exigua*: uma pertencente à raça 1 com o fenótipo E1 (Rm 1,60) obtida em Canaã, MG e duas da raça 2 (Carneiro & Almeida, 2000), uma com fenótipo E1 (Rm 1,60) e a outra com fenótipo E2 (Rm 1,60 e 1,90), coletadas em Muriaé e Manhuaçu, MG, respectivamente, e a raça 3 (seringueira) com fenótipo E1b (Rm 1,10 e 1,60), coletadas em plantas de seringueira no município de São José do Rio Claro, MT.

As populações da raça 1 e 2 foram mantidas em mudas de cafeeiros cultivar Catuaí Vermelho IAC 44 por um período de aproximadamente um ano, enquanto que a população pertencente à raça 3 foi mantida em mudas de seringueira clone RRIM 600 por sete meses.

As plantas utilizadas na multiplicação dos nematóides e na realização dos ensaios foram mantidas na casa de vegetação e câmaras de crescimento do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, com os tratamentos culturais necessários ao desenvolvimento das mesmas, de acordo com as recomendações técnicas para a cultura.

### Caracterização isoenzimática e fisiológica das populações

Para a averiguação dessas populações de *M. exigua* quanto à pureza da espécie e ao fenótipo de esterase, foi empregada a técnica de eletroforese vertical em sistema descontínuo (Mini-protean), proposta por Ornstein & Davis (1964). Cerca de 20 fêmeas de cada população de *Meloidogyne*, em início de postura e com coloração branco-leitosa, foram retiradas de raízes com galhas e colocadas em microtubos contendo 10 µL de solução extratora. Para cada população foram utilizadas aproximadamente 240 fêmeas por corrida eletroforética. Após a maceração das fêmeas, os extratos protéicos foram aplicados nas cavidades do gel de poliacrilamida (empilhamento 4% e separação 8%) para subsequente corrida eletroforética. A etapa de empilhamento foi conduzida a 80 V por 15 minutos, seguida pela corrida de separação a 200 V por 35 minutos. Após interromper a corrida, o gel foi retirado e mergulhado em solução reveladora para a enzima esterase (Alfenas et al, 1991) e fixado em solução alcoólica (Carneiro & Almeida, 2001). Em

seguida, os géis foram lavados e submetidos à secagem pelo método do bastidor durante 24 horas (Alfenas & Brune, 1998).

Para a confirmação das “raças”, conforme proposta de Carneiro & Almeida (2000), foram utilizadas as seguintes plantas: tomateiro ‘Rutgers’, pimentão ‘Early California Wonder’, cafeeiro ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ e seringueira clone RRIM 600.

A inoculação foi realizada quando as plantas atingiram 3 a 4 pares de folhas definitivas, utilizando-se 5000 ovos/planta. A avaliação foi realizada 60 dias após a inoculação. Foram avaliadas as seguintes variáveis: número de galhas e de ovos por sistema radicular. A primeira variável foi utilizada para atribuir notas de 0 a 5, segundo a escala de Taylor & Sasser (1978). As plantas que obtiveram nota igual ou inferior a 2 (número de galhas ≤ 10) foram consideradas resistentes, reação (-), e as plantas com nota maior que 2 (número de galhas >10) foram consideradas suscetíveis, reação (+).

### **Obtenção e multiplicação do inóculo**

Os ovos de nematóides foram extraídos segundo o método de Boneti & Ferraz (1981). Assim, raízes foram lavadas cuidadosamente em água corrente para retirar partículas de solo aderidas, picadas em pedaços de aproximadamente 1 a 2 cm e trituradas em liquidificador com solução de NaOCl 0,5% por 20 segundos. A concentração de ovos foi determinada em câmara de contagem de Peters e a suspensão calibrada para 1000 ovos/mL.

### **Obtenção das mudas de cafeeiro**

Sementes de cafeeiro ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ 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”, as mesmas foram transplantadas para vasos de argila de 0,5 L ou plástico de 2,0 L de capacidade, contendo uma mistura de solo e areia 2:1 (v/v) igualmente tratada.

### **Efeito da temperatura na reprodução das populações de *M. exigua***

Para a realização do ensaio, foram utilizadas as populações citadas, exceto a raça 3 (seringueira) e mudas de cafeeiro ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ com 3 a 4 pares de folhas definitivas nas temperaturas de 18, 22, 26 e 30°C.

Quando as mudas atingiram dois a três pares de folhas definitivas foi realizada a inoculação com 5.000 ovos por planta, que foram colocados em dois orifícios de 3 cm de profundidade feitos ao lado de cada planta. O experimento foi montado num delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com 8 repetições, cujos fatores estudados foram 4 níveis de temperaturas e três populações de *M. exigua*.

A avaliação foi realizada aos 90 dias da inoculação. Foram avaliadas as seguintes variáveis: número de ovos e de galhas por sistema radicular e a massa da matéria seca da parte aérea. A primeira variável foi usada para a determinação do fator de reprodução ( $FR = Pf/Pi$ ), em que  $Pf$  = população final e  $Pi$  = população inicial do nematóide (Oostenbrink, 1966). Enquanto, que a última variável foi utilizada para calcular o índice de redução (IR) da massa da matéria seca em percentagem em relação à testemunha. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de médias, utilizando-se o programa estatístico SAEG (Euclides, 1983).

### **Efeito do estágio de desenvolvimento de mudas de cafeeiro na reprodução das populações de *M. exigua***

Foram utilizadas mudas de cafeeiro ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ nos seguintes estádios de desenvolvimento: “palito de fósforo”, folhas cotiledonares (“orelha de onça”), dois e seis pares de folhas definitivas.

A inoculação constou de 5.000 ovos/planta, que foram colocados em dois orifícios de 3 cm de profundidade feitos ao lado de cada planta. O experimento foi montado num delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com 8 repetições. Os fatores estudados foram 4 estádios de desenvolvimento do cafeeiro e 4 populações de *M. exigua*.

A avaliação foi realizada aos 90 dias após a inoculação. Foram avaliadas as seguintes variáveis: número de ovos e galhas por sistema radicular e a massa da matéria seca da parte aérea do cafeeiro. A primeira variável foi usada para a determinação do fator

de reprodução ( $FR = Pf/Pi$ ), em que  $Pf$  = população final e  $Pi$  = população inicial do nematóide (Oostenbrink, 1966). A segunda variável foi avaliada atribuindo-se notas variando de 0 a 5, segundo a escala de Taylor e Sasser (1978). Calculou-se também o índice de redução (IR), em percentagem, da massa da matéria seca da parte aérea em relação à testemunha (cafeeiros não inoculados).

Para atender as pressuposições de normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cochran e Bartlett), os dados foram transformados em  $\log(x + 1)$  e submetidos à análise de variância e testes de médias, utilizando-se o programa estatístico SAEG (Euclides, 1983).

### **Reprodução de populações de *M. exigua* em mudas de cafeeiro avaliadas em diferentes épocas**

Foram inoculadas mudas de cafeeiro 'Catuaí Vermelho IAC 44' com 3-4 pares de folhas definitivas, e as seguintes épocas de avaliação: 60, 90, e 120 dias após a inoculação.

A inoculação constou de 5.000 ovos/planta, que foram colocados em dois orifícios com 3 cm de profundidade feitos ao lado de cada planta. O experimento foi montado num delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com 8 repetições, contemplando os fatores três épocas de avaliação e três populações de *M. exigua*.

As avaliações foram realizadas aos 60, 90 e 120 dias após a inoculação. Foram avaliadas as seguintes variáveis: massa da matéria seca da parte aérea, número de galhas e de ovos por sistema radicular. Esta última variável foi utilizada para determinar o fator de reprodução do nematóide (FR) conforme proposto por Oostenbrink (1966). Calculou-se também o índice de redução (IR), em percentagem, da massa da matéria seca da parte aérea em relação à testemunha (cafeeiros não inoculados).

Os dados referentes ao número de galhas e ovos por sistema radicular foram transformados para  $\log(x)$  e submetidos à análise de variância no programa estatístico SAEG (Euclides, 1983). Os valores da massa da matéria seca da parte aérea atenderam as pressuposições de normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cochran e Bartlett), não sendo necessário, transformá-los para realizar a análise de variância (Ribeiro Junior, 2001).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Reprodução de populações de *M. exigua* em mudas de cafeeiro sob diferentes temperaturas

Não houve interação significativa entre população e temperatura e também não foram verificadas diferenças estatísticas entre as populações de *M. exigua*, quanto ao número de galhas, de ovos e produção de matéria seca da parte aérea de mudas de cafeeiro. Entretanto, a temperatura teve influência ( $P \leq 0,05$ ) sobre a reprodução do nematóide (Tabela 1) e no desenvolvimento do cafeeiro (Tabela 2). Como não houve diferenças estatísticas entre as populações do patógeno, apenas a população 1 (raça 1 com o fenótipo E1 (Rm 1,60) – Canaã, MG) foi representada nas tabelas. A temperatura de 26°C foi a melhor para a produção de matéria seca e ovos, mas, para o número de galhas não diferiu de 22°C ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 1** - Números médios de galhas (NG) e de ovos (NO) produzidos por *Meloidogyne exigua* \* em mudas de cafeeiro mantidas às temperaturas de 18, 22, 26 e 30°C

Temperaturas	NG	IG <sup>1</sup>	NO	FR <sup>2</sup>
18°C	82,40 b	4	1801,50 c	0,36
22°C	111,50 a	5	7252,00 b	1,45
26°C	210,40 a	5	9998,90 a	2,00
30°C	33,00 c	4	1619,00 c	0,32

<sup>1</sup> Índice de galhas conforme Taylor & Sasser (1978) e <sup>2</sup> Fator de reprodução conforme Oostenbrink, 1966). Médias de 8 repetições. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

\* população 1 (fenótipo E1, raça 1 – oriunda do município de Canaã, MG).

O desenvolvimento do cafeeiro, medido pela massa da matéria seca da parte aérea apresentou grande variação quanto às temperaturas em estudo, com valores médios de 0,44 até 1,09 g/parte aérea a 30 e 26°C (Tabela 2), respectivamente, porém não houve diferença estatística na testemunha em relação às plantas inoculadas com as populações de *M. exigua*.



O índice de redução da matéria seca, calculado em relação à testemunha, mostrou os menores índices a 22 e 26°C, variando, respectivamente, de 5,98 a 13,03% e de 2,83 a 6,60% dentre as populações. Para as outras temperaturas, essa variação foi de 23,43 a 32,79% (dados não mostrados).

**Tabela 2** - Produção (g) e índice de redução (IR%) da matéria seca da parte aérea de mudas de cafeeiros nas temperaturas de 18, 22, 26 e 30°C, aos 90 dias após a inoculação com *Meloidogyne exigua* \*

Temperaturas	Matéria seca (g)		
	Testemunha	Pop. 1	IR (%)
18°C	0,64 ns	0,44 c	31,25
22°C	0,69	0,65 b	5,98
26°C	1,06	0,99 a	6,60
30°C	0,61	0,41 c	32,79

Médias de 8 repetições. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Ns = não significativo.

\* população 1 (fenótipo E1, raça 1 – oriunda do município de Canaã, MG).

A reprodução de *M. exigua* foi bastante reduzida à temperatura de 18°C, cujo número de ovos foi de aproximadamente cinco vezes menor do que a 26°C. À temperatura de 30°C, a maior entre as estudadas, teve efeito negativo sobre o desenvolvimento do nematóide de maneira similar àquela de 18°C.

Os dados apresentaram a mesma tendência daqueles obtidos por Tronconi et al. (1986), cuja taxa reprodutiva à 16°C foi quase 20 vezes menor do que aquela à 24°C. Essas observações confirmam a adaptação biológica de *M.exigua* ao ambiente tropical, onde tem infectado culturas tipicamente tropicais. Uma outra indicação dessa capacidade adaptativa é aquela observada por Lordello, em 1982, na qual estimou que a temperatura basal de desenvolvimento era de 15°C. Contudo, existem indicações de que em temperaturas superiores a 30°C há uma influência negativa no ciclo de vida desse nematóide (Lima et al., 1985). Esses autores não detectaram qualquer desenvolvimento embriogênico em *M. exigua* a 35°C.

No geral, as temperaturas mais favoráveis ao desenvolvimento e à reprodução do nematóide foram semelhantes às aquelas que beneficiaram o desenvolvimento do cafeeiro. O comportamento reprodutivo das três populações de *M. exigua* aqui estudadas foi semelhante ao da população avaliada por Tronconi et al. (1986), uma vez que a reprodução desta foi mais alta às temperaturas variando de 20 e 24°C.

Em condições de temperaturas desfavoráveis ao desenvolvimento do cafeeiro, o processo infeccioso de *M. exigua* foi mais prejudicial à planta. Os maiores IR ocorreram a 18 e 30°C, cujos valores foram de 31,25 e 32,79%, respectivamente (Tabela 2). No entanto, apesar do nematóide apresentar maior reprodução a 22 e 26°C ( $P = 0,05$ ), o seu efeito sobre o desenvolvimento do cafeeiro nessas temperaturas foi baixo em relação às demais temperaturas (Tabela 2). Esses resultados mostram que em temperaturas na faixa de 22 a 26°C, ou seja, as mais favoráveis ao desenvolvimento da planta, as mudas de cafeeiro são mais tolerantes ao ataque do *M. exigua*. Isso significa que em condições de campo, o manejo das plantas em áreas infestadas com esse nematóide é preponderante quando estas estão sob condição de estresse causado por temperaturas inapropriadas ao hospedeiro. Moura (1997) ressalta que a tolerância de plantas às populações de *Meloidogyne* spp. pode ser favorecida (ou desfavorecida) por alguns fatores ambientais, em especial, a temperatura e a constituição mineral do solo.

Dentro de uma mesma espécie de *Meloidogyne* já foi observada diferença quanto à exigência de temperatura, cuja temperatura ótima para a reprodução de uma população de *M. incognita*, proveniente da Holanda, foi 5°C mais baixa do que uma população da Venezuela (Dao, 1970). As populações utilizadas no presente estudo apresentaram-se diferentes quanto aos fenótipos de esterase e, até mesmo, às preferências por hospedeiro, mas foram semelhantes quanto às exigências de temperatura. Isto possivelmente ocorreu devido as populações de *M. exigua* terem sido coletadas em municípios diferentes, mas com clima/temperatura muito similares.

Os dados aqui obtidos, a respeito da interação da temperatura com o nematóide, podem contribuir para o entendimento da dinâmica populacional do mesmo e para as estimativas de prejuízos para a cultura. Além disso, podem ser úteis para os pesquisadores que necessitam multiplicar essa espécie de nematóide para a realização de experimentos, como aqueles dos programas de melhoramento visando resistência genética, nos quais uma quantidade significativa de inóculo é requerida.

### **Efeito do estágio de desenvolvimento na reprodução das populações de *M. exigua***

Durante o período experimental, registraram-se as temperaturas médias mínimas e máximas de 18,7 e 29,7°C, respectivamente.

A população de *M. exigua*, oriunda de plantas de seringueira do Mato Grosso do Sul, raça 3, fenótipo de esterase E1b (Rm 1,10 e 1,60) não infectou o cafeeiro, não induziu a formação de galhas e nem produziu ovos, em nenhum dos estádios de desenvolvimento da planta estudados. Em razão disso, a mesma foi excluída da análise estatística.

Não houve interação significativa entre população e estágio de desenvolvimento e também não foram verificadas diferenças estatísticas ( $P > 0,05$ ) entre as populações de *M. exigua*, quanto às variáveis analisadas. Já o estágio de desenvolvimento das mudas de cafeeiro teve efeito ( $P \leq 0,05$ ) na expressão dos sintomas (número e índice de galhas) e na reprodução de *M. exigua* (número de ovos e fator de reprodução) (Tabela 3). Observou-se que a inoculação nas mudas mais velhas, com seis pares de folhas definitivas, resultou em maior reprodução de *M. exigua* ( $P \leq 0,05$ ), com número de galhas e de ovos cerca de 17 vezes maior que em “palito de fósforo”.

O fator de reprodução (FR) em mudas com seis pares de folhas foi mais de seis vezes superior ao do estágio dois pares de folhas, mas foi 9,6 e 17,1 vezes maior que em “orelha de onça” e “palito de fósforo”, respectivamente. Nos estádios 1, “palito de fósforo”, e 2, “orelha de onça”, o FR foi inferior a 1, nos demais foram superiores a 1. Enquanto, que os índice de galhas (IG) foi igual a 4 nos estádios 1, 2 e 3, mas igual a 5, no estágio 4 (Tabela 3).

**Tabela 3** - Número médio de galhas (NG) e de ovos (NO), índice de galhas (IG), e fator de reprodução (FR) de *Meloidogyne exigua*\* em raízes de mudas de cafeeiro, inoculadas em diferentes estádios de desenvolvimento

ESTÁDIO	NG	IG	NO	FR
<b>E1 (palito de fósforo)</b>	42,13 d	4	1974,54 d	0,39
<b>E2 (orelha de onça)</b>	66,17 c	4	3461,58 c	0,69
<b>E3 (2 pares de folhas)</b>	77,21 b	4	5071,38 b	1,01
<b>E4 (6 pares de folhas)</b>	716,21 a	5	33248,50 a	6,65

Média de 8 repetições. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Índice de galhas (Taylor & Sasser, 1978), e fator de reprodução (Oostenbrink, 1966).

\* população 1 (fenótipo E1, raça 1 – oriunda do município de Canaã, MG).

A infestação do solo com a população 4, isto é, raça 3 de *M. exigua* não interferiu no desenvolvimento das plantas de café. Mas, o processo infeccioso iniciado pelas demais populações de *M. exigua* interferiram negativamente no desenvolvimento das mudas de cafeeiro em todos os estádios (Tabela 4). A matéria seca da parte aérea das plantas não inoculadas foi maior ( $P < 0,05$ ) do que nas plantas inoculadas. O índice de redução (IR%) foi semelhante nos diferentes estádios, variando entre 17 e 21% (Tabela 4).

**Tabela 4** - Produção (g) e índice de redução (IR%) da massa da matéria seca da parte aérea de mudas de cafeeiro, inoculadas em diferentes estádios de desenvolvimento com *Meloidogyne exigua*\*

Estádio	Matéria seca (g)		IR (%)
	Testemunha	<i>M. exigua</i>	
<b>E1 (palito de fósforo)</b>	0,59 cA	0,49 cB	16,95
<b>E2 (orelha de onça)</b>	0,85 cA	0,68 cB	20,00
<b>E3 (2 pares de folhas)</b>	1,14 bA	0,90 bB	21,05
<b>E4 (6 pares de folhas)</b>	5,49 aA	4,38 aB	20,22

Média de 8 repetições. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

\* população 1 (fenótipo E1, raça 1 – oriunda do município de Canaã, MG).

O cafeeiro arábica, apesar de ser considerado o hospedeiro tipo de *M. exigua* (Goeldi, 1887), não respondeu com formação de galhas e nem permitiu a reprodução da população de *M. exigua* oriunda de plantas de seringueira do Mato Grosso do Sul. Ficou claro que independente do estágio de desenvolvimento das mudas não há formação de galhas e reprodução dessa população. Carneiro & Almeida (2000) também tentaram, sem sucesso, multiplicar e reproduzir os sintomas em mudas de cafeeiro no estágio de 3-4 pares de folhas definitivas.

A maior taxa reprodutiva proporcionada pelas mudas mais velhas se deve, provavelmente, ao maior volume de raízes disponíveis para a penetração dos juvenis do nematóide. Nos estádios iniciais das mudas, o sistema radicular é menos desenvolvido e as chances dos juvenis de segundo estágio (J2), mesmo que ativos, encontrarem e, conseqüentemente, invadirem as raízes diminuem consideravelmente (Lordello et al, 1977). Embora não tenha sido feito o cálculo da massa de raízes das mudas, sabe-se que há uma correspondência proporcional entre o desenvolvimento da parte aérea e da raiz do cafeeiro. Assim, os estádios 3 e 4 que produziram 1,14 e 5,49 g de matéria seca na parte aérea, respectivamente, certamente também produziram mais massa de raízes.

Considerando apenas o FR, nos estádios iniciais de desenvolvimento do cafeeiro, a cultivar Catuaí erroneamente seria classificada como má hospedeira ( $FR < 1$ ) segundo critério de Seinhorst (1967) citado por Moura (1997). Isto indica aos nematologistas e fitomelhoristas que a escolha do estágio de desenvolvimento da muda de cafeeiro é um critério fundamental para a avaliação e seleção de fontes de resistência à *M. exigua*.

Segundo Taylor & Sasser (1978), plantas com notas 0, 1 e 2 são classificadas como resistentes, enquanto que plantas com notas 3, 4 e 5 são suscetíveis. De acordo com este critério, em todos os estádios de desenvolvimento vegetativo, o cafeeiro 'Catuaí Vermelho IAC 44' seria classificado como suscetível ou bom hospedeiro das populações de *M. exigua*. Fato este coerente, uma vez que, esse cultivar é utilizado como padrão de suscetibilidade ao nematóide. Esses resultados concordam com os obtidos por Lordello et al. (1977), em que o número de galhas das plantas de café no estágio de "orelha de onça" foi maior do que no estágio de "palito de fósforo", embora esse autor tenha comparado apenas estes dois estádios de desenvolvimento.

Alguns autores consideram a presença e o número de galhas como um critério inconsistente para ser utilizado na avaliação de fontes de resistência (Moura, 1997; Asmus

et al., 2000). Para sustentar essa posição, argumentam que em plantas resistentes ao nematóide das galhas pode haver formação de galhas sem que haja reprodução do nematóide, e que em algumas plantas suscetíveis pode não ocorrer à formação das mesmas (Moura, 1997). No entanto, com base na quantidade de galhas induzidas por *M. exigua* em *Coffea* spp. observou-se uma relação direta com a reprodução do nematóide como visto pelo número de ovos e FR. Diante disso, o número de galhas induzidas por esse nematóide pode ser considerado um real indicador de diferenças na reprodução do nematóide em mudas de cafeeiros. Essa consistência na relação galhas (sintomas) e número de ovos (reprodução) já têm sido observados por outros autores ao estudar vários genótipos de cafeeiro (Gonçalves & Pereira, 1998; Bertrand et al., 2001). A vantagem que se pode tirar dessa informação é que em fases iniciais dos programas de melhoramento do cafeeiro visando resistência a *M. exigua*, é possível avaliar apenas o número de galhas como expressão da suscetibilidade das progênies. Esse fato resulta numa grande economia de tempo, sem perder em confiabilidade, uma vez que nestas fases o número de progênies avaliadas é muito alto.

Sabe-se que em cafeeiro, a formação de galhas indica que a interação com *M. exigua* foi bem sucedida (Lordello et al., 1977; Gonçalves & Pereira, 1998; Bertrand et al., 2001). Dessa forma, as fêmeas ali estabelecidas irão reproduzir, o que pode variar é o número e a capacidade reprodutiva das mesmas. No entanto, resultados mais conclusivos podem ser obtidos ao utilizar mudas a partir de dois pares de folhas definitivas e avaliar conjuntamente o número de galhas e de ovos.

Uma importante informação gerada nesse trabalho, a respeito da reprodução de *M. exigua*, é que essa foi bem maior, cerca de seis vezes, ao se utilizar mudas de com seis pares de folhas, quando comparadas ao de dois pares de folhas. Esse é o estágio das mudas mais utilizado em experimentos envolvendo cafeeiro e *Meloidogyne* spp. Dessa forma, é recomendada a utilização de mudas mais velhas (seis pares de folhas) quando houver necessidade de grande quantidade de inóculo para a realização de experimentos.

As mudas infectadas com *M. exigua* tiveram seu desenvolvimento vegetativo prejudicado. Esse efeito depressivo da infecção de *M. exigua* no desenvolvimento vegetativo de mudas de cafeeiro já foi relatado por diversos autores (Boneti et al., 1982; Gonçalves et al., 1996/1998).

Embora as populações de *M. exigua* estudadas apresentassem diferenças nos fenótipos de esterase (E1 e E2) e na virulência a outras espécies de plantas (tomateiro e o pimentão), as mesmas apresentaram o mesmo comportamento na interação com o cafeeiro, independente dos estádios de desenvolvimento estudados. Esses resultados revelam que essas populações são similarmente adaptadas ao parasitismo do cafeeiro, com exceção da população oriunda da seringueira (fenótipo E1b) que não foi capaz de infectar quaisquer dos estádios vegetativos do cafeeiro.

### **Reprodução de populações de *M. exigua* em mudas de cafeeiro avaliadas em diferentes épocas**

Durante o período experimental, registraram-se as temperaturas médias mínimas e máximas de 16,4 e 29,6°C, respectivamente. Essas temperaturas estão entre aquelas que favoreceram o desenvolvimento das mudas de cafeeiro.

Não houve interação significativa entre população e época de avaliação e também não foram verificadas diferenças estatísticas ( $P > 0,05$ ) entre as populações de *M. exigua*, quanto ao desenvolvimento do cafeeiro, produção de ovos e galhas. A expressão dos sintomas e a reprodução das três populações de *M. exigua* foram influenciadas pelas épocas de avaliações de maneira semelhante (Tabela 5). O número de galhas e ovos por sistema radicular do cafeeiro foi crescente ao longo do período avaliado. A última época de avaliação, 120 dias após a inoculação, apresentou os maiores valores ( $P \leq 0,05$ ) para essas variáveis. Nessa época, o número médio de galhas induzidas por *M. exigua* foi de 146 e a produção de ovos de 11.578 (média das três populações, dados não mostrados).

**Tabela 5** - Número médio de galhas (NG) e de ovos (NO) produzidos em raízes de mudas de cafeeiros aos 60, 90 e 120 dias após a inoculação com *Meloidogyne exigua*\*

Épocas de Avaliação	NG	IG	NO	FR
60 dias	52,17 c	4	1584,89 c	0,32
90 dias	72,84 b	4	5951,21 b	1,19
120 dias	136,64 a	5	10022,64 a	2,00

Médias de 8 repetições. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

\* população 1 (fenótipo E1, raça 1 – oriunda do município de Canaã, MG).

A matéria seca da parte aérea das plantas não inoculadas (testemunha) diferiu das plantas inoculadas ( $P \leq 0,05$ ). O maior índice de redução (IR), transformado em percentagem, foi observado nos primeiros 60 dias após a inoculação, no qual alcançou 31,97 % (Tabela 6). As médias do IR considerando as três épocas de avaliação foram de 22,96; 19,47 e 20,01%, para as populações 1, 2 e 3 de *M. exigua*, respectivamente. Ao longo do tempo o IR foi diminuindo, cujos valores aos 120 dias, última época de avaliação reduziu para 16,95 na população 1.

**Tabela 6** - Produção (g) e índice de redução (IR%) da massa da matéria seca da parte aérea de mudas de cafeeiro aos 60, 90 e 120 dias após a inoculação com *Meloidogyne exigua*\*

Épocas de Avaliação	Matéria seca (g)		
	Testemunha	<i>M. exigua</i>	IR (%)
60 dias	0,60 cA	0,41 cB	31,97
90 dias	0,98 bA	0,74 bB	24,49
120 dias	1,18 aA	0,98 aB	16,95

Média de 8 repetições. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

\* população 1 (fenótipo E1, raça 1 – oriunda do município de Canaã, MG).



Gonçalves (1998), em estudo com uma população de *M. exigua* oriunda de cafeeiro do município de São Sebastião do Paraíso, MG, observou que aos 100 dias após a inoculação o IR foi de 4,2; 19,3; 22,1; 22,3 e 29% para os níveis de inóculo de 1000, 2000, 4000, 8000 e 12000 ovos/planta, respectivamente. Ao analisarmos o IR ao nível de inóculo de 4000 ovos/planta (22,1%) utilizado por esse autor, que é próximo ao utilizado no presente trabalho, que foi de 5000 ovos/planta, percebe-se que os dados são muito semelhantes. O IR foi maior na primeira época de avaliação, isto é, aos 60 dias e menor na última aos 120 dias para todas as populações estudadas. Isso possivelmente pode ser explicado devido ao fato de que os nematóides do gênero *Meloidogyne* são mais prejudiciais nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta (Seinhorst, 1965) e à medida que o sistema radicular se desenvolve o mesmo torna-se mais tolerante a infecção pelo nematóide. Esse efeito depressivo do processo infeccioso de *M. exigua* no desenvolvimento vegetativo de mudas de cafeeiro já foi relatado por diversos autores, mesmo em estudos com outros genótipos (Boneti et al., 1982; Gonçalves et al., 1996; Gonçalves, 1998).

A cultivar Catuaí é considerada como padrão de suscetibilidade aos nematóides do gênero *Meloidogyne*, e o FR igual a 1 é usado como o limite para classificar as plantas como resistentes ou suscetíveis (Oostenbrink, 1966). Assim, observou-se que os FR para as populações estudadas foram considerados baixos na primeira época de avaliação, cujos valores oscilaram entre 0,32 e 0,48, o que levaria a classificá-los erroneamente, como resistentes. A partir de 90 dias, segunda época de avaliação, os valores foram superiores a 1 e variaram entre 1,19 a 2,70, resultado compatível ao se tratar de cultivares suscetíveis.

A utilização de mudas com até dois pares de folhas definitivas seria interessante nos estudos de seleção de genótipos de cafeeiro com resistência a *Meloidogyne* spp. devido ao fator tempo. A produção de mudas de café é demorada e esperar por estádios mais avançados de desenvolvimento vegetativo torna o processo seletivo dispendioso, ainda mais, que o período para a avaliação vai gastar pelo menos três meses após a inoculação. Entretanto, a redução do tempo gasto nesse tipo de ensaio poderá levar a classificar um o material genético como resistente quando simplesmente o período foi insuficiente para o desenvolvimento do nematóide naquela planta. Diante desses resultados, é recomendável que em pesquisas de melhoramento de plantas visando avaliar as possíveis fontes de

resistência de cafeeiros a *M. exigua*, e na diferenciação de possíveis raças, a avaliação das mudas seja realizada a partir de 90 dias após a inoculação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C., PETERS, L., BRUNE, W. & PASSADOR, G.C. 1991. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais, Sociedade de Investigações Florestais Viçosa: UFV, 242p.
- ALFENAS, A.C. & BRUNE, W. 1998. 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, 574p.
- ALMEIDA, A.M.R. & SILVEIRA, J.M. 1983. Efeito da idade de inoculação de plantas de soja com o vírus do mosaico da soja e da percentagem de plantas infectadas sobre o rendimento e algumas características econômicas. *Nematologia Brasileira*, 8:229-236.
- ASMUS, G. FERRAZ, L. C. C. B. & B. APPEZZATO-DA-GLÓRIA. 2000. Alterações anatômicas em raízes de milho (*Zea mays* L.) parasitadas por *Meloidogyne javanica*. *Nematropica*, 30: 33-39.
- BARBOSA, D.H.S.G., VIEIRA, H.D., SOUZA, R.M., VIANA, A.P. & SILVA, C.P. 2004. Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. *Nematologia Brasileira*, 28:49-54.
- BERTRAND, B.T., ANTHONY, F. & LASHERMES, P. 2001. Breeding for resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica* by introgression of resistance genes of *Coffea Canephora*. *Plant Pathology*, 50: 637-643.
- BONETI, J.I.S. & FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6:553.
- BONETI, J.I.S., FERRAZ, S., BRAGA, J.M. & OLIVEIRA, L.M. 1982. Influência do parasitismo de *Meloidogyne exigua* sobre a absorção de micronutrientes (Zn, Cu, Fe, Mn e B) e sobre o vigor de mudas de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6:197-207.
- CAMPOS, V.P., LIMA, R.D & ALMEIDA, V.F. 1985. Nematóides parasitas do cafeeiro. *Informe Agropecuário*, 11:50-58.

- CARNEIRO, R.M.D.G. & ALMEIDA, M.R.A. 2000. Caracterização isoenzimática e variabilidade intraespecífica dos nematóides de galhas do cafeeiro no Brasil. In: I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Anais, Poços de Caldas, MG. pp. 280-282.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & ALMEIDA, M.R.A. 2001. Técnica de Eletroforese usada no Estudo de enzimas dos nematóides das galhas para identificação de espécies. Fitopatologia Brasileira, 25: 35-44.
- CONAB. 2005. Companhia Nacional de Abastecimento – Secretaria da Produção e Comercialização/CONAB. Safra brasileira de café estimada 2004/2005. Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br/spc.htm>> Acesso 20 fevereiro de 2005.
- DAVIS, B.J. Disc electrophoreses. II. 1964. Method end Application to human serum proteins. Annals of the New York Academy of Sciences, 121:404-427.
- ESBENSHADE, P.R & TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Electrophoretic methods for the study of root-knot nematode enzymes. In: BARKER, K.R., CARTER, C.C., SASSER, J.N. (Eds.) An advanced treatise on *Meloidogyne*. North Carolina State University Graphics. p.115-123.
- EUCLYDES, R.F. 1983. Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para análises Estatística e Genética).Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 59p.
- GONÇALVES, W., FERRAZ, L.C.C.B., LIMA, M.M.A. & SILVAROLLA, M.B. 1996. Reações de cafeeiros às raças 1, 2 e 3 de *Meloidogyne incognita*. Summa Phytopathologica, 22:172-177.
- GONÇALVES, W. 1998. Efeito de diferentes níveis e inóculo na avaliação precoce da reação do cafeeiro a *Meloidogyne exigua*. Nematologia Brasileira, 22: 75-78.
- GONÇALVES, W. & PEREIRA, A.A. 1998. Resistência de cafeeiro a nematóides IV Reação do cafeeiro derivados do híbrido de Timor a *Meloidogyne exigua*. Nematologia Brasileira, 22: 39-49.
- LIMA, R.D. & FERRAZ, S. 1985. Biologia de *Meloidogyne exigua* II. Desenvolvimento pós-embriogênico em cafeeiro Mundo Novo. Revista Ceres, 32: 349-361.
- LORDELLO, R.R.A, FAZUOLI, L.C & GONÇALVES, W. 1977. Estudo da infestação de cafeeiro com *Meloidogyne exigua* em dois estádios de desenvolvimento. Nematologia Brasileira, 2:201-205.
- LORDELLO, R. R.A. 1982. Desenvolvimento de *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887, em raízes de cafeeiros, em três ambientes. Piracicaba. ESALQ, 43p. (Dissertação de mestrado 1982).
- MOURA, R. M. 1997. O Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose parte II. Revisão Anual de Patologia de Plantas, 5: 281-315.

- OLIVEIRA, D.S., LIMA, R.D., ROESE, A.D. & SILVA, R.V. 2001. Caracterização morfológica e bioquímica de populações de *Meloidogyne* spp. em cafeeiros na Zona da Mata de Minas Gerais. In: II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Anais, Vitória, ES, pp. 1072-1077.
- OOSTENBRINK, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Meded. Landbouw. Wageningen. 66:1-46.
- ORNSTEIN, L. 1964. Disc electrophoreses. I. Background and Theory. Annals of the New York Academy of Sciences, 121:321-349.
- RIBEIRO JUNIOR, J.I. 2001. Análises estatísticas no SAEG. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 301p.
- RIBEIRO, R.C.F., PEREIRA, A.A., OLIVEIRA, C.H. & LIMA, R.D. 2005. Resistência de progênies de híbridos interespecíficos de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* a *Meloidogyne exigua*. Nematologia Brasileira, (no prelo).
- SENHORST, J.W. 1965. The relationship between nematode density and damage to plants. Nematologica, 11: 137-154.
- SILVA, R.V., OLIVEIRA, R.D., PEREIRA, A.A. & PINTO, F.S. 2003. Variabilidade de *Meloidogyne exigua* em genótipos de cafeeiro. In: XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Resumo, Uberlândia, MG, 28: 293.
- TAYLOR, A.L. & SASSER, J.N. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Coop. Publ. Dep. Plant. Pathol., north Carolina State University Graphics Raleigh. 111p.
- TRONCONI, N. M., FERRAZ, S., SANTOS, J. M. & REGAZZI, A. J. 1986. Influência da temperatura na patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne exigua* em mudas de cafeeiro. Nematologia Brasileira, 10: 69-83.

## **CAPÍTULO 2**

**Diferenciação de raças de *Meloidogyne exigua* em *Coffea* spp.**

## INTRODUÇÃO

O café é um dos mais importantes produtos agrícolas comercializados no mundo e a principal fonte econômica de vários países dos continentes americano e africano. Dentre as espécies, cerca de 80 do gênero *Coffea* (Cros, 1994), somente duas são cultivadas comercialmente, *C. arabica* e *C. canephora*. A primeira representa mais de 70% do café comercializado no mundo. Entretanto, as outras espécies são importantes no melhoramento de *C. arabica*, por possuírem genes de resistência a pragas e doenças e a condições adversas do ambiente (Gonçalves & Silvarolla, 2001).

Em países como o Brasil, Colômbia, Venezuela e alguns da América Central, *Meloidogyne exigua*, Goeldi 1887, representa um sério problema para a cafeicultura, pois constitui um fator limitante para a obtenção de alta produtividade em cafeeiros do tipo arábica (Campos et al., 1990; Barbosa et al., 2004).

A variabilidade genética já é conhecida em espécies do gênero *Meloidogyne*. Essa é consequência possivelmente da forma de reprodução desses nematóides que passa pela anfimixia até a partenogênese obrigatória, ao grau de ploidia que vai desde haplóide até vários níveis de poliploidia, incluindo também as variações no número de cromossomos somáticos, que variam de 14 a 74 (Caswell & Roberts, 1987) e, também devido às mutações. A espécie *M. exigua* se reproduz por partenogênese meiótica facultativa, modo de reprodução com menor estabilidade genética comparada às espécies de *Meloidogyne* que se reproduzem por partenogênese mitótica (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985).

Nos últimos anos, estudos com populações de *M. exigua* oriundas de cafeeiro e seringueira, têm revelado diferenças bioquímicas no padrão isoenzimático para a enzima esterase com a detecção de quatro fenótipos, tais como, E1 (Rm 1,60), E1a (Rm 1,60 e 1,90), E2 (Rm 1,60 e 1,90) e E1b (Rm 1,10 e 1,60). A diferença entre E1a e o E2 está na intensidade das bandas, pois em E1 a primeira banda (Rm 160) é a de intensidade mais forte, enquanto que no E2 é a segunda banda (Rm 1,90) (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Carneiro & Almeida, 2000; Oliveira et al., 2001).

Em estudos morfológicos de populações de *Meloidogyne* spp., provenientes de cafeeiros da Zona da Mata de Minas Gerais, observou-se que as fêmeas de algumas populações oriundas do município de São João do Manhuaçu apresentaram configurações

perineais semelhantes às de *M. arenaria*, mas nos estudos isoenzimáticos, todas apresentaram o fenótipo de esterase típico de *M. exigua* (Oliveira et al., 2001).

Carneiro & Almeida (2000) propuseram a separação de “raças fisiológicas” de *M. exigua* com base na capacidade de reprodução de diversas populações em plantas de diferentes espécies botânicas. A raça 1 é constituída por indivíduos que infectam o pimentão e o cafeeiro, mas não conseguem infectar o tomateiro. Indivíduos da raça 2 infectam o tomateiro, o pimentão e o cafeeiro, e à raça 3, pertencem os indivíduos que não infectam o tomateiro, o pimentão e nem o cafeeiro, mas atacam a seringueira.

Estudos envolvendo técnicas moleculares também têm mostrado a existência de variabilidade na espécie. Randig et al. (2002), por meio da técnica de RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), detectaram alto nível de polimorfismo intraespecífico (67,5%) entre as populações de *M. exigua* provenientes de cafeeiros e aquelas de seringueira.

Não existem dúvidas quanto à variabilidade fisiológica de *M. exigua*, mas, a identificação desta nos padrões atuais não é tarefa fácil, pois necessita de quatro espécies botânicas, entre elas a seringueira que é de difícil aquisição em várias regiões do país e suas sementes apresentam um curto período de viabilidade. Essas diferenças fisiológicas também não atendem por completo ao conceito de “raças” normalmente adotado para os fitopatógenos. Raças são biótipos distinguidos por sua preferência de hospedeiro dentro de um grupo taxonômico, geralmente cultivares de uma espécie de planta (Sturhan, 1971), diferentemente da usual separação de raças de *Meloidogyne* spp. que envolve plantas de diferentes espécies.

É indiscutível esta variabilidade em genótipos de cafeeiro, mas a expressão da mesma não é bem conhecida. Em *C. canephora*, *C. congensis* e *C. dewevrei*, têm-se encontrado gene(s) de resistência o que permite o seu uso direto como porta-enxertos e, indiretamente, como doadoras de genes para cultivares suscetíveis, porém produtivos de *C. arabica* (Curi et al., 1970; Fazuoli & Lordello, 1978; Gonçalves & Silvarolla, 2001). Híbridos de *C. arabica* e *C. canephora*, como por exemplo, H4782-7-585, H4782-7-785, H4782-7-925, que são resistentes à ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*), apresentaram também resistência a *M. exigua*, *M. incognita* e, ou, *M. paranaensis*, porém esses híbridos têm segregado para essa característica (Gonçalves & Pereira, 1998). Algumas seleções de Híbridos Timor e Catimor que foram consideradas imunes e homozigotas para a resistência

a *M. exigua*, apresentaram também, boas características agronômicas (Gonçalves & Pereira, 1998; Gonçalves & Silvarolla, 2001).

Essas informações mostram a possibilidade de se identificar plantas dentro do gênero *Coffea* com o propósito de se estabelecer uma série diferenciadora de raças para *M. exigua*. Pode-se reforçar tal hipótese com os resultados obtidos por Gonçalves & Pereira (1998) e Silva et al. (2003). Eles demonstraram que algumas progênies derivadas do Híbrido de Timor, como a UFV 1262 e UFV 1680, responderam de forma diferenciada às populações de *M. exigua* originárias de Fervedouro e São Sebastião do Paraíso, MG.

Um estudo dessa natureza poderia servir de suporte para as pesquisas, em especial às de melhoramento tendo em vista a obtenção de plantas resistentes a *M. exigua* e facilitar os trabalhos de diagnose na rotina dos laboratórios de nematologia.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o comportamento reprodutivo de populações de *M. exigua* em genótipos de cafeeiro, os quais já têm mostrado alguma resposta diferencial a esse nematóide, visando detectar e identificar a variabilidade existente nessa espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Origem das populações de *Meloidogyne exigua***

Foram estudadas quatro populações distintas de *M. exigua* oriundas de diversas localidades de modo a abranger, pelo menos, parte da variabilidade existente nesse patógeno, combinando os três fenótipos de esterase e as três “raças” sugeridas para esta espécie (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985; Carneiro & Almeida, 2000; Oliveira et al., 2001). A população 1, pertencente à raça 1, expressou o fenótipo E1 (Rm 1,60) e foi originária de Canaã/MG. A população 2 (raça 2, fenótipo E1) foi obtida em Muriaé/MG, enquanto a população 3 (raça 2 e fenótipo E2 = Rm 1,60 e 1,90) foi coletada em Manhuaçu, MG. A população 4, da raça 3, se reproduz em seringueira e expressa o fenótipo E1b (Rm 1,10 e 1,60), a qual é proveniente de São José do Rio Claro, MT.



### **Caracterização isoenzimática e fisiológica das populações de *Meloidogyne exigua***

Para a averiguação dessas populações de *M. exigua* quanto à pureza da espécie e ao fenótipo de esterase, foi empregada a técnica de eletroforese vertical em sistema descontínuo (Mini-protean), proposta por Ornstein & Davis (1964). Cerca de 20 fêmeas de cada população de *Meloidogyne*, em início de postura e com coloração branco-leitosa, foram retiradas de raízes com galhas e colocadas em micro tubos contendo 10 µL de solução extratora. Para cada população foram utilizadas aproximadamente 240 fêmeas por corrida eletroforética. Após a maceração das fêmeas, os extratos protéicos foram aplicados nas cavidades do gel de poliacrilamida (empilhamento 4% e separação 8%) para subsequente corrida eletroforética. A etapa de empilhamento foi conduzida a 80 V por 15 minutos, seguida pela corrida de separação a 200 V por 35 minutos. Após interromper a corrida, o gel foi retirado das placas e mergulhado em solução reveladora para a enzima esterase (Alfenas et al, 1991) e, posteriormente, foi fixado em solução alcoólica por pelo menos 30 minutos (Carneiro & Almeida, 2001). Em seguida, os géis foram lavados e submetidos à secagem pelo método do bastidor durante 24 horas (Alfenas & Brune, 1998).

Para a confirmação das raças, foram utilizadas as seguintes plantas: tomateiro ‘Rutgers’, pimentão ‘Early California Wonder’, cafeeiro ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ e seringueira clone RRIM 600, conforme usado por Carneiro & Almeida (2000).

A inoculação foi realizada quando as plantas atingiram 3 a 4 pares de folhas definitivas, utilizando-se 5000 ovos/planta. A avaliação foi realizada 60 dias após a inoculação, quando foram avaliados o número de galhas e de ovos por sistema radicular. A primeira variável foi utilizada para atribuir notas de 0 a 5, segundo a escala de Taylor & Sasser (1978). As plantas que obtiveram nota igual ou inferior a 2 (número de galhas = 10) foram consideradas resistentes, reação (-), e as plantas com nota maior que 2 (número de galhas >10) foram consideradas suscetíveis, reação (+).

### **Diferenciação de raças de *Meloidogyne exigua* em *Coffea* spp.**

Empregaram-se genótipos de cafeeiro provenientes do “Programa de Melhoramento de Café da UFV-EPAMIG”, cultivados no Campo de Adaptação e Seleção de Cafeeiros, em Viçosa, MG, conforme apresentado na tabela 5.

Foram selecionados genótipos que apresentaram resultados contraditórios em estudos prévios com populações de *M. exigua*: genótipos descendentes do Híbrido de Timor, cruzamento natural entre *C. arabica* e *C. canephora*, e seus derivados: Catimor (Caturra X Híbrido de Timor), Cavimor (Catuaí X Catimor), Sarchimor (Villa Sarchi X Híbrido de Timor) e Icatu (Cruzamento artificial *C. arabica* X *C. canephora*). Os cultivares IAC-Apoatã e Catuaí Vermelho IAC 44 serviram como padrão de resistência e suscetibilidade, respectivamente.

Sementes de cada um dos genótipos foram semeadas em bandejas contendo areia previamente tratada com brometo de metila ( $100 \text{ cm}^3/\text{m}^3$ ) e colocadas para germinar em câmara de crescimento a temperatura de 30°C. Quando as plântulas atingiram o estágio de “palito de fósforo” foram transplantadas para vasos de argila com capacidade para 0,5 litros, contendo uma mistura de solo e areia 2:1 (v/v), igualmente tratada. A inoculação foi realizada quando as plantas atingiram 3 a 4 pares de folhas definitivas, utilizando-se 5000 ovos/planta.

O ensaio foi conduzido no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, sob condição de casa de vegetação. O experimento foi montado num delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (25 x 4) com 6 repetições. Os fatores foram os 24 genótipos de cafeeiro e quatro populações de *M. exigua*.

Decorridos, 110 dias da inoculação realizou-se a avaliação das seguintes variáveis: número de ovos e de galhas por sistema radicular e a massa da matéria fresca das raízes. A primeira variável foi usada para a determinação do fator de reprodução ( $FR = Pf/Pi$ ), em que Pf = população final e Pi = população inicial do nematóide (Oostenbrink, 1966).  $FR = 1$  confere reação de resistência ao genótipo e  $FR > 1$  confere reação de suscetibilidade. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott no programa estatístico SAEG (Euclides, 1983). Para fins da análise estatística, os genótipos imunes (valores das variáveis = 0) e os segregantes foram excluídos da análise estatística. A população oriunda de seringueira, a qual não infectou o cafeeiro, também foi excluída da análise estatística.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental, registraram-se as temperaturas médias mínimas e máximas de 18,7 e 29,7°C, respectivamente.

A caracterização pela enzima esterase possibilitou a confirmação da espécie e a pureza das populações de *M. exigua*, indicando não haver mistura de fenótipos numa mesma população.

Por meio das plantas diferenciadoras usadas por Carneiro & Almeida (2000), confirmaram-se as três “raças” de *M. exigua*. A raça 1, cujos indivíduos conseguiram parasitar o tomateiro e o cafeeiro, mas não o pimentão; a raça 2, cujos indivíduos foram capazes de parasitar o tomateiro, o cafeeiro e o pimentão, e a raça 3, que não parasitou nenhuma das três espécies, ficando restrito às plantas de seringueira.

A população de *M. exigua*, oriunda de plantas de seringueira de São José do Rio Claro, MT, raça 3, fenótipo de esterase E1b (Rm 1,10 e 1,60) não infectou o cafeeiro, não induziu a formação de galhas e nem produziu ovos, em nenhum dos genótipos avaliados. Em função da reação dos genótipos de *Coffea* spp. frente às populações de *M. exigua*, esses foram divididos em três grupos: suscetíveis (Tabela 1), segregantes (Tabela 2) e imunes (Tabela 4), tanto pelo critério de Taylor & Sasser (1978) como o proposto por Oostenbrink (1966). Mesmo considerando o critério adaptado por Moura (1997), que usa a redução do fator de reprodução, esses três grupos de genótipos permanecem inalterados. A separação desses grupos se tornou importante tanto pelo aspecto estatístico devido à eliminação do valor zero exibido pelos genótipos imunes quanto da diferenciação dos genótipos segregantes que apresentaram uma alta variação nos dados.

Pela análise de variância dos genótipos classificados como suscetíveis não foi observada interação entre as populações e os genótipos. Também não foi observada nenhuma relação entre os fenótipos de esterase e a resposta de hospedeiro. Evidenciaram-se dois grupos de respostas quanto ao número de galhas: no primeiro, os genótipos UFV 1682, UFV 1824, UFV 2389, UFV 1076, UFV 951, UFV 7577 e ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ apresentaram menor número de galhas (variando de 124 a 217) e no segundo, variou de 230 a 327 (Tabela 1). Apesar disso, todos os genótipos estudados apresentaram índice de galhas (IG) igual a 5 (> 100 galhas). Esse valor de IG caracteriza uma alta suscetibilidade dos

mesmos. Foi possível observar uma relação direta de galhas com o número de ovos nesses genótipos. Esse grupo apresentou valores do fator de reprodução (FR) variando de 2,78 a 3,89, enquanto os outros genótipos apresentaram FR entre 4,71 e 5,75 (Tabela 1). Apesar de ser utilizada como padrão de suscetibilidade, a cultivar Catuaí Vermelho IAC 44 exibiu FR médio de 3,48. O genótipo que apresentou o maior fator de reprodução foi o UFV 963 (FR = 5,75), enquanto que o menor foi o UFV 951 (FR = 2,78). De uma maneira geral, os genótipos que apresentaram os menores números de ovos e, conseqüentemente, menores FR, também exibiram um sistema radicular menos desenvolvido, característica avaliada pela massa da matéria fresca das raízes (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios do número de galhas (NG) e de ovos (NO), da massa fresca das raízes (MFR) e reação dos genótipos de *Coffea* spp. classificados como suscetíveis a *Meloidogyne exigua*

Progênes	NG	NO	FR*	MFR
<b>Híbrido de Timor</b>				
UFV 1292	230 a	24120 a	4,82	3,19 c
UFV 1680	254 a	23541 a	4,71	3,46 c
UFV 1682	187 b	19465 b	3,89	2,81 d
UFV 1804	286 a	26853 a	5,37	3,99 b
UFV 1824	147 b	16572 b	3,31	3,09 c
UFV 2389	182 b	18941 b	3,79	2,64 d
<b>Sarchimor</b>				
UFV 963	327 a	28767 a	5,75	3,83 b
<b>Cavimor</b>				
UFV 1076	162 b	17532 b	3,51	2,45 d
<b>Catimor</b>				
UFV 922	292 a	26637 a	5,33	4,55 a
UFV 951	124 b	13911 b	2,78	2,56 d
UFV 6869	285 a	27074 a	5,41	4,01 b
UFV 7577	217 b	19004 b	3,80	4,99 a
<b>Icatu</b>				
Icatu – 39	283 a	27949 a	5,59	4,55 a
<b>Catuaí</b>				
Catuaí V. IAC 44	183 b	17397 b	3,48	3,96 b

Média de seis repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott. \* FR = Fator de reprodução (Pf/Pi) segundo Oostenbrink (1966).

Com relação às progênies segregantes, seis dentre os 25 genótipos segregaram quanto à resistência às populações de *M. exigua* (Tabela 2). As progênies UFV 951, UFV 1262, H498-14 e H518-2, segregaram para as três populações de *M. exigua* oriundas de cafeeiro, enquanto que as progênies UFV 1959 e H493-1 segregaram para duas. Para a progênie UFV 1959, das seis plantas inoculadas com cada população, apenas uma foi suscetível à população 1, duas à população 3 e foi imune à população 2 (Tabela 2). Enquanto que o genótipo H493-1 apresentou uma planta suscetível à população 2, uma à população 3, e seis plantas foram imunes à população 1. As progênies que apresentaram resposta variável como a UFV 1804, UFV 1825 e H498-14, foram todas resistentes à população 1 e suscetível à 3. A maioria das progênies originados do Híbrido de Timor expressou suscetibilidade a tais populações, mas foram imunes à população 4.

Tabela 2 - Valores médios dos números de galhas (NG) e de ovos (NO) produzidos em genótipos segregantes de *Coffea* spp. aos 110 dias após a inoculação com populações de *Meloidogyne exigua*

GENÓTIPOS	POP	Frequência de plantas (%)		NG	NO
		S	R		
<b>UFV 951</b>	1	50,00	50,00	87,00	9940,50
	2	66,67	33,33	107,50	12507,00
	3	83,33	16,67	176,50	19285,33
	4	0	100,00	4,00	0
<b>UFV 1262</b>	1	16,67	83,33	27,80	3074,83
	2	16,67	83,33	18,50	2076,17
	3	33,33	66,67	26,83	2992,00
	4	0	100,00	5,00	0
<b>UFV1959</b>	1	16,67	83,33	27,16	2236,83
	2	0	100,00	0	0
	3	33,33	66,67	61,33	1724,17
	4	0	100,00	2,00	0
<b>H 493-1</b>	1	0	100,00	4,20	0
	2	16,67	83,33	39,00	3541,67
	3	16,67	83,33	37,00	3102,83
	4	0	100,00	2,00	0
<b>H498-14</b>	1	33,33	66,67	36,50	3734,33
	2	66,67	33,33	107,67	10858,17
	3	33,33	66,67	55,83	5300,33
	4	0	100,00	0	0
<b>H518-2</b>	1	16,67	83,33	39,33	2917,50
	2	16,67	83,33	39,00	3091,17
	3	50,00	50,00	104,17	8129,83
	4	0	100,00	0	0

Média de seis repetições. S = suscetíveis, R = resistentes, segundo Oostenbrink (1966). Pop 1: população proveniente de Muriaé/MG, Pop 2: Manhuaçu/MG, Pop 3: Canaã/MG, Pop 4: São José do Rio Claro/ MT.

Com as informações obtidas da resposta diferencial desses genótipos frente às populações testadas foi proposta uma série diferenciadora das populações de *M. exigua* utilizando as progênies UFV 1959 e H 493-1, e as cultivares Catuaí Vermelho IAC 44 e Apoatã IAC 2258 (Tabela 3).

Tabela 3 - Proposta de diferenciação de raças de *Meloidogyne exigua* usando genótipos de cafeeiro

População	Genótipos de Cafeeiro				Raça
	H 493- 1 CSH	UFV 1959	Catuaí 44	Apoatã 2258	
Pop. 1	-	+	+	-	R 1
Pop. 2	+	-	+	-	R 2
Pop. 3	+	+	+	-	R 3
Pop. 4	-	-	-	-	R 4

(-) e (+) = indicam hospedeiro resistente e suscetível, respectivamente, segundo a escala de Taylor & Sasser (1978). Pop 1: população proveniente de Muriaé/MG, Pop 2: Manhuaçu/MG, Pop 3: Canaã/MG, Pop 4: São José do Rio Claro/MT.

As progênes UFV 981, UFV 1266 e UFV 1848, além dos cultivares Robusta T 3580 c 169 e Apoatã IAC 2258 (Tabela 4), não foram infectadas por quaisquer das populações de *M. exigua* avaliadas (ausência de galhas e ovos) e, assim, foram classificadas como imunes a elas.

Tabela 4 - Valores médios dos números de galhas (NG) e de ovos (NO), e reação dos genótipos (R) de *Coffea* spp. classificados como imunes (I) quando inoculados com *Meloidogyne exigua* (4 populações)

Genótipos de <i>Coffea</i> spp	NG	NO	R
UFV 981 (Sarchimor)	0	0	I
UFV 1266 (Híbrido de Timor)	0	0	I
UFV 7595 (Catimor)	0	0	I
Robusta T. 3580 ( <i>C. canephora</i> )	0	0	I
Apoatã IAC 2258 ( <i>C. canephora</i> )	0	0	I

Tabela 5 - Comparação da reação de resistência/suscetibilidade em 28 genótipos de *Coffea* spp. em relação a 8 populações de *Meloidogyne exigua*

Genótipos de <i>Coffea</i> spp.	Populações de <i>Meloidogyne exigua</i>							
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
<b>Híbrido Timor</b>								
UFV 963	S	S	S	I	S	-	-	-
UFV 981	I	I	I	I	I	-	-	-
UFV 1262	R (Se)	R (Se)	R (Se)	I	R	R*	R (Se)*	R
UFV 1266	I	I	I	I	I	I	I	I
UFV 1292	S	S	S	I	S	S*	S*	-
UFV 1680	S	S	S	I	R	R	S	R
UFV 1682	S	S	S	I	S	S*	S*	-
UFV 1804	S	S	S	I	R	S	S	S
UFV 1824	S	S	S	I	S	S*	S*	-
UFV 1825	-	-	-	-	R	S	S	S
UFV 1848	I	I	I	I	I	I	I	I
UFV 1959	R (Se)	I	R (Se)	I	R	R	R	R
UFV 2389	S	S	S	I	-	-	-	-
<b>Cavimor</b>								
UFV 1076	S	S	S	I	-	-	-	-
<b>Catimor</b>								
UFV 922	S	S	S	I	-	-	-	-
UFV 951	S (Se)	S (Se)	S (Se)	I	-	-	-	-
UFV 6572	-	-	-	-	R	S	S*	S
UFV 6619	-	-	-	-	R	S	S*	S
UFV 6869	S	S	S	I	S	S	-	-
UFV 7577	S	S	S	I	R	-	-	-
UFV 7595	I	I	I	I	R	R	R	R
<b>Icatu</b>								
Icatu – 39	S	S	S	I	S	-	-	-
<b>Híbridos</b>								
H 493 – 1	I	R (Se)	R (Se)	I	-	S	S	S
H 498 – 14	R (Se)	S (Se)	S (Se)	I	R (Se)	-	S	S
H 518 – 2	R (Se)	R (Se)	S (Se)	I	-	R	S	R
<b><i>C. arabica</i></b>								
Catuaí Vermelho IAC 44	S	S	S	I	S	S	S	S
<b><i>C. canephora</i></b>								
Robusta T 3580	I	I	I	I	-	-	-	-
Apoatã IAC 2258	I	I	I	I	I	I	I	I

Reação: S = suscetível, Se = segregante, R = resistente, I = imune. (Oostenbrink, 1966; Taylor & Sasser, 1978); P1: população proveniente de Muriaé/MG, P2: Manhuaçu/MG, P3: Canaã/MG, P4: São José do Rio Claro/MT. As populações 5 a 8 foram estudadas por outros pesquisadores: P5: São Sebastião do Paraíso/MG, Gonçalves & Pereira (1998). P6: Mirai/MG, Ribeiro et al. (2005). P7: Fervedouro e P8: Caratinga/MG (A.A. Pereira. Inf. pessoal).

\* Genótipos avaliados por Silva et al. (2003) usando as mesmas populações 5 e 6.



O cafeeiro, apesar de conhecido como hospedeiro natural de *M. exigua*, apresentou-se como planta não hospedeira da população 4, independente do genótipo estudado, resultado esse igual ao obtido por Carneiro & Almeida (2000) com a cultivar Catuaí. Esse biótipo poderia ser considerado uma “raça geográfica”, que segundo Sturhan (1971) trata-se de categoria infra-específica ou subdivisões de espécies encontradas em diferentes regiões geográficas, presumivelmente adaptadas devido à peculiaridade do ambiente. Áreas cultivadas com seringueira, como no caso do Mato Grosso, eram tradicionalmente cultivadas com pastagens após o desbravamento do cerrado. Estas áreas não são recomendadas para o plantio do cafeeiro devido a restrições climáticas, principalmente temperaturas elevadas e déficit hídrico (Alfonsi, 2005). Dessa forma, a adaptação da espécie *M. exigua*, presente nessa área, poderia ter levado a capacidade de infectar a seringueira quando essa cultura foi implantada.

Outra possibilidade seria considerar esta uma nova espécie, já que o fenótipo para a enzima esterase é diferente dos outros fenótipos encontrados em populações de *M. exigua* coletadas em cafeeiros. E mesmo considerando respostas fisiológicas, essa população não foi capaz de infectar hospedeiros tradicionais dessa espécie, como o tomateiro e o pimentão (Carneiro & Almeida, 2000). Em estudos moleculares utilizando marcadores RAPD, Randig et al. (2002) observaram um alto nível de polimorfismo (67,5%) entre uma população de *M. exigua* oriunda de seringueira e a de cafeeiro. Esse grau de polimorfismo parece ser muito alto quando se compara as variações intra-específicas dessa espécie, pois, Carneiro et al. (2004) compararam somente populações coletadas de cafeeiro, mas com diferentes habilidades de infectar o tomateiro, e observaram apenas 8,6% de diversidade genética. Entretanto, mais estudos envolvendo outras técnicas moleculares ou marcadores são essenciais de forma a confirmar tais resultados, porque a análise do DNA ribossomal, conduzida por Tenente et al. (2004), mostrou que as populações de *M. exigua* oriundas do cafeeiro e da seringueira formam um único grupo monofilético.

Considerando que a conceituação de espécie em nematóides é estritamente morfológica, estudos completos acerca da morfologia e morfometria de fêmeas, machos e juvenis pelo uso de microscopia ótica e eletrônica ainda são requeridos para dirimir as dúvidas referentes ao enquadramento dessa população numa nova espécie. Enquanto tais dados são ainda indisponíveis, considerar-se-á essa população como uma variante dentro de *M. exigua*.

Não foi observada nenhuma interação entre os fenótipos de esterase e a resposta de hospedeiro conforme já observado por Oliveira (2002) ao usar os hospedeiros diferenciadores do Estado da Carolina do Norte e mais algumas plantas citadas como hospedeiras de *M. exigua*.

Alguns autores consideram a presença e o número de galhas como um critério inconsistente para ser utilizado na avaliação de fontes de resistência (Moura, 1997; Asmus et al., 2000). Para sustentar essa posição, argumentam que em culturas resistentes aos nematóides das galhas pode haver formação de galhas sem que haja reprodução do nematóide, e que em algumas plantas suscetíveis pode não ocorrer a formação das mesmas (Moura, 1997). No entanto, a quantidade de galhas induzidas por *M. exigua* em *Coffea* spp. expressou uma relação direta com a reprodução do nematóide, como visto pelo número de ovos e FR. Diante disso, o número de galhas induzidas por *M. exigua* pode ser considerado um real indicador de diferenças na reprodução do nematóide entre genótipos de cafeeiros. Essa consistência na relação galhas (sintomas) e número de ovos (reprodução) já tem sido observada também por outros autores (Gonçalves & Pereira, 1998; Bertrand et al., 2001; Silva et al., 2003). A vantagem que se pode tirar dessa informação é que em fases iniciais dos programas de melhoramento do cafeeiro visando à resistência a *M. exigua*, é possível avaliar apenas o número de galhas como expressão da suscetibilidade das progênies. Considerando que nessas fases o número de progênies avaliadas é muito alto, esse fato resulta numa grande economia de tempo e sem perder em confiabilidade.

As progênies UFV 981, UFV 1266 e UFV 1848, além dos cultivares Robusta T 3580 c 169 e Apatã IAC 2258 (Tabela 5), apresentaram reação de imunidade a todas as populações de *M. exigua* estudadas. Aqui foi seguida a conceituação estabelecida por Moura (1997) que define imunidade em relação à meloidoginose como ausência de reprodução por parte do nematóide na interação *Meloidogyne* - planta hospedeira. Uma outra informação a ser ressaltada, ainda, é que esses genótipos também apresentam resistência ao fungo *Hemileia vastatrix*, agente causal da ferrugem do cafeeiro (A.A. Pereira, comunicação pessoal). Essa característica eleva-os a uma categoria superior de doadores de genes num programa de melhoramento. Diante do exposto, tais genótipos mostram-se promissores como fontes de resistência conjunta aos dois dos principais patógenos do cafeeiro no Brasil.

Alguns genótipos segregaram quanto à reação de resistência/suscetibilidade frente às populações oriundas de cafeeiro. Resultados obtidos por Gonçalves & Pereira (1998) e Silva et al. (2003) demonstraram que algumas progênies derivadas do Híbrido de Timor, como a UFV 1262 e UFV 1680, responderam de forma diferenciada às populações de *M. exigua* originárias do município de São Sebastião do Paraíso e Fervedouro, MG. Essa informação reforça a hipótese de existir um comportamento diferenciado entre populações de *M. exigua*, as quais podem vir a ser separadas por genótipos de cafeeiro.

Ainda que tais resultados provenham de diferentes autores e com algumas diferenças na metodologia empregada (estádio de desenvolvimento da planta e período de avaliação), é possível perceber que há a possibilidade de se criar uma série diferenciadora de populações de *M. exigua* dentro do gênero *Coffea*. Se os genótipos ainda estão segregando, como é sabido para alguns deles, apenas terá que ter sua reprodução obtida por enraizamento de estacas. Com os dados obtidos no presente estudo foi proposta uma série diferenciadora das populações de *M. exigua* (Tabela 4), utilizando as progênies UFV 1959 e H493-1, e os cultivares Catuaí Vermelho IAC 44 e Apatã IAC 2258. Contudo, a validação desses genótipos como possíveis diferenciadores de raças deve ser realizada usando um número maior de populações.

É graças a grande diversidade genética encontrada no Híbrido Timor e em outros híbridos que se pode perseguir o objetivo de se estabelecer uma série diferenciadora de raças usando o cafeeiro. Lashermes et al. (2000), em análise molecular da introgressão de genes de *C. canephora* em *C. arabica*, observaram que, apesar de derivado de um único híbrido interespecífico, os genótipos derivados do Híbrido de Timor mostraram grande diversidade genética. Foram detectados nesses genótipos, pelo menos, o dobro da diversidade genética apresentada nos cultivares de *C. arabica*. Essa diversidade deve ser considerada, juntamente com a variabilidade do patógeno em programas de melhoramento de cafeeiro visando selecionar fontes de resistência a *M. exigua*.

Apesar da variabilidade fisiológica já ser conhecida em *M. exigua* (Carneiro & Almeida, 2000), essa não atende por completo ao conceito de “raças” normalmente adotado para os fitopatógenos, pois a mesma necessita de quatro espécies de plantas. Já raças são definidas como biótipos distinguidos por sua preferência de hospedeiro dentro de um grupo taxonômico (Sturhan, 1971).

Assim a validação dessa nova proposta de determinação de raças de *M. exigua*, com o uso de genótipos de cafeeiro, assume papel relevante, pois a utilização de cultivares resistentes a esse patógeno constitui-se atualmente em uma das principais estratégias de controle. E o sucesso dessa prática vai depender das espécies e, ou, raças presente na área, uma vez que a resistência é na maioria dos casos específica (Gonçalves & Silvarolla, 2001). Além de servir de suporte para as pesquisas, em especial as de melhoramento, tendo em vista a obtenção de plantas resistentes a *M. exigua*, a separação de raças dessa espécie de nematóide em cafeeiro facilitaria os trabalhos de diagnose na rotina dos laboratórios de nematologia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFONSI, R.R. Zoneamento Climático da cultura do café (Texto). Disponível em: < <http://www.cpa.unicamp.br> htm > Acesso em 20 de fevereiro de 2005.
- ALFENAS, A.C., PETERS, L., BRUNE, W. & PASSADOR, G.C. 1991. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais, Sociedade de Investigações Florestais Viçosa: UFV, 242p.
- ALFENAS, A.C. & BRUNE, W. 1998. 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, 574p.
- ASMUS, G. L., FERRAZ, L. C. C. B. & APPEZZATO-DA-GLÓRIA. B. 2000. Alterações anatômicas em raízes de milho (*Zea mays* L.) parasitadas por *Meloidogyne javanica*. Nematropica, 30: 33-39.
- BARBOSA, D.H.S.G., VIEIRA, H.D., SOUZA, R.M., VIANA, A.P. & SILVA, C.P. 2004. Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. Nematologia Brasileira, 28: 49-54.
- BONETI, J.I.S. & FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, 6:553.
- CAMPOS, V. P., SIVAPALAN, P. & GNANAPRAGASAN, N. C. 1990. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: LUC, M.; SIKORA, R. A. & BRIDGE, J. (ed.) Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. London: CAB. Internacional, pp. 367-397.

- CARNEIRO, R.M.D.G. & ALMEIDA, M.R.A. 2000. Caracterização isoenzimática e variabilidade intraespecífica dos nematóides de galhas do cafeeiro no Brasil. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Anais, Poços de Caldas, MG. pp. 280-282.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & ALMEIDA, M.R.A. 2001. Técnica de Eletroforese usada no Estudo de enzimas dos nematóides das galhas para identificação de espécies. *Fitopatologia Brasileira*, 25: 35-44.
- CARNEIRO, R.M.D.G., TIGANO, M.S., RANDIG, O., ALMEIDA, M.R.A. & SARAH J.L. 2004. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology*, 6: 287-298.
- CASWELL, E.P. & ROBERTS, P.A. 1987. Nematode population genetics. In: Veech, J.a. & Dickson, D. (Eds). *Vistas on Nematology*. Hyattsville MD, USA, Soc. Nematologists. p. 390-397.
- CROS, J. 1994. Implications phylogénétiques des variations de 1 ADN chloroplastique chez les caféiers (genres *Coffea* L. et *Psilanthus* Hook. F.). Montpellier: Université Montpellier II. 160p. (These doctorat).
- CURI, S. M.; A. CARVALHO; F. P. MORAES; L. C. MÔNACO & H.V. de ARRUDA. 1970. Novas fontes de resistência genética de *Coffea* no controle de nematóide do cafeeiro, *Meloidogyne exigua*. *O Biológico*, 36: 293-295.
- DAVIS, B.J. 1964. Disc electrophoreses. II. Method end Application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 121:404-427.
- EUCLYDES, R.F. 1983. Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para análises Estatística e Genética). Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. 59p.
- ESBENSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Electrophoretic methods for the study of root-knot nematode enzymes. In: BARKER, K.R., CARTER, C.C., SASSER, J.N. (Eds.) *An advanced treatise on Meloidogyne*. North Carolina State University Graphics. p. 115-123.
- FAZUOLI, L.C. & LORDELLO, R.R.A. 1978. Fontes de resistência em espécies de café a *Meloidogyne exigua*. *Nematologia Brasileira*, 3: 49-52.
- GONÇALVES, W. & PEREIRA, A.A. 1998. Resistência de cafeeiro a nematóides IV Reação do cafeeiro derivados do híbrido de Timor a *Meloidogyne exigua*. *Nematologia Brasileira*, 22: 39-49.
- GONÇALVES, W. & SILVAROLLA, M.B. 2001. Nematóides parasitos do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) *Tecnologias de produção de café com qualidade*. Viçosa: Editora UFV. p. 199-267.
- LASHERMES P., ANDRZEWSKI, S., BERTRAND, B., COMBES MC, DUSSERT,G., TROUSLOT , P. & ANTHONY F. 2000. Molecular analisis introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.).*Theor. Appl. Genet*, 100: 139-146.

- MOURA, R. M. 1997. O Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose parte II. Revisão Anual de Patologia de Plantas, 5: 281-315.
- OLIVEIRA, D.S., LIMA, R.D., ROESE, A.D & SILVA, R.V. 2001. Caracterização morfológica e bioquímica de populações de *Meloidogyne* spp. em cafeeiros na Zona da Mata de Minas Gerais. In: II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Anais, Vitória, ES, pp. 1072-1077.
- OLIVEIRA, D.S. 2002. Caracterização de populações de *Meloidogyne exigua* associadas a cafeeiros na Zona da Mata de Minas Gerais. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. (Tese de Mestrado).
- OOSTENBRINK, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Meded. Landbouw. Wageningen, 66: 1- 46.
- ORNTEIN, L. 1964. Disc electrophoreses. I. Background and Theory. Annals of the New York Academy of Sciences. 121: 321-349.
- RANDIG, O., M. BONGIOVANNI; R.M.D.G. CARNEIRO & P. CASTAGNONE SERENO. 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. Genome, 45:862-870.
- RIBEIRO, R.C.F., PEREIRA, A.A., OLIVEIRA, C.H. & LIMA, R.D. 2005. Resistência de progênies de híbridos interespecíficos de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* a *Meloidogyne exigua*. Nematologia Brasileira, (no prelo).
- SILVA, R.V., OLIVEIRA, R.D., PEREIRA, A.A. & PINTO, F.S. 2003. Variabilidade de *Meloidogyne exigua* em genótipos de cafeeiro. In: XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Resumo, Uberlândia, MG, 28: 293.
- SILVAROLLA B.M., GONÇALVES W. & LIMA MA, 1998. Resistência do cafeeiro a nematóides. V. Reprodução de *Meloidogyne exigua* em cafeeiros derivados da hibridação de *Coffea arabica* com *C. canephora*. Nematologia Brasileira, 22: 51-59.
- STURHAN, D. 1971. Biological races. In: Plant Parasitic Nematodes, eds, B. M. Zuckerman, W. F. Mai and R. A. Rohde. Academic Press, New York and London. 2: 51-71.
- TAYLOR, A.L. & SASSER, J.N. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Coop. Publ. Dep. Plant. Pathol., north Carolina State University Graphics Raleigh. 111p.
- TENENTE, G.C.M.V., P. DE LEY, I. TANDINGRAN DE LEY, G. KARSSSEN & J.R. VANFLETEREN. 2004. Sequence analysis of the D2/D3 region of the large subunit rDNA from different *Meloidogyne* isolates. Nematropica, 34: 1-12.

## CONCLUSÕES GERAIS

As plantas de café ‘Catuaí’ reagiram da mesma forma quando inoculadas com diferentes populações de *M. exigua*, independente dos fenótipos de esterase e, ou, “raças”.

A temperatura de 26°C foi a melhor para a formação de galhas, produção de ovos e da matéria seca da parte aérea das mudas de cafeeiro. Esses dados podem nortear os pesquisadores quanto ao planejamento e a implantação de ensaios envolvendo *M. exigua* e seu hospedeiro tipo.

Mudas de cafeeiro com seis pares de folhas foram as que mais favoreceram a reprodução de *M. exigua*, portanto, essas devem ser utilizadas para a seleção de genótipos resistentes e na multiplicação de inóculo.

A avaliação aos 120 dias após a inoculação proporcionou observar maiores valores para galhas e ovos do nematóide. Uma análise conjunta envolvendo o período de avaliação e a inoculação em diferentes estádios de desenvolvimento do cafeeiro permitiu concluir que os ensaios envolvendo *M. exigua*-cafeeiro devem ser avaliados pelo menos aos 90 dias da inoculação.

O genótipo UFV 1959 permitiu a reprodução das populações 1 e 3 de *M. exigua*, enquanto o H493 - 1 CSH mostrou-se suscetível às populações 2 e 3. Em nenhum destes genótipos houve a reprodução da população 4, permitindo assim o uso do cafeeiro para separar as ditas raças de *M. exigua*. Contudo, a validação desses genótipos, como possíveis diferenciadores de raças deste nematóide, deve ser realizada com um número maior de populações. Devido a sua fase segregante, o uso de tais genótipos deve envolver a propagação vegetativa (enraizamento de estacas).