



**NATÁLYA MONIQUE RIBEIRO BARBOSA GUIMARÃES**

**ANÁLISES DE ELEMENTOS QUÍMICOS E  
POPULAÇÕES ENDOPARASÍTICAS EM  
CAFEEIROS INOCULADOS COM  
*MELOIDOGYNE EXIGUA* E *MELOIDOGYNE  
PARANAENSIS***

**Lavras - MG**

**2016**

**NATÁLYA MONIQUE RIBEIRO BARBOSA GUIMARÃES**

**ANÁLISES DE ELEMENTOS QUÍMICOS E POPULAÇÕES  
ENDOPARASÍTICAS EM CAFEIROS INOCULADOS COM  
*MELOIDOGYNE EXIGUA* E *MELOIDOGYNE PARANAENSIS***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Eduardo Alves

**Lavras - MG**

**2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Guimarães, Natália Monique Ribeiro Barbosa.

Análises de elementos químicos e populações endoparasíticas  
em cafeeiros inoculados com *Meloidogyne exigua* e *Meloidogyne  
paranaensis* / Natália Monique Ribeiro Barbosa Guimarães. –  
Lavras : UFLA, 2016.

78 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Eduardo Alves.

Bibliografia.

1. Nematóide das galhas. 2. Ciclo de vida. 3. Microscopia  
eletrônica de varredura. 4. Resistência. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

**NATÁLYA MONIQUE RIBEIRO BARBOSA GUIMARÃES**

**ANÁLISES DE ELEMENTOS QUÍMICOS E POPULAÇÕES  
ENDOPARASÍTICAS EM CAFEEIROS INOCULADOS COM  
*MELOIDOGYNE EXIGUA* E *MELOIDOGYNE PARANAENSIS***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 08 de março de 2016.

Dra. Sônia Maria de Lima Salgado	UFLA
Dr. Antônio Nazareno Guimarães Mendes	UFLA
Dra. Milene Alves de Figueiredo	EMBRAPA-Café
Dr. Vicente Paulo Campos	UFLA

Dr. Eduardo Alves  
Orientador

**Lavras-MG  
2016**

*A Deus, por nunca me desamparar,  
ao meu marido João Filipi Rodrigues Guimarães,  
aos meus pais, Manoel Barbosa Sobrinho e Maria José Ribeiro Barbosa, e aos  
meus irmãos Emanuela Nataly Ribeiro Barbosa e  
Arthur Natanael Ribeiro Barbosa*

**Ofereço**

*A minha avó Zezinha (in memoriam),*

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, por ser tão bom e fiel.

Ao meu marido João Filipi e sua família, por todo o carinho e por sempre me encorajar e acreditar no meu potencial.

Ao meu pai e a minha mãe, pelo apoio dado e por todo o esforço que fizeram para que eu concluísse essa etapa na minha vida, tudo o que fiz foi com muito carinho e foi por vocês.

Aos meus irmãos por toda a alegria que me proporcionam, pela atenção que sempre têm por mim.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar o doutorado.

Ao meu orientador Prof. Eduardo, pelos ensinamentos e excelente orientação e a todos do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA.

À minha co-orientadora Doutora Sônia Salgado e à EPAMIG Sul por todo o apoio no desenvolvimento do nosso trabalho.

Aos demais professores do DFP/UFLA por todo conhecimento transmitido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsa de doutorado, ao Consórcio Pesquisa Café, FAPEMIG e CNPq pelo apoio.

Ao professor Vicente Paulo Campos e todos do Laboratório de Nematologia da UFLA.

Aos Doutores professor Ramiro Rezende e Eduardo Freire pelo apoio durante a minha qualificação.

Aos colegas da Fitopatologia: Sueny, Thaíssa, Rose, Gizely, Livia, Acleide, Cristian, Gilmara, Aurivan, Camila, Silvino, Fabiano, Aline, Elisa,

Amanda, Tamara, Claudia, Rayssa, Matheus, Arinaldo, Aline, Liliana, Wendel,  
Luma, Tarlei, Júlio, Willian, Tiago, Ariana, Tesfahum, Eloísa, Fernanda, Ana  
Cristina, Luciana.

*“O senhor é meu Pastor, nada me faltará.”*

**Salmos 23:1**



## RESUMO

Foi analisada até 45 dias após a inoculação a população endoparasítica e o início dos sintomas induzidos por *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis* em raízes de cafeeiros resistentes e suscetíveis, por meio da quantificação de cinco formas de desenvolvimento endoparasítico: vermiforme, salsichóide, ovóide e fêmea com e sem ovos nas cvs. Mundo, Apatã e IPR 100, além do Genótipo 1 – MG 179 pl1 R1 e Genótipo 2 – MG 179 pl3 R1. Aos 10 dias da inoculação houve grande flutuação populacional de vermiformes (J2) de *M. exigua* e igualdade nessa população de *M. paranaensis* nos cinco genótipos. Dos 10 aos 31 DAI, a flutuação populacional das formas salsichóides e ovóides intensificou-se tanto em *M. exigua* como em *M. paranaensis*. Dos 31 aos 45 DAI, a formação de fêmeas jovens de *M. exigua* foi quase nula em Apatã e IPR 100 e elevou-se a população de fêmeas com ovos no Mundo Novo e Genótipo 1. A formação de fêmeas jovens e com ovos de *M. paranaensis* foi igualmente baixa em todos os cafeeiros exceto na cv. Mundo Novo. Foi observado rachaduras longitudinais nas raízes novas com *M. paranaensis* e galhas arredondadas com aparente massa de ovos nas raízes com *M. exigua*. Esses genótipos de cafeeiros foram avaliados quanto a resistência de *Meloidogyne exigua* após 6 meses da inoculação. Através da Microanálise de Raios-X os elementos minerais de regiões com e sem galhas em cada genótipo cafeeiro foram quantificados. O desenvolvimento vegetativo dos genótipos com e sem inoculação foram avaliados em incremento de altura e de diâmetro, e massa fresca das raízes. As variáveis analisadas foram submetidas à técnica multivariada de variáveis canônicas. As cultivares Apatã e IPR 100 mostraram-se resistentes à *M. exigua* já a cultivar Mundo Novo e os Genótipos 1 e 2 foram suscetíveis. O cálcio e o ferro estiveram presentes em todas as amostras analisadas sendo o cálcio detectado em quantidades maiores nos genótipos associados ao nematoide, exceto no Genótipo 1. O potássio foi

detectado apenas nos genótipos onde não houve associação com *M. exigua*. Não houve interação significativa nos genótipos com a presença ou ausência do nematoide para as variáveis vegetativas, as cvs. Mundo Novo e Apatã e o Genótipo 1 apresentaram maiores valores para essas variáveis. Com a análise multivariada de variáveis canônicas verificou-se três padrões de dispersão, o primeiro entre Mundo Novo e Genótipo 1, o segundo entre Genótipo 2 e IPR 100 e um terceiro padrão composto da cultivar Apatã. Os Genótipos 1 e 2 mostraram resistência à *M. paranaensis* e suscetibilidade à *M. exigua*. O teor de cálcio em raízes de cafeeiros parasitados por *M. exigua* é maior quando comparado com o teor em raízes sadias, podendo esse elemento estar relacionado às defesas da planta.

Palavras-chaves: *Coffea* spp. Nematoide das galhas. Ciclo de vida. Microscopia eletrônica de varredura. Resistência.

## ABSTRACT

It was analyzed 45 days after inoculation the endoparasitic population and the onset of symptoms induced by *Meloidogyne exigua* and *M. paranaensis* in resistant and susceptible coffee roots, through the quantification of five forms of development: wormlike, changed worm, ovoid and female with and without eggs in cvs. Mundo Novo, Apoatã and IPR 100, in addition to Genotype 1 - MG 179 pl1 R1 and Genotype 2 - MG 179 PL3 R1. Ten days after inoculation there was great fluctuation of wormlike (J2) of *M. exigua* and equality in this population of *M. paranaensis* in five genotypes. From 10 to 31 DAI, the fluctuation of changed worm and ovoid forms intensified both in *M. exigua* as *M. paranaensis*. From 31 to 45 DAI, the training of young females *M. exigua* was almost nil in Apoatã and IPR 100 and increased the population of females with eggs in the Mundo Novo and Genotype 1. The training of young females and eggs mass *M. paranaensis* was also low in all the trees except cv. Mundo Novo. It was observed longitudinal cracks in the new roots with *M. paranaensis* and rounded galls with apparent egg mass in the roots with *M. exigua*. These genotypes of coffee plants were evaluated for resistance to *M. exigua* 6 months after inoculation. Through X-ray microanalysis of the mineral elements of regions with and without galls on each coffee genotype were quantified. The vegetative development of genotypes with and without inoculation was evaluated on growth in height and diameter, and fresh weight of roots. The variables analyzed were subjected to multivariate canonical variables. The Apoatã and IPR 100 cultivars were resistant to *M. exigua* have to cultivate the Mundo Novo and the Genotypes 1 and 2 were susceptible. The calcium and iron were present in all samples being analyzed calcium detected in larger amounts in the genotypes associated with nematode, except Genotype 1. The potassium was detected only where the genotype was not associated with *M. exigua*. There was

no significant interaction in the genotypes with the presence or absence of the nematode for vegetative variables, cvs. Mundo Novo and Apoatã, and Genotype 1 showed higher values for these variables. With multivariate canonical variate analysis found three dispersion patterns, the first between Mundo Novo and Genotype 1, the second between Genotype 2 and IPR 100 and a third standard composite cultivar Apoatã. Os Genotypes 1 and 2 showed resistance *M. paranaensis* and susceptibility to *M. exigua*. The calcium content in coffee root parasitized by *M. exigua* is higher compared to the level in healthy roots, can this element is related to the defense of the plant.

Keyword: *Coffea* spp. Root-knot nematode. Life-cycle. Scanning electron microscopy. Resistance.

## SUMÁRIO

### PRIMEIRA PARTE

**1. INTRODUÇÃO**.....13

**REFERÊNCIAS**.....17

**SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**.....22

Artigo 1 – Análise populacional endoparasítica de *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis* em cafeeiros resistentes e suscetíveis.....22

Artigo 2: Reação de cafeeiros à *Meloidogyne exigua* e estudo dos elementos químicos nas raízes parasitadas através da Microanálise de Raios-X.....52

## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e o segundo maior consumidor de café do mundo, de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento, do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com uma produção estimada para 2016 entre 49,13 e 51,94 milhões sacas beneficiadas de café numa área total em produção de 1.977.518,3 hectares (CONAB, 2016).

Apesar das condições ambientais e climáticas favoráveis, a cultura cafeeira passa ainda por problemas fitossanitários (CARNEIRO, 1995). A presença de fitonematoides nas lavouras das principais regiões cafeeiras do país tem sido um importante fator que afeta a produção, causando sérios prejuízos, e até mesmo, em alguns casos, inviabilizando a atividade (BARBOSA et al., 2004; CASTRO et al., 2008).

Diversos gêneros de nematoides já foram associados ao cafeeiro, com destaque aos nematoides do gênero *Meloidogyne*, conhecido como o nematoide das galhas radiculares (CAMPOS; VILLAIN, 2005). Dentre as mais de 15 espécies de *Meloidogyne* que parasitam o cafeeiro, *M. exigua* é a espécie mais disseminada no Brasil, predominando em todos os principais estados produtores por possuir ampla disseminação e capacidade adaptativa a diversas regiões, já *M. paranaensis* juntamente com *M. incognita* são considerados os nematoides mais danosos ao cafeeiro devido à alta agressividade às raízes, podendo levar a planta à morte. (CAMPOS, 1987; CASTRO et al., 2008; BARBOSA et al., 2004). Em Minas Gerais, principal polo cafeeiro do país, há relatos de ocorrência de *M. paranaensis* em alguns municípios como Patrocínio e Serra do Salitre, na região do Alto Paranaíba, e Piumhi, Alpinópolis e Coqueiral na região sul do Estado (SILVA et al., 2009; SALGADO et al., 2015).

Uma das principais medidas de manejo dos fitonematoides é a utilização de plantas resistentes, por ser um método não agressivo ao ambiente, econômico e eficaz (CAMPOS; VILLAIN, 2005; KANAYAMA et al., 2009; MOURA, 1996). A estratégia principal para o desenvolvimento de cultivares resistentes a *M. exigua* é através da transferência do gene de resistência de *C. canephora* para *Coffea arabica* por meio de cruzamentos, sabe-se que a resistência a esse agente, pelo menos, é conferida por um gene dominante conhecido como Mex-1 (NOIR et al., 2003). No entanto, os mecanismos de resistência a esse nematoide em cultivares de café ainda precisam ser esclarecidos. Progênies derivadas do cruzamento entre Híbrido de Timor com outras cultivares vêm se mostrando promissoras, aliando altas produtividades com resistência a diversos patógenos que atacam o cafeeiro (REZENDE et al., 2013; RIBEIRO et al., 2005).

O uso de variedades enxertadas em áreas com nematoide das galhas tem sido uma saída na busca para o controle desses fitopatógenos. Utilizando *C. canephora* da Costa Rica observou-se alta resistência à *M. exigua* e a raças de *M. incognita* e a *M. paranaensis* (FAZUOLI, 1986; GONÇALVES, 1998). Uma linhagem melhorada designada de Aboatã é usada como porta enxerto (FAZUOLI et al., 2002), sendo de uso comum em áreas infestadas (CAMPOS; VILLAIN, 2005).

O ciclo de vida de *Meloidogyne* sp. inicia-se no ovo, onde no interior ocorre várias fases durante o desenvolvimento embrionário até a formação do juvenil do primeiro estágio, ou J1. A seguir sofre uma ecdise originando o juvenil do segundo estágio ou J2, ainda dentro do ovo. Em condições favoráveis o J2 perfura o ovo com o estilete e eclode. Fora do ovo, o J2 orienta-se seguindo um gradiente de concentração de exsudados radiculares até localizar a ponta da raiz da planta, onde penetra na região da coifa através do meristema radicular. Para facilitar a penetração, o J2 usa uma combinação de danos físicos por meio de pulsões do estilete e quebra da parede celular por enzimas celulolíticas e

pectinolíticas. Na fase endofítica o J2 vermiforme inicia a alimentação excretando substâncias nas células da planta que são alteradas morfológica e fisiologicamente. O J2 inicia a formação de um sítio de alimentação permanente, que consiste em várias células gigantes. Estas células funcionam como drenos especializados, que fornecem nutrientes para o J2 que alarga o corpo transversalmente, adquirindo assim formato salsichóide, tornando-se sedentário. Em seguida, o J2 sofre três ecdises, passando a juvenil do terceiro estágio (J3) e juvenil do quarto estágio (J4), ambos com o formato do corpo ovóide, desprovidos de um estilete funcional, portanto não se alimenta durante esse período tornando-se adulto. Os machos são vermiformes, não se alimentam e abandonam a raiz. Já as fêmeas continuam se alimentando e tornam-se periformes (FREITAS et al., 2001; JONES et al., 2013).

Os eventos que envolvem os estímulos para eclosão, atração, penetração dos tecidos do hospedeiro, reconhecimento do local susceptível à indução formando o sítio de alimentação, envolvendo modificação anatômica nas células e alterações na expressão genética da planta são fundamentais para o sucesso da infecção (DAVIS; MITCHUM, 2005). Uma vez formado o sítio de alimentação o nematoide, o estudo de alterações estruturais verificadas durante essa interação entre patógeno e planta hospedeira pode mostrar o quadro geral do processo de colonização e, ao mesmo tempo, revelar detalhes da intimidade entre os organismos envolvidos (PASCHOLATI et al., 2008). Características particulares do ataque de cada patógeno no cafeeiro já são conhecidas. Quando as raízes do cafeeiro são parasitadas por *M. exigua*, formam pequenas galhas arredondadas. Já no parasitismo por *M. paranaensis*, as raízes tornam-se grossas, corticosas, com rachaduras desprendendo-se o córtex (SALGADO et al., 2008). O parasitismo do cafeeiro por esses organismos afeta as relações água × planta e o processo fotossintético (MELAKEBERHAM et al., 1986). Por exemplo, os nematoides interferem na absorção e translocação de água e nutrientes



inorgânicos e/ou orgânicos e reduzem a absorção de micronutrientes como zinco, cobre, ferro, manganês e boro e o vigor das plantas. No sistema radicular de mudas de cafeeiro infectadas por *M. exigua* os teores de Cu, Fe, Mn, B e Zn foram reduzidos (BONETTI et al., 1982).

As alterações ocorridas nas raízes dos cafeeiros pelo nematoide das galhas refletem na parte aérea das plantas através de diversos sintomas como: crescimento desigual, deficiências minerais de diversas intensidades, murchamento, desfolhamento, redução na produtividade e em casos mais severos, leva à morte (CAMPOS; VILLAIN, 2005).

As análises convencionais do estado nutricional de plantas fornecem apenas o conteúdo total mineral, não indicando a localização dos elementos no tecido vegetal. Através da Microanálise de raios X, os elementos minerais podem ser detectados e localizados nos tecidos, propiciando ainda avaliação qualitativa e quantitativa (BELAN et al., 2015).

A possibilidade de detectar os elementos minerais nas raízes de plantas parasitadas por *Meloidogyne* sp. pode auxiliar no entendimento da relação parasítica e na reação do cafeeiro ao nematoide. Diante disso, microanálises de Raios X podem permitir a detecção dos elementos envolvidos na relação parasítica entre *Meloidogyne* e raízes de genótipos de cafeeiro com diversidade de reação ao nematoide e determinar a localização precisa dos elementos minerais no sítio de alimentação do nematoide possivelmente envolvidos na resistência da planta ao nematoide.

No presente trabalho objetivou-se realizar um estudo quantitativo do desenvolvimento endoparasítico da pós-embriogênese de *M. exigua* e *M. paranaensis* em genótipos de cafeeiro, comparando as cultivares suscetíveis e resistentes, como também avaliar o comportamento desses genótipos à *M. exigua*, detectar e quantificar os elementos químicos envolvidos na interação planta X nematoide nestes genótipos com e sem a presença do nematoide.

## REFERÊNCIAS

BARBOSA D. H. S. G. V.; SOUZA, R. M.; VIANA, A. P.; SILVA, C. P. Field estimates of coffee yield losses and amage threshold by *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 28, p. 49-54, 2004.

BELAN, L. L.; POZZA, E. A.; FREITAS, M. L. O.; POZZA, A. A. A.; ABREU, M. S.; ALVES, E. Nutrients distribution in diseased coffee leaf tissue. **Australasian Plant Pathology**, v. 44, p. 105–111, Jan. 2015.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S.; BRAGA, J. M.; OLIVEIRA, L. M. 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**, Brasília, v. 7, p. 197-206, 1982.

CAMPOS V. P. M. Ocorrência e distribuição de espécies de *Meloidogyne* em cafezais dos Campos das Vertentes e do Sul de Minas. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 11, p. 233-41, 1987.

CAMPOS, V. P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE J. (Ed.) **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CAB International, 2005. p. 529-579.

CARNEIRO, R.G. Reação de progênes de café ‘Icatu’ a *Meloidogyne incognita* raça 2, em condições de campo. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 19, p. 53-59, 1995.

CASTRO, J. M. C. C.; POZZA, E.A.; NAVES, R.L.; ANDRADE JUNIOR, W.C.; DUTRA, M.R.; COIMBRA, J.L.; MAXIMINIANO, C.; SILVA, J.R.C. Levantamento de fitonematoides em cafezais no Sul de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 32, p. 56-64, 2008.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO: Café, Primeiro levantamento, janeiro/2016 [on line]. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2016. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_01\\_20\\_17\\_01\\_56\\_bol\\_etim\\_cafe\\_-\\_janeiro\\_2016.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_20_17_01_56_bol_etim_cafe_-_janeiro_2016.pdf)> Acesso em: 03 fev. 2016.

DAVIS, E. L.; MITCHUM, M. G. Nematodes: sophisticated parasites of legumes. **Plant Physiology**, v. 137, p. 1182-1188, Apr. 2005.

FAZUOLI, L. C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: RENA, A. B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, N.; YAMADA, J. (Ed). **Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade do cafeeiro**. Piracicaba: POTAFÓS, 1986. p. 87-113.

FAZUOLI, L. C.; MEDINA FILHO, H. P.; GONÇALVES, W.; GUERREIRO FILHO, O.; SILVAROLLA, M. B. Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arábica obtidas no Instituto Agrônômico de Campinas. In: ZAMBOLIN, L. (Ed.). **O Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café**. Viçosa: Editora UFV, 2002. p. 162-215.

GONÇALVES, W. P.. Resistência do cafeeiro a nematóides IV- Reação de cafeeiros derivados do híbrido de Timor a *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 22, p. 39-50, 1998.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S. **Introdução a Nematologia-Cadernos didáticos**, 58. Viçosa: UFV, 2001, 84 p.

JONES, J. T.; HAEGEMAN, A.; DANCHIN, E. G. J.; GAUR, H. S.; HELDER, J.; JONES, M. G. K.; KIKUCHI, T.; MANZANILLA-LÓPEZ, R.; PALOMARES-RIUS, J. E.; WESEMAEL, W. M. L.; ROLAND N. PERRY, R. N. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology **Molecular Plant Pathology**, UK, v. 14, n. 9, p. 946–961, 2013.

KANAYAMA, F. S.; SERA, G. H.; SERA, T.; MATA, J. S. da; RUAS, P. M.; ITO, D. S. Progênes de *Coffea arabica* cv IPR 100 com resistência ao nematoide *Meloidogyne incognita* raça 1. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1321-1326, Sep./Oct. 2009.

MELAKEBERHAN, H.; BROOKE, R. C.; WEBSTER J. M. Relationship between physiological response of French beans of different age to *Meloidogyne incognita* and subsequent yield losses. **Plant Pathology**, UK, v. 35, p. 203-213, June, 1986.

MOURA, R. M. Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Piracicaba, vol. 4, p. 209-245, 1996.

NOIR, S. A.; BERTRAND, B.; COMBES, M.C.; LASHERMES, P. Identification of a major gene (Mex-1) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. **Plant Pathology**, UK, v. 52, p. 97-103, Jan. 2003.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 627 p. 2008.

REZENDE, R. M.; SALGADO, S. M. L.; REZENDE, J. C.; CARVALHO, G. R.; PEREIRA, A. A.; LIMA, R.R.; FERREIRA, A. D.; Resistência de progênies de *Coffea arabica* em área infestada por *Meloidogyne exigua*. **Nematropica**, College Park, v. 43, n. 2, p. 233-240, Dec. 2013.

RIBEIRO, R. C. F. P.; OLIVEIRA, C. H.; LIMA, R. D. Resistência de progênies de híbridos interespecíficos de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* a *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, p. 11-16, 2005.

SALGADO, S. M. L.; GUIMARÃES, N. M. R. B.; BOTELHO, C. E.; 3, TASSONE, G. A. T.; MARCELO, A. L.; SOUZA, S. R.; OLIVEIRA, R. D. L.; FERREIRA, D. F. *Meloidogyne paranaensis* e *Meloidogyne exigua* em lavouras cafeeiras na região Sul de Minas Gerais. **Coffee Science**, Lavras, v. 10, n. 4, p. 475–481, 2015.

SALGADO, S.M.O; SILVA, R. V.; CAMPOS, V. P. Aspectos importantes dos fitonematóides do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.29, p. 42-50, 2008.

SILVA, R. V.; OLIVEIRA, R. D. L.; ZAMBOLIM, L. Primeiro Relato da Ocorrência de *Meloidogyne paranaensis* em Cafeeiro no Estado de Goiás. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 33, n. 2, p. 187-190, 2009.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**

Artigo 1 – Preparado de acordo com as normas do periódico Nematropica

**ANÁLISE POPULACIONAL ENDOPARASÍTICA DE *MELOIDOGYNE*  
*EXIGUA* E *M. PARANAENSIS* EM CAFEZEIROS RESISTENTES E  
SUSCETÍVEIS.**

Natália Monique Ribeiro Barbosa Guimarães<sup>1\*</sup>, Sônia Maria de Lima Salgado<sup>2</sup>,  
João Filipi Rodrigues Guimarães<sup>3</sup>, Tesfahun Alemu Setotaw<sup>4</sup>, Tiago Teodoro  
Bijsterveld<sup>2</sup>, Vicente Paulo Campos<sup>1</sup>, Eduardo Alves<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia (DFP), Universidade Federal de Lavras (UFLA), CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil; <sup>2</sup>Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Unidade Sul, Cx. Postal 176, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil; <sup>3</sup>Departamento de Biologia (DBG), Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP: 36570-000, Viçosa, MG, Brasil; <sup>4</sup>Departamento de Agricultura (DAG), Universidade Federal de Lavras (UFLA), CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil. \*Autor para correspondência: Rua Barbosa Lima, 829, Centro, Bloco 5, Apartamento 302, Lavras, MG, Brasil, CEP: 37200-000, Phone: 55-35-991904206, Fax: 55-35-38291468. e-mail: agronaribeiro@hotmail.com.

População endoparasítica de *Meloidogyne* spp. em cafeeiros.

## ABSTRACT

GUIMARÃES, N. M. R. B., SALGADO, S. M. L., GUIMARÃES, J. F. R., BIJSTERVELD, T. T., CAMPOS, V. P., ALVES, E. 2016. **ANALYSIS ENDOPARASITIC OF POPULATION *MELOIDOGYNE EXIGUA* AND *M. PARANAENSIS* IN RESISTANT AND SUSCEPTIBLE COFFEE CULTIVARS.** *Nematropica* 41:00-00.

The various stages of endophytic *Meloidogyne* life cycle are directly related to parasitism in the host plant. This research investigated the endoparasitic population and the beginning symptoms of *M. exigua* and *M. paranaensis* in coffee roots from resistant and susceptible cultivars. The analysis was performed by quantifying five forms of development (wormlike, changed worm, ovoid and female with and without eggs) by those nematodes. Splitting in three periods of development, the nematodes were analyzed at five coffee genotypes (Mundo Novo 376-14, Apoatã IAC 2258, IPR 100, Genotype 1 - MG 179 pl1 R1 and Genotype 2 - MG 179 PL3 R1) during 8 collection periods after inoculation. At the first period, ten days after inoculation (DAI) the coffee genotypes showed great fluctuation of wormlike (J2) of *M. exigua* and not fluctuation of the juveniles in the five genotypes infested by *M. paranaensis*. At the second period, 10 to 31 DAI, the population fluctuation of changed worm and ovoid shapes intensified in both nematodes with severe reduction at these forms of *M. exigua* at the end in Apoatã and IPR 100 cultivars. At the third period, 31 to 45 DAI, the shaping young *M. exigua* females were almost zero in Apoatã and IPR 100. At this period, population of females with eggs was higher ( $p \leq 0.05$ ) only at the Mundo Novo cultivar and Genotype 1. Formation of *M. paranaensis* females was lower ( $p \leq 0.05$ ) in all coffees but significantly higher in the Mundo Novo cultivar. At the 45 DAI, the *M. exigua* and *M. paranaensis*



symptoms were differentiated by use of scanning electron microscopy which identified longitudinal cracks even at the beginning of new roots infested where it was possible to see crack roots induced by *M. paranaensis* and galls with eggs mass superficially visible on roots infested by *M. exigua*. Genotypes 1 and 2 behave as resistant to *M. paranaensis* and susceptible to *M. exigua*. *M. paranaensis* induces longitudinal cracks in the first biological cycle in susceptible cultivars.

**Key-words:** *Coffea* spp., root-knot nematode, life-cycle, scanning electron microscopy, resistance.

#### RESUMO

GUIMARÃES, N. M. R. B., SALGADO, S. M. L., GUIMARÃES, J. F. R., BIJSTERVELD, T. T., CAMPOS, V. P., ALVES, E. 2016. **ANÁLISE POPULACIONAL ENDOPARASÍTICA DE *MELOIDOGYNE EXIGUA* E *M. PARANAENSIS* EM CAFEEIROS RESISTENTES E SUSCETÍVEIS.** Nematropica 41:00-00.

As diversas fases endofíticas do ciclo de vida de *Meloidogyne* estão diretamente relacionadas ao parasitismo na planta hospedeira. Objetivou-se analisar a população endoparasítica e o início dos sintomas induzidos por *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis* nas raízes de cafeeiros resistentes e suscetíveis, por meio da quantificação das cinco formas de desenvolvimento endoparasítico: vermiforme, salsichóide, ovóide e fêmea com e sem ovos na cv. suscetível Mundo Novo 376/4, nas cultivares resistentes Apatã IAC 2258 e IPR 100, além do Genótipo 1 – MG 179 pl1 R1 e Genótipo 2 – MG 179 pl3 R1. Em oito épocas de avaliação definiram-se três períodos distintos de desenvolvimento

endoparasítico dos nematoides. No primeiro período, 10 dias da inoculação (10 DAI) houve grande flutuação populacional de vermiformes (J2) de *M. exigua* e igualdade ( $P \leq 0,05$ ) nessa população de *M. paranaensis* nos cinco genótipos. No segundo período, 10 a 31 DAI, a flutuação populacional das formas salsichóides e ovóides intensificou-se tanto em *M. exigua* como em *M. paranaensis*, com redução acentuada dessas formas de *M. exigua* ao final desse período em Apoatã e IPR 100. No terceiro período, 31 a 45 DAI, a formação de fêmeas jovens de *M. exigua* foi quase nula em Apoatã e IPR 100 e elevou-se a população de fêmeas com ovos no Mundo Novo e Genótipo 1. A formação de fêmeas jovens e com ovos de *M. paranaensis* foi igualmente baixa ( $P \leq 0,05$ ) em todos os cafeeiros exceto na cv. Mundo Novo onde a população dessas fêmeas foi significativamente alta. Aos 45 dias da inoculação, a sintomatologia de *M. paranaensis* e *M. exigua* nos cafeeiros pode ser diferenciada em microscopia eletrônica de varredura pela observação de rachaduras longitudinais nas raízes novas com *M. paranaensis* e galhas arredondadas com aparente massa de ovos nas raízes com *M. exigua*. Os Genótipos 1 e 2 comportaram-se como resistentes à *M. paranaensis*, e suscetíveis à *M. exigua*. *M. paranaensis* induz rachaduras longitudinais já no primeiro ciclo biológico em cultivares suscetíveis.

**Palavras-chave:** *Coffea* spp., nematoide de galhas, ciclo de vida, microscopia eletrônica de varredura, resistência.

## INTRODUÇÃO

*Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis* são responsáveis por sérios prejuízos no desenvolvimento e produtividade do cafeeiro. A importância dessas espécies respectivamente deve-se à ampla disseminação nas regiões produtoras

do Brasil e ao efeito destrutivo às raízes (Campos e Villain, 2005; Salgado *et al.*, 2014).

A atração e penetração dos tecidos do hospedeiro como também o reconhecimento do tecido suscetível para a indução do local de alimentação são fundamentais para o sucesso da infecção (Davis e Mitchum, 2005). Juvenis infectantes de segundo estágio (J2) penetram nas raízes e migram para alcançar o cilindro vascular onde se tornam sedentários após estabelecer o seu local de alimentação permanente (Williamson e Hussey, 1996).

O prolongado e íntimo relacionamento dos fitonematoides com a planta hospedeira envolvem alterações complexas na morfologia e função da célula hospedeira (Goverse e Smant, 2014). A interação altamente especializada e complexa entre a planta hospedeira e o *Meloidogyne* pode possibilitar o parasitismo do tecido vegetal pela fuga dos mecanismos de defesa (Davis *et al.*, 2004) por meio de estratégias que o nematoide utiliza para manipular a célula da planta (Goverse e Smant, 2014).

O parasitismo de *Meloidogyne* sp. depende do sucesso das diversas fases do desenvolvimento endofítico até atingir a maturidade e reprodução. Essas fases representadas pela população endoparasítica do nematoide são influenciadas pela resposta de resistência da planta. Algumas cultivares de *Coffea* sp. que apresentam resistência ao nematoide de galhas como a cultivar Apatã IAC 2258, resistente ao *Meloidogyne* spp. (Fazuoli, 2002) e o IPR 100, resistente ao *M. paranaensis*, *M. incognita* (Sera *et al.*, 2007) e *M. exigua* (Rezende *et al.*, 2015, informação pessoal) podem influenciar nas diferentes fases do ciclo endofítico de *Meloidogyne*. No entanto, são escassos os estudos relacionados às interações incompatíveis entre *Meloidogyne* e as cultivares de cafeeiro, principalmente nos aspectos quantitativos da população endoparasítica. Desta forma, objetivou-se estudar quantitativamente o desenvolvimento

endoparasítico da pós-embriogênese de *M. exigua* e *M. paranaensis* em cultivares suscetíveis e resistentes de cafeeiros.

## MATERIAL E MÉTODOS

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

Mudas do Genótipo 1 e Genótipo 2, referentes respectivamente aos acessos MG 179 pl1 R1 e MG 179 pl3 R1, ambos originados do cruzamento de Catuaí Vermelho X Amphiló MR 2161, mantidos no Banco Ativo de Germoplasma de Café da EPAMIG, foram formadas a partir de sementes colhidas na safra 2013-2014 na área experimental localizada na Fazenda Guaíçara, Piumhi, Minas Gerais. Além desses genótipos, as cultivares IPR 100 e Mundo Novo 376/4, ambas de *Coffea arabica* e a cultivar Apatã IAC-2258 de *C. canephora* também foram formadas de sementes colhidas na área experimental citada.

No estágio de folhas cotiledonares, formadas em bandejas contendo areia autoclavada, as mudas foram transferidas para tubetes de 55cm<sup>3</sup> contendo areia autoclavada onde permaneceram sob temperatura média de 28°C com irrigação diária em casa de vegetação.

### *Obtenção do inóculo de Meloidogyne spp. e inoculação*

Ovos de *M. exigua* e *M. paranaensis*, oriundos de cafeeiros suscetíveis em áreas experimentais infestadas nos municípios de Campos Altos e Piumhi, respectivamente, foram identificados através dos fenótipos de esterese em *M. exigua* E2 e *M. paranaensis* P1. Essas populações foram mantidas em tomateiros cultivar Santa Clara em casa de vegetação por 60 dias, quando então foram extraídos conforme a técnica de Hussey e Barker (1973). A suspensão de ovos foi calibrada para inoculação de 2.500 ovos em quatro orifícios equidistantes

feitos ao redor da planta, separadamente para cada nematoide por muda de cafeeiro quando essas atingiram o segundo par de folhas definitivas. A pesquisa foi instalada em delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial de cinco tratamentos e oito épocas de avaliação, em três repetições, em casa de vegetação com temperatura média de 28°C.

#### *Avaliação da população endoparasítica de M. exigua e M. paranaensis*

Nas mudas dos dois genótipos de cafeeiro e das três cultivares separadamente inoculadas com *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis*, foi avaliado o desenvolvimento endoparasítico desses nematoides aos 4, 7, 10, 17, 24, 31, 38 e 45 dias após a inoculação (DAI). Aos quatro dias da inoculação todas as plantas foram cuidadosamente retiradas dos tubetes e suas raízes lavadas para eliminar os juvenis de segundo estágio (J2) que não penetraram. Em seguida, as plantas foram transplantadas para novos tubetes (55cm<sup>3</sup>) com areia autoclavada.

Em cada época a população endoparasítica dos nematoides foi avaliada após a coloração das raízes com fuccina ácida segundo Byrd *et al.* (1983). Todo o sistema radicular corado foi dissecado, sob microscópio estereoscópico, a fim de localizar e quantificar os espécimes de *M. exigua* e *M. paranaensis* dentro das raízes nas fases de vermiformes, salsichóides e ovóides (J3 ou J4) além das fêmeas jovens com massa de ovos, totalizando cinco fases de desenvolvimento. Os vermiformes representaram os juvenis de segundo estágio (J2) endofítico e sem alteração na forma do corpo, enquanto que o salsichóide representou o J2 com formato alterado do corpo devido ao início da alimentação. As fases ovóides representaram os juvenis do terceiro e quarto estádios. A partir de então as fases de fêmeas jovens (sem massa de ovos) e fêmeas adultas com massa de ovos, perfazendo-se as cinco fases de desenvolvimento endofítico.

Baseado nas épocas de avaliação da população endoparasítica de *M. exigua* e *M. paranaensis* dos 4 aos 45 DAI, foram definidos três períodos distintos: no primeiro período ou de estabelecimento do J2 no cafeeiro, estão as épocas onde se encontraram apenas espécimes vermiformes; no segundo período ou intermediário as épocas com espécimes salsichóides, ovóides e vermiformes remanescentes; o terceiro período foi definido com a fase de fêmeas e remanescentes ovóides, definido como período final comprovado pela presença de ovos.

*Estudos sintomatológicos de raízes de cafeeiros infectados por M. exigua e M. paranaensis por Microscopia eletrônica de varredura*

Das raízes dos cafeeiros parasitados por *M. exigua* e *M. paranaensis* após a coloração com fucsina ácida e localização dos espécimes de nematoides, foram retirados seguimentos de aproximadamente 2 mm de comprimento e posteriormente acondicionados por 24 horas em solução de Karnovsky modificada a pH 7,2. Em seguida cada segmento foi transferido para o líquido crio-protetor (glicerol 30%), onde permaneceu por 30 min. Após esse tempo foram realizados cortes transversais e longitudinais nos seguimentos de raiz empregando nitrogênio líquido. As secções obtidas foram transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora. Subsequentemente foram desidratadas em uma série de acetona (25, 50, 75, 90 e 100% por três vezes) e depois levadas para o aparelho de ponto crítico. As secções obtidas foram montadas em suportes de alumínio *stubs*. Com a ajuda de uma fita de carbono dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio para a fixação dos segmentos de raiz, as secções foram cobertas com ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP. Imagens de secções de raízes parasitadas por *M. exigua* e *M. paranaensis* spp. foram geradas e

registradas digitalmente em aumentos variáveis, nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de trabalho de 9 mm.

#### *Análises estatísticas*

Os dados da população endoparasítica de cada fase de desenvolvimento dos nematoides nas épocas de avaliação foram submetidos ao teste de variância no programa estatístico R (R Core Team, 2014). Médias dos tratamentos transformadas em  $\sqrt{(x+0,5)}$ , quando necessário, foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS

#### *População endoparasítica de *M. exigua* em cafeeiros resistentes e suscetíveis*

A fase de J2 vermiforme foi observada no primeiro período transcorrido em 10 DAI com intensa flutuação dos espécimes vermiformes entre nos cafeeiros estudados. Aos 4 DAI a população do J2 foi significativamente menor no Apatã e no Genótipo 1. Aos 7 e 10 DAI a população do J2 reduziu em todos os cafeeiros comparada aos 4 DAI. No entanto aos 10 dias foi significativamente menor no IPR 100 (Figura 1A, B, C).

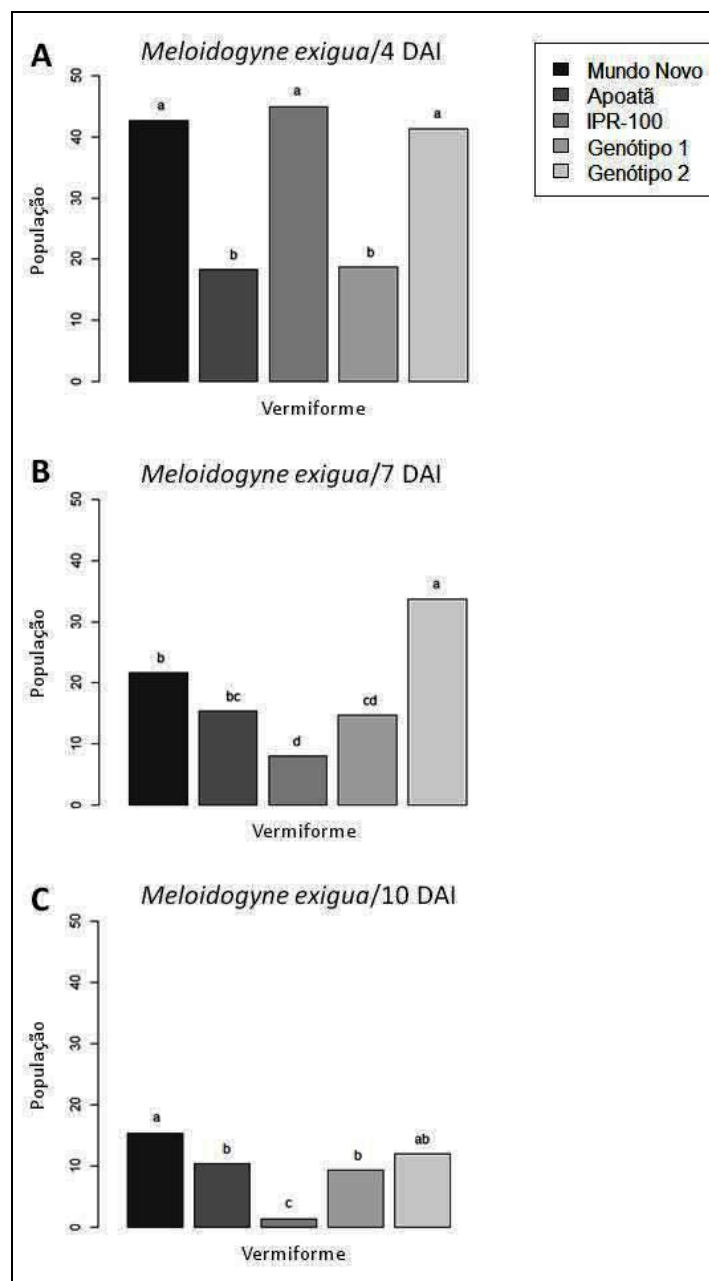


Figura 1. Primeiro período do desenvolvimento do corpo de *Meloidogyne exigua* dentro da raiz de cafeeiros aos 4 dias (A) após a inoculação (DAI), aos 7 DAI



(B) e aos 10 DAI (C). Médias seguidas da mesma letra nas colunas de cada estágio de desenvolvimento não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No segundo período, definido entre 17 a 31 DAI, o total de espécimes nas diversas fases foi maior em Mundo Novo seguido pelo Genótipo 1. Aos 17 DAI, os espécimes salsichóides ocorreram em maior número na cultivar Mundo Novo, Genótipo 1 e 2 e em menor número em Apatã e IPR 100, devido à manifestação da resistência dessas cultivares aos 17DAI. Os espécimes ovoides (J3 ou J4) apareceram neste período e em número significativamente maior na cultivar Mundo Novo, indicando que o nematoide obteve sucesso na formação do sítio de alimentação. Aos 24 DAI foi evidenciada a diferença na população endoparasítica de *M. exigua* entre os cafeeiros suscetíveis e resistentes. A população dos espécimes ovóides foi significativamente reduzida em Apatã e IPR 100 comparando aos demais genótipos. Aos 31 DAI ocorreram apenas ovoides com a mesma tendência desta população aos 24 DAI. Este período termina aos 31 DAI com as fases vermiformes, salsichóides e ovoides da população endoparasítica em diversas proporções (Figura 2A, B e C). A evolução ou não das fases endofíticas de desenvolvimento de *M. exigua* nesse período indica uma resposta diferenciada dos cafeeiros em decorrência da resistência ou suscetibilidade dos cafeeiros.

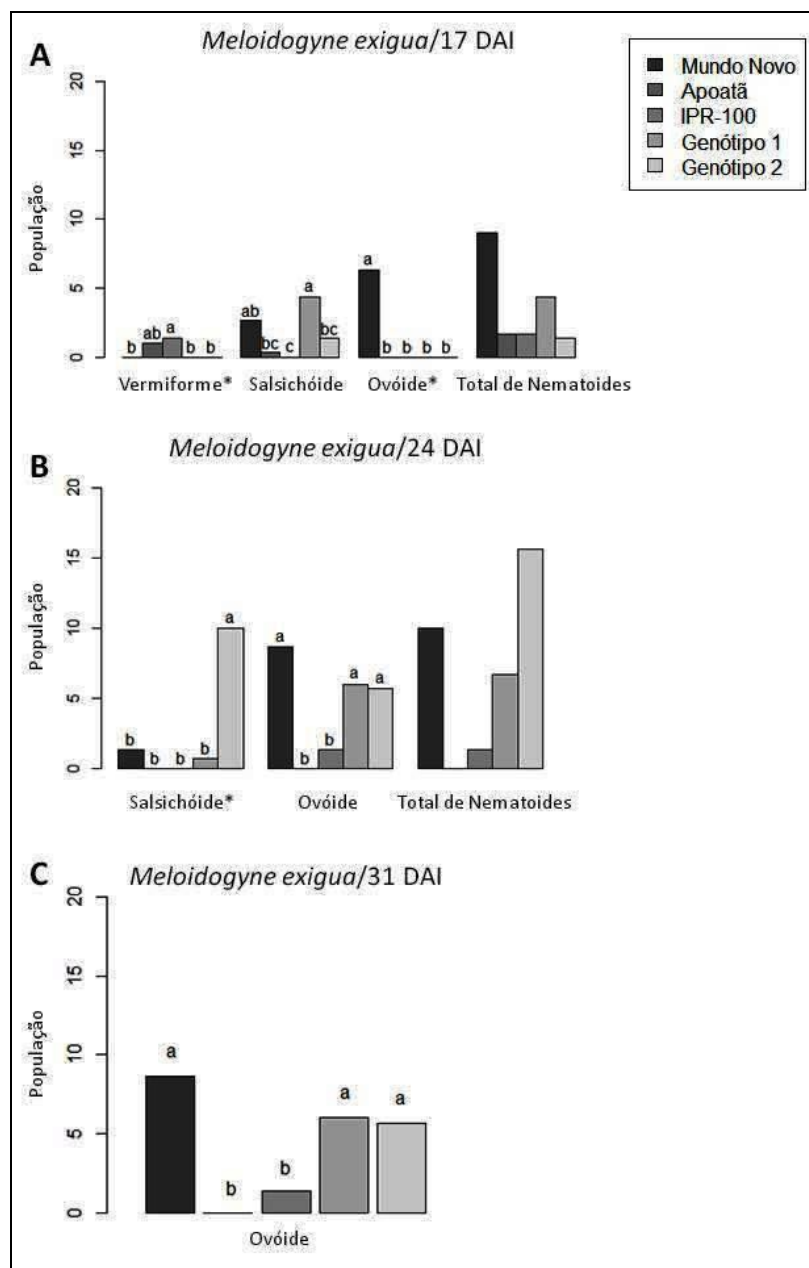


Figura 2. Segundo período do desenvolvimento do corpo de *Meloidogyne exigua* dentro da raiz de genótipos de cafeeiros aos 17 dias (A) após a inoculação

(DAI), aos 24 DAI (B) e aos 31 DAI (C). Médias seguidas da mesma letra nas colunas de cada estágio de desenvolvimento não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. \*Valores transformados em  $\sqrt{(x+0,5)}$ .

O terceiro período começou aos 38 DAI com formação de fêmeas jovens e com ovos, além das formas remanescentes ovóides e terminou aos 45 DAI com apenas fêmeas (jovens e com ovos). Esse período, com duração de 7 dias, transcorreu para o final do ciclo de vida de *M. exigua*. Aos 38 DAI a população de fêmeas jovens seguiu a mesma tendência da população de espécimes ovóides do período anterior (31 DAI) e iniciou a formação de ovos no Genótipo 2. Maior população endoparasítica ocorreu no cafeeiro Mundo Novo seguido dos Genótipos 1 e 2. Aos 45 DAI a formação de fêmeas jovens seguiu mesma tendência observada aos 38 DAI. Ocorreu maior ( $P \leq 0,05$ ) número de fêmeas com ovos nas cultivares Mundo Novo e Genótipo 2 (Figura 3A e B), completando o ciclo biológico de *M. exigua* nos cafeeiros mantidos à 28°C. A população endoparasítica total foi destacadamente superior no cafeeiro Mundo Novo seguido pelos Genótipos 1 e 2.

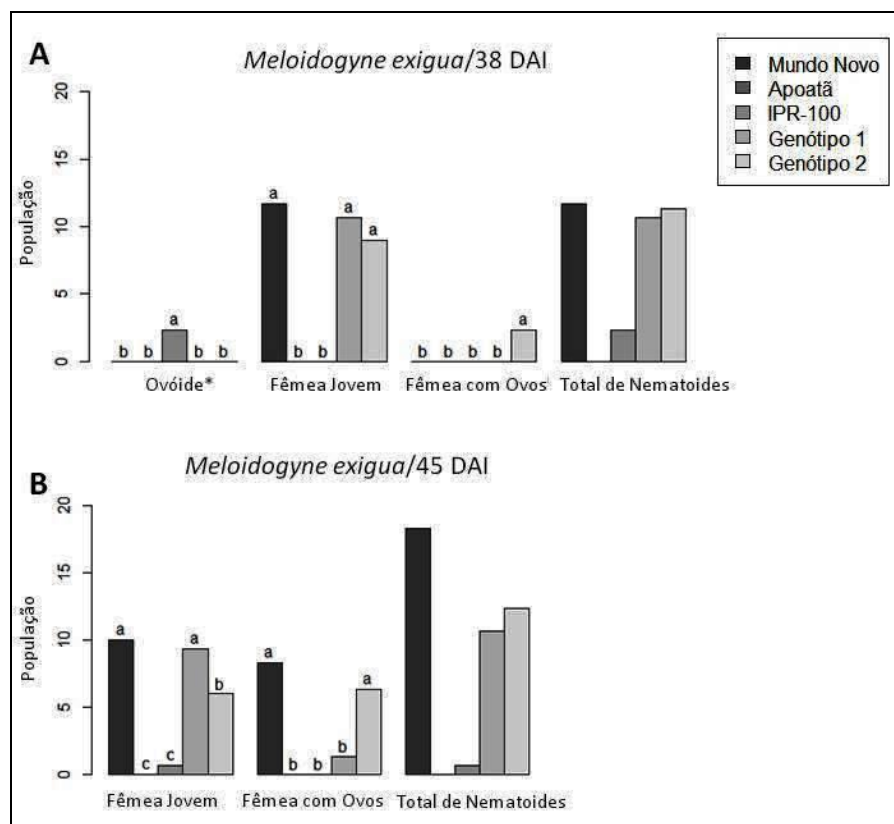


Figura 3. Terceiro período do desenvolvimento do corpo de *Meloidogyne exigua* dentro da raiz de genótipos de cafeeiros aos 38 dias (A) após a inoculação (DAI) e aos 45 DAI (B). Médias seguidas da mesma letra nas colunas de cada estágio de desenvolvimento não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. \*Valores transformados em  $\sqrt{(x+0,5)}$ .

#### *População endoparasítica de M. paranaensis em cafeeiros resistentes e suscetíveis*

Aos 4 e 7 DAI ocorreram apenas espécimes vermiformes e em número estatisticamente semelhante em todos os genótipos cafeeiros (Figura 4A e B). Nesse primeiro período, observou-se o mesmo formato vermiforme do J2

endofítico, indicando uma possível movimentação até o local propício para iniciar o sítio de alimentação. Este período transcorreu sem nenhuma flutuação significativa dos espécimes vermiformes entre os cafeeiros.

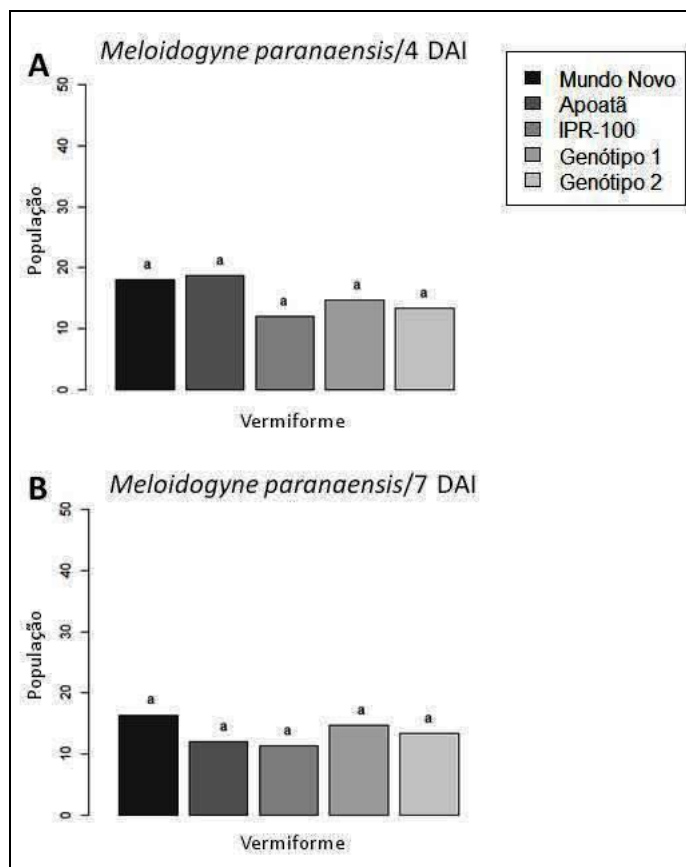


Figura 4. Primeiro período do desenvolvimento do corpo de *Meloidogyne paranaensis* dentro da raiz de genótipos de cafeeiros, aos 4 dias (A) após a inoculação (DAI) e aos 7 DAI (B). Médias seguidas da mesma letra nas colunas de cada estágio de desenvolvimento não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A população endoparasítica no segundo período, 10 aos 24 DAI, mostrou que o desenvolvimento do corpo de *M. paranaensis* iniciou aos 10 DAI, ou seja, antes de *M. exigua*, com a presença de salsichóides. Aos 10 DAI ocorreu grande flutuação populacional dos espécimes vermiformes e salsichóides o que não ocorreu no período anterior, 4 e 7 DAI, com pouca definição da resistência dos genótipos cafeeiros. O número total de espécimes foi elevado no cafeeiro Mundo Novo seguido pelo IPR 100 (Figura 5A, B e C). Aos 17 DAI ocorreram salsichóides e ovóides destacando-se a alta população na cultivar Mundo Novo, e número reduzido de salsichóides em Apatã e IPR 100. Aos 24 DAI observaram-se as fases vermiforme, salsichóide e ovoide, sendo que o menor número de salsichóides ocorreu no IPR 100 e de ovóides no Apatã. No Mundo Novo ocorreu maior ( $P \leq 0,05$ ) população de salsichóide e de população endoparasítica total seguido pelo Genótipo 1 (Figura 5C).

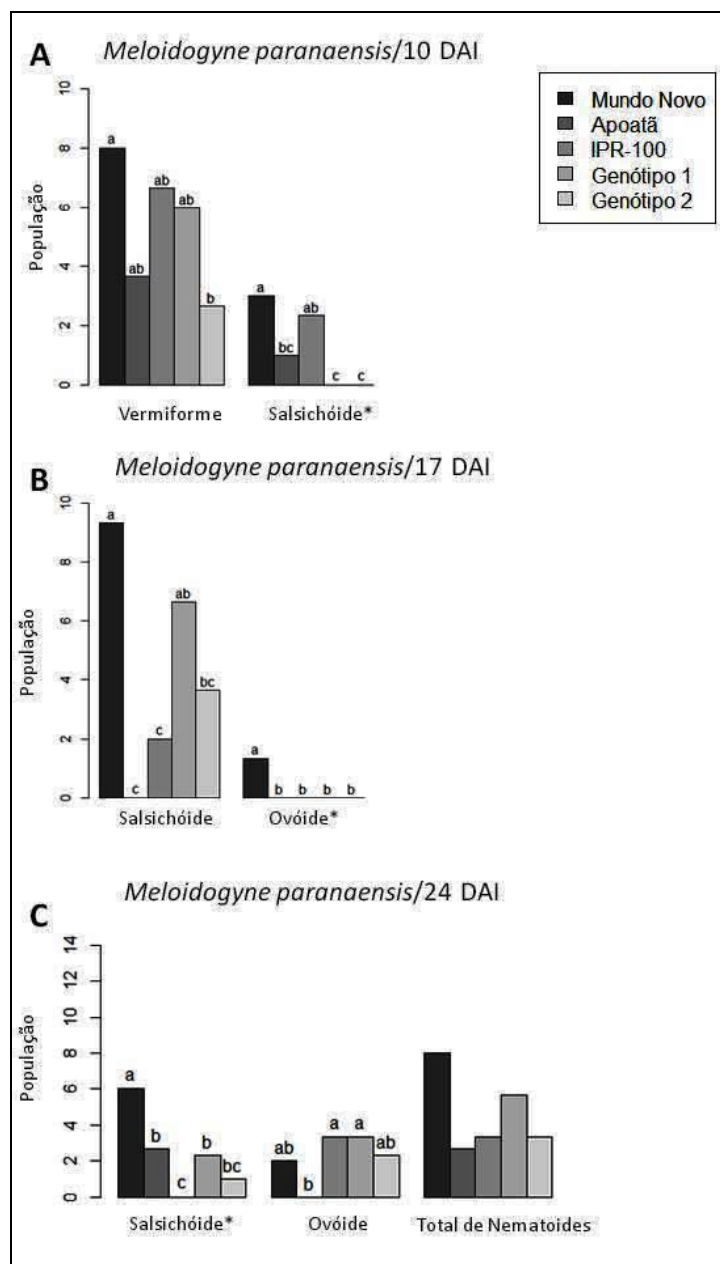


Figura 5. Segundo período do desenvolvimento do corpo de *Meloidogyne paranaensis* dentro da raiz de genótipos de cafeeiros aos 10 dias (A) após a

inoculação (DAI), aos 17 DAI (B) e aos 24 DAI (C). Médias seguidas da mesma letra nas colunas de cada estágio de desenvolvimento não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. \*Valores transformados em  $\sqrt{(x+0,5)}$ .

Aos 31 DAI, início do terceiro período, o número de ovoides e fêmeas jovens foi significativamente maior na cultivar Mundo Novo. Aos 38 DAI menor ( $P \leq 0,05$ ) número de ovoides ocorreu no Apoatã e IPR 100 comparado com os Genótipos 1 e 2. Nessa época, a população de fêmeas jovens foi semelhante nos cafeeiros Apoatã, IPR 100, Genótipos 1 e 2. Aos 45 DAI maior população de fêmeas com ovos ocorreu no Mundo Novo e a população dessas fêmeas foi igualmente ( $P \leq 0,05$ ) reduzida nos demais genótipos de cafeeiro (Figura 6A, B e C). Aos 45 DAI, observou-se alta população endoparasítica total de *M. paranaensis* no Mundo Novo. Aos 45 DAI observou-se ausência de *M. paranaensis* no IPR 100 e Apoatã, demonstrando que as fêmeas jovens não produziram ovos como ocorreu no cafeeiro Mundo Novo.



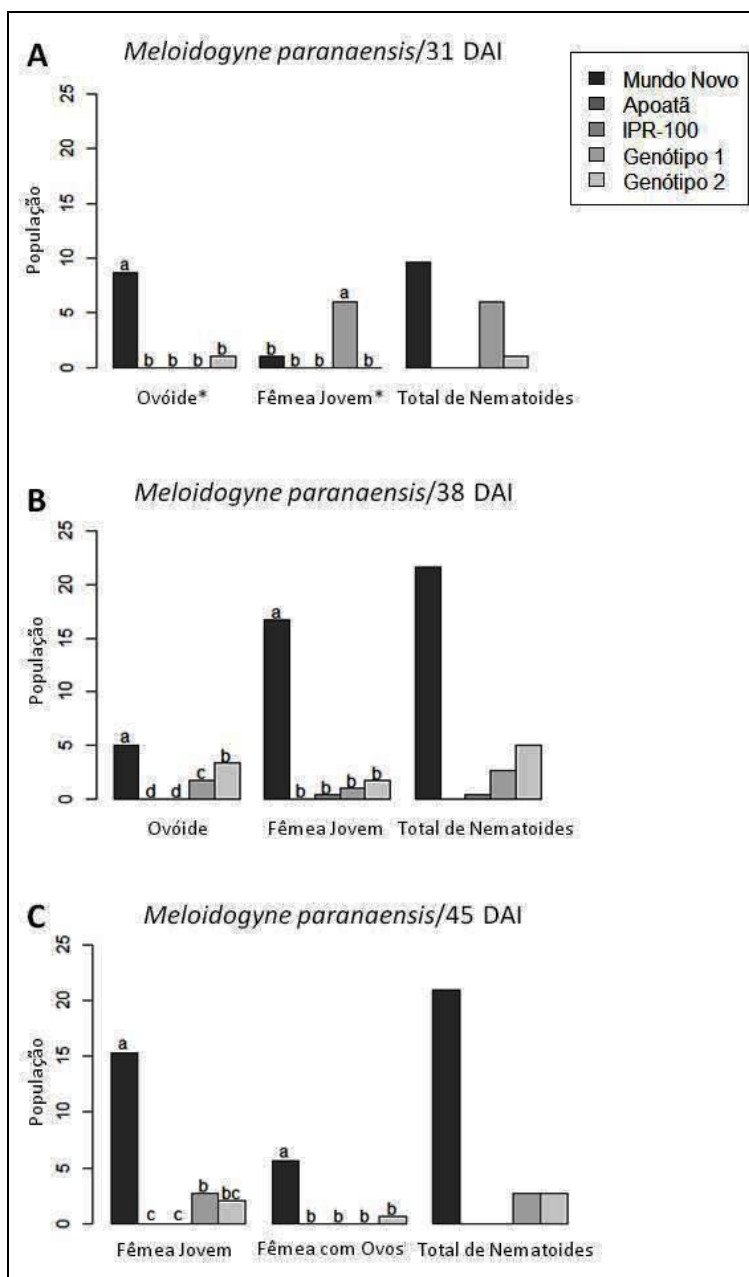


Figura 6. Terceiro período do desenvolvimento do corpo de *Meloidogyne paranaensis* dentro da raiz de genótipos de cafeeiros aos 31 dias (A) após a

inoculação (DAI), aos 38 DAI (B) aos 45 DAI (C). \*Valores transformados em  $\sqrt{(x+0,5)}$ . Médias seguidas da mesma letra nas colunas de cada estágio de desenvolvimento não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

*Observações de raízes de cafeeiros infectados por M. exigua e M. paranaensis ao microscópio eletrônico de varredura*

A região da coifa da raiz foi o local de penetração das duas espécies de *Meloidogyne* em estudo e foi observado que o desenvolvimento dos nematoides ocorreu próximo ao cilindro central das raízes de todos os cafeeiros. Somente na cultivar Mundo Novo foi observado engrossamento na raiz com a presença de todas as fases de desenvolvimento endoparasítico de *M. paranaensis*. No engrossamento observado nas raízes novas do cafeeiro Mundo Novo, aos 45 DAI, destaca-se a presença de rachaduras longitudinais (Figura 7A) na epiderme e córtex da raiz, o que não ocorreu com o parasitismo de *M. exigua* (Figura 7B). Esse é o primeiro relato da presença de rachaduras nas raízes novas de cafeeiros ainda ao final do primeiro ciclo biológico de *M. paranaensis*. Essas rachaduras constatadas no engrossamento da raiz de cafeeiro Mundo Novo parasitada por *M. paranaensis* confirma a agressividade desse nematoide ao cafeeiro suscetível e demonstra a possibilidade do ataque de outros microrganismos patogênicos como fungos e bactérias pela exposição do córtex da raiz. Com o desenvolvimento das fases da população endoparasítica nos cafeeiros suscetíveis houve a formação de galhas em ambas as espécies, porém *M. exigua* desencadeou apenas galhas arredondadas, bem formadas, características dessa espécie.

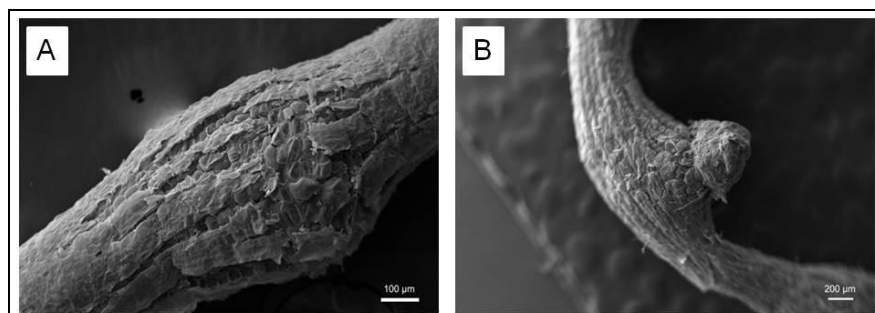


Figura 7. Eletromicrografia de varredura da sintomatologia diferenciada de *Meloidogyne exigua* e *Meloidogyne paranaensis* nas raízes de cafeeiro cultivar Mundo Novo 376/4, aos 45 dias da inoculação. A: engrossamento com rachaduras epidérmicas causadas pelo parasitismo de *M. paranaensis*; B: Galha arredondada típica de *M. exigua* com massa de ovos aparente.

## DISCUSSÃO

O primeiro período das relações *M. exigua* e *M. paranaensis* e os cafeeiros suscetíveis e resistentes estudados neste trabalho reflete o sucesso na penetração do J2 após vencer as barreiras da planta impostas para impedir seu parasitismo. Contudo em cafeeiro, as barreiras impeditivas à penetração do J2 são pouco estudadas. Em nosso estudo foi possível observar, pela primeira vez, com as espécies de nematoides estudadas, que no período de estabelecimento da relação *M. exigua* e os cafeeiros Apatã e Genótipo 1 o impedimento a penetração do J2 pode ter ocorrido para parte da população apesar de permitir a penetração de muitos J2 de *M. exigua*. Por outro lado, os cafeeiros Mundo Novo, IPR 100 e Genótipo 2 podem ter atraído maior número de J2 para a superfície da coifa, possivelmente pela liberação de exsudatos, que envolveram o meristema radicular, dando mais chance para a penetração ocorrer (Campos *et al.*, 2006). No entanto, Oliveira *et al.* (2011) observaram números reduzidos de espécimes

vermiformes de *M. incognita* em Apoatã aos 2 e 4 DAI. Vale ressaltar que *M. incognita* é tão patogênico a cafeeiros quanto *M. paranaensis*. O clone 14 de *C. canephora* manifestou resistência do tipo HR a *M. incognita* e *M. paranaensis* no momento da penetração (Lima *et al.*, 2015).

A penetração de J2 de *Meloidogyne* em plantas resistentes tem ocorrido com frequência em várias culturas inclusive em crotalária (Araya e Caswell-Chen, 1992; Oliveira *et al.*, 2011), sugerindo que a atração é processo independente da resistência em muitas culturas e também nos cafeeiros aqui estudados.

A redução de espécimes vermiformes de *M. exigua* aos 10 DAI em relação aos 4 DAI (Figura 1C) indica que a maioria dos J2 não conseguiu êxito na indução da formação de células gigantes. Em soja suscetível os J2 que penetram nas plantas e não conseguiram sucesso na formação do sítio de alimentação tentaram sair do hospedeiro (Dias-Arieira *et al.*, 2002). No entanto, nenhuma variação na densidade populacional de espécimes vermiformes dentro da raiz entre os genótipos de cafeeiro infestados por *M. paranaensis* foi observada. Vale ressaltar que o tempo para consumação do período de estabelecimento do parasitismo (primeiro período) foi maior nos genótipos de cafeeiro infectados por *M. exigua* (17 DAI) comparado com *M. paranaensis* (10 DAI). Desta forma, o J2 de *M. exigua* demanda mais tempo para enganar a defesa da planta do que o juvenil de *M. paranaensis*. D'Arc e Ferraz (1985) observaram forma salsichóide de *M. exigua* em cafeeiro Mundo Novo com 9 DAI. Em soja, a formação salsichóide de *M. paranaensis* foi observada aos 8 DAI (Moritz *et al.* 2008). Em tomateiros Rutgers, Costa *et al.* (1998) observaram espécimes salsichóides de *M. javanica* aos 10 DAI. Silva *et al.* (2013) observaram formas salsichóides de *M. exigua* 15 DAI em cafeeiro Catuaí usado como controle suscetível. No entanto em cafeeiros infectados com *M. exigua* no presente estudo só foi possível observa-los aos 17 DAI.

A grande redução de formas salsichóides nas cultivares Apoatã e IPR 100 infectados por *M. exigua* e *M. paranaensis* aos 17 DAI (Figuras 2A e 5B) reflete a incapacidade dos J2 em vencer a defesa da planta e conseqüentemente não formar o sítio de alimentação. Assim a resistência dessas cultivares a *M. exigua* e *M. paranaensis* se manifesta muito cedo no ciclo de vida desses patógenos. Em cultivar de tomateiro suscetível a formação de células gigantes induzidas por *M. enterolobii* foi observada aos 17 DAI (Westerich *et al.*, 2011).

A redução significativa de espécimes ovóides de *M. exigua* aos 38 DAI (Figura 3A) nas cultivares Apoatã e IPR 100 confirma o alto nível de resistência dos cultivares a ambas as espécies de *Meloidogyne* refletindo a incapacidade de incrementar a retiradas de nutrientes para satisfazer a exigência crescente para o desenvolvimento do corpo. Vale ressaltar que o Apoatã é usado como porta enxerto de *Coffea arabica* em áreas infestadas por *M. exigua* e *M. paranaensis* e tem sua resistência comprovada por vários autores (Campos e Villain, 2005; Fazuoli *et al.*, 2002; Gonçalves e Silvarolla, 2007). A resistência do Apoatã ao *M. paranaensis* inibiu o desenvolvimento das células nutridoras no sítio de alimentação, pois de acordo com a análise da população endoparasítica esse nematoide conseguiu avançar somente até a fase de juvenil salsichóide aos 24DAI. No IPR 100 a resistência ocorre mais tarde, impedindo a manutenção do sítio de alimentação, visto que nessa cultivar foi observada a fase ovoide aos 24 DAI e uma quantidade bastante reduzida de fêmeas jovens aos 38 DAI. A população endoparasítica demonstra a manifestação da resistência das cultivares Apoatã e IPR 100 e do Genótipo 1 ao *M. paranaensis* em épocas diferentes. No Genótipo 1, o desenvolvimento do *M. paranaensis* foi até a fase de fêmea jovem respectivamente aos 45 DAI, possivelmente com o sítio de alimentação incapaz de possibilitar o avanço no desenvolvimento corporal, completando a completude do ciclo de vida do nematoide nas plantas. Nas condições do

presente estudo, *M. exigua* e *M. paranaensis* completaram seu ciclo de vida aos 45 DAI na cultivar Mundo Novo.

As altas populações das fases de desenvolvimento salsichóide, ovoide e fêmea jovem de *M. exigua* (Figuras 2A, B e C; 3A e B) nos Genótipos 1 e 2 indica alta suscetibilidade desses cafeeiros. No entanto, a baixa ocorrência de fêmeas jovens e com ovos nos mesmos cafeeiros infestados por *M. paranaensis* (Figura 6B e C) indica resistência, mas em nível menor do que nas cultivares Apoatã e IPR 100 (Figura 6). A resistência dos Genótipos 1 e 2 a *M. paranaensis* se manifesta no período de desenvolvimento da fase ovoide para fêmea, muito tarde no ciclo de vida do nematoide, diferente da resistência de Apoatã e IPR 100 a *M. exigua* e *M. paranaensis*. Por isso o ciclo de *M. paranaensis* se completa com produção de poucos ovos nos Genótipos 1 e 2 aos 45 DAI. Os Genótipo 1 e 2 já demonstraram tolerância a *M. paranaensis* em outro ensaio (Silva *et al.*, 2015). Os Genótipos 1 e 2 ainda não foram estudados quanto a resistência a *M. exigua* e *M. paranaensis*.

A resistência de cultivares de café a nematoides se manifesta em fases diferentes da ontogenia de nematoides. Na cultivar de café resistente Apoatã a *M. incognita*, nenhum espécime salsichóide, ovóide e fêmeas foram encontradas aos 25 DAI, contudo a presença deles foi observada aos 25 DAI na cultivar suscetível Catuaí (Oliveira *et al.* 2011).

Ainda não foi possível relacionar a ineficiência da célula gigante produzida no parasitismo de nematoides em plantas com o seu tamanho ou em algum aspecto fisiológico, e nem mesmo com níveis diferentes de impedimento a nutrição do nematoide na célula gigante. No entanto a sua capacidade nutridora dos nematoides se manifesta possibilitando vários níveis populacionais de acordo com o genótipo do hospedeiro levando as plantas a terem comportamentos diferenciados desde suscetibilidade até alta resistência. O impedimento à evolução da população do nematoide parasita passa a ser critério

para resistência. Formação de galhas em progênies de *C. arabica* pode ocorrer sem que a fêmea internamente produza ovos (Rezende *et al.*, 2013).

Eletromicrografias de meloidoginoses do cafeeiro tem sido empregada em sua maioria nos estudos de taxonomias e identificação de espécies. Poucos trabalhos utilizam dessa metodologia no estudo da sintomatologia de espécie de *Meloidogyne* em cafeeiros. Nesse estudo detectou-se a presença precoce de rachaduras longitudinais no córtex da raiz na região da galha induzida por *M. paranaensis* ao completar um ciclo de vida aos 45 DAI.

No presente estudo *M. paranaensis* confirma-se a agressividade desse nematoide às raízes do cafeeiro pela formação de rachaduras ainda durante o primeiro ciclo de vida e em zona de crescimento de raízes novas, rachaduras essas que além de danificarem a integridade e funcionamento das raízes podem servir como porta de entrada para outros microorganismos. Estudos mais aprofundados da fisiologia do parasitismo de *M. paranaensis* em cafeeiro com identificação das enzimas de degradação da parede celular podem esclarecer a formação dessas rachaduras.

A presença de galhas é um aspecto sintomatológico do ataque desses patógenos. No entanto, em cultivares resistente pode haver formação de galhas sem que haja reprodução do nematoide como verificado no presente estudo com *M. paranaensis*. Esse resultado indica que a avaliação sintomatológica não é um parâmetro para verificar resistência de cafeeiros a *M. paranaensis*, confirmando Carneiro *et al.* (2008), os quais apontam que o índice de galhas não pode ser um indicador de resistência e suscetibilidade de cafeeiros. Resultados contraditórios obtidos por Pasqualotto *et al.* (2015) afirmam haver possibilidade de avaliação de materiais genéticos de cafeeiros para resistência a *M. paranaensis* baseando-se na caracterização sintomatológica do sistema radicular parasitado. Mais pesquisas devem ser realizadas para confirmar a impossibilidade de empregar os sintomas de galhas nos estudos de resistência dos cafeeiros a *M. paranaensis*.

## CONCLUSÕES

O comportamento de genótipos de cafeeiros à *M. exigua* e à *M. paranaensis* são diferentes.

A resistência de Apoatã e IPR 100 à *M. exigua* se manifesta um pouco mais cedo em relação a *M. paranaensis*.

Necessita-se de mais pesquisas para comprovar a imunidade da cultivar IPR 100 à *M. exigua*.

Os Genótipos 1 e 2 comportaram-se como resistentes à *M. paranaensis*, e suscetíveis à *M. exigua*.

*M. paranaensis* induz rachaduras longitudinais já no primeiro ciclo biológico em cultivares suscetíveis sem a necessidade de uma elevada população do nematoide para que esse dano ocorra.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo e à EPAMIG Sul pela parceria no desenvolvimento da pesquisa. Ao Consórcio Pesquisa Café, FAPEMIG e CNPq pelo apoio.

## LITERATURA CITADA

Araya, M., E. P. Caswell-Chen. 1992. Penetration of *Crotalaria juncea*, *Dolichos lablab* and *Sesamum indicum* roots by *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 26: 238-240.



- Birdy, D. W., T. Kirkpatrick, K. R. Barker. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15(1): 142-143.
- Campos, H. D., V. P. Campos, J. L. Coimbra. 2006. Efeito de Exudato Radicular de *Brachiaria decumbens* e do Sorgoleone de *Sorghum bicolor* no desenvolvimento de *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira* 30(1): 59-65.
- Campos, V. P., L. Villain. 2005. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. Pp. 529-579 in M. Luc, R. A. Sikora, J. Bridge. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford: CAB International.
- Carneiro, R. M. D. G., L. F. G. Mesquita, W. Gonçalves, A. A. Pereira. 2008. Pathogenicity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) from Brazil and America on two genotypes of *Coffea arabica*. *Tropical Plant Pathology* 33(4)309-312.
- Costa, D. C., S. Ferraz, R. C. Caldas. 1998. Estudo comparativo da penetração e desenvolvimento de *Meloidogyne javanica* em raízes de guandu e tomateiro. *Nematologia Brasileira* 22(2) 80-86.
- D'arc, L. R., S. Ferraz. 1985. Biologia de *Meloidogyne exigua*. II - Desenvolvimento pós-embriogênico em cafeeiro 'Mundo Novo'. *Revista Ceres* 32: 349-361.
- Davis, E. L., R. S. Hussey, T. J. Baum. 2004. Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends in Parasitology* 20:134-141.
- Davis, E. L., M. G. Mitchum. 2005. Nematodes: sophisticated parasites of legumes. *Plant Physiology* 137:1182-1188.
- Dias-Arieira, C. R., S. Ferraz, L. G. Freitas, H. Mizobuts. 2002. Penetração e desenvolvimento de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Heterodera glycines* em quatro gramíneas forrageiras. *Nematologia Brasileira*. 26(1):35-41.

- Fazuoli, L. C., H. P. Medina Filho, W. Gonçalves, O. Guerreiro Filho, M. B. Silvarolla. 2002. Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arábica obtidas no Instituto Agrônômico de Campinas. Pp. 162-215 in L. Zambolin. O Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café. Viçosa: Editora UFV.
- Gonçalves, W., M. B. Silvarola. 2007. A luta contra a doença causada pelos nematoides parasitas do cafeeiro. O Agrônômico. 59(1):54-56.
- Goverse, A., G. Smant. 2014. The activation and suppression of plant innate immunity by parasitic nematodes. Annual Reviews Phytopathology. 52:243-265.
- Hussey, R. S., H. R. Barker. 1973. A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter 57:1025-1028.
- Lima, E. A., C. Furlanetto, M. Nicole, A. C. M. M. Gomes, M. R. A. Almeida, A. Jorge-Júnior, V. R. Correa, S. M. L. SALGADO;, M. A. G. FERRÃO;, R. M. D. G. CARNEIRO. 2015. The multi-resistant reaction of drought-tolerant Coffee 'Conilon Clone 14' to *Meloidogyne* spp. and late Hypersensitive-Like Response in *Coffea canephora*. Phytopathology 105(6): 806-814.
- Moritz, M. P., R. G. Carneiro, D. C. Santiago, K. C. Nakamura, E. Pignoni, J. C. Gomes. 2008. Estudo comparativo da penetração e reprodução de *Meloidogyne paranaensis* em raízes de cultivares de soja resistente e suscetível. Nematologia Brasileira 32(1):33-40.
- Oliveira, D. S., R. D. L. Oliveira, D. G. Silva, R. V. SILVA. 2011. Characterization of *Meloidogyne incognita* populations from São Paulo and Minas Gerais state and their pathogenicity on coffee plants. Tropical Plant Pathology 36(3): 190-194.

- Pasqualotto A. T., S. M. L. Salgado, C. E. Botelho, A. N. G. Mendes, R. M. Rezende, S. R. Souza. 2015. Características agronômicas de progênies de cafeeiro em área infestada por *Meloidogyne paranaensis*. *Coffee Science* 10(3): 392 – 401.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2014. Disponível em: URL <http://www.R-project.org/>.
- Rezende, R. M., S. M. L. Salgado, J. C. Rezende, G. R. Carvalho, A. A. Pereira, R. R. Lima, A. D. Ferreira. 2013. Resistência de progênies de *Coffea arabica* em área infestada por *Meloidogyne exigua*. *Nematropica* 43(2):233-240.
- Salgado, S. M. L., J. C. Rezende, J. A. R. Nunes . 2014. Selection of coffee progenies for resistance to nematode *Meloidogyne paranaensis* in infested area. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 14: 94-101.
- Sera, G. H., T. Sera, D. S. Ito, J. S. Mata, D. S. Doi, J. A. Azevedo, C. Ribeiro Filho. 2007. Progênies de *Coffea arabica* cv IPR-100 resistentes ao nematoide *Meloidogyne paranaensis*. *Bragantia*, 66(1):43-49.
- Silva, V. A., S. M. L. Salgado, L. A. Sá, A. M. Reis, H. R. O. Silveira, A. N. G. Mendes, J. P. R. A. D. Barbosa, A. A. Pereira. 2015. Uso de características fisiológicas na identificação de genótipos de café arabica tolerantes ao *Meloidogyne paranaensis*. *Coffee Science* 10(2):242-250.
- Silva, R. V., R. D. L. Oliveira, P. S. Ferreira, A. O. Ferreira, F. A. Rodrigues. 2013. Defense responses to *Meloidogyne exigua* in resistant coffee cultivar and non-host plant. *Tropical Plant Pathology* 38(2):114-121.
- Westerich, J. N., J. M. O. Rosa, S. R. S. Wilcken. 2011. Estudo Comparativo da Biologia de *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*) e *Meloidogyne javanica* em tomateiros com Gene *Mi*. *Summa Phytopathology* 37(1):35-41.

Williamson, V. M., R. S. Hussey. 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell* 8:1735-1745.

Artigo 2 – Preparado de acordo com as normas do periódico Nematropica.

**REAÇÃO DE CAFEIROS À *MELOIDOGYNE EXIGUA* E ESTUDO DOS  
ELEMENTOS QUÍMICOS NAS RAÍZES PARASITADAS ATRAVÉS DA  
MICROANÁLISE DE RAIOS-X**

Natália Monique Ribeiro Barbosa Guimarães<sup>1\*</sup>, Sônia Maria de Lima Salgado<sup>2</sup>,  
João Filipi Rodrigues Guimarães<sup>3</sup>, Fabiano França<sup>1</sup>, Eduardo Alves<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia (DFP), Universidade Federal de Lavras (UFLA), CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil; <sup>2</sup>Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Unidade Sul, Cx. Postal 176, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil; <sup>3</sup>Departamento de Biologia (DBG), Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP: 36570-000, Viçosa, MG, Brasil;  
\*Autor para correspondência: Rua Barbosa Lima, 829, Centro, Bloco 5, Apartamento 302, Lavras, MG, Brasil, CEP: 37200-000, Phone: 55-35-991904206, Fax: 55-35-38291468. e-mail: agronaribeiro@hotmail.com.

Reação de cafeeiros à *M. exigua* e Microanálise de Raios-X.

ABSTRACT

GUIMARÃES, N. M. R. B., SALGADO, S. M. L., GUIMARÃES, J. F. R., FRANÇA, F., ALVES, E. 2016. **REACTION COFFEE GENOTYPES TO MELOIDOGYNE EXIGUA AND STUDY OF ELEMENTS CHEMICALS IN ROOTS PARASITIZED THROUGH MICROANALYSIS X-RAY.** Nematropica 41:00-00.

Changes in coffee plants infested by *M. exigua* still need new knowledge, especially in genotypes developed lately. Five genotypes of coffee plants (Mundo Novo 376-14, Apoatã IAC 2258, IPR 100, Genotype 1 - MG 179 PL1 R 1 and Genotype 2 - MG 179 PL3 R1) were evaluated for resistance to *Meloidogyne exigua* 6 months after inoculation. The mineral elements and regions with galls formed and where no parasitic nematode for each coffee genotype were quantified by X-ray microanalysis. The vegetative development of genotypes inoculated and not inoculated were evaluated in growth in height, diameter and fresh weight of the roots of plants with and without inoculation. The variables analyzed were subjected to multivariate canonical variables. The Apoatã and IPR 100 cultivars were resistant to *M. exigua* have to cultivate the Mundo Novo and the Genotypes 1 and 2 were susceptible. The calcium and iron were present in all samples being analyzed calcium detected in larger amounts in the genotypes associated with nematode, except Genotype 1. The potassium was detected only where the genotype was not associated with *M. exigua*. There was no significant interaction in the genotypes with the presence or absence of the nematode, the cultivars Mundo Novo and Apoatã and Genotype 1 showed higher values for these variables. With multivariate canonical variate analysis found three dispersion patterns, the first between Mundo Novo and Genotype 1, the second between Genotype 2 and IPR 100 and a third standard composite cultivar Apoatã with the highest distance between treatments. Os Genotypes 1 and 2 showed susceptibility to *M. exigua*. The calcium content in coffee root parasitized by *M. exigua* is higher compared to the level in healthy roots, can this element is related to the plant defenses.

**Key-words:** *Coffea* spp., root-knot nematode, resistance.

## RESUMO

GUIMARÃES, N. M. R. B., SALGADO, S. M. L., GUIMARÃES, J. F. R., FRANÇA, F., ALVES, E. 2016. **REAÇÃO DE CAFEEIROS A *MELOIDOGYNE EXIGUA* E ESTUDO DOS ELEMENTOS QUÍMICOS NAS RAÍZES PARASITADAS ATRAVÉS DA MICROANÁLISE DE RAIOS-X.** Nematropica 41:00-00.

As alterações nos cafeeiros infestados por *M. exigua* ainda precisa de novos conhecimentos, principalmente nos genótipos desenvolvidos ultimamente. Cinco genótipos de cafeeiros (Mundo Novo 376-14, Apoatã IAC 2258, IPR 100, Genótipo 1 – MG 179 pl1 R1 e Genótipo 2 – MG 179 pl3 R1) foram avaliados para a resistência de *Meloidogyne exigua* após 6 meses da inoculação. Os elementos minerais de regiões com galhas bem formadas e de locais onde não houve parasitismo do nematoide em cada genótipo cafeeiro foram quantificados através da Microanálise de Raios-X. O desenvolvimento vegetativo dos genótipos inoculados e não inoculados foram avaliados em incremento de altura, de diâmetro e de massa fresca das raízes de plantas com e sem inoculação. As variáveis analisadas foram submetidas à técnica multivariada de variáveis canônicas. As cultivares Apoatã e IPR 100 mostraram-se resistentes à *M. exigua* já a cultivar Mundo Novo e os Genótipos 1 e 2 foram suscetíveis. O cálcio e o ferro estiveram presentes em todas as amostras analisadas sendo o cálcio detectado em quantidades maiores nos genótipos associados ao nematoide, exceto no Genótipo 1. O potássio foi detectado apenas nos genótipos onde não houve associação com *M. exigua*. Não houve interação significativa nos genótipos com a presença ou ausência do nematoide, as cultivares Mundo Novo e Apoatã e o Genótipo 1 apresentaram maiores valores para essas variáveis.

Com a análise multivariada de variáveis canônicas verificou-se três padrões de dispersão, o primeiro entre Mundo Novo e Genótipo 1, o segundo entre Genótipo 2 e IPR 100 e um terceiro padrão composto da cultivar Apoatã que apresentou maior distância entre os tratamentos. Os Genótipos 1 e 2 mostraram suscetibilidade à *M. exigua*. O teor de cálcio em raízes de cafeeiros parasitados por *M. exigua* é maior quando comparado com o teor em raízes sadias, podendo esse elemento está relacionado às defesas da planta.

**Palavras-chave:** *Coffea* spp., nematoide de galhas, resistência.

## INTRODUÇÃO

A ocorrência de nematoides nos campos de cultivo de *Coffea* sp. pode reduzir em até 20% a produção cafeeira (Ito *et al.*, 2008). *Meloidogyne exigua* é a espécie mais encontrada nas regiões produtoras do Brasil (Campos e Villain, 2005). E para evitar esses prejuízos, o uso de cafeeiros resistentes é uma das principais medidas de manejo. A resistência de cafeeiros a *Meloidogyne* spp tem sido empregada em áreas infestadas por meio do plantio de mudas em pé-franco ou mudas de *Coffea arabica* enxertadas em *C. canephora*. Embora a maioria das cultivares de *C. arabica* seja altamente suscetíveis ao nematoide das galhas, algumas cultivares demonstraram certos níveis de resistência ou tolerância a algumas espécies de *Meloidogyne*.

A cultivar Apoatã IAC 2258 de *C. canephora*, usada como porta enxerto (Fazuoli *et al.*, 2002), permite a produção de café em áreas comprometidas pela presença de fitonematoides. No Estado de Minas Gerais, Brasil, cultivares de *C. arabica* enxertadas em Apoatã produziram rendimentos mais elevados em comparação com plantas não enxertadas (Tomaz *et al.*, 2005). Na América



Central e do Sul, o uso de porta-enxertos resistentes para o manejo de nematoides tem sido praticado em grande escala por mais de 35 anos (Bertrand *et al.*, 2001). Determinados porta-enxertos apresentam maior desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea e maior eficiência na absorção de nutrientes, aumentando com isso o potencial de produção da lavoura (Dias *et al.*, 2011).

Progênes de *C. arabica* selecionadas por Sera *et al.* (2007) para obtenção da cultivar IPR-100, possuem resistência a *M. incognita* raça 1 (Kanayama *et al.*, 2009) e resistência ao *M. paranaensis* em áreas cafeeiras do Paraná e Minas Gerais (Salgado *et al.*, 2014), com baixo custo na formação das mudas pois são propagadas predominantemente por sementes.

O Amphillo, material genético introduzido da Etiópia, tem sido empregado nos programas de melhoramento genético do café desenvolvido em varias instituições de pesquisa. Após cruzamentos com a cultivar Catuaí, esse material genético está preservado no Banco de Germoplasma do Café da EPAMIG, com grande potencial de resistência a *Meloidogyne* sp. Em estudo conduzido em casa de vegetação, Morera e López (1987) observaram que *C. arabica* cv. Amphillo foi moderadamente resistente a *M. exigua*. Enquanto Gonçalves *et al.* (1996) observaram resistência parcial do Amphillo à raça 2 de *M. incognita*. Algumas progênes de cafeeiro oriundas do cruzamento do Amphillo 2171 e Catuai Vermelho têm demonstrado resistência a *Meloidogyne paranaensis* em área infestada (Salgado *et al.*, 2014).

A reação de cafeeiros a *Meloidogyne* spp. é dependente da interação parasítica da espécie de nematoide com a genética da planta. O estudo de alterações estruturais e fisiológicas verificadas durante a interação entre um patógeno e uma planta hospedeira pode revelar detalhes da interação entre os organismos (Pascholati *et al.*, 2008).

Há uma diversidade de reação dos cafeeiros com reflexo na sintomatologia e nos elementos nutricionais do cafeeiro. O parasitismo de fitonematoides sobre seus hospedeiros frequentemente induz alterações na composição mineral e orgânica dos tecidos da planta parasitada quando comparadas às plantas não infectadas (Ferreira *et al.*, 2012). O desenvolvimento endoparasítico de *Meloidogyne* spp. provoca alterações nas raízes do cafeeiro associadas a processos como a obstrução dos vasos condutores, alteração na absorção e translocação de água e de nutrientes e alterações fisiológicas. Plantas parasitadas por *Meloidogyne* spp. apresentam carência de nitrogênio, fósforo e potássio e tendência a menor absorção de cálcio e magnésio (Gomes *et al.*, 2008). O cálcio é deslocado para o sítio de infecção do nematoide devido à reação de defesa da planta, especialmente quando ocorrem danos na membrana, uma vez que é essencial na formação de barreiras estruturais e químicas (Belan *et al.*, 2015).

Combinando simultaneamente a composição e morfologia, a microanálise de raios X (MAX) é uma técnica de análise qualitativa e quantitativa de elementos minerais nas amostras. Essas observações podem detectar os elementos químicos envolvidos na relação parasítica de *Meloidogyne* sp. em raízes de cafeeiro. Por isso, o presente trabalho, objetivou avaliar o comportamento de genótipos cafeeiros a *M. exigua* como também detectar e quantificar os elementos minerais envolvidos na interação planta X nematoide nestas cultivares com e sem a presença do nematoide.

## MATERIAL E MÉTODOS

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

Mudas do Genótipo 1 e Genótipo 2, referentes respectivamente aos acessos MG 179 pl1 R1 e MG 179 pl3 R1, ambos originados do cruzamento de Catuaí Vermelho X Amphiló MR 2161, mantidos no Banco Ativo de Germoplasma de Café da EPAMIG, foram formadas a partir de sementes colhidas na safra 2013-2014 na área experimental localizada na Fazenda Guaçuara, Piumhi, Minas Gerais. Além desses genótipos, as cultivares IPR 100 e Mundo Novo 376/4, ambas de *Coffea arabica* e a cultivar Apoatã IAC-2258 de *C. canephora* também foram formadas de sementes colhidas na área experimental citada.

No estágio de folhas cotiledonares, formadas em bandejas contendo areia autoclavada, as mudas foram transferidas para vasos de 5 litros contendo a mistura solo:esterco (2:1) desinfestado com Dazomete (BASAMIDE®). Os vasos com as mudas permaneceram em casa de vegetação com temperatura média de 28°C e irrigação manual diária.

#### *Obtenção do inóculo de Meloidogyne exigua e inoculação*

Ovos de *M. exigua* oriundos de cafeeiros suscetíveis em área experimental infestada no município de Campos Altos foram identificados através dos fenótipos de esterese em *M. exigua* E2. Essa população foi mantida em tomateiros cultivar Santa Clara em casa de vegetação por 60 dias, quando então foram extraídos conforme a técnica de Hussey e Barker (1973). A suspensão de ovos foi calibrada para inoculação de 9.000 ovos em quatro orifícios equidistantes feitos ao redor da planta, quando essas atingiram o oitavo par de folhas definitivas. O experimento foi instalado em casa de vegetação, em delineamento de blocos casualizados. Na avaliação da reprodução do nematoide foram utilizados os cinco genótipos inoculados com *M. exigua* em cinco repetições. Já para as análises de crescimento vegetativo dos cafeeiros foram

utilizados cinco genótipos de café com e sem inoculação de *M. exigua* (fatorial 5 X 2), com cinco repetições.

#### *Reprodução de M. exigua nos cafeeiros*

Aos 6 meses após a inoculação de *Meloidogyne exigua*, as plantas foram avaliadas por meio do índice de galhas (IG), segundo a escala proposta por Taylor e Sasser (1978), e também pelo número de ovos produzidos, o qual foi extraído das raízes através da técnica de Hussey e Barker (1973). A seguir, coletou-se o número de ovos por grama de raiz (NOGRaiz), e fator de reprodução (FR), calculado pelo quociente entre o número de ovos ao final do experimento (Pf) e o número de ovos inoculados (Pi).

#### *Microanálise de Raios X dos elementos minerais nas raízes de cafeeiros parasitadas por M. exigua*

Aos seis meses da inoculação, com auxílio de um microscópio estereoscópico, as raízes foram seccionadas em pequenas regiões sadias (sem parasitismo) e de galhas bem formadas. Esses segmentos foram montados em *stubs* com a ajuda de uma fita de carbono dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio, devidamente etiquetados, e mantidos por 24 horas em estufa a 70°C para desidratação dos espécimes. Após esse período, foram levados para a máquina de pulverização catódica (MED 010, Balzer) e coberto com uma camada de carbono. As amostras foram observadas sob SEM (Leo Evo 40 XVP) acoplado ao sistema de detecção de MAX EDS X-Flash Detector 5010 (Bruker) e analisados utilizando o software ESPIRIT 1.9 (Bruker). Imagens foram geradas e registradas digitalmente, a aumentos variáveis, para cada amostra, nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de trabalho de 9 mm.

Posteriormente foram determinadas quantitativamente e qualitativamente a composição elementar coletando e analisando os Raios X emitidos pela amostra.

#### *Desenvolvimento vegetativo de cafeeiros inoculados e não inoculados com *M. exigua**

No dia da inoculação as plantas com e sem inoculação foram avaliadas quando ao crescimento vegetativo por meio da altura e diâmetro do caule na altura do primeiro nó, medidos em centímetros. Aos 6 meses após a inoculação de *Meloidogyne exigua*, as plantas foram avaliadas em altura e diâmetro de caule para obtenção dos valores do incremento de altura (Alt) e incremento de diâmetro (Diam), subtraindo os valores dessa avaliação com a primeira (dia da inoculação). Aos seis meses foi avaliada também a massa fresca da raiz (MFRaiz).

A reprodução do nematoide foi avaliada por meio do índice de galhas (IG), segundo a escala proposta por Taylor e Sasser (1978), número de ovos por grama de raiz (NOGRAiz), e fator de reprodução (FR), calculado pelo quociente entre o número de ovos ao final do experimento (Pf) e o número de ovos inoculados (Pi).

#### *Análises estatísticas*

As variáveis índice de galhas (IG), número de ovos por grama de raiz (NOGRAiz) e fator de reprodução (FR) não tiveram distribuição normal dos dados, pois não atenderam os critérios de homocedasticidade mesmo após a transformação, por isso foi adotada metodologia não-paramétrica de Kruskal-Wallis para comparação dos tratamentos. Constatada diferença significativa em nível de 5% entre os tratamentos, realizou-se a análise de comparação múltipla via teste pareado de Wilcoxon.

Os dados de desenvolvimento vegetativo foram submetidos aos testes de homogeneidade de variância de Bartlett e de normalidade de Shapiro-Wilk, considerando 5% de probabilidade. As variáveis Alt e MFRaiz por não atenderem aos critérios de homogeneidade de variância e normalidade foram transformadas seguindo a metodologia Box-Cox com o parâmetro  $\lambda$  ajustado de -0,09 e 1,29 respectivamente, e posteriormente empregou-se o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em seguida todas as variáveis, exceto a variável Índice de Galhas (IG), foram submetidas à técnica multivariada de variáveis canônicas para visualização gráfica da dispersão dos tratamentos. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software R (R Core Team, 2014).

## RESULTADOS

### *Reprodução de M. exigua nos cafeeiros*

O índice de galhas (IG) apresentou amplitude de 0 a 5 seguindo a metodologia proposta por Taylor e Sasser (1978) (Figura 1). As cultivares Apoatã e IPR 100 não apresentaram formação de galhas e receberam nota 0, comportando-se como resistentes à *M. exigua*. A cultivar Mundo Novo e os Genótipo 1 e 2 receberam nota 5, pois apresentaram no seu sistema radicular uma quantidade de galhas maior que 100.

O número de ovos por grama de raiz (NOGRaiz) nos cafeeiros Mundo Novo e nos Genótipos 1 e 2 foram estatisticamente iguais demonstrando multiplicação do nematoide, sendo considerados suscetíveis. Já as cultivares Apoatã e IPR 100 não apresentaram formação de ovos, comportando-se como resistentes (Figura 1).

Utilizando-se os critérios adaptados de Seinhorst (1967) com base no fator de reprodução (FR), verificou-se que as cultivares Apoaã e IPR 100 após seis meses de inoculação de *M. exigua* comportaram-se como resistentes, apresentando valores menores que 1 (FR=0), ao passo que os genótipos Mundo Novo, Genótipo 1 e 2 obtiveram fator de reprodução maior que 1, comportando-se assim como suscetíveis a *M. exigua*.

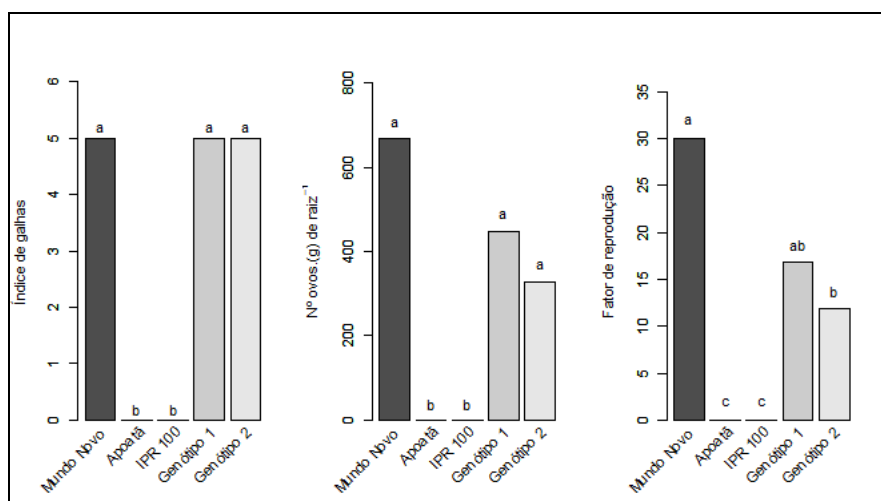


Figura 1. Índice de galhas, número de ovos por grama de raiz e fator de reprodução de genótipos de cafeeiros inoculados com *Meloidogyne exigua* sob condições de casa de vegetação. Médias seguidas pela mesma letra nas barras não diferem entre si, pelo teste Wilcoxon ao nível de 5% de probabilidade. Índice de galhas segundo metodologia de Taylor e Sasser (1978); Fator de Reprodução segundo critério de Seinhorst (1967).

*Microanálise de Raios X dos elementos minerais nas raízes de cafeeiros parasitadas por M. exigua*

Na Microanálise de raios-X (MAX) foi possível identificar nove elementos químicos na composição dos tecidos de raiz dos genótipos de cafeeiros com e sem a presença de *M. exigua* em 100% das áreas analisadas. Nas amostras onde o nematoide não estava presente pode ser observado uma maior variação da composição dos elementos químicos, ao contrário das amostras parasitadas por *M. exigua*, onde houve uma redução desses elementos (Tabela 1).

As cultivares resistentes, Apoatã e IPR 100, na presença do nematoide não formaram galhas, comprovando a resistência ao *M. exigua*.

Tabela 1. Detecção de elementos minerais através da Microanálise de Raios-X em raízes de cafeeiros com e sem *M. exigua* 6 meses após inoculação.

Tratamentos	Sem <i>M. exigua</i>			Com <i>M. exigua</i>		
	Potássio (K)	Cálcio (Ca)	Ferro (Fe)	Potássio (K)	Cálcio (Ca)	Ferro (Fe)
Mundo Novo	25,45%	8,60%	19,45%	-	33,86%	17,42%
Apoatã	42,86%	32,78%	2,53%	*	*	*
IPR 100	63,23%	21,31%	2,39%	*	*	*
Genótipo 1	37,58%	34,07%	6,96%	-	25,14%	74,84%
Genótipo 2	39,19%	12,65%	8,69%	-	14,19%	19,83%

\*As cultivares resistentes Apoatã e IPR 100 não formaram galhas 6 meses após a inoculação de *M. exigua*. – elemento não detectado.

O cálcio e o ferro estiveram presentes em todas as amostras analisadas, porém com concentração diferenciada conforme a ausência ou presença de *M.*



*exigua*. O cálcio foi detectado em quantidades maiores nos genótipos associados ao nematoide quando comparados aos mesmos genótipos correspondentes sem o nematoide, exceto no Genótipo 1 (Figura 2Q).

A concentração do ferro foi alterada pela presença do *M. exigua*. Maior concentração de ferro destacadamente ocorreu no Genótipo 1, (Tabela 1). A porcentagem de ferro manteve-se estável nas amostras com e sem nematoide da cultivar Mundo Novo. Nos Genótipos 1 e 2 com *M. exigua*, a presença desse elemento foi elevada (Figura 2R e X) em comparação a esses mesmos genótipos sem parasitismo de *M. exigua*.

O potássio foi detectado apenas nos genótipos onde não houve associação com *M. exigua* (Figura 3), destacando a cultivar IPR 100 onde o elemento foi detectado em 63,23% da área analisada (Figura 3F). O potássio e o cálcio foram os elementos mais detectados nas áreas analisadas de Apoatã, com 42,86% e 32,78% e no IPR 100 com 63,23% e 21,31% respectivamente. Os outros elementos detectados apresentaram valores pouco expressivos.

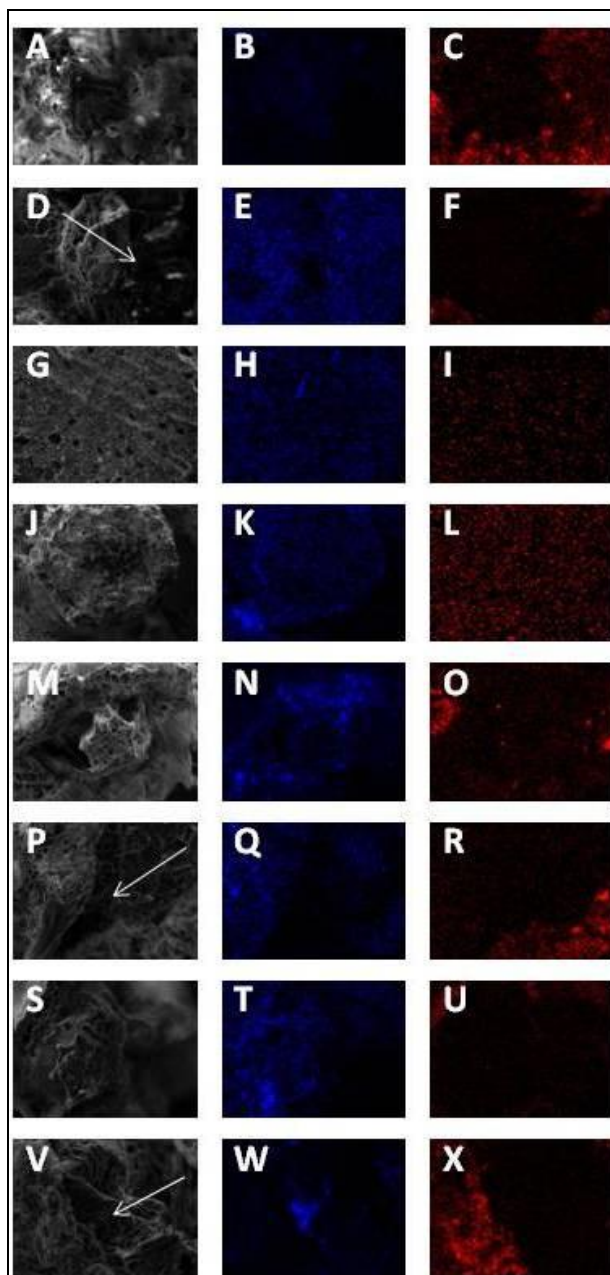


Figura 2. Mapeamento de cálcio (coloração azul) e ferro (coloração vermelha) através da Microanálise de Raios-X em raízes de genótipos cafeeiro. (A, B, C)

Cultivar Mundo Novo sem *M. exigua*. (B) Presença de cálcio; (C) Presença de ferro; (D, E, F) Cultivar Mundo Novo com *M. exigua*. (E) Presença de cálcio; (F) Presença de ferro; (G, H, I) Cultivar Aboatã sem *M. exigua*. (H) Presença de cálcio; (I) Presença de ferro; (J, K, L) Cultivar IPR 100 sem *M. exigua*. (K) Presença de cálcio; (L) Presença de ferro; (M, N, O) Genótipo 1 sem *M. exigua*. (N) Presença de cálcio; (O) Presença de ferro; (P, Q, R) Genótipo 1 com *M. exigua*. (Q) Presença de cálcio; (R) Presença de ferro; (S, T, U) Genótipo 2 sem *M. exigua*. (T) Presença de cálcio; (U) Presença de ferro; (V, W, X) Genótipo 2 com *M. exigua*. (W) Presença de cálcio; (X) Presença de ferro.

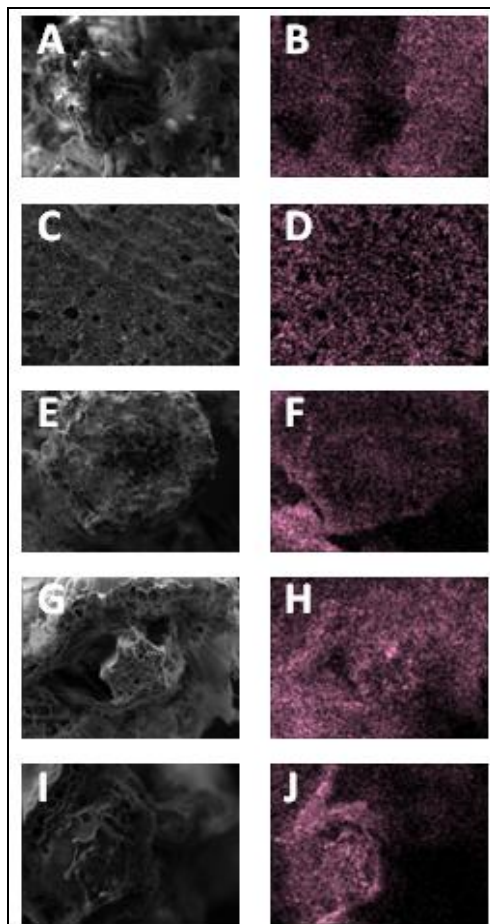


Figura 3. Mapeamento de potássio através da Microanálise de Raios-X em raízes de genótipos cafeeiro sem *M. exigua*. (A) Cultivar Mundo Novo. (B) Presença de potássio em cultivar Mundo Novo. (C) Cultivar Apatã. (D) Presença de potássio em cultivar Apatã. (E) Cultivar IPR 100. (F) Presença de potássio em IPR 100. (G) Genótipo 1. (H) Presença de potássio em Genótipo 1. (I) Genótipo 2. (J) Presença de potássio em Genótipo 2.

*Desenvolvimento vegetativo dos genótipos de cafeeiros*

A análise de variância mostrou que não houve interação significativa entre os genótipos e a presença/ausência do nematoide nas variáveis vegetativas. O incremento na altura (Alt) apresentou variações de acordo com os genótipos avaliados (Tabela 2).

As cultivares Mundo Novo, Apatã e o Genótipo 1 apresentaram maior incremento de altura, e menores valores dessa variável foram igualmente ( $P < 0,05$ ) observados na cultivar IPR 100 e o Genótipo 2. Com relação ao incremento de diâmetro do caule (Diam) dos cafeeiros, o Genótipo 1 apresentou maior valor não diferindo das cultivares Mundo Novo e Apatã e do Genótipo 1. A cultivar IPR 100 apresentou menor valor de incremento de altura (Tabela 2).

A massa fresca da raiz (MFRaiz) foi mais alta na cultivar Apatã e menor no Genótipo 2. As cultivares Mundo Novo e IPR 100, e o Genótipo 1 não diferiram estatisticamente entre si.

Tabela 2. Incremento de altura (Alt), incremento de diâmetro (Diam), em centímetros, matéria fresca da raiz (MFRaiz em gramas), em cafeeiros ao seis meses da inoculação de *Meloidogyne exigua*.

Tratamentos	Alt	Diam	MFRaiz
Mundo Novo	57,4 a	0,8 ab	448,5 ab
Apatã	59,2 a	0,7 ab	505,3 a
IPR 100	40,8 b	0,6 b	340,5 bc
Genótipo 1	57,8 a	0,9 a	338,4 bc
Genótipo 2	36,8 b	0,7 ab	329,9 c

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

### Análise de variáveis canônicas

Na análise de variáveis canônicas, as duas primeiras variáveis explicaram 94,9% da variância total dos dados (Figura 4), onde a primeira variável canônica teve uma contribuição de 66,9% e a segunda 28% para este total.

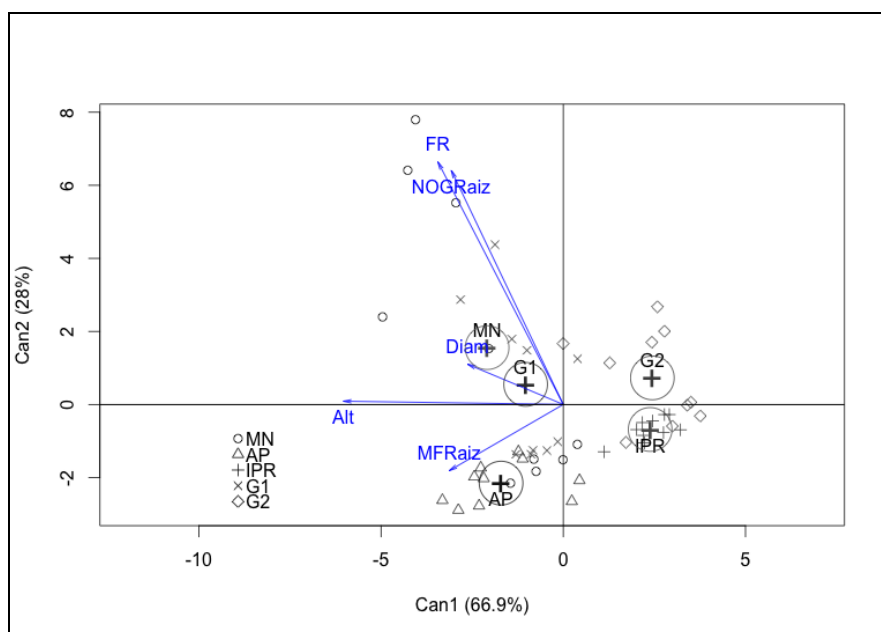


Figura 4. Diagrama de análises canônicas das variáveis incremento de altura da planta (Alt), incremento de diâmetro (Diam), massa fresca da raiz (MFRaiz), número de ovos por grama de raiz (NOGRaiz) e fator de reprodução (FR), em cafeeiros das cultivares Mundo Novo (MN), Apatã (AP), IPR 100 (IPR), Genótipo 1 (G1), e Genótipo 2 (G2), aos 6 meses da inoculação de *M. exigua*.

Associação entre as variáveis Diam e MFRaiz ocorreu nas cultivares Mundo Novo e Apatã, respectivamente (Figura 4). Considerando as

informações gráficas obtidas foi possível verificar que as variáveis NOGRaiz e FR possuíram comportamento similar quanto a correlação com as variáveis canônicas utilizadas para a visualização da dispersão dos tratamentos.

Considerando a dispersão dos dados dentro dos tratamentos foi possível notar que a cultivar Mundo Novo apresentou a maior dispersão, por outro lado, a cultivar IPR 100 apresentou maior agrupamento. Analisando a dispersão entre os tratamentos, verificou-se três padrões de dispersão, o primeiro entre Mundo Novo e Genótipo 1, o segundo entre Genótipo 2 e IPR 100 e um terceiro padrão composto da cultivar Apoatã que apresentou maior distância entre os tratamentos.

## DISCUSSÃO

Após a inoculação de *M. exigua* foi observado que as cultivares Apoatã e IPR 100 não apresentaram formação de galhas nem a multiplicação de ovos em suas raízes, já a cultivar Mundo Novo foi quem apresentou maior valor de FR, confirmando assim o seu padrão de suscetibilidade. Fazuoli *et al.* (1987) identificaram plantas da cultivar porta enxerto Apoatã de *C. canephora* com resistência a *M. incognita*, em condições de campo. Em estudo desenvolvido por Gonçalves e Pereira (1998) observaram também que plantas de Apoatã inoculadas com *M. exigua* apresentaram FR igual a 0 após 120 dias da inoculação, resultado esse que corrobora com o presente estudo. Gonçalves *et al.* (1998) relatam que a cultivar Apoatã seja resistente a *M. paranaensis*, porém não é imune a esse nematoide. Resultados semelhantes foram obtidos por Sera *et al.* (2007) após avaliar progênies de *C. arabica* cv. IPR 100 associadas à *M. paranaensis*.

Os Genótipo 1 e 2 mostraram suscetibilidade à *M. exigua* embora os estudos desses genótipos associados à esse nematoide sejam escassos, futuros estudos devem ser desenvolvidos para se ter uma real ideia da resistência desses materiais ao nematoide das galhas.

A microanálise de raios-X vem sendo aplicada no estudo da composição mineral de tecidos vegetais associados à fitopatógenos, porém não tinha sido utilizada para avaliar a distribuição de nutrientes na região de desenvolvimento de fitonematoides no sistema radicular de cafeeiros. Sabe-se que os fitonematoides necessitam do hospedeiro vivo para o seu desenvolvimento, sendo essa relação bastante especializada (Williamson e Hussey, 1996). O reconhecimento do nematoide pela planta desencadeia uma rápida geração de espécies reativas de oxigênio, tóxico ao patógeno, em seguida um influxo de cálcio no citoplasma induz uma rápida resposta de defesa denominada reação de hipersensibilidade (Muthamilarasan e Prasad, 2013).

O cálcio foi detectado em todas as amostras analisadas, com maiores teores naquelas associadas à *M. exigua*. Esses resultados podem indicar uma possível reação de defesa mesmo nas cultivares suscetíveis a esse nematoide. Resultados similares em doenças de folhas de cafeeiros foram observado por Belan *et al.* (2015) onde um elevado teor de cálcio foi detectado nos sintomas das doenças mancha aureolada e cercosporiose. O cálcio está relacionado às vias de defesas primárias da planta, como a formação de espécies reativas de oxigênio e reação de hipersensibilidade. Esse elemento é deslocado para áreas infectadas quando ocorre ruptura de membranas, uma vez que é essencial na formação de barreiras estruturais e químicas na defesa da planta (Wondafrash *et al.*, 2013).

Outro elemento que foi detectado em todas as amostras foi o ferro. Na presença de ferro, o peróxido de hidrogênio, uma espécie reativa de oxigênio, dá



origem ao radical hidroxila, extremamente reativo à fitopatógenos. As espécies reativas de oxigênio se acumulam rapidamente no início dos processos infecciosos em interações compatíveis e incompatíveis, na explosão oxidativa, que tem sido verificada em reações de hipersensibilidade em resposta à infecção (Stangarlin *et al.*, 2011).

A supressão das defesas do hospedeiro é de fundamental importância para o sucesso da infecção. Trabalhos recentes mostraram que *M. incognita* secretou uma proteína denominada calreticulina que suprimiu as respostas de defesa da planta através do sequestro de cálcio livre (Jones *et al.*, 2013)

O potássio foi detectado apenas nas amostras onde não houve o parasitismo do nematoide, pois esses organismos ao se estabelecerem na planta induz seu sítio de alimentação que funciona como um dreno metabólico, depauperando os minerais presentes e desestabilizando o teor de elementos químicos nesse local. Gomes *et al.* (2008) observou que plantas parasitadas por *Meloidogyne* spp. apresentam carência de alguns elementos minerais inclusive o potássio. Em doenças de folhas de cafeeiros Belan *et al.* (2015) detectaram nos tecidos assintomáticos em torno das lesões um teor mais elevado de potássio, que diminuiu gradualmente até os tecidos sintomáticos, atribuindo esse evento à mobilidade do elemento mineral devido a quebra da parede celular do hospedeiro, podendo também estar envolvido em relações de defesa da planta.

Nesse estudo, as diferenças observadas com relação às variáveis vegetativas dos genótipos se deram provavelmente devido às características genéticas. Sabe-se que com o avanço dos estudos em melhoramento do cafeeiro, continuamente são produzidas plantas com características próprias e desejáveis para uma melhor produção cafeeira. Os cafeeiros Mundo Novo e Apatã IAC 2258 caracterizam-se por ter porte alto e possuírem exuberante sistema radicular (Embrapa, 2016), já a cultivar IRP 100 por possuir um porte médio (Iapar,

2012). A resistência de plantas à fitopatógenos também é desejada nos programas de melhoramento. Sabe-se que a cultivar Apoatã possui resistência aos nematoides das galhas. *M. exigua* não é tão agressivo ao sistema radicular dos cafeeiros suscetíveis quanto às outras espécies de nematoides das galhas, sendo que essa forma galhas arredondadas na ponta das raízes e causa pouca morte de raízes laterais (Castro *et al.*, 2008). Os resultados observados nesse trabalho corroboram com Zhang e Schmitt (1995) quando observaram em raízes de *C. liberica* inoculadas com *M. konaensis* um sistema radicular abundante igualmente observado em plantas sem nematoides.

Nas análises multivariadas dos dados, considerando que as duas primeiras variáveis canônica foram responsáveis por explicar 94,9% da variação total, a representação gráfica foi eficiente para a verificação da dispersão dos tratamentos, pois alguns autores consideram que valores superiores a 70% para as duas primeiras variáveis canônicas é suficiente para realização deste tipo de análise. (Carpentieri-Pípulo *et al.*, 2000).

A dispersão visualizada dentro dos tratamentos pode ser explicada pela variação genética existente dentro de cada genótipo, pois o cafeeiro possui um sistema reprodutivo misto, com uma taxa de alogamia de aproximadamente 10%, em média (Melo e Sousa, 2011). Existe ainda a possibilidade desta variação está associada às variações de natureza ambiental.

A existência de três padrões de dispersão pode está associada à variabilidade genética existente entre os tratamentos, isso é reforçado pelas análises univariadas em que para todas as variáveis analisadas houve diferença significativa entre os tratamentos.

Apesar da metodologia de variáveis canônicas por vezes apresentar resultados distintos daqueles obtidos por meio de análises univariadas, já que a mesma usa informações simultâneas de todas as variáveis, lançando mão da

redução de dimensionalidade dos dados (José *et al.*, 2013), houveram coincidências entre as análises multi e univariadas. Os resultados comuns entre as análises foram comprovados pelo comportamento de associação estatística entre Mundo Novo e Genótipo 1 em todas as variáveis e associação entre a cultivar IPR 100 e Genótipo 2 para as variáveis de desenvolvimento vegetativo.

### CONCLUSÃO

Os Genótipos 1 e 2 comportaram-se como suscetíveis à *M. exigua*.

O teor de cálcio em raízes de cafeeiros parasitados por *M. exigua* é maior quando comparado com o teor em raízes sadias, podendo esse elemento está relacionado às defesas da planta.

O potássio foi detectado apenas em raízes não associadas a *M. exigua*.

### AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo e à EPAMIG Sul pela parceria no desenvolvimento da pesquisa. Ao Consórcio Pesquisa Café, FAPEMIG e CNPq pelo apoio.

### LITERATURA CITADA

- Belan, L. L., E. A. Pozza, M. L. O. Freitas, A. A. A. Pozza, M. S. Abreu, E. Alves. 2015. Nutrients distribution in diseased coffee leaf tissue. *Australasian Plant Pathology* 44:105–111.

- Bertrand, B., H. Etienne, A. Eskes. 2001. Growth, production, and bean quality in *Coffea arabica* as affected by interspecific grafting: consequences for rootstock breeding. Hort Science 36:269-273.
- Campos, V. P., L. Villain. 2005. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. Pp. 529-579 in M. Luc, R. A. Sikora, J. Bridge. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Wallingford: CAB International.
- Carpentieri-Pípolo, V., D. Destro, C. E. C. Prete, M. G. N. Gonzales, I. Popper, S. Zanatta, F. A. Silva. 2000. Seleção de genótipos parentais de acerola com base na divergência genética multivariada. Pesquisa Agropecuária Brasileira 35:1613-1619.
- Castro, J. M. C. C., E. A. Pozza, R. L. Naves, W. C. Andrade Junior, M. R. Dutra, J. L. Coimbra, C. Maximiniano, J. R. C. Silva. 2008. Levantamento de fitonematoides em cafezais no Sul de Minas Gerais. Nematologia Brasileira 32:56-64.
- Dias, F. P., A. N. G. Mendes, A. M. Carvalho, H. S. Vallone, S. P. Carvalho, A. D. Ferreira. 2011. Desenvolvimento de cafeeiros enxertados em Apoatã IAC 2258 cultivados no campo isento de nematoides. Coffee Science 6(3):203-211.
- Embrapa. 2016. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Consórcio Pesquisa Café. On line: <http://www.consorciopesquisacafe.com.br/index.php/tecnologias/separador-8/cultivares/>.
- Ferreira, P. A., W. S. Neves, E. A. Lopes, S. Ferraz, L. G. Freitas. 2012. Efeito da fertilização e da nutrição de plantas sobre doenças causadas por nematoides. Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas 6(2): 33-42.
- Fazuoli, L. C., M. M. A. Lima, W. Gonçalves, W. M. Costa. 1987. Melhoramento do cafeeiro visando resistência a nematoides: utilização de

- porta-enxertos resistentes. In: Congresso Paulista de Agronomia. p. 171-180.
- Fazuoli, L. C., H. P. Medina Filho, W. Gonçalves, O. Guerreiro Filho, M. B. Silvarolla. 2002. Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arábica obtidas no Instituto Agrônômico de Campinas. Pp. 162-215 in L. Zambolin. O Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café. Viçosa: Editora UFV.
- Gomes, V. M., R. M. Souza, M. M. Silva, C. Dolinski. 2008. Caracterização do estado nutricional de goiabeiras em declínio parasitadas por *Meloidogyne mayaguensis*. Nematologia brasileira 32(2):154-160.
- Gonçalves, W., L. C. C. B. Ferraz, M. M. A. Lima, M. B. Silvarolla. 1996. Reações de cafeeiros às raças 1, 2 e 3 de *Meloidogyne incognita*. Summa Phytopathologica 22:172-177.
- Gonçalves, W., A. A. Pereira. 1998. Resistência do cafeeiro a nematoides IV- Reação de cafeeiros derivados do Híbrido de Timor a *Meloidogyne exigua*. Nematologia Brasileira 22(1):39-50.
- Gonçalves, W., M. B. Silvarolla, M. M. A. Lima. 1998. Estratégias visando a implementação do manejo integrado dos nematoides parasitos do cafeeiro. Informe Agropecuário 19(193):36-47.
- Hussey, R. S., H. R. Barker. 1973. A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant disease Reporter 57:1025-1028.
- Iapar. 2012. Café IPR 100, cultivar de café arábica resistente ao nematoide *Meloidogyne paranaensis*. On line: [http://www.iapar.br/arquivos/File/Sementes\\_e\\_Mudas/folder\\_ipr100\\_13\\_09\\_12.pdf](http://www.iapar.br/arquivos/File/Sementes_e_Mudas/folder_ipr100_13_09_12.pdf).

- Ito, D. S., G. H. Sera, T. Sera, D. C. Santiago, F. S. Kanayama, L. Grossi. 2008. Progênies de café com resistência aos nematóides *Meloidogyne paranaensis* e raça 2 de *Meloidogyne incognita*. *Coffee Science* 3:156-163.
- Jones, J. T., A. Haegeman, E. G. J. Danchin, H. S. Gaur, J. Helder, M. G. K. Jones, T. Kikuchi, R. Manzanilla-López, J. E. Palomares-Rius, W. M. L. Wesemael, R. N. Perry. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14(9):946–961.
- José, J. V., R. Rezende, P. S. L. Freitas, K. Hongyu, A. Perboni, P. A. A. Marques, C. T. S. Dias, R. D. Coelho. 2013. Análise multivariada e geoestatística de variáveis físico-hídricas de diferentes solos. *Water Resources and Irrigation Management* 2(3):21-129.
- Kanayama, F. S., G. H. Sera, T. Sera, J. S. Mata, P. M. Ruas, D. S. Ito. 2009. Progênies de *Coffea arabica* progênies de cv. IPR 100 com resistência ao nematoide *Meloidogyne incognita* raça 1. *Ciência e Agrotecnologia* 33(5):1321-1326.
- Melo, B., L. B. Sousa. 2011. Biologia da reprodução de *Coffea arabica*. L. e *Coffea canephora* Pierre. *Revista Verde* 6(2):01-07.
- Morera, N., R. López. 1987. Respuesta de seis líneas experimentales de *Coffea* spp. a la inoculación con *Meloidogyne exigua*. *Nematropica* 17:103-109.
- Muthamilarasan, M., M. Prasad. 2013. Plant innate immunity: na updated insight into defense mechanism. *Journal of Bioscience* 38:33–449.
- Pascholati, S. F., B. Leite, J. R. Stangarlin, P. Cia. 2008. Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Piracicaba: FEALQ, 627 p.

- R Core Team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. On line: URL <http://www.R-project.org/>.
- Salgado, S. M. L., J. C. Rezende, J. A. R. Nunes . 2014. Selection of coffee progenies for resistance to nematode *Meloidogyne paranaensis* in infested area. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 14: 94-101.
- Seinhorst, J. W. 1967. The relationships between population increase and population density in plant parasitic nematodes. *Nematologica* 13(1):157-171.
- Sera, G. H., T. Sera, D. S. Ito, J. S. Mata, D. S. Doi, J. A. Azevedo, C. Ribeiro Filho. 2007. Progenies de *Coffea arabica* cv IPR-100 resistentes ao nematoide *Meloidogyne paranaensis*. *Bragantia*, 66(1):43-49.
- Taylor, A. C., J. N. Sasser. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes: International *Meloidogyne* Project. North Carolina State University Graphics, Raleigh, 111p.
- Tomaz, M. A., N. S. Sakiyama, H. E. P. Martinez, C. D. Cruz, A. A. Pereira, R. S. Freitas. 2005. Porta enxertos afetando o desenvolvimento de plantas de *Coffea arabica* L. *Ciência Rural* 35:70-575.
- Williamson, V. M., R. S. Hussey. 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell* 8:1735-1745.
- Wondafrash, M., N. M. V. Dam, T. O. G. Tytgat. 2013. Plant systemic induced responses mediate interactions between root parasitic nematodes and aboveground herbivorous insects. *Frontiers in plant science* 4(87):1-15.
- Zhang, F., D. P. Schmitt. 1995. Relationship of *Meloidogyne konaensis* population densities to coffee growth. *Plant Disease* 79:446-449.