



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LUCIANA HARUMI SHIGUEOKA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA E  
FENOTÍPICA DE POPULAÇÕES DE *Meloidogyne paranaensis*  
ASSOCIADAS AO CAFEEIRO**

---

Londrina  
2017

LUCIANA HARUMI SHIGUEOKA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA E  
FENOTÍPICA DE POPULAÇÕES DE *Meloidogyne paranaensis*  
ASSOCIADAS AO CAFEEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Inês Cristina de Batista Fonseca.

Co-orientadora: Dr<sup>ª</sup>. Andressa Cristina Zamboni Machado.

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Shigueoka, Luciana Harumi .

Caracterização morfológica, bioquímica e fenotípica de populações de *Meloidogyne paranaensis* associadas ao cafeeiro / Luciana Harumi Shigueoka. - Londrina, 2017.  
78 f. : il.

Orientador: Inês Cristina de Batista Fonseca.

Coorientador: Andressa Cristina Zamboni Machado.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Nematóide das galhas - Tese. 2. Diversidade - Tese. 3. Café - Tese. I. Fonseca, Inês Cristina de Batista. II. Machado, Andressa Cristina Zamboni. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

LUCIANA HARUMI SHIGUEOKA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA  
E FENOTÍPICA DE POPULAÇÕES DE *Meloidogyne paranaensis*  
ASSOCIADAS AO CAFEIEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de concentração em Fitossanidade.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Inês Cristina de Batista  
Fonseca  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Andressa Cristina Zamboni  
Machado.  
Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora Cristina Santiago  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dr<sup>a</sup>. Neucimara Rodrigues Ribeiro  
GDM Seeds

---

Dr. Dhalton Shiguer Ito  
Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR

Londrina, 22 de fevereiro de 2017

## **DEDICO**

*À minha família, em especial aos meus pais Armando e Elisa.*

*Ao Gustavo pelos momentos agradáveis e  
companheirismo.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar e abençoar meus caminhos, me ajudando a alcançar meus objetivos.

À Universidade Estadual de Londrina, à coordenação e aos docentes do Programa de Pós Graduação em Agronomia, pelos conhecimentos transmitidos.

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

Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e ao Laboratório de Nematologia pela disponibilidade da infraestrutura para a realização do trabalho.

Ao Consórcio Pesquisa Café pelo apoio financeiro no projeto “Desenvolvimento de cultivares de cafés resistentes aos nematoides *Meloidogyne paranaensis*, *M. incognita* e *M. exigua*.”

À professora Dr<sup>a</sup>. Inês Cristina de Batista Fonseca pela orientação, amizade, conhecimento científico, apoio e confiança.

À Dr<sup>a</sup>. Andressa Cristina Zamboni Machado pela oportunidade, excelente orientação, amizade, conhecimento científico e experiência, além da confiança durante o desenvolvimento do projeto.

Ao Dr. Tumoru Sera, agradeço aos valiosos conhecimentos transmitidos que contribuíram para minha formação.

Ao Dr. Gustavo Hiroshi Sera pelos ensinamentos e amizade.

Aos integrantes da comissão examinadora pela presença e contribuições para a melhoria do trabalho.

Aos funcionários, bolsistas e estagiários do Laboratório de Nematologia do IAPAR, por toda colaboração, apoio, momentos de descontração e agradável convivência.

À equipe do Laboratório de Melhoramento Genético de Café do IAPAR, por toda colaboração e momentos de descontração.

À minha família, pelo apoio, amor incondicional e pelas palavras de estímulo.

Aos amigos, pelo incentivo e momentos de lazer e alegrias.

À todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”*

Leonardo Da Vinci

SHIGUEOKA, Luciana Harumi. **Caracterização morfológica, bioquímica e fenotípica de populações de *Meloidogyne paranaensis* associadas ao cafeeiro.** 2017. 78f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

Na cafeicultura, um dos principais fatores limitantes à sua produção é a incidência de nematoides do gênero *Meloidogyne*. O aparecimento de populações mais agressivas de *M. paranaensis* tem sido frequentemente observado em lavouras cafeeiras e essa diversidade de população dos fitonematoides pode interferir na longevidade das estratégias de manejo utilizando cultivares resistentes. Portanto, o objetivo do trabalho foi caracterizar populações de *M. paranaensis* coletadas de lavouras de café infestadas. As metodologias utilizadas para caracterização das 11 populações estudadas, provenientes de municípios do Estado do Paraná e uma do Estado de Minas Gerais, envolveram análise morfológica dos padrões perineais, análise bioquímica por eletroforese de isoenzimas e caracterização fisiológica em diferentes genótipos de café. As avaliações morfológicas mostraram que existe variação entre as populações, apesar de a maioria delas apresentar padrões típicos. A identificação bioquímica foi baseada na análise de zimogramas de  $\alpha$ -esterase e resultou no aparecimento de três perfis distintos: P1 (típico de *M. paranaensis*), P2 (atípico) e um fenótipo ainda não descrito na literatura, P2A. Na caracterização fisiológica, 13 genótipos de café foram inoculados com 11 populações de *M. paranaensis*, e observou-se variação na agressividade das populações em relação a “Mundo Novo IAC 376-4”, genótipo sem genes de resistência ao nematoide, além de variação na virulência das populações nos diferentes genótipos com genes de resistência. Entretanto, nenhuma relação foi observada entre a origem das populações com suas variações nos padrões perineais, perfis de esterase ou multiplicação nos genótipos de café, bem como entre as diferentes caracterizações entre si, sugerindo que a diversidade encontrada nas diferentes populações estudadas não apresenta um padrão de comportamento identificável pelos parâmetros aqui utilizados.

**Palavras-chave:** Nematoide das galhas. Diversidade. Café.

SHIGUEOKA, Luciana Harumi. **Morphological, biochemical, and phenotypic characterization of *Meloidogyne paranaensis* populations associated to coffee.** 2017. 78p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

### ABSTRACT

One of the main limiting factors to yield of coffee crops is the incidence of *Meloidogyne* spp. The emergence of more aggressive populations of *M. paranaensis* have been observed frequently in coffee growing areas and this diversity can interfere in the longevity of management strategies based on the use of resistant cultivars. Therefore, the objective of this study was to characterize *M. paranaensis* populations collected from infested coffee crops. Methodologies used to characterize the 11 studied populations, from municipalities from Paraná and Minas Gerais States, involved the morphological analysis of perineal patterns, biochemical analysis by isozyme eletrophoresis, and phenotypic characterization in different coffee genotypes. Morphological evaluations showed the existence of variation between populations, although the majority of them showed typical perineal patterns. The biochemical identification was based on  $\alpha$ -esterase zymograms analyses and resulted in the appearance of three distinct profiles: P1 (typical from *M. paranaensis*), P2 (atypical) and a non-described profile, P2A. In the phenotypic characterization, 13 coffee genotypes were inoculated with 11 *M. paranaensis* populations and there was observed a variation in the aggressiveness of populations in relation to “Mundo Novo”, a genotype without resistance genes, besides in the virulence of populations in different genotypes carrying resistance genes. Nevertheless, no relationship was observed between the origin of population with their variations in perineal patterns, esterase profiles, or multiplication in coffee genotypes, as well as between the different characterizations each other, suggesting that the diversity found in the different populations here studied do not show an identifiable behavior through the parameters here utilized.

**Key words:** Root knot nematode. Diversity. Coffee.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1** - Configurações perineais observadas em populações de *Meloidogyne paranaensis* encontradas na cultura do café. Fotografias retiradas a partir de microscopia de luz. A e B = padrões perineais típicos de *M. paranaensis* encontrados nas populações 2223 e 2225, respectivamente; C e D = presença de asas laterais atípicas em *M. paranaensis* nas populações 2225 e 2290, respectivamente; E e F = padrões perineais atípicos, com arco dorsal baixo, encontrado nas populações 2223 e 2224, respectivamente..... 41
- Figura 3.2** - Fenótipos de  $\alpha$ -esterase observados em populações de *Meloidogyne paranaensis* em áreas cafeeiras no Brasil. Acima: gel de poliacrilamida. Abaixo: Gel esquemático (listras pretas significam isoformas principais (sempre nítidas) e azuis, secundárias) ..... 43
- Figura 3.3** - Resumo geral dos resultados encontrados para fator de reprodução na interação entre 11 populações de *Meloidogyne paranaensis* e 13 genótipos de café..... 46
- Figura 3.4** - Resumo geral dos resultados encontrados para número de nematoides por grama de raízes na interação entre 11 populações de *Meloidogyne paranaensis* e 13 genótipos de café ..... 48
- Figura 3.5** - Análise do fator de reprodução para o fator população de *Meloidogyne paranaensis* em relação aos 13 genótipos de café ..... 49
- Figura 3.6** - Análise do número de nematoides por grama de raízes para o fator população de *Meloidogyne paranaensis* em relação aos 13 genótipos de café ..... 50
- Figura 3.7** - Análise do fator de reprodução para o fator genótipos de café em relação ao fator população de *Meloidogyne paranaensis* ..... 50
- Figura 3.8** - Análise do número de nematoides por grama de raízes para o fator genótipos de café em relação ao fator população de *Meloidogyne paranaensis* ..... 51
- Figura 3.9** - Dendrograma obtido a partir dos dados de fator de reprodução e número de nematoides por grama de raízes de diferentes populações de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro cv. Santa Clara..... 52
- Figura 3.10** - Dendrograma obtido a partir dos dados de fator de reprodução e número de nematoides por grama de raízes de diferentes populações de *Meloidogyne paranaensis* em genótipos de *Coffea arabica* e *C. canéfora* ..... 54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> - Origem das populações de <i>Meloidogyne paranaensis</i> utilizadas no presente estudo .....	36
<b>Tabela 3.2</b> - Genótipos de <i>Coffea arabica</i> e <i>C. canephora</i> utilizados para a caracterização fenotípica das populações de <i>Meloidogyne paranaenses</i> .....	39
<b>Tabela 3.3</b> - Comparação dos perfis de $\alpha$ -esterase e porcentagem de padrões perineais típico e atípico das 11 populações de <i>Meloidogyne paranaensis</i> .....	42
<b>Tabela 3.4</b> - Caracterização bioquímica de populações de <i>Meloidogyne paranaensis</i> a partir de seus perfis de $\alpha$ -esterase e respectiva mobilidade relativa .....	43
<b>Tabela 3.5</b> – Fator de reprodução (FR) e número de nematoides por grama de raízes (Nema/g) de <i>Meloidogyne paranaensis</i> em tomateiro cv. Santa Clara .....	44
<b>Tabela 3.6</b> - Fator de reprodução das populações de <i>Meloidogyne paranaensis</i> em diferentes genótipos de café .....	45
<b>Tabela 3.7</b> - Número de nematoides por grama de raízes das populações de <i>Meloidogyne paranaensis</i> em diferentes genótipos de café .....	47

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1	<i>MELOIDOGYNE</i> SPP. NA CULTURA DO CAFÉ.....	14
2.2	<i>MELOIDOGYNE PARANAENSIS</i> .....	16
2.3	MANEJO DE NEMATOIDES NA CULTURA DO CAFÉ .....	19
2.4	VARIABILIDADE GENÉTICA EM <i>MELOIDOGYNE PARANAENSIS</i> .....	21
2.5	METODOLOGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E DIAGNOSE DE <i>MELOIDOGYNE</i> SPP. ....	23
2.5.1	Caracterização Morfológica.....	26
2.5.2	Caracterização Bioquímica.....	27
2.5.3	Caracterização Fenotípica.....	30
<b>3</b>	<b>ARTIGO A: CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE</b> <b><i>meloidyne paranaensis</i> EM LAVOURAS CAFEIRAS</b> .....	33
<b>3.1</b>	<b>RESUMO</b> .....	33
<b>3.2</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	33
<b>3.3</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	34
<b>3.4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
3.4.1	PURIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DE POPULAÇÕES.....	35
3.4.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE POPULAÇÕES DE <i>MELOIDOGYNE PARANAENSIS</i> .....	36
3.4.3	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA .....	37
<b>3.5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	40
3.5.1	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA .....	40
3.5.2	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA .....	42
3.4.3	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA.....	44
<b>3.6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	55
<b>3.7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	64
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65

## 1 INTRODUÇÃO

O café é uma importante commodity no comércio agrícola internacional, sendo o Brasil o maior produtor e exportador e o segundo maior consumidor do produto. Entretanto, existem vários fatores que vêm interferindo na produção e na produtividade da cultura do café, como estresses abióticos (seca, temperatura, umidade) e bióticos (doenças e pragas).

Dentre os fatores bióticos, podemos evidenciar os nematoides como um dos principais causadores de danos à cafeicultura. Muitas regiões brasileiras com grande potencial para o cultivo do café não podem ser exploradas devido à presença desses patógenos. Os fitonematoides do gênero *Meloidogyne* constituem o principal grupo de patógenos responsáveis pela limitação da produtividade agrícola.

O controle dos fitonematoides é difícil de ser realizado, uma vez que, em áreas infestadas, a erradicação é praticamente impossível. A principal estratégia de manejo preventivo é evitar a disseminação via solo, água e culturas com esse patógeno para áreas indenidas. Em áreas infestadas, uma estratégia de manejo eficiente é o uso de cultivares resistentes, juntamente com o manejo cultural para redução da população. Porém, atualmente, existem poucas cultivares de café resistentes a este nematoide. Cultivares de café arábica com resistência a *M. paranaensis* se limitam ao porta-enxerto Apoatã IAC 2258 ou à cultivar IPR 100.

O aparecimento de biótipos mais agressivos de *M. paranaensis* tem sido frequentemente observado em lavouras cafeeiras do estado do Paraná. A variabilidade genética de nematoides pode interferir na eficiência e na longevidade de estratégias de manejo baseadas em cultivares resistentes. Além disso, a possibilidade de existência de variantes intraespecíficas com diferentes potenciais reprodutivos deve ser investigada. Essa informação seria útil em programas de melhoramento genético de plantas, uma vez que o uso de várias populações diferenciadas da mesma espécie nos screenings para resistência eliminaria possíveis resultados contraditórios. Portanto, o desenvolvimento de estratégias de manejo é diretamente relacionado com a variabilidade genética do nematoide.

*Meloidogyne* spp. são identificadas principalmente pela característica morfológica das fêmeas, além do padrão perineal; características de machos e juvenis de segundo estágio são complementares. No entanto, a caracterização confiável de espécies de *Meloidogyne* com base em morfologia é subjetiva, mesmo para taxonomistas bem familiarizados com o gênero. Contudo, outras ferramentas são importantes para identificação

de espécies, como a caracterização fenotípica, na qual utilizam-se hospedeiros diferenciadores, a caracterização bioquímica e a identificação molecular, que auxilia no esclarecimento das variabilidades intraespecífica e interespecífica dentro do gênero *Meloidogyne*.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho é caracterizar populações de *M. paranaensis* coletadas em lavouras de café infestadas quanto à morfologia dos seus padrões perineais, aos seus perfis eletroforéticos de  $\alpha$ -esterase e à sua fisiologia em genótipos de café.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *MELOIDOGYNE* SPP. NA CULTURA DO CAFÉ

A primeira publicação sobre o parasitismo de um nematoide em cafeeiro foi realizada por Joubert no ano de 1878, e, posteriormente, no ano de 1887, Goeldi, estudando a doença mencionada por Joubert, denominou o agente causador da enfermidade de *Meloidogyne exigua*, estabelecendo o gênero *Meloidogyne*. A palavra vem do grego *melon*, que significa maçã ou fruto do cabaceiro, *oid* (semelhante) e *gyne* (fêmea) (TIHOHOD, 1993).

Atualmente, são descritas cerca de 90 espécies de *Meloidogyne* e, dentre essas, 17 estão em associação com plantas de café. Destas, pelo menos três ocorrem e causam danos em lavouras de café no Brasil, *M. paranaensis* Carneiro et al., 1996, *M. incognita* (Kofoid; White, 1919) Chitwood, 1949 e *M. exigua* Goeldi, 1892 (SANTOS et al., 2001; CARNEIRO; COFCEWICZ, 2008). Essas espécies são consideradas importantes devido à sua ampla distribuição geográfica e pela intensidade dos danos que causam (GONÇALVES et al., 2004).

Levantamentos de fitonematoides em áreas cafeeiras evidenciam que, em São Paulo, foram encontradas as espécies *M. incognita*, *M. exigua*, *M. paranaensis* e *M. coffeicola* (LORDELLO; LORDELLO, 2001). No Estado de Minas Gerais, existem relatos de ocorrência de *M. paranaensis* (CASTRO; NAVES; CAMPOS, 2003), entretanto, a maior disseminação é de *M. exigua* (OLIVEIRA et al., 2005). No Estado do Paraná, a predominância é de *M. paranaensis*, seguida de *M. incognita* (KRZYZANOWSKI et al., 2001; ITO et al., 2014; MATUNAGA et al., 2016).

*Meloidogyne exigua* está bastante disseminado em várias regiões cafeeiras importantes do país, como Mogiana (SP), Zona da Mata (MG), Alto Paranaíba (MG), Triângulo Mineiro (MG) e Sul de Minas (MG), ou seja, ocorre na principal região cafeeira do país (GONÇALVES; SILVAROLLA, 2001). Também já foi observado em cafezais nos Estados do Paraná, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Bahia, Distrito Federal e Ceará (SANTOS, 1997). No Estado do Paraná, foi identificado parasitando cafeeiros em dois municípios, Altônia e Terra Roxa (PORTZ et al., 2006). A consequência do processo de parasitismo de *M. exigua* nas produções iniciais do cafeeiro são perdas de 50 a 68,2% (GUERRA NETO et al., 1985). Além disso, Barbosa et al. (2004) observaram redução de 45% na produtividade de café devido ao ataque desse nematoide.

Em condições de casa de vegetação, Rodrigues e Crozzoli (1995) inocularam densidades populacionais crescentes (de 0,125 a 64 ovos/ cm<sup>3</sup> de solo) de *M. exigua* em mudas de café, cultivares Caturra Amarillo e Catimor P4 e, estes autores observaram redução do desenvolvimento da parte aérea a partir da densidade de 16 ovos/ cm<sup>3</sup> de solo. Aplicando a análise de Seinhorst para estabelecimento do limite de tolerância da cultura a esse nematoide, os mesmos autores verificaram que, para as variáveis relacionadas ao desenvolvimento da parte aérea das plantas, esse limite seria de 0,25 ovos/ cm<sup>3</sup> de solo. Di Vito et al. (2000) também estabeleceram limites de tolerância baixos para *M. exigua* em café “São Tomé”, da ordem de 1,2 ovos/ cm<sup>3</sup> de solo. Tal diferença pode ter sido obtida em função das cultivares utilizadas e condições ambientais em que cada experimento foi conduzido, não havendo inferências a respeito dos danos que poderiam ocorrer em condições de campo.

*Meloidogyne incognita* é outra espécie de nematoide amplamente disseminada em cafezais do Brasil, tendo sido identificada em propriedades dos Estados do Espírito Santo (LORDELLO; HASHIZUME, 1971), Minas Gerais (LIMA et al., 1985; CAMPOS; MELLES, 1987) e Bahia (SOUZA et al., 2000). Nas regiões do arenito do Estado de São Paulo, é a espécie com maior disseminação (GONÇALVES; SILVAROLLA, 2001; CARNEIRO et al., 2005). Em 1970, era considerado como um dos principais nematoides para a cafeicultura brasileira (LORDELLO; MELLO FILHO, 1970). *M. incognita* é responsável por grande destruição do sistema radicular das plantas de café, causa fendas e descorticamento, com eliminação quase total de raízes laterais. Isso resulta em um estado de declínio, com desfolha, clorose e sintomas de deficiências nutricionais que pode levar a planta à morte (CAMPOS; VILLAIN, 2005). Entretanto, pesquisa realizada por Carneiro e Almeida (2000) indicou aumento significativo da distribuição de 70% de *M. paranaensis* e decréscimo de 30% de *M. incognita* em cafezais brasileiros, provavelmente devido à identificação errônea de *M. paranaensis* antes de sua descrição como espécie válida, uma vez que era classificado como *M. incognita* raça 5 ou biótipo IAPAR (CARNEIRO et al., 1996).

No Estado do Paraná, *M. incognita* e *M. paranaensis* são os principais fitonematoides da cafeicultura (CARNEIRO et al., 1992; ITO et al., 2013; MATUNAGA et al., 2016). Juntos, podem causar destruição de até 85% do volume do sistema radicular de *C. arabica* em um período de até cinco anos de cultivo (BERTRAND; ANTHONY, 2008). Krzyzanowski et al. (2001) realizaram um levantamento em que coletaram 657 amostras no Estado do Paraná e, em 224 delas, identificaram *Meloidogyne* spp., sendo que *M. paranaensis* foi encontrado em 43,8% das amostras e *M. incognita* em 17,8%; em 22,8% das amostras, foi encontrada mistura de *M. paranaensis* e *M. incognita*. Mais recentemente, Ito et al. (2013) e

Matunaga et al. (2016), em levantamento de espécies de *Meloidogyne* nas regiões noroeste e norte do Estado, observaram que *M. paranaensis* estava presente em 73,1% das amostras coletadas na região noroeste e em 30,15% das amostras da região norte, enquanto que *M. incognita*, em 15,4% e 5,55% das amostras, respectivamente. A mistura de ambas as espécies foi observada em 15,4% e 2,38% das amostras, respectivamente.

*Meloidogyne paranaensis* foi ainda detectado em cafezais de alguns municípios do Alto Paranaíba e do Sul de Minas Gerais (SANTOS, 1997; CASTRO et al., 2008; CASTRO; CAMPOS, 2004) e pode ser uma ameaça para a cafeicultura mineira já que, neste Estado, predomina *M. exigua*, que é uma espécie menos agressiva. *M. paranaensis* também foi identificado atacando cafeeiros nos estados de Goiás (SILVA; OLIVEIRA; ZAMBOLIN, 2009), Espírito Santo (BARROS et al., 2011) e São Paulo (FAVORETO; SANTOS, 2001; KUBO et al., 2001; CARNEIRO et al., 2005). Além do Brasil, no café, *M. paranaensis* foi relatado na Guatemala e nos EUA (Havaí) (CARNEIRO et al., 2004; CAMPOS; VILLAIN, 2005). As perdas ocasionadas por esta espécie podem variar desde a redução da produtividade da cultura até a morte das plantas (SILVA et al., 2009). Em condições de alta infestação, este fitoparasita pode reduzir a produtividade a níveis antieconômicos na primeira colheita, tanto em solo arenoso como em argiloso para cultivares suscetíveis, como Mundo Novo, Catuaí e IAPAR 59 (MATA et al., 2000).

## 2.2 MELOIDOGYNE PARANAENSIS

*Meloidogyne paranaensis* apenas recentemente foi descrito como espécie válida, uma vez que foi inicialmente identificado como *M. incognita* e, por cerca de duas décadas, foi considerado apenas uma variante dessa espécie expressando alta virulência ao cafeeiro. Nos anos 1990, essa população foi encontrada atacando cafeeiros no Paraná, representando então, cerca de 52% das infestações causadas por nematoides de galhas no Estado (CARNEIRO et al., 1996). Carneiro (1993) descreveu essa variante de *M. incognita* com a denominação de “biótipo IAPAR”.

Posteriormente, com base em diferenças morfológicas e biológicas, esta população foi descrita e designada como *M. paranaensis* (CARNEIRO et al., 1996). Sua diferenciação daquela espécie também pode ser realizada através de seus fenótipos de  $\alpha$ -esterase [Est P1 (= Est F1) e P2] (CARNEIRO et al., 2004) e de marcadores do tipo SCAR (RANDIG et al., 2002; RANDIG; CASTAGNONE-SERENO, 2004). A

reprodução dessa espécie é caracterizada por ser via partenogênese mitótica, com número de cromossomos  $3n = 50-52$  (CHITWOOD; PERRY, 2009).

De acordo com a descrição de *M. paranaensis*, seu padrão perineal é tipicamente retangular para ovalado, o arco dorsal geralmente é alto, quadrado, sendo que as estrias laterais variam de finas a grossas, lisas ou onduladas. As linhas do campo lateral geralmente são descontínuas, não apresentam incisuras distintas e, às vezes, aparecem como uma depressão linear descontínua levemente marcada por pausas e garfos. Todas as variantes apresentam configuração triangular das estrias na região após o ânus. Além disso, os fasmídeos são conspícuos (CARNEIRO et al., 1996).

Essa espécie, assim como as demais do gênero, é endoparasita sedentária. A infecção ocorre quando o juvenil de 2º estágio ( $J_2$ ) atravessa o parênquima cortical e posiciona a região anterior na periferia do cilindro vascular, ao nível da endoderme/periciclo e inicia o parasitismo (FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

No parasitismo, o nematoide insere seu estilete na célula vegetal e injeta secreções esofagianas, estimulando a formação de um cenócito localizado ao redor da extremidade anterior do seu corpo. Essas células são hipertrofiadas, com citoplasma denso, granuloso e núcleos/nucléolos muito evidentes, essenciais à alimentação e ao desenvolvimento subsequente do nematoide (FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

Após a infecção inicial e o estabelecimento de seu parasitismo nas plantas, a fêmea inicia seu desenvolvimento, tornando-se obesa, de corpo globoso, de coloração branco-leitosa, os órgãos reprodutivos amadurecem e a região anterior forma um “pescoço”. Com o amadurecimento dos órgãos reprodutivos, a fêmea deposita todos os ovos em um único local da raiz, originando um típico aglomerado ou massa (FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

Os ovos mantêm-se unidos devido à presença de substâncias gelatinosas secretadas pelas glândulas retais da fêmea, que flui através do ânus durante o período de oviposição, protegendo-os da dessecação. As massas de ovos são formadas internamente, no parênquima cortical, ou externamente, sobre a superfície das raízes, podendo conter até 400 ovos (FERRAZ; MONTEIRO, 2011), dependendo do hospedeiro e das condições ambientais. Os ovos passam por fases embrionárias, dividindo-se continuamente até atingirem um estágio multinuclear, dando origem à fase juvenil.

No interior dos ovos, encontram-se juvenis de 1º estágio ( $J_1$ ), que sofrem a primeira ecdise, originando os juvenis de 2º estágio ( $J_2$ ). Os  $J_2$  eclodem, sendo vermiformes e móveis, e migram no solo à procura de raízes de um hospedeiro favorável (FERRAZ; MONTEIRO, 2011). Seguindo um gradiente de concentração de exsudatos radiculares, o  $J_2$

orienta seu movimento em direção à raiz e penetra na região da zona de alongamento celular, logo atrás da coifa (FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2001).

Após a penetração na raiz, o J<sub>2</sub> estabelece o parasitismo e, gradualmente, torna-se mais robusto e com corpo salsichoide, perdendo sua mobilidade e tornando-se sedentário. Atingindo seu máximo crescimento, o juvenil sofre sua segunda ecdise, se transformando em juvenil de 3º estágio (J<sub>3</sub>), que, em seguida, dá origem ao juvenil de 4º estágio (J<sub>4</sub>) ou pré-adulto. Tanto o J<sub>3</sub> como o J<sub>4</sub> não possuem estilete e o esôfago é praticamente degenerado, sendo incapazes de se alimentar. Ocorre ainda a quarta e última ecdise, no qual o adulto (macho ou fêmea) é formado, com estilete e esôfago regenerados (FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

Quando a fêmea é formada, ela continua a engrossar até ficar esférica e completa seu amadurecimento no interior da planta, resultando na postura de ovos. Essa espécie se reproduz por partenogênese mitótica obrigatória (CARNEIRO et al., 1996), no qual não é necessária a presença do macho para completar o ciclo de vida e os ovos viáveis podem ser produzidos pelas fêmeas sem a ocorrência da fertilização. Dessa forma, os machos têm seu número reduzido ou encontrado em condições ambientais desfavoráveis, onde o juvenil que daria origem à fêmea passa por reversão sexual, tornando-se macho (FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2001).

Uma vez que ocorre a formação do macho, este mantém a forma vermiforme, rompe a cutícula que o envolvia no 4º estágio, abandona a raiz, não se alimenta e, na maioria das espécies de *Meloidogyne*, não têm papel na reprodução (TIHOHOD, 1993; FERRAZ et al., 2010).

Normalmente, o ciclo completo de vida deste fitonematoide completa-se em 21 a 28 dias, com temperatura variando de 25 a 30 °C (FERRAZ; MONTEIRO, 2011). Entretanto, o ciclo de vida pode variar, dependendo da espécie vegetal e de fatores ambientais, como umidade e temperatura (TIHOHOD, 1993).

As alterações morfológicas causadas pelo nematoide incitam multiplicação desordenada das células do córtex (hiperplasia) e, normalmente, formam engrossamentos radiculares denominados galhas. No interior da galha, podem-se encontrar várias fêmeas se alimentando e parasitando a raiz (FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2001). No tocante às alterações fisiológicas, a presença do cenócito causa interrupção e desorganização do sistema vascular, o citoplasma se torna denso, há espessamento da parede, o núcleo torna-se evidente, ficando reduzida a absorção e o transporte de água e nutrientes (TIHOHOD, 1993).

Inicialmente, o parasitismo dos nematoides do gênero *Meloidogyne* resulta na formação de galhas típicas, como as observadas em *M. exigua*, ou um leve inchaço das radículas, como em *M. paranaensis*, *M. incognita* e *M. coffeicola*, formado pela própria planta como uma reação às toxinas introduzidas pelo fitopatógeno (CAMPOS; VILLAIN, 2005). Embora sejam muito comuns nas plantas atacadas, não constituem sintoma obrigatório, estando ausentes em certas interações (CAMPOS; VILLAIN, 2005).

Carneiro et al. (1996) descreveram que plantas de café infestadas por *M. paranaensis* no campo apresentam praticamente todo o sistema radicular atacado, inclusive a raiz principal, ocasionando engrossamentos, descorticamentos, rachaduras e necrose dos tecidos do córtex, com total desorganização deste tecido, podendo ocorrer redução no sistema radicular.

Em consequência dos danos causados no sistema radicular e nas células das plantas, ocorrem sintomas característicos na parte aérea, como desuniformidade no crescimento, desfolha, murcha, sintomas de deficiências nutricionais e diminuição na produção. Esses sintomas podem levar à morte da planta. Além disso, nota-se a formação de reboleiras, uma vez que a distribuição deste fitopatógeno no solo é irregular, existindo áreas de maior ou menor extensão (FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

### 2.3 MANEJO DE NEMATOIDES NA CULTURA DO CAFÉ

O controle de fitonematoides é uma tarefa de difícil realização, ainda mais em lavouras cafeeiras, de ciclo perene, onde cada situação necessita de cuidadosa análise para recomendação dos métodos (MACHADO et al., 2013). No Brasil, as ferramentas de manejo mais utilizadas para lavouras infestadas são a rotação de culturas, especialmente em áreas de renovação da lavoura, variedades resistentes ou uso de porta enxerto resistente e o manejo do solo com plantas antagonistas (MACHADO et al., 2013).

A rotação de culturas é um método eficiente de redução populacional, especialmente em culturas anuais e consiste na utilização de plantas antagonistas ou não hospedeiras dos nematoides durante um período de tempo (FERRAZ et al., 2010). Para os nematoides de galhas, diversas espécies vegetais já foram indicadas para uso em rotação de culturas, incluindo algumas espécies de gramíneas, crucíferas, leguminosas de adubação verde, entre outras (WHITEHEAD, 1998). Entretanto, no café, sua aplicação é viável quando da renovação da lavoura, o que torna sua utilização bastante restrita. Infelizmente, várias das espécies vegetais recomendadas para o manejo de nematoides apresentam alguma limitação

ao seu uso, seja pela dificuldade de manejo, seja pela aptidão climática. Além disso, opções de plantas para rotação de culturas visando o manejo de *M. paranaensis* são limitadas (MACHADO et al., 2014). Uma alternativa para a utilização de plantas não hospedeiras ou antagonistas na cultura cafeeira seria seu cultivo na entrelinha da lavoura, desde que o espaçamento utilizado pelo produtor permita o cultivo de plantas nessa condição, o que nem sempre acontece.

No Estado do Paraná, uma prática há muito tempo recomendada é o manejo de solo por um período de um ano e meio a dois anos, visando a redução populacional desses fitoparasitas, com posterior plantio de café enxertado em porta enxerto resistente, como a variedade Apoatã IAC 2258 de *C. canephora* (KRZYZANOWSKI et al., 2001).

Fontes de resistência aos nematoides do gênero *Meloidogyne* são escassas em *Coffea arabica* L., porém foram encontradas em espécies de *C. canephora* Pierre ex Froehner, *C. congensis* Froehner e *C. dewevrei* De Wild et Th. Dur. (GONÇALVES, 1999).

Seleções de “Icatu”, como a linhagem 925, têm apresentado boa resistência a *M. paranaensis* (MATIELLO et al., 2005), além de plantas de “Icatu” (MATA et al., 2000, 2002; SERA et al., 2004). ‘Icatu Vermelho IAC 3888’ também é resistente a *M. paranaensis* (GONÇALVES; SILVAROLLA, 2007); em alguns acessos de *C. arabica* da Etiópia foi observada resistência a *M. paranaensis* (ANTHONY et al., 2003; BOISSEAU et al., 2009).

A cultivar IPR 100, derivada do cruzamento entre “Catuaí” e um cafeeiro arábico da série BA-10, portador de genes de *C. liberica* Hiern, apresentou resistência a *M. paranaensis* e às raças 1 e 2 de *M. incognita*, provavelmente originadas de *C. liberica* (SERA et al., 2007, 2009; ITO et al., 2008; KANAYAMA et al., 2009).

A utilização de cafeeiros resistentes constitui-se em uma das principais formas de controle de *Meloidogyne* spp. em lavouras cafeeiras, seja via porta enxerto ou pé franco. A eficiência desse método dependerá do conhecimento do nível populacional de fitonematoides na área, da espécie, além da utilização de outros métodos em conjunto (KRZYZANOWSKI et al., 2001). Portanto, é extremamente apropriado a obtenção de cultivares resistentes a esses parasitas para serem utilizadas em áreas infestadas.

Em vista do exposto, existem alguns métodos de controle para o nematoide das galhas que parasitam o cafeeiro, entretanto, relacionado a *M. paranaensis*, a maioria deles vem apresentando baixa eficiência em áreas implantadas com alta população inicial (MATA et al., 2000).

Para a adoção de qualquer das medidas de manejo acima descritas, é imprescindível uma identificação correta das espécies em questão. Os dados obtidos através

de levantamentos populacionais são úteis não só na identificação dos nematoides associados com a cultura e sua distribuição numa dada localidade, mas possibilitam, ainda, o início de estudos a respeito da biologia, ecologia e controle de fitonematoides (DAVIDE, 2003). Pesquisas de levantamento de nematoides é fonte de informação importante para a adoção de medidas de manejo, como rotação de culturas e o plantio de variedades resistentes quando o nível de infestação já atingiu o nível de dano para a cultura (DAVIDE, 2003).

Além do mais, nas condições brasileiras, o manejo de nematoides esbarra em várias dificuldades. Existe uma grande diversidade de gêneros e espécies de nematoides, que devem ser devidamente conhecidos. Estes, geralmente apresentam ciclos de vida mais curtos e mais gerações por ano agrícola em elevadas temperaturas, causando grande pressão de inóculo. Outro fator de elevada importância é a frequente presença de espécies concomitantes na mesma área que podem causar sérios prejuízos (MATUNAGA et al., 2016), o que é obviamente muito relevante quando da introdução de materiais resistentes. Essa estratégia ainda enfrenta uma série de desafios, tais como a existência de populações atípicas dos nematoides, com capacidade de quebra da resistência de genótipos resistentes.

Em resposta ao crescente apontamento de quebra de resistência à *M. incognita* (SILVA et al., 2016) e *M. paranaensis* (SHIGUEOKA et al., 2016) em plantas cultivadas, incluindo o café, se faz necessário um aprofundamento no estudo da diversidade genética desses patógenos, buscando identificar padrões genéticos e suas frequências, e entender como as suas populações podem diferir umas das outras. Tais informações podem favorecer o desenvolvimento de estratégias de manejo desses nematoides, por meio dos programas de melhoramento e de ações voltadas ao controle genético, tais como o silenciamento gênico e a transgenia.

#### 2.4 VARIABILIDADE GENÉTICA EM *MELOIDOGYNE* SPP.

Em estudos visando o uso da resistência no controle de *Meloidogyne* spp., a origem da população do fitonematoide é um fator primordial, pois a variabilidade genética intraespecífica tem sido observada em populações coletadas em diferentes localidades (DAVIS et al., 1996; CARNEIRO; ALMEIDA, 2000; SILVA et al., 2003).

A variabilidade genética nas populações de nematoides ocorre possivelmente devido à sua forma de reprodução, por anfimixia ou partenogênese facultativa ou obrigatória, ao grau de ploidia (haploide até vários níveis de poliploidia), ou variações no número de cromossomos somáticos (CASWELL; ROBERTS, 1987).

A constatação dessa variabilidade tem sido comprovada pela preferência em relação às plantas hospedeiras, padrão isoenzimático e análises de DNA (CHITWOOD; PERRY, 2009; ARAÚJO FILHO et al., 2016; SILVA et al., 2016). A própria capacidade de parasitar diversas espécies de plantas cultivadas sugere a existência de variabilidade genética e alta capacidade de adaptação desses organismos (FREIRE et al., 2002).

Tal diversificação dos nematoides das galhas é demonstrada em relação aos complementos cromossômicos e polimorfismo de proteínas observados, sendo considerada reflexo de uma complexa evolução do gênero, envolvendo poliploidização e hibridação interespecífica, resultando em espécies partenogenéticas mitóticas a partir de ancestrais sexuais diploides (CASTAGNONE-SERENO et al., 2013). Sendo assim, as espécies mitóticas poliploides, como é o caso de *M. incognita*, podem apresentar padrões evolutivos, enquanto as espécies com reduzidos números de cromossomos, como *M. exigua*, podem estar mais próximas do ancestral do gênero (CASTAGNONE-SERENO et al., 2013).

Estudos realizados por Carneiro et al. (1996) relatam que esta espécie é triploide, apresentando 50 a 52 cromossomos, entretanto, Freire et al. (2002) afirmam que *M. paranaensis* possui 28 cromossomos. Freire et al. (2002) supõem que a diferença encontrada no número de cromossomos é devida à ocorrência de reprodução partenogenética meiótica facultativa associada à aneuploidia. Além disso, populações de *M. paranaensis* podem se reproduzir por partenogênese mitótica, contribuindo para o aumento da variabilidade genética da espécie, conferindo adaptabilidade às condições adversas e capacidade de parasitar uma gama maior de hospedeiros (FREIRE et al., 2002).

Essa variação intraespecífica observada em *Meloidogyne* spp. pode estar relacionada ainda à interação planta e fitonematoides, resultando em diferenças na hospedabilidade, agressividade e virulência (SILVA et al., 2016). Relacionar a diversidade ou a variabilidade genética de populações de *Meloidogyne* spp. à sua capacidade de parasitar plantas com genes de resistência, por meio do estudo de polimorfismo do DNA, pode ser um caminho para se entender como determinadas combinações gênicas atuam no sentido de garantir adaptabilidade e sucesso no parasitismo. Além disso, a diagnose também é dificultada pela existência de variabilidade intraespecífica em determinados caracteres taxonômicos ou moleculares (ROBERTS, 1995; TRUDGILL, 1991).

O polimorfismo genômico observado é em grande parte independente da virulência. Tais dados sugerem que, dentro de uma espécie, os isolados virulentos não compartilham uma origem comum e são provavelmente resultado de eventos mutacionais independentes (CASTAGNONE-SERENO, 2002).

## 2.5 METODOLOGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E DIAGNOSE DE *MELOIDOGYNE* SPP.

A identificação de nematoides é tarefa bastante complexa, uma vez que existe grande número de espécies com características morfológicas ou morfométricas difíceis de visualização ou com sobreposição de valores (OLIVEIRA et al., 2011). A técnica utilizada para a identificação da espécie necessita ser precisa e bastante confiável para não ocorrerem incongruências, que podem levar a um desastroso planejamento de manejo em áreas infestadas. De Ley e Blaxter (2002) sugerem que, para a segura identificação de nematoides, é necessária a integração entre diferentes técnicas, por exemplo a relação entre dados morfológicos ou morfométricos e moleculares.

Para a diagnose de *Meloidogyne* spp., os métodos mais utilizados são a análise da configuração perineal das fêmeas (TAYLOR; NETSCHER, 1974), a morfologia da região labial e do estilete de juvenis de segundo estágio, de machos e fêmeas, o teste de hospedeiros diferenciais (HARTMAN; SASSER, 1985), a caracterização citogenética (TRANTAPHYLLOU, 1985), a eletroforese de isoenzimas (ESBENSHADE; TRIANTAPHYLLOU, 1985) e a caracterização molecular (CURRAN et al., 1985).

A correta identificação das espécies de *Meloidogyne* é de grande importância para o controle eficiente da doença, além de ser uma tarefa difícil, pois como já citado existem muitos caracteres subjetivos e imprecisos e a diagnose baseada apenas em padrões morfológicos, como a configuração perineal das fêmeas ou morfologia da região labial de indivíduos, pode resultar em erros. Ademais, pode ocorrer variação em relação ao comportamento nos hospedeiros, variação no modo de reprodução que pode gerar variabilidade, além da existência de espécies crípticas, que são aquelas morfologicamente semelhantes, mas geneticamente distintas (HUNT; HANDOO, 2009; VAN OPPEN et al., 2001).

Para garantir melhor segurança na identificação, a diagnose das principais espécies de *Meloidogyne* pode ser realizada através da eletroforese de isoenzimas, envolvendo proteínas solúveis de fêmeas do nematoide (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001). Inicialmente publicada por Esbenshade e Triantaphyllou em 1985, esta técnica foi utilizada por centenas de trabalhos de caracterização de espécies de *Meloidogyne*, demonstrando sua eficiência e segurança para tal finalidade, sendo ainda hoje a principal ferramenta para a diagnose desse gênero em termos mundiais (BLOK; POWERS, 2009). Entretanto, mesmo sendo bastante segura, não é possível distinguir raças de uma mesma espécie utilizando-se a eletroforese de

isoenzimas (JANATI et al., 1982).

Além da caracterização por eletroforese de isoenzimas, vários métodos têm sido descritos a partir da extração de DNA de fêmeas, juvenis, ovos e machos de *Meloidogyne* spp. (BLOK; POWERS, 2009). A técnica de amplificação de DNA por PCR (reação em cadeia de polimerase), seguramente a mais utilizada para diagnose molecular de patógenos, auxilia na melhor discriminação interespecífica de espécies de *Meloidogyne*, sendo utilizada especialmente em combinação com outras ferramentas, como marcadores moleculares, notadamente os do tipo SCAR, RFLP e RAPD, através da amplificação de regiões do DNA mitocondrial ou ribossômico (POWERS; HARRIS, 1993; PETERSEN et al., 1997; BLOK; POWERS, 2009; FERRAZ; BROWN, 2002).

O DNA ribossômico (rDNA) e o DNA mitocondrial (mtDNA) são as regiões do genoma de nematoides que têm sido utilizadas para caracterização entre espécies. O rDNA é a região mais estudada nos nematoides, por ser altamente conservada (JONES; PHILLIPS; ARMSTRONG, 1997; POWERS, 2004); consiste de três genes ribossomais, 18S, 5.8S e 28S (26S), que contêm duas regiões espaçadoras (ITS-1 e ITS-2) entre eles, separadas pelo gene 5.8S (HILLIS; DIXON, 1991; DORRIS; DE LEY; BLAXTER, 1999). Além dessas regiões, contém o espaço interno transcrito (ITS), espaço externo transcrito (ETS) e a região do espaço intergênico (IGS), que são foco para estudos de filogenia (CASTAGNONE-SERENO; SKANTAR; ROBERTSON, 2011). A maioria da variação na sequência no rDNA ocorre nas regiões intergênicas transcritas ou não transcritas em comparação às regiões codificadoras (5.8S) (CASTAGNONE-SERENO; SKANTAR; ROBERTSON, 2011). A principal vantagem dos marcadores baseados em rDNA é que eles apresentam várias cópias, fornecendo um amplo material para estudo com variações e estabilidade (CASTAGNONE-SERENO; SKANTAR; ROBERTSON, 2011).

A região 18S do rDNA, especialmente suas regiões espaçadoras ITS1 e ITS2, é importante para reconstrução filogenética do filo Nematoda, para análises de relação entre famílias e para geração de informações para a iniciativa do código de barras para nematoides (*DNA barcoding*) (CASTAGNONE-SERENO; SKANTAR; ROBERTSON, 2011). Também em caracterização de populações ou novas espécies de fitonematoides de plantas são frequentemente incluídas análises da sequência 18S (CASTAGNONE-SERENO; SKANTAR; ROBERTSON, 2011).

As sequências de nucleotídeos das regiões ITS têm sido utilizadas para estudo das estruturas populacionais e para fins de diagnóstico, podendo também ser úteis no desenvolvimento de *primers* específicos (WANG et al., 2003; HÜBSHEN et al., 2004;

MACHADO; FERRAZ; OLIVEIRA, 2007). Além disso, também são bastante utilizadas para estudo das relações filogenéticas entre espécies de nematoides (BECKENBACH; BLAXTER; WEBSTER, 1999; SUBBOTIN et al., 2001; SABO et al., 2002). Para fins diagnósticos, entretanto, a utilização dessas regiões deve ser vista com cautela, pois as mesmas acumulam mutações, inserções e deleções ao longo do processo evolutivo da espécie, gerando variabilidade genética, que pode interferir na eficiência de métodos diagnósticos (MACHADO, 2006). Além disso, a presença de múltiplos tipos de ITS dentro de espécies ou mesmo entre indivíduos também é considerada uma desvantagem do uso das regiões ITS como alvo para o diagnóstico de espécies (ROBERTS et al., 2016).

Outra região do rDNA que tem sido alvo de diversos estudos é a 28S (26S), notadamente a chamada extensão D2/D3. Essa região está presente em uma subunidade ribossômica que apresenta um número de diferentes domínios que evoluem em taxas diferentes, entre eles os segmentos de expansão (HASSOUNA; MICHOT; BACHELLERIE, 1984). A região de expansão D2/D3 é útil para reconstrução de eventos evolutivos mais recentes ou para determinar relações entre organismos próximos, ou seja, as relações interespecíficas, podendo ser utilizada para fins diagnósticos (ROBERTS et al., 2016).

Tanto as regiões ITS e 18S, quanto D2/D3, são frequentemente utilizadas para diagnosticar espécies de *Meloidogyne* que possuem caracteres morfológicos ou fisiológicos semelhantes, como é o caso de *M. hispanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* (BLOK; POWERS, 2009). Entretanto, *M. hispanica* apresenta tamanho de sequência da região ITS idêntico ao de *M. ethiopica*, o que inviabiliza o diagnóstico utilizando-se apenas essa região; vale ressaltar que ambos apresentam D2/D3 com tamanhos diferentes, podendo ser separados dessa forma (LANDA et al., 2008). Apesar desse fato, a distinção entre espécies de *Meloidogyne* baseando-se no tamanho de fragmentos dessas regiões apresenta a vantagem de que os produtos atuam como controle positivo, ou seja, sempre é possível a visualização de algum produto, em contraste com o uso de *primers* específicos, onde um produto é unicamente obtido da espécie alvo do primer específico e resultados negativos não podem ser distinguidos de reações que falharam (BLOK; POWERS, 2009).

O DNA mitocondrial (mtDNA) também pode ser utilizado em estudos envolvendo nematoides. Essa região apresenta muitas vantagens como marcador, pois ocorre em múltiplas cópias por célula, sendo facilmente amplificado, é altamente conservado entre animais, com raras duplicações, não apresenta íntrons e suas regiões intergênicas são muito curtas (GISSI et al., 2008). Suas regiões de controle, variáveis, são geralmente ladeadas por regiões altamente conservadas, chamadas regiões funcionais, permitindo o desenho de

*primers* específicos (GISSI et al., 2008). Também é considerado um alvo ideal para estudos filogenéticos e para fins diagnósticos (DERYCKE et al., 2010), com pressuposições feitas sobre os processos envolvidos na herança, conservação e evolução do mtDNA (ROBERTS et al., 2016). Isso porque o mtDNA teria herança uniparental (SONG et al., 2014), pelas células germinativas maternas, estando associado à segregação vegetativa que remove a heteroplasmia, ou seja, a presença de mais de um tipo de mtDNA, com alta eficiência, pressupondo-se que o mtDNA efetivamente não é recombinante. As variações ocorridas nessa região, originaram, portanto, a partir de mutações que seriam herdadas de forma clonal pela linha maternal (ROBERTS et al., 2016). Sua utilização tem sido fundamental para responder questões ligadas à ecologia e biologia evolutiva (AVISE et al., 1987), genética da conservação (ROBERTSON et al., 2007), entre outras.

Além dessas, uma técnica bastante segura, mas ainda sem utilização em rotina laboratorial no país, é o código de barras do DNA (*DNA barcode*) (OLIVEIRA et al., 2009). Seu uso foi proposto pelo laboratório de Cold Spring Harbor (EUA), em 2003 (POWERS, 2004), tendo como princípio a ideia de que, em um pequeno trecho do genoma do organismo, específico para cada espécie, geralmente o DNA mitocondrial ou DNA ribossômico, existiria variação suficiente para separar as espécies existentes no planeta. A aplicação de tal técnica é baseada em sequenciamento de regiões do genoma do organismo, garantindo total segurança na correta identificação das espécies. Inúmeras sequências de espécies de nematoides, inclusive de *Meloidogyne* spp., estão disponíveis em bases de dados eletrônicas específicas e com acesso aberto, permitindo a utilização do código de barras do DNA para diagnose de nematoides.

### 2.5.1 Caracterização Morfológica

A identificação de espécies de *Meloidogyne* baseada apenas em caracteres morfológicos, especialmente a configuração perineal de fêmeas, foi, por muito tempo, a única ferramenta disponível para tal finalidade (CARNEIRO et al., 2000). Entretanto, a precisão e a confiabilidade da diagnose baseada apenas em padrões morfológicos é duvidosa, mesmo tratando-se de taxonomista qualificado e especializado no gênero *Meloidogyne* (ESBENSHADE; TRIANTAPHYLLOU, 1990), devido à sobreposição de várias características existentes entre as diversas espécies filiadas ao gênero *Meloidogyne*, além da ocorrência de variações intraespecíficas e/ou intrapopulacionais (CARNEIRO et al., 2007; CARNEIRO; ALMEIDA; CARNEIRO, 1996a; CARNEIRO et al., 2004).

O padrão perineal é observado na região posterior das fêmeas adultas de *Meloidogyne* spp., que é composta pelo ânus e vulva, correspondendo à região perineal propriamente dita, o término da cauda, fasmídeos, linhas laterais e estrias cuticulares que circundam tal região, que conferem características específicas para cada espécie (HUNT; HANDOO, 2009). Por exemplo, a configuração perineal de *M. paranaensis* apresenta formato retangular a oval, com arco dorsal alto, estrias finas ou mais grossas, sendo lisas ou onduladas, com ausência de linha lateral (HUNT; HANDOO, 2009).

A utilização exclusiva da observação de modelos perineais, como realizado em alguns laboratórios, mostra-se consideravelmente limitada para identificação específica de *Meloidogyne* spp., devido aos fatores supra mencionados. Provavelmente, são inúmeros os casos de identificações equivocadas. Por exemplo, os relatos de populações de *M. incognita* em café na Guatemala e El Salvador, que haviam sido baseadas em padrões perineais, devem ser consideradas com cautela, pois pesquisas recentes realizadas nesses países, com o auxílio de fenotipagem por enzimas, não detectaram *M. incognita* e, sim, *M. paranaensis* e *M. izalcoensis* (CARNEIRO et al., 2004). Soma-se, ainda, o considerável número de espécies que exibem padrão perineal similar ao de *M. incognita*, sendo erroneamente identificadas, como é o caso de *M. paranaensis* (CARNEIRO et al., 1996).

Entretanto, a utilização dos padrões perineais é interessante para estudos populacionais, especialmente quando forem complementares às técnicas bioquímicas, fisiológicas e moleculares (CARNEIRO et al., 2004; CARNEIRO; COFCEWICZ, 2008), uma vez que podem contribuir com maior abrangência para o esclarecimento da variabilidade observada em diferentes populações da mesma espécie.

### 2.5.2 Caracterização Bioquímica

A identificação das espécies de *Meloidogyne* não é tarefa simples e a utilização apenas de caracteres morfológicos deve ser vista com cautela, especialmente por laboratórios de diagnose, em que a correta identificação é crucial para a recomendação de manejo ou para fins quarentenários. Metodologias mais precisas e confiáveis devem ser priorizadas, como a identificação bioquímica por meio de isoenzimas.

A técnica de eletroforese de isoenzimas consiste na avaliação da migração ou mobilidade relativa (MR) das enzimas. A MR das enzimas em gel de acrilamida sob corrente elétrica varia de acordo com suas cargas elétricas e pesos moleculares, levando à visualização de isoformas em diferentes posições no gel, no qual são específicas para a maior

parte das espécies de *Meloidogyne*. As principais vantagens são o reconhecimento de *Meloidogyne* spp., mesmo em mistura, identificação de populações atípicas, eficiência, confiabilidade e rapidez (CARNEIRO et al., 2000, BLOK; POWERS, 2009).

De acordo com Carneiro e Almeida (2000), são utilizadas fêmeas branco leitosas (no início da fase de oviposição) e os fenótipos enzimáticos indicam a espécie de *Meloidogyne* de acordo com o número de isoformas reveladas no gel de acrilamida. Os padrões enzimáticos são comparados com padrão conhecido, ou seja, *M. javanica*, incluído na eletroforese para determinar as distâncias de migração.

Dickson, Huisingh e Sasser (1971) e Hussey, Sasser e Huising (1972) realizaram as primeiras pesquisas em taxonomia bioquímica de nematoides das galhas e empregaram a eletroforese para comparação de proteínas e enzimas de espécies de nematoides. Ao longo do tempo, foram estudadas várias enzimas específicas para identificação das espécies de *Meloidogyne*. Entretanto, as enzimas esterase, malato desidrogenase, superóxido dismutase e glutamato oxaloacetato transaminase apresentaram as melhores características para identificação taxonômica (CARNEIRO et al., 1996; 2000). A isoenzima esterase (Est) é a mais estudada e utilizada na identificação de espécies de *Meloidogyne*, com 40 fenótipos descritos (BLOK; POWERS, 2009).

A identificação por fenótipos enzimáticos tem sido amplamente utilizada, tanto em trabalhos de diagnose, caracterização de populações e levantamentos, quanto em estudos descritivos de novas espécies (ESBENSHADE; TRIANTAPHYLLOU, 1985; CARNEIRO et al., 1996; CARNEIRO et al., 2004).

Essa técnica também tem sido útil para confirmação ou refutação de identificações equivocadas baseadas exclusivamente em caracteres morfológicos, como é o caso de *M. enterolobii* (= *M. mayaguensis*) e *M. paranaensis*. No primeiro caso, *M. mayaguensis*, inicialmente descrito em 1988 por Rammah e Hirschmann, entrou em sinonímia com *M. enterolobii* (BRITO et al., 2004), descrito por Yang e Eisenback em 1983, quando estudos bioquímicos e moleculares foram utilizados para caracterização de populações, sendo alçada à condição de uma das principais espécies do gênero (BLOK et al., 2002). A utilização de caracteres morfológicos para a identificação dessa espécie no passado provavelmente levou a muitos erros de identificação nos levantamentos realizados (BRITO et al., 2004).

A espécie, *M. paranaensis*, foi, por muitos anos, identificada erroneamente como *M. incognita* raça 5 ou biótipo IAPAR, em função da grande semelhança morfológica entre as duas espécies. Por meio da observação de fenótipos de esterase, combinada com estudos moleculares, *M. paranaensis* foi identificado e finalmente separado de *M. incognita*

(CARNEIRO et al., 1996). Sua caracterização bioquímica revelou fenótipo de esterase com apenas uma isoforma (P1) e N1 para malato desidrogenase (CARNEIRO et al., 1996).

Até o momento, não existem padrões enzimáticos para todas as espécies descritas do gênero *Meloidogyne*, mas, para aquelas em que tais padrões estão disponíveis, a segurança na identificação é elevada. Isso porque a variabilidade intraespecífica em nível enzimático é baixa, devido ao fato de que as enzimas são produzidas por meio da expressão de genes altamente conservados, representado uma fração pequena do genoma funcional (MCLAIN; RAI; FRASER, 1987).

Existem exemplos de fenótipos isoenzimáticos atípicos para espécies válidas de *Meloidogyne* ou mesmo fenótipos descritos na literatura para os quais ainda não há definição específica (BLOK; POWERS, 2009; ARAÚJO FILHO et al., 2016). Por exemplo, Cenis, Opperman e Triantaphyllou, (1992) relataram um padrão de esterase atípico (S1) de *M. incognita* originado da Espanha. Adam, Phillips e Blok, (2005) descreveram o fenótipo S2 para isolados de *M. incognita* originados da Líbia. Medina et al. (2007) encontraram Est S1, Est F2b e Est F2a em 20% das amostras de figo no Brasil. Carneiro et al. (2007) observaram um padrão de esterase atípico L3 (Rm 1,0; 1,1; 1,3) e V3/V4 com menor isoforma (Rm 1,3) e três isoformas maiores (0,9; 1,2; 1,3) em vinhedos no Chile, identificados como *Meloidogyne* sp. Nesses casos de ocorrência de variantes intraespecíficas, faz-se necessário o uso de mais de uma enzima para identificação das populações (BLOK; POWERS, 2009).

Especificamente para a cultura do café, os fenótipos de esterase demonstraram ser uma eficiente ferramenta para identificação dos nematoides das galhas em lavouras infestadas. Carneiro et al. (2005) identificaram, em levantamento realizado em lavouras de café no Brasil, *M. incognita* (Est I1, I2), *M. paranaensis* (Est P1, P2), *M. arenaria* (Est A2), *M. arabicida* López & Salazar, 1989 (Est AR2), *M. exigua* (Est E1), *M. mayaguensis* (= *M. enterolobii*) (Est M2) e duas populações que apresentaram os padrões Est SA2, SA4, posteriormente descritas como *M. izalcoensis* Carneiro, Almeida, Gomes & Hernández, 2005. O fenótipo P2 de *M. paranaensis* é uma variante do inicialmente descrito, P1.

A caracterização e o entendimento acerca de variantes fenotípicas nas populações de uma mesma espécie de *Meloidogyne* é importante, pois o aparecimento de variantes intraespecíficas pode estar correlacionado com uma possível variabilidade genética dentro dessas populações. E esse é um dos fatores que pode estar relacionado com a especialização no parasitismo de determinada espécie.

### 2.5.3 Caracterização Fenotípica

A identificação de raças fisiológicas em espécies do gênero *Meloidogyne* foi inicialmente observada por Sasser (1952), que propôs o reconhecimento formal da presença de variantes fisiológicos ou raças. Posteriormente, o mesmo autor propôs a série de hospedeiros diferenciais para a classificação das raças, o chamado Teste de Hospedeiros Diferenciais ou *North Carolina Host Differential Test* (HARTMAN; SASSER, 1985).

Esse teste é realizado através de plantas diferenciadoras de famílias botânicas diferentes. As raças são diferenciadas através de reações positivas e negativas, observadas em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* ‘Rutgers’), fumo (*Nicotiana tabacum* ‘NC 95’), algodão (*Gossypium hirsutum* ‘Deltapine 61’), pimentão (*Capsicum annuum* ‘Early California Wonder’), melancia (*Citrullus vulgaris* ‘Charleston Gray’) e amendoim (*Arachis hypogaea* ‘Florunner’) (HARTMAN; SASSER, 1985).

Apesar de ter sido recomendado como ferramenta auxiliar na identificação de espécies de *Meloidogyne*, e não como única forma de diagnose de espécies, muitos autores têm utilizado o teste de hospedeiros diferenciais para fins diagnósticos. Entretanto, tal situação apresenta sérios problemas, entre eles, o aparecimento de variantes fisiológicos diferentes daqueles inicialmente descritos e, mais importante, a descrição de novas espécies do gênero, que apresentam padrões fenotípicos semelhantes às espécies inicialmente descritas, sejam elas *M. incognita*, *M. javanica*, *M. hapla* e *M. arenaria*, para as quais o teste foi proposto, levando a erros de identificação (MOENS; PERRY; STARR, 2009). Nesse sentido, Moens, Perry e Starr (2009) recomendam formalmente a descontinuidade da utilização do teste para separação de raças ou variantes, uma vez que esse teste não seria capaz de abranger toda a diversidade presente no gênero em relação à capacidade parasitária em diferentes hospedeiros.

O termo “raça”, utilizado dentro do contexto originalmente descrito para uma terminologia prevalente nos EUA na época, refere-se a populações de um patógeno que diferem em virulência em espécies hospedeiras que carregam genes específicos de resistência efetivos para outras populações avirulentas desse patógeno (MOENS; PERRY; STARR, 2009). Esse sistema de classificação mistura a variação de virulência de populações e diferentes espécies hospedeiras, o que, fitopatologicamente falando, não é o mais correto. Camargo (2011) define o conceito fitopatológico de raça como aquele observado em populações do patógeno que atacam somente algumas cultivares da espécie hospedeira (especialização intraespecífica), sendo a definição de raça, portanto, dada de acordo com as

reações fenotípicas das populações quando inoculadas em uma série de cultivares da mesma espécie hospedeira, denominada série diferencial.

Em Nematologia, raças têm sido utilizadas para classificar as variações observadas em populações do nematoide de cisto da soja (*Heterodera glycines*). Para as populações variantes do nematoide de cisto da batata, *Globodera rostochiensis*, e do nematoide de cisto dos cereais, *Heterodera avenae*, o termo patótipo tem sido preferido, enquanto as variações observadas para o nematoide *Ditylenchus dipsaci* são classificadas em biótipos (STARR; BRIDGE, COOK, 2001).

A variação intraespecífica de *Meloidogyne* spp. pode ser expressa na interação hospedeiro e patógeno em três níveis: reação de não hospedeiro, agressividade e virulência (STARR; BRIDGE, COOK, 2001). Nesse contexto, a reação de não hospedeiro, ou imunidade, é observada em plantas que não permitem o ataque do nematoide, geralmente bloqueando a penetração dos mesmos em seus tecidos radiculares ou prevenindo o desenvolvimento do nematoide e sua reprodução, sem sofrer danos. Virulência seria definida de acordo com a habilidade do nematoide em se reproduzir em plantas hospedeiras com genes de resistência, ou seja, nematoides virulentos possuem a capacidade de reprodução, enquanto nematoides avirulentos não são capazes de se reproduzir na presença de genes específicos de resistência. Agressividade refere-se à diferenças na reprodução de populações de patógenos em plantas com resistência horizontal, ou seja, à capacidade do nematoide de reproduzir-se em todas as cultivares da planta hospedeira, mas com algumas variações (TRUDGILL, 1991).

A diversidade fenotípica e a variabilidade intraespecífica nas populações de *Meloidogyne* spp. em genótipos de espécies hospedeiras, especialmente de *Coffea* spp., dificultam a seleção de fontes de resistência (SANTOS, 2016). A ampla gama de nematoides das galhas relatadas no café está relacionada à grande diversidade na patogenicidade (HERNANDEZ, 1997; VILLAIN et al., 1999).

No Estado do Paraná, *M. paranaensis* é o principal problema nematológico da cultura do café (ITO et al., 2013). Não obstante os prejuízos causados, são frequentes os relatos de populações do nematoide causando danos bastante acentuados, o que demonstra a possibilidade de diferenças em agressividade em populações de *M. paranaensis*. Em face dessas observações, Silva, Gardiano e Machado (2013) realizaram um estudo, em condições de casa de vegetação, em que plantas de cafeeiro 'Mundo Novo' foram inoculadas com três diferentes populações de *M. paranaensis*, originadas de cafeeiros e coletadas no Estado do Paraná, nos municípios de Apucarana (esterase P1 - típico) e Londrina (esterase P1 - típico, e P2 - atípico). Os autores observaram que a população de Apucarana apresentou multiplicação

cinco vezes superior à das demais populações, evidenciando uma maior fecundidade desta população, na cultivar estudada. Entretanto, não foi possível a comprovação de que a maior fecundidade de algumas populações de *M. paranaensis* resultaria em danos mais acentuados nas plantas de café.

O aparecimento de tais variantes é preocupante, especialmente em culturas perenes, como o café, em função do grande dispêndio de tempo e recursos para a obtenção de cultivares ou porta enxertos resistentes aos nematoides e a possibilidade de quebra dessa resistência por populações atípicas ou variantes intraespecíficos dos nematoides. Para as espécies de *Meloidogyne* fitoparasitas de café, existem poucos estudos sobre a diversidade e filogenia (RANDIG et al., 2002; CARNEIRO et al., 2004). Entretanto, variabilidade intraespecífica na capacidade reprodutiva de populações de *Meloidogyne* spp. tem sido observada em genótipos de *Coffea* spp. (RIBEIRO et al., 2005; SILVA et al., 2005), sugerindo a existência de diversidade genética entre populações que parasitam a cultura.

Portanto, essa questão deve ser levada em consideração por programas de melhoramento genético da cultura, de modo a evitar problemas de quebra de resistência de cultivares em lavouras comerciais e de garantir-se a durabilidade de genes de resistência em condições de campo.

### 3 ARTIGO A: CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE *Meloidogyne paranaensis* EM LAVOURAS CAFEEIRAS

#### 3.1 RESUMO

Na cafeicultura, um dos principais fatores limitantes à sua produção é a incidência de pragas e doenças, especialmente os fitonematoides. O principal gênero que causa perdas acentuadas de produção nas lavouras cafeeiras é *Meloidogyne*. No Estado do Paraná, o principal nematoide para a cultura é *M. paranaensis*. Entretanto, o aparecimento de populações mais agressivas dessa espécie tem sido frequentemente observado em lavouras cafeeiras e essa diversidade pode interferir na longevidade de estratégias de manejo utilizando cultivares resistentes. O objetivo do trabalho foi caracterizar populações de *M. paranaensis* coletadas de lavouras de café infestadas. As metodologias utilizadas para caracterização das 11 populações estudadas, provenientes de municípios do Estado do Paraná e de Minas Gerais, envolveram a análise morfológica dos padrões perineais, a análise bioquímica por eletroforese de isoenzimas e a caracterização fenotípica em diferentes genótipos de café. As avaliações morfológicas mostraram que existe variação entre as populações, apesar da maioria delas apresentar padrões típicos. A identificação bioquímica foi baseada na análise de zimogramas de  $\alpha$ -esterase e resultou no aparecimento de três perfis distintos: P1 (típico de *M. paranaensis*), P2 (atípico) e um fenótipo ainda não descrito na literatura, P2A. Na caracterização fenotípica, 13 genótipos de café foram inoculados com 11 populações de *M. paranaensis*, e observou-se variação na agressividade das populações em relação a “Mundo Novo IAC 376-4”, genótipo sem genes de resistência ao nematoide, além de variação na virulência das populações nos diferentes genótipos com genes de resistência. Entretanto, nenhuma relação foi observada entre a origem das populações com suas variações nos padrões perineais, perfis de esterase ou multiplicação nos genótipos de café, bem como entre as diferentes caracterizações entre si, sugerindo que a diversidade encontrada nas diferentes populações estudadas não apresenta um padrão de comportamento identificável pelos parâmetros aqui utilizados.

Palavras-chave: nematoide das galhas; *Coffea arabica*; *Coffea canephora*; diversidade.

#### CHARACTERIZATION OF *Meloidogyne paranaensis* POPULATIONS FROM COFFEE CROPS

#### 3.2 ABSTRACT

One of the main limiting factors to yield in coffee growing areas is the incidence of pests and diseases, among them the phytonematodes. The principal genera causing extensive yield losses in coffee crops is *Meloidogyne*. In the Paraná State, the key nematode to coffee crops is *M. paranaensis*. However, the insurgence of more aggressive populations of this nematode species have been frequently observed in coffee growing areas and this diversity could affect the longevity of management strategies using resistant cultivars. Therefore, the objective of this work was to characterize *M. paranaensis* populations collected in infested coffee crops. The methodologies used for the characterization of 11 populations from municipalities of Paraná and Minas Gerais States, involved the morphological analyses of perineal patterns, the biochemical analyses using the isozyme electrophoresis, and the phenotypic characterization in different coffee genotypes. Morphological evaluations showed the existence of variation

between populations, although the majority of them showed typical perineal patterns. The biochemical identification was based on  $\alpha$ -esterase zymograms analyses and resulted in the appearance of three distinct profiles: P1 (typical from *M. paranaensis*), P2 (atypical) and a non-described profile, P2A. In the phenotypic characterization, 13 coffee genotypes were inoculated with 11 *M. paranaensis* populations and there was observed a variation in the aggressiveness of populations in relation to “Mundo Novo”, a genotype without resistance genes, besides in the virulence of populations in different genotypes carrying resistance genes. Nevertheless, no relationship was observed between the origin of population with their variations in perineal patterns, esterase profiles, or multiplication in coffee genotypes, as well as between the different characterizations each other, suggesting that the diversity found in the different populations here studied do not show an identifiable behavior through the parameters here utilized.

Key-words: root-knot nematode; *Coffea arabica*; *Coffea canephora*; diversity

### 3.3 INTRODUÇÃO

Os fitonematoides do gênero *Meloidogyne* são responsáveis por decréscimos significativos na cafeicultura. No Estado do Paraná, *Meloidogyne paranaensis* é o principal problema nematológico da cultura do café (ITO et al., 2013; MATUNAGA et al., 2016). Não obstante os prejuízos causados são frequentes os relatos de populações do nematoide causando danos acentuados, o que demonstra a possibilidade de diferenças quanto a agressividade em populações de *M. paranaensis*.

Em face dessas observações, Silva, Gardiano e Machado (2013) realizaram um estudo, em condições de casa de vegetação, em que plantas de cafeeiro ‘Mundo Novo’ foram inoculadas com três diferentes populações de *M. paranaensis*, originadas de cafeeiro e coletado no Estado do Paraná, nos municípios de Apucarana (esterase P1 - típico) e Londrina (esterase P1 - típico, e P2 - atípico). Os autores observaram que a população de Apucarana apresentou multiplicação cinco vezes superior à das demais populações, evidenciando uma maior fecundidade desta população na cultivar estudada. Entretanto, não foi possível a comprovação de que a maior fecundidade de algumas populações de *M. paranaensis* resultaria em danos mais acentuados nas plantas de café.

O aparecimento de tais variantes é preocupante, especialmente em culturas perenes, como o café, em função do grande dispêndio de tempo e recursos para a obtenção de cultivares ou porta enxertos resistentes aos nematoides e a possibilidade de quebra dessa resistência por populações atípicas ou variantes intraespecíficos dos nematoides. Para as espécies de *Meloidogyne* fitoparasitas de café, existem poucos estudos sobre a diversidade e

filogenia (RANDIG et al., 2002; CARNEIRO et al., 2004). Entretanto, variabilidade intraespecífica na capacidade reprodutiva de populações de *Meloidogyne* spp. tem sido observada em genótipos de *Coffea* spp. (RIBEIRO et al., 2005; SILVA et al., 2005), sugerindo a existência de diversidade genética entre populações que parasitam a cultura.

Em resposta ao crescente apontamento de quebra de resistência à *M. incognita* (SILVA et al., 2016) e *M. paranaensis* (SHIGUEOKA et al., 2016) em plantas cultivadas, incluindo o café, se faz necessário um aprofundamento no estudo da diversidade genética desses patógenos, buscando identificar padrões genéticos e suas frequências, e entender como as suas populações podem diferir umas das outras. Tais informações podem favorecer o desenvolvimento de estratégias de manejo desses nematoides, por meio de programas de melhoramento e de ações voltadas ao controle genético.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar populações de *M. paranaensis* coletadas em lavouras de café infestadas quanto à morfologia dos seus padrões perineais, aos seus perfis eletroforéticos de  $\alpha$ -esterase e à sua caracterização fenotípica em genótipos de café.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.4.1 PURIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DE POPULAÇÕES

As populações de *M. paranaensis* foram obtidas de raízes parasitadas de café, coletadas em diferentes regiões produtoras nos Estados do Paraná e Minas Gerais (Tabela 3.1). As amostras de raízes passaram inicialmente por extração dos nematoides (BONETI; FERRAZ, 1981), seguida de inoculação dos mesmos em tomateiros cv. Santa Clara, a fim de permitir a multiplicação dos nematoides para posterior identificação.

Após aproximadamente 30 dias, a partir de raízes parasitadas de tomate, procedeu-se a identificação das populações por eletroforese de isoenzimas (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001), sendo uma única massa de ovos de cada população separada e inoculada em tomateiros sadios para purificação das populações, obtenção dos isolados monoespecíficos e multiplicação para os estudos propostos.

Rotineiramente, as populações do presente trabalho são mantidas em casa de vegetação em plantas de café cv. Mundo Novo, sendo multiplicadas em tomate apenas quando da necessidade de aumento da quantidade de inóculo.

**Tabela 3.1** - Origem das populações de *Meloidogyne paranaensis* utilizadas no presente estudo.

Código da população	Município	Cultivar
9	São Jorge do Patrocínio – PR	IAPAR 59 enxertado com Apatã IAC 2258
13	Altônia – PR	<i>Coffea arabica</i>
2223	São Jorge do Patrocínio – PR	IPR 100
2224	São Jorge do Patrocínio – PR	IPR 100
2225	São Jorge do Patrocínio – PR	IPR 100
2226	São Jorge do Patrocínio – PR	IPR 100
2290	Altônia – PR	<i>Coffea arabica</i>
2291	Piumhi - MG	<i>Coffea arabica</i>
98.1	Apucarana – PR	Mundo Novo
1 BL	Londrina - PR	Mundo Novo
2 BK	Londrina - PR	Mundo Novo

**Fonte:** o próprio autor

#### 3.4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE POPULAÇÕES DE *MELOIDOGYNE PARANAENSIS*

Na caracterização morfológica, pelos menos dez fêmeas branco leitosas de cada população foram retiradas aleatoriamente das raízes de tomate com auxílio de microscópio estereoscópico, e transferidas para uma gota de solução de ácido láctico a 45%. A região perineal foi cortada, limpa e inserida em glicerina sob lâmina de vidro, para posterior observação em microscópio de luz (HARTMAN; SASSER, 1985).

Na caracterização bioquímica, 15 fêmeas branco leitosas de cada população, ou seja, em fase de oviposição, foram dissecadas das raízes de tomateiro com auxílio de microscópio estereoscópico. Em seguida, cada fêmea foi colocada em um tubo capilar do tipo hematócrito contendo 5 µl de solução de sacarose.

Para determinar os fenótipos de  $\alpha$ -esterase, as fêmeas foram maceradas e transferidas para poços em gel de poliacrilamida (PAGE) com gel de empilhamento a 4% (pH 6,8) e gel separador a 7,5% (pH 8,9), utilizando tampão de corrida com Tris-glicina (pH 8,9). Extratos de três fêmeas do isolado IPR MJAV 81 de *M. javanica*, exibindo o fenótipo típico J3 (Rm: 1,0, 1,3 e 1,4), foi adicionado em dois poços de cada gel atuando, dessa forma, como isolado referência.

A eletroforese foi realizada em aparato Mini PROTEAN III (Bio-Rad), a 4 °C, sob voltagem constante de 100 V no gel de empilhamento ( $\pm 15$  min) e, então, a 200 V no gel separador (25 – 30 min) (BRITO et al., 2004). A revelação foi realizada utilizando  $\alpha$ -

naftilacetato como substrato e mediante incubação a 37 °C, conforme descrito por Carneiro e Almeida (2001). A taxa de mobilidade relativa (Rm) foi calculada atribuindo-se valor 1 à isoforma de menor mobilidade do isolado de referência J3, sendo a linha divisória entre os geis separador e de empilhamento o ponto inicial de referência para as medições.

### 3.4.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

O experimento para caracterização fenotípica das populações de *M. paranaensis* foi conduzido em casa de vegetação no Instituto Agrônomo do Paraná, em Londrina, Paraná, Brasil (23° 21' 20,0" S / 51° 09' 58,2" O), no período de 02 de julho a 28 de outubro de 2015. As médias de temperatura máxima e mínima, durante o período experimental, foram de 32,5 °C e 23,6 °C, respectivamente.

Foram utilizados cinco genótipos de *C. arabica* e oito de *C. canephora* var. robusta para tal caracterização. Dos cinco genótipos de café arábica, foram escolhidas as cultivares IPR 100 e IPR 106, por serem descritas em outros estudos como sendo resistentes a *M. paranaensis* (Ito et al., 2008; Andreazi et al., 2015). Duas outras linhagens (IAPAR E0606 T21, IAPAR E1106 T149) foram previamente identificadas como sendo resistentes pelo programa de melhoramento do IAPAR por meio de seleção de plantas mais vigorosas e produtivas em áreas infestadas e por inoculações artificiais em telado. *Coffea arabica* cv. Mundo Novo IAC 376-4 foi usada como padrão suscetível. Dos oito genótipos de *C. canephora*, Apoatã IAC 2258 já foi relatado como sendo resistente a *M. paranaensis* (Andreazi et al., 2015), enquanto que os outros foram utilizados porque foram previamente identificados como sendo resistentes pelo mesmo programa de melhoramento, utilizando a mesma metodologia de seleção.

IPR 100 teve origem do cruzamento de ‘Catuaí Vermelho IAC 81’ x (‘Catuaí Vermelho IAC 81’ x IAC 1110-8), sendo IAC 1110-8 um genótipo de *Coffea arabica* portador de genes de *C. liberica* denominado BA-10, selecionado na Índia. IPR 106 foi originada de Icatu 925, o qual foi derivado do cruzamento artificial entre Bourbon Vermelho di-haploide com número duplicado de cromossomos e *C. canephora* com número duplicado de cromossomos, que foi retrocruzado duas vezes com a cultivar Mundo Novo IAC 379-19. Icatu 925 é uma conhecida fonte de resistência a *M. paranaensis* (Carneiro et al., 2013; Matiello et al., 2016). IAPAR E0606 T21 e IAPAR E1106 T149 são linhagens F<sub>5</sub> derivadas

de uma hibridação natural entre Icatu 925 e Sarchimor 1669-33, sendo as duas originadas da mesma planta F<sub>3</sub>, porém de plantas F<sub>4</sub> diferentes.

Dos genótipos de *C. canephora* var. robusta, Apoatã IAC 2258 é a única que é uma cultivar. Os outros sete genótipos de *C. canephora* foram originados de sete plantas individuais, cada um originado de diferentes populações, as quais foram clonadas e implantadas em um experimento de campo no IAPAR, denominado E0703. As plantas dos sete genótipos de *C. canephora* utilizadas no nosso estudo foram clonadas do E0703 por meio de estaquia, enquanto que as plantas de Apoatã IAC-2258 foram originadas de sementes de polinização aberta.

As sementes dos genótipos de *C. arabica* também foram originadas de polinização aberta e a semeadura foi em germinadores contendo areia. Estacas de ramos ortotrópicos dos genótipos de *C. canephora* foram coletadas e enraizadas em tubetes. Após as mudas de *C. arabica* atingirem o estágio cotiledonar, foram transplantadas para tubetes para completar seu desenvolvimento. Quando as mudas de ambas as espécies atingiram quatro a seis pares de folhas, foram transplantadas para copos plásticos com capacidade de 700 cm<sup>3</sup>, contendo cerca de 600 cm<sup>3</sup> de substrato (3:1, areia: solo) previamente esterilizado por calor seco a 160 °C por 5 horas.

Aproximadamente 60 dias antes das inoculações, os nematoides foram extraídos de raízes de café cv. Mundo Novo e inoculados em tomateiros cv. Santa Clara, para multiplicação. Os espécimes utilizados como inóculo foram extraídos das raízes dos tomateiros pelo método de Boneti e Ferraz (1981). Nas suspensões obtidas, o número de exemplares por mililitro foi estimado, sob microscópio de luz e com auxílio de câmara de Peters. A inoculação das plantas de café foi realizada através da pipetagem de suspensão contendo 1.000 exemplares de cada população (Pi), isoladamente, em dois orifícios feitos no solo, próximos ao colo das plantas. Plantas de tomate cv. Santa Clara foram inoculadas com cada população para confirmação da viabilidade do inóculo e das boas condições experimentais. As plantas foram fertilizadas com 3 g de Osmocote® Plus (15% N, 9% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 12% K<sub>2</sub>O, 1% Mg, 2.3% S, 0.05% Cu, 0.45% Fe, 0.06% Mn, 0.02% Mo) e irrigadas diariamente, mantendo-as em capacidade de campo.

**Tabela 3.2** - Genótipos de *Coffea arabica* e *C. canephora* utilizados para a caracterização fenotípica das populações de *Meloidogyne paranaensis*.

Genótipo	Origem
IAPAR E0606 T21	Icatu x Sarchimor
Mundo Novo IAC 376-4	Bourbon x Sumatra
IAPAR E1106 T149	Icatu x Sarchimor
IPR 106	Icatu
IPR 100	Catuaí x (Catuaí x BA 10)
Apoatã IAC 2258	<i>Coffea canephora</i> var robusta
IAPAR E0703 T5	<i>Coffea canephora</i> var robusta
IAPAR E0703 T7	<i>Coffea canephora</i> var robusta
IAPAR E0703 T9	<i>Coffea canephora</i> var robusta
IAPAR E0703 T10	<i>Coffea canephora</i> var robusta
IAPAR E0703 T13	<i>Coffea canephora</i> var robusta
IAPAR E0703 T17	<i>Coffea canephora</i> var robusta
IAPAR E0703 T19	<i>Coffea canephora</i> var robusta

**Fonte:** o próprio autor

As avaliações foram realizadas aos 90 dias após a inoculação. As partes aéreas dos cafeeiros foram descartadas e os sistemas radiculares lavados em água corrente e pesados. Em seguida, procedeu-se a extração dos ovos e juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>), empregando-se a metodologia de Boneti e Ferraz (1981). Após a extração, a população final (Pf) de cada população de *M. paranaensis* foi quantificada com auxílio de lâmina de Peters, sob microscópio de luz, obtendo-se o fator de reprodução do nematoide (FR = Pf/Pi) em cada parcela. Com os dados do peso do sistema radicular e Pf, foi determinado o número de nematoides por grama de raízes (Nema/g).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se o esquema fatorial 11 x 13 (11 populações x 13 genótipos de café) e cinco repetições para cada cultivar/ população do nematoide, sendo cada unidade experimental representada por um vaso contendo uma planta. Os dados obtidos de FR e Nema/g foram transformados para log (x + 1) e submetidos à análise de variância e testes para desdobramento das interações entre os fatores utilizando-se o programa R 2.15.2 Core Team (2015), pacote ExpDes (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013).

Na cultivar de tomate Santa Clara foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições para cada população de nematoide. Os dados obtidos de FR e Nema/g foram transformados para  $\sqrt{x + 0,5}$  submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett e teste de comparação de médias LSD a 5% de probabilidade utilizando-se o programa R 2.15.2 Core Team (2015), pacote Agricolae.

A diversidade fenotípica entre os genótipos de café estudados foi avaliada através de análise fatorial. O dendrograma obtido a partir do agrupamento baseado na análise de componentes principais através do método de Ward, utilizando a distância Euclidiana, utilizando-se as médias de valores para a variável FR e nema/g de todos os genótipos testados e da cultivar de tomate Santa Clara.

### 3.5 RESULTADOS

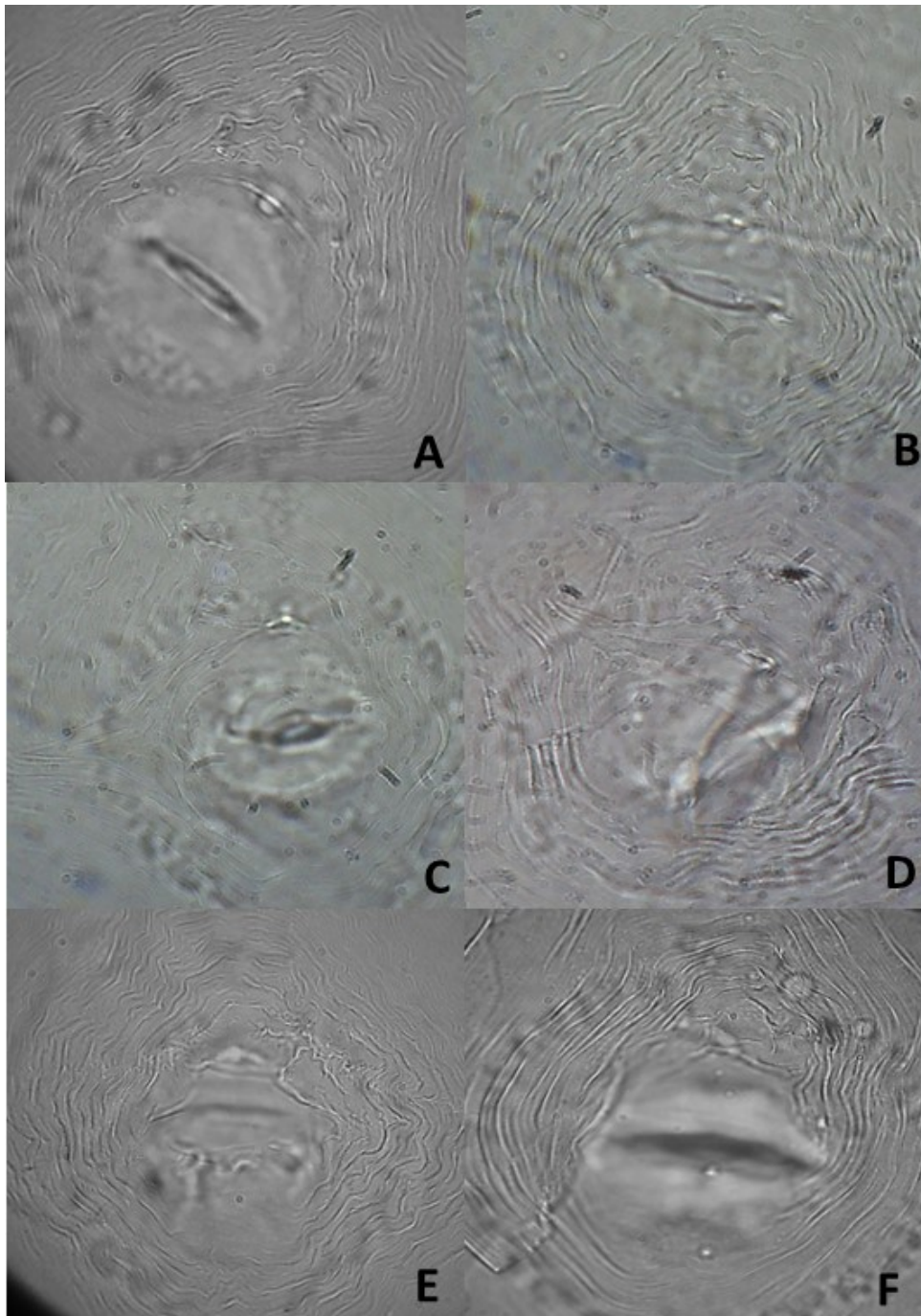
#### 3.5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A partir da observação das configurações perineais das 11 populações de *M. paranaensis*, pode-se concluir que a maioria dos indivíduos apresentou configuração típica da espécie, isto é, formato retangular a ovalado, arco dorsal alto e trapezoidal, presença de estrias grossas e/ou finas, onduladas e/ou lisas, com linhas laterais descontínuas demarcadas por estrias que se dobram ou se interrompem (Figura 3.1). Somente a população 1 BL, proveniente de Londrina, apresentou 100% dos indivíduos com configurações típicas.

Algumas populações apresentaram indivíduos com configuração perineal atípica, como nas populações 2223 e 2224 (provenientes de São Jorge do Patrocínio), que apresentaram arco dorsal variando de alto, mediano a baixo e linhas laterais discretamente evidentes. A porcentagem de perineais atípicas entre os indivíduos das populações 2223 e 2224 foi de 44,44 e 60,00%, respectivamente (Tabela 3.3). As populações 2226 e 98.1 (provenientes de São Jorge do Patrocínio e Apucarana, respectivamente), também apresentaram elevada porcentagem de indivíduos atípicos (69,23% e 50,00%, respectivamente) (Tabela 3.3).

As populações 2225, 2290, 2291, 2BK e 9, de São Jorge do Patrocínio, Altônia, Piumhi, Londrina e São Jorge do Patrocínio, respectivamente, exibiram algumas variações entre os indivíduos, apesar da maioria apresentar padrões típicos. Nestas, observou-se variabilidade intraespecífica, destacando-se indivíduos com presença de asa lateral proeminente. Nesse caso, a porcentagem de indivíduos atípicos foi de 40,00% (2225), 27,27% (2290), 30,77% (2291), 38,46% (2BK) e 25,00% (9) (Tabela 3.3). A população 13, originada de Altônia, apresentou menor porcentagem de indivíduos atípicos, com 9,09%.

**Figura 3.1** - Configurações perineais observadas em populações de *Meloidogyne paranaensis* encontradas na cultura do café. Fotografias retiradas a partir de microscopia de luz. A e B = padrões perineais típicos de *M. paranaensis* encontrados nas populações 2223 e 2225, respectivamente; C e D = presença de asas laterais atípicas em *M. paranaensis* nas populações 2225 e 2290, respectivamente; E e F = padrões perineais atípicos, com arco dorsal baixo, encontrado nas populações 2223 e 2224, respectivamente.



Fonte: o próprio autor.

**Tabela 3.3** - Porcentagem de padrões perineais típico e atípico das 11 populações de *Meloidogyne paranaensis*.

População	% Típico	% Atípico
9	75,00	25,00
13	90,90	9,09
2223	66,66	44,44
2224	40,00	60,00
2225	60,00	40,00
2226	30,77	69,23
2290	72,72	27,27
2291	69,23	30,77
98.1	50,00	50,00
1 BL	100,00	---
2 BK	61,54	38,46

**Fonte:** o próprio autor.

### 3.5.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

O fenótipo típico de  $\alpha$ -esterase P1 (Figura 3.2) foi encontrado em (63,63%) das 11 populações de *M. paranaensis* do presente estudo, com mobilidade relativa (Rm) (Tabela 3.4) variando de 1,24 (população 9, de São Jorge do Patrocínio) a 1,31 (populações 98.1 e 1 BL, provenientes de Apucarana e Londrina). Tais mobilidades relativas foram calculadas em função do padrão utilizado, *M. javanica*, cuja mobilidade relativa de seu fenótipo típico J3 foi de 1,0; 1,3 e 1,4.

A população 2 BK se destacou pois apresentou o perfil P2 (Rm: 1,02; 1,31) (Figura 3.2). Além disso, os isolados 2223 (Rm: 1,26; 1,28), 2290 (Rm:1,29; 1,31) e 2291 (1,27; 1,30), apresentaram fenótipo atípico ainda não descrito na literatura, aqui denominado P2A, de modo que foi observada isoforma mais espessa e uma discreta sombra ao término da isoforma (Figura 3.2).

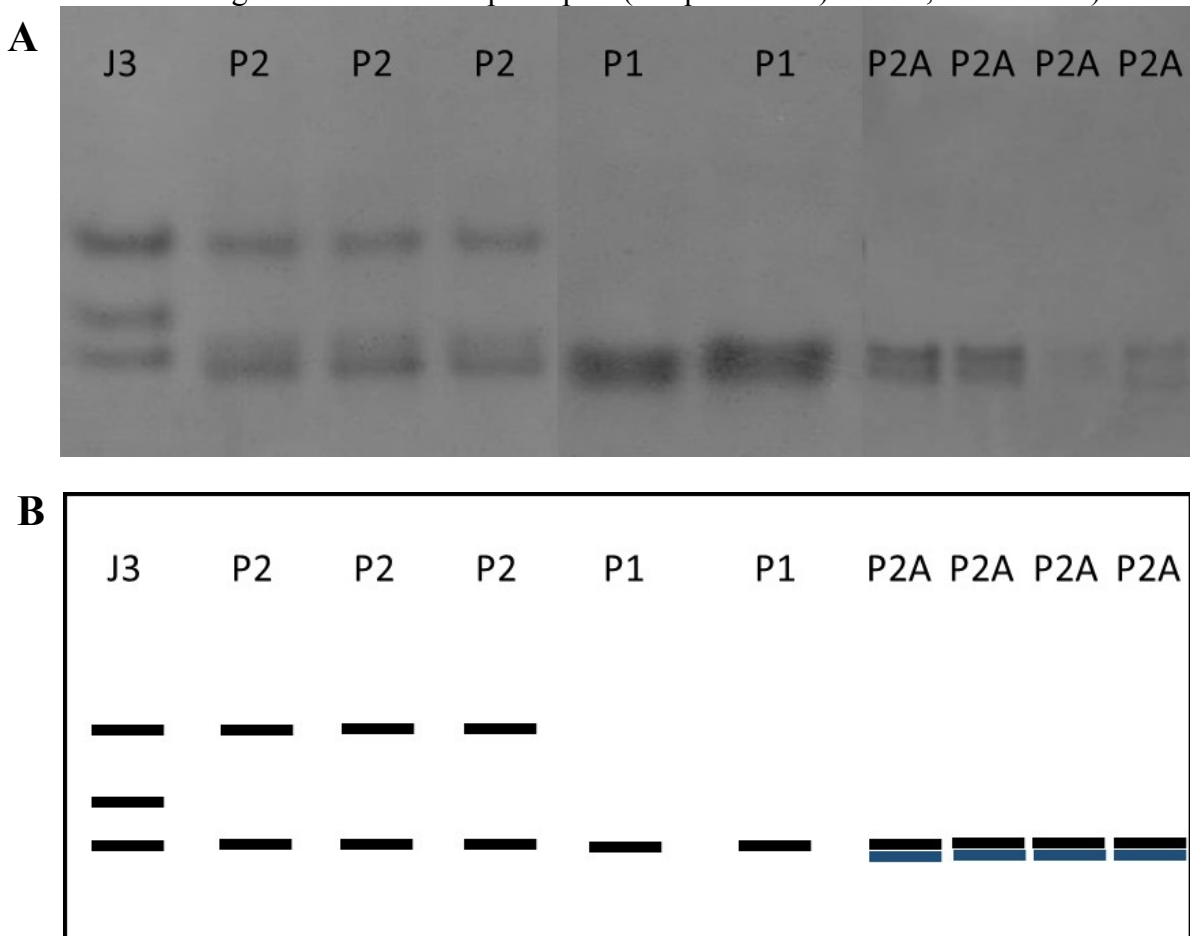
**Tabela 3.4** - Caracterização bioquímica de populações de *Meloidogyne paranaensis* a partir de seus perfis de  $\alpha$ -esterase e respectiva mobilidade relativa.

População	Municípios	Mobilidade relativa	Perfil de $\alpha$ -esterase
9	São Jorge do Patrocínio	1,25	<sup>1</sup> P1
13	Altônia	1,30	P1
2224	São Jorge do Patrocínio	1,30; 1,32	P2A
2225	São Jorge do Patrocínio	1,27; 1,29	P2A
2226	São Jorge do Patrocínio	1,25	P1
2290	Altônia	1,29; 1,31	<sup>3</sup> P2A
2291	Piumhi – MG	1,27; 1,30	P2A
2223	São Jorge do Patrocínio	1,26; 1,28	P2A
98.1	Apucarana	1,28	P1
1 BL	Londrina	1,31	P1
2 BK	Londrina	1,00; 1,33	<sup>2</sup> P2

<sup>1</sup>P1 = perfil típico de *M. paranaensis* (Carneiro et al., 1996; Carneiro et al., 2000; Rm: 1,40; Carneiro et al., 2004; Rm: 1,32); <sup>2</sup>P2 = perfil atípico de *M. paranaensis* (Carneiro et al., 2004; Rm: 0,9; 1,32); <sup>3</sup>P2A = perfil atípico não descrito de *M. paranaensis* encontrado no presente estudo.

Fonte: o próprio autor.

**Figura 3.2** - Fenótipos de  $\alpha$ -esterase observados em populações de *Meloidogyne paranaensis* em áreas cafeeiras. A: gel de poliacrilamida. B: Gel esquemático (listras pretas significam isoformas principais (sempre nítidas) e azuis, secundárias).



Fonte: o próprio autor.

### 3.4.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

Os resultados obtidos para fator de reprodução (FR) e número de nematoides por grama de raízes (nema/g) das diferentes populações de *M. paranaensis* estudadas em tomateiro cv. Santa Clara encontram-se resumidos na Tabela 3.5. Os elevados valores de FR e nema/g em tomate confirmaram a viabilidade dos inóculos utilizados, bem como as adequadas condições experimentais.

**Tabela 3.5** – Fator de reprodução (FR) e número de nematoides por grama de raízes (Nema/g) de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro cv. Santa Clara.

População	FR	Nema/g
9	98,90 a	7.989 cd
13	17,26 b	1.552 cd
2223	36,10 ab	3.514 bcd
2224	23,52 b	2.462 cd
2225	8,19 b	2.791 bcd
2226	37,09 ab	4.456 bc
2290	9,21 b	694 d
2291	23,86 b	3.738 bcd
98.1	28,23 b	7.716 abc
1BL	13,79 b	3.316 bcd
2BK	78,39 a	12.618 a
CV	49.79	49.01

Cada valor representa a média de quatro repetições. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de LSD a 5% de probabilidade.

**Fonte:** o próprio autor.

De acordo com os valores de fator de reprodução (FR) (Tabela 3.6 e Figura 3.3) e número de nematoides por grama de raízes (nema/g) (Tabela 3.7 e Figura 3.4) obtidos nos genótipos de café avaliados, pode-se observar grande variação fenotípica entre as populações de *M. paranaensis* estudadas.

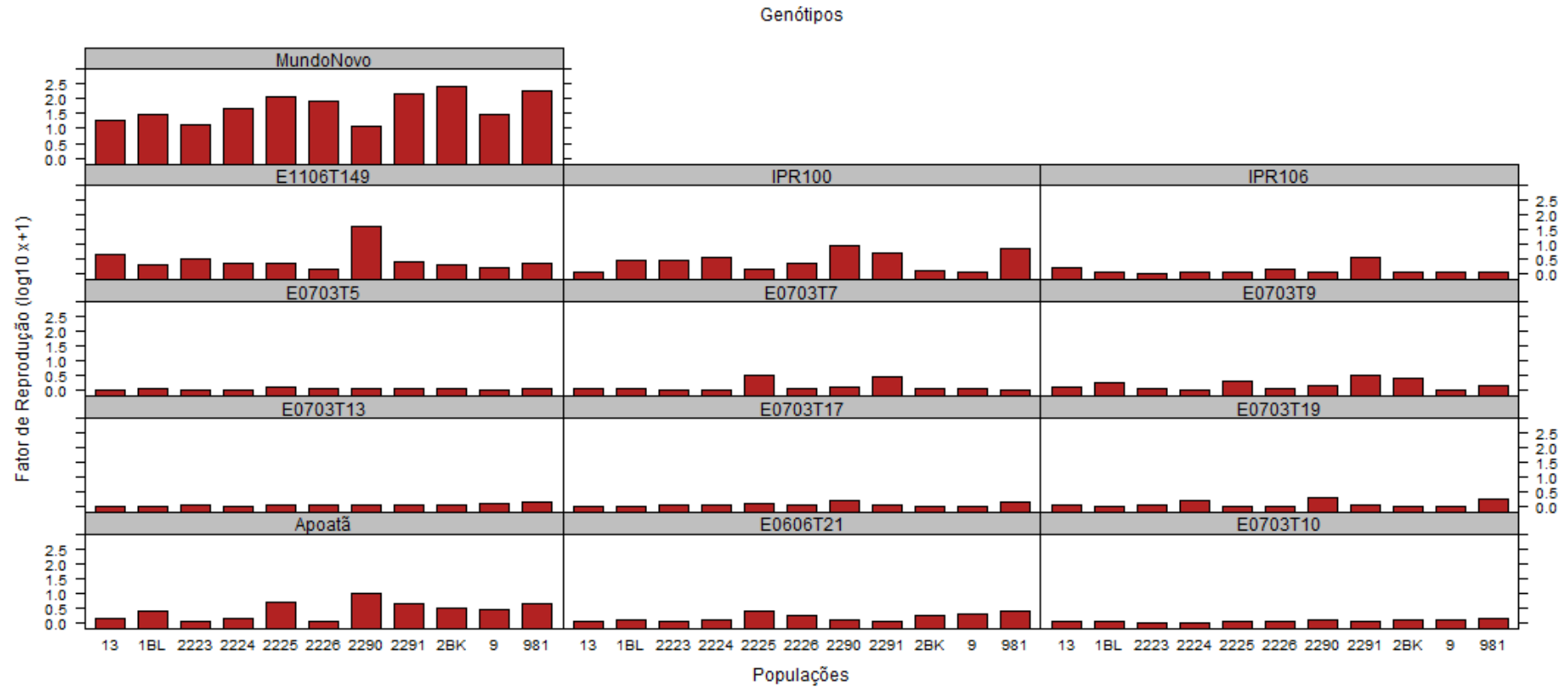
**Tabela 3.6** - Fator de reprodução das populações de *Meloidogyne paranaensis* em diferentes genótipos de café.

População	Mundo Novo	E1106T149	Apoatã	IPR 100	E0703T9	E0606T21	E0703T7	IPR 106	E0703T19	E0703T17	E0703T10	E0703T13	E0703T5	Média
2BK	252,40 A a	1,13 C b	3,31 B b	0,41 C c	1,78 A b	0,99 A b	0,13 B c	0,12 B c	0,01 B d	0,05 A d	0,34 A c	0,18 A c	0,20 A c	20,08
98.1	180,36 B a	1,48 C c	3,78 B b	6,43 A b	0,50 B d	1,87 A c	0,08 B d	0,25 B d	1,32 A d	0,42 A d	0,43 A d	0,40 A d	0,12 A d	15,19
2291	145,40 C a	2,35 C c	3,52 B b	6,44 A b	3,66 A c	0,14 B d	2,48 A c	3,08 A b	0,20 A d	0,10 A d	0,15 A d	0,22 A d	0,18 A d	12,92
2225	122,07 C a	1,31 C c	9,65 A b	0,47 C d	1,40 A c	2,21 A c	2,57 A c	0,21 B d	0,08 B d	0,40 A d	0,16 A d	0,17 A d	0,30 A d	10,85
2226	85,59 D a	0,50 C b	0,15 C c	1,80 B b	0,16 C c	0,89 A b	0,17 B c	0,69 B b	0,02 B c	0,12 A c	0,19 A c	0,12 A c	0,11 A c	6,96
2290	11,65 G b	41,04 A a	9,45 A b	8,11 A b	0,44 B c	0,24 B c	0,33 B c	0,18 B c	1,38 A c	1,10 A c	0,26 A c	0,20 A c	0,19 A c	5,73
2224	48,88 E a	2,36 C b	0,40 C c	2,55 B b	0,02 D c	0,31 B c	0,10 B c	0,14 B c	0,72 A c	0,17 A c	0,07 A c	0,05 A c	0,08 A c	4,30
9	44,28 F a	1,51 C b	2,14 B b	0,13 C c	0,05 D d	1,16 A b	0,13 B c	0,15 B c	0,05 B d	0,40 A d	0,22 A c	0,30 A c	0,06 A d	3,86
1BL	29,37 F a	2,23 C b	1,64 B b	2,05 B b	0,84 B b	0,27 B c	0,15 B c	0,16 B c	0,06 B c	0,09 A c	0,12 A c	0,00 B d	0,14 A c	2,86
13	18,13 G a	4,32 B b	0,55 C c	0,21 C c	0,27 C c	0,15 B c	0,17 B c	0,66 B c	0,14 B c	0,07 A c	0,08 A c	0,07 A c	0,06 A c	1,91
2223	13,23 G a	2,25 B b	0,10 C c	2,36 B b	0,14 C c	0,13 B c	0,08 B c	0,08 B c	0,15 A c	0,14 A c	0,06 A c	0,11 A c	0,04 A c	1,45
<b>Média</b>	86,49	5,50	2,81	0,84	0,76	0,58	0,52	0,52	0,38	0,28	0,19	0,17	0,13	

Valores representam a média de cinco repetições. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade. Dados transformados para  $\log(x + 1)$ .

**Fonte:** o próprio autor.

**Figura 3.3** - Resumo geral dos resultados encontrados para fator de reprodução na interação entre 11 populações de *Meloidogyne paranaensis* e 13 genótipos de café.



Fonte: o próprio autor.

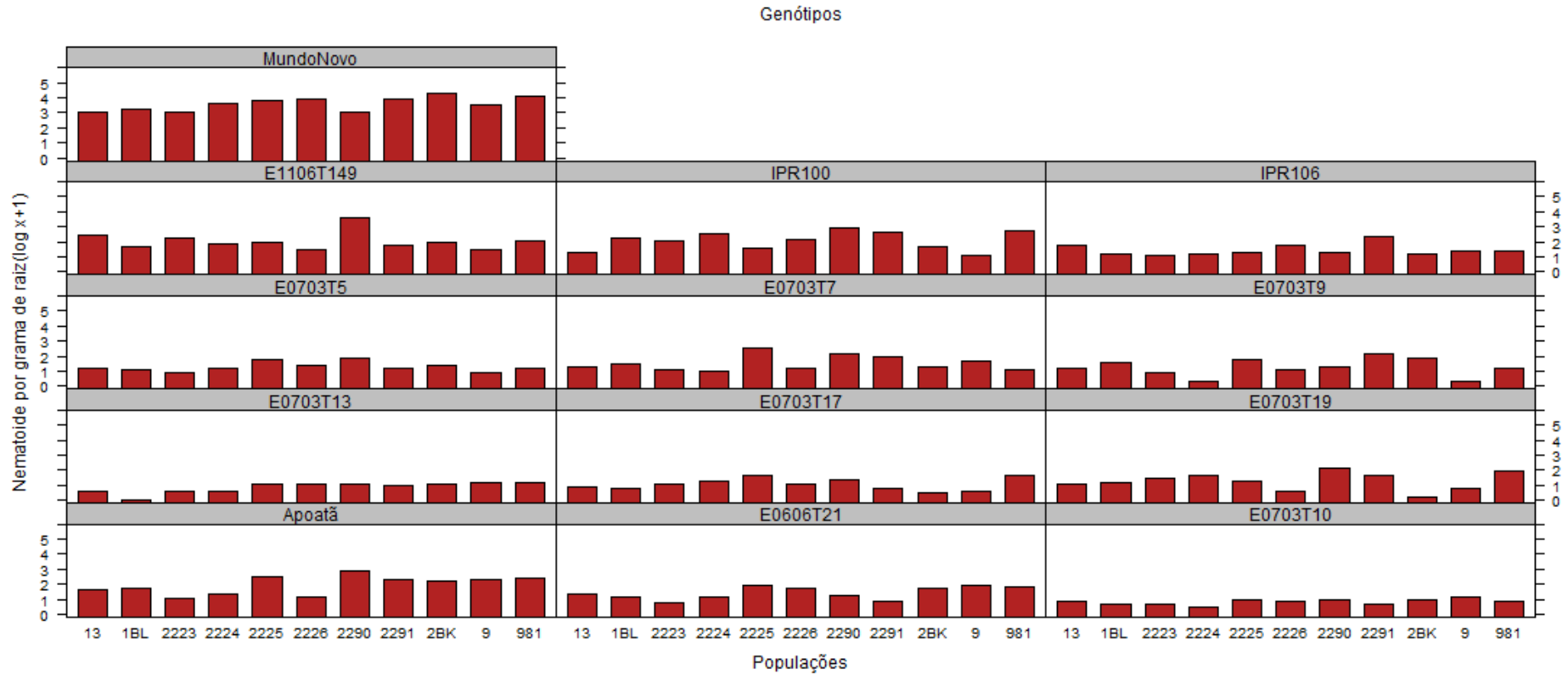
**Tabela 3.7** - Número de nematoides por grama de raízes das populações de *Meloidogyne paranaensis* em diferentes genótipos de café. Valores representam a média de cinco repetições. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste

População	Mundo Novo	E1106T149	Apoatã	IPR 100	E0703T9	E0606T21	E0703T7	IPR 106	E0703T19	E0703T17	E0703T10	E0703T13	E0703T5	Média
2BK	18966 A a	128 B b	320 A b	56 C b	105 A b	66 A b	20 B c	15 C c	2 D d	4 B d	10 A d	15 A c	26 B c	1518
98.1	12380 A a	147 B c	305 A b	576 A b	22 B d	106 A c	19 B d	25 C d	106 A c	46 A c	11 A d	16 A d	21 B d	1060
2291	7908 A a	260 C c	204 A b	667 A b	245 A c	7 B e	188 A c	386 A b	66 B d	10 B e	4 A e	10 A e	19 B d	767
2225	7005 A a	86 B c	660 A b	44 C d	87 A c	131 A c	465 A b	34 C d	33 C d	60 A c	9 A d	12 A d	86 A c	726
2226	8224 A a	43 C c	16 C d	207 B b	12 B d	90 A c	18 B d	73 B c	10 D e	10 B d	6 A e	14 A d	23 B d	673
2290	1342 B b	4849 A a	868 A b	943 A b	19 B d	20 B d	187 A c	22 C d	223 A c	145 A d	10 A d	11 A d	82 A c	671
2224	4331 A a	141 B c	65 C d	379 A b	1 D e	16 B d	10 B d	20 C d	70 B c	23 A d	3 A e	3 B e	16 B d	390
9	3652 B a	146 C c	238 A b	12 C d	2 D e	102 A c	60 B c	33 C c	18 C e	4 B e	15 A d	13 A d	11 B d	331
1BL	1707 B a	102 C c	67 B c	193 B b	41 A c	102 B d	44 B c	15 C d	14 C d	6 B e	6 A e	0 C f	13 B d	177
13	1248 B a	348 B b	47 B c	29 C c	20 B c	27 B c	20 B c	75 B c	16 C d	13 B d	8 A d	4 B d	19 B c	144
2223	1218 B a	225 B b	12 C c	145 B b	8 C d	5 B d	13 B d	13 C c	30 B c	17 B c	5 A d	4 B d	9 B d	131
<b>Média</b>	6180	588	255	295	51	61	95	64	53	31	8	9	29	

de Scott-knott a 5% de probabilidade. Dados transformados para  $\log(x + 1)$ .

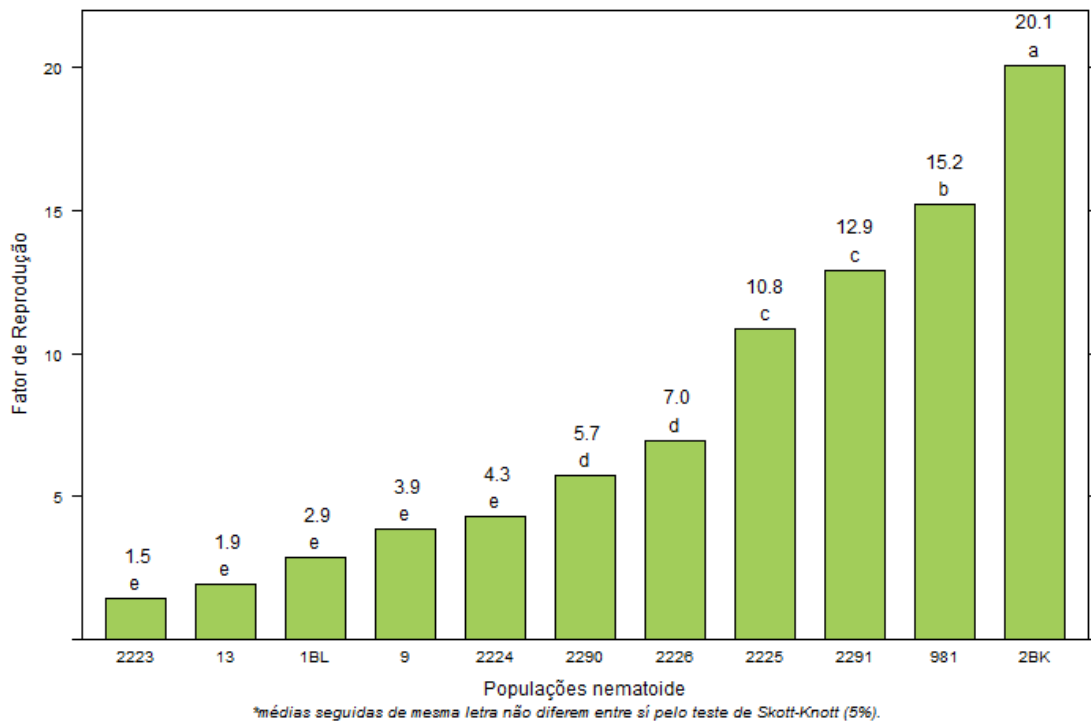
**Fonte:** o próprio autor.

**Figura 3.4** - Resumo geral dos resultados encontrados para número de nematoides por grama de raízes na interação entre 11 populações de *Meloidogyne paranaensis* e 13 genótipos de café.



Analisando-se apenas a variável FR (Figura 3.5) das populações de *M. paranaensis*, independente do genótipo de café em que foi inoculada, observa-se que existem diferenças em agressividade, aqui utilizada como maior ou menor capacidade reprodutiva nos genótipos, com a formação de cinco grupos distintos: i) população 2BK, com o maior valor de FR (20,1); ii) 98.1, com FR = 15,2; iii) populações 2291 e 2225 (FRs = 12,9 e 10,8, respectivamente); iv) populações 2226 e 2290, com FRs = 7,0 e 5,7); e iv) populações 2224, 9, 1BL, 13 e 2223, com FRs variando de 4,3 a 1,5).

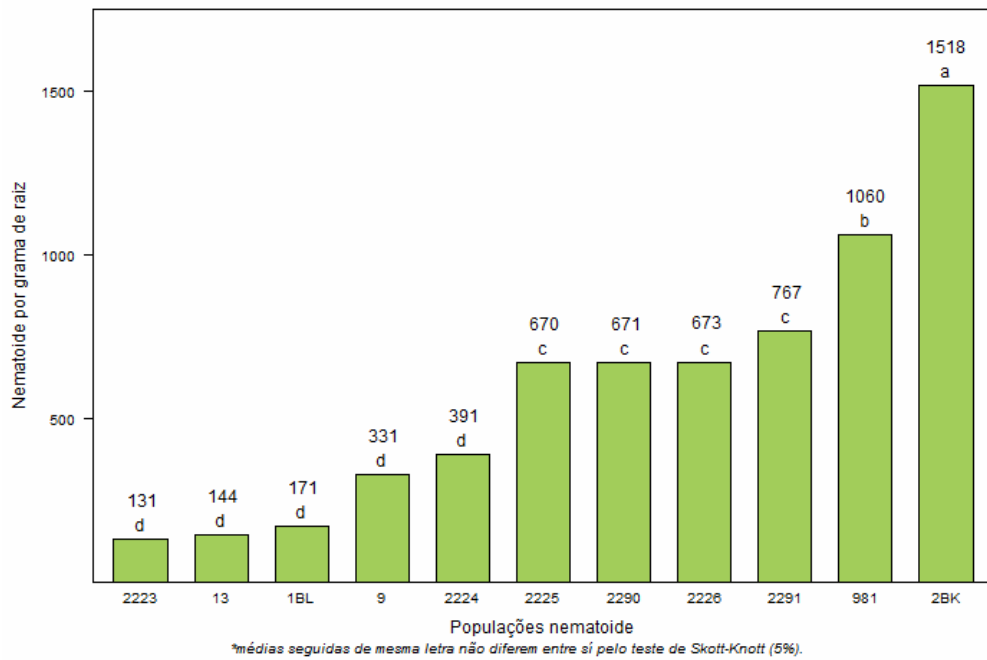
**Figura 3.5** - Análise do fator de reprodução para o fator população de *Meloidogyne paranaensis* em relação aos 13 genótipos de café.



**Fonte:** o próprio autor.

De maneira geral, os valores obtidos para nema/g corroboram os resultados obtidos em relação ao FR das populações, independente do genótipo de café (Figura 3.6). Nesse caso, houve a formação de quatro grupos distintos, mas a classificação geral das populações alterou-se pouco, mostrando boa correlação entre as duas variáveis. Os grupos foram compostos por: i) 2BK, com o maior valor de nema/g (1.518); ii) 98.1, com nema/g = 1060; iii) populações 2291, 2226, 2290 e 2225 (nema/g = 767, 673, 671 e 670, respectivamente); iv) populações 2224, 9, 1BL, 13 e 2223, com nema/g variando de 391 a 131.

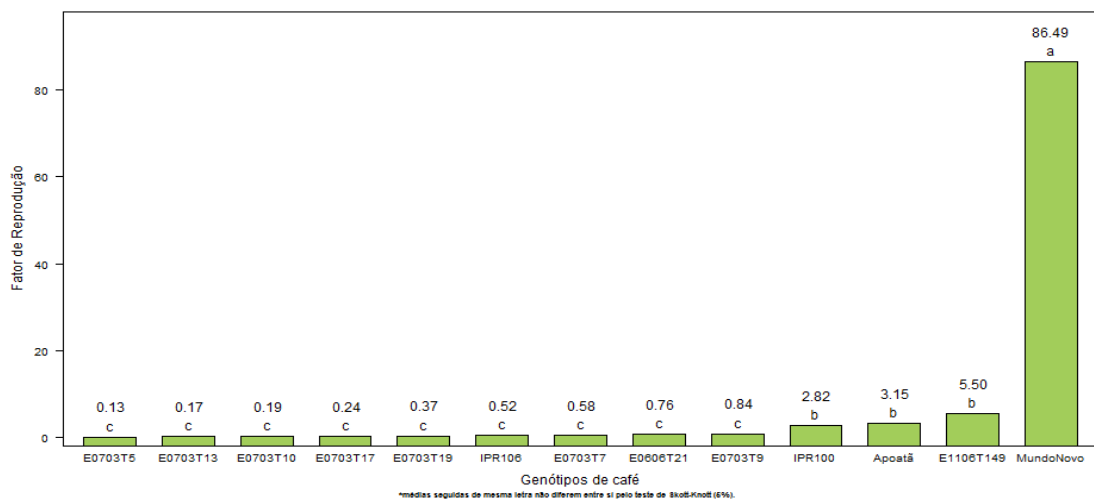
**Figura 3.6** - Análise do número de nematoides por grama de raízes para o fator população de *Meloidogyne paranaensis* em relação aos 13 genótipos de café.



**Fonte:** o próprio autor

Por outro lado, quando se observa a reação dos genótipos de café às diferentes populações de *M. paranaensis*, com base na variável FR (Figura 3.7), nota-se a formação de apenas três grupos distintos: i) Mundo Novo, utilizado como padrão de suscetibilidade e com os maiores valores de FR (86,49); ii) genótipos E 1106T149, Apatã IAC 2258 e IPR 100, com FRs = 5,50, 3,15 e 2,82, respectivamente; iii) os demais genótipos, com FRs variando de 0,84 a 0,13.

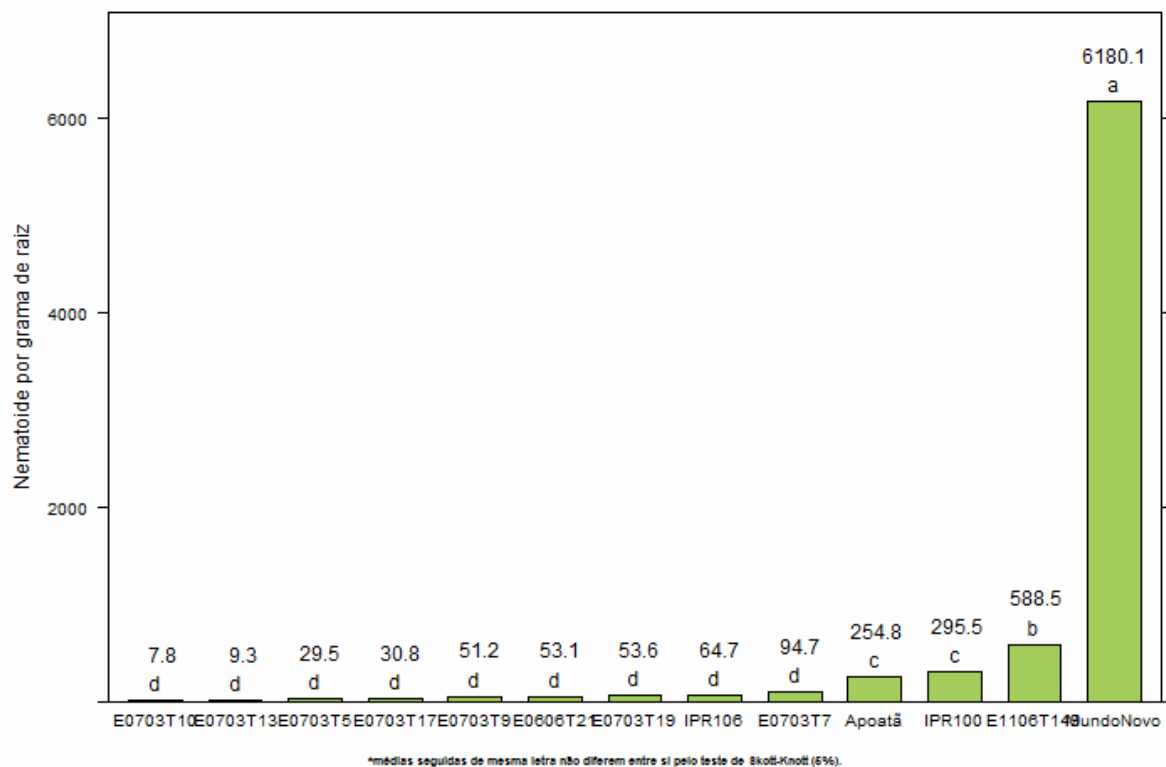
**Figura 3.7** - Análise do fator de reprodução para o fator genótipos de café em relação ao fator população de *Meloidogyne paranaensis*.



**Fonte:** o próprio autor

Ainda analisando a reação dos genótipos de café, agora com base em nema/g (Gráfico 3.6), também há correlação com os resultados obtidos para FR, com a formação de quatro grupos distintos: i) Mundo Novo, com os maiores valores de nema/g (6.180); ii) genótipo E1106T149 (nema/g = 588); iii) genótipos IPR 100 e Apatã IAC 2258, com nema/g = 295 e 255, respectivamente; iv) demais genótipos, com nema/g variando de 95 a 8.

**Figura 3.8** - Análise do número de nematoides por grama de raízes para o fator genótipos de café em relação ao fator população de *Meloidogyne paranaensis*.

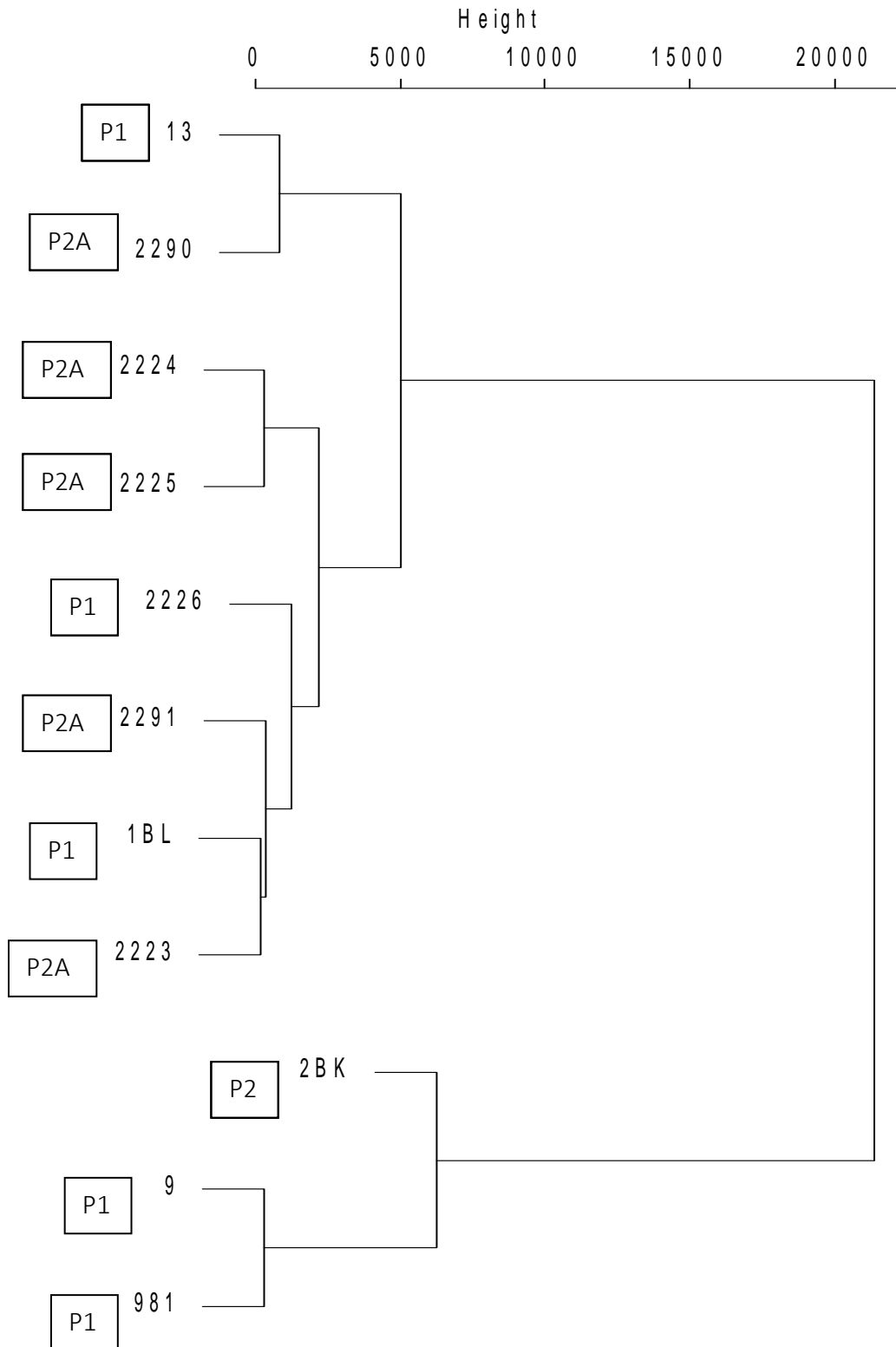


**Fonte:** o próprio autor.

O dendrograma obtido a partir do agrupamento baseado na análise de componentes principais através do método de Ward, utilizando a distância Euclidiana e as variáveis FR e nema/g das populações de *M. paranaensis* em tomateiro (Figura 3.9) ou em genótipos de café (Figura 3.10) mostrou comportamentos distintos das populações em relação à sua multiplicação nos hospedeiros utilizados.

Comparando-se o comportamento das populações de *M. paranaensis* em relação ao tomateiro (Figura 3.9), observou-se a formação de três grupos distintos, a saber: 1) populações 2BK, 9 e 98.1, com os maiores valores de FR e nema/g; 2) populações 13 e 2290, com os menores valores de FR e nema/g; 3) demais populações, com FR e nema/g intermediários.

**Figura 3.9** – Dendrograma obtido a partir dos dados de fator de reprodução e número de nematoides por grama de raízes de diferentes populações de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro cv. Santa Clara.

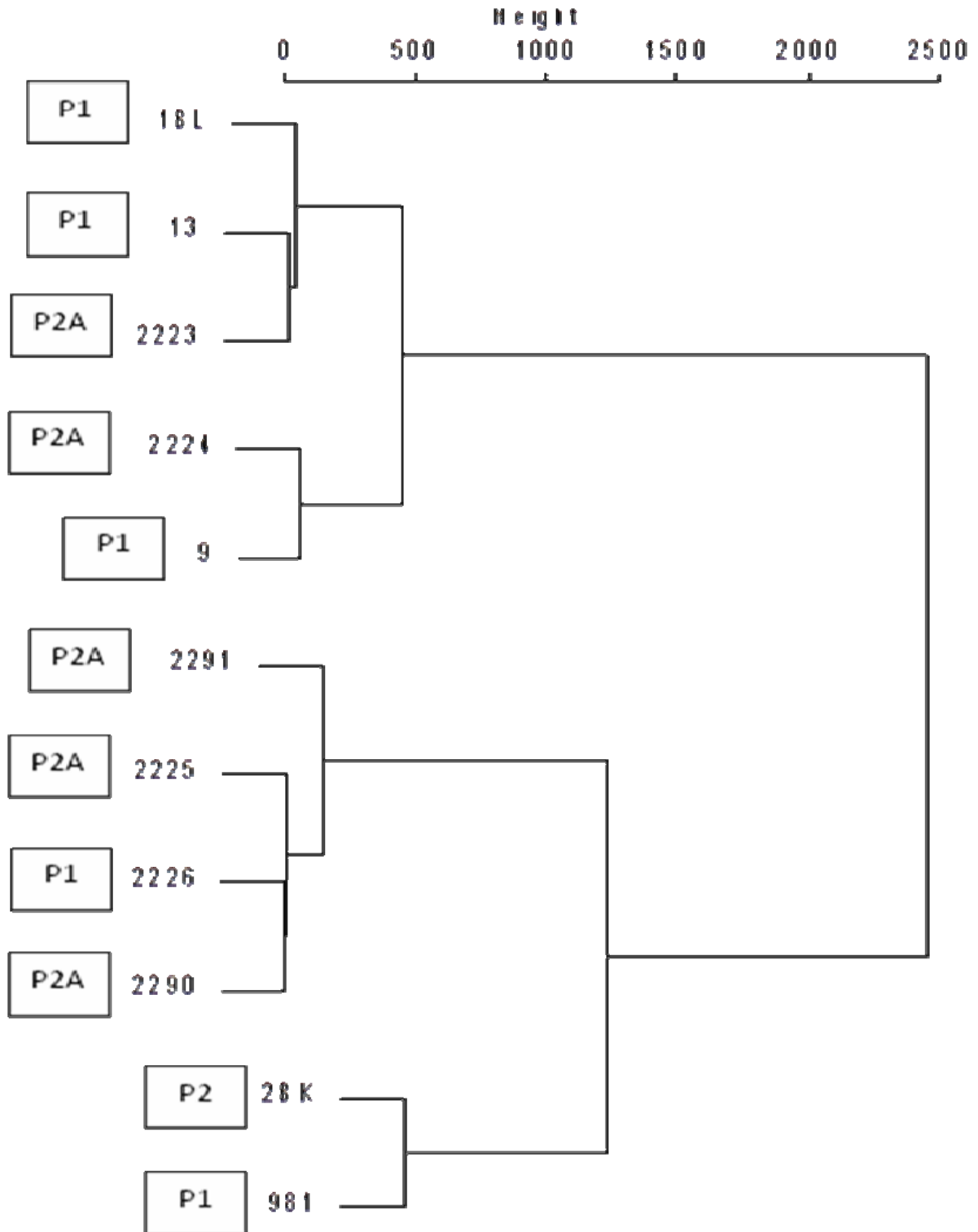


**Fonte:** o próprio autor.

Em relação ao comportamento das populações de *M. paranaensis* nos diferentes genótipos de café utilizados (Figura 3.10), três grupos também foram formados, porém com algumas diferenças daqueles obtidos quando o hospedeiro era o tomateiro. Os grupos constituíram-se de: 1) populações 2 BK e 98.1, com os maiores valores de FR e nema/g, independente do genótipo de café; 2) populações 1BL, 13, 2223, 2224 e 9, com os menores valores de FR e nema/g; 3) demais populações, com valores intermediários de FR e nema/g.

Vale destacar que as populações 2 BK e 98.1 constituíram o grupo de maior valor de FR e nema/g em ambos os hospedeiros considerados, tomateiro e café, enquanto que a população 13 constituiu o grupo de menor valor de FR e nema/g, tanto em tomate quanto em café.

**Figura 3.10** – Dendrograma obtido a partir dos dados de fator de reprodução e número de nematoides por grama de raízes de diferentes populações de *Meloidogyne paranaensis* em genótipos de *Coffea arabica* e *C. canephora*.



**Fonte:** o próprio autor.

### 3.6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram identificadas populações morfologicamente atípicas e variáveis, entretanto, foram encontrados também indivíduos com características típicas da espécie. Conforme descrito por Carneiro et al. (1996), o padrão perineal de *M. paranaensis* é variável, com formato retangular a oval, arco dorsal geralmente alto e quadrado, apresentando estrias dorsais variando de finas a grossas e suaves a onduladas; as linhas laterais geralmente são descontínuas, sem incisuras distintas, às vezes aparecendo como uma depressão linear descontínua levemente marcadas por quebras e bifurcações.

Apesar da maioria dos isolados de *M. paranaensis* ora estudados apresentar tais padrões perineais típicos, variabilidade intraespecífica devido à ocorrência de indivíduos atípicos, também, foi observada em diferentes indivíduos da mesma população. Alguns indivíduos das populações avaliadas apresentaram semelhança com o padrão perineal de *M. incognita*, *M. hapla* ou *M. arenaria*. Por exemplo, indivíduos das populações 2224, 2225, 2290 e 2291 apresentaram asa lateral proeminente, característica de *M. hapla* e, nas populações 2223, 2224, 2225, 2290, 2291 e 2 BK, foram observados exemplares com “ombros”, característicos de *M. arenaria*, assim como a presença de asa lateral, característica de *M. hapla* (EISENBACK, 1985). Existem relatos de variações intraespecíficas em *Meloidogyne* spp. (ARAÚJO FILHO et al., 2016), entretanto, populações de *M. exigua* originadas de cafeeiros apresentaram baixa variabilidade (LIMA; FERRAZ, 1985), o que parece não ser observado em populações também de cafeeiros de *M. paranaensis*, de acordo com os presentes resultados.

As configurações perineais apresentaram grande variabilidade na sua morfologia, podendo ser encontrados padrões típicos, intermediários e atípicos (CLIFF; HIRSCHMANN, 1985). Entretanto, na caracterização morfológica de *Meloidogyne* spp., o padrão perineal ainda é uma das características mais utilizadas para identificação de espécies. Devido às variações existentes e ao grande número de espécies descritas dentro do gênero, torna-se difícil a diferenciação entre as espécies utilizando-se apenas da caracterização através de padrões perineais (EISENBACK; HUNT, 2009).

Oliveira et al. (2005) analisaram populações de *M. exigua* provenientes de Minas Gerais, e, de acordo com os padrões perineais, 91% dos isolados foram identificados como *M. exigua* típicos. Entretanto, a população do município de São João do Manhuaçu apresentou configuração similar à de *M. arenaria*, sendo considerada atípica, a espécie foi

confirmada por meio da caracterização bioquímica (E1 e E2). Caso fosse utilizada somente a caracterização através de padrões perineais, a população atípica citada seria equivocadamente identificada como *M. arenaria* (OLIVEIRA et al., 2005).

Muitas espécies de *Meloidogyne* foram descritas baseando-se somente em pequenas variações morfológicas, incluindo os padrões perineais. O próprio *M. paranaensis*, pela sua caracterização morfológica inicial, isoladamente, foi identificado como *M. incognita* raça 5 ou biótipo IAPAR (CARNEIRO, 1993). Posteriormente, através da caracterização isoenzimática, *M. paranaensis* foi finalmente descrita como nova espécie, com características diferenciadas de *M. incognita* (CARNEIRO et al., 1996). Similaridades na configuração da região perineal são encontradas ainda nas espécies *M. paranaensis*, *M. izalcoensis* Carneiro, Almeida, Gomes e Hernandez, *M. enterolobii* Yang e Eisenback (sinonímia de *M. mayaguensis* Rammah e Hirschmann) e *M. incognita* (CARNEIRO; COFCEWICZ, 2008). Várias espécies que foram identificadas equivocadamente, posteriormente entraram em sinonímia, como *M. acrita*, *M. elegans* e *M. inornata* (considerados *M. incognita*), *M. bauruenis* e *M. lordelloi* (sinonímia de *M. arenaria*) (EISENBACK; TRIANTAPHYLLOU, 1991).

Diferenças morfométricas entre populações da mesma espécie ou entre indivíduos dentro de uma mesma população também têm sido relatadas em outros gêneros, como *Pratylenchus* spp. (SIQUEIRA; INOMOTO, 2008; MACHADO et al., 2015). As variações intraespecíficas podem ser reflexo de variações naturais resultantes da adaptação ambiental e manutenção da heterogeneidade dos indivíduos, permitindo a sobrevivência da espécie (OLOWE; CORBETT, 1984a; b). Populações oriundas de diferentes plantas hospedeiras e cultivares de uma mesma espécie vegetal também podem apresentar diferenças significativas nas características morfométricas de valor taxonômico (FORTUNER; QUÉNÉHERVÉ, 1980). Ainda, para algumas espécies, mudanças ocorridas durante o desenvolvimento do nematoide podem causar variações nos caracteres morfológicos (TARTÉ; MAI, 1976).

Torres et al. (2004) observaram variações morfológicas entre populações de *P. brachyurus* e relataram que essa variação ocorreu tanto devido à diversidade existente dentro da população ou da espécie, quanto à procedência, ou seja, a área geográfica ou a planta hospedeira da qual se originaram. Ainda, segundo Doucet et al. (2001), a temperatura pode influenciar diretamente nas mensurações em um mesmo isolado de *P. vulnus*.

Para a identificação de espécies a utilização da morfologia é importante, entretanto, é necessário conhecer a amplitude de variação existente em um caráter morfológico específico (EISENBACK; HUNT, 2009). Devido à existência de similaridade

em padrões morfológicos (perineais) entre as espécies de *Meloidogyne*, é apropriada a utilização de metodologias complementares para a diagnose confiável, como as caracterizações bioquímica (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001) e molecular (OLIVEIRA; MONTEIRO; BLOK, 2011). No presente estudo foram empregadas a caracterização morfológica, bioquímica e fenotípica para a correta e confiável identificação das variações intraespecíficas das populações de *M. paranaensis* oriundas de cafeeiros.

Na caracterização bioquímica, através da análise dos perfis de  $\alpha$ -esterase das populações de *M. paranaensis* ora estudadas, variações entre populações também foram observadas. O perfil de  $\alpha$ -esterase P1 foi encontrado em cinco populações analisadas, com mobilidades relativas correspondentes às descritas por Carneiro et al. (1996), quando da descrição da espécie. Entretanto, o perfil P2 foi observado na população 2 BK, proveniente do município de Londrina, anteriormente descrito por Carneiro et al. (2004) em populações de *M. paranaensis* provenientes da Guatemala.

Além disso, as populações 2223, 2224, 2225 (proveniente de São Jorge do Patrocínio), 2290 (proveniente de Altônia) e 2291 (proveniente de Piumhi-MG) apresentaram perfil de  $\alpha$ -esterase atípico inédito, ainda não descrito na literatura, ora denominado P2A, por exibir duas isoformas, uma primária e outra secundária, diferentes do perfil P2 descrito por Carneiro et al. (2004).

Carneiro et al. (2004) realizaram a caracterização da diversidade genética de populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de cafezais de algumas regiões do Brasil, América Central e EUA, baseando-se nos fenótipos de  $\alpha$ -esterase, morfologia e polimorfismo molecular. Os autores concluíram que os fenótipos de  $\alpha$ -esterase foram específicos para identificar as espécies de *Meloidogyne* provenientes do cafeeiro e que *M. paranaensis* apresentou ambos os perfis descritos (P1 e P2).

Villain et al. (2013) também utilizaram fenótipos de  $\alpha$ -esterase para identificação de espécies de *Meloidogyne* parasitando cafeeiros em regiões da América Central e relataram que *M. paranaensis* é o principal fitonematoide parasitando cafeeiro no sudoeste da Guatemala. Foram observados os fenótipos P1 e P2, sendo que P2 aparentemente é o mais disseminado entre as populações estudadas daquele país. Ainda na Guatemala, a distribuição de populações com fenótipo P1 parece estar limitada a algumas áreas cafeeiras, segundo Carneiro et al. (2004). Inversamente, no Brasil o fenótipo P1 é o predominante e está presente em grande parte das amostras das diferentes regiões cafeeiras (CARNEIRO et al., 2004; CARNEIRO et al., 2005; CARNEIRO; COFCEWICZ, 2008; MATUNAGA et al. 2016).

Na espécie *M. exigua*, é possível encontrar quatro fenótipos: E1 (CARNEIRO et al., 2000), E1a, E1b (CARNEIRO et al., 2000) e E2 (OLIVEIRA et al., 2005). Além disso, Muniz et al. (2008) identificaram uma população de *M. exigua* com fenótipo E3, não observado em cafeeiro. Os padrões perineais dessa população atípica foram semelhantes ao de *M. exigua* originados de café. Oliveira et al. (2005) utilizaram o fenótipo de esterase para caracterizar 57 populações de *Meloidogyne* spp. coletadas na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. Treze populações (22,8%) apresentaram padrão típico de uma isoforma (E1), enquanto que 77,2% apresentaram uma isoforma adicional (E2). No entanto, variabilidade intraespecífica não foi observada em nenhuma das 57 populações estudadas.

A variabilidade intraespecífica em nível enzimático geralmente é considerada baixa no gênero *Meloidogyne*, pois as enzimas são produzidas através de expressão de genes altamente conservados e representam uma fração pequena do genoma (MCLAIN et al., 1987). Entretanto, no presente estudo, as populações de *M. paranaensis* apresentaram variabilidade intraespecífica em seus perfis de  $\alpha$ -esterase. Para *M. enterolobii*, Brito et al. (2004) observaram elevada variabilidade intraespecífica baseada na caracterização bioquímica pela isoenzima de  $\alpha$ -esterase.

Com base nos resultados obtidos nas caracterizações morfológica e bioquímica, pode-se concluir que as populações de *M. paranaensis* estudadas apresentaram plasticidade fenotípica, visualizada tanto pelos padrões perineais, com ausência de características típicas em alguns indivíduos, quanto pelos fenótipos atípicos de  $\alpha$ -esterase. Plasticidade é definida pela capacidade de organismos responderem a diferentes estímulos ambientais de maneira distinta (SCHLICHTING, 1986). A plasticidade fenotípica é influenciada por fatores ambientais, tais como temperatura, condições hídricas e de nutrição do solo, podendo causar alterações em nível celular, fisiológico e morfológico em espécies. A plasticidade fenotípica, portanto, representa a capacidade de determinado genótipo, ou população, produzir diferentes fenótipos em resposta ao ambiente (SCHLICHTING, 1986).

Em relação à caracterização fenotípica das populações de *M. paranaensis* estudadas, observou-se a presença de níveis diferentes tanto de agressividade quanto de virulência das mesmas nos genótipos de café e na cultivar de tomate. Agressividade, segundo Vanderplank (1963, 1968), seria a quantidade de doença induzida por um patógeno em um hospedeiro suscetível. Nesse caso, com base apenas no genótipo Mundo Novo IAC 376-4, que não apresenta genes de resistência a esse nematoide, ou seja, que representaria o hospedeiro suscetível, a agressividade das populações, aqui considerada como a maior ou

menor capacidade de multiplicação do nematoide no hospedeiro, pôde ser observada, uma vez que os FRs variaram de 11,65 (2290) a 252,40 (2BK).

Variabilidade na agressividade de populações de outras espécies de fitonematoides foi relatada por Siqueira e Inomoto (2008), que avaliaram a reação de sete cultivares de feijão caupi inoculadas com três populações de *Pratylenchus brachyurus* e observaram resposta das cultivares de acordo com a origem do nematoide. A população originada do Estado do Mato Grosso foi mais agressiva que as populações oriundas dos Estados da Bahia e do Rio de Janeiro. Em contrapartida, a população da Bahia, comparativamente, foi mais agressiva que a população do Rio de Janeiro. De acordo com os resultados desse estudo, os autores confirmaram a existência de variação na agressividade entre diferentes populações de *P. brachyurus*.

Tais diferenças na capacidade reprodutiva em hospedeiros portadores ou não de diferentes genes de resistência têm sido observadas em muitas interações entre *Meloidogyne* spp. e diferentes espécies de plantas (ROBERTS, 1995; CASTAGNONE-SERENO, 2006). No caso do parasitismo em plantas resistentes, a virulência, aqui considerada como a capacidade do nematoide em se reproduzir em plantas portadoras de genes de resistência (WILLIAMSON; ROBERTS, 2009), é a característica que melhor explica a interação nematoide-planta.

Algumas populações ora estudadas se destacaram pela virulência em genótipos de *C. arabica* ou *C. canephora* com genes de resistência, como a população 2291, proveniente de Piumhi-MG, que conseguiu se multiplicar nos genótipos portadores de genes de resistência E1106T149 (FR = 2,35), Apatã (FR = 3,52), IPR 100 (FR = 6,44), E0703T9 (FR = 3,66), E0703T17 (FR = 2,48) e IPR 106 (FR = 3,08). Ainda, a população 2291 foi a única que apresentou a capacidade de se reproduzir na cultivar IPR 106 (derivada de Icatu, possuindo genes de resistência a *M. paranaensis* proveniente de *C. canephora*). Fonseca et al. (2008) relataram que a cultivar Apatã IAC 2258, selecionada de *C. canephora* cv. Robusta, apresenta resistência às raças 1, 2 e 3 de *M. incognita*, *M. paranaensis* e *M. exigua*. Entretanto, no presente estudo, a cultivar Apatã IAC 2258 foi suscetível para sete populações avaliadas.

O resultado obtido para a população 2291 reveste-se de grande importância, uma vez que, apesar do principal nematoide presente nas lavouras de café no Estado de Minas Gerais ser *M. exigua* (GONÇALVES et al., 2004), é crescente a disseminação de *M. paranaensis* nos municípios desse Estado (CASTRO; NAVES; CAMPOS, 2003; CASTRO et al., 2008; SALGADO et al., 2015), possivelmente *M. paranaensis* causará danos

significativos na cafeicultura nesse Estado e, conseqüentemente, na economia do país. Inclusive, Castro et al. (2008) identificaram *M. paranaensis* no município de Piumhi, cuja população ora estudada foi uma das mais virulentas em diferentes genótipos de café.

Além da população 2291, outra que merece destaque é a população 2290, que apresentou a capacidade de se multiplicar em E0703T17 (FR = 1,10), E0703T19 (FR = 1,38), IPR 100 (FR = 8,11), Apatã (FR = 9,45) e E1106T149 (FR = 41,04), todos portadores de diferentes genes de resistência ao nematoide. Além disso, em Mundo Novo, sem genes de resistência, o FR da população 2290 foi de 11,65, comparativamente às demais populações, o menor valor. Essa situação representa claramente o que é chamado na literatura de custo adaptativo ou *fitness* da virulência. Vanderplank (1968) sugeriu que uma mutação ocorrida no patógeno que confere virulência em genótipos portadores de genes de resistência geralmente estaria associada com uma penalidade, o chamado *fitness*, quando na presença do hospedeiro sem genes de resistência.

O *fitness* da virulência, ou do parasitismo, é quantificável e pode ser medido em termos absolutos ou relativos. Para patógenos de plantas, alguns parâmetros podem ser utilizados, como a taxa reprodutiva (LEACH et al., 2001). Vanderplank (1968) sugeriu que a mutação para virulência apenas ocorreria se necessária para lograr genes de resistência, ou seja, se constituísse a única maneira da população sobreviver ou persistir naquela condição.

De acordo com Williamson e Roberts (2009), a “aquisição” da virulência por determinada população do nematoide pode ser conferida pela perda ou modificação do produto gerado pelo gene de parasitismo, que é reconhecido pelo gene de resistência da planta, ou por um ganho na habilidade de lograr a resistência da planta. Nesse último caso, a produção de antioxidantes ou a alteração do balanço hormonal para comprometer a resposta de defesa da planta parecem ser os mecanismos mais comuns envolvidos.

Outras populações, incluindo 98.1, 2226, 2224, 1 BL e 2223, conseguiram se multiplicar em IPR 100 (que possui genes de resistência derivados de *C. liberica*), apresentando FRs variando de 1,80 (2226) a 6,43 (98.1), indicando, mais uma vez, variação intraespecífica na virulência dessas populações no parasitismo de uma cultivar com genes de resistência.

A população 2BK, apesar de multiplicar-se em E1106T149 (FR = 1,13), Apatã (FR = 3,31) e E0703T9 (FR = 1,78), foi a que apresentou o maior valor de FR em Mundo Novo (FR = 252,40), o que a caracterizaria como a mais agressiva no genótipo sem genes de resistência e com algum nível de virulência, uma vez que conseguiu multiplicar-se, mesmo que em baixos níveis, em genótipos portadores de genes de resistência. Inclusive, nas

análises de agrupamento realizadas, a população 2BK sempre se apresentou entre aquelas com maior valor de FR e nema/g devido à sua intensa multiplicação em Mundo Novo, o que “inflacionou” os valores dessas variáveis.

Em outras interações envolvendo cafeeiros também já foram observadas populações virulentas capazes de lograr genes de resistência. Por exemplo, o gene *Mex-1* de cafeeiro, herdado de *C. canephora*, confere resistência a *M. exigua* (NOIR et al., 2003), e, segundo Muniz et al. (2009), a resistência desse gene poderia ser superada por populações virulentas de *M. exigua*. Para *M. incognita*, há relatos de populações virulentas para outros patossistemas envolvendo espécies de solanáceas com genes *R*, como cultivares de tomate portadores do gene *Mi*, pepino com gene *N* e de melão com genes *Me1* e *Me3* (TZORTZAKAKIS, 2005; ROBERTSON et al., 2006), constituindo um exemplo de plasticidade genética de populações de *M. incognita*.

Em relação aos valores de FR das populações de *M. paranaensis* em tomate cv. Santa Clara, também pôde-se verificar diferenças na agressividade entre as mesmas, apesar do tomateiro não ter sido utilizado para essa finalidade, apenas para verificação da viabilidade dos inóculos. A variação no FR foi de 6,75 a 79,41. As populações que apresentaram FR mais baixos foram 2225 (FR = 6,75) e 2290 (FR = 7,56), enquanto que os valores mais elevados foram obtidos nas populações 9 (FR = 79,41) e 2BK (FR = 62,79). De maneira geral, a cultivar de tomate utilizada é considerada boa hospedeira de *M. paranaensis*, apresentando valores de FR sempre elevados, segundo informações do Laboratório de Nematologia do IAPAR (dados não mostrados).

As populações de *M. paranaensis* do presente estudo foram isoladas de plantas de café, o que poderia justificar os menores valores de FR em tomateiro, em comparação aos genótipos de café, obtidos para algumas populações. Populações de *M. incognita*, outro importante nematoide parasita do cafeeiro, perdem a agressividade em café, após serem mantidas preferencialmente em plantas de tomate, e vice-versa (OLIVEIRA et al., 2009a). Carneiro e Jorge (2001) também observaram que populações de *M. incognita* raça 2 e *M. paranaensis*, quando multiplicadas por dois anos consecutivos em tomateiro, perderam significativamente a capacidade de infectar o cafeeiro, e, quando essas populações foram multiplicadas em plantas de cafeeiro, reduziram sua capacidade de infectar plantas de tomateiro.

Em algumas populações, observa-se um custo associado da virulência em parasitar genótipos de tomate portadores do gene *Mi-1*, medido através da menor capacidade de infecção ou fecundidade das fêmeas em genótipos de tomate sem genes de resistência

(ROBERTS 1995; CASTAGNONE-SERENO et al., 2007). Castagnone-Sereno et al. (1994) relataram inclusive perda da capacidade de infecção de uma população de *M. incognita* virulenta para o gene *Mi* em plantas de pimentão, sem genes de resistência, o mesmo tendo sido observado para uma população de campo de *M. incognita* virulenta para o gene *Mi* (TZORTZAKAKIS; BLOK, 2007). Williamson e Roberts (2009) sugerem que o ganho de virulência em populações de *Meloidogyne* spp. pode estar associado, portanto, inclusive com alterações na gama de hospedeiros, em alguns casos.

As diferenças observadas na reação dos diferentes genótipos de café estudados, a principal explicação seria o fato de serem materiais genéticos diferentes, oriundos de diferentes cruzamentos e campos de seleção, apesar de alguns possuírem os mesmos parentais, o que conferiria características genéticas e/ou arranjos alélicos diferentes entre os mesmos, conferindo diferentes níveis de resistência/suscetibilidade a *M. paranaensis*.

No caso dos genótipos, as populações do nematoide se apresentaram como mais ou menos agressivas. Por exemplo, as 11 populações estudadas foram mais agressivas (FRs variando de 2,00 a 8,00) em IPR 100 do que em IPR 106 (FRs variando de 2,00 a 3,50). Pode-se sugerir que IPR 100 possui menos genes de resistência de efeito secundário, ou resistência quantitativa, do que IPR 106, para todas as populações estudadas.

Genótipos com maior nível de resistência quantitativa (ex. E0703T13 ou IPR 106, comparados à IPR 100) possuem, além do gene de resistência R, que geralmente provoca a reação de hipersensibilidade (SHIGUEOKA et al., no prelo), genes de efeito secundário, que conferem resistência quantitativa e que auxiliam na diminuição do FR do nematoide. Em contrapartida, nos genótipos com resistência qualitativa, existe a presença de gene de resistência de efeito principal (denominado R ou *major gene*), e, portanto, ocorre reação de hipersensibilidade no hospedeiro e o nematoide não se reproduz normalmente, como ocorre em IPR 106 (SHIGUEOKA et al., no prelo).

Na relação entre patógeno e hospedeiro, há a interação de genes de resistência do hospedeiro e genes de virulência do patógeno. A “quebra” da resistência de genes menores em genótipos ocorre devido à plasticidade do patógeno, que pôde ser observado pela variação no FR das 11 populações de *M. paranaensis* nos 13 genótipos estudados.

Genótipos com genes de resistência aos nematoides têm sido selecionados em *Coffea* spp., entretanto, através de pressão de seleção e evolução, mecanismos complementares de ataque do patógeno também são selecionados. O parasitismo, portanto, permite estabelecer relações genéticas entre o patógeno e o hospedeiro, de modo que

modificações genéticas no hospedeiro podem ser acompanhadas por modificações genéticas nas populações dos patógenos, denominado coevolução (CAMARGO, 2011).

Segundo Camargo (2011), uma das condições essenciais para a existência da coevolução é a variabilidade genética, tanto do hospedeiro, quanto do patógeno. Populações dos patógenos com alta variabilidade possuem uma melhor capacidade de responder aos agentes seletivos, ou seja, adaptam-se com mais facilidade às mudanças do ambiente. Uma das principais características das 11 populações estudadas nesse trabalho é que, para todas, ou havia relatos de parasitismo em cultivares com genes de resistência ou relatos de maior agressividade em cultivares sem genes de resistência em lavouras cafeeiras. É possível, portanto, que tais populações desenvolveram mecanismos para gerar a variabilidade necessária para o sucesso no parasitismo em cultivares resistentes.

A espécie *M. paranaensis* apresenta o modo de reprodução via partenogênese mitótica obrigatória, assim como *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (TRANTAPHYLLOU, 1985; CASTAGNONE-SERENO, 2006; CHITWOOD; PERRY, 2009). Neste modo de reprodução, sem recombinação sexual, é esperada uma progenia clonal, que sugeriria menor variabilidade. Entretanto, tais espécies apresentam ampla distribuição geográfica e polifagia (TRUDGILL; BLOK, 2001). As variações apresentadas, portanto, seriam uma resposta provavelmente dos diferentes números de cromossomos presentes nas espécies (WILLIAMSON; ROBERTS, 2009). Por exemplo, os números de cromossomos variam de  $2n = 42$  a  $48$  em *M. javanica*, de  $2n = 32$  a  $38$  em *M. incognita* e de  $3n = 50$  a  $52$  em *M. paranaensis* (CHITWOOD; PERRY, 2009). Essa variação cromossômica sugere que essas espécies são aneuploides, com diferente número de cópias de alguns cromossomos, o que pode levar a variações fenotípicas (WILLIAMSON; ROBERTS, 2009). Também são sugeridas outras maneiras de aquisição de variabilidade genética por parte de espécies partenogênicas, como conversão gênica, presença de elementos transponíveis ou outros mecanismos especializados de variação gênica (WILLIAMSON; ROBERTS, 2009).

Apesar da existência de variação entre as populações estudadas, não é possível afirmar que há a presença de raças fisiológicas em *M. paranaensis*. A identificação de raças fisiológicas em espécies do gênero *Meloidogyne* é realizada pelo teste de hospedeiros diferenciadores proposto pela Universidade Estadual da Carolina do Norte (MOENS; PERRY; STARR, 2009). Entretanto, o mesmo foi proposto com plantas hospedeiras de espécies diversas, aplicando equivocadamente o conceito fitopatológico de raças fisiológicas (CAMARGO, 2011). O termo raça, quando utilizado dentro de um contexto fitopatológico, refere-se a populações do patógeno que diferem entre si em relação à virulência na espécie

hospedeira que carrega genes específicos de resistência efetivos para outras populações (MOENS; PERRY; STARR, 2009). No presente trabalho, três diferentes espécies botânicas, *C. arabica*, *C. canephora* e *S. lycopersicum*, foram utilizadas para a caracterização fenotípica das populações de *M. paranaensis*.

A variação observada entre as diferentes populações de *M. paranaensis* ora estudadas reveste-se de grande importância para o melhoramento genético da cultura do café visando resistência a esse nematoide. Plantas com altos níveis de resistência ao nematoide podem ser identificadas ao se utilizar populações agressivas (BOERMA; HUSSEY, 1992). A seleção de plantas com resistência a várias populações do nematoide, portanto, pode ser feita com a utilização de mistura de populações do nematoide provenientes de diferentes regiões geográficas ou hospedeiros (HUSSEY; BOERMA, 1981).

Dessa forma, é importante a seleção de genótipos com diversas fontes de resistência ao nematoide, tornando-se a característica mais estável mesmo contando-se com a plasticidade fenotípica de populações de *M. paranaensis*, o que evitaria a seleção de indivíduos virulentos e agressivos ou a perda da resistência pelo material genético.

### 3.7 CONCLUSÃO

Variações morfológicas, bioquímicas e fenotípicas foram observadas nas populações de *Meloidogyne paranaensis* ora estudadas. Entretanto, nenhuma relação foi observada entre a origem das populações com suas variações nos padrões perineais, perfis de esterase ou multiplicação nos genótipos de café, bem como entre as diferentes caracterizações entre si, sugerindo que a diversidade encontrada nas diferentes populações estudadas não apresenta um padrão de comportamento identificável pelos parâmetros aqui utilizados, sendo necessários estudos futuros para melhor entendimento da diversidade das populações de *Meloidogyne paranaensis*.

#### 4 REFERÊNCIAS

- ADAM, M. A. M.; PHILLIPS, M. S.; BLOK, V. C. Identification of *Meloidogyne* spp. from north east Libya and comparasion of their inter and intro-specific genetic variation using RAPDs. **Nematology**, Leiden, v. 7, p. 599-609, Jun. 2005.
- ANTHONY, F.; TOPART, P.; ASTORGA, C.; ANZUETO, F.; BERTRAND, B. La resistencia genética de *Coffea* spp. a *Meloidogyne paranaensis*: identificación y utilización para la caficultura latinoamericana. **Manejo integrado de Playas y Agroecología**, Costa Rica n.67, p. 5-12. 2003.
- ARAÚJO FILHO, J. V.; MACHADO, A. C. Z.; DALLAGNOL, L. J.; CAMARGO, L. E. A. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) parasitizing resistant tobacco cultivars in Southern Brazil. **Plant Disease**, Ames, v. 100, n. 6, p. 1222-1231, Jun. 2016.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 18, p. 489-522, Nov. 1987.
- BARBOSA, D. H. S. G.; VIEIRA, H. D.; SOUZA, R. M.; VIANA, A. P.; SILVA, C. P. Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 28, n. 1, p. 49-54, Jun. 2004.
- BARROS, A. F.; OLIVEIRA, R. D. L.; ZAMBOLIN, L.; FERREIRA, A. O.; COUTINHO, R. R. *Meloidogyne paranaensis* attacking coffee trees in Espirito Santo State, Brazil. **Australasian Plant Disease**, [S.I.] v. 6, p. 43-45, Maio 2011.
- BECKENBACH, K.; BLAXTER, M.L.; WEBSTER, J. M. Phylogeny of *Bursaphelenchus* species derived from analysis of ribossomal internal transcribed spacer DNA sequences. **Nematology**, Flórida, v. 1, p. 539-548, Jan.1999.
- BERTRAND, B., ANTHONY, F. Genetics of resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and breeding. In: Souza, R. M. (Ed.). **Plant-parasitic nematodes of coffee**. Berlin: Springer. 2008, p. 165-190.
- BLOK, V. C., WISHART, J., FARGETTE, M., BERTHIER, K., PHILLIPS, M. S. Mitochondrial differences distinguishing *Meloidogyne mayaguensis* from the major species of tropical root-knot nematodes. **Nematology**, Flórida, v. 4, p.773–781, Fev. 2002.
- BLOK, V.; POWERS, T. O. Biochemical and molecular identification. In: PERRY, M.; MOENS, M.; STARR, J.L. (Eds.). **Root-knot nematodes**. CABI Publishing, Wallingford, p. 98-118, 2009.
- BRITO, J. A.; POWERS, T. O.; MULLIN, P. G.; INSERRA, R. N.; DICKSON, D. W. Morphological an molecular characterization of *Meloidogyne mayaguensis* isolates from Florida. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 36, n. 3, p. 232-240. Sep. 2004.

BOERMA, H. R.; HUSSEY, R. S. Breeding plants of resistance to nematodes. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 24, p. 242-252, 1992.

BONETTI, J. I.; FERRAZ, S. Modificações no método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 533, 1981.

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

CAMARGO, L. E. A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**, v. 1, 4ª edição, Editora Agronômica Ceres, p. 119-132, 2011.

CAMPOS, V. P.; MELLES, C. C. A. Ocorrência e distribuição de espécies de *Meloidogyne* em cafezais dos campos das vertentes e do sul de Minas. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 11, p. 233-241. Abr. 1987.

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

CARNEIRO, R. G.; ALTÉIA, A. A. K.; BRITTO, J. A. Levantamento da ocorrência e frequência de espécie e raças fisiológicas de *Meloidogyne* no Noroeste do Paraná 1: núcleo regional da Emater de Paranaíba. In: XVII Congresso Brasileiro de Nematologia. **Resumo**. Lavras. 1992.

CARNEIRO, R. G. Fitonematoides na cafeicultura paranaense: Situação atual. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, **Anais...** Jaboticabal, SP, Brasil. 1993.

CARNEIRO, R. M. D. G.; CARNEIRO, R. G.; ABRANTES, I. M. O.; SANTOS, M. S. N. A.; ALMEIDA, M. R. A. *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasiting coffee in Brazil. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 28, p. 177-189. Sep. 1996.

CARNEIRO, R. M. D. G., ALMEIDA, M. R. A. CARNEIRO, R. G. Enzyme phenotype of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. **Fundamental and Applied Nematology**, [S.I.] v. 19, p. 555-560, Oct. 1996a.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Distribution of *Meloidogyne* spp. on Coffee in Brazil: identification, characterization and intraspecific variability. In: **Mejoramiento sostenible del café arábica por los recursos genéticos, asistido por los marcadores moleculares, com énfasis en la resistencia a los nemátodos**. Publicación Especial. CATIE / IRD, Turrialba. p. 43-48. 2000.

- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 25 p. 35-44, Maio 2001.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; JORGE, C. L. Seletividade fisiológica de populações de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne paranaensis* quando multiplicadas durante sucessivas gerações em tomateiros e cafeeiros. Anais, 2º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Brasília. DF. pp. 82-83. 2001.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; TIGANO, M. S.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M. R. A.; SARAH, J. L. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. **Nematology**, Leiden, v. 6, n. 2, p. 287-298. Jan. 2004.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M. R. A.; GONÇALVES, W. Identificação e caracterização de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiro nos estados de São Paulo e Minas Gerais através dos fenótipos de esterase e SCAR-multiplex-PCR. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, n. 2, p. 233-241. Out. 2005.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; COFCEWICZ, E. T.; MAGUNACELAYA, J. C.; ABALLAY, E. *Meloidogyne ethiopica*, a major root-knot nematode parasitising *Vitis vinifera* and other crops in Chile. **Nematology**, Leiden, v. 9, n. 5, p. 635-641, May 2007.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; COFCEWICZ, E. T. Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematoides, *Meloidogyne* spp. In: SOUZA, R. M. (Ed.). **Plant parasitic nematodes of coffee**. Springer. Holand, p. 87-122. 2008.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; BONGIOVANNI, M.; DALMASSO, A. Reproduction of virulent isolates of *Meloidogyne incognita* on susceptible and *Mi*-resistant tomato. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 26, p. 324-328, 1994.
- CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes. *Euphytica*, v. 124; n.2; p. 193-199, 2002.
- CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. **Heredity**, [S.I.] v. 96, p. 282-289, 2006.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; BONGIOVANNI, M.; WAJNBERG, E. Selection and parasite evolution: a reproductive fitness cost associated with virulence in the parthenogenetic nematode *Meloidogyne incognita*. **Evolutionary Ecology**, [S.I.] v. 21, p. 259-270, 2007.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; SKANTAR, A.; ROBERTSON, L. Molecular tools for diagnostics. In: Eds. JONES, J.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. p. 444-445. 2011.

CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E.G.J.; PERFUS-BARBEOCH, L.; ABAD, P. Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: new insights from the genomic era. **Annual Review of Phytopathology**, [S.I.] v. 51, p. 203-220, Aug. 2013.

CASTRO, J. M. C.; NAVES, R. L.; CAMPOS, V. P. Ocorrência de *Meloidogyne paranaensis* em cafeeiro na região do Alto Paranaíba em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 565. Out. 2003.

CASTRO, J. M. C.; CAMPOS, V. P. Detecção de *Meloidogyne paranaensis* em cafeeiros do Sul de Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 4, p. 507. 2004.

CASTRO, J. M. C.; CAMPOS, V. P.; POZZA, E. A.; NAVES, R. L.; ANDRADE JÚNIOR, W. C.; DUTRA, M. R.; COIMBRA, J. L.; MAXIMINIANO, C.; SILVA, J. R. C. Levantamento de fitonematoides em cafezais do Sul de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 32, n. 1, p. 56-64. Mar. 2008.

CASWELL, E. P.; ROBERTS, P. A. Nematode population genetics. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. (Eds). **Vistas on Nematology**. Hyattsville MD, USA, Soc. Nematologists, p. 390-397. 1987.

CENIS, J. L.; OPPERMAN, C. H.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. Cytogenetic, enzymatic and restriction fragment length polymorphism variation of *Meloidogyne* spp. from Spain. **Phytopathology**, [S.I.] v. 82, p. 76-80. Nov. 1992.

CHITWOOD, D. J.; PERRY, R. N. Reproduction, physiology and biochemistry. In: PERRY, R.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Eds.). **Root-knot Nematodes**. Cambridge, MA, USA, CABI International, p. 182-200. 2009.

CLIFF, G.M.; HIRSCHMANN, H. Evaluation of morphological variability in *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, Riverside, v.17, n.4, p.445-449, 1985.

CURRAN, J.; BAILLIE, D. L.; WEBSTER, J. M. Use of restriction fragments length differences in genomic DNA to identify nematode species. **Parasitology**, [S.I.] v. 90, p. 137-144, Feb. 1985.

DAVIDE, R.G. Nematode survey and collection of samples. In: DELA CRUZ, F.S.; VAN DEN BERGH, I.; DE WAELE, D.; HAUTEA, D.M.; MOLINA, A.B. (Eds.). **Towards management of Musa nematodes in Asia and the Pacific**. Technical Bulletin. Los Baños: Inibap, p. 3-6, 2003.

DAVIS, E.L.; KOENNING, S.R.; BURTON, J.W.; BARKER, K.R. Greenhouse evaluation of selected soybean germplasm for resistance to North Carolina populations of *Heterodera glycines*, *Rotylenchulus reniformis*, and *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 28, p. 590-598, 1996.

- DE LEY, P.; BLAXTER, M. L. Systematic position and phylogeny. In: LEE, D.L. (Ed.). **The biology of nematodes**. Taylor and Francis, London, UK, p. 1-30, 2002.
- DERYCKE, S.; DE LEY, P.; DE LEY, I.T.; HOLOVACHOV, O.; RIGAUX, A.; MOENS, M. Linking DNA sequences to morphology: cryptic diversity and population genetic structure in the marine nematode *Thoracostoma trachygaster* (Nematoda, Leptosomatidae). **Zoologica Scripta**, v. 39, p. 276-289, Dec. 2010.
- DICKSON, D.W.; HUISINGH, D.; SASSER, J.N. Dehydrogenases, acid and alkaline phosphatases, and esterases for chemotaxonomy of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera* and *Aphelenchus* spp. **Journal of Nematology**, Riverside, v.3 p. 1-16, Jan. 1971.
- DI VITO, M.; CROZZOLI, R.; VOLVLAS, N. Pathogenicity of *Meloidogyne exigua* on coffee (*Coffea arabica* L.) in pots. **Nematropica**, Flórida, v. 30, p. 22-61, Dec. 2000.
- DORRIS, M.; DE LEY, P.; BLAXTER, M. L. Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 15 p. 188-193, May. 1999.
- DOUCET, M.; LAX, P.; DI RIENZO, J. A.; PINOCHET, J.; BAUJARD, P. Temperature-induced morphometrical variability in an isolate of *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen, 1951 (Nematoda: Tylenchida). **Nematology**, Leiden, v. 3, p. 1-8, 2001.
- EISENBACK, J. Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. In: BARKER, K. R.; CARTER, C. C.; SASSER, J. N. (Ed.). **An advanced treatise on Meloidogyne**. Methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics, v. 2, p. 79-105, 1985.
- EISENBACK, J. D.; TRIANTAPHYLLOU, H. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In: NICKLE, W. R. (Ed.). **Manual of Agricultural Nematology**. Marcel Dekker, New York, p. 191-274, 1991.
- EISENBACK, J. D.; HUNT, D. J. General morphology. In: PERRY, R.N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Eds.). **Root-knot nematodes**. Cambridge, MA, USA, CABI North America Office, p. 18-54, 2009.
- ESBENSHADE, P. R.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida). **Journal of Nematology**, Riverside, v. 17, p. 6-20, Jul. 1985.
- ESBENSHADE, P. R.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. Isozyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 22, p. 10-15, Jan. 1990.
- FAVORETO, A. J.; SANTOS, J. M. Caracterização bioquímica e morfológica de populações de nematoides das galhas em café (*Coffea arabica* L.) em regiões produtoras do Estado de São Paulo. In: XXIII Congresso Brasileiro de Nematologia, Marília, **Anais...** p. 93. 2001.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. Taxonomy and classification. In: An introduction to nematodes: plant nematology. Sofia, Moscow: Pensoft, p.184-207, 2002.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. de; LOPES, E. A.; DIAS-ARIEIRA, C. R. Manejo sustentável de fitonematoides. Viçosa: Editora UFV, 2010. p.306.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematoides. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (Eds). **Manual de Fitopatologia**. 4ª Edição. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. p. 289-295.

FERREIRA, E. B., CAVALCANTI, P. P., NOGUEIRA, D. A. ExpDes: Experimental Designs package. R package version 1.1.2. 2013.

FONSECA, A. F. A. da.; FERRÃO, R. G.; FERRÃO, M. A. G.; VOLPI, P. S.; VERDIN FILHO, A. C.; FAZUOLI, L. C. Cultivares de café Robusta. In: CARVALHO, C. H. S. de. Cultivares de café: origem, características e recomendações. Brasília: Embrapa Café, 2008. p. 255-280.

FORTUNER, R.; QUÉNÉHERVÉ, P. Morphometrical variability in *Helicotylenchus* Steiner, 1945. 2. Influence of the host on *H. dihystera* (Cobb, 1893) Sher, 1961). **Révue de Nématologie**, Bondy, v.3, p.291-296, 1980.

FREIRE, C. R.; DAVIDE, L. C.; CAMPOS, V. P., SANTOS, C. D.; FREIRE, P. W. Cromossomos de três espécies brasileiras de *Meloidogyne*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v. 26, n. 5, p. 900-903, set./out., 2002

FREITAS L. G.; OLIVEIRA, R. D. de L.; FERRAZ, S. **Introdução à nematologia**. Viçosa: UFV, 2001. p. 84.

GISSI, C.; IANNELLI, F.; PESOLE, G. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. **Heredity**, v. 101, p. 301-320, 2008.

GONÇALVES, W. Melhoramento do cafeeiro visando à resistência a nematoides. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS **Anais...** Lavras: UFLA, Núcleo de estudos em cafeicultura, p. 82-91,1999.

GONÇALVES, W.; SILVAROLLA, M. B. Nematoides parasitos do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Tecnologias de produção de café com qualidade**. Viçosa: UFV, Departamento de Fitopatologia, p. 199-268, 2001.

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

GUERRA NETTO, E. G.; D' ANTONIO, A. M.; FREIRE, A. C. F. E. Influência de *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887, no desenvolvimento de lavoura de *Coffea arabica* L., variedade Mundo Novo. In: XII Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras. **Resumos...**, Caxambu, MG. p. 36-37. 1985.

HARTMAN, R. M.; SASSER, J. N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host and perineal pattern morphology. In: BARKER, K. R.; CARTER, C. C.; SASSER, J. N. (Eds.). **An advanced treatise on *Meloidogyne***. Methodology, Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, v. 2, p. 115-123, 1985.

HASSOUNA, N.; MICHOT, B.; BACHELLERIE, J. P. The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. **Nucleic Acids Research**, [S.I.] v. 12, p. 3563-3583, Apr.1984.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The quarterly review of biology**, New York, v. 66, p. 441-453, Dec. 1991.

HERNANDEZ, A. Étudo de la variabilité intra et intrespécifique des nematodes du genre *Meloidogyne* parasites des caféières en Amérique Centrale. 1997. 98 f. Thèse de doctorat, Académie de Montpellier, France, 1997.

HÜBSHEN, J.; KLING, L.; IPACHU, U.; ZINKERNAGEL, V.; BROWN, D. J. F.; NEILSON, R. Development and validation of species-specific primers that provide a molecular diagnostic for virus-vector longidorid nematodes and related species in German viticulture. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 110, p. 883-891, Mar. 2004.

HUNT, D. J.; HANDOO, Z. A. Taxonomy, identification and principal species. In: PERRY, R.N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Eds.). **Root-knot nematodes**. Cambridge, MA, USA, CABI North America Office, p. 55-97, 2009.

HUSSEY, R.S.; SASSER, J.N.; HUISING, D. Disc-eletrophoretic studies of soluble proteins and enzymes of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 4, 183-189, Jun. 1972.

HUSSEY, R. S.; BOERMA, H. R. Greenhouse procedures for screening for root-knot nematode resistance in soybeans. **Crop Science**, Madison, v. 21, p. 794-796, 1981.

JONES, J. T.; PHILLIPS, M. S.; ARMSTRONG, M. R. Molecular approaches in plant Nematology. **Fundamental and Applied Nematology**, Paris, v. 21 p. 655-666, Jan. 1997.

ITO, D. S.; SERA, G. H.; SERA, T.; SANTIAGO, D. C.; KANAYAMA, F. S.; DEL GROSSI, L. Progênies de café com resistência aos nematoides *Meloidogyne paranaensis* e raça 2 de *Meloidogyne incognita*. **Coffee Science**, Lavras, v. 3, n. 2, p. 156-163. Jul./Dez. 2008.

ITO, D. S.; MACHADO, A. C. Z.; SILVA, S. A.; DORIGO, O. F.; GARDIANO, C. G.; MATTEI, D. Levantamento parcial de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiros na região do arenito (noroeste) do estado do Paraná. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 8. 2013, Salvador, **Anais...** Brasília: EMBRAPA-CAFÉ, 2013.

ITO, D. S.; MACHADO, A. C. Z.; SILVA, S. A.; DORIGO, O. F. Partial Survey of *Meloidogyne* Species on Coffee in Parana State, Brazil. In: 6th INTERNATIONAL CONGRESS OF NEMATOLOGY, Cape Town. **Journal of Nematology**. Florida: Society of Nematologists, v. 46, p. 179, 2014.

JANATI, A.; BERGÉ, J. B.; TRIANTAPHYLLOU, A. C.; DALMASSO, A. Nouvelles données sur l'utilisation des isostérases pour l'identification des *Meloidogyne*. **Revue de Nématologie**, Bondy, v. 5, n. 1, p. 147-154, Oct. 1982.

KANAYAMA, F. S.; SERA, G. H.; SERA, T.; MATA, J. S. da; RUAS, P. M.; ITO, D. S. Progênies de *Coffea arabica* cv. IPR 100 com resistência ao nematoide *Meloidogyne incognita* raça 1. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 5, p. 1321-1326. Set./Out. 2009.

KUBO, R. K.; INOMOTO, M.M.; SILVA, R.A.; ANTEDOMÊNICO, S.R. Symptoms caused by *Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus brachyurus* and *P. coffeae* on tubers of potato cvs. Monalisa e Bintje. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n.3, p. 331-333, Jun. 2001.

KRZYŻANOWSKI, A. A., FIGUEIREDO, R., SANTIAGO, D. C., FAVORETO, L. Levantamento de espécies e raças de *Meloidogyne* em cafeeiros no Estado do Paraná. In: II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Vitória, ES. **Resumos...** Brasília, DF: Embrapa Café, p. 81, 2001.

LANDA, B. B.; PALOMARES RIUS, J. E.; VOVLAS, N.; CARNEIRO, R. M. D. G.; MALEITA, C. M. N.; ABRANTES, I. M. O. Molecular characterization of *Meloidogyne hispanica* (Nematoda, Meloidogynidae) by phylogenetic analysis of genes within the rDNA in *Meloidogyne* spp. **Plant Disease**, Ames, v. 92, p. 1104-1110, Jul. 2008.

LEACH, J. E.; CRUZ, C. M. V.; BAI, J.; LEUNG, H. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. **Annual Review of Phytopathology**, [S.I.] v. 39, p. 187-224, 2001.

LIMA, R. D. de; CAMPOS, V. P.; HUANG, S. P.; MELLES, C. C. A. Reprodutividade e parasitismo de *Meloidogyne exigua* em ervas daninhas que ocorrem em cafezais. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 9, p. 63-72. Out. 1985.

LORDELLO, L.G.E.; MELLO FILHO, T. Mais um nematoide ataca o cafeeiro. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 45, p. 102, Jun. 1970.

LORDELLO, L. G. E.; HASHIZUME, H. Suscetibilidade da variedade Konillou de *C. canephora* a um nematoide. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 46, p. 157-158. Mar. 1971.

LORDELLO, A. I. L.; LORDELLO, R. R. A. Nematoides encontrados em cafezais do estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 23, 2001, Garça. **Anais...** Garça: SBN/FAEF. p. 85. 2001.

MACHADO, A.C.Z. **Pratylenchus brachyurus x algodoeiro: patogenicidade, métodos de controle e caracterização molecular de populações**. 2006. 132 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, SP, 2006.

MACHADO, A. C. Z.; FERRAZ, L. C. C. B.; OLIVEIRA, C. M. G. Development of a species-specific reverse primer for the molecular diagnostic of *Pratylenchus brachyurus*. **Nematropica**, Flórida, v. 37, p. 249-257, Dec. 2007.

MACHADO, A. C. Z.; ITO, D. S.; SILVA, S. A.; DORIGO, O. F. Agressividade de populações de *Meloidogyne paranaensis* em cafeeiro ‘Mundo Novo’. VIII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. **Anais...** Salvador, 2013.

MACHADO, A.C.Z.; MATTEI, D.; SILVA, S.A.; DORIGO, O.F.; ITO, D.S. Host status of green manures to four species of root-knot nematodes in Brazil. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 46, n. 2, p. 198, Jun. 2014.

MACHADO, A.C.Z.; SIQUEIRA, K. M. S.; FERRAZ, L. C. C. B.; INOMOTO, M. M.; BESSI, R.; HARAKAVA, R.; OLIVEIRA, C. M. G. Characterization of Brazilian populations of *Pratylenchus brachyurus* using morphological and molecular analyses. **Tropical Plant Pathology**, Fortaleza, v. 40, n. 2, p. 102-110, 2015.

MATA, J. S.; SERA, T.; AZEVEDO, J. A.; ALTEIA, M. Z.; COLOMBO, L. A.; SANCHES, R. S.; PETEK, M. R.; FADELLI, S. Seleção para resistência ao nematoide *Meloidogyne paranaensis* EMN95001: IAPARLN 94066 de “Catuaí x Icatu” em áreas altamente infestada. In: I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Poços de Caldas, MG. **Resumos Expandidos...** Brasília, DF. Embrapa Café; Belo Horizonte: Minasplan, 2000. p.515-518.

MATA, J. S. da; SERA, T.; ALTÉIA, M. Z.; AZEVEDO, J. A.; FADELLI, S.; PETEK, M. R.; TRILLER, C.; SERA, G. H. Resistência de genótipos de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) de São Jorge do Patrocínio ao nematoide *Meloidogyne paranaensis* (EMN2001.07). **SBPN Scientific Journal**, São Paulo, v. 6, p. 34-36. 2002.

MATUNAGA, D. S.; OLIVEIRA, H. R. F.; ITO, D. S.; DORIGO, O. F.; SILVA, S. A.; MACHADO, A. C. Z. Levantamento de fitonematoides em áreas cafeeiras do Norte do Estado do Paraná. In: XXXIII Congresso Brasileiro de Nematologia, **Resumos...** Petrolina, PE, 2016.

MCLAIN, D. K. O.; RAI, K. S.; FRASER, J. M. Intraespecific and interespecific variation in the sequence and abundance of highly repeated DNA among mosquitos of the *Aedes albopictus* subgroup. **Heredity**, [S.I.] v. 58, p. 373-381, Jun. 1987.

MEDINA, I. L.; GOMES, C. B.; ROSSI, C.; CARNEIRO, R. M. D. G. Characterization and identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from fig (*Ficus carica* L.) trees in Rio Grande do Sul and São Paulo states of Brazil, **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 30, p. 179-187, Nov. 2007.

MOENS, M.; PERRY, R. N.; STARR, J. L. *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Eds.). **Root-knot nematodes**. Cambridge, MA, USA, CABI North America Office, p. 1-17, 2009.

MUNIZ, M. F. S.; CAMPOS, V. P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CASTRO, J. M. C.; ALMEIDA, M. R. A.; CARNEIRO, R. M. D. G. Diversity of *Meloidogyne exigua* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations from coffee and rubber tree. **Nematology**, Leiden, v. 10, n. 6, p. 897-910, 2008.

MUNIZ, M. F. S.; CAMPOS, V. P.; MOITA, A. W.; GONÇALVES, W.; ALMEIDA, M. R. A.; SOUSA, F. R.; CARNEIRO, R. M. D. G. Reaction of coffee genotypes to different populations of *Meloidogyne* spp.: detection of a naturally virulent *M. exigua* population. **Tropical Plant Pathology**, Fortaleza, v. 34, n. 6, p. 370-378, 2009.

NOIR, S.; ANTHONY, F.; 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**, Avenel, v. 52, n. 1, p. 97-103, 2003.

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

OLIVEIRA, C. M. G.; MACHADO, A. C. Z.; KUBO, R. K.; HARAKAVA, R. Diagnose de *Aphelenchoides fragariae* e *Pratylenchus* spp. pela aplicação da tecnologia do código de barras do DNA. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 33, n. 3, p. 218-225, Jun. 2009.

OLIVEIRA, D. S.; OLIVEIRA, R. D. L.; SILVA, D. G.; SILVA, R. V. Falha na adaptabilidade (*fitness*) de *Meloidogyne incognita* ao cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 33, n. 3, p. 207-211, 2009a.

OLIVEIRA, C. M. G., BESSI, R.; HARAKAVA, R.; MACHADO, A. C. Z.; KUBO, R. K. Técnicas moleculares e microscopia eletrônica de varredura no esclarecimento da posição taxonômica da população K5 de *Pratylenchus* sp. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 35, n. 1-2, p. 36-45, Jun. 2011.

OLIVEIRA, C. M. G.; MONTEIRO, A. R.; BLOK, V. C. Morphological and molecular diagnostics for plant-parasitic nematodes: working together to get the identification done. **Tropical Plant Pathology**, Fortaleza, v. 36, n. 2, p. 65-73, 2011.

LOWE, T.; CORBETT, D. C. M. Morphology and morphometrics of *Pratylenchus brachyurus* and *P. zaeae* II. Influence of environmental factors. **Indian Journal of Nematology**, New Dehli, v. 14, n. 1, p. 6-17, 1984a.

LOWE, T.; CORBETT, D. C. M. Morphology and morphometrics of *Pratylenchus brachyurus* and *P. zaeae* III. Influence of geographical location. **Indian Journal of Nematology**, New Dehli, v. 14, n. 1, p. 30-35, 1984b.

PORTZ, R. L.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; BALBI-PENA, M. I.; FURLANETTO, C. *Meloidogyne* spp. associadas à cafeicultura em municípios do oeste do Paraná. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 30, n. 1, p. 23-27. Mar. 2006.

POWERS, T. O.; HARRIS, T. S. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 25, n. 1, p.1-6, Mar. 1993.

POWERS, T. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. **Annual Review of Phytopathology**, [S.I.] v. 26, p. 367-383, Sep. 2004.

PETERSEN, D. J.; ZIJLSTRA, C.; WISHART, J.; BLOK, V.; VRAIN, T. C. Specific probes efficiently distinguish root-knot nematode species using signature sequences in the ribosomal intergenic spacer. **Fundamental and Applied Nematology**, Paris, v. 20, n. 6, p. 619-626, Nov. 1997.

R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

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

RANDIG, O.; CARNEIRO, R. M. D. G.; CASTAGNONE-SERENO, P. Identificação das principais espécies de *Meloidogyne* parasitas do cafeeiro no Brasil com marcadores SCAR-café em multiplex-PCR. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 28, n. 1, p. 1-10, Out. 2004.

ROBERTS, P. A. Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance, **Annual Review of Phytopathology**, [S.I.] v. 33, p. 199, Feb. 1995.

RIBEIRO, R. C. F.; PEREIRA, A. A.; OLIVEIRA, C. F.; LIMA, R. D. Resistência de progênies de híbridos interespecíficos de *Coffea arabica* e *C. canephora* a *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, [S.I.] v. 29, p.11-16, Mar. 2005.

ROBERTSON, L.; LÓPEZ-PÉREZ, J.A.; BELLO, A.; DÍEZ-ROJO, M.A.; ESCUER, M.; PIEDRA-BUENA, A.; ROS, C.; MARTINEZ, C. Characterization of *M. incognita*, *M. arenaria* and *M. hapla* populations from Spain and Uruguay parasitizing pepper (*Capsicum annuum* L.). **Crop Protection**, [S.I], v.25, p.440-445, 2006.

ROBERTSON, B C.; STEEVES, T. E.; MCBRIDE, K. P.; GOLDSTEIN, S. J.; WILLIAMS, M.; GEMMELL, N. J. Phylogeography of the New Zealand blue duck (*Hymenolaimus malacorhynchos*): implications for translocation and species recovery. **Conservation Genetics**, v.8, p. 1431-1440, 2007.

RODRIGUES, I. F. D.; CROZZOLI, R. Efecto del nematode agallador *Meloidogyne exigua* sobre el crecimiento de plantas de café em vivero. **Nematologia Mediterrânea**, Bari, v. 23, p. 325-328, Dec. 1995.

SABO, A.; REIS, L. G. L.; KRALL, E.; MUNDO-OCAMPO, M.; FERRIS, V. R. Phylogenetic relationship of a distinct species of *Globodera* from Portugal and two *Punctodera* species. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 34, p. 263-266, Sep. 2002.

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

SANTOS, J. M. dos. **Estudo das principais espécies de *Meloidogyne goeldi* que infectam o cafeeiro no Brasil com descrição de *Meloidogyne goeldii* sp. n.** 1997. 153 f. Tese (Doutorado em Agronomia). UNESP – Campus de Botucatu, Botucatu, 1997.

SANTOS, J. M. dos. Os nematoides de galha que infectam o cafeeiro no Brasil. In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 4. ENCONTRO SOBRE DOENÇAS E PRAGAS DO CAFEEIRO, 5., 2001, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: Instituto Biológico, 2001. p.10-20.

SANTOS, M. F. A. **Desenvolvimento de marcadores SCAR para identificação de espécies de *Meloidogyne* do cafeeiro e variabilidade genética e agressividade de populações de *M. paranaensis* a genótipos de *Coffea* spp.** 2016. 124 f. Tese de doutorado, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2016.

SASSER, J. N. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) by host reaction. **Plant Disease Reporter**. 36, p. 84-86.

SCHILICHTING, C. D. The evolution of phenotypic plasticity in plants. **Annual Review of Ecology Systematics**, [S.l.], v. 17, pp. 667-693, 1986.

SERA, T.; MATA, J. S. da; ITO, D. S.; DOI, D. S.; SERA, G. H.; AZEVEDO, J. A. de; COTARELLI, V. M. Identificação de cafeeiros resistentes aos nematoides *Meloidogyne paranaensis* e *M. incognita* raças 2 e 1 em populações de Icatu (*Coffea arabica*). **SBPN Scientific Journal**, São Paulo, v. 8, p. 20. 2004.

SERA, G. H.; SERA, T.; AZEVEDO, J. A. de; MATA, J. S. da; RIBEIRO-FILHO, C.; DOI, D. S.; ITO, D. S.; FONSECA, I. C. de B. Porta-enxertos de café robusta resistentes aos nematoides *Meloidogyne paranaensis* e *M. incognita* raças 1 e 2. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 2, p. 171-184. Abr./Jun. 2006.

SERA, G. H.; SERA, T.; ITO, D. S.; MATA, J. S. da; DOI, D. S.; AZEVEDO, J. A. de; RIBEIRO-FILHO, C. Progênes de *Coffea arabica* cv IPR 100 resistentes ao nematoide *Meloidogyne paranaensis*. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 1, p. 43-49. 2007.

SERA, G. H.; SERA, T.; MATA, J. S. da; ALEGRE, C. R.; FONSECA, I. C. B.; ITO, D. S.; KANAYAMA, F. S.; BARRETO, P. C. Reaction of coffee cultivars Tupi IAC 1669-33 and IPR 100 to nematode *Meloidogyne paranaensis*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 9, p. 293-298. Set. 2009.

SHIGUEOKA, L. H.; SERA, G. H.; SERA, T.; SILVA, S. A.; FONSECA, I. C. B.; MACHADO, A. C. Z. Diversidade fenotípica de populações de *Meloidogyne paranaensis* em genótipos de *Coffea arabica* e *C. canephora*. In: XXXIII Congresso Brasileiro de Nematologia, **Resumos...** Petrolina, PE, 2016.

SHIGUEOKA, L. H.; DORIGO, O. F.; ARITA, L. Y.; FONSECA, I. C. B.; SILVA, S. A.; SERA, G. H.; MACHADO, A. C. Z. Histopathological characterization of *Coffea arabica* cultivar IPR 106 resistance to *Meloidogyne paranaensis*. **Journal of Phytopathology**, no prelo.

SIQUEIRA, M. M.; INOMOTO, M. M. Pathogenicity and reproductive fitness of *Pratylenchus brachyurus* on cowpea. **Nematology**, Leiden, v. 10, n. 4, p. 495-500, 2008.

SILVA, R. V.; OLIVEIRA, R. D.; PEREIRA, A. A.; PINTO, F. S. Variabilidade de *Meloidogyne exigua* em genótipos de cafeeiro. XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia. **Resumo...** Uberlândia, v. 28, p. 293, 2003.

SILVA, R. V. **Produção de inóculo e diferenciação de raças de *Meloidogyne exigua* em *Coffea spp.*** 2005. 48 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2005.

SILVA, R. V.; OLIVEIRA, R. D. L.; ZAMBOLIN, L. Primeiro relato de ocorrência de *Meloidogyne paranaensis* em cafeeiro no estado de Goiás. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 33, n. 2, p. 187-190. Dez. 2009.

SILVA, S. A.; GARDIANO, C. G.; MACHADO, A. C. Z. Agressividade de populações de *Meloidogyne paranaensis* em cafeeiro 'Mundo Novo'. In: XXXI Congresso Brasileiro de Nematologia, Cuiabá, MT, **Anais...** CD-rom. 2013.

SILVA, S. A.; MATUNAGA, D. S.; TOMAZ, J. P.; SOUZA, R. F.; MACHADO, A. C. Z. Diversidade genética do nematoide das galhas, *Meloidogyne incognita*, baseada na região ITS1 do rDNA. In: XXXIII Congresso Brasileiro de Nematologia, **Resumos...** Petrolina, PE, 2016.

SONG, H.; BALLARD, J.W.O.; WO, J.; YI, Y.J.; SUTOVSKY, P. Regulations of mitochondrial genome inheritance by autophagy and ubiquitin-proteasome system: implications for health, fitness and fertility. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-16, Jun. 2014.

SOUZA, S. E.; SANTOS, J. M.; MATOS, R. V.; RAMOS, J. A.; SANTOS, F. S.; FERRAZ, R. C. N.; CARVALHO, G. S.; OLIVEIRA, C. A. Levantamento preliminar de *Meloidogyne* em cafeeiros no estado da Bahia – Planalto da Vitória da Conquista e Chapada Diamantina. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1, 2000, Poços de Caldas. **Resumos expandidos...** Brasília: EMBRAPA. p. 167-170. 2000.

STARR, J. L.; BRIDGE, J.; COOK, R. Resistance to plant-parasitic nematode: History, current use and future potential. pp. 1-22. In: STARR, J. L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (Eds). **Plant resistance to parasitic nematodes**. New York, NY, USA, CABI Publishing, p. 1-22, 2002.

SUBBOTIN, S.A.; VIERSTRAETE, A.; DE LEY, P.; ROWE, J.; WAEYENBERGE, L.; MOENS, M.; VANFLETEREN, J.R. Phylogenetic relationship within the cyst-forming nematodes (Nematoda, Heteroderidae) based on analysis of sequences from the ITS regions of ribosomal DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 21, p. 1-16, Oct. 2001.

TARTÉ, R.; MAI, W. F. Morphological variation in *Pratylenchus penetrans*. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 18, p. 185-195, 1976.

TAYLOR, D. P.; NETSCHER, C. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Nematologica**, Leiden, v. 20, p. 268-269. Jun. 1974.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: FUNEP, p. 267-279, 1993.

TORRES, G. R. C.; PEDROSA, E. M. R.; SIQUEIRA, K. M. S.; MOURA, R. M. *Pratylenchus brachyurus* em *Cucumis melo* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 29, p. 668-669, 2004.

TRIANANTAPHYLLOU, A. C. Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. In: SASSER, J.; CARTER, C. (Eds.). **An Advanced Treatise on Meloidogyne**, vol. I. North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, p. 113-126, 1985.

TRUDGILL, D.L. Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. **Annual Review of Phytopathology**, [S.I.] v. 29, p. 167, Sep. 1991.

TRUDGILL, D. L.; BLOK, V. C. Apomitic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, [S.I.] v. 39, p. 53-77, 2001.

TZORTZAKAKIS, E. A.; ADAM, M. A. M.; BLOK, V. C.; PARASKEVOPOULOS, C.; BOURTZIS, K. Occurrence of resistance-breaking populations of root-knot nematodes on tomato in Greece. **European Journal of Plant Pathology**, [S.I.] v. 113, p. 101-105, 2005.

TZORTZAKAKIS, E. A.; BLOK, V. C. Differentiation in two populations of *Meloidogyne incognita* from Greece in relation to reproduction on resistant tomato and pepper. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 114, p. 276-277, 2007.

VANDERPLANK, J.E. **Plant Diseases: Epidemics and Control**. Academic Press, New York, 349 pp., 1963.

VANDERPLANK, J. E. **Disease resistance in plants**. London, New York: Academic, 206 pp., 1968.

VAN OPPEN, M. J.; McDONALD, B. J.; WILLIS, B.; MILLER, D. J. The evolutionary history of the coral genus *Acropora* (Scleractinia, Cnidaria) based on a mitochondrial and a nuclear marker: reticulation, incomplete lineage sorting, or morphological convergence? **Molecular Biology and Evolution**, [S.I.] v. 18, n. 7, p. 1315-1329, Jul. 2001.

VILLAIN, B.; ANZUETOO, F.; HERNANDEZ, A.; SARAH, J. L. Los nematodes parasites del cafeto. In: BERTRAND, B.; RAPIDEL, B. (Eds). *Desafios de la caficultura en Centroamérica*. San Jose, Costa Rica, ICCA-PROMECAFE, p. 327-368. 1999.

VILLAIN, L.; SARAH, J. L.; HERNÁNDEZ, A.; BERTRAND, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P.; CHARMETANT, P.; ANZUETO, F.; CARNEIRO, R. M. D. G. Diversity of root-knot nematodes parasitizing coffee in Central America. **Nematropica**, Flórida, v. 43, n. 2, p. 194-206. 2013.

WANG, X.; BOSSELUT, N.; CASTAGNONE-SERENO, C.; VOISIN, R.; ABAD, P.; ESMENJAUD, D. Multiplex polymerase chain reaction identification of single individuals of

the Longidorid nematodes *Xiphinema index*, *X. diversicaudatum*, *X. vuittenezi*, and *X. italiae* using specific primers from ribosomal genes. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93, p. 160-166, Feb. 2003.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p.6531-6535, Nov. 1990.

WILLIAMSON, V. M.; ROBERTS, P. A. Mechanisms and genetics of resistance. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Eds.). **Root-knot nematodes**. Cambridge, MA, USA, CABI North America Office, p. 301-325, 2009.

WHITEHEAD, A.G. **Plant nematode control**. New York: CAB International, p.384, 1998.