

SCREENING DE POPULAÇÕES DE CAFEIROS (*Coffea arabica* L.) VISANDO À PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLOS AGENTES BIÓTICOS

Lucas Mateus Rivero Rodrigues²; Larissa de Brito Caixeta³; Thiago Adalton Rosa Rodrigues⁴; Murilo Galhardo Carneiro⁵; Masako Toma Braghini⁶; Oliveira Guerreiro Filho⁷.

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café e CNPq

² Bolsista INCT/CNPq, DSc, IAC-SP, lucasmrr@iac.sp.gov.br

³ Bolsista PNP/CAPEs, DSc, IAC-SP, caixetalb@iac.sp.gov.br

⁴ Bolsista CNPq - PIBIC/IAC, Campinas-SP, thiago.adalton@hotmail.com

⁵ Bolsista CNPq - PIBIC/IAC, Campinas-SP, murilogcarneiro@gmail.com

⁶ Bolsista Consórcio Pesquisa Café, BS, IAC-SP, mako@iac.sp.gov.br

⁷ Pesquisador científico, DSc, Instituto Agronômico de Campinas-SP, Bolsista CNPq-DT, oliveiro@iac.sp.gov.br

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi selecionar cafeeiros com resistência múltipla aos nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.), à ferrugem-do-cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) e à mancha-aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*), por meio da recombinação e seleção de fontes de resistência múltipla aos patógenos em auxílio ao programa de melhoramento conduzido pelo Instituto Agronômico de Campinas. Plantas de cafeeiros em geração F₂, obtidas a partir de hibridação entre a linhagem Sarchimor IAC 4933 e o acesso silvestre IAC 2036-6 de *Coffea arabica* (FAO, 1968), foram avaliadas quanto à resistência a *P. syringae* pv. *garcae*, *H. vastatrix* e simultaneamente a *Meloidogyne exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*. Dos 597 cafeeiros F₂ inoculados com *P. syringae* pv. *garcae*, 372 revelaram-se resistentes ao patógeno. Quanto à ferrugem do cafeeiro, apenas 18 plantas das 355 testadas foram suscetíveis à raça II do fungo. As plantas resistentes à ferrugem e à mancha-aureolada foram posteriormente avaliadas quanto à resistência aos nematoides das galhas. Ao final do período experimental foi possível selecionar 35 plantas com altos níveis de resistência aos nematoides e, conseqüentemente, com resistência simultânea a todos os agentes bióticos estudados. Os resultados obtidos evidenciaram importantes aspectos das interações cafeeiros – patógenos: (i) a resistência à mancha-aureolada parece ser de caráter qualitativo, e provavelmente com interações alélicas; (ii) a matriz H 20393-2 não apresentou plantas suscetíveis à raça II de *H. vastatrix*, evidenciando sua natureza homozigota; (iii) a inoculação das plantas com as espécies de *Meloidogyne* em mistura foi eficiente em selecionar cafeeiros com altos níveis de resistência múltipla.

PALAVRAS-CHAVE: café arábica, nematoides-das-galhas, mancha-aureolada, ferrugem-do-cafeeiro, melhoramento genético do cafeeiro.

SCREENING OF COFFEE TREES POPULATIONS (*Coffea arabica* L.) AIMING AT PIRAMIDATION OF RESISTANCE GENES TO MULTIPLE BIOTIC AGENTS

ABSTRACT: The aim of this work was to select coffee trees with multiple resistance to root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.), coffee rust (*Hemileia vastatrix*) and bacterial halo blight (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*), through recombination and selection of multiple resistance sources to pathogens in support of the breeding program conducted by the Instituto Agronômico de Campinas. Coffee trees in F₂ generation, obtained from hybridization between Sarchimor IAC 4933 and wild access IAC 2036-6 of *Coffea arabica* (FAO, 1968), were evaluated for resistance to *P. syringae* pv. *garcae*, *H. vastatrix* and simultaneously to *M. exigua*, *M. incognita* and *M. paranaensis*. Of 597 F₂ coffee plants inoculated with *P. syringae* pv. *garcae*, 372 proved to be resistant to the pathogen. As for the coffee rust, only 18 plants out of 355 tested were susceptible to *H. vastatrix* race II. Plants with resistance to coffee rust and bacterial halo blight were further evaluated for resistance to root knot nematodes. At the end of the experimental period it was possible to select 35 plants with high levels of root knot resistance and, consequently, with simultaneous resistance to all biotic agents studied. The results showed important aspects of coffee - pathogen interactions: (i) the resistance to bacterial halo blight seems to be of qualitative character, and probably with allelic interactions; (ii) matrix H 20393-2 showed no susceptible plants to *H. vastatrix* race II, showing their homozygous nature; (iii) plant inoculation with *Meloidogyne* species was efficient in selecting coffee plants with high levels of multiple resistance.

KEY WORDS: arabica coffee, root knot nematodes, bacterial halo blight, coffee rust, coffee tree breeding.

INTRODUÇÃO

Dentre os patógenos que acometem a cafeicultura, os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.), a ferrugem-do-cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) e a mancha-aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) constituem grande ameaça à produção de cafés, podendo afetar plantações inteiras, limitando o desenvolvimento e a produção dos cafeeiros para a safra seguinte (Silva et al., 2006; Carneiro et al., 2005; Campos & Villain, 2005; Rodrigues et al., 2013). A alta complexidade para o manejo dos patógenos citados faz do controle genético das doenças do cafeeiro a melhor estratégia

de controle, visando cada vez mais a redução do uso de produtos fitossanitários para combatê-las, além de outras inúmeras vantagens socioambientais. Os programas de melhoramento de *C. arabica* buscam a piramidação dos genes de resistência em cultivares altamente produtivas. A propagação seminal e a natureza perene da espécie *C. arabica* são fatores que tornam o tempo para a seleção de indivíduos superiores a partir de hibridações até o registro de uma cultivar relativamente longo. Por este motivo, a escolha dos genitores deve favorecer a piramidação dos genes no sentido de possuírem resistência simultânea a diferentes agentes bióticos e permitir um maior ganho de seleção. Genótipos resistentes à ferrugem vêm sendo selecionadas há cerca de 30 anos, resultando na seleção de cultivares com altos níveis de resistência ao fungo como genótipos do grupo Sarchimor (Pereira et al., 1980) e a cultivar IAC Catuai SH3 portadora de genes de resistência à ferrugem provenientes da introdução 1110-8 (BA-10) (Fazuoli et al., 2015). No entanto, essas cultivares são suscetíveis aos demais problemas fitossanitários da cultura, como os nematoides do gênero *Meloidogyne* que limitam a produção do café arábica em algumas importantes regiões brasileiras e também a mancha-aureolada, doença que vem se revelando gradativamente importante, especialmente em cafezais jovens (Rodrigues et al., 2013). Com relação à resistência a nematoides, programas de melhoramento do cafeeiro são conduzidos em duas estratégias: a seleção de cultivares porta-enxerto resistentes de *C. canephora* e o desenvolvimento de cultivares pé-franco resistentes de *C. arabica* (Gonçalves & Silvarolla, 2001). A resistência múltipla a diversos agentes bióticos ainda não estão presentes em cultivares com caracteres agrônômicos de interesse, por este motivo faz-se necessário a busca em acessos mantidos em Bancos de Germoplasma da espécie. Recentemente, Fatobene et al. (2017) ao estudar a resistência de cafeeiros silvestres originários da Etiópia, região de origem e diversificação da espécie, identificou introduções com resistência múltipla aos principais nematoides nocivos à cultura, *M. paranaensis*, *M. incognita* e *M. exigua*, sendo a introdução IAC 2036-6, provavelmente em homozigose para as características. Posteriormente, Tomiyama et al. (2017) observou que esta introdução também é fonte de resistência à mancha-aureolada. Recombinações entre este vasto germoplasma têm sido realizadas no sentido de reunir estes diferentes atributos em uma mesma cultivar, aliando-os a outras características importantes como a produção de frutos, o porte baixo das plantas, a maturação mais uniforme dos frutos e a alta porcentagem de sementes do tipo chato. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi selecionar cafeeiros com resistência múltipla aos nematoides-das-galhas, à ferrugem-do-cafeeiro e à mancha-aureolada, por meio da identificação de cafeeiros portadores de resistência múltipla aos agentes bióticos em gerações precoces do programa de melhoramento conduzido pelo Instituto Agrônômico de Campinas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal: Sementes originadas de polinização aberta de cafeeiros híbridos, sintetizados a partir da linhagem Sarchimor IAC 4933 e IAC 2036-6 o acesso silvestres da espécie *C. arabica* (FAO, 1968), descritos na tabela 1, foram coletadas, processadas e germinadas em areia. No estágio de palito de fósforo as plântulas foram transplantadas para tubetes (180cm³) contendo substrato adicionado do adubo Basacote® (3g/L⁻¹) e mantidas em casa-de-vegetação. No total, foram avaliadas cinco populações de cafeeiros F₂ em relação à resistência à mancha-aureolada, à ferrugem e a três espécies de *Meloidogyne*. Em todos os experimentos foram adotados como controle suscetível, plantas da cultivar de *C. arabica* Mundo Novo IAC 515-20.

Seleção de plantas resistentes à mancha-aureolada: Após o desenvolvimento do primeiro par de folhas, as plântulas tiveram as folhas cotiledonares inoculadas pela metodologia de abrasão (Rodrigues et al. 2017) com suspensão da bactéria *P. syringae* pv. *garcae* (ajustada para conter aproximadamente 10⁸ UFC/mL⁻¹) oriunda da linhagem IBSBF 1197 da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico. Em seguida as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação com umidade relativa entre 70-80%. As avaliações da severidade da mancha-aureolada foram efetuadas momento em que todas as plantas da cultivar Mundo Novo IAC 515-20 de *C. arabica*, utilizadas como controle experimental suscetível, alcançaram os sintomas correspondentes à nota máxima da escala de pontos, descrita a seguir: 0 = ausência de clorose e/ou anasarca, ou ainda, reação de hipersensibilidade ao redor das lesões; 1 = início de amarelecimento ao redor das puncturas, até 10% de área foliar apresentando sintomas da doença; 2 = 11-25% da área inoculada apresentando anasarcas, podendo ou não estar circundadas por halo amarelado; 3 = 26-50% da área inoculada anasarcada, halo amarelado pronunciado ao redor das puncturas; 4 = 51-75% da área necrosada, halo amarelado por toda área inoculada; 5 = 100% da área inoculada necrosada.

Seleção de plantas resistentes à ferrugem-alaranjada: As plantas que apresentaram resistência à mancha-aureolada foram testadas para a confirmação da presença de alelos de resistência à ferrugem. Para tanto, discos foliares foram obtidos a partir de folhas jovens e acondicionados em caixa contendo espuma umedecida para as inoculações. O inóculo consistiu em suspensão de uredósporos da raça II do fungo de *H. vastatrix*, coletados em plantas diferenciadoras de raças do fungo, mantidas no Centro de Café Alcides Carvalho, do IAC. A concentração da suspensão foi ajustada para conter aproximadamente 1,5x10⁵ uredósporos/mL⁻¹. Os discos foram inoculados com uma gota da suspensão de uredósporos e posteriormente mantidos em câmaras úmidas, segundo método de Eskes & Toma-Braghini (1981). Dois parâmetros foram adotados para as avaliações: Densidade de lesões: avaliado através de escala de 0 a 9 pontos, sendo 0, atribuído às plantas resistentes, sem sintomas e 9 pontos, às plantas com alta incidência de lesões grandes, regulares e esporulação intensa; Tipo de reação das lesões: avaliado por escala de 0 atribuído às plantas imunes sem lesões a 4 pontos àquelas suscetíveis com esporulação intensa.

Triagem de populações F₂ de cafeeiros resistentes a *Meloidogyne* spp: Os cafeeiros selecionados como resistentes à mancha-aureolada e ferrugem do cafeeiro foram inoculados simultaneamente com três espécies de *Meloidogyne* spp. Populações puras das três espécies foram multiplicadas em cafeeiros suscetíveis e à exceção de *M. exigua*, em tomateiros. Os inóculos foram obtidos a partir de extração de raízes das plantas hospedeiras altamente infestadas utilizando-se o método de extração de Hussey & Baker (1973) modificado por Bonetti & Ferraz (1987). Plantas com 4-5 pares de folhas mantidas em vasos de 800 ml contendo mistura de solo e areia 1:1 (v:v), esterilizado em autoclave foram inoculadas com 3.000 ovos/juvenis (J2) com mistura, em iguais proporções, das espécies *M. incognita*, *M. exigua* e *M. paranaensis*. A avaliação das plantas foi realizada 180 dias após a inoculação. A triagem foi feita levando em consideração o índice de dano (ID), por meio de escala de 0 a 5 pontos, onde 0 = sistemas radiculares totalmente íntegros; 1 = presença de raros e pequenos engrossamentos nas raízes secundárias; 2 = pequenos engrossamentos em porcentagem inferior a 25% do sistema radicular; 3 = engrossamentos e início de necrose em 25 a 50% do sistema radicular; 4 = perda de raízes secundárias decorrente de necrose observada em 51 a 75% do sistema radicular; e 5 = perda acentuada de raízes secundárias com destruição superior a 75 % do sistema radicular. As plantas foram consideradas resistentes quando ID≤2, e suscetíveis quando ID>2 (Hussey & Jansen, 2002; Bertrand et al., 2000). As plantas com ID<2 foram selecionadas e clonadas, enquanto que as que apresentaram ID>2 foram descartadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação de plantas resistentes à mancha-aureolada: Plantas das cultivares Mundo Novo IAC 515 (n= 22) utilizadas como controle experimental, mostraram-se suscetíveis a *P. syringae* pv. *garcae* e, a nota máxima da escala de pontos alcançada aproximadamente aos 30 dias após a inoculação.

Dos 597 cafeeiros F₂ inoculados com a bactéria, 372 revelaram-se resistentes ao patógeno, 225 plantas mostraram-se igualmente suscetíveis ao controle experimental, a cultivar Mundo Novo IAC 515.

A progênie H 20393-13 segregou na proporção aproximada de 3 plantas resistentes para 1 suscetível (Tabela 1), indicando caráter qualitativo da característica herdado do genitor etíope IAC 2036-6. Entretanto, é necessário analisar os retrocruzamentos recíprocos para elucidar o modo de ação e o número de genes responsáveis pela resistência à mancha-aureolada, uma vez que as quatro demais progênies, originárias do mesmo cruzamento, apresentaram distorções em relação à segregação esperada para a herança governada por um gene dominante, mas com maioridade numérica de plantas resistentes, exceto na progênie H 20393-11.

Tabela 1. Fenotipagem de populações de cafeeiros F₂ em relação à resposta à infecção pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, agente causal da mancha-aureolada, a *Hemileia vastatrix*, agente causal da ferrugem alaranjada e a mistura das espécies *Meloidogyne incognita*, *M. exigua* e *M. paranaensis* causadores de lesões e galhas nas raízes.

População	n=	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>		n=	<i>Hemileia vastatrix</i>		n=	<i>Meloidogyne</i> spp.	
		Escala de Pontos			DL / TR			Índice de dano	
		R	S		R	S		R	S
		(0-1)	(2-5)		(0-2 / 0-1)	(3-9 / 2-4)		(1-2)	(3-5)
H 20393-1	122	78	44	79	75	4	73	0	73
H 20393-2	125	76	49	73	73	0	71	9	62
H 20393-3	118	74	44	70	69	1	71	3	68
H 20393-11	109	52	57	46	38	8	36	4	32
H 20393-13	123	92	31	87	82	5	82	19	63

H 20393- = Híbrido entre a linhagem Sarchimor IAC 4933 e o acesso da Etiópia IAC 2036-6. Escala de pontos para avaliação da severidade da mancha-aureolada (Rodrigues et al., 2017). DL / TR = Parâmetros utilizados para avaliação da severidade da ferrugem alaranjada (Esques e Braghini, 1987). Índice de dano = Escala de pontos para avaliação da severidade de danos em raízes (Hussey & Jansen, 2002).

Avaliação de plantas resistentes à ferrugem do cafeeiro: Todas as plantas das cultivares Mundo Novo IAC 515 (n= 11) utilizadas como controle experimental mostraram-se suscetíveis a *H. vastatrix* apresentando nota máxima na escala de pontos após 20 dias da inoculação. Dos 355 cafeeiros F₂ inoculados com o a raça II do fungo *H. vastatrix*, 337 revelaram-se resistentes (Tabela 1), apresentando taxas de resistência variando de 82% (H 20393-11) a 100% (H 20393-2). A alta incidência de cafeeiros resistentes se deve ao fato de que, a raça inoculada (raça II) apresenta gene de virulência v5, em contrapartida, a linhagem Sarchimor IAC 4933 (originária da hibridação entre o híbrido de timor 832/2 e a variedade exótica Villa Sarchi) doadora de genes de resistência à ferrugem contem, provavelmente os fatores de resistência SH5, 6, 7, 8, e 9, sendo estes genes de resistência capazes de impedir a colonização desta raça do patógeno. Neste sentido, é provável que a matriz H 20393-2 contenha a melhor combinação dos genes de resistência, uma vez que não apresentou plantas suscetíveis em 73 indivíduos avaliados.

Avaliação de plantas resistentes aos nematoides das galhas: Todas as plantas das cultivares Mundo Novo IAC 515 (n= 15) utilizadas como controle experimental mostraram-se suscetíveis às três espécies de *Meloidogyne*, apresentando índices de dano correspondentes a 4 - 5 pontos da escala, fato que valida a eficiência das inoculações com a mistura das espécies de *Meloidogyne* e a seleção efetuada.

Dentre as populações F₂ avaliadas, foi possível encontrar plantas resistentes às três espécies nos híbridos H 20393-2, H 20393-3, H 20393-11 e H 20393-13, sendo esta última a que apresentou a maior porcentagem de plantas resistentes, 23,75% (Tabela 1). Provavelmente esta matriz contém maior número de genes de resistência aos nematoides em relação às demais avaliadas. As plantas resistentes foram selecionadas e clonadas para avanço de gerações e testes para cada espécie de *Meloidogyne* isoladamente.

Os resultados deste trabalho evidenciam a resistência de 35 cafeeiros portadores de resistência múltipla à mancha-aureolada, à ferrugem alaranjada e aos nematoides *M. incognita*, *M. exigua* e *M. paranaensis*. Ainda, as matrizes H 20393-2, H 20393-3 e H 20393-13 originaram as progênies com os maiores índices de resistência múltipla aos patógenos. Por fim, a resistência à mancha-aureolada é, provavelmente, de caráter qualitativo, assim como às raças individuais de *H. vastatrix*;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTRAND, B.; PEÑA DURÁN, M.X.; ANZUETO, F.; CILAS, C.; ETIENNE, H.; ANTHONY, F.; ESKES, A.B. Genetic study of *Coffea canephora* coffee tree resistance to *Meloidogyne incognita* nematodes in Guatemala and *Meloidogyne* sp. nematodes in El Salvador for selection of rootstock varieties in Central America. *Euphytica*, v.113, p.79-86, 2000.
- BONETTI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.6, p.553, 1981.
- 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: CAB International, 2005. p.529-579.
- 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*, v. 29, p. 233-242, 2005.
- Eskes, A. B. & Toma-Braghini, M. (1981). Assessment methods for resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). *FAO Plant Protection Bulletin*, 29, 56-66.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (1968) Coffee mission to Ethiopia 1946 – 1965 (1968) Report, FAO. Ed. Rome, Italy, 200p.
- Fatobene BJR, Andrade VT, Aloise GS, Silvarolla MB, Gonçalves W, Guerreiro Filho O (2017) Wild *Coffea arabica* resistant to *Meloidogyne paranaensis* and genetic parameters for resistance. *Euphytica* 213: 1-9.
- FAZUOLI, L. C.; MASAKO BRAGHINI, M. T.; GUERREIRO FILHO, O.; SILVAROLLA, M. B.; GONÇALVES, W.; MISTRO, J. C.; GALLO, P. B. Cultivar IAC Catuaí SH3, uma contribuição do IAC para a Cafeicultura. In: IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Curitiba – PR, 2015.
- GONÇALVES, W.; SILVAROLLA, M. B. Nematoides parasitos do cafeeiro. In: Zambolim, L. (Ed.). *Tecnologias de produção de café com qualidade*. Viçosa: UFV, p.199-268, 2001.
- HUSSEY, R. S.; JANSSEN, G. J. W. Root-knot nematode: *Meloidogyne* species. In: STARR, J. L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (Eds.) *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. Wallingford, UK: CAB International. p.43–70, 2002.
- HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Report*, v.57, p.1025-1028, 1973.
- PEREIRA, A.A.; BARTHOLO, G.F.; CHAVES, G.M. "Sarchimor" - Nova cultivar resistente à ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.). In: *Projeto Café*. Viçosa, EPAMIG-ESAL-UFMG-UFG, 1980. p.170-174.
- RODRIGUES, L. M. R.; ALMEIDA, I. M. G.; PATRÍCIO, F. R. A.; BERIAM, L. O. S.; MACIEL, K. W.; BRAGHINI, M. T.; GUERREIRO FILHO, O. Mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. *Boletim Técnico IAC*, 122. Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Campinas, 2013. 24p.
- RODRIGUES, L. M. R.; ALMEIDA, I.M.G.; PATRICIO, F.R.A.; BERIAM, L.O.S.; MACIEL, K.W.; BRAGHINI, M. T.; GUERREIRO FILHO, O. Aggressiveness of strains and inoculation methods for resistance assessment to bacterial halo blight on coffee seedlings. *Journal of Phytopathology*, v. 165, p. 105-114, 2017.
- SILVA, M. C; VÁRZAI, V.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; AZINHEIRAI, H. G.; FERNANDEZ, D.; PETITOT, A. S.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P.; NICOLE, M. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Brazilian Journal Plant Physiology*, Londrina, v. 18, n. 1, p. 119-147, Jan./Mar. 2006.
- TOMIYAMA, A. L. M. R., RODRIGUES, L. M. R., FATOBENE, B. J. R., DESTÉFANO, S.A.L., GUERREIRO FILHO, O. Acessos silvestres de *Coffea arabica* com resistência múltipla à mancha-aureolada e aos nematoides-das-galhas. IN: 40º Congresso Paulista de Fitopatologia, 2017, Campinas, SP, 2017.