



**REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA
DA AMAZÔNIA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PPG-BIONORTE
DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA
EM REDE
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA**



**ESTRATÉGIAS DE CONTROLE PARA NEMATOIDE DAS GALHAS
(*Meloidogyne incognita*) NO CAFEIEIRO**

VANEIDE ARAÚJO DE SOUSA RUDNICK

Porto Velho – RO

2020

VANEIDE ARAÚJO DE SOUSA RUDNICK

ESTRATÉGIAS DE CONTROLE PARA NEMATOIDE DAS GALHAS
(Meloidogyne incognita) **NO CAFEIEIRO**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Fundação Universidade Federal de Rondônia, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Conservação.

Orientador(a): Prof. Dr. Cléberon de Freitas Fernandes

Co-orientador (a): Prof. Dr. José Roberto Vieira Junior

Porto Velho – RO

AGOSTO/2020

VANEIDE ARAÚJO DE SOUSA RUDNICK

ESTRATÉGIAS DE CONTROLE PARA NEMATOIDE DAS GALHAS
(Meloidogyne incognita) **NO CAFEIRO**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Fundação Universidade Federal de Rondônia, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Conservação.

Aprovada em / /

Banca examinadora

Prof. Dr. Cleberon de Freitas Fernandes (Orientador)
Embrapa Agroindústria Tropical

Prof. Dr. Rodrigo Barros Rocha
Embrapa Rondônia

Prof. Dr. Marcelo Curitiba Espíndula
Embrapa Rondônia

Prof. Dr. Marlon Vagner Valentim Martins
Embrapa Agroindústria Tropical

Prof. Dr. Victor Mouzinho Spinelli
Universidade Federal de Rondônia - UNIR

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Eugênio Rudnick, pelo companherismo,
compreensão e incentivos constantes. Aos meus filhos
Thainá Rudnick e Enricko Rudnick, pela compreensão, apoio e contribuição.

AGRADECIMENTOS

A minha família, meu esposo Eugênio Rudnick, meus filhos Thainá Rudnick e Enricko Rudnick. Pela compreensão, apoio e incentivo, sempre.

Aos meus amigos e compaheiros de trabalho Albertina Marangoni Botega, e Marcos Rodrigues Gomes da Silva, pelo apoio e incentivo pela concessão de horários especiais para que eu pudesse realizar a pesquisa.

Aos meus orientadores Cleberon de Freitas Fernandes e José Roberto Vieira Junior, pela oportunidade, ensinamentos, companheirismo e amizade.

A toda equipe da Embrapa Rondônia, em especial aos pesquisadores Rodrigo Barros Rocha, Marcelo Curitiba Espíndula, Rogério Sebastião Corrêa da Costa e ao meu ajudante na motagem e condução dos ensaios, o senhor Antônio Miranda Marques.

Aos meus colegas que colaboraram na realização da pesquisa, Elize Francisca Mendes dos Anjos, Solange Aparecida Rodrigues Mariobo, Francisco Paiva Uchoa, Ludmila Coutinho da Silva, Talyssa Mendes e Silva, Rebeca Mona de Lima Silva, Gleice Ribeiro da Silva, Matheus Cunha Figueiredo, Mariana Leão de Souza, Liliani Ogrodowczyk, Taciano da Silva Hollanda.

A coordenação regional do Bionorte na pessoa da Dra Carolina Rodrigues da Costa Doria.

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CPC), a Fundação de Amparo ao Desenvolvimento das Ações científicas e Tecnológicas e à Pesquisa do Estado de Rondônia (FAPERO) e a Embrapa Rondônia pelo apoio financeiro.

RESUMO

O nematoide *Meloidogyne incognita* constitui um dos principais fatores limitantes ao estabelecimento e a sustentabilidade das lavouras cafeeiras no estado de Rondônia. O controle químico (nematicida) tem sido inviável para o cafeeiro, uma vez que, seu uso torna-se frequente em áreas infestadas, causando assim alto custo econômico e ambiental. Visando alternativas de controle que possa minimizar e ou substituir o uso de nematicidas químicos, objetivou-se nesse trabalho testar estratégias de controle contra *M. incognita* no cafeeiro. Este estudo testou três estratégias de controle, sendo: Caracterização de plantas resistentes a *M. incognita* componentes dos genótipos do programa de melhoramento genético da Embrapa Rondônia; Controle biológico utilizando os microrganismos, *Glomus macrocarpum* (Fungos Micorrizicos Arbusculares - FMA) e cepas da rizobactéria *Bacillus cereus*; Controle com extratos aquosos de plantas dos gêneros *Mucuna* e *Crotalaria*. Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação em mudas de cafeeiro com seis meses, conduzidas individualmente em vasos de 8 L, inoculadas com 5.000 ovos. Os parâmetros avaliados foram: número de galhas por grama de raiz (NG), número de ovos e juvenis (J2) por planta (NO) e fator de reprodução (FR). Os resultados obtidos foram: Para Controle genético, seis genótipos (BRS3210, C12, BRS2299, BRS2314, BRS3137 e BRS1216) identificados como resistentes. Para controle biológico os tratamentos: micorriza isolado, rizobactérias isolado (estirpes Rz216, Rz216 e Rz48), e interação (rizobactérias + micorriza), na presença de nematoide, mostraram eficiência de controle similares ao tratamento nematicida. Para os extratos aquosos, observou-se que: *Crotalaria juncea* ramo seco (CJRS), *C. ochroleuca* folha seca (COFLS), *C. spectabilis* folha seca (CEFIS), *Mucuna* preta ramo seco (MPRS), *C. juncea* fruto fresco (CJFrF), *C. spectabilis* fruto fresco (CEFrF), *Mucuna* preta folha seca (MPFIS), *C. ochroleuca* ramo fresco (CORF) e *C. spectabilis* fruto seco (CEFrS) expressaram resultado similar ao nematicida. Observou-se que as estratégias avaliadas se mostraram eficientes para o controle de *M. incognita* em cafeeiro. Estudos posteriores são necessários para identificação dos mecanismos de ação e constituintes químicos ativos, viabilizando, assim, novas alternativas de controle para o nematóide das galhas no cafeeiro na região Amazônica.

Palavras-chaves: Resistência genética; Controle alternativo, Controle biológico, *Coffea canephora*

ABSTRACT

The nematode *Meloidogyne incognita* is one of the main factors limiting the establishment and sustainability of coffee crops in the state of Rondônia. Chemical control (nematicide) has been unfeasible for coffee, since its use is frequent in infested areas, thus causing high economic and environmental costs. Aiming at control alternatives that can minimize and or replace the use of chemical nematicides, the objective of this work was to test control strategies against *M. incognita* in coffee. This study tested three control strategies, being: Characterization of plants resistant to *M. incognita* components of the genotypes of the genetic improvement program of Embrapa Rondônia; Biological control using the microorganisms, *Glomus macrocarpum* (Arbuscular Mycorrhizal Fungi - AMF) and strains of the *Bacillus cereus* rhizobacterium; Control with aqueous extracts of plants of the genera *Mucuna* and *Crotalaria*. The tests were carried out in a greenhouse on six-month-old coffee seedlings, conducted individually in 8 L pots, inoculated with 5.000 eggs. The evaluated parameters were: number of galls per gram of root (NG), number of eggs and juveniles (J2) per plant (NO) and reproduction factor (RF). The results obtained were: For Genetic Control, six genotypes (BRS3210, C12, BRS2299, BRS2314, BRS3137 and BRS1216) identified as resistant. For biological control, the treatments: isolated mycorrhiza, isolated rhizobacteria (strains Rz216, Rz216 and Rz48), and interaction (rhizobacteria + mycorrhiza), in the presence of nematodes, show similar control efficiency to the nematicide treatment. For aqueous extracts, it was observed that: *Crotalaria juncea* dry branch (CJRS), *C. ochroleuca* dry leaf (COFLS), *C. spectabilis* dry leaf (CEFIS), Black *Mucuna* dry branch (MPRS), *C. juncea* fresh fruit (CJFrF), *C. spectabilis* fresh fruit (CEFrF), *Mucuna* black dry leaf (MPFIS), *C. ochroleuca* fresh branch (CORF) and *C. spectabilis* dry fruit (CEFrS) expressed similar results to the nematicide. It was observed that the evaluated strategies proved to be efficient for the control of *M. incognita* in coffee. Further studies are needed to identify the mechanisms of action and active chemical constituents, thus enabling new control alternatives for the gall nematode in coffee in the Amazon region.

Keywords: Genetic resistance; Alternative control, Biological control, *Coffea canephora*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Objetivos Geral.....	10
1.1.1. Objetivos Especificos	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. Nematoides parasitas de plantas.....	11
2.2. Nematóide <i>Meloidogyne incognita</i>	12
2.3. Cafeeiro <i>Coffea canephora</i>	13
2.4. <i>C. canephora</i> x <i>M. incognita</i>	15
2.5. Métodos alternativos ao controle químico (nematicida) para nematoides das galhas	17
3. REFERÊNCIAS.....	20
ARTIGO 1: RESISTANCE OF NEW <i>Coffea canephora</i> CLONES TO ROOT-KNOT NEMATODE (<i>Meloidogyne incognita</i>) IN THE WESTERN AMAZON.....	32
ARTIGO 2: Interaction Between Rhizobacteria and Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the coffee root-knot nematode.....	49
ARTIGO 3: Extratos aquosos de plantas do gênero <i>Crotalaria</i> e <i>Mucuna</i> contra <i>M. incognita</i>	73
4. CONCLUSÃO	86

1. INTRODUÇÃO

Rondônia é o principal estado produtor de café da região amazônica, o 5º maior produtor nacional e o 2º maior no cultivo do café Conilon (CONAB, 2020; IBGE, 2020). No Estado a cafeicultura encontra-se em plena expansão. Está atualmente com 71,1 mil hectares, sendo 64,9 em produção, com estimativa de 2,4 milhões de sacas. Há expectativa de aumento de 6,6% da área em produção para safra 2020.

A expansão da cafeicultura no Estado vem ocorrendo em áreas já antropizadas, na maior parte em áreas de pastagens degradadas. O que tem causado, problemas com incidência de doenças do sistema radicular em lavouras em formação, com destaque para nematoides (Ali et al., 2017; Cesarano et al., 2017; Marques et al., 2019; Avelino et al., 2019).

Os nematoides parasitas de plantas estão entre as importantes restrições na produção agrícola. Sendo capaz de causarem perdas de produção que podem chegar até a 66% dependendo da espécie e da cultura (Hassan et al., 2013; Talwana et al., 2015; Yadav, 2017). No cafeeiro podem reduzir em média 15% da produtividade (Talwana et al., 2015; Lopes e Ferraz, 2016; Lima et al., 2019). Por ser tratar de patógeno de solo o controle de nematoides parasitas de plantas é uma prática complexa. Exigindo a integração de métodos de controle, sendo os mais utilizados, cultivares resistentes, rotação de culturas e o controle químico, dos quais o controle químico é o mais frequente (Ferraz, 2018; Bernard, Egnin e Bonsi et al., 2017; Zasada et al., 2018, Sikandar et al., 2020).

Vários gêneros e espécies de nematoides atacam a planta do cafeeiro (Villain et al., 2018; Maghuly, Jankowicz-Cieslak e Bado, 2020). Sendo o gênero *Meloidogyne* citados como os de maior ocorrência (Villain et al., 2013; Zambolin, 2016; Huyen et al., 2018; Liah, Indarti e Putra, 2018; Oliveira e Rosa, 2018; Lima et al., 2019). Em Rondônia segundo estudos realizados por Vieira Junior, et al. (2015) o espécie *Meloidogyne incognita* é destacada como principal.

Considerando a dificuldade de controle, para *M. incognita*, visto sua forma de parasitismo, e sua ocorrência generalizada no estado de Rondônia. E ainda a escassez de nematicidas disponíveis no mercado. Levando em consideração que o cafeeiro é uma cultura perene, inviabilizando técnicas de controle como a rotação de culturas. Buscou-se testar como estratégias de controle em substituição a nematicidas químicos, usualmente produtos com alto grau de toxicidade, conforme sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) foram testadas neste trabalho. Resistência genética de genótipos de *C. canephora* provenientes do programa de melhoramento da Embrapa Rondônia para desenvolvimento de cultivares adaptadas ao bioma amazônico. Controle

biológico e controle fitoquímico com utilização de extratos naturais de plantas. Visando garantir sustentabilidade econômica e ambiental, para mitigar danos causados por *M. incognita* nos cafezais do Estado de Rondônia.

1.1.Objetivos Geral

Testar alternativas ao controle químico contra nematoides da galhas *Meloidogyne incognita* em plantas do cafeeiro.

1.1.1. Objetivos Especificos

- Identificar genótipos de *C. canephora*, em fase final de avaliação, o resistentes a *M. incognita* para subsidiar o lançamento de novas cultivares do programa de melhoramento genético do cafeeiro da Embrapa Rondônia.
- Verificar a eficiência nematicida de agentes biológicos: Rizobactérias (*Bacillus cereus*) e Fungos Micorrizicos Arbusculares (*Glomus macrocarpum*), contra *M. incognita* em plantas de *C. canephora*.
- Avaliar o efeito nematicida e nematostático de extratos aquosos de plantas de Crotalaria (*Crotalaria juncea*, *C. ochroleuca* e *C. spectabilis*) e Mucuna (*Mucuna aterrina* e *M. pruriens*), contra *M. incognita* em plantas de *C. arabica*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Nematoides parasitas de plantas

Nematoides são vermes de corpo cilíndrico, não segmentado e alongado, o nome nematoide vem da palavra grega nema (fio). Pertencem reino Animalia, filo Nematoda. Possuem a parede corporal constituída de três camadas principais (cutícula, epiderme e músculos somáticos), apresentam tamanhos variados (0,5 mm a 10 m), respiração tegumentar (difusão) e sistema digestório completo. A maioria é dioica e apresenta dimorfismo sexual (Warton, 2012; Shah e Mahamood, 2017; Ferraz, 2018).

Possui, geralmente, um ciclo de vida composto por seis estágios ou instares sendo: ovo (ou embrião), quatro estágios juvenis denominados de J1, J2 J3 e J4 e adulto. O estágio juvenil J1 e J2 ocorrem antes da eclosão. O J2 eclodido muda para J3 e depois para J4 que muda para a fase adulta (Bridge e Starr, 2007; Stock e Goodreich-Blair, 2012; Van Den Berg, Marais e Swart, 2017; Shah e Mahamood, 2017; Ferraz, 2018).

Habitam grande parte dos ecossistemas terrestres e aquáticos, devido a sua vasta cadeia alimentar que compreende de predadorismo e parasitismo de várias espécies do reino Animalia e Plantae. Os nematoides podem ser classificados ainda como de vida livre sendo os que se alimentam de bactérias, fungos, onívoros e predadores. E os parasitas que podem ser onívoros e herbívoros (Kiontke e Fitch, 2013; Song et al., 2017; Van Den Hoogen et al., 2019).

Os herbívoros, são pequenos, com tamanhos entre 12 mm a 250 mm de comprimento e 15 a 35 mm de largura. Eles podem infestar quase todas as partes das plantas dependendo da espécie (Bird e Warner, 2018; Mitiku, 2018). No entanto, o impacto econômico mais importante na agricultura é causado por espécies que parasitam as raízes das plantas (Talwana et al., 2015; Toumi et al., 2017; Coyne et al., 2018; Thomas e Nischwitz, 2018).

Os nematóides parasitas de raízes podem ser ectoparasitas e/ou endoparasitas migratórios e/ou sedentários possuem estruturas especializadas denominado de estiletos que permitem a penetração na raiz, além da alimentação no caso de endoparasitas, a exemplo os nematoides de nódulos ou cisto, que induzem complexas estruturas de alimentação nas raízes de seus hospedeiros (Bridge e Starr, 2007; Kionthe e Fitch, 2013; Ferraz e Brow, 2016; Lopes e Ferraz, 2016; Iqbal e Jones, 2017; Palomares-Rius et al., 2017; Berg, Marais e Swart, 2017; Ferraz, 2018).

Entre os gêneros de maior importância na agricultura mundial pode-se citar: *Meloidogyne* (nematoides das galhas); *Heterodera* e *Globodera* (nematoides dos cistos);

Pratylenhus (nematoides das lesões radiculares); Radopholus (nematoides do buraco); Rotylenchulus (o nematoide reniforme) e Nacobbus, o falso nematoide das raízes (Nicol et al., 2011; Jones et al., 2013; Singh, Hodda e Ash, 2013; Hassan et al., 2013; Iqbal e Jones, 2017; Mitiku, 2018; Bélair et al., 2018).

2.2. Nematoide *Meloidogyne incognita*

O gênero *Meloidogyne* Goeldi (1887) tem sido descrito na literatura como os fitonematoides com maior número de espécies parasitárias de plantas. Cerca de 100 espécies já foram descritas, sendo quatro, *M. arenaria* (Neal) Chitwood, *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *M. javanica* (Treud) Chitwood e *M. hapla* Chitwood, consideradas mais importantes, devido à ampla distribuição geográfica e ao seu grau de polifagia, que atinge grande parte das culturas agrícolas (Carneiro, Lima e Correia, 2017; Bernard, Egnin e Bonsi, 2017; Mitiku, 2018; Ferraz, 2018).

Dentro o gênero *Meloidogyne* a espécie *M. incognita* é identificada como a de maior ocorrência, com presença em quase todo hemisfério sul, principalmente em regiões de clima tropical, que compreendem a faixas de temperaturas entre 18 e 30 °C. No Brasil, segundo dados disponibilizados pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (2019), existem 1560 citações literárias, que compreendem ao período de 1878 a 2006, ao gênero *Meloidogyne* e 40% é inerente a *M. incognita* (Singh et al, 2013; Jones, et al., 2013).

A biologia do *M. incognita* lhe garante grande eficiência de propagação, proporcionando e alto índice de parasitismo. Sua reprodução se dá por via assexuada, partenogênese mitótica. Fêmeas são dominantes na espécie. O ciclo reprodutivo é de 25 dias em média, em condições favoráveis (Ferraz e Brown, 2016; Ferraz, 2018).

O ciclo de vida de *M. incognita* consiste em seis estágios ovo, J1, J2, J3, J4 e adultos. Sendo apenas o estágio J2 (móvel), capaz de infectar as raízes do hospedeiro. Após a infecção os estágios adicionais de desenvolvimento ocorrem dentro da raiz da planta, ou seja, nos locais de alimentação, no entanto, os juvenis J3 e J4 têm natureza sedentária (Escobar et al, 2015). O J4 muda para adulto fêmea ou macho (raramente), o macho adulto recupera sua motilidade e são capazes de deixar a raiz, enquanto as fêmeas permanecem sedentárias, aumentam seu tamanho e passam a ter forma globosa, denominada de formato pêra (fruta) e ovopositam seus ovos fora da raiz em uma matriz gelatinosa de glicoproteína que serve como proteção contra predadores e perda de água, uma fêmea produz em torno de 400 ovos por ciclo (Bird, Opperman e Williamson, 2009; Perry e Moens, 2011; Escobar et al, 2015; Bernard, Egnin e Bonsi, 2017; Sikandar et al., 2020).

O J2 ao penetrar a raiz da planta induzem a formação de um grupo de células chamadas sincitios, células gigantes ou galhas nas proximidades da vasculatura radicular (Bartlem, Jones e Hammes, 2014; Rodiuc et al., 2014; Escobar et al, 2015). A formação de células gigantes é facilitada pela liberação de compostos proteicos (efetores) e secreções não proteicas como o propósito de manipular o funcionamento da célula para, primeiro, suprimir o sistema imunológico do hospedeiro e, segundo, estabelecer o sitio de alimentação (Rehman, Gupta e Goyal, 2016; Palomares-Rius et al., 2017; Siddique e Grundler, 2018; Sato, Kadota e Shirasu, 2019; Vieira e Gleason, 2019).

O estabelecimento do sítio de alimentação (células gigantes) além de causar a deformação física da raiz, servem de entradas para outros patógenos oportunistas e prejudica a translocação de seiva, que podem causar redução no crescimento, amarelamento e casos mais severos a seca e morte da planta (Ferraz, 2018; Mitiku, 2018; Sikandar et al., 2020).

2.3. Cafeeiro *Coffea canephora*

O café, bebida oriunda da terra dos grãos do cafeeiro, é uma das bebidas mais consumidas no mundo. Sua disseminação e propagação se iniciaram após o domínio de técnicas de plantio e preparo da bebida pelos árabes (Melo, Silva e Nunes, 2018; Ataides, Cunha e Santos, 2019).

A produção comercial na cafeicultura provém basicamente de duas espécies: *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. A espécie *C.arabica*, conhecida popularmente como café arábica, apresenta bebida mais leve, adocicada, o que lhe proporcionou certa preferência do consumidor, logo, maior valor comercial, representando 59,47% da produção mundial (IOC, 2020). Enquanto à espécie *C. canephora* conhecida popularmente como café canéphora, conilon e robusta, por apresentar bebida mais forte com maior amargor e menor acidez é comercialmente utilizado para compor blends com café arábica e fabricação de café expresso e cafés solúveis (Innocentini, 2015; Ferrão et al, 2017; IOC, 2020).

A espécie *C. canephora* é diploide ($2n = 22$), uma das principais características que a diferencia da espécie *C. arabica* que é tetraploide ($2n = 44$), e é uma planta alógama, com fecundação cruzada, gerando uma variabilidade genética maior comparada a *C. arabica* que é autógama (Hamon et al., 2015; Looor SolóRzano et al., 2017; Akpertey et al., 2018; Dubberstein et al., 2020).

Devido à autoincompatibilidade, a propagação vegetativa para a espécie *C. canephora* é mais recomendada (Partelli et al., 2014; Ramalho et al., 2016). Com ressalvas para

o plantio ser composto de mais de um clone para que ocorra a fertilização (Melo e Sousa, 2011; Fonseca et al., 2013; Moraes et al., 2018).

A diversidade genética da *C. canephora* é promissora para o desenvolvimento de novas variedades via hibridação com melhor rendimento e resistência a pragas e doenças, pois populações com diversidade genética reduzida como é o caso de *C. arabica* são mais vulneráveis às mudanças ambientais (Camargo, 2010; Venturini et al., 2013; Bragança et al., 2016).

Variedades de *C. canephora* são mais adaptáveis a áreas de cultivos com diferença na precipitação efetiva, taxa de evapotranspiração, topografia, capacidade de retenção de umidade do solo, textura do solo, taxa de infiltração do solo e escoamento. Basicamente são duas as principais variedades cultivadas para fins comerciais, Conilon e Robusta (Ferreira et al., 2019). Estudos de modelagem climática, para o mapeamento das áreas de cultivo com café, preveem redução das propensas áreas produtoras de *C. arabica* com a mesma qualidade de bebida típica existente atualmente. (Jesus Júnior et al., 2012; Martins et al., 2015; Hameed et al., 2020).

O consumo de café é emergente em todo o mundo, especialmente no sudeste da Ásia, na Península Arábica e Europa Oriental, o que tende a impulsionar o setor produtivo (Vegro e Almeida, 2020). Atualmente os cafés são rotulados como Extra Forte, Tradicional, Superior e Goumert. O Goumet representa café de origem especial, valorizado pela especialização gastronômica, que impulsiona uma expansão para o comércio de *C. canephora* em contraponto a majoritariamente existente a espécie *C. arabica* (Teles e Behrens, 2020).

A produção mundial de café ultrapassa 10 milhões de toneladas. Sendo o Brasil o maior produtor com aproximadamente quatro milhões de toneladas (FAO, 2020; IOC, 2020). No Brasil, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia e Rondônia são responsáveis por 97% da produção. Sendo, Minas Gerais, São Paulo e Bahia os maiores produtores do café arábica e Espírito Santo, Rondônia e Bahia de café canéfora, somando em torno de 570 mil toneladas (CONAB, 2020; IBGE, 2020).

Rondônia é o maior produtor da região Norte e ocupa a 5ª posição nacional, possui por volta de 11 mil propriedades que desenvolve a atividade da cafeicultura. Atualmente o Estado está com cerca de 64 mil hectares em produção, com uma estimativa de produção de 118 mil toneladas (CONAB, 2020; IBGE, 2020).

O café gerou para Rondônia no ano de 2019 uma receita de mais de 715 milhões de reais (MAPA, 2020), sendo o 2º produto de maior expressão, compondo 23% do valor bruto de produção das atividades agrícolas.

A cafeicultura rondoniense vem evoluindo significativamente. Nos últimos 10 anos a produtividade média saiu de 10 sacas por hectare para mais de 30 (CONAB, 2020; IBGE, 2020). Tal fato é atribuído a plantios de variedades mais produtivas e pelo uso da propagação vegetativa na produção de mudas, reduzindo assim a variabilidade das plantas, proporcionando uniformidade de crescimento, maturação e produção (Espíndula e Partelli, 2011; Ramalho, et al., 2014; Ramalho et al., 2016; Muniswamy et al., 2017; Santos e Silva, 2017; Teixeira, et al., 2019; Espíndula, et al., 2019).

Atualmente, além de a cultivar BRS Ouro Preto, foram registradas mais dez novas cultivares para cultivo nas condições ambientais do bioma amazônico, conforme Registro Nacional de Cultivares – RNC do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Ramalho et al., 2014; Espindula et al, 2019).

Paralelamente, existem outros genótipos implantados no Estado, selecionados pelos próprios cafeicultores, com altos índices de produtividade. Mas até o momento sem conhecimento científico do comportamento destes e sua adaptabilidade ao ambiente regional, o que pode expor a cafeicultura rondoniense a alguns intemperes (Rocha et al., 2015; Cheng et al., 2016; Carvalho et al., 2019; Maghuly et al., 2020).

Mesmo com essa incerteza, a seleção de genótipos, seja empírica e/ou científica tem proporcionado melhoras, como qualidade de bebida, tamanho de peneira, resistências a pragas e doenças, além dos ganhos de produtividade. O café de Rondônia vem se destacando no mercado dos cafés de bebidas especiais e se colocando entre os melhores cafés canéforas do Brasil (Coffee of the Year, 2018; 2019). Os cafeicultores rondonienses têm buscado a modernização e a tecnologia para manter e expandir a produção visando não só o mercado nacional, mas o internacional (Santos e Silva, 2017).

2.4. *C. canephora* x *M. incognita*

Entre os patógenos que acometem os cafezais numerosos gêneros e espécies de nematoides têm sido associados ao café em todo o mundo, incluindo alguns que são responsáveis por significativos danos e/ou mortalidade de plantas, resultando em perdas econômicas para os cafeicultores e economias locais (Talwana, et al., 2015; Sipes e Myers, 2018; Villain et al, 2018; Maghuly, Jankowicz-Cieslak e Bado, 2020).

Os nematoides da galhas são considerados os mais agressivos capazes de causarem prejuízos significativos na cultura do café, entre as espécies consideradas mais prejudiciais, sendo, destaca-se a *M. incognita* (Barros et al., 2014; Vieira Junior et al., 2015; Santos, et al., 2018; Liah, Indarti e Putra, 2018). Na interação de *M. incognita* com o cafeeiro, as raízes

apresenta deformações como engrossamentos, nas raízes mais velhas e lignificadas intercalando com partes sadias. Rachaduras, fendilhamentos e escamações com descolamento dos tecidos corticais (descorticamento) podem também ser observados (Vieira Junior e Fernandes, 2015; Ventura, Costa e Lima, 2017; Zambolim, 2016; Lima, et al., 2019).

A resposta de infecção e patogenicidade de *M. incognita* em *C. canephora* está relacionada ao patógeno e a capacidade de resposta da planta (Oliveira, et al., 2011; Wangai, et al., 2014). A resistência da planta envolve além de mecanismos físicos e ou químicos, que podem ser barreiras físicas como pilosidade e ou produção de exsudados que impeçam a penetração de juvenis J2 na raiz. A existência de respostas elucidadas também por mecanismos bioquímicos e genéticos, pós infecção.

A relação planta-patogeno é complexa e o sucesso do parasitismo depende da capacidade do nematoide em estabelecer interações compatíveis com o hospedeiro. Espécies polífagas como *M. incognita*, produzem uma variedade de diferentes efetores e supressores que dificultam seu controle (Cabrera et al., 2015; Ali et al., 2017; Hewezi e Baum, 2017; Kaloshian e Teixeira, 2019; Meijas et al., 2019).

Sugerindo uma interação gene-a-gene específica que provavelmente é controlado por mais de um gene de resistência (Lima et al., 2015). Sendo a distribuição do genoma do nematóide não aleatória e sugerindo a ocorrência de regiões genômicas mais propensas a sofrer duplicações e perdas em resposta à pressão de seleção da resistência do hospedeiro (Albuquerque, et al., 2017; Castagnone-Sereno, et al., 2019).

Entretanto mesmo em plantas resistentes podem ser observados danos diretos no sistema radicular também alteram a fisiologia das plantas de cafeeiro. Plantas infectadas por nematóides apresentaram redução na altura e teor de amido. Bem como redução na transpiração, condutância estomática e concentração de CO₂, menor teor foliar de P, K, Mn e Fe quando comparadas às plantas saudáveis (Goulart et al., 2019).

Levando a danos na parte área da planta como: amarelecimento seguido de declínio, queda prematura das folhas e queda de produção. Geralmente esses sintomas ocorrem em reboleiras, sendo mais frequentemente observados e com maior severidade na fase de enchimento e maturação dos frutos, ou seja, do meio para o final do ciclo produtivo, principalmente em solos arenosos (Dias Arueira, et al., 2012; Talwana, et al., 2015, Zambolim, 2016; Ventura, Costa e Lima, 2017).

Muitas da vezes quando se manifestam os sintomas na parte área, os danos podem ser confundidos com nutrição, e o diagnóstico poderá ocorrer tarde de mais, para adoção de medidas de controle. As medidas de controle recomendadas para nematoides se baseiam em

métodos genéticos, químicos e culturais (Vieira Junior et al., 2014). Sendo o uso de nematicidas químicos tradicionalmente mais usado, mas a aplicação repetida é prejudicial ao meio e na saúde humana, podendo produzir efeitos fitotóxicos na cultura do café (Cepeda-Siller et al., 2018).

2.5. Métodos alternativos ao controle químico (nematicida) para nematoides das galhas

O controle de fitonematoides é constituído na utilização de manejos integrados composto pela junção dos controles químico, genético, cultural e físico, e biológico. A biotecnologia também é uma forte aliada no controle de fitonematoides, pois, além de promover a seleção de variedades resistentes, possibilita a identificação e prospecção de novas técnicas de controle (Ferraz e Brown, 2016; Bergamim Filho e Amorim, 2018; Silva e Figueiredo, 2018).

O controle de nematoides no cafeeiro é uma prática dispendiosa, pois trata-se de uma cultura perene e sabe-se que uma vez a área (solo) infestado, dificilmente se consegue sua erradicação. Para que se tenha êxito no controle, há necessidade de aplicação constante de nematicidas, o que resulta em alto custo, econômico e ambiental (Vieira Junior e Fernandes, 2015; Zambolim, 2016; Ventura, Costa e Lima, 2017; Lima, et al., 2019).

A adoção de técnicas biotecnológicas para o controle de nematoides, tem sido alvos de pesquisas não só para explorar a resistência genética natural da planta ou para aplicar formas sintéticas de resistência, mas para identificar outras formas de resistência como aquelas baseadas na interrupção das células de alimentação, expressão de proteínas específicas ou peptídeos, no silenciamento de genes (RNAi) ou na entrega de compostos tóxicos ao nematóide (Matsuo et al., 2012; Fosu-Nyarko e Jones, 2015; Silva e Figueiro, 2018).

A busca por variedades do cafeeiro resistentes a nematoides, faz necessário a triagem em grande escala de germoplasmas. O uso de cultivares resistentes no Brasil visando o controle de *Meloidogyne* spp. iniciou em 1940 no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), na cultura da batata. Na década de 60 já havia se expandido para a cultura da cana de açúcar e do café. A partir de 1887 quando diagnosticado *Meloidogyne exigua* em cafezais do Rio de Janeiro por E. Goeldi, evidenciou-se a necessidade de busca por genótipos resistentes a *Meloidogyne* spp. para a cultura do café, dado a constatação do dano severo em genótipos suscetíveis (Ferraz e Brown, 2016).

Os programas de melhoramento do cafeeiro geralmente contam com espécies diplóides relacionadas a *C. canephora*. Grande parte baseiam-se em cruzamentos interespecíficos e intraespecíficos, entre as espécies *C. arabica* e *C. canephora*, resultando em

novas cultivares que apresentem além da produtividade, resistência a pragas e doenças. Em *C. canephora* plantas resistentes a nematoide das galhas além de serem utilizados como porta enxertos para espécies de *C. arabica*, podem ser fontes de resistência em programas de melhoramento (Ramalho, et al., 2009; Salgado, Rezende e Nunes, 2014; Santos, et al., 2018; Oliveira, et al., 2018).

Avaliando genótipos de *C. arabica* provenientes de cruzamentos intra e interespecies com *C. canephora*, Peres, et al. (2017) observaram variações de respostas para resistência a *M. incognita*, apenas 8 dos 18 genótipos avaliados foram considerados resistentes, e segundo os autores essa resistência pode ser atribuída ao genótipo Amphillo. Confirmando que a seleção de genótipos resistentes é viável para o melhoramento de plantas de café contra nematoides das galhas *Meloidogyne* spp.

Outra estratégia de controle que tem demonstrado bons resultados em pesquisas é o controle biológico. Os principais organismos estudados no controle biológico de fitonematoides são fungos e bactérias. O uso de rizobactérias tem demonstrado resultados promissores no controle de *M. incognita*. Os gêneros mais promissores incluem *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* e *Streptomyces* (Almagharobi, Massoud e Abdelmonein, 2013; Kaur, et al., 2016; Turatto, et al., 2018; Alves de Almeida, de Souza e de Araújo, 2018).

Dentre as Rizobactérias o gênero *Bacillus* tem demonstrado maior potencial no controle *M. incognita*. Ann (2013), obteve efeito nematicida em ensaio *in vitro* de 76,4 % contra juvenil J2 em 2 hs após inoculação e 100% após 12 hrs. E uma redução de 60,95 na população de *M. incognita* em em raízes de plantas de *Pepper vine*. Em tomateiro, a eficiência de controle de *B. mycooides* R2 contra *M. incognita* foi de 90,94% (Luo et al., 2018). *Bacillus subtilis* via tratamento de semente e via pulverização foliar foi eficaz tão quanto ao nematicida químico, em plantas do feijoeiro (Oliveira et al, 2017).

Além das rizobactérias promotoras de crescimentos, outros microorganismos que estabelecem simbiose com raízes de plantas podem apresentar também potencial de controle biológico contra fitonematoides, como é o caso dos fungos micorrizicos arbusculares (Berbara, et al., 2006; Pozo, et al., 2013; Wani, et al., 2017; Dhiman et al., 2019).

O biocontrole de nematoides das galhas por fungos micorrizicos, envolve complexas relações que vão desde a expressão gênica, a mudanças transcricionais, hormonais e enzimáticas no hospedeiro, a uma composição e nível de exsudados radiculares alterados, quem pode impactar na infecção das raízes pelo nematoide, no quesito incubação, motilidade, quimiotaxia. Podendo também causar mudanças na rizosfera que poderam alterar a interação

planta-patógeno, o que significa que estudos caso a caso terão que ser realizados para resultar em aplicações de campo de FMA (Schouteden, et al., 2015; Bajaj, et al., 2017;).

Foram observados por Vos, et al. (2012) a redução de 45% da população de *M. incognita* em plantas de tomate em plantas micorrizadas com *Glomus mosseae*. Segundo os mesmos autores o efeito da interação micorriza e planta contra nematoide, possibilitou a identificação de genes relacionados a defesa especificamente, na interação de biocontrole, em comparação com as testemunhas que eram apenas micorrizas ou apenas nematoide. Indicando a existência de priming de defesa induzido por micorrizas (Vos, et al, 2013).

Além o efeito do biocontrole contra nematoides proporcionada pelas micorrizas arbusculares, a combinação com outros agentes biológicos pode melhorar a eficiência sobre o controle populacional do patógeno. Já que a micorriza além de proporcionar ganhos agronômicos a planta, por meio da produção de hormônios naturais de crescimento e disponibilização de elementos nutricionais, é capaz de induzir a resistência sistêmica (Lamovsek, Urek e Trda, 2013; Silva e Figueiredo, 2018).

Associação com rizobactérias promotoras de crescimento (têm mostrado imenso potencial para controlar nematoides (Hussain et al. 2016). O Biocontrole associando micorrizas arbusculares com rizobacterias contra *M. incognita* em plantas de tomateiro, mostrou aumentar o crescimento da planta e reduzir a população de nematóides, indicando seu potencial de biocontrole para o manejo de nematóides (Sharma e Sharma 2017).

Outra forma de controle alternativo é o uso extratos de plantas antagônicas, e ou repelentes a nematoides. Visando a prospecção de novas moléculas, devido a maioria apresentar compostos nematostáticos, que tem a capacidade de paralisar o juvenil (J2) e compostos que tenham efeito nematicida (Coltro-Roncato, et al, 2015; Moreira e Ferreira, 2015; Aminu-Taiwo, Fawole e Claudius-Cole, 2015; Martins e Santos, 2016).

Testando efeito nematicida em tomateiros aos 60 dias após inoculação, Mateus, et al. (2014), obteve efeito com os extratos de *Erythrina mulungu* e *Verbena officinalis*. Os extratos *Ruta graveolens*, *Conyza bonariensis*, e *Brassica napus* demonstraram também efeito nematicida reduzindo o número de galhas nas raízes e o fator de reprodução de *M. incognita* em tomateiro (Kuhn, et al., 2015).

Phyllanthus amarus aplicado como extrato aquoso de folhas apresentou maior efeito nematicida em condições *in vitro* e em tomateiro (Khan, et al., 2019). Extratos botânicos de *Aegle marmelos* e *Prosopis cinerarea* reduziram a incidência de galhas em plantas de *Coleus forskohlii* (Soumana, Trivedi e Trivedi, 2015).

Entre a gama de espécies que vem sendo estudada a uma observação maior para plantas do gênero *Mucuna* e *Crotalaria* (Rocha, et al., 2017). Plantas de *Mucuna pruriens* reduziu em 79% a população de de nematóides de galhas e *Crotalaria spectabilis* 85% após 90 dias (Osei, et al., 2010). *Mucuna aterrima* e *Crotalaria spectabilis* também apresentaram os menores fator de reprodução e população final quando inoculadas com *Meloidogyne* spp (Giraldeli, et al., 2017). O uso de *Crotalaria Juncea* como adubo verde em plantio sucessivo de berijela, redução a população de nematoides na área e cultivo (Patel e Dhillon, 2017).

Considerando o custo na implantação e cultivo de cafeeiro, e o difícil controle de nematoides em solos infestados. Estratégias de controle que proporcione, aumento de rendimento e menor custo, são expectativas desejáveis para a cafeicultura. Estudos visando testar estas estratégias se fazem necessário.

3. REFERÊNCIAS

- Akpertey, A.; Anim-Kwapong, E. & Ofori, A. 2019. Assessment of genetic diversity in Robusta coffee using morphological characters. *International Journal of Fruit Science*, 19(3), 276-299.
- Albuquerque, E. V.; Petitot, A. S.; da Silva, J. P.; Grossi-de-Sa, M. F. & Fernandez, D. 2017. Early responses of coffee immunity-related genes to root-knot nematode infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 100, 142-150.
- Ali, N.; Tavoillot, J.; Besnard, G.; Khadari, B.; Dmowska, E.; Winiszewska, G. & El Oualkadi, A. 2017. How anthropogenic changes may affect soil-borne parasite diversity? Plant-parasitic nematode communities associated with olive trees in Morocco as a case study. *BMC ecology*, 17(1), 4.
- Almaghrabi, O. A.; Massoud, S. I. & Abdelmoneim, T. S. 2013. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. *Saudi journal of biological sciences*, 20(1), 57-61.
- Alves de Almeida, J.; de Souza, J. C. & de Araújo, F. G. 2018. Tratamento de sementes com abamectina e *Paecilomyces lilacinus* no manejo de *Heterodera glycines* na cultura da soja. *Multi-Science Journal*, 1(4), 62-65.
- Aminu-Taiwo, B. R.; Fawole, B.; & Claudius-Cole, A. O. 2015. Host status of some selected crops to *Meloidogyne incognita*. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 3(5), 1532-1536.
- Ann, Y. C. 201). Screening for nematicidal activities of Bacillus species against root knot nematode (*Meloidogyne incognita*). *Journal of Experimental Agriculture International*, 794-805.
- Ataides, M. R. A.; Cunha, I. C.; & Santos, J. C. V. 2019. Cafeterias da área central de Caldas Novas, Goiás: componentes da paisagem urbana turística. *Ateliê do Turismo*, 3(1), 31-44.

- Avelino, A. C. D.; de Faria, D. A.; de Oliveira, L. D.; Cervo, Y. N.; Contreras Filho, A. S.; Farinha, M. A. & Rodrigues, J. 2019. Fungi associated with major agricultural and forage crops in integrated systems of Brazilian tropical regions. *Journal of Experimental Agriculture International*, 1-13.
- Bajaj, R.; Prasad, R.; Varma, A.; & Bushley, K. E. 2017. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and the mycorrhizal-like fungus *Piriformospora indica* in biocontrol of plant parasitic nematodes. In Varma, A.; Prasad, R. & Tuteja, N. (Eds.). *Mycorrhiza-Eco-Physiology, Secondary Metabolites, Nanomaterials* pp. 43-56.
- Barros, A. F.; Oliveira, R. D. L.; Lima, I. M.; Coutinho, R. R.; Ferreira, A. O.; & Costa, A. 2014. Root-knot nematodes, a growing problem for Conilon coffee in Espírito Santo state, Brazil. *Crop Protection*, 55, 74-79.
- Bartlem, D. G.; Jones, M. G. & Hammes, U. Z. 2014. Vascularization and nutrient delivery at root-knot nematode feeding sites in host roots. *Journal of Experimental Botany*, 65(7), 1789-1798.
- Bélair, G.; Forge, T.; Mimee, B.; Tenuta, M.; & Yu, Q. 2018. Current state of plant parasitic nematodes in Canada. In *Plant Parasitic Nematodes in Sustainable Agriculture of North America* (pp. 1-29). Springer, Cham.
- Berbara, R. L.; Souza, F. A. & Fonseca, H. M. A. C. 2006. Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição. *Nutrição mineral de plantas. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, MG*, 74-85.
- Bergamin filho, A. & Amorim, L. 2018. Manejo Integrado de Doenças. In Amorim, L.; Rezende, J. A. M. & Bergamin filho, A. (Eds.). *Manual de Fitopatologia. Vol. 1. Princípios e Conceitos. 5ª Ed. Agronômica Ceres. Ouro Fino – MG*. pp 303-309
- Bernard, G. C.; Engin, M.; Bonsi, C. 2017. The Impact of Plant-Parasitic Nematodes on Agriculture and Methods of Control. In: Mohammad Manjur Shah, M. M.; Mahamood, M. (Ed.). *Nematology: Concepts, Diagnosis and Control. London, IntechOpen*: 121–151. doi: 10.5772/intechopen.68958
- Bird, D. M.; Opperman, C. H.; & Williamson, V. M. 2009. Plant infection by root-knot nematode. In *Cell biology of plant nematode parasitism* (pp. 1-13). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Bird, G. W.; & Warner, F. 2018. Nematodes and Nematologists of Michigan. In *Plant Parasitic Nematodes in Sustainable Agriculture of North America* (pp. 57-85). Springer, Cham.
- Bragança, R.; dos Santos, A. R.; de Souza, E. F.; de Carvalho, A. J. C.; Luppi, A. S. L.; & da Silva, R. G. 2016. Impactos das mudanças climáticas no zoneamento agroclimatológico do café arábica no Espírito Santo. *Revista Agro@ambiente On-line*, 10(1), 77-82.
- Bridge, J. & Starr, J. L. 2007. Plant Nematode Biology and Parasitism. In *Planta Nematodes of Agricultural Importance: A Colour Handbook, 1st Edition*. 152 p.
- Cabrera, J.; Díaz-Manzano, F. E.; Fenoll, C. & Escobar, C. 2015. Developmental Pathways Mediated by Hormones in Nematode Feeding Sites. 73, 167-188. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2014.12.005>.

- Camargo, M. B. P. D. 2010. The impact of climatic variability and climate change on arabic coffee crop in Brazil. *Bragantia*, 69(1), 239-247. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052010000100030>.
- Carneiro, R. M. D. G.; Lima, F. S. & Correia V. R. 2017. Methods and Tools Currently Used for the Identification of Plant Parasitic Nematodes. In Shah, M. M. & Mahamood, M. (Eds.). *Nematology - Concepts, Diagnosis and Control*. pp 4-19.
- Carvalho, H. F.; Silva, F. L. D.; Resende, M. D. V. D. & Bhering, L. L. 2019. Selection and genetic parameters for interpopulation hybrids between kouilou and robusta coffee. *Bragantia*, 78(1), 52-59. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.2018124>.
- Castagnone-Sereno, P.; Mulet, K.; Danchin, E. G.; Koutsovoulos, G. D.; Karaulic, M.; Da Rocha, M. & Abad, P. 2019. Gene copy number variations as signatures of adaptive evolution in the parthenogenetic, plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular ecology*, 28(10), 2559-2572.
- Cepeda-Siller M., Cerna-Chávez E., Ochoa-Fuentes Y., Dávila Medina M., Garrido Cruz F., Hernández Juárez A. (2018) Biological effectiveness of Nemmax nematicide in the cultivation of coffee (*Coffea arabica* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9(2):459-464.
- Cesarano, G.; Zotti, M.; Antignani, V.; Marra, R.; Scala, F.; & Bonanomi, G. 2017. Soil sickness and negative plant-soil feedback: A reappraisal of hypotheses. *Journal of plant pathology*, 99(3), 545-570.
- Cheng, B.; Furtado, A.; Smyth, H. E. & Henry, R. J. 2016. Influence of genotype and environment on coffee quality. *Trends in Food Science & Technology*, 57, 20-30.
- Coltro-Roncato, S.; Gonçalves, E. D. V.; Dildey, O. D. F.; Kuhn, O. J.; & Stangarlin, J. R. 2015. Fitoquímicos como controle alternativo de nematoides. In Kuhn, O. J; Nunes, R.V.; Stangarlin, J. R. & Rampim, L. *Ciências agrárias: tecnologias e perspectivas*. Marechal Cândido Rondon: Universidade Estadual do Oeste do Paraná. pp 188-206.
- Companhia Nacional de Abastecimento. Observatório Agrícola. Acompanhamento da safra brasileiro, café. v. 6 – safra 2020. n.1 – Primeiro levantamento, Janeiro 2020.
- Coyne, D. L.; Cortada, L.; Dalzell, J. J.; Claudius-Cole, A. O.; Haukeland, S.; Luambano, N.; & Talwana, H. 2018. Plant-parasitic nematodes and food security in Sub-Saharan Africa. *Annual review of phytopathology*, 56, 381-403.
- Dias-Arieira, C. R.; Santana, S. D. M.; Chiamolera, F. M.; Biela, F.; Cunha, T. P. L.; Puerari, H. H.; & Fontana, L. F. 2012. Behavior of coffee plants IPR 100 and IPR 106 in soil infested with *Meloidogyne incognita*. *J. Food Agric. Environ*, 10(1), 251-255.
- Dhiman, U.; Rana, S.; Kesar, S.; Panwar, A.; Devi, M.; Kumar, V. & Parihar, R. D. 2019. Entomopathogenic Nematodes: Their Occurrence and Pathogenicity. In Upadhyay, S. K. (Ed.). *Parasitology Taxonomy and Bioecology*. pp 61-83.
- Dubberstein, D.; Partelli, F. L.; Guilhen, J. H. S.; Rodrigues, W. P.; Ramalho, J. C. & Ribeiro-Barros, A. I. 2020. Biometric traits as a tool for the identification and breeding of *Coffea canephora* genotypes. *Genetics and Molecular Research*. 19(2), gmr18541.

- Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária. Regen - Gestão de Recursos Genéticos para Alimentação, Agricultura e Bioindústria. Disponível em: <http://alelo.cenargen.embrapa.br/>. Acesso em: 10 out. 2019.
- Escobar, C.; Barcala, M.; Cabrera, J.; & Fenoll, C. 2015. Overview of root-knot nematodes and giant cells. In *Advances in botanical research*. 73, 1-32.
- Espíndula, M. C. & Partelli, F. L. 2011. Vantagens do uso de clones no cultivo de cafeeiros canéfora (Conilon e Robusta). Porto Velho: *Embrapa Rondônia*, Documentos, n. 144. 16p.
- Espíndula, M.; Teixeira, A.; Rocha, R.; Ramalho, A.; Vieira Junior, J. R.; Alves, E.; & Fernandes, C. D. F. 2019. Novas cultivares de cafeeiros *Coffea canephora* para a Amazônia Ocidental Brasileira: Principais características. Porto Velho: *Embrapa Rondônia*. Comunicado Técnico, 413. 36 p.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. FAOSTAT. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 8 de mar. 2020.
- Ferrão, R. G.; da Fonseca, A. F. A.; Ferrão, M. A. G. & de Muner, L. H.; 2017. *Coffea canephora* In. Ferrão, R. G.; da Fonseca, A. F. A.; Ferrão, M. A. G. & de Muner, L. H. (Ed.). *Café Conilon*. 2 ed. atual. e ampl. 2a reimpressão - Vitória, ES : Incaper, 784p.
- Ferraz, L. C. C. B.; & Brown, D. J. F. 2016. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. Manaus: *Norma Editora*, 251p.
- Ferraz, L. C. C. B. 2018. Nematoides. In: Amorin, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A. (Ed.). *Manual de Fitopatologia*. 5ª ed. Ouro Fino – MG. *Agronômica Ceres*, p.195 – 211.
- Fonseca, A. F. A.; Ferrão, M. A. G.; & Ferrão, R. G. 2013. Vantagens e riscos no uso de mudas clonais de *Coffea canephora*. *Visão Agrícola*, 12. 17-18.
- Fosu-Nyarko, J. & Jones, M. G. 2015. Application of biotechnology for nematode control in crop plants. In. Escobar. C. & Fenoll C. (eds) *Advances in Botanical Research, Plant Nematode Interações: A View on Compatible Interralationships*. 73. p.339-376.
- Giraldeli, A.; San Gregorio, J. P. R.; Monquero, P.; Aguillera, M. & Ribeiro, N. 2017. Weeds Hosts of Nematodes in Sugarcane Culture. *Planta Daninha*, 35. e017156815
- Goulart, R. R.; Terra, W. C.; Salgado, S. L.; Alves, J. D.; Campos, V. P.; Fatobene, B. R.; Marchiori, P.R.; de Souza, S. R. & Oliveira, R. L. 2019. *Meloidogyne paranaensis* and *M. exigua* alter coffee physiology, *Nematology*, 21(5), 459-467. doi: <https://doi.org/10.1163/15685411-00003226>.
- Hameed, A.; Hussain, S. A. & Suleria, H. A. R. 2020. “Coffee bean-related” agroecological factors affecting the coffee. *Co-Evolution of Secondary Metabolites*, 641-705.
- Hamon, P.; Hamon, S.; Razafinarivo, N. J.; Guyot, R.; Siljak-Yakovlev, S.; Couturon, E. & de Kochko, A. 2015. *Coffea* genome organization and evolution. In. Preddy, V. R. (Ed.). *Coffee in health and disease prevention*. 29-37.
- Hassan, M. A.; Pham, T. H.; Shi, H. S.; Zheng, J. 2013. Nematodes threats to global food security. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*, 63(5), 420-425. doi: 10.1080/09064710.2013.794858.

- Hewezi, T. & Baum, T. J. 2017. Communication of sedentary plant-parasitic nematodes with their host plants. In: Becard G. (Ed.). *Advances in botanical research*. 82, 305-324.
- Huyen, P. T. T.; Giang, P. Q.; Toan, N. V.; Trinh, P. T. 2018. Correlation Between the Distribution of Nematodes and Soil Physicochemical Characteristics in Coffee Rejuvenation Areas. *Environment Asia*, 11(1), 141-156. doi: 10.14456/ea.2018.11
- Hussain I.; Alam S. S.; Khan I.; Shah B.; Naeem A.; Khan N.; Ullah W.; Adnan M.; Shah S. R. A.; Junaid K.; Ahmed N. & Iqbal, M. 2016. Medicinal plants rhizosphere exploration for the presence of potential biocontrol fungi. *J Entomol Zool Stud* 4(3), 108–113.
- Innocentini, M. 2015. Política brasileira do agronegócio do café Desafios e propostas. *Revista de Política Agrícola*, 24(2), 5-16.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Produção Agrícola Municipal. Tabela 1613 – Área destinada à colheita, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras permanentes. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613>. Acesso em: 29 de mar. 2020.
- International Coffee Organization. Trade Statistics Tables Table 1: Crop year production by country* In thousand 60-kg bags. Disponível em: http://www.ico.org/trade_statistics.asp?section=Statistics. Acesso em: 30 de jun. 2020.
- Iqbal, S. & Jones, M. G. K. 2017. Nematodes. In Thomas, B.; Murray, B. G. & Murphy, D. J. (Ed.). *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. 3, 113-119.
- Jesus Júnior, W. C.; Martins, L. D.; Rodrigues, W. N.; Moraes, W. B.; Amaral, J. F. T.; Tomaz, M. A.; Alves, F. R. 2012. Mudanças climáticas: potencial impacto na sustentabilidade da cafeicultura. In: Tomaz, M. A.; Amaral, J. F. T.; Jesus Júnior, W. C.; Fonseca, A. F. A.; Ferrão, R. G.; Ferrão, M. A. G.; Martins, L. D.; Rodrigues, W. N. (Org.). *Inovação, difusão e integração: bases para a sustentabilidade da cafeicultura*. Alegre: CAUFES, 179-202.
- Jones, J. T.; Haegeman, A.; Danchin, E. G.; Gaur, H. S.; Helder, J.; Jones, M. G. & Perry, R. N. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 14(9), 946-961.
- Kaloshian, I.; & Teixeira, M. 2019. Advances in Plant– Nematode Interactions with Emphasis on the Notorious Nematode Genus *Meloidogyne*. *Phytopathology*, 109(12), 1988-1996.
- Kaur, T.; Jasrotia, S.; Ohri, P. & Manhas, R. K. 2016. Evaluation of in vitro and in vivo nematicidal potential of a multifunctional streptomycete, *Streptomyces hydrogenans* strain DH16 against *Meloidogyne incognita*. *Microbiological research*, 192, 247-252.
- Khan, F.; Asif, M.; Khan, A.; Tariq, M.; Ansari, T.; Shariq, M. & Siddiqui, M. A. 2019. Evaluation of the nematicidal potential of some botanicals against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infected carrot: In vitro and greenhouse study. *Current Plant Biology*, 20, <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2019.100115>.
- Kiontke, K. & Fitch, D. H. 2013. Nematodes. *Current Biology*, 23(19), R862-R864.

- Kuhn, P. R.; Belle, C.; Reinehr, M. & Kulczynski, S. M. 2015. Extratos aquosos de plantas daninhas, aromáticas e oleaginosa no controle de *Meloidogyne incognita*. *Nematropica* 45,150-157.
- Lamovšek, J.; Urek, G. & Trdan, S. 2013. Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.): microbes against the pests. *Acta agriculturae Slovenica*, 101(2), 263-275.
- Liah, M.; Indarti, S.; Putra, N. S. 2018. Short Communication: Abundance and diversity of plant parasitic nematodes associated with BP 308 and BP 42 clones of robusta coffee in Java, Indonesia. *Biodiversitas*, 19(1), 67-70.
- Lima, I. D. M.; Buonicontro, D.; Arpini, B. D. S.; Teodoro, M. & Costa, N. S. 2019. Gerenciamento de nematoides no sistema de produção do cafeeiro 'Conilon'. In: Partelli, F. L.; Espindula, M. C. (Org.). *Café Conilon: conhecimento para superar desafios*. Alegre, ES : CAUFES, Cap. 4, p. 61-74.
- Lima, E. A.; Furlanetto, C.; Nicole, M.; Gomes, A. C.; Almeida, M. R.; Jorge-Júnior, A.; ... & Carneiro, R. M. 2015. The multi-resistant reaction of drought-tolerant coffee 'Conilon clone 14' to *Meloidogyne* spp. and late hypersensitive-like response in *Coffea canephora*. *Phytopathology*, 105(6), 805-814.
- Loor SolóRzano, R. G.; De Bellis, F.; Leroy, T.; Plaza, L.; Guerrero, H.; Subia, C. & Vera, D. 2017. Revealing the diversity of introduced *Coffea canephora* germplasm in Ecuador: towards a national strategy to improve robusta. *The Scientific World Journal*, 2017.12 p. <https://doi.org/10.1155/2017/1248954>.
- Lopes, E. A. & Ferraz, S. 2016. Importância dos fitonematoides na agricultura In Oliveira, C. M. G.; Silva e Castro, L. H. & Santos, M. A. (Org.) *Diagnose de fitonematoides*, cap. 1. p. 1-10.
- Luo, T.; Hou, S.; Yang, L.; Qi, G. & Zhao, X. 2018. Nematodes avoid and are killed by *Bacillus mycoides*-produced styrene. *Journal of Invertebrate Pathology*, 159, 129-136.
- Maghuly, F.; Jankowicz-Cieslak, J.; Bado, S. 2020. Improving coffee species for pathogen resistance. *Cabi Reviews*, 15(9). doi: 10.1079/PAVSNR202015009
- Marques, B. N.; Kobayashi, L.; de Oliveira Arieira, G.; Faria, D. A.; Avelino, A. C. D.; de Abreu, J. G. & TeRzi, B. G. 2019. Nematodes Associated to Tropical Forages in Pasture Areas. *Journal of Experimental Agriculture International*, 1-10.
- Martins, E.; Aparecido, L. E. D. O.; Santos, L. P. S.; Mendonça, J. M. A. D.; & Souza, P. S. D. 2015. Influência das condições climáticas na produtividade e qualidade do cafeeiro produzido na região do sul de Minas Gerais. *Coffee Science*, Lavras 10(4), 499-506.
- Martins, M. C. B. & Santos, C. D. G. 2016. Ação de extratos de plantas medicinais sobre juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 2. *Revista Ciência Agronômica*, 47(1), 135-142.
- Mateus, M. A. F.; Faria, C. M. D. R.; Botelho, R. V.; Dallemole-Giaretta, R.; Ferreira, S. G. M. & Zaluski, W. L. 2014. Extratos aquosos de plantas medicinais no controle de *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949. *Bioscience Journal*, 30(3), 730-736.

- Matsuo, E.; Ferreira, P. A.; Sediyaama, T. Ferraz, S. Borém, A. & Fritsche-Neto, R. 2012. Breeding for Nematode Resistance. In Fritsche-Neto, R. & Borém, A. (Eds.). *Plant Breeding for Biotic Stress Resistance*. pp 81-102.
- Mejias, J.; Truong, N. M.; Abad, P.; Favery, B. & Quentin, M. 2019. Plant proteins and processes targeted by parasitic nematode effectors. *Frontiers in plant science*. 10, 970. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00970>.
- Melo, B.; & Sousa, L. B. 2011. Biologia da reprodução de *Coffea arabica*. L. e *Coffea canephora* Pierre. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 6(2), 1-7.
- Melo, J. R.; da Silva, N. F. M.; & de Siqueira Nunes, N. M. 2018. café: origem e contribuição para a economia do Brasil. *Múltiplos Acessos*, 3(1).
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Valor Bruto da Produção Agropecuária. VBP Regional. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/agricultura-e-pecuaria/2020/06/valor-da-producao-agropecuaria-e-projetado-em-r-703-8-bilhoes-para-2020>. Acesso em: 15 de mar. 2020.
- Mitiku, M. 2018. Plant-parasitic nematodes and their management: a review. *Journal of biology, Agriculture and Healthcare*. 8(1), 34-42.
- Moraes, M. S.; Teixeira, A. L.; Ramalho, A. R.; Espíndula, M. C.; Ferrão, M. A. G. & Rocha, R. B. 2018. Characterization of gametophytic self-incompatibility of superior clones of *Coffea canephora*. *Genetics and Molecular Research*, 17, 1-11.
- Moreira, F. J. C; Ferreira, A. C. S. 2015. Controle alternativo de nematoide das galhas (*Meloidogyne enterolobii*) com cravo de defunto (*Tagetes patula* L.), em solo. 1, 99-110.
- Muniswamy, B.; Kosaraju, B.; Mishra, M. K.; & Yenugula, R. 2017. Field performance and genetic fidelity of micropropagated plants of *Coffea canephora* (Pierre ex A. Froehner). *Open Life Sciences*, 12(1), 1-11.
- Nicol, J. M.; Turner, S. J.; Coyne, D. L.; Den Nijs, L.; Hockland, S. & Maafi, Z. T. 2011. Current Nematode Threats to World Agriculture. In: Jones J.; Gheysen G.; Fenoll C. (eds) *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0434-3_2.
- Oliveira, C. M. G. D.; & Rosa, J. M. O. 2018. Nematoides parasitos do cafeeiro. São Paulo: *Instituto Biológico* (Boletim técnico, 32). p. 1-28.
- Oliveira, G. R. F.; Silva, M. S.; Proença, S. L.; Bossolani, J. W.; Camargo, J. Á.; Franco, F. S. & Sá, M. E. 2017. INFLUÊNCIA DO *Bacillus subtilis* NO CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATOIDES E ASPECTOS PRODUTIVOS DO FEIJOEIRO/INFLUENCE OF *Bacillus subtilis* IN NEMATODES BIOLOGICAL CONTROL AND PRODUCTION ASPECTS OF BEAN. *Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas*, 11(1), 47-58.
- Oliveira, D. S.; Oliveira, R. D.; Silva, D. G. & Silva, R. V. 2011. Characterization of *Meloidogyne incognita* populations from São Paulo and Minas Gerais state and their pathogenicity on coffee plants. *Tropical plant pathology*, 36(3), 190-194.

- Osei, K.; Gowen, S. R.; Pembroke, B.; Brandenburg, R. L. & Jordan, D. L. 2010. Potential of leguminous cover crops in management of a mixed population of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Journal of Nematology*, 42(3), 173-178.
- Peres, A. C.; Salgado, S. M. L.; Correa, V. R.; Santos, M. F. A.; Mattos, V. S.; Monteiro, J. M. S. & Carneiro, R. M. D. G. 2017. Resistance of *Coffea arabica* genotypes against *Meloidogyne paranaensis* and *M. incognita* under controlled and field conditions. *Nematology*, 19(5), 617-626. doi: <https://doi.org/10.1163/15685411-00003075>.
- Palomares-Rius, J. E.; Escobar, C.; Cabrera, J.; Vovlas, A. & Castillo, P. 2017. Anatomical alterations in plant tissues induced by plant-parasitic nematodes. *Frontiers in plant science*, 8, 1987.
- Patel, S.; & Dhillon, N. K. (2017). Evaluation of sunnhemp (*Crotalaria juncea*) as green manure/amendment and its biomass content on root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in successive crop brinjal. *Jornal of Entomology abd Zoology Studies*, 5(6), 716-720.
- Partelli, F. L.; Covre, A. M.; Oliveira, M. G.; Alexandre, R. S.; Vitória, E. L. D. & Silva, M. B. D. 2014. Root system distribution and yield of 'Conilon' coffee propagated by seeds or cuttings. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 49(5), 349-355.
- Perry, R. N. & Moens, M. 2011. Introdução to Plant-Parasitic Nematodes; Modes of Parasitism. In Fenoll, C.; Gheysen, G. & Jones, J. (Eds.). *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. pp 3-20.
- Pozo, M. J.; Jung, S. C.; Martínez-Medina, A.; López-Ráez, J. A.; Azcón-Aguilar, C. & Barea, J. M. 2013. Root allies: arbuscular mycorrhizal fungi help plants to cope with biotic stresses. In Aroca, R. (Ed.) *Symbiotic endophytes*. pp. 289-307.
- Ramalho, A. R.; Rocha, R. B.; Souza, F. F.; Veneziano, W. & Teixeira, A. L. 2016. Progresso genético da produtividade de café beneficiado com a seleção de clones de cafeeiro 'Conilon'. *Revista Ciência Agronômica*, 47(3), 516-523.
- Ramalho, A. R.; Rocha, R. B.; Veneziano, W. & Santos, M. M. D. 2014. *Cultivar de cafeeiro Conilon BRS Ouro Preto-características agronômicas e agroindustriais*. Porto Velho: Embrapa Rondônia, Comunicado Técnico, n. 396. 9 p
- Ramalho, A. R.; Veneziano, W.; Rocha, R. B.; Oliveira, C. L. L. G.; Cassaro, J. D. 2009. *Cultivares de cafeeiros conilon e robusta indicadas para o estado de Rondônia*. Porto Velho: Embrapa Rondônia, Comunicado Técnico, n. 348. 10 p.
- Rehman, S.; Gupta, V. K. & Goyal, A. K. 2016. Identification and functional analysis of secreted effectors from phytoparasitic nematodes. *BMC microbiology*, 16(1), 48.
- Rocha, R. B.; Ramalho, A. R.; Teixeira, A. L.; Souza, F. D. F. & Cruz, C. D. 2015. Adaptabilidade e estabilidade da produção de café beneficiado em *Coffea canephora*. *Ciência Rural*, 45(9), 1531-1537.
- Rocha, T. L.; Soll, C. B.; Boughton, B. A.; Silva, T. S.; Oldach, K.; Firmino, A. A. & Silva, L. P. 2017. Prospection and identification of nematotoxic compounds from *Canavalia ensiformis* seeds effective in the control of the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1), 87-100.

- Rodiuc, N.; Vieira, P.; Banora, M. Y. & Engler, J. A. 2014. On the track of transfer cell formation by specialized plant-parasitic nematodes. *Frontiers in Plant Science*. Plant Physiology, 5, 14p. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00160>.
- Salgado, S. M. L.; Rezende, J. C. de. & Nunes, J. A. R. 2014. Selection of coffee progenies for resistance to nematode *Meloidogyne paranaensis* in infested area. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 14(2), 94-101. <https://doi.org/10.1590/1984-70332014v14n2a17>
- Santos, M. F.; Salgado, S. M.; Silva, J. G.; Correa, V. R.; Mendonça, J. S. & Carneiro, R. M. 2018. *Meloidogyne incognita* parasitizing coffee plants in southern Minas Gerais, Brazil. *Tropical plant pathology*, 43(1), 95-98.
- Santos, T. R. S.; & da Costa Silva, R. G. 2017. Cafeicultura em Rondônia: circuito espacial de produção, modernização e subordinação. *Geografia (Londrina)*, 26(2), 145-163.
- Sato, K.; Kadota, Y.; & Shirasu, K. 2019. Plant immune responses to plant parasitic nematodes. *Frontiers in plant science*, 10, doi: 10.3389/fpls.2019.01165.
- Schouteden, N.; De Waele, D.; Panis, B. & Vos, C. M. 2015. Arbuscular mycorrhizal fungi for the biocontrol of plant-parasitic nematodes: a review of the mechanisms involved. *Frontiers in Microbiology*, 6, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01280>.
- Shah, M. M. & Mahamood, M. 2017. Nematodes - A Lesser Known Group of Organisms. In Shah, M. M.; & Mahamood, M. (Eds.). *Nematology: Concepts, Diagnosis and Control*. Cap. 1, p 3-18.
- Sharma I. P. & Sharma A. K. 2017. Physiological and biochemical changes in tomato cultivar PT-3 with dual inoculation of mycorrhiza and PGPR against root-knot nematode. *Symbiosis* 71(3), 175–183.
- Siddique, S.; & Grundler, F. M. 2018. Parasitic nematodes manipulate plant development to establish feeding sites. *Current opinion in microbiology*, 46, 102-108.
- Sikandar, A.; Zhang, M. Y.; Wang, Y. Y.; Zhu, X. F.; Liu, X. Y.; Fan, H. Y.; Xuan, Y. H.; Chen, L. J.; Duan, Y. X. 2020. Review article: *Meloidogyne Incognita* (Root-Knot Nematode) a risk to agriculture. *Applied Ecology and Environmental Research* 18(1),1679-1690. doi:10.15666/aeer/1801_16791690.
- Silva, J. C. P.; Figueiredo, Y, F. 2018. Avanços na Biotecnologia aplicada ao controle de fitonematoides. In Souza, T. J.; [et al.] (Eds.). Simpósio de Manejo de Boenças de Planta [Anais do] XVIII Simpósio de Manejo de Doenças de Plantas: biotecnologia aplicada à fitopatologia / organizado pelo Núcleo de Estudos em Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras; Ed. UFLA. pp 143-159.
- Singh, S. K.; Hodda, M.; Ash, G. J.; & Banks, N. C. 2013. Plant-parasitic nematodes as invasive species: characteristics, uncertainty and biosecurity implications. *Annals of Applied Biology*, 163(3), 323-350.
- Singh, S. K.; Hodda, M. & Ash, G. J. (2013). Plant parasitic nematodes of potential phytosanitary importance, their main hosts and reported yield losses. *Eppo Bulletin*, 43(2), 334-374.

- Sipes, B.; & Myers, R. 2018. Plant Parasitic Nematodes in Hawaiian Agriculture. In Subbotin, S. A. & Chitambar, J. J. (Eds). *Plant Parasitic Nematodes in Sustainable Agriculture of North America*, 1, p. 193-209.
- Soumana, D.; Trivedi, L.; & Trivedi, P.C. 2015. Sustainable use of medicinal plants to control *Meloidogyne incognita*-a strategy to fight root knot disease of crops in rajasthan, India. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(8), 818-829.
- Song, D.; Pan, K.; Tariq, A.; Sun, F.; Li, Z.; Sun, X.; ... & Wu, X. 2017. Large-scale patterns of distribution and diversity of terrestrial nematodes. *Applied Soil Ecology*, 114, 161-169.
- Stock, S. P. & Goodrich-Blair, H. 2012. Nematode parasites, pathogens and associates of insects and invertebrates of economic importance In Lacey, L. A. (Ed.). *Manual of techniques in invertebrate pathology, 2nd ed. Academic Press, London, United Kingdom*. p 373-426.
- Talwana, H.; Sibanda, Z.; Wanjohi, W.; Kimenju, W.; Luambano-Nyoni, N.; Massawe, C.; Manzanilla-López, R. H.; Davies, K. G.; Hunt, D. J.; Sikora, R. A.; Coyne, D. L.; Gowen, S. R. & Kerry, B. R. 2015. Agricultural nematology in East and Southern Africa: problems, management strategies and stakeholder linkages. *Society of Chemical Industry*, 72, 226-245. doi:10.1002/ps.410.
- Teixeira, A. L.; Rocha, R. B.; Espindula, M. C.; Ramalho, A. R.; Vieira Junior, J. R.; Alves, E. A. & Teles, C. F. R. 2019. Robustas Amazônicas: novas cultivares híbridas de café canéfora para a amazônia ocidental. In *Embrapa Rondônia-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 10.; 2019, Vitória. Pesquisa, Inovação e Sustentabilidade dos Cafés do Brasil. Anais... Brasília, DF: Embrapa Café, 2019.
- Teles, C. R. A.; & Behrens, J. H. 2020. The waves of coffee and the emergence of the new Brazilian consumer. In Almeida, L. F. & Spers, E. E. (Eds.). *Consumption and Industry Strategies in Brazil* . Cap. 13, p. 257-274.
- Thomas, S. H.; & Nischwitz, C. 2018. Plant Parasitic Nematodes of New Mexico and Arizona. In Subbotin, S. A. & Chitambar, J. J. (Eds.). *Plant Parasitic Nematodes in Sustainable Agriculture of North America*. 1, p. 113-130.
- Toumi, F.; Waeyenberge, L.; Viaene, N.; Dababat, A. A.; Nicol, J. M.; Ogbonnaya, F. & Moens, M. 2018. Cereal cyst nematodes: importance, distribution, identification, quantification, and control. *European journal of plant pathology*, 150(1), 1-20.
- Turatto, M. F.; Dourado, F. D. S.; Zilli, J. E. & Botelho, G. R. 2018. Control potential of *Meloidogyne javanica* and *Ditylenchus* spp. using fluorescent *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1), 54-58.
- Van den Berg, E.; Marais, M.; & Swart, A. 2017. Nematode morphology and classification. In Fourie, H.; Spaull, V. W.; Jones, R. K.; Daneel, M. S. & De Waele, D. (Eds.). *Nematology in South Africa: A view from the 21st Century*, p. 33-71.
- Van Den Hoogen, J.; Geisen, S.; Routh, D.; Ferris, H.; Traunspurger, W.; Wardle, D. A. & Bardgett, R. D. 2019. Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature*, 572(7768), 194-198.

- Vegro, C. L. R.; & de Almeida, L. F. 2020. Global coffee market: Socio-economic and cultural dynamics. In Almeida, L. F. & Spers, E. E. (Eds.). *Coffee Consumption and Industry Strategies in Brazil*. Cap. 1, p. 3-19.
- Ventura, J. A.; Costa, H.; & Lima, I. (2017). Manejo de pragas do café conilon. In Ferrão, R. G.; da Fonseca, A. F. A.; Ferrão, M. A. G. & de Muner, L. H. (Ed.). *Café Conilon*. 2 ed. atual. e ampl. - Vitória, ES : Incaper, 434-479.
- Venturini, R. P.; Silva, V. A.; Cunha, R. L.; Volpato, M. M. L.; Chalfoun, S. M.; Carvalho, G. R.; & Carvalho, V. L. 2013. A pesquisa e as mudanças climáticas na cafeicultura. *Informe Agropecuário*, 34, 34-43.
- Vieira Júnior, J. R.; Fernandes, C. D. F.; Matos, S. I.; Marreiros, J. A. A.; Freire, T. C.; Fonseca, A. S.; Sangi, S. C.; Maia, D. Z. & Silva, D. S. G. D. 2014. Alternativas para o manejo integrado de nematoide-das-galhas do cafeeiro. Porto Velho: Embrapa Rondônia, Documentos nº 160. 17 p.
- Vieira Júnior, J. R.; Fernandes, C. D. F.; Matos, S. I.; Freire, T. C.; Fonseca, A. S.; Marreiros, J. A. A. & Silva, D. S. G. D. 2015. Levantamento da ocorrência de populações do nematoide-das-galhas-do-cafeeiro (*Meloidogyne* sp.) em Rondônia-primeira atualização. Porto Velho: Embrapa Rondônia, Comunicado Técnico, n. 397. 2015. 5 p.
- Vieira, P.; & Gleason, C. 2019. Plant-parasitic nematode effectors—insights into their diversity and new tools for their identification. *Current opinion in plant biology*, 50, 37-43.
- Villain L.; Lima, S. S. M. & Trinh P. Q. 2018. Nematode parasites of coffee and cocoa. In Sikora R. A.; Coyne D.; Hallmann J. & Timper P. (Eds.). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford : CABI, pp. 536-583. ISBN 978-1-78639-124-7
- Villain, L.; Sarah, J. L.; Hernández, A.; Bertrand, B.; Anthony, F.; Lashermes, P. & Carneiro, R. M. D. G. 2013. Diversity of root-knot nematodes parasitizing coffee in central america [Diversidad de nematodos agalladores asociados al cultivo de café en centro américa]. *Nematropica*, 43(2), 194-206.
- Vos, C.; Geerinckx, K.; Mkandawire, R.; Panis, B.; De Waele, D. & Elsen, A. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi affect both penetration and further life stage development of root-knot nematodes in tomato. *Mycorrhiza*, 22(2), 157-163.
- Vos, C.; Schouteden, N.; van Tuinen, D.; Chatagnier, O.; Elsen, A.; De Waele, D. & Gianinazzi-Pearson, V. 2013. Mycorrhiza-induced resistance against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* involves priming of defense gene responses in tomato. *Soil Biology and Biochemistry*, 60, 45-54.
- Wangai, K. J.; Nzesya, M. J.; Maina, M. W.; Peter, W. M. & Elijah, G. K. 2014. Reaction of selected coffee germplasm to root-knot nematodes in Kenya. *Journal of Natural Sciences Research*, 4(3), 68-75.
- Wharton, D. A. 2012. *A functional biology of nematodes*. 208 p.
- Wani, K. A.; Manzoor, J.; Shuab, R. & Lone, R. 2017. Arbuscular mycorrhizal fungi as biocontrol agents for parasitic nematodes in plants. In Varna, A.; Prasad, R. & Tuteja, N. *Mycorrhiza-Nutrient Uptake, Biocontrol, Ecorestoration*. pp. 195-210.

- Yadav, U. 2017. Recent trends in nematode management practices: the indian context. *International Research Journal of Engineering and Technology*, 04(12), 482-489.
- Zambolim, L. Coffee tree diseases. In: Kimati H. et al. *Phytopathology Manual*. 5th ed. Ouro-Fino –MG: Agronômica Ceres, 2016a. v.2, p. 208-210.
- Zasada, I.; Dandurand, L. M.; Gleason, C.; Hagerty, C. H.; Ingham, R. E. 2018. Plant Parasitic Nematodes of the Pacific Northwest: Idaho, Oregon and Washington. In: Subbotin, S. A. & Chitambar, J. (Eds.). *Plant Parasitic Nematodes in Sustainable Agriculture of North América*, Vol. 2 - Western USDA and Mexico. p. 1-25.

ARTIGO 1: RESISTANCE OF NEW *Coffea canephora* CLONES TO ROOT-KNOT NEMATODE (*Meloidogyne incognita*) IN THE WESTERN AMAZON^A

Vaneide Araújo de Sousa Rudnick¹, José Roberto Vieira Junior², Cleberson de Freitas Fernandes³, Rodrigo Barros Rocha⁴, Alexsandro Lara Teixeira⁵, André Rostand Ramalho⁶, Marcelo Curitiba Espindula⁷, Anderson Vieira Santos⁸, Elize Francisca Mendes dos Anjos⁹, Francisco Paiva Uchôa¹⁰

¹Universidade Federal de Rondônia/UNIR, Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal/BIONORTE, Porto Velho, RO, Brasil

²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Embrapa, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, Brasil

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Embrapa, Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia, Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, Brasil

⁴Universidade Luterana do Brasil/ULBRA, Canoas, RS, Brasil

⁵Universidade Federal de Rondônia/UNIR, Rolim de Moura, RO, Brasil

Contact authors: van.rudnick@gmail.com, jose-roberto.vieira@embrapa.br,

cleberson.fernandes@embrapa.br, rodrigo.rocha@embrapa.br,

alexsandro.teixeira@embrapa.br, andre.rostand@embrapa.br,

marcelo.espindula@embrapa.br, andersonvieirasantos@msn.com, elizeanjos@gmail.com,

francisco.paivau@gmail.com Received in January 20, 2020 and approved in July 28, 2020

ABSTRACT

Root-knot disease is among the main diseases affecting coffee crop. The plant selection to the development new resistant cultivars is among one the most efficient methods of control. The present work aimed to quantify the resistance responses of *Coffea canephora* clones to root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in the Western Amazon. For this, 17 previously selected clones were evaluated in three experimental trials, carried out in the municipalities of Ji-Paraná and Porto Velho, Rondônia. The resistance to root-knot nematodes *M. incognita* were evaluated by the numbers of gall in the roots (NG) and by the reproductive factor (RF). The resistance response was also interpreted according the genetic diversity of the clones based in their morphological traits. The clones BRS3210, C12, BRS2314, BRS3137 and BRS1216 are resistant to *M. incognita* with RF of 0.34, 0.62, 0.79, 0.86 and 0.98, respectively. BRS3213, C125, C15, BRS2336, BRS3220 and C09 clones were classified as susceptible, with RF of 1.93, 1.95, 2.00, 2.31, 2.32 and 2.35. The BRS3193, C160 and BRS2357 clones were classified as very susceptible, with RF values of 3.03, 4.41 and 5.82, respectively. The clustering based on the genetic diversity of morphological traits indicated that genotypes more similar to the Robusta botanic variety had lower RF. The hybrid plants showed intermediate degrees of resistance indicating the segregation for the character of the *M. incognita* resistance. The clones BRS3210, C12, BRS2299, BRS2314, BRS3137 and BRS1216 expressed resistance responses to *M. incognita* with potential for growing resistant genotypes in the Western Amazon.

Key words: Coffee; root-knot disease; plant breeding; Amazonian.

^A Versão aceita revista Coffe Science (em edição)

1. INTRODUCTION

Brazil is the second largest coffee producer of the species *Coffea canephora* with production of 14.3 million bags (60 kg) of hulled coffee (CONAB, 2020). This culture is a relevant source of income for hundreds of municipalities being important to the generation of jobs in the field. The state of Rondônia is the third largest producer of *C. canephora* in Brazil, after the states of Espírito Santo and Bahia. Its coffee-growing area consists of approximately 73 thousand hectares, with mean annual production of 1.9 million bags (60 kg) of hulled coffee (CONAB 2020; Ministry of Agriculture, Livestock and Supply - MAPA 2020).

Among the factors that can limit coffee yield, pests and diseases is one of the most important (Van Der Vossem, et al., 2015; Zambolim, 2016a; Avelino, et al., 2018; Oliveira, et al., 2018a; Myers, et al., 2020). Plant-parasitic nematodes have an important economic impact on coffee in most coffee-producing countries. Economic losses may vary considerably, depending on the species, the population density and the susceptibility of the host cultivar (Fatobene, et al., 2018). Among the most harmful species are the *Meloidogyne exigua* Göldi 1887, *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood 1949 and *M. paranaensis* Carneiro, Almeida & Carneiro (1996). *M. incognita* has been the species with the highest occurrence in *C. Canephora* crops in the state of Rondônia, and the one with the greatest economic impact (Vieira Junior et al., 2015). Causing the death of plants up to two years old, the damage caused to the root system reduces the absorption capacity of water and nutrients (Goulart, et al., 2019; Ventura, et al. 2019). It also exposes the root to others diseases such as Fusarium wilt and Rizoctonia damping-off (Vieira Junior et al., 2015; Lopez-Lima et al., 2018).

The field control of plant parasite nematodes is limited and usually does not bring satisfactory results (Ferraz and Brown, 2016; Zambolim, 2016a; Ebone, Kovaleski; Deuner,

2019). Some practices such as crop rotation may not be viable, once the *M. incognita* has a large host range. Chemical control is also limited, as it causes adverse effects to the environment and loses its efficacy over time (Zambolim, 2016b).

Plant selection of *C. canephora* genotypes with resistance to root knot nematodes may be considered in the development of new resistant cultivars (Lima, et al., 2015; Fatobene et al., 2018). Of the 32 genotypes of *C. canephora* evaluated by Santos et al. (2018a), it was observed that nine showed higher susceptibility to *M. incognita*. In a study of 73 wild *Coffea* spp, plants were identified 18 genotypes of *C. canephora* resistant to *Meloidogyne* spp. (Aribi et al. 2018). *C. canephora* clones resistant to *Meloidogyne* spp. are an alternative to coffee production in infested areas, including those areas traditionally cultivated with *C. arabica* (Salgado, et al., 2020).

With the objective of selecting resistant genotypes, clones with characteristics of the Conilon and Robusta botanical varieties were characterized to their reaction to the root-knot nematode *M. incognita* (Est I2).

2. MATERIAL AND METHODS

Seventeen previously selected genotypes (Oliveira, et al., 2018b; Spinelli, et al., 2018) were evaluated by the following morphological and productive traits: plant height, number of productive plagiotropic branches, distance between rosettes of the plagiotropic branch, number of coffee beans per rosette, number of rosettes per plagiotropic branch, length of plagiotropic branch, length and width of leaves, number of days for fruit ripening and coffee bean size. The genotypic value of production was estimated based on production of hulled coffee using the BLUP (Best Linear Unbiased Prediction) method (Table 1).

Table 1. Clones of *Coffea canephora* evaluated for *Meloidogyne incognita* resistance on three experiments (trials) performed in the municipalities of Ji-Paraná and Porto Velho - RO.

Treatments	Clones	Origin
1	Apoatã-2258	Robusta IAC 2258-1 S2

2	K98M-0125	Cultivar BRS Ouro Preto
3	K98M-0160	Cultivar BRS Ouro Preto
4	BRS 2357	Cultivar BRS Ouro Preto
5	BRS 2299	Cultivar BRS Ouro Preto
6	C09	Emcapa 03 x Robusta 640
7	C12	Emcapa 03 x Robusta IAC2258-1 S2
8	C15	Emcapa 03 x Robusta IAC2258-1 S2
9	C750	Open pollinated hybrid
10	BRS 2336	Open pollinated hybrid
11	BRS 3137	Open pollinated hybrid
12	BRS 3193	Open pollinated hybrid
13	BRS 3210	Emcapa 03 x Robusta IAC2258-1 S2
14	BRS 3213	Emcapa 03 x Robusta IAC2258-1 S2
15	BRS 2314	Emcapa 03 x Robusta 640
16	BRS 1216	Emcapa03 x Robusta 1675
17	BRS 3220	Emcapa 03 x Robusta 1675

The *M. incognita* inoculation agent was extracted from samples of roots taken from under the canopy of naturally infested crop fields in the municipality of Ji-Paraná, RO (10°52'53''S, 61°30'45''W, altitude 159 m) (Santos et al., 2017). In order to identify the species of the rootknot nematode, enzymatic characterization of the esterase profile was performed in the Embrapa Temperate Climate Plant Pathology Laboratory - RS, according to the methodology of Carneiro & Almeida (2001). Using females of *Meloidogyne javanica* as control samples, the observed esterase profile was of a single typical pattern of *M. incognita* (Est I2) (Santos et al., 2017). The inoculum was kept in greenhouse, alternating its multiplication in tomato and coffee plants forming an inoculum bank. This inoculum was registered in the “Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - Sisgen” under access code number AF69FBC.

To quantify the resistance response to *M. incognita* of the *C. canephora* clones, three tests were carried out: the first and the second trials were evaluated at Embrapa Rondônia – Porto Velho, RO (8 ° 47 '38, 44 "S, 63 ° 50'47.93 "O) from September 2017 to February 2018 and from July to December 2018. The third trial was evaluated at the Lutheran University of Brazil (10 ° 51'44.36" S, 61 57'29.33 "O) in Ji-Paraná- RO from July to December 2018. All

tests were performed in a greenhouse "chapel model", covered with 120 micron anti-UBV plastic film with front and side ventilation.

For the tests, seedlings with six months of development and six pairs of leaves were transplanted to 8-liter pots containing sterilized substrate composed of natural soil and sand 1:1. Each coffee plant was inoculated separately by irrigation of the substrate in the pot with 10 ml of suspension containing 5000 eggs + second stage juveniles (J2) of *M. incognita* (Est I2). For this evaluation, the roots of each plant were separated from the shoots, washed, and weighed, and the number of galls were counted in 3g of root. After that, the roots were processed according to the methodology of Boneti & Ferraz (1981) to determine the number of eggs and the reproduction factor (RF) of *M. incognita* (RF = final population / initial population) (Oostenbrink, 1966). To calculate the RF, the number of nematode eggs extracted from each coffee plant were counted on a Peter's slide under a light microscope.

The classification of the resistance levels was based on the criteria proposed by Moura and Regis (1987). The immune genotypes were those with 100% reduction in the reproduction factor (RF). The resistant were those with 99 to 51% of reduction and the susceptible ones those below 50% of reduction. The most susceptible genotypes presented RF estimates higher than the susceptible controls.

Each genotype inoculated with *M. incognita* represented a treatment, using six replications for each clone arranged in a completely randomized design. The Apoatã-2258 and BRS2299 were used as resistant controls, due to their previously known resistance to *M. incognita* (Santos et al., 2017). The open pollination clones C750 and C125 were used as susceptible controls due to their susceptibility to nematodes, as observed in the tests carried out by Santos et al. (2017; 2018a).

The significance of the effect of clones on the resistance response was individually tested in each experiment, according to the model described by Cruz, Regassi and Carneiro (2012) (Equation 1):

$$Y_{ij} = \mu + G_i + E_{ij} \quad (1)$$

Where Y_{ij} refers to the observation of the i th genotype in the j th replication; μ is the experimental average; G_i is the effect of the i th genotype (clone); and E_{ij} is the experimental error that affects all the observations.

After that, the homogeneity of residual variances was verified and a joint variance analysis was performed, to quantify the effect of the interaction between genotypes and experiments. Each experiment was interpreted as a different environment, according to the model described by (Cruz, Regazzi and Carneiro, 2012):

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + A_j + GA_{ij} + E_{ijk} \quad (2)$$

Where Y_{ijk} refers to the observation of the i th genotype in the j th environment; μ is the experimental average; G_i is the effect of the i th genotype (clone); A_j it is the effect of the j th environment; GA_{ij} is the effect of the interaction between the i th genotype and the j th environment and E_{ijk} is the experimental error.

In order to quantify the proportion of total variance due to genotype and environmental effects, estimates of genotypic, environmental and phenotypic variance were obtained using the least squares estimation method (Cruz et al., 2012). From the variance components were estimated the heritability in the broad sense, the genotypic and environmental coefficients of variation and the intraclass correlation (Rocha et al., 2015).

3. RESULTS AND DISCUSSION

The effect of the genotype x environment interaction was significant for the resistance traits: number of galls, number of eggs and reproduction factor; indicating differences in the resistance response of the clones (Table 2). To achieve higher precision and accuracy of the RF estimates, three biological tests were interpreted.

The change in the resistance response evaluated in different tests can be of simple nature, when there is no alteration in the classification of the resistant genotypes. Or this change can be of complex nature, when there is modification in the RF classification (Cruz et al., 2012). For this reason the RF estimates were interpreted individually in each experiment (Table 2).

Table 2. Analysis of variance of gall number (NG), number of eggs (NO) and nematode reproduction factor (RF) evaluated at 17 clones of the botanical varieties Conilon and Robusta in experiments carried out in Porto Velho - RO and Ji-Paraná, RO, 150 days after inoculation with 5000 eggs of *Meloidogyne incognita*.

FV	GL	NG ¹	NO ¹	RF
Treatments	16	3,60**	15,66**	24,28**
Genotypes (GEN)	12	1,22 ^{NS}	16,56**	24,44**
Control (CTRL)	3	14,53**	16,35**	30,03**
Groups	1	8,21*	7,17 ^{NS}	16,74 ^{NS}
Environments (ENV)	2	9,09**	14,18**	8,42**
GEN x ENV	32	9,33**	4,28**	5,29**
Residue	255			
Total	305			
Average Overall		8,92	246,84	1,94
Average Susceptible Control		10,23	358,56	2,25
Average Resistant Control		3,54	39,57	0,37

¹Data transformed to the square root of the value. **: significant at 1% probability. GL: degrees of freedom, NG: number of galls, NO: number of eggs, RF: Reproduction factor.

The heritability measures the relative proportion between the genotypic and environmental variances in expression of the resistance (Almeida, Cruz and Resende, 2016). The number of eggs (NO) and the reproduction factor (RF) presented mean heritability estimates higher than 90%, indicating predominant genetic control, with potential for selection gains (Table 3). Lower estimate of heritability was observed for the gall number trait, indicating higher environmental influence.

Several factors can affect the results of a challenge between pathogen and host. Biological factors such as inoculant virulence, seedling development, substrate composition, inoculation conditions, greenhouse humidity, temperature and solar irradiation, may be considered (Hua, 2013; Mohawesh and Karajeh, 2014; Carvalho, et al., 2015; Özalp and Devran, 2018). In addition to standardizing the conditions of the biological tests, the principles

of agricultural experimentation were considered to interpret all these factors together, as effects of the environment.

The characteristics that have the higher coefficients of variation were RF>NO>NG (Table 3). Santos et al. (2017) observed similar magnitude estimates in the the evaluation of the cultivar ‘BRS Ouro Preto’ to *M. incognita* (Est I2). Estimates of the coefficient of genetic variation (CV_g) above the coefficient of environmental variation (CV_e) characterize a favorable condition to obtain gains with the selection of resistant plants. The CV_g/CV_e ratio showed an amplitude of 0,35 for NG and 2,76 for RF indicating that the second trait had higher genetic variability than the first one.

Table 3. Genetic parameters estimates of nematode number of galls (NG), number of eggs (NO) and reproduction factor (RF) evaluated in 17 clones of the botanical varieties Conilon and Robusta in experiments carried out in Porto Velho - RO and Ji-Paraná, RO, 150 days after inoculation with 5000 eggs of *Meloidogyne incognita*.

Genetic Parameters	NG	NO	RF
σ_g^2	0,03	36,47	2,40
σ_p^2	0,37	5,10	0,25
σ_e^2	0,25	11,60	0,31
h^2	18,16	93,96	95,91
$\hat{\rho}$	4,67	68,60	80,82
CV_g	5,88	42,00	72,50
CV_e	17,83	24,92	28,89
CV_g/CV_e	0,35	1,77	2,76

σ_g^2 : genotypic variance, σ_p^2 : phenotypic variance, σ_e^2 : environmental variance, h^2 : heritability for selection based on genotype average $\hat{\rho}$: intraclass correlation, CV_g : genotypic coefficient of variation, CV_e : environmental coefficient of variation, CV_g/CV_e : ratio of genotypic and environmental coefficients of variation.

Although used as a criterion to classify plant resistance to nematodes, other authors have reported limitations in the use of the number of galls for the diagnosis of resistance (Saucet, et al., 2016; Barcala, et al., 2016; Sato, et al., 2019); since resistant plants can form galls in the presence of few nematodes and susceptible plants might not produce galls (Santos et al., 2017). According to Araujo Filho and Dallagnol (2018), the resistance response of plants does not prevent the penetration of roots by juveniles (J2). Lima et al. (2015) show that the defense

response of the roots of *C. canephora* was later activated by the formation of giant cells, with inhibition and degradation of the nematode feeding sites, instead of obstructing the root infection. Thus, the characteristic number of galls was not considered for discrimination of resistant genotypes.

As expected, the treatments used as resistant and susceptible controls showed significant differences in the resistance traits means (Table 2). The reproduction factor of 0.37 of the Apoatã-2258 and BRS2299 treatments indicates that these clones, also classified as resistant by Santos et al., 2018a, showed resistance to *M. incognita*. Such results confirm the resistance of the Apoatã cultivar which has been used as an alternative in control of root-knot nematodes. The Apoatã IAC 2258 is recommended as rootstock resistant to *Meloidogyne* spp. in São Paulo for planting grafted seedlings in areas infested with the nematodes *M. exigua* and *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood and *M. paranaensis* (BARBOSA, et al., 2014; ANDREAZI, et al, 2015).

The reproduction factor of 2.25 estimated from the susceptible treatments C750 and C125 indicates the higher susceptibility of these clones. The use of susceptible clones is also important to check on the inoculum's virulence, understood as the pathogen's ability to multiply within the host (Lima, et al., 2015; Peres, et al., 2017; Santos, et al., 2018b). These results are similar to those obtained by Santos et al. (2017; 2018a) who observed reproduction factor averages of 0.36 and 1.59 in different experiments evaluated in Western Amazonia.

For the classification of resistance of *C. canephora* genotypes to *M. incognita* (Est I2) the clones were ordered according to the reproduction factor reduction (RFR), using Linn and Binns classification criteria that considers performance and stability in all experiments (Table 4). The classification of resistance or susceptibility was based on the criteria presented by Moura and Regis (1987).

The clones BRS 3210, C12, BRS 2314, BRS 3137 and BRS 1216 expressed reduction of the reproduction factor (RF) higher than 51% being considered as resistant. The clone BRS 3210 showed higher reductions in the RF than the positive control BRS 2299. Clones BRS 3213, KM98-0125, C15, BRS 2336 and C09 expressed a reduction in reproduction factor of less than 50% and were classified as susceptible to knot-root nematode *M. incognita*. In turn, clones BRS 2357, KM98-0160 and BRS 3193 were considered very susceptible, being more susceptible than susceptible control C750.

The reproduction factor (RF) showed an amplitude ranging from 0.34 (BRS 3210) to 5.82 (BRS 2357), similar as observed in another studies. Aribi et al. (2018) observed amplitude from 0.0 to 3.1 in the evaluation of 13 genotypes. Amplitude of 0.34 to 8.4 was also observed by Lima et al. (2015), after 8 months of inoculation with a population of 10.000 eggs.

In order to compare the genetic diversity to the resistance response, the clones were grouped according to their morphological characteristics (Figure 1). The plants of the Robusta botanical variety were distinguished by their higher vegetative vigor, which reflect in their higher height, plagiotropic branch length, distance between rosettes, number of rosettes per branch, leaf length and width compared to the clones of the Conilon botanical variety. The dendrogram indicated the formation of four distinct groups according to the similarity of the clones, whether from the botanical variety Conilon, Robusta or intervarietal hybrids (Figure 1).

The group I formed by clones C750, BRS 2357 with traits of the Conilon botanical variety presented higher average reproduction factor (RF = 4.18). The group II formed by clones KM98-0160, KM98-0125, BRS 2336, BRS 2299 and BRS 3137 and the group III by clones BRS 3210, BRS 3213, C15, BRS 3220, BRS 1216, C09, BRS 2314 and BRS 3193 are characterized by clustering plants with hybrid traits among the Conilon botanical varieties and Robusta. These groups had lower mean reproductive factor estimates than the first group of

2.08 and 1.63 respectively. And at last, the group IV formed by the clones Apoatã and C12 that have predominant Robusta traits, presented lower mean of the reproduction factor (RF = 0,39).

Table 4. Reproduction factor (RF) and reproduction factor reduction (RFR) of 17 *Coffea canephora* clones of the Conilon and Robusta botanical varieties in experiments carried out in the municipalities of Porto Velho - RO and Ji-Paraná, RO, 150 days after inoculation with 5000 eggs of *Meloidogyne incognita*.

Genotypes	Exp1	Exp2	Exp3	Average (RF)	Linn and Binns Ordering	RFR (%)	Classification ³
Apoatã-2258	0,18	0,03	0,03	0,08	1	96.86	Resistant
BRS 3210	0,28	0,32	0,43	0,34	2	86.67	Resistant
C12	0,43	0,35	1,08	0,62	3	75.69	Resistant
BRS 2299 ¹	0,78	0,5	0,7	0,66	4	74.12	Resistant
BRS 2314	0,98	0,37	1,03	0,79	5	69.02	Resistant
BRS 3137	0,63	0,92	1,03	0,86	6	66.27	Resistant
BRS 1216	1	0,92	1,02	0,98	7	61.57	Resistant
BRS 3213	1,6	1,8	2,38	1,93	8	21.57	Susceptible
K98M-0125 ²	1,5	1,7	2,65	1,95	9	24.31	Susceptible
C15	1,87	2,23	1,9	2,00	10	23.53	Susceptible
BRS2336	2,78	1,93	2,23	2,31	11	9.41	Susceptible
BRS3220	2,07	1,78	3,1	2,32	12	9.02	Susceptible
C09	2,47	1,87	2,7	2,35	13	7.84	Susceptible
C750 ²	2,22	2,82	2,62	2,55	14	0.00	Highly Susceptible
BRS 3193	2,73	2,25	4,1	3,03	15	-18.82	Highly Susceptible
K98M-0160	4,97	3,07	5,2	4,41	16	-72.94	Highly Susceptible
BRS 2357	5,85	4,2	7,42	5,82	17	-128.24	Highly Susceptible

¹Resistant control, ²Susceptible control. Exp1: Porto Velho (September 2017 to February 2018). Exp2: Porto Velho (July to December 2018.), Exp3: Ji-Paraná (July to December 2018). ³Classification according to Moura and Regis (1987).

In addition to the lower plant reproduction factor of the Robusta botanical variety, resistance segregation is also observed in hybrid plants, with very resistant hybrid clones such as BRS 3210 and very susceptible ones, like as BRS 3193. The segregation of the resistance response indicates that the genotypes must be evaluated individually regardless of their genealogy or other morphological traits.

Many studies of nematode resistance have indicated the action of few genes with greater effect (PASSIANOTTO, et al., 2017; MOTA, et al., 2020). There are also other results, that indicate the action of lesser effect genes that have evolved over time, according to the gene-for-gene theory (BELL, et al., 2019, PRZYBYLSKA A. and OBREPALSKA-STEPLOWSKA, 2020). In *C. canephora*, the plant-pathogen response mechanism is related to a hypersensitivity response, which occurs shortly after root penetration and establishment of a feeding site, starting an attack and defense gene interaction between pathogen and host (LIMA et al., 2015; MAGHULY, JANKOWICZ-CIESLAK and BADO, 2020).

This pattern was also observed by Albuquerque et al. (2017) in *C. arabica* response against *M. incognita*. These authors observed that plant defense genes were suppressed in susceptible plants, unlike the resistant ones that showed a rapid hypersensitivity response shortly after the establishment of the feeding site.

According to Ferraz (2018) and Ventura et al. (2019) the strategies to reduce the population of phytonematodes in field are biological, chemical and genetic, the latter being the most efficient and economically viable. Therefore, the selection of resistant clones is one of the most promising alternatives to minimize the damage caused by nematodes in the coffee culture, keeping the nematode populations below the level of economic damage (FATOBENE, et al., 2018; REZENDE, et al., 2019; SALGADO, et al., 2020). The clones BRS 3210, C12, BRS 2314, BRS 3137 and BRS 1216, showed resistance to *M. incognita*. Thus constituting an important factor for the management and control of gall nematodes in the region.

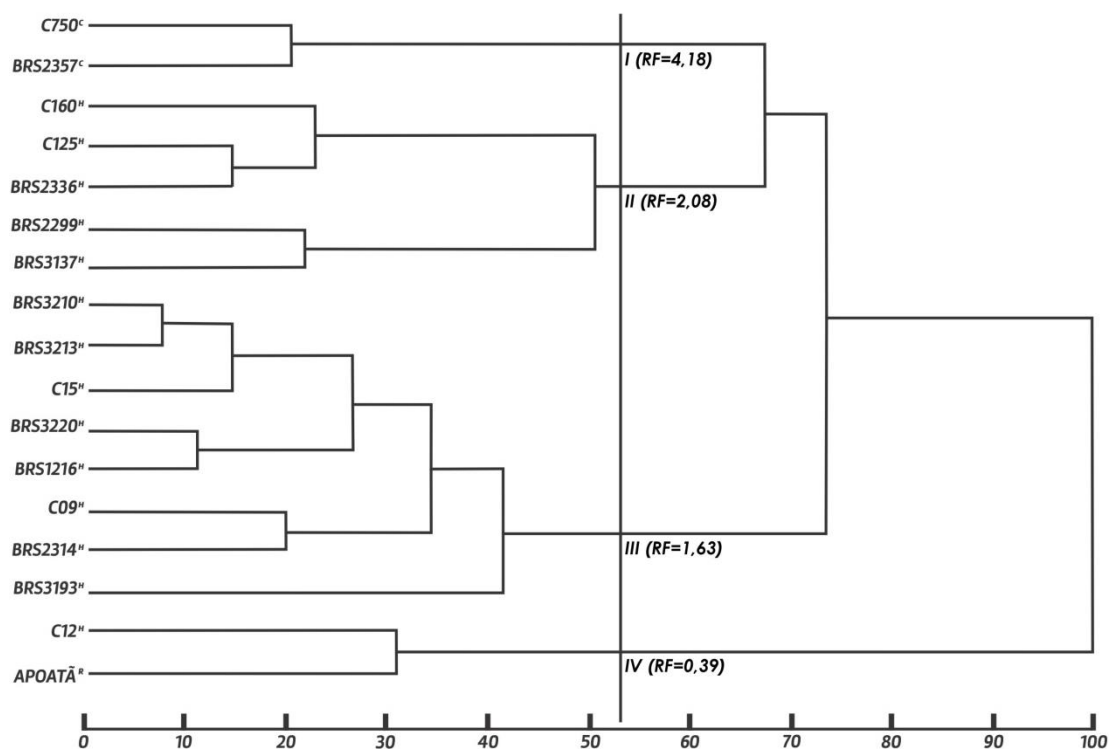


Figure 1. Dendrogram obtained by the UPGMA method, classifying the 17 *Coffea canephora* clones in relation to ten morphological traits evaluated in the first production. The letters C, R and H identify clones with predominant traits of the botanical varieties Conilon, Robusta or intervarietal hybrids. The cutoff point established at the greatest distance between the groups identifies the clusters I, II, III and IV that present different reproductive factors (RF).

4. CONCLUSION

At 150 DAI, the *C. canephora* clones BRS 3210, C12, BRS 2299, BRS 2314, BRS 3137 and BRS 1216 expressed resistance response to *M. incognita*, indicating potential for selection in coffee breeding programs of genotypes resistant to root nematodes. The number of eggs + J2 is a more reliable trait, for evaluating resistance to *M. incognita* in *C. canephora*, than to characteristic number of galls. The segregation of the resistance response indicates that the genotypes must be evaluated individually regardless of their genealogy or other morphological traits.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

To the Brazilian Coffee Research and Development Consortium (CPC), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Foundation for the Support

of the Development of Scientific and Technological Actions and Research of the State of Rondônia (FAPERO) and Embrapa Rondônia for their financial support.

6. REFERENCES

- ALBUQUERQUE, E.V.S. et al. Early responses of coffee immunity-related genes to root-knot nematode infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 100: 142-150, 2017.
- ALMEIDA, I.F.; CRUZ, C.D.; RESENDE, M.D.V. Validation and phenotypic correction in genome-wide selection. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 51 (12): 1973-1982, 2016.
- ANDREAZI, E. et al. Behavior of 'IPR 100' and 'Apoatã IAC 2258' coffee cultivars under different infestation levels of *Meloidogyne paranaensis* inoculum. **Australian Journal of Crop Science**, 9 (11):1069-1074, 2015.
- ARAUJO FILHO, J.V.; DALLAGNOL, L.J. Plant resistance to phytonmatoids: importance, terminology and biological aspects. In: DALLAGNOL, L. J **Genetic resistance of plants and pathogens**. Pelotas. Ed. UFPel. 2018, p. 394-420.
- ARIBI, J. et al. Screening of wild coffee (*Coffea* spp.) for resistance to *Meloidogyne incognita* race 1. **Nematropica**, 48 (1): 5-14, 2018.
- AVELINO, J. et al. Multiple-disease system in coffee: From crop loss assessment to sustainable management. **Annual review of phytopathology**, 56: 611-635, 2018.
- BARBOSA, D.H.S.G. et al. Efeito da enxertia e do nematoide *Meloidogyne exigua* sobre o crescimento radicular e a produtividade de cafeeiros. **Coffee Science**, 9 (4): 427-434, 2014.
- BARCALA, M. et al. **Belowground defense strategies against sedentary nematodes**. Springer, Cham, 2016. p. 221-251.
- BELL, C.A. et al. Plant-parasitic nematodes respond to root exudate signals with host-specific gene expression patterns. **PLoS pathogens**, 15 (2): e1007503, 2019.
- BONETI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modification of the Hussey & Barker method for extracting eggs from *Meloidogyne exigua* from coffee roots. **Fitopatologia Brasileira**, 6 (3): 553, 1981.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Electrophoresis technique used in the study of gall nematode enzymes for species identification. **Nematologia Brasileira**, 25 (1): 35-44, 2001.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A and CARNEIRO, R. G. Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. **Fundamental and applied Nematology**, 19(6): 555-560, 1996.
- NATIONAL SUPPLY COMPANY - CONAB. **Monitoring of the Brazilian harvest: coffee**. Brasilia: Conab. 1 (1): 35-37, 2020.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Biometric models applied to genetic improvement**. 4.ed. Viçosa: UFV, 514 p. 2012.
- CARVALHO, L.M. et al. *Mi-1*-mediated nematode resistance in tomatoes is broken by short-term heat stress but recovers over time. **Journal of nematology**, 47(2): 133-140, 2015.

- EBONE, L.A.; KOVALESKI, M. and DEUNER, C.C. Nematicides: history, mode, and mechanism action. **Plant Science Today**, 6 (2): 91-97, 2019.
- FATOBENE, B.J.R. et al. *Coffea canephora* clones with multiple resistance to *Meloidogyne incognita* and *M. paranaensis*. **Experimental Agriculture**, 55 (3): 443-451, 2018.
- FERRAZ, L.C.C.B.; BROWN, D.J.F. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. Manaus: **Norma Editora**, (1): 251, 2016.
- FERRAZ, L.C.C.B. Nematoides. In: AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 5^a ed. Ouro Fino – MG. Agronômica Ceres, 2018. p.195 – 211.
- GOULART, R.R. et al. *Meloidogyne paranaensis* and *M. exigua* alter coffee physiology. **Nematology**, 21 (5): 459-467, 2019.
- HUA, J Modulation of plant immunity by light, circadian rhythm, and temperature. **Current opinion in plant biology**, 16 (4): 406-413, 2013.
- LIMA, E.A. et al. The Multi-Resistant Reaction of Drought-Tolerant Coffee “Conilon Clone 14” to *Meloidogyne* spp. and Late Hypersensitive-Like Response in *Coffea canephora*. **Phytopathology**, 105 (6): 805–814, 2015.
- LÓPEZ-LIMA, D. et al. Fungal diversity and *Fusarium oxysporum* pathogenicity associated with coffee corky-root disease in Mexico. **Revista De La Facultad De Ciencias Agrarias UNCuyo**, 52 (1): 276-292, 2018.
- MAGHULY, F.; JANKOWICZ-CIESLAK, J. & BADO, S. Improving coffee species for pathogen resistance. **CAB Reviews**, 15(009): 1-18, 2020.
- MINISTRY OF AGRICULTURE, LIVESTOCK AND SUPPLY - MAPA. **Gross Value of Production** - January / 2020 - Brazil. Available at: <https://www.gov.br/> Accessed: May 15, 2020.
- MOHAWESH, O. and KARAJEH, M. Effects of deficit irrigation on tomato and eggplant and their infection with the root-knot nematode under controlled environmental conditions. **Archives of Agronomy and Soil Science**, 60 (8): 1091-1102, 2014.
- MOTA, A.P.Z. et al. Evolutionarily conserved plant genes responsive to root-knot nematodes identified by comparative genomics. **Molecular Genetics and Genomics**, 1-16, 2020.
- MOURA, R.M.; REGIS, E.M.O. Reactions of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in relation to the parasitism of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* (Nematoda: Heteroderidae). **Nematologia Brasileira**, 11: 215-225, 1987.
- MYERS, R. et al. Grafted Coffee Increases Yield and Survivability. **HortTechnology**, 30 (3): 428-432, 2020.
- OLIVEIRA, C.M. et al. Coffee berry borer in conilon coffee in the Brazilian Cerrado: an ancient pest in a new environment. **Bulletin of entomological research**, 108 (1): 101-107, 2018a.
- OLIVEIRA, L.N.L. et al. Selection of *Coffea canephora* parents from the botanical varieties Conilon and Robusta for the production of intervarietal hybrids. **Ciência Rural**, 48 (4): 1-7, 2018b.
- OOSTENBRINK, M. Major characteristic of relation between nematodes and plants. **Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen**, 66 (4): 1-46, 1966.

- ÖZALP, T.; DEVRAN, Z. Response of tomato plants carrying Mi-1 gene to *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 under high soil temperatures. **Türkiye Entomoloji Dergisi**, 42 (4): 313-322, 2018.
- PASSIANOTTO, A.L.L., et al. Genome-wide association study for resistance to the southern root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in soybean. **Molecular Breeding**, 37:148, 2017.
- PERES, A.C.J. et al. Resistência de genótipos de *Coffea arabica* contra *Meloidogyne paranaensis* e *M. incognita* em condições controladas e de campo. **Nematology**, 19 (5): 617-626, 2017.
- PRZYBYLSKA, A., and OBREPALSKA-STEPLOWSKA, A. Plant defense responses in monocotyledonous and dicotyledonous host plants during root-knot nematode infection. **Plant and Soil**, 451: 239-260, 2020.
- REZENDE, R.M. et al. Arabica coffee progenies with multiple resistant to root-knot nematodes. **Euphytica**, 215:62, 2019.
- ROCHA, R. B. et al. **Melhoramento de *Coffea canephora* - considerações e metodologias.** In: Alaerto Luiz Marcolan; Marcelo Curitiba Espindula. (Org.). *Café na Amazônia*. 1ed. Brasília, DF: Embrapa, 2015, v. 1, p. 99-126.
- SALGADO, S.M.L. et al. Resistance of Conilon coffee cultivar Vitoria Incaper 8142 to *Meloidogyne paranaensis* under field conditions. **Experimental Agriculture**, 56 (1): 88-93, 2020.
- SANTOS, A.V. et al. Reaction of *Coffea canephora* clones to the root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **African Journal of Agricultural Research**, 12 (11): 916-922, 2017.
- SANTOS, A.V. et al. Characterization of resistance response of *Coffea canephora* genotypes to *Meloidogyne incognita* (Est I2) root-knot nematode. **Coffee Science**, 13 (2): 219 - 229, 2018a.
- SANTOS, M.F.A et al. Genetic variability of *Meloidogyne paranaensis* populations and their aggressiveness to susceptible coffee genotypes. **Plant Pathology** 67 (1): 193-201, 2018b.
- SATO, K.; KADOTA, Y.; SHIRASU, K. Plant Immune Responses to Parasitic Nematodes. **Frontiers in plant science**, 10: 1165-1165, 2019.
- SAUCET, S.B. et al. Resistance to root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. in woody plants. **New Phytologist**, 211 (1): 41-56, 2016.
- SPINELLI, V.M. et al. Contribution of agronomic traits to the coffee yield of *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner in the western amazon region. **Coffee Science**, 13 (3): 333-340, 2018.
- VAN DER VOSSEN, H; BERTRAND, B. and CHARRIER, A. Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review. **Euphytica**, 204 (2): 243-256, 2015.
- VENTURA, J.A.; COSTA, H. and LIMA, I.M. Conilon coffee disease management In: **Conilon Coffee**, FERRÃO [et al.], 3rd edition updated and expanded - Vitória, ES: Incaper, 2019.
- VIEIRA JÚNIOR, J.R. et al. Survey of the occurrence of threats from the coffee tree gall nematode (*Meloidogyne* sp.) In Rondônia - first update. **Technical Release**, 397. ISSN 0103-9458, 2015.

- ZAMBOLIM, L. Coffee tree diseases. In: KIMATI H. et al. **Phytopathology Manual**. 5th ed. Ouro-Fino –MG: Agronômica Ceres, 2016a. v.2, p. 208-210.
- ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, 41 (1): 1-8, 2016b.

1 **ARTIGO 2: Interaction Between Rhizobacteria and Arbuscular Mycorrhizal Fungi**
 2 **in the control of coffee root-knot nematode^A**

3 Vaneide Araújo de Sousa RUDNICK ^{1*}ID, José Roberto VIEIRA JUNIOR², Cleberson de
 4 Freitas FERNANDES², Rogério Sebastião Corrêa da COSTA³, Ludmila Coutinho da
 5 SILVA⁴, Talyssa Mendes da SILVA⁴, Chaly Martins da SILVA⁵, Christiana de Fátima
 6 Bruce da SILVA²

7
 8 ¹ Doutoranda do programa de pós graduação Bionorte-Rede de Biodiversidade e Biotecnologia
 9 da Amazônia Legal - Fundação Universidade Federal de Rondônia - UNIR. Secretaria do
 10 PPG-BIONORTE BR 364 KM 9,5, CAMPUS
 11 Porto Velho/RO CEP: 76801059 (69) 2182-2208 Coordenador: Carolina Rodrigues da Costa
 12 Doria

13 ² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agroindústria Tropical. Rua Doutora Sara
 14 Mesquita, 2270 Pici 60511110 - Fortaleza, CE - Brasil

15 ³ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisas Agroflorestais de Rondônia. Br 364 -
 16 Km 5,5 Br 364 78900-970 - Porto Velho, RO - Brasil - Caixa-postal: 127

17 ⁴ Graduanda do curso de Agronomia - Centro Universitário Aparício de Carvalho – FIMCA. R. das
 18 Ararás, 241 - Eldorado, Porto Velho - RO, 76811-678.

19 ⁵ Mestrando do programa de pós graduação em Ciências Ambientais - Fundação Universidade Federal de
 20 Rondônia – UNIR. Câmpus Universitário de Rolim de Moura. Av. Norte Sul nº 7300, Nova Morada,
 21 Rolim de Moura - RO - CEP 76940-000.

22 *Corresponding author: van.rudnick@gmail.com ^{ID}:<https://orcid.org/0000-0003-0384-798X>

23

24 **Abstract**

25 Plant parasitic nematodes are among the disease-causing most important of coffee
 26 production. Among the species that have the greatest importance for national coffee
 27 growing are those belonging to the genus *Meloidogyne* spp. given its aggressiveness and
 28 environmental plasticity. In this sense, the aim of this work was propose the use of isolates
 29 of Arbuscular Mycorrhizal Fungi of the species *Glomus macrocarpum* and Growth
 30 Promoting Bacteria or Rhizobacteria (PGPR) of the species *Bacillus cereus*, obtained
 31 from roots of *Coffea canephora* health plants in commercial coffee plantations, as
 32 biological control agents against *Meloidogyne incognita*. The experiment was carried out
 33 in vitro and in vivo. Each plant (eight-liter pot) was inoculated with a suspension
 34 containing 5,000 eggs + *M. incognita* J2. At 150 days, Reproduction Factor (FR), number
 35 of galls per gram of roots (NGGR), fresh root mass (MMFR), number of AMF spores in
 36 the soil were evaluated. In the in vitro strains of rhizobacterias treatments Rz140 and

^A Versão preliminar submetido à revista Acta Amazonica, estando sujeito a alterações pelo conselho editorial da revista.

37 Rz212 showed greater larvicidal effect while treatment Rz216 was more efficient as
38 ovicide. In the in vivo test the treatments, *G. macrocarpum* isolated, *B. cereus* isolated
39 strains (Rz212, Rz216 and Rz48) and interaction with mycorrhiza showed similar control
40 efficiency to nematocidal treatment (Carbofuranthe) reducing RF at least 89% compared
41 to water control. Interaction between control agents, rhizobacteria *B. cereus* and AMFs
42 *G. macrocarpum* indicates that the association brought benefits to both species, requiring
43 a deeper study of the interaction for better understanding related to the interaction plant-
44 microorganism-pathogen.

45 **Keywords:** *Bacillus cereus*, *Glomus macrocarpum*, biological control, *Meloidogyne*
46 *incognita*, PGPR

47

48 INTRODUCTION

49 Brazilian coffee production has represented, for several years, a third of the global
50 harvest (Vieira, et al., 2019). Brazil is the largest producer, exporter and second largest
51 consumer of coffee in the world. Coffee is a relevant source of revenue for hundreds of
52 municipalities, with more than 264 thousand rural establishments, of which about 80%
53 are considered family farming, according to the 2017 Census of Agriculture (IBGE,
54 2020).

55 Among the diseases that affect coffee growing in Brazil, the pathogens that attack
56 the root system stand out (Vieira Junior and Fernandes, 2015). Among these, the root knot
57 nematode (*Meloidogyne* spp.), With emphasis on the species *M. incognita* (Barros et al.,
58 2014; Vieira Júnior et al., 2015; Oliveira and Rosa, 2018). The control of plant parasitic
59 nematodes in perennial crops such as coffee is more difficult when compared to annual
60 crops. Its eradication is practically impossible, or technically and economically unviable
61 (Penrith et al., 2019). Basically, the control methods are summarized in varietal control,
62 cultural control and chemical control (Ferraz, 2018).

63 The chemical control of nematodes in implanted coffee plantations has a high cost,
64 high toxicity to man and the environment, and little efficiency in reducing damage and
65 losses (Zambolim, 2016; Ventura, Costa and Lima, 2017). The consecutive use of
66 nematicides can cause a sterilization of the environment (biological vacuum), taking the
67 resurgence of the pathogen to more severe levels (Vieira Junior and Fernandes, 2015).

68 Alternatives that aim to reduce costs and improve quality with less interference in
69 the balance of the environment and that result in benefits for all links in the production
70 chain have been an increasing focus within the national production chain. Biological
71 control has proven to be feasible against various pathogens and pests in recent years as a
72 substitute for chemical control. It is a method of combating pests and diseases of
73 agricultural importance, using natural enemies, such as predatory insects, parasitoids and
74 microorganisms (fungi, bacteria and viruses) (Medeiros et al., 2018).

75 Recent studies demonstrate that biological agents can act to reduce aggression as
76 well as the survival of the pathogen or pest, drastically reducing its damage (Botrel, et al.,
77 2018; Morris et al., 2018; Laborde, et al., 2019; Ranjini and Naika, 2019; Silva, et al.,
78 2019).

79 Focused on biological control of the root knot nematode, caused by *Meloidogyne*
80 *incognita*, in *Coffea canephora*, this work evaluated the effect of the interaction of
81 autochthonous isolates of *Bacillus cereus* Plant Growth Production Rhizobacteria
82 (PGPR) with Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF's) in the *in vitro* and *in vivo* control of
83 the pathogen.

84 **MATERIAL AND METHODS**

85 **Location and characterization of the area**

86 The experiment was carried out in the city of Porto Velho, in a greenhouse “chapel
87 model”, 120 micron anti-UBV plastic film cover, shade net with 30% solar radiation
88 block, with frontal and lateral ventilation, at the Research Center Agroforestry of
89 Rondônia - Embrapa Rondônia (8 ° 47'38.44 "S, 63 ° 50'47.93" O), from January to July
90 2019.

91 In order to carry out this work, the microbial isolates obtained in advance were
92 registered in the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated
93 Traditional Knowledge (SISGEN) under access code n° A613C64.

94 **Obtaining the *Meloidogyne incognita* inoculum and preparing the suspension**

95 In order to obtain *M. incognita* inoculate, nematode samples were collected from
96 the soil in the canopy projection of naturally infested plants, located in coffee plantations
97 in the city of Ji-Paraná-RO. With the establishment of the pure sample, enzymatic
98 characterization of the esterase profile was performed using the electrophoresis technique
99 (Carneiro and Almeida, 2001) in the Phytopathology laboratory of Embrapa Clima
100 Temperado - RS to identify the species (Santos et al., 2017). This isolate was identified
101 as *Meloidogyne incognita* Estearase Group I2. Pure samples from egg mass from a single
102 female were multiplied in 'Santa Cruz Kada' tomato plants, kept in a greenhouse. The
103 inoculum was maintained in tomato and chicory plants, alternating its multiplication with
104 coffee plants in a greenhouse, with the replacement of the host species every 60 days.

105 For the extraction of nematode eggs, the method described by Bonetti and Ferraz
106 (1981) was used. To calibrate the suspension (5.000 eggs + J2 / pot), the eggs + J2 count
107 was performed using a stereomicroscope and the counting chamber (Peters chamber).

108

109 **Obtaining and isolating rhizobacteria and preparing the suspension**

110 The strains were collected in rhizosphere planted with healthy *canephora* coffee
111 from the Experimental Fields of Embrapa Rondônia in the units of Porto Velho, Ouro
112 Preto do Oeste, Machadinho do Oeste, and in the cities Itapuã do Oeste and Colorado do
113 Oeste (Silva, 2017). Four strains of rhizobacteria of the species *Bacillus cereus*, named
114 as follows: Rz48, Rz140, Rz212, Rz216, pre-selected from test results performed by Silva
115 (2017) were used. Rhizobacteria were grown in Petri dishes with Kado & Heskett (1970)
116 culture medium and taken to growth in culture chamber, type BOD at 28 ° C for a period
117 of 24 hours. After the multiplication of the rhizobacteria, the colonies were scraped from
118 the medium with the aid of a Drigalski loop and a suspension suspension with sterile
119 mineral water of each isolate was prepared, at the absorbance concentration of 0.4 A,
120 determined in a spectrophotometer at 540_{nm}. At the same time, in a colony-forming unit
121 counting test in a 1:10 serial dilution of the suspension sample, it was determined that at
122 0.4 A_{540nm} there were 1.0 x 10⁸ CFU.mL⁻¹ after 24 hours of culture.

123 **DNA extraction sequencing and identification of Bacillus isolates**

124 The inoculum of *Bacillus* isolates was introduced into 10 mL of Kado and Heskett
125 (1970) culture medium and incubated at 24 ° C for 16 hours in an orbital shaker. A 2 ml
126 aliquot of each culture was centrifuged at 12000 g for 5 minutes until the cells
127 precipitated. To obtain the bacterial genomic DNA, the CTAB method protocol was used
128 (Warner, 1996). The identification at the molecular level was carried out by amplifying
129 the 16S rRNA gene, for this purpose a polymerase chain reaction (PCR) was performed
130 using the 27F forward primer (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 ') and the 1525R
131 reverse primer (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3 ') (Weisburg et al. 1991; Paes et al.

132 2012). The amplification reactions were performed using a final volume of 25 μ L, which
133 contained 300 ng of genomic DNA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM
134 MgCl₂, 100 μ M of each deoxynucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP and dTTP)
135 (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK), 12.5 pmol of each primer and 0.5
136 units of Taq DNA polymerase (Amersham Biosciences, São Paulo, Brazil). The PCR
137 reactions were performed on a PTC-200 thermocycler (MJ-Research Inc., Maryland,
138 USA) programmed for an initial denaturation step (4 min at 94 ° C) followed by 35 cycles
139 of 1 min at 94 ° C, 1 min at 55 ° C and 2 min at 72 ° C. The last cycle was followed by a
140 single final 10 min extension at 72 ° C. The presence of PCR products of the expected
141 size was confirmed by the analysis of 2 μ L of the PCR product in electrophoresis in 1.0%
142 agarose gel and staining with ethidium bromide. The DNA was purified from the rest of
143 the PCR reaction using the KIT PCR GFX (GE Healthcare).

144 The readings obtained after sequencing were analyzed and the contigs were
145 assembled using the Codon Code Aligner 8.0.1 platform (CodonCode Corporation,
146 Dedham, MA, USA). The sense sequences 3'-5 'were edited with the Reverse
147 Complement software (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html), to obtain the
148 reverse complement of the sequences. After correcting the direction of the contigs, the
149 molecular identification was carried out comparing with the DNA sequence of the
150 database, with the BLAST tool (Basic Local Alignment Search Tool)
151 ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov / Blast.cgi](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)), at the NCBI-National Center for
152 Biotechnology Information- (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul et al. 1990). For
153 comparisons, the “Megablast” algorithm and identification in the database with the option
154 “Taxonomy reports” were used, where the organisms in the database were organized by

155 the largest number of occurrences similar to the *Bacillus* sequence. The values of
156 coverage and identity were assessed as well.

157 **AMF spore extraction, isolation and identification**

158 To extract the spores from the AMFs, 50 cm³ of soil from corn and brachiaria
159 plantations from the experimental field of Embrapa Rondônia, in the city of Porto Velho,
160 were used. The extraction was performed following the wet sifting technique
161 (Gerdermann and Nicolson, 1963). After extraction, the spores were transferred to a Petri
162 dish and randomly separated into two groups, one part used to inoculate coffee plants
163 (100 spores per plant / pot) and the other part, containing 10 spores, arranged on the slide
164 with Meltzer reagent and observed under an optical microscope, with bright field
165 illumination and immersion objective, for species identification. AMF species were
166 identified according to Schenck and Perez (1988) and using the morphological descriptors
167 of the International Culture Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi
168 (<http://invam.caf.wwu.edu/>). The taxonomic characters observed were: number and type
169 of layers of the spore walls and their reaction to the Melzer reagent; characteristics of
170 internal walls, when present; morphology of the spore supporting hypha; and variation in
171 the color and size of the spores.

172 **Rhizobacteria *in vitro* assay**

173 The test was carried out in 1.5 ml Eppendorf tubes, placing 100 µl of the
174 suspension containing 50 eggs of *M. incognita*, together with 100 µl of one of the
175 respective treatments (Rz216, Rz212, Rz140 and Rz48). The tubes were maintained in
176 culture chamber type B.O.D. for 15 days at a temperature of 25° ± 1C, in the dark. On the

177 sixteenth day, the parameters of the number of eggs and hatched juveniles and those who
178 were active were evaluated.

179 ***In vivo* assay**

180 Coffee seedlings of clone 750 *Coffea canephora*, (belonging to the Active
181 Germplasm Bank of Embrapa Rondônia) considered susceptible to *Meloidogyne*
182 *incognita*, at six months of age, were transplanted into plastic pots with a capacity of 8
183 liters, containing soil in proportion 2: 1 of soil-sand, autoclaved for 1 hour in an autoclave
184 at 121 ° C, 1.1 atm. In each pot, a coffee seedling was transplanted.

185 At 15 days after transplanting, the plants were inoculated with a 20 ml suspension
186 containing 100 spores of AMFs of the species *Glomus macrocarpum*. After 30 days of
187 inoculation with AMFs, the plants received a volume of 100 ml of suspension of each
188 rhizobacteria isolate at 0,4 A_{540nm}. And after a period of 24 hours to the application of the
189 rhizobacterium suspension, 10 ml of the nematode suspension close to the root,
190 containing 5,000 eggs + J2 of *M. incognita*, was applied.

191 Every 30 days, a equal rhizobacterial suspension applications were carried out, as
192 previously described, until 90 days were completed. 150 days after the inoculation date
193 (DAI), coffee plants were evaluated for reaction to *M. incognita*. For this, the roots of
194 each plant were separated from the aerial part, washed, weighed, evaluated for the number
195 of galls and processed (Boneti and Ferraz, 1981) to evaluate the number of eggs and
196 determine the reproduction factor (RF = final population / initial population)
197 (Oostenbrink, 1966).

198 To obtain the number of galls (NG) and number of eggs (NO) per plant, the results
199 of fresh root weight (FRW) were used, to calculate the reproduction factor (RF) the (NO)
200 was considered as the final population.

201 Counting the number of galls and egg mass was performed based on the scale of
202 grades proposed by Taylor & Sasser (1978) to obtain the gall index (GI) and egg mass
203 index (EMI), thus: grade 0 (without galls and / or egg masses); grade 1 (1 to 2 galls and /
204 or egg masses); grade 2 (3 to 10 galls and / or egg masses); grade 3 (11 to 30 galls and /
205 or egg masses); grade 4 (31 to 100 galls and / or egg masses); grade 5 (more than 100
206 galls and / or egg masses).

207 **Experimental design**

208 The *in vitro* experiment was conducted in a completely randomized manner (DIC)
209 with six replications, each Eppendorf being considered a repetition. Four treatments
210 called Rz216, Rz212, Rz140 and Rz48 were evaluated, with 02 water and nematicide
211 controls (Carbofuran) in the commercial dose dose (According recommendations present
212 in AGROFIT®) calculated for the volume of the suspension (200 μ L).

213 The *in vivo* experiment was conducted in DIC with 21 treatments with six
214 repetitions, with each plant / pot considered a repetition. The treatments performed are
215 described below: 4 strains of *B. cereus* (Rz48, Rz140, Rz212, Rz216) inoculated
216 individually, isolated and in interaction with *G. macrocarpum* against *M. incognita*, and,
217 isolated without interaction with *M. incognita* (control). *G. macrocarpum* against *M.*
218 *incognita* and isolate (control), Water and Nematicide (Carbofuran) in the commercial
219 dose (*M. incognita* controls) (10 liters / ha / 40cm deep) calculated for the pot volume (8

220 liters). The data were submitted to Analysis of Variance (ANOVA) and the treatment
 221 averages compared by Scott Knott's test at 5% probability by the GENES® program.

222 RESULTS

223 The *B. cereus* strains showed nematocidal activity against *M. incognita* expressing
 224 the same effect as the nematocidal chemical control, reaching an inhibition percentage
 225 higher than 72.8% (Table 1).

226 **Table 1.** Nematocidal effect of *B. cereus* strains against *M. incognita* (Est I2) in *in vitro*
 227 assay.

Treatment	% inhibition *
Nematicide	88,012 b
Rz48	80,548 b
Rz212	79,359 b
Rz140	73,493 b
Rz216	72,843 b
Water	27,008 a

228 * eggs and J2 immobile. Means followed by the same letters do not differ statistically from each other by
 229 the Scott Knott test at 5% probability.

230 The nematocidal effect of rhizobacterial isolates, when evaluated separately
 231 against hatching and motility of hatched J2, showed that the Rz 216 treatment expressed
 232 greater inhibition on hatching compared to the other treatments, with an inverse effect in
 233 relation to J2 motility (Table 2).

234 **Table 2.** J2 hatching inhibition and nematotoxic effect of *B. cereus* strains against *M.*
 235 *incognita* (Est I2) in *in vitro* assay.

Treatment	% egg	% J2 immobile
Rz48	35,17 Aa	45,37 Ba
Rz140	21,37 Aa	52,12 Bb
Rz212	33,34 Aa	46,02 Bb
Rz216	55,32 Bb	17,52 Aa

236 Means followed by the same uppercase letters in the vertical and lowercase letters in the horizontal do not
237 differ statistically from each other by the Scott Knott test at 5% probability.

238 In in vivo tests with *C. canephora* seedlings in a greenhouse, strains of *B. cereus*
239 rhizobacteria and spores of the AMF species *G. macrocarpum*, expressed nematicidal
240 potential for both rhizobacteria and isolated AMF, and in the interaction between them,
241 when compared with each other.

242 All treatments showed a reduction in the Reproduction Factor (RF) when
243 compared to the “uncontrolled” water treatment. Even the treatment with the Rz140 strain
244 that presented higher RF when compared to the nematicide control (FR 0.07) both for the
245 isolated treatment (Rz140 = RF 2.63) and for the treatment with AMF interaction (Rz140
246 + AMF = RF 1.79) showed a reduction of approximately 3 times when compared to the
247 RF of the water treatment (RF 6.75) (Table 3).

248 **Table 3.** Nematicidal effect of mycorrhize colonization with *G. macrocarpum*, of *B.*
249 *cereus* strains and of the biological interaction between *G. macrocarpum* and *B. cereus*
250 under the Reproduction Factor (RF) and Gall Index (GI) of the *M. incognita* gall
251 nematode in coffee seedlings after 150 days of inoculation.

Treatment	Reproduction factor	Gall index
Nematicide	0,07 a	0,07 a
Rz212 + AFM	0,11 a	1,33 a
AFM	0,18 a	3,33 b
Rz48 + AFM	0,18 a	2,50 b
Rz212	0,29 a	2,83 b
Rz216 + AFM	0,61 a	3,33 b
Rz48	0,68 a	4,16 b
Rz216	0,73 a	2,66 b
Rz140 + AFM	1,79 b	3,83 b
Rz140	2,36 b	4,33 b
Water	6,75 c	2,33 b

252 Means followed by the same letters do not differ statistically from each other by the Scott Knott test at 5%
253 probability.
254

255 Analyzing the spore density of AFM *G. macrocarpum* present in the soil, it
 256 appears that the interaction with *M. incognita* affected the spore density in the soil when
 257 compared to mycorrhizal plants without interaction (AFM = 1.853 > AFM + nematode =
 258 1.070 spores / 50mL of soil). It is observed that for the AFM interaction and treatments
 259 Rz48 and Rz140 the interaction with the pathogen *M. incognita* was significant for
 260 reducing spore density (Table 4).

261 **Table 4.** Number of *G. macrocarpum* spores extracted from soil in coffee seedlings after
 262 180 days of mycorrhize colonization and 150 days of inoculation with *M. incognita*.

Treatment	N° of spores AMFs (50 mL of soil)
Rz212 + AFM + nematode	2.036 a
AFM	1.853 a
Rz216 + AFM	1.766 a
Rz48 + AFM	1.671 a
Rz216 + AFM + nematode	1.641 a
Rz140 + AFM	1.501 a
Rz212 + AFM	1.120 b
AFM + nematode	1.070 b
Rz48 + AFM + nematode	782 c
Rz140 + AFM + nematode	652 c

263 Means followed by the same letters do not differ statistically from each other by the Scott Knott test at 5%
 264 probability.

265 It was also observed that the development of the root system of the coffee
 266 seedlings, showed a response to fresh mass of different roots for the treatments. Treatment
 267 with AFM at first indicates a reduction in the development of the root system. The AFM
 268 treatment alone showed less fresh root mass (12.29 g). Also reducing for the interaction

269 with Rz140 and Rz216 in comparison and these traits without interaction with AFM
 270 (Table 5).

271 **Table 5.** Fresh mass of root of coffee seedlings of mycorrhize colonization of the
 272 biological interaction between *G. macrocarpum* and *B. cereus* of inoculation with *M.*
 273 *incognita*.

Treatment	Root grams
Water	50.60 a
Rz216	47.54 a
Nematicide	46.66 a
Rz140	43.54 a
Rz140 + nematode	41.35 a
Rz48 + AFM + nematode	38.94 a
Rz48	36.76 a
Rz216 + nematode	35.95 a
Rz212 + AFM	35.80 a
Nematode	35.65 a
Rz48 + AFM	34.05 a
Rz48 + nematode	33.72 a
Rz212 + nematode	33.14 a
Rz212	31.42 a
Rz140 + AFM + nematode	26.22 b
Rz140 + AFM	21.34 b
Rz212 + AFM + nematode	18.92 b
Rz216 + AFM	18.67 b
Rz216 + AFM + nematode	17.25 b
AFM + nematode	16.40 b
AFM	12.29 b

274 Means followed by the same letters do not differ statistically from each other by the Scott Knott test at 5%
 275 probability.

276
 277
 278
 279
 280
 281

282 DISCUSSION

283 When comparing the inhibition on hatching and motility of J2 within the same
284 treatment, only the Rz48 treatment did not express a difference, its inhibition being the
285 same for both variables. The treatments Rz140 and Rz212 showed greater nematotoxic
286 effect against J2, while the treatment Rz216 was more efficient as an ovicide since its
287 inhibition was greater against the outbreak of J2's.

288 In testing rhizobacteria *in vitro* to control *M. incognita* in stage J2, Xiang et al.
289 (2017) observed that among all the strains evaluated, the genus *Bacillus spp.* was the one
290 that obtained the highest percentage of mortality for J2 when compared to the other
291 genders. The authors also observed that there is variation between the strains tested. The
292 authors tested 14 strains of *B. cereus* and the results ranged from 50.3 to 94.3% in J2
293 motility. This is consistent with the results of this study, as the Rz216 treatment showed
294 a lower control potential than J2 (17.52%) while RZ140 expressed 52.12%, reaffirming
295 the variation of the control effect according to the strain of the same species according to
296 Xiang et al. (2017).

297 Strains of *Bacillus spp* showed nematicidal activity in *in vitro* treatments, causing
298 more than 65% mortality in juveniles of *M. incognita* as also observed by Zhou et al.
299 (2016).

300 Gao et al., (2016) in the purification of compounds produced by *Bacillus cereus*
301 concluded that the sphingosine compound can severely inhibit nematode reproduction.
302 According to the authors, sphingosine, being an 18-carbon amino alcohol with an
303 unsaturated hydrocarbon chain, can easily act on tissues or organs enriched with lipids.
304 Thus, explaining the nematocidal as well as ovicidal action of rhizobacteria genus

305 *Bacillus* spp. The authors obtained a mortality action of 90.96% in an *in vitro* treatment
306 under J2 of *M. incognita*. These results was similar as the obtained in this study,
307 demonstrating which *Bacillus* isolates can act with a strong ovicidal action.

308 In addition to secondary metabolic as shown by the authors Gao et al. (2016) there
309 are studies that prove the nematicidal action also of enzymatic activities produced by
310 rhizobacteria of the genus *Bacillus* spp. Yang et al. (2013), observed that enzymatic
311 activities (chitinase and proteases) are capable of degrading the nematode cuticle and the
312 egg house. Facts also observed by Lee et al (2014); Chen et al. (2015); Castaneda-Alvarez
313 et al. (2015) and Zheng, et al. (2016).

314 In this work, we observed that the action of the cells of the rhizobacterium *Bacillus*
315 *cereus* on the eggs of *M. incognita* (Figure 1). Confirming the ability of eggshell to break
316 down by rhizobacteria.

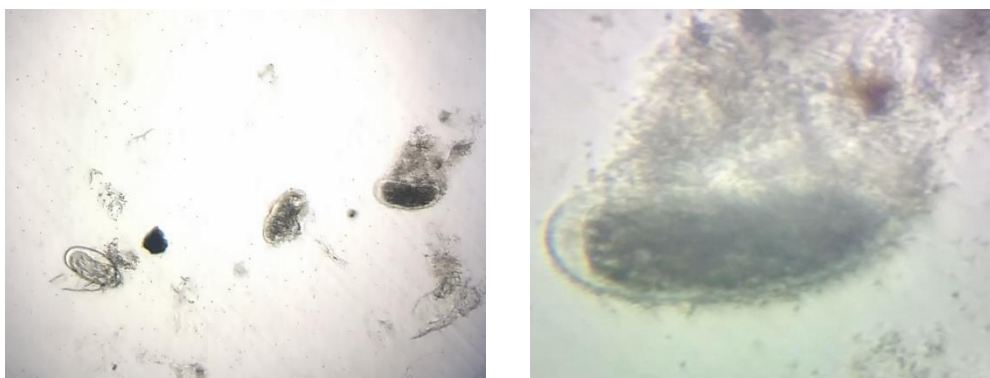


Figure 1. Visualization under optical microscopy of the action of *Bacillus cereus* cells on *M. incognita* eggs in an *in vitro* assay.

317 The treatments *G. macrocarpum* isolated (mycorrhiza + nematode), *B. cereus*
318 isolated strains (Rz212, Rz216 and Rz48 + nematode) and interaction (Rz212, Rz216 and
319 Rz48 + mycorrhiza + nematode) showed similar control efficiency to the nematicide
320 treatment (Carbofuran). It was also observed that despite the lack of statistical

321 significance, the interaction between control agents, rhizobacteria *B. cereus* and AMFs
322 *G. macrocarpum* behaved in a tendency of numerical reduction of RF, in relation to
323 treatment with *B. cereus* isolated.

324 Assessing the nematocidal effect against *M. incognita* of the interaction AMF
325 (*Rhizophagus irregularis*) and growth-promoting rhizobacteria (*Pseudomonas* spp.) In
326 tomato plants Sharma and Sharma (2017) found that the interaction between species was
327 beneficial in controlling the pathogen, according to the authors, the interaction increased
328 the plant's defensive enzymes. Also evaluating the interaction between AMF and
329 rhizobacteria Flor-Peregrín, et al. (2014), obtained positive results from the interaction.

330 It is noted that despite the reduction in RF provided by treatments, both did not
331 prevent infection of the pathogen. With the exception of the RZ212 + mycorrhiza +
332 nematode treatment, all the others did not differ between the control (water) regarding the
333 number of galls. Thus, indicating that the effect of colonization under the pathogen was
334 post-infection, which may indicate a resistance-inducing action.

335 AMFs have been the subject of studies as phytonematode control agents, since
336 these organisms form nutrition-absorption or absorption-nutrition sites or parasitism sites
337 in the plant's root system. The inverse effect formed by the symbiosis of FAMs is the
338 main reason for its use, since once symbiosis with the plant is established, a more effective
339 response from the plant to the pathogen attack is expected, once the plant is better
340 nourished. Some studies have shown that, in addition to improving the nutritional status
341 of plants, AMFs can stimulate the plant's defense response, both through morphological
342 mechanisms and biochemical activities (Schouteden et al., 2015; Tchabi et al., 2016;
343 Wani et al., 2017).

344 According to Vos et al. (2013) the control response for *M. incognita* in tomato
345 plants was due to resistance induction. The authors observed greater expression of genes
346 identified in the phenylpropanoid pathway and ROS metabolism of mycorrhizal plants,
347 which could explain the observed reduction in infection by the pathogen.

348 Nangyal et al. (2016) observed that the AMFs responded as a biological control
349 agent for *M. incognita* in the Luffa plant. In plants inoculated with AMFs, the size of
350 giant cells decreased, and the abnormalities of vascular bundles were fewer. Marro et al.
351 (2018) also found that inoculation with AMFs reduced the penetration of J2 into tomato
352 roots against *Nacobbus aberrans*.

353 These results are consistent with Ferreira et al. (2018), who determined patterns
354 of co-occurrence, starting from combinations between nematodes and AMFs in both
355 samples (soil and roots), using probabilistic models. The authors observed that the higher
356 the percentage of mycorrhizal fungi in the soil, the fewer the nematodes in the roots of
357 the plants.

358 Assessing the effect of mycorrhize colonization and the interaction between
359 rhizobacteria in tomato plants against *M. javanica*, Sohrabi et al. (2017) observed that
360 there was a reduction in the fresh mass of the roots of mycorrhizal plants, this variation
361 did not interfere in the nematode inhibition. This fact can also be observed in this work,
362 despite the species being different for both biocontrol, pathogen and host agents.

363 The explanation for the reduction in the development of coffee seedlings in
364 relation to the root system can be explained by França et al. (2014), the authors analyzing
365 the influence of AMFs on the growth of coffee seedlings note that, at the beginning of the
366 symbiotic process, the association can be considered a drain of assimilates from the plant.
367 The seedling does not yet have enough leaf to maintain the association, leading thus to

368 the drop in the net photosynthetic rate and consequently delaying the development of the
369 plant. In general, the inoculated plants showed a negative effect at the beginning of
370 growth when compared to non-inoculated seedlings. This fact may be the explanation for
371 the lesser development of the root system of the coffee seedlings evaluated in this
372 experiment.

373 Mycorrhize colonization can satisfy the plant's need to allocate resources in the
374 production of roots and contribute to the increase of the aerial part, thus guaranteeing the
375 production of photo assimilates for both symbionts, in case the leaf area of the plant is
376 not adequate. This fact was observed by Cruz et al. (2019), in a study of mycorrhize
377 colonization in the development of *C. arabica* seedlings of different cultivars and species
378 of AMFs.

379 **CONCLUSION**

380 The AMFs microorganisms *G. macrocarpum* and *B. cereus* showed nematocidal
381 activity against *M. incognita* in *C. canephora* seedlings under controlled conditions at
382 150 days, providing an effect similar to the chemical nematicide Carbofuran.

383 The control presented by the microorganisms was independent of each other and
384 could be used separately, but it was noted that the interaction improved the result for *B.*
385 *cereus* in terms of the nematocidal effect and for *G. macrocarpum* in terms of the
386 development of the plant's root system.

387 Further studies are recommended for a better understanding of the mechanisms
388 involved in the association and interaction of plants (*C. canephora*), microbiological
389 agents (*G. macrocarpum* and *Bacillus cereus* - strains 212 and 216) and pathogens (*M.*

390 *incognita*) in order to prospect for biological control of the gall nematode in the coffee
391 tree.

392 **ACKNOWLEDGEMENTS**

393 We thank the Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CPC), the
394 Fundação de Amparo ao Desenvolvimento das Ações Científicas e Tecnológicas e à
395 Pesquisa do Estado de Rondônia (FAPERO) of the State of Rondônia (FAPERO) and
396 Embrapa Rondônia for their financial support. The authors thank the Platform of
397 Sequencing LABCEN / CCB in the UFPE for use its facilities.

398

399 **REFERENCES**

- 400 Aldina, R.F.; Indarti, S.; Wibowo, A. 2017. Pathogenicity of Nematofagous Fungus for
401 Control of *Pratylenchus coffeae* Nematodes on Coffee Plants. In: *Proceeding of the*
402 *1st International Conference on Tropical Agriculture*. Springer, Cham, 243-251.
- 403 Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. 1990. Basic local
404 alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410. doi:
405 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- 406 Barros, A.F.; Oliveira, R.D.L.; Lima, I.M.; Coutinho, R.R.; Ferreira, A.O.; Costa, A.
407 2014. Root-knot nematodes, a growing problem for Conilon coffee in Espírito
408 Santo state, Brazil. *Crop Protection* 55: 74-79 p.
- 409 Boneti, J.I.S.; Ferraz, S. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração
410 de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 6(3):
411 553.
- 412 Botrel, D.A.; Laborde, M.C.F.; Medeiros, F.H.V. de; Resende, M.L.V. de; Ribeiro Júnior,
413 P.M.; Pascholati, S.F.; Gusmão, L.F. 2018. Saprobic fungi as biocontrol agents of
414 halo blight (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) in coffee clones. *Coffee Science*
415 13(3): 283 -291.
- 416 Cacefo, V.; Araújo, F.F.; Pacheco, A. C. 2016. Biological control of *Hemileia vastatrix*
417 Berk. & Broome with *Bacillus subtilis* Cohn and biochemical changes in the coffee.
418 *Coffee Science* 11(4): 567-574.

- 419 Carneiro, R.M.D.G.; Almeida, M.R.A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de
420 enzimas dos nematóides das galhas para identificação de espécies. *Nematologia*
421 *Brasileira* 25(1): 35 – 44.
- 422 Castaneda-Alvarez, C.; Prodan, S.; Rosales, I.M.; Aballay, E. 2015. Exoenzymes and
423 metabolites related to the nematicidal effect of rhizobacteria on *Xiphinema index*
424 Thorne & Allen. *Journal of Applied Microbiology* 120: 413–424.
425 doi:10.1111/jam.12987
- 426 Chen, L.; Jiang, H.; Cheng, Q.; Chen, J.; Wu, G.; Kumar, A.; Sun, M.; Liu, Z. 2015.
427 Enhanced nematicidal potential of the chitinase pachi from *Pseudomonas*
428 *aeruginosa* in association with Cry21Aa. *Scientific Reports* 5:14395: 1-11.
429 doi:10.1038/srep14395.
- 430 Cruz, R.S.; Araújo, F.H.V; França, A.C.; Graziotti, P.H. 2019. Crescimento pós-plantio
431 de cultivares de *Coffea arabica* inoculadas com fungos micorrízicos
432 arbusculares. *Revista Craibeiras de Agroecologia* 4(1): e8059.
- 433 Ferraz, L.C.C.B. 2018. Nematodos. In: Amorin, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho,
434 A. (Ed.). *Manual de Fitopatologia*. 5ª ed. Ouro Fino – MG. *Agronômica Ceres*,
435 p.195 – 211.
- 436 Ferreira, B.S.; Santana, M.V.; Macedo, R.S.; Silva, J.O.; Carneiro, M.A.A; Rocha, M.R.
437 2018. Co-occurrence patterns between plant-parasitic nematodes and arbuscular
438 mycorrhizal fungi are driven by environmental factors. *Agriculture, ecosystems &*
439 *environment* 265: 54-61.
- 440 Flor-Peregrín, E.; Azcón, R.; Martos, V.; Verdejo-Lucas, S.; Talavera, M. 2014. Effects
441 of dual inoculation of mycorrhiza and endophytic, rhizospheric or parasitic bacteria
442 on the root-knot nematode disease of tomato. *Biocontrol science and technology*
443 24(10): 1122-1136. doi: 10.1080/09583157.2014.925091
- 444 França, A.C.; Carvalho, F.P.; Franco, M.H.R.; Avelar, M. de; Souza, B.P.; Stürmer, S. L.
445 2014. Crescimento de mudas de cafeeiro inoculadas com fungos micorrízicos
446 arbusculares. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 9(4): 506-511.
- 447 Gao, H.; Qi, G.; Yin, R.; Zhang, H.; Li, C.; Zhao, X. 2016. *Bacillus cereus* strain S2
448 shows high nematicidal activity against *Meloidogyne incognita* by producing
449 sphingosine. *Scientific Reports* 6:28756: 1-11. doi: 10.1038/srep28756
- 450 Gerdemann, J.W.; Nicolson, T.H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species
451 extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British*
452 *Mycological Society* . Soc.46: 235-246.
- 453 IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2020. *Censo Agropecuário ano*
454 *2017 resultados definitivos*. Características dos Estabelecimentos. Lavouras
455 Permanentes.

- 456 Kado, C.I.; Heskett, M.G. 1970. Selective media for isolation of Agrobacterium,
457 Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas and Xanthomonas. *Phytopathology* 60:
458 969-979. doi: 10.1094/Phyto-60-969
- 459 Laborde, M.C.F.; Botelho, D.M. dos S.; Rodríguez, G.A.A.; Resende, M. L.V. de;
460 Queiroz, M.V. de; Batista, A.D.; et al. 2019. *Phialomyces macrosporus* reduces
461 *Cercospora coffeicola* survival on symptomatic coffee leaves. *Coffee Science*
462 14(1): 1-11.
- 463 Lee, Y.S.; Anees, M.; Park, Y.S.; Kim, S.B.; Jung, W.J.; Kim, K.Y. 2014. Purification
464 and properties of a Meloidogyne-antagonistic chitinase from *Lysobacter capsici*
465 YS1215. *Nematology* 16: 63–72. (2014) doi:10.1163/15685411-00002745.
- 466 MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Coordenação-Geral de
467 Agrotóxicos e Afins/DFIA/SDA. 2020. *Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários –*
468 *AGROFIT*.
- 469 Marro, N.; Caccia, M.; Doucet, M.E.; Cabello, M.; Becerra, A.; Lax, P.2018. Mycorrhizas
470 reduce tomato root penetration by false root-knot nematode *Nacobbus*
471 *aberrans*. *Applied soil ecology* 124: 262-265.
- 472 Medeiros, F.H.V.; Silva, J.C. P.; Pascholati, S. F. 2018. Controle Biológico de Doenças
473 de Plantas. In: Amorin, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A. (Ed.). *Manual*
474 *de Fitopatologia*. 5ª ed. Ouro Fino – MG. *Agrônômica Ceres*, p. 261-272.
- 475 Mesquita, B.P.; Silva, M.A. 2019. Recordes de Produção e exportação de café não
476 refletem remuneração dos cafeicultores. *Agroanalysis*, 40-41.
- 477 Mitiku, M. 2018. Plant-Parasitic Nematodes and Their Management: A
478 Review. *Agriculture Research & Technology: Open Access J* 16(2): 1-9.
- 479 Monteiro, M.C.P.; Alves, N.M.; Queiroz, M.V.; Pinho, D.B. Pereira, O.L.; Souza, S.M.C.
480 de; Cardoso, P.G. 2017. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de
481 cafeeiros. *Bioscience Journal* 33 (2). doi:10.14393/BJ-v33n2-34494.
- 482 Morris, J.R.; Jiménez-Soto, E.; Philpott, S.M.; Perfecto, I. 2018. Ant-mediated
483 (Hymenoptera: Formicidae) biological control of the coffee berry borer: diversity,
484 ecological complexity, and conservation biocontrol. *Myrmecological News* 26, 1-
485 17.
- 486 Nangyal, H., Zohra, T., Shinwari, Z.K. 2016. Morphopathological Changes Induced by
487 Root Knot Nematodes in Luffa Plant (*Luffa cylindrica* L.) and Their Alleviation By
488 Vesicular Arbuscular Mycorrhizae Fungi. *American-Eurasian Journal of*
489 *Agricultural & Environmental Sciences* 16 (1), 198-203. doi:
490 10.5829/idosi.aejaes.2016.16.1.12838.
- 491 Oliveira, C.M.G.; Rosa, J.M.O. 2018. *Boletim Técnico Nematodos Parasitos do Cafeeiro*.
492 Instituto Biológico, São Paulo, 28 p.

- 493 Oostenbrink, M. 1966. *Major characteristic of relation between nematodes and plants.*
494 *Mededelingen Landbouwhogeschool* 66(4): 1-46.
- 495 Paes, F.A.; Hissa, D.C.; Angelim, A.L.; Pinto, N.W.; Grangeiro, T.B.; Melo, V.M.M.
496 2012. Diversity of a chlorine-resistant *Bacillus* population isolated from a
497 Wastewater treatment station. *Water Environment Research*, 8: 274-281. doi:
498 10.2175/106143012x13280358613462
- 499 Penrith, M.L.; Bastos, A.D.; Etter, E.M.C.; Beltran-Alcrudo, D. 2019. Epidemiology of
500 African swine fever in Africa today: Sylvatic cycle versus socio economic
501 imperatives. *Transboundary and Emerging Diseases* 66, 672–686.
- 502 Ranjini, A. P.; Naika, R. 2019. Efficacy of biocontrol agents on *Myrothecium roridum*,
503 the stem necrosis and leaf spot pathogen of coffee seedlings. *Journal of*
504 *Biopesticides* 12(1): 109-113.
- 505 Santos, A.V.; Rocha, R.B.; Fernandes, C. de F.; Silveira, S.F. da; Ramalho, A. R.; Vieira
506 Júnior, J.R. 2017. Reaction of *Coffea canephora* clones to the root knot
507 nematode, *Meloidogyne incognita*. *African Journal of Agricultural Research*
508 12(11), 916-922.
- 509 Schenk, N.C.; Perez, Y. 1988. *Manual for the identification of Vesicular – arbuscular*
510 *mycorrhizal fungi*. INVAM Synergistic Publications, Gainesville, 241p.
- 511 Schouteden, N.; Waele, D.D.; Panis, B.; Vos, C.M. 2015. Arbuscular mycorrhizal fungi
512 for the biocontrol of plant-parasitic nematodes: a review of the mechanisms
513 involved. *Frontiers in Microbiology*, 6:1280, 1-12.
- 514 Sharma, I. P.; Sharma, A. K. 2017. Physiological and biochemical changes in tomato
515 cultivar PT-3 with dual inoculation of mycorrhiza and PGPR against root-knot
516 nematode. *Symbiosis* 71: 175-183.
- 517 Silva, C.M. da. 2017. *Seleção de rizobactérias como agente de biocontrole de*
518 *meloidogyne incognita em coffea canephora Pierre*. Dissertação de Mestrado em
519 Ciências Ambientais, Fundação Universidade Federal de Rondônia, Rolim de
520 Moura, Rondônia. 57 p.
- 521 Silva, F.J.; Veira, B.S., Siquieroli, A.C. 2019. Biological control of *Pseudomonas*
522 *syringae* pv. *garcae* in coffee crop with *Bacillus* spp. isolates. *Científica* 47(4): 364-
523 370.
- 524 Sohrabi, F.; Sheikholeslami, M.; Heydari, R.; Rezaee, S.; Sharifi, R. 2017. Study on
525 combined application of arbuscular mycorrhizal fungi isolates and plant growth
526 promoting rhizobacteria in controlling root-knot nematode *Meloidogyne javanica*
527 in tomato under greenhouse conditions. *Iranian Journal of Plant Pathology*. 53(4):
528 449-462.

- 529 Taylor, A.L.; Sasser, J.N. 1978. *Biology, Identification and Control of Root-Knot*
530 *Nematodes (Meloidogyne spp.)*. N.C. State Univ. Dept. Plant Path., and USAID,
531 Raleigh, N.C.
- 532 Tchabi, A.; Hountondji, F.C.C.; Ogunsola, B.; Lawouin, L.; Coyne, D.; Wiemken, A.;
533 Oehl, F. 2016. The influence of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on micro-
534 propagated hybrid yam (*Dioscorea* spp.) growth and root knot nematode
535 (*Meloidogyne* spp.) suppression. *International Journal of Current Microbiology*
536 *and Applied Sciences* 5(10): 267-281. doi:10.20546/ijcmas.2016.510.030.
- 537 Ventura, J.A.; Costa, H.; Lima, I.M. 2017. Manejo das doenças do cafeeiro Conilon In:
538 Ferrão, R.G.; Fonseca, A.F.A. da; Ferrão, M.A.G.; Umner, L.H. D. (Ed.). *Café*
539 *Conilon*. 2 ed. Atual. e ampl. 2ª reimpressão. Incaper, Vitória, p.435-474.
- 540 Vieira Júnior, J.R.; Fernandes, C. de F.; Matos, S.I.; Freire, T.C.; Fonseca, A.S.;
541 Marreiros, J.A.A.; Zeferino, D.M.; Silva, D.S.G da. 2015. *Levantamento da*
542 *ocorrência de populações do nematodo-das-galhas-do-cafeeiro (Meloidogyne sp.)*
543 *em Rondônia - primeira atualização*. Porto Velho: Embrapa Rondônia,
544 Comunicado Técnico, n. 397. 2015. 5 p.
- 545 Vieira Júnior, J.R.; Fernandes, C.F. 2015. Doenças do cafeeiro. In: Marcolan, A.L.;
546 Espindula, M.C. (Ed.). *Café da Amazônia*. Brasília, DF: Embrapa, p.281-304.
- 547 Vieira, A.C.P.; Pellin, V.; Locatelli, L.; Bruch, K.L.; 2019. Desenvolvimento Regional e
548 Indicações Geográficas de café no Brasil: Perspectivas Pós-Registro In: Vieira,
549 A.C.P.; Lourenzani, A.E.B.; Bruch, K.L.; Locatelli, L.; Gaspar, L.C.M. (Org.)
550 *Indicações Geográficas, Signos coletivos e Desenvolvimento Local/Regional*.
551 Vol.2. Deviant, Gaspar- Erechim, 485 p.
- 552 Vos, C.; Schouteden, N.; Tuinen, D.V.; Chatagnier, O.; Elsen, A.; Waele, D.D.; Panis,
553 B.; Gianinazzi-Pearson, V. 2013. Mycorrhiza-induced resistance against the root-
554 knot nematode *Meloidogyne incognita* involves priming of defense gene responses
555 in tomato. *Soil Biology and Biochemistry* 60: 45-54.
- 556 Wani, K.A.; Manzoor, J.; Shuab, R.; Lone, R. 2017. Arbuscular mycorrhizal fungi as
557 biocontrol agents for parasitic nematodes in plants. In: Varma, a.; Prasad, R.;
558 Tuteja, N. *Mycorrhiza-Nutrient Uptake, Biocontrol, Ecorestoration*. Cham,
559 Springer, p. 195-210.
- 560 Warner, S.A.J. 1996. Genomic DNA isolation and lambda library construction. In: Foster,
561 G. D., Twell D. (Ed). *Plant Gene Isolation. Principle and practice*. John Wiley &
562 Sons, West Sussex: p. 51-73.
- 563 Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A.; Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA
564 amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697-703. doi:
565 10.1128/jb.173.2.697-703.1991

- 566 Xiang, N., Lawrence, K.S.; Kloepper, J.W.; Donald, P.A.; Mcinroy, J.A.; Lawrence,
567 G.W. 2017. Biological control of *Meloidogyne incognita* by spore-forming plant
568 growth-promoting rhizobacteria on cotton. *Plant disease*, 101(5): 774-784.
- 569 Yang, J.; Liang, L.; Li, J.; Zhang, K. Q. 2013. Nematicidal enzymes from microorganisms
570 and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97: 7081–7095.
571 doi:10.1007/s00253-013-5045-0.
- 572 Zambolim, L. 2009. Manejo integrado de doenças do conilon (*Coffea canephora*). In:
573 Zambolim, L. (Ed.). *Tecnologias para produção do café conilon*. UFV, Viçosa, 360
574 p.
- 575 Zambolim. L. 2016. Doenças do cafeeiro. In: Amorin, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin
576 Filho, A.; Camargo, L.E.A. (Ed). *Manual de Fitopatologia*. 5ª ed. Ouro Fino – MG.
577 *Agronômica Ceres*, 193-214 p.
- 578 Zheng, Z.; Zheng, J.; Zhang, Z. Peng, D.; Sun, M. 2016. Nematicidal spore-forming
579 Bacilli share similar virulence factors and mechanisms. *Scientific Reports* 6: 31341.
580 doi: 10.1038/srep31341
- 581 Zhou, L.; Yuen, G.; Wang, Y.; Lanfang, W.; Guanghai, J. 2016. Evaluation of bacterial
582 biological control agents for control of rootknot nematode disease on tomato. *Crop*
583 *Protection* 84: 8-13.
- 584
- 585
- 586

ARTIGO 3: Extratos de plantas do gênero *Crotalaria* e *Mucuna* contra nematoide das galhas no cafeeiro

RESUMO

Alternativas que possam minizar o uso de agrotóxicos na agricultura são fontes de várias pesquisas, sobretudo as que possibilitam a redução de uso de nematicidas que geralmente são produtos de toxicidade alta e de utilização frequente. Dentre as alternativas que vem sendo pesquisadas os extratos vegetais despontam como uma alternativa viável no controle de fitonematoides. Como a perspectiva de testar a ação nematicida de extratos aquosos de plantas de crotalarias e mucunas contra *Meloidogyne incognita* como alternativa ao uso de nematicidas químicos em plantas do cafeeiro, conduziu-se este estudo. Foram utilizadas três espécies de Crotalária: *C. juncea*, *C. spectabilis* e *C. ochroleuca* e duas espécies de mucuna: *M. pruriens* e *M. aterrina*. As plantas foram separadas por folhas, flores, frutos e talos e utilizadas em duas formas, frescos e secos, para confecção de extratos aquosos. Os extratos concentrados foram submetidos a diluições seriadas com objetivo de encontrar a menor concentração com maior efeito de inibição de eclosão e motilidade de J2 em ensaios *in vitro* e posterior realizou-se ensaio *in vivo* em plantas do cafeeiro. Os extratos que apresentaram maior inibição na menor concentração foram, para crotalárias *Crotalaria juncea* fruto fresco (CJFrF) inibiu 96,27% e folha fresca (CJFIF) 94,24%, nas concentrações de 6,71 e 3,16 mg.L⁻¹ respectivamente *Crotalaria ochroleuca* folha seca e talo fresco com 91% e 85,56% nas concentrações 6,36 e 2,5 mg.L⁻¹. E *crotalária spectabilis* flor fresca (CEFF) 65,53% na concentração de 2,7 mg.L⁻¹. Para mucunas, mucuna cinza folha seca (MCFIS) 61,41% na concentração de 1,6 mg.L⁻¹ e mucuna preta o extrato folha fresca (MPFIF) com 77,16% na concentração de 1,6 mg.L. No ensaio *in vivo* os extratos de crotalarias: *C. juncea* talo seco (CTJS), fruto fresco (CJFrF); *C. ochroleuca* folha seca (COFIS), talo fresco (COTF); e *C. spectabilis* folha seca (CEFIS), fruto fresco (CEFrF), fruto seco (CEFrS); e mucuna preta talo seco (MPTS), folha seca (MPFIS) apresentaram Fator de Reprodução idem ao controle nematicida. Indicando assim que estes extratos apresentam potencial de bioprospecção no controle de *M. incognita* no cafeeiro.

Palavras-chave: fitoquímicos; nematicida; prospecção; nematodos das galhas.

ABSTRACT

Alternatives that can minimize the use of pesticides in agriculture are sources of several researches, especially those that make it possible to reduce the use of nematicides that are generally products of high toxicity and frequent use. Among the alternatives that have been researched, plant extracts stand out as a viable alternative in the control of phytomatotomoids. As the perspective to test the nematicidal action of aqueous extracts of crotalaria and mucuna plants against *Meloidogyne incognita* as an alternative to the use of chemical nematicides in coffee plants, this study was conducted. Three species of Crotalaria were used: *C. juncea*, *C. spectabilis* and *C. ochroleuca* and two species of mucuna: *M. pruriens* and *M. aterrina*. The plants were separated by leaves, flowers, fruits and stems and used in two forms, fresh and dry, for making aqueous extracts. The concentrated extracts were subjected to serial dilutions in order to find the lowest concentration with the greatest effect of inhibiting hatching and motility of J2 in *in vitro* tests and later *in vivo* testing was carried out on coffee plants. The extracts that showed greater inhibition in the lowest concentration were, for crotalaria *Crotalaria juncea*

fresh fruit (CJFrF) inhibited 96.27% and fresh leaf (CJFIF) 94.24%, in the concentrations of 6.71 and 3.16 mg.L⁻¹ respectively *Crotalaria ochroleuca* dry leaf and fresh stalk with 91% and 85.56% at concentrations 6.36 and 2.5 mg.L⁻¹. And fresh flower spectabilis crotalaria (CEFF) 65.53% at a concentration of 2.7 mg.L⁻¹. For mucunas, gray mucuna dry leaf (MCFIS) 61.41% in the concentration of 1.6 mg.L⁻¹ and black mucuna the fresh leaf extract (MPFIF) with 77.16% in the concentration of 1.6 mg.L. In the in vivo test the crotalaria extracts: *C. juncea* dry stem (CTJS), fresh fruit (CJFrF); *C. ochroleuca* dry leaf (COFIS), fresh stalk (COTF); and *C. spectabilis* dry leaf (CEFIS), fresh fruit (CEFrF), dried fruit (CEFrS); and black mucuna dry stalk (MPTS), dry leaf (MPFIS) had the same reproduction factor as the nematicide control. Thus indicating that these extracts have potential for bioprospecting in the control of *M. incognita* in coffee.

Keywords: phytochemicals; nematicide; prospection; gall nematodes.

INTRODUÇÃO

O controle de nematoides parasitas do cafeeiro é um constante desafio para a agricultura mundial. Basicamente as técnicas de manejo resumem-se em utilização de cultivares resistentes, rotação de cultura e controle químicos (Ferraz, 2018; Sikandar et al., 2020). Sendo resistência genética de plantas e a aplicação de nematicidas os controles mais usuais devido a praticidade e facilidade de utilização.

O controle por resistência genética de plantas pode ser limitado pela disponibilidade de genótipos resistentes disponível no mercado. Logo o uso de nematicidas químicos é o método de controle mais utilizado. O que tem acarretado em problemas não só econômicos, mas principalmente ambientais, gerados, pelo o uso indiscriminado desses produtos, e também a reduzida disponibilidade de princípios ativos, principalmente para culturas perenes, no caso, café (Ferraz, 2018; KVVS, Patil e Yadav, 2019).

Entre as alternativas de controle a rotação de culturas, com plantas antagônicas e ou repelentes a exemplo plantas das espécies *Crotalaria* spp e *Mucuna* spp (Debiasi et al., 2016; Giraldele et al., 2017; Santana-Gomes et al., 2019; Nascimento et al., 2020). Tem se comportado como uma boa técnica para redução da população de nematoides no solo. Mas para o cafeeiro essa prática torna-se complexa e inviável. Mesmo que seja realizado plantio em entrelinhas a dificuldade e custo de manejo dificultam sua utilização.

Visando aproveitar o potencial nematicida das plantas de crotalarias e mucunas. A exemplo desse potencial pode-se citar a monocrotalina, produzida pelas plantas de crotalarias, que inibe a mobilidade de juvenis em estágio J2 e da mucuna 3-hidroxi-L-tirosina (Torto et al., 2018; Scupinari et al., 2020). Há atualmente pesquisas a procura por outras formas de utilização dessas plantas no controle de nematoides, além do seu plantio em área infestadas.

Constituindo opções, como incorporação de material vegetal ao solo, bem como a confecção de extratos vegetais com partes da planta ou até mesmo plantas inteiras (Borges et

al., 2013; Anene e Declerck, 2016; Silva et al., 2018; Henmi e Mrahatta, 2018; Lopes et al., 2019).

Os extratos vegetais despontam-se como fonte alternativa ao uso de nematicidas químicos, apresentando a vantagem de atuar em vários novos locais-alvo, sem efeitos nocivos aos organismos não-alvo e ao meio ambiente (Naz et al., 2016; Torto et al., 2018).

Como base em obter alternativas ao controle químico para nematoides parasitas do coffeeiro este estudo verificou a ação nematicida de extratos aquosos de plantas de crotalarias e mucunas contra o nematoide das galhas *Meloidogyne incognita*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para os ensaios do efeito nematicida dos extratos aquosos das plantas de crotaria e mucuna utilizou-se duas espécies de mucuna sendo: *Mucuna* Adans (*M. pruriens* (L) DC, *Mucuna aterrima* Piper & Tracy) e três espécies de crotalária: *Crotalaria juncea* L., *Crotalaria ochroleuca* G. Don e *Crotalaria spectabilis* Roth. Para realização deste trabalho procedeu-se o registro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (Sisgen) sob o código de acesso nº A613C64.

As plantas foram separadas por segmentos (folhas, flores, frutos e talos) e utilizadas em duas formas: frescos e secos. Para obtenção do material seco as frações foram levadas a estufa para secagem a 45°C por 72 horas. O material fresco e seco foi triturado e pesado para proceder ao preparo dos extratos. Para cada 1 grama do material foram adicionados 10 mL do extrator H₂O estéril, macerados, levados para Câmara Incubadora com Agitação Orbital (Shaker) refrigerada, a 100 RPM por 24 horas. Após este período a suspensão foi filtrada em gazes e papel filtro 100% celulose, e centrifugado a 2.000 rpm por 2 minutos.

O extrato obtido foi evaporado em banho-maria a 45°C por 24 horas e resuspendido em 1 mL de H₂O estéril para obtenção da concentração do extrato bruto (mg.L⁻¹).

Para identificação dos tratamentos foi adotado o uso de siglas que foram formadas pelas primeiras sílabas do nome da planta *C. spectabilis* (CE), *C. juncea* (CJ), *C. ochroleuca* (CO), mucuna cinza (CZ) e mucuna preta (MP) seguida pelo fragmento da planta utilizado: folha seca (FIS), folha fresca (FIF), talo fresco (TF), talo seco (TS), fruto fresco (FrF), fruto seco (FrS), flor fresca (FF) e flor seca (FS) (Tabela 1).

Tabela 1. Denominação dos tratamentos conforme plantas e seus fragmentos utilizados para confecção dos extratos aquosos das plantas do gênero *Crotalaria* e *Mucuna*.

Sigla tratamento	Denominação planta	Fragmento vegetal
CEFIF	<i>Crotalaria spectabilis</i>	folha fresca
CEFIS	<i>Crotalaria spectabilis</i>	folha seca
CETF	<i>Crotalaria spectabilis</i>	talo fresco
CETS	<i>Crotalaria spectabilis</i>	talo seco
CEFrF	<i>Crotalaria spectabilis</i>	fruto fresco
CEFrS	<i>Crotalaria spectabilis</i>	fruto seco
CEFF	<i>Crotalaria spectabilis</i>	flor fresca
CJFIF	<i>Crotalaria juncea</i>	folha fresca
CJFIS	<i>Crotalaria juncea</i>	folha seca
CJTF	<i>Crotalaria juncea</i>	talo fresco
CJTS	<i>Crotalaria juncea</i>	talo seco
CJFrF	<i>Crotalaria juncea</i>	fruto fresco
CJFrS	<i>Crotalaria juncea</i>	fruto seco
CJFF	<i>Crotalaria juncea</i>	flor fresca
CJFS	<i>Crotalaria juncea</i>	flor seca
COFIF	<i>Crotalaria ochroleuca</i>	folha fresca
COFIS	<i>Crotalaria ochroleuca</i>	folha seca
COTF	<i>Crotalaria ochroleuca</i>	talo fresco
COTS	<i>Crotalaria ochroleuca</i>	talo seco
COFrF	<i>Crotalaria ochroleuca</i>	fruto fresco
COFF	<i>Crotalaria ochroleuca</i>	flor fresca
MCFIF	<i>Mucuna cinza</i>	folha fresca
MCFIS	<i>Mucuna cinza</i>	folha seca
MCTF	<i>Mucuna cinza</i>	talo fresco
MCTS	<i>Mucuna cinza</i>	talo seco
MPFIF	<i>Mucuna preta</i>	folha fresca
MPFIS	<i>Mucuna preta</i>	folha seca
MPTF	<i>Mucuna preta</i>	talo fresco
MPTS	<i>Mucuna preta</i>	talo seco

Foi realizado ensaios *in vitro* para determinação de concentração em mg.L^{-1} de sólidos totais com objetivo de encontrar a menor diluição com maior efeito de inibição. Os extratos concentrados foram submetidos a diluições seriadas até 10^{-6} .

O ensaio *in vitro* foi realizado com a adição de 100 μL de suspensão dos extratos e adicionadas 100 μL da suspensão de *M. incognita* contendo 100 ovos, em eppendorfs de 1,5 mL. Os eppendorfs foram isolados da incidência de luz (acondicionados em caixas de papel) e levados a BOD a $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 15 dias.

O delineamento utilizado foi em DIC com 5 repetições cada eppendorfs foi considerado uma repetição, perfazendo 29 tratamentos e 02 controles, controle positivo foi utilizado o nematicida Carbofuran, na dosagem comercial de 0,25g/L e controle negativo água.

As variáveis avaliadas foram: número de ovos, juvenis (J2) imóveis e móveis, procedendo a contagem dos mesmos com auxílio de microscópio óptico utilizando a câmara de Peters, para obtenção do % de controle de inibição. O resultado foi submetido à análise de Regressão Probit e ao teste de DL₅₀.

O ensaio *in vivo* foi conduzido em casa de vegetação “modelo capela”, cobertura de filme plástico anti UVB de 120 micras com ventilação frontal e lateral livre no Centro de Pesquisa Agroflorestral de Rondônia – Embrapa Rondônia (8°47'38.44"S, 63°50'47.93"O), durante o período de janeiro a julho de 2019 no município de Porto Velho-RO.

Mudas de café provenientes da espécie *Coffea arabica*, cultivar Catucaí considerado susceptível ao nematoide das galhas, com 6 meses de idade, foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 8 litros, contendo solo na proporção 2:1 de solo-areia, autoclavado por 1 hora em autoclave a 121°C. Aos 15 dias após o transplante as plantas foram inoculadas, com suspensão de 10 ml contendo “5.000” ovos + J2. E após um período de 24 horas foi realizado a aplicação de 10 ml de extrato por litro de solo, repetido aos 30 dias.

Decorridos 90 dias da data de inoculação (DAI) as plantas foram avaliadas quanto à reação a *M. incognita* (Est I2). Para tanto, as raízes de cada planta foram separadas da parte aérea, lavadas, pesadas, avaliadas quanto ao número de galhas e processadas para a extração de ovos de nematodos (BONETI e FERRAZ, 1981) para verificação do número de ovos foi realizado a contagem por meio do uso de microscópio estereoscópio, utilizando a câmara de contagem (câmara de Peters). Para obtenção do número de galhas (NG) e número de ovos (NO) por planta foi utilizado o resultados de peso fresco da raiz (PFR), para cálculo do fator de reprodução (FR) o (NO) foi considerado como população final (FR = população final / população inicial) (OOSTENBRINK, 1966).

A contagem do número de galhas e massa de ovos foi realizada baseando-se na escala de notas proposta por Taylor & Sasser (1978) para a obtenção do índice de galhas (IG) e índice de massas de ovos (IMO), assim sendo: nota 0 (sem galhas e/ou massas de ovos); nota 1 (1 a 2 galhas e/ou massas de ovos); nota 2 (3 a 10 galhas e/ou massas de ovos); nota 3 (11 a 30 galhas e/ou massas de ovos); nota 4 (31 a 100 galhas e/ou massas de ovos); nota 5 (mais de 100 galhas e/ou massas de ovos).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 11 tratamentos e 02 testemunhas controle positivo com água e controle negativo com nematicida Carbuforano aplicado na dose comercial (10 litros/ha) calculada para o volume do vaso (8 litros), com seis repetições, sendo cada planta/vaso considerada uma repetição. Os tratamentos realizados são descritos a seguir: CJFrS, CJFrF, CJTS, CEFrS, CEFrF, CEFIS, COTF, COFIS,

MCFIS, MPTS, MPFIS siglas estão descritas na tabela 1. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade pelo programa Genes®.

RESULTADOS

No ensaio *in vitro* todos os extratos apresentaram 100% de inibição contra a inibição do *M. incognita* na concentração do extrato bruto. Considerando as diluições, as respostas foram diferentes conforme a espécie, fragmento da planta (folha, talo, flor e fruto) e preparo (fresco ou seco) dos extratos (Figuras 1 a 5).

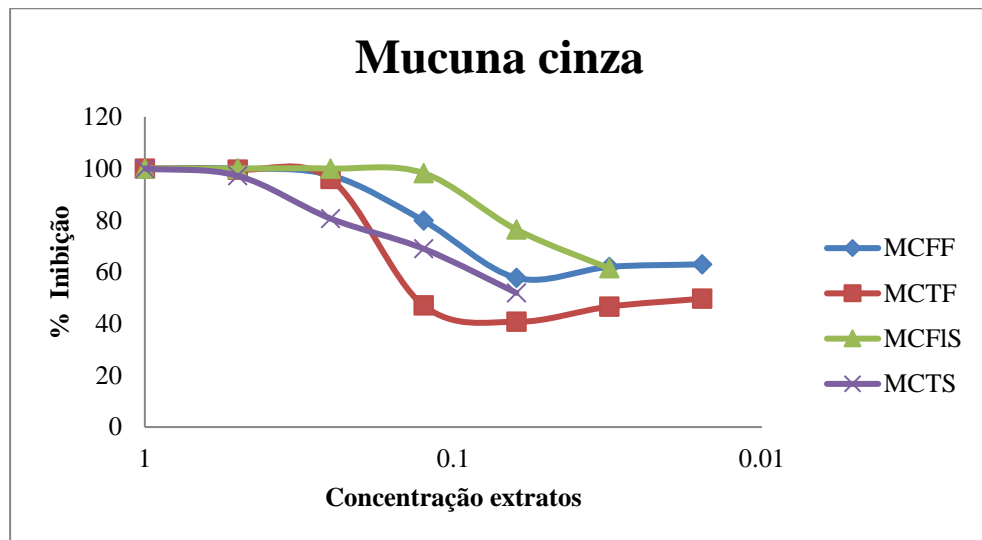


Figura 1. Percentual de Inibição de eclosão de J2 e motilidade dos extratos de mucuna cinza conforme concentração dos extratos, parte da planta e modo de preparo (seco ou fresco).

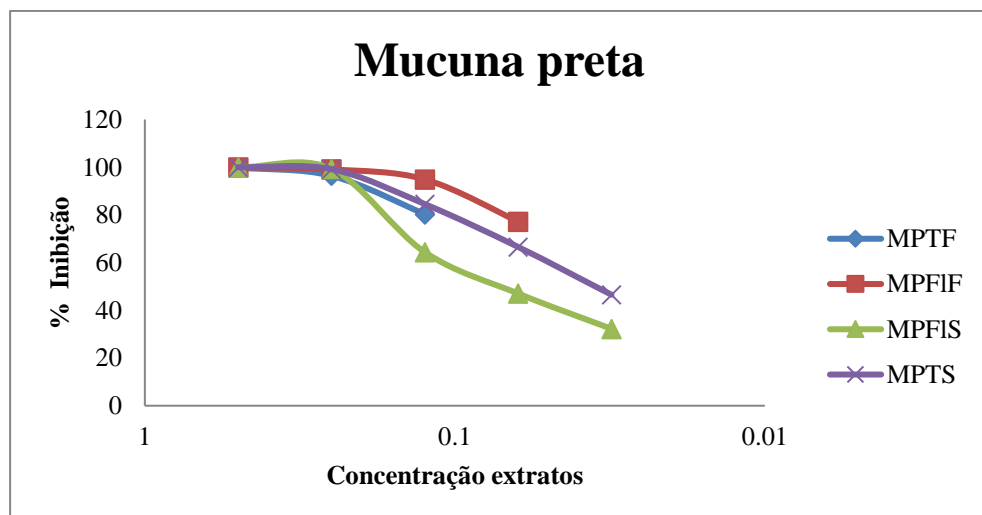


Figura 2. Percentual de Inibição de eclosão de J2 e motilidade dos extratos de mucuna preta conforme concentração dos extratos, parte da planta e modo de preparo (seco ou fresco).

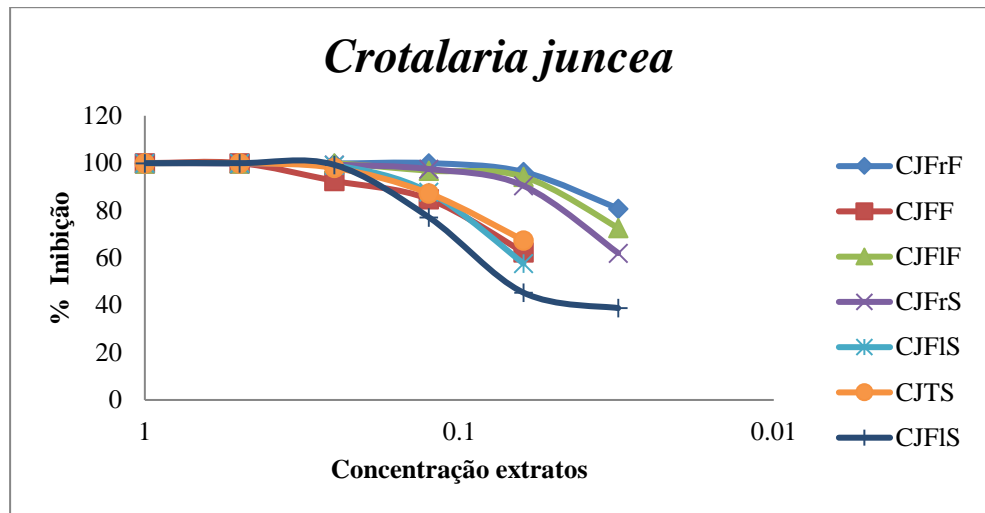


Figura 3. Percentual de Inibição de eclosão de J2 e motilidade dos extratos de *Crotalaria juncea* conforme concentração dos extratos, parte da planta e modo de preparo (seco ou fresco).

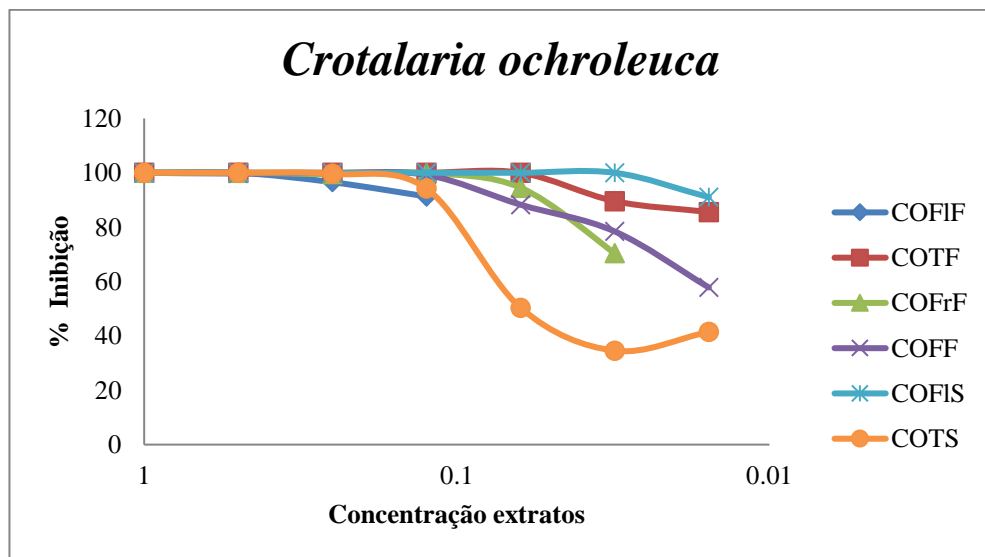


Figura 4. Percentual de Inibição de eclosão de J2 e motilidade dos extratos de *Crotalaria ochroleuca* conforme concentração dos extratos, parte da planta e modo de preparo (seco ou fresco).

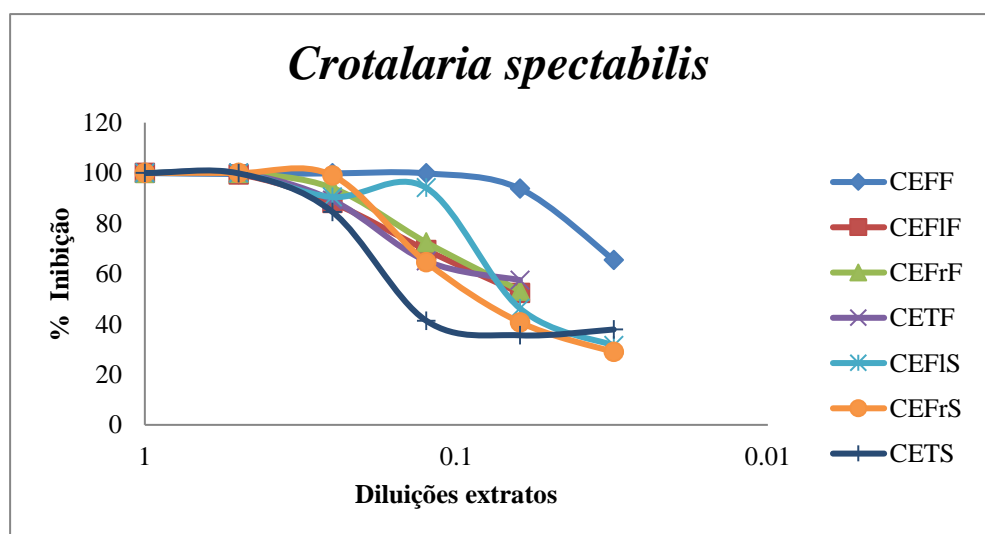


Figura 5. Percentual de Inibição de eclosão de J2 e motilidade dos extratos de *Crotalaria spectabilis* conforme concentração dos extratos, parte da planta e modo de preparo (seco ou fresco).

O extrato de mucuna cinza folha seca (MCFIS) apresentou maior percentual de inibição (61,41%) na concentração de 1,6 mg.L⁻¹ para *M. incognita in vitro* (Figura 1). Já a mucuna preta o extrato folha fresca (MPFIF) com 77,16% de inibição total também na concentração de 1,6 mg.L (Figura 2).

Para os extratos de crotalária, *Crotalaria juncea* fruto fresco (CJFrF) inibiu 96,27% e folha fresca (CJFIF) 94,24%, nas concentrações de 6,71 e 3,16 mg.L⁻¹ respectivamente (Figura 3). *Crotalaria ochroleuca* folha seca e talo fresco apresentaram maior potencial de inibição de 91% e 85,56% nas concentrações 6,36 e 2,5 mg.L⁻¹ (Figura 4). E *crotalária spectabilis* apresentou maior potencial de inibição para o extrato flor fresca (CEFF) 65,53% na concentração de 2,7 mg.L⁻¹ (Figura 5).

Quando submetidos ao teste Probit, o tratamento *C. juncea*, fruto fresco (CJFrF) foi que apresentou maior inibição com menor concentração em mg.L⁻¹ sendo utilizado como padrão de efetividade para os demais em relação a efetividade da dose/tratamento conforme LD₅₀ (Tabela 2).

Tabela 2. Eficiência dos extratos das espécies *C. juncea*, *C. spectabilis* e *C. ochroleuca* e *M. pruriens* (mucuna preta e mucuna cinza), produzidos a partir de folhas, talos, flores e frutos, frescos e secos, no controle de *in vitro* do nematodo *M. incognita*.

Extrato*	LD ₅₀	R ²	b ₁	Efetividade ¹	Ordenamento ²
CJFrF	0,69	0,31	2,34	1	1
CJFIF	0,76	0,31	2,06	0,91	2
COFF	0,79	0,37	1,77	0,88	3
COTF	0,84	0,38	1,75	0,82	4
MPFIF	0,86	0,32	2,73	0,80	5
CJTF	0,87	0,41	2,51	0,79	6
CEFF	0,92	0,33	1,66	0,75	7
COFrF	0,98	0,37	2,58	0,70	8
CEFrF	1,01	0,4	2,33	0,69	9
CETF	1,02	0,34	1,86	0,68	10
CJFF	1,1	0,33	2,22	0,63	11
CJFS	1,13	0,36	2,18	0,61	12
MCTS	1,14	0,32	1,92	0,60	13
CJTS	1,26	0,34	2,52	0,55	14
CEFIF	1,32	0,36	2,23	0,52	15
MCFIS	1,39	0,42	2,67	0,50	16
COFIF	1,56	0,13	1,36	0,45	17
MPTS	1,57	0,44	2,3	0,44	18
MTPF	1,61	0,27	2,72	0,43	19
CJFrS	1,69	0,45	3,42	0,41	20
COFIS	1,72	0,52	2,68	0,40	21

CJFIS	2,14	0,5	2,45	0,32	22
CEFrS	2,34	0,56	2,6	0,29	23
COTS	2,5	0,49	1,82	0,28	24
MPFIS	2,67	0,51	2,42	0,26	25
CEFIS	2,7	0,52	2,5	0,25	26
CETS	4,14	0,43	1,88	0,17	27
MCFIF	11,17	0,28	1,25	0,06	28
MCTF	101,58	0,28	1,03	0,007	29

LD₅₀: concentração letal em partes por milhão que inibe 50% da população de nematodos, R2: coeficiente de determinação ajustado, b1: coeficiente angular da regressão, Efetividade1: Redução da eficiência em relação ao melhor extrato. Ordenamento2: Ordenamento dos extratos de acordo com a menor concentração de LD. *Códigos dos extratos estão descritos na tabela 1 (metodologia).

No ensaio *in vivo* os extratos de crotalarias: *C. juncea* talo seco (CTJS), fruto fresco (CJFrF); *C. ochroleuca* folha seca (COFIS), talo fresco (COTF); e *C. spectabilis* folha seca (CEFIS), fruto fresco (CEFrF), fruto seco (CEFrS); e mucuna preta talo seco (MPTS), folha seca (MPFIS) apresentaram Fator de Reprodução idem ao controle nematicida (Tabela 3).

Tabela 3. Fator de Reprodução e Índice de Galhas para plantas de café com 90 dias após inoculação (5000 ovos + J2) de *M. incognita* tratados com extratos aquosos de fragmentos de plantas de mucuna e crotalaria.

Tratamento	FR	IG
CEFrS	0,01 a	4,8
COTF	0,02 a	3,5
MPFIS	0,03 a	3,5
CEFrF	0,07 a	3,7
CJFrF	0,10 a	3,3
NEMATICIDA	0,13 a	4,0
CEFIS	0,14 a	3,5
MPTS	0,14 a	4,3
COFIS	0,22 a	4,2
CJTS	0,25 a	3,8
ÁGUA	0,38 b	4,2
CJFrS	0,50 b	4,2
MCFIS	0,60 b	3,8

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de média Scott Knott a 5% de probabilidade. *Códigos dos extratos estão descritos na tabela 1.

DISCUSSÃO

O extratos de crotalaria e mucuna apresentaram no ensaio *in vitro* contra *M. incognita* maior percentual de inibição de eclosão e motilidade de juvenil (J2), estando acima de resultados já obtidos em alguns estudos com extratos de plantas contra *M. incognita* por extratos aquosos de plantas de citronela (*Cymbopogon nardus*) e de chá mexicano (*Dysphania ambrosioides*) causou a mortalidade de 46% e 79%, respectivamente de J2 em ensaio *in vitro* em sua concentração bruta (Silva et al., 2020).

Avaliando efeito nematicida de *C. spectabilis* e *M. pruriens* contra *M. incognita* Osei et al. (2010), observaram que a inibição de eclosão de juvenis (J2) foi de 74%. Enquanto nesse estudo todos os extratos obtiveram 100% de inibição total considerando extrato bruto.

Observou-se neste estudo que concentrações dos extratos, bem como a parte utilizada das plantas influenciaram no percentual de inibição de eclosão de J2. Fato também observado em estudo de extratos aquosos preparados com folhas secas das espécies *Phyllanthus amarus*, *Leucas cefalotes*, *Coccinia grandis* e *Trianthema portulacastrum* em ensaios realizados por Khan et al. (2019), segundo os autores a resposta de inibição acompanhou uma diminuição gradual da taxa de eclosão de ovos com o aumento das concentrações, mas nem mesmo na concentração bruta observaram inibição total (100%). A maior inibição foi para a concentração de 5.000 ppm para o extrato de *P. amarus* (86%). Jidere e Oluwatayo (2018) também obtiveram variação de inibição de J2 *M. incognita in vitro* conforme parte da planta e concentração do extrato de sementes de *M. oleifera* e *J. curcas*.

As crotalarias apresentaram maior percentual de inibição em suas concentrações menores quando comparado a mucuna. Sendo que para as crotalarias a *C. ochroleuca* inibição de 100% já ocorreu na diluição de 10^{-6} para o extrato folha fresca (COFIF), 10^{-4} *C. spectabilis* folha fresca (CEFIF) e *C. juncea* fruto fresco (CJFrF). E para as mucunas diluição de 10^{-3} extratos talo seco (MPTS) e folha seca (MPFIS), e 10^{-4} folha seca (MCFIS) (Figuras 1 a 5). Barros et al. (2014) não obtiveram sucesso no controle *M. incognita* contra J2 *in vitro* com extratos aquosos de folhas frescas de mucuna. Diferindo dos resultados obtidos neste, já que os extratos de mucuna que mesmo tendo ação inferior as crotalárias nas concentrações mais baixas, obteve em média 40% de inibição contra J2 *in vitro*.

A maior inibição dos extratos de crotalária pode ser atribuído à composição bioquímica de compostos com efeitos tóxicos contra nematoides e metabólicos secundários, como a monocrotalina (Pacheco e Silva-Lopez, 2010; Colegate et al., 2012; Jang et al., 2019). A presença de APs tóxicas para nematoides foi verificada também por Scupinari et al. (2020) em *C. spectabilis*, inclusive com teor de monocrotalina maior em sementes do que em folhas.

O que se pode observar neste trabalho com os resultados *in vivo*, já que o Fator de Reprodução foi menor para *C. spectabilis* fruto tanto, fresco como seco, do que para os extratos foliares (Tabela 3). Testando efeito nematicidade de plantas antagônicas Giraldeli et al. (2017) observaram que *C. spectabilis* reduziu 90% da população final.

Lopes et al. (2019) testando extratos de plantas de crotalaria (folhas secas) contra *M. incognita* em tomate, também observaram que tanto *C. spectabilis* como *C. ochroleuca* reduziram o Fator de Reprodução apresentando resultados menor que um ($Fr < 1$). Condizentes

com os resultados deste estudo. Já que todos os extratos de *C. ochroleuca* e *C. spectabilis* independentemente da parte da planta e da forma (seco ou fresco), apresentaram fator de reprodução menor que um ($Fr < 1$).

Testando *Crotalaria* spp, incorporada ao solo, extrato aquoso aplicado tanto no solo, como na planta contra *M. incognita* Borges et al. (2013) apresentaram redução superior a 40% da população de nematoides no solo, para ambas formas de aplicação.

CONCLUSÃO

Os extratos de crotalarias: *C. juncea* talo seco (CTJS), fruto fresco (CJFrF); *C. ochroleuca* folha seca (COFIS), talo fresco (COTF); e *C. spectabilis* folha seca (CEFIS), fruto fresco (CEFrF), fruto seco (CEFrS); e mucuna preta talo seco (MPTS), folha seca (MPFIS) reduziram o FR em relação ao controle água e apresentaram mesmo efeito do controle nematicida. Indicando assim que estes extratos apresentam potencial de bioprospecção no controle de *M. incognita* no cafeeiro.

AGRADECIMENTOS

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CPC), a Fundação de Amparo ao Desenvolvimento das Ações Científicas e Tecnológicas e à Pesquisa do Estado de Rondônia (FAPERO) e a Embrapa Rondônia pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Anene, A.; Declerck, S. 2016. Combination of *Crotalaria spectabilis* with *Rhizophagus irregularis* MUCL41833 decreases the impact of *Radopholus similis* in banana. *Applied Soil Ecology*, 106, 11-17.
- Barros, A. F.; Campos, V. P.; da Silva, J. C. P.; Pedroso, M. P.; Medeiros, F. H. V.; Pozza, E. A.; Reale, A. L. 2014. Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. *Applied Soil Ecology*, 80, 34-43.
- Boneti, J.I.S.; Ferraz, S. 1981. Modification of the Hussey & Barker method for extracting eggs from *Meloidogyne exigua* from coffee roots. *Fitopatologia Brasileira* 6 (3), 55.
- Borges, F. G.; Batisttus, A. G., Muller; M. A., Mioranza, T. M.; Kuhn, O. J. 2013. Manejo alternativo de nematodos de galha (*Meloidogyne incognita*) em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). *Scientia Agraria Paranaensis*, 12, 425-433.
- Colegate, S. M.; Gardner, D. R.; Joy, R. J.; Betz, J. M.; Panter, K. E. 2012. Dehydropyrrolizidine alkaloids, including monoesters with an unusual esterifying acid, from cultivated *Crotalaria juncea* (Sunn Hemp cv. 'Tropic Sun'). *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(14), 3541-3550.

- Debiasi, H.; Franchini, J. C., Dias; W. P., Ramos Junior, E. U.; Balbinot Junior, A. A. 2016. Práticas culturais na entressafra da soja para o controle de *Pratylenchus brachyurus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(10), 1720-1728.
- Ferraz, L.C.C.B. 2018. Nematodos. In: Amorin, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A. (Ed.). *Manual de Fitopatologia*. 5ª ed. Ouro Fino – MG. *Agronômica Ceres*, p.195 – 211.
- Giraldeli, A.; San Gregorio, J. P. R.; Monquero, P.; Aguillera, M. & Ribeiro, N. 2017. Weeds Hosts of Nematodes in Sugarcane Culture. *Planta Daninha*, 35. e017156815.
- Henmi, V. H.; Marahatta, S. P. 2018. Effects of sunn hemp foliage and macadamia nut husks on plant-parasitic and beneficial nematodes. *Nematologica*, 48(1), 34-37.
- Jang, J. Y.; Le Dang, Q.; Choi, G. J.; Park, H. W.; Kim, J. C. 2019. Control of root-knot nematodes using *Waltheria indica* producing 4-quinolone alkaloids. *Pest management science*, 75(8), 2264-2270.
- Jidere, C. I.; Oluwatayo, J. I. 2018. Efficacy of Some Botanical Extracts on Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*) Egg-Hatch and Juvenile Mortality in vitro. *Asian Journal of Agricultural and Horticultural Research*, 1-13.
- Khan, F.; Asif, M.; Khan, A.; Tariq, M.; Ansari, T.; Shariq, M.; Siddiqui, M. A. 2019. Evaluation of the nematicidal potential of some botanicals against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infected carrot: In vitro and greenhouse study. *Current Plant Biology*, 20, <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2019.100115>.
- KVVS, K. K.; Patil, J. A.; Yadav, S. 2019. Nematodes associated with organic farming systems and their management strategies: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(4), 713-720.
- Lopes, A. P. M.; Soares, M. R. C.; Chidichima, L. P. S.; Dias-Arieira, C. R. 2019. Weed hosts of *Meloidogyne* spp. and the effect of aqueous weed extracts on egg hatching. *Weed Research*, 60(2), 142-149.
- Nascimento, D. D.; Vidal, R. L., Pimenta, A. A.; Costa, M. G.; Soares, P. L. M. 2020. *Crotalaria* and millet as alternative controls of root-knot nematodes infecting okra. *Bioscience Journal*, 36(3), 713 – 719.
- Naz, I.; Abdulkafi, S.; Munir, I.; Ahmad, M.; Ali, A.; Palomares-Rius, J. E.; Ali, S.; Ahmad, I. 2016. Cis-and trans-protopinium, a novel nematicide, for the eco-friendly management of root-knot nematodes. *Crop Protection*, 81, 138-144.
- Oostenbrink, M. 1966. Major characteristic of relation between nematodes and plants. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen*, 66 (4), 1-46.
- Santana-Gomes, S. M.; Dias-Arieira, C.R.; Ferreira, J. C. A.; Schwengber, R. P.; Baldisera, S. S. 2019. REPRODUCTION OF *Pratylenchus zae* AND *P. brachyurus* IN COVER CROPS. *Revista Caatinga*, 32(2), 295 – 301.
- Osei, K.; Gowen, S. R.; Pembroke, B.; Brandenburg, R. L. & Jordan, D. L. (2010). Potential of leguminous cover crops in management of a mixed population of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Journal of nematology*, 42(3), 173.

- Scupinari, T.; Russo, H. M.; Ferrari, A. B. S.; Bolzani, V. S.; Dias, W. P.; Nunes, E. O.; HofAMFn-Campo, C. B.; Zeraik, M. L. 2020. *Crotalaria spectabilis* as a source of pyrrolizidine alkaloids and phenolic compounds: HPLC-MS/MS dereplication and monocrotaline quantification of seed and leaf extracts. *Phytochemical Analysis*, 1-9.
- Silva, J. C. P.; Campos, V. P.; Barros, A. F.; Pedroso, M. P.; Terra, W. C.; Lopez, L. E.; Souza, J. T. 2018. Plant volatiles reduce the viability of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* either directly or when retained in water. *Plant disease*, 102(11), 2170-2179.
- Silva, M. F.; Campos, V. P.; Barros, A. F.; Silva, J. C. P.; Pedroso, M. P.; Silva, F. J.; Gomes, V. A.; Justino, J. C. 2020. Medicinal plant volatiles applied against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Crop Protection*, 130, 105057.
- Silva-López, R. E. D.; Pacheco, J. D. S. 2010. Genus *Crotalaria* L.(Leguminosae). *Revista Fitos*, 5(3), 43-52.
- Taylor, A.L.; Sasser, J.N. 1978. Biology, *Identification and Control of Root-Knot Nematodes (Meloidogyne spp.)*. N.C. State Univ. Dept. Plant Path., and USAID, Raleigh, N.C.
- Torto, B.; Kirwa, H.; Kihika, R.; Murungi, L. K. 2018. Strategies for the manipulation of root knot nematode behavior with natural products in small scale farming systems. *American Chemical Society*. 9. 115 – 126.
- Sikandar, A.; Zhang, M. Y.; Wang, Y. Y.; Zhu, X. F.; Liu, X. Y.; Fan, H. Y., & Duan, Y. X. 2020. *Meloidogyne incognita* (root-knot nematode) a risk to agriculture. *Applied Ecology and Environmental Research*. 18(1), 1679-1690.

4. CONCLUSÃO

Na avaliação de resistência genética de clones de *C. canephora* contra *M. incognita* em condições controladas, observa-se que há ocorrências de segregação para essa expressão de resistência contra *M. incognita*. Indicando que os genótipos devem ser avaliados individualmente, independentemente de sua genealogia ou outras características morfológicas. Identificou-se que os clones de *C. canephora* BRS 3210, C12, BRS 2299, BRS 2314, BRS 3137 e BRS 1216 expressaram resposta de resistência a *M. incognita*, indicando potencial para seleção em programas de melhoramento genético de genótipos resistentes a nematóides radiculares.

Os microorganismos *G. macrocarpum* (FMA) e *B. cereus* apresentaram atividade nematicida contra *M. incognita* em *C. canephora*, isoladamente e quando associados, proporcionando efeito semelhante ao nematicida químico Carbofuran. Observou-se que a interação melhorou o resultado nematicida para *B. cereus* e para desenvolvimento radicular para *G. macrocarpum*.

Os extratos de crotalarias: *C. juncea* talo seco (CTJS), fruto fresco (CJFrF); *C. ochroleuca* folha seca (COFIS), talo fresco (COTF); e *C. spectabilis* folha seca (CEFIS), fruto fresco (CEFrF), fruto seco (CEFrS); e mucuna preta talo seco (MPTS), folha seca (MPFIS) reduziram o FR em relação ao controle água e apresentaram mesmo efeito do controle nematicida, contra *M. incognita* no cafeeiro.

As alternativas de controle para *M. incognita* no cafeeiro, testadas neste trabalho, se mostraram promissoras. Indicando potencial de uso para controle de nematoides das galhas no cafeeiro. Porém como os estudos foram realizados sob condições controladas, recomenda-se que sejam realizados testes em condições de campo, pra confirmação dos resultados obtidos.