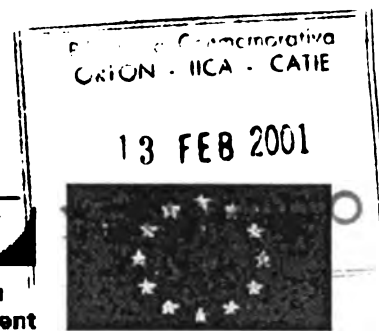


**CATIE**



**IRD**  
Institut de recherche  
pour le développement



**Mejoramiento sostenible del café Arabica  
por los recursos genéticos,  
asistido por los marcadores moleculares,  
con énfasis en la resistencia a los nemátodos**

*Memorias del Taller  
realizado en el CATIE,  
del 29 al 30 de agosto de 2000*

Editado por: François Anthony, Coordinador  
Ely Rodríguez

Publicación Especial CATIE/IRD  
Turrialba, Costa Rica, 2000

## CONTENIDO

---

### PARTE 1: Los recursos genéticos

---

Diversidad de los recursos genéticos del café ( <i>Coffea arabica</i> ), disponible para el mejoramiento genético	p. 11
Phylogenetic relationships of coffee species and origin of <i>Coffea arabica</i> L. tetraploid genome	p. 17
Utilización de los recursos genéticos en el Instituto Agronômico de Campinas (Brazil)	p. 25
Utilización de los recursos genéticos del café en el programa de mejoramiento genético de <i>C. arabica</i> , en Colombia	p. 33
Utilización de los recursos genéticos para la creación varietal en América Central	p. 39

---

### PARTE 2: La resistencia del café a los nemátodos (*Meloidogyne* spp.)

---

Distribution of <i>Meloidogyne</i> spp. on coffee in Brazil: identification, characterization and intraspecific variability	p. 43
Nematóides parasitos ( <i>Meloidogyne</i> spp.) do cafeeiro: manejo genético e químico no Brasil	p. 49
Situación de los nematodos del cafeto en Guatemala	p. 55
Genetics of coffee resistance to nematode <i>Meloidogyne paranaensis</i>	p. 61
The Coffee 'Corky-root' Disease: ethiology and genetic resistance	p. 67
Estudio genético de la resistencia del café a <i>Meloidogyne exigua</i> de Costa Rica	p. 69

---

### PARTE 3: Selección asistida por marcadores moleculares

---

Las bases de la Genética molecular	p. 73
Main DNA molecular markers and their use in breeding programmes and for chromosome mapping	p. 79
Molecular marker-assisted breeding: a coffee perspective	p. 85

---

### ANEXOS

---

1. Programa del taller	p. 93
2. Lista de los participantes y direcciones	p. 95



Hacienda Juan Viñas, el 30 de agosto, 2000

## **AGRADECIMIENTOS**

*El taller se realizó gracias al apoyo financiero del CATIE, de PROMECAFE, del IRD a través de su Delegación para la Información y la Comunicación, y de la Comisión Europea a través del proyecto INCO-DC nº ERBIC18CT970181.*

*El taller se desarrolló gracias al apoyo logístico de la Unidad de Capacitación del CATIE y el presente documento se publicó gracias a la colaboración de la Unidad de Producción de Medios del CATIE.*

*¡ Todos los que participaron al evento estén agradecidos por sus aportes !*

## **PRESENTACIÓN**

Se organizó el taller de Mejoramiento sostenible del café Arabica por los recursos genéticos, asistido por los marcadores moleculares, con énfasis en la resistencia a los nemátodos en el CATIE (Turrialba, Costa Rica), los días 29 y 30 de agosto 2000, con el objetivo de compartir entre científicos los resultados obtenidos recientemente en los tres temas siguientes: los recursos genéticos del café, la resistencia del café a los nemátodos y los marcadores moleculares para el mejoramiento genético. Basándose en los conocimientos generados, se puede proponer nuevas estrategias para mejorar la resistencia de las variedades de café a los parásitos, utilizando la diversidad natural de los cafés silvestres y aplicando las técnicas de marcación molecular. Esta solución genética permitirá reducir significativamente el uso de pesticidas a corto plazo.

El taller permitió reunir fitomejoradores del café con especialistas en los temas antes mencionados, intercambiar experiencias y preparar proyectos de investigación. Además, dio la oportunidad de diseminar los resultados obtenidos recientemente en varios proyectos de investigación, en los cuales varias instituciones de Centroamérica han tenido una participación activa:

- 1991-1994: Proyecto de la Comisión Europea (contrato # C11\*CT91-0899) sobre el desarrollo de marcadores bioquímicos y moleculares para el cultivo café, coordinado por el Scottish Crop Research Institute (Escocia), con la participación del CATIE y del IRD (Institut de recherche pour le développement, ex ORSTOM, Francia);
- 1994-1997: Proyecto de la Comisión Europea (contrato # C11\*CT92-0090) sobre los nemátodos del café en Centroamérica, coordinado por el CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, Francia), con la participación del CATIE y del Programa cooperativo para el desarrollo y la modernización de la caficultura en México, Centroamérica, Panamá y República Dominicana (PROMECAFE) del Instituto Interamericano de Cooperación en Agricultura (IICA);
- 1995-2000: Proyecto regional de mejoramiento genético del café, coordinado por el PROMECAFE, con la participación del CATIE y de la Cooperación Francesa (CIRAD, IRD; Ministerio de Asuntos Exteriores);
- 1997-2000: Proyecto de la Comisión Europea (contrato INCO-DC # ERBIC18CT970181) sobre el mejoramiento de la resistencia del café a los nematodos y el desarrollo de marcadores moleculares para asistir en la selección, coordinado por el IRD, con la participación del CATIE, del PROMECAFE y de la Universidad de Trieste (Italia).

Este documento contiene los resúmenes de las principales presentaciones. Pretende servir como memoria del evento y como referencia para actualizar los conocimientos en los temas tratados.

*François Anthony*  
*Coordinador Técnico*

**Parte 1:**

**LOS RECURSOS GENÉTICOS DEL CAFÉ**

# DIVERSIDAD DE LOS RECURSOS GENÉTICOS DEL CAFÉ (*Coffea arabica*), DISPONIBLE PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO

**Anthony F.<sup>1</sup>, Astorga C.<sup>1</sup>, Bertrand B.<sup>2</sup>, Dussert S.<sup>3</sup> & Lashermes P.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica. <sup>2</sup> IICA-PROMECAFE, Ap. 55, 2200 Coronado, Costa Rica. <sup>3</sup> IRD, BP 5045, 34032 Montpellier cedex 1, Francia.

---

Palabras claves: recursos genéticos, diversidad genética, *Coffea*

## Introducción

Por definición, los recursos genéticos de una planta cultivada corresponden a la totalidad de las plantas con las que ella puede intercambiar genes. Para el café Arábica (*Coffea arabica* L.), los recursos genéticos incluyen unas cien especies descritas en el género *Coffea* y las especies menos conocidas del género *Psilanthus* (Bridson, 1987). Todas estas especies poseen un genoma de base común que permite la obtención de híbridos y la transferencia de genes entre las especies. Presentan también la placentación característica del café, descrita por los botánicos, que se reconoce por la presencia de un surco, más o menos invaginado en la parte ventral del albumen de las semillas.

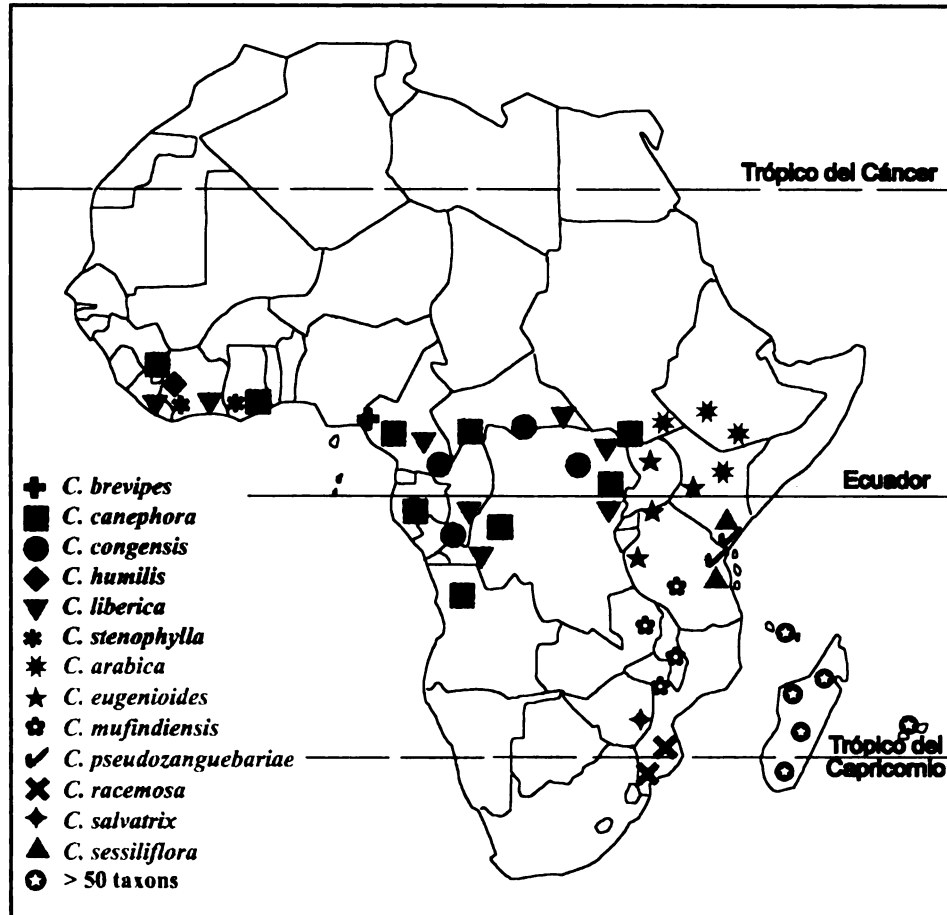
En las colecciones de campo se está conservando unas 40 especies de café, principalmente en Costa de Marfil y Madagascar. Hasta ahora, los programas de mejoramiento genético del café han utilizado solamente una parte infinitesimal de la inmensa reserva de genes disponibles en los cafés silvestres. En América Latina, los fitomejoradores han explotado una base genética limitada, introducida en el siglo XVIII como Typica y Bourbon, y desde los años 70, la resistencia a la roya anaranjada, obtenida de un híbrido interespecífico natural, el Híbrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*), el cual la heredó de su ancestro *C. canephora* (ver la síntesis de Bertrand et al., 1999). Esta sub-utilización de los recursos genéticos se explica por el hecho de que las recolecciones de café silvestres fueron emprendidas recientemente, durante la segunda mitad del siglo XX. De ello resulta una falta de información sobre las características interesantes para el mejoramiento y la organización de la diversidad genética.

Esta presentación pretende resumir los conocimientos sobre: i) la distribución de las especies, ii) las principales características de interés para el mejoramiento genético, y iii) la estructura de la diversidad genética disponible en las dos especies cultivadas, *C. arabica* y *C. canephora*.

## Distribución de las especies de café

El centenar de especies conocidas están repartidas en tres conjuntos biogeográficos (Figura 1): en la región malgache (Chevalier, 1947), en África del Este (Bridson y Verdcourt, 1988) y en África Central y Occidental (Chevalier, 1947; P. Stoffelen, 1998). Algunas especies del género *Psilanthus* se encuentran también en India y hasta en Oceanía (Bridson, 1987).

Especies como *C. canephora* y *C. liberica* están distribuidas a gran escala, de Guinea a Zaire. Otras tienen una distribución limitada y presentan adaptaciones particulares, como *C. humilis* en los bosques humbrófilos de África del Oeste o *C. congensis* en las riveras del río Congo (Zaire) y de sus afluentes en África Central.



**Figura 1.** Distribución de las principales especies de café (*Coffea* spp.) (Anthony et al., 1999).

### Características de los cafés silvestres, de interés para el mejoramiento genético

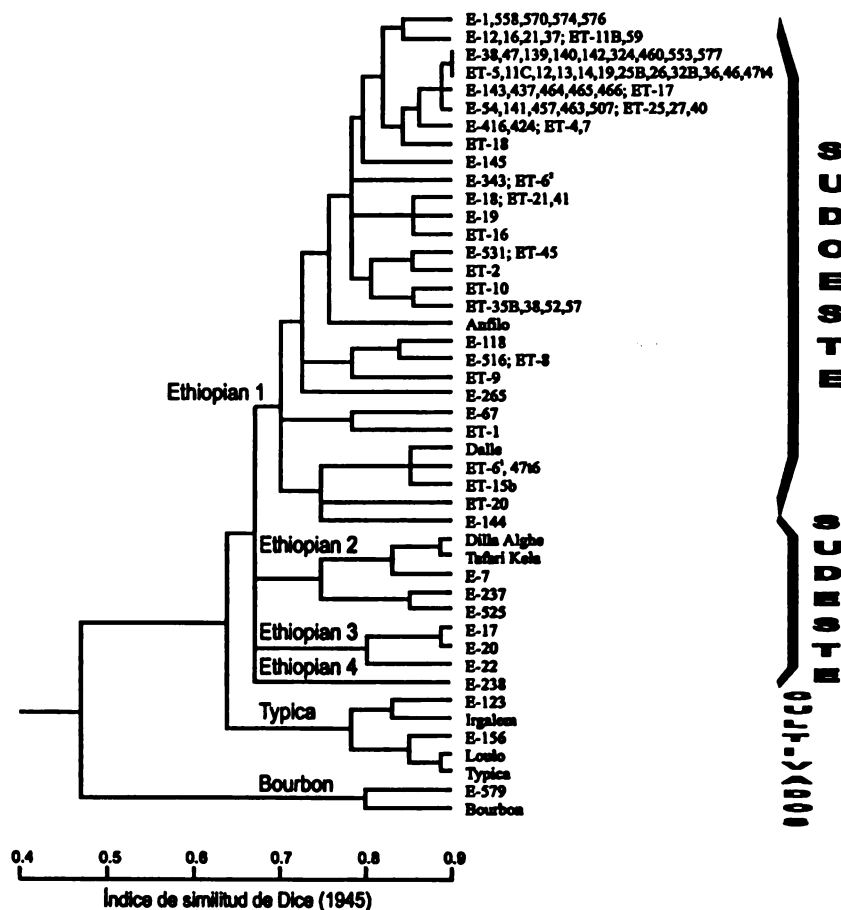
Las principales características de los cafés silvestres que pueden ser valoradas en el mejoramiento genético, se encuentran resumidas a continuación (ver la síntesis de Anthony et al., 1999):

- la resistencia a varias razas de la roya anaranjada, en *C. arabica* (individuos silvestres), *C. canephora*, *C. pseudozanguebariae*, y con una frecuencia más baja en *C. liberica*, *C. eugenioides* y *C. salvatrix*;



- la resistencia al antracnosis del fruto llamado CBD (Coffee Berry Disease), en *C. canephora*;
- la resistencia a los nemátodos del género *Meloidogyne*, en *C. arabica* (individuos silvestres), *C. canephora*, y *C. liberica*;
- la resistencia al minador de las hojas en *C. racemosa* y *C. stenophylla*;
- la ausencia de cafeína en los granos de *C. pseudozanguebariae* y de la mayoría de las especies malgaches;
- la tolerancia a las bajas temperaturas de *C. liberica*;
- la adaptación a la sequía y a las temperaturas elevadas de *C. racemosa*;
- la adaptación a las zonas inundables de *C. congensis*, explotada en los híbridos Congusta (*C. canephora* x *C. congensis*) cultivados en Madagascar.

### Estructura de la diversidad genética en *C. arabica*



**Figura 2.** Clasificación de 88 accesiones silvestres de Etiopía, 6 variedades cultivadas en Etiopía y 2 accesiones representativas de las bases genéticas Typica y Bourbon, por los marcadores moleculares RAPD (adaptado de Anthony et al., 2000).

## Estructura de la diversidad genética en *C. canephora*

El material silvestre recolectado en el centro de origen de la especie *C. canephora* se clasificó en cinco grupos por los marcadores RFLP (Dussert et al., 1999): tres grupos con individuos de África Central, un grupo con la casi totalidad de los individuos de África del Oeste, y un grupo bastante heterogéneo, con individuos de África Central y del Oeste de Costa de Marfil. Este último grupo aparece como el grupo más diferenciado.

## Conclusiones

El inventario de las especies de cafés silvestres todavía no se ha terminado, pues se recolectó una decena de nuevas especies durante las últimas recolecciones en Camerún y Congo, organizada por el ORSTOM (Anthony, 1992).

Los resultados obtenidos recientemente por marcadores moleculares, sobre la estructura de la diversidad genética disponible en las especies *C. arabica* y *C. canephora*, permiten hacer un uso racional de la diversidad genética conservada en los germoplasmas, escogiendo materiales/progenitores en los varios grupos de las clasificaciones.

El valor de los cafés silvestres hace necesario la elaboración de una estrategia de conservación a largo plazo, desarrollando métodos de conservación complementarios a las colecciones de campo, como la criopreservación (ver la síntesis de Dussert et al., 1997) y incluyendo la definición de colecciones reducidas (*core collections*), representativas de la diversidad genética conservada en los grandes germoplasmas (Hamon et al., 1995; Noirot et al., 1996).

## Referencias bibliográficas

- Anthony F (1992). Les ressources génétiques des caféiers : collecte, gestion d'un conservatoire et évaluation de la diversité génétique. Colección "Travaux et Documents Microfichés" n° 81. París, Francia, ORSTOM, 320 p.
- Anthony F, Astorga C, Berthaud J (1999). Los recursos genéticos: las bases de una solución genética a los problemas de la caficultura latinoamericana. In: "Desafíos de la caficultura centroamericana". B Bertrand & B Rapidel eds. CIRAD-IICA, San José, pp. 369-406
- Anthony F, Bertrand B, Quiros O, Lashermes P, Berthaud J, Charrier A (2000). Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. Euphytica: en curso de impresión
- Bertrand B, Aguilar G, Santacreo R, Anzueto F (1999). El mejoramiento genético en América Central. In: "Desafíos de la caficultura centroamericana". B Bertrand & B Rapidel eds. CIRAD-IICA, San José, pp. 407-456
- Bridson DM (1987). Nomenclatural notes on *Psilanthus*, including *Coffea* sect. *Paracoffea* (*Rubiaceae* tribe *Coffeae*). Kew Bulletin 42: 453-460
- Bridson D y Verdcourt B (1988). *Coffea*. In: "Flora of Tropical East Africa (part 2)". R.M. Polhill. ed. A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 703-723

- Chevalier A (1947). Les caféiers du globe; III) Systématique des caféiers et faux caféiers. Maladies et insectes nuisibles. In: "Encyclopédie biologique n°28 (III)". P. Lechevalier ed., Paris, pp. 139-213
- Dice LR (1945). Measures of amount of ecological association between species. Ecology 26: 297-302
- Dussert S, Chabrillange N, Engelmann F, Anthony F, Noirot M., Hamon S (1997). *In vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.) germplasm. In: "Conservation of genetic resources in vitro", Volume 1. MK Razdan & EC Cocking eds. Science Publishers, Nueva York, pp. 287-305
- Dussert S, Lashermes P, Anthony F, Montagnon C., Trouslot P, Combes MC, Berthaud J, Noirot M., Hamon S (1999). Le caféier, *Coffea canephora*. In: "Diversité génétique des plantes tropicales cultivées". P Hamon, M Seguin, X Perrier & JC Glaszmann eds. Collection Repères. CIRAD, Montpellier, pp. 175-194
- Hamon S, Dussert S, Noirot M, Anthony F, Hodgkin T (1995). Core collections: accomplishments and challenges. Plant Breeding Abstracts 65: 1125-1133
- Noirot M, Hamon S, Anthony F (1996). The Principal Component Scoring: a new method of constituting a Core Collection using quantitative data. Genetic Resources And Crop Evolution 43: 1-6
- Stoffelen P (1998). *Coffea* and *Psilanthus* (Rubiaceae) in tropical Africa: a systematic and palynological study, including a revision of the West and Central African species. Tesis de doctorado. Universidad católica de Louvain, 270 p.

# PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF COFFEE SPECIES AND ORIGIN OF *Coffea arabica* TETRAPLOID GENOME

**Lashermes P.<sup>1</sup>, Combes M.C.<sup>1</sup>, Topart P.<sup>2</sup> & Anthony F.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> IRD, BP 5045, 34032 Montpellier cedex 1, Francia. <sup>2</sup> CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica.

---

**Key words:** *Coffea arabica*, coffee, phylogenetic relationships, cpDNA polymorphism, rDNA polymorphism

## **Introduction**

Coffee-trees belong to the tribe *Coffeae* in the family *Rubiaceae*. The subgenus *Coffea* consists of approximately 100 taxa so far identified in African and Madagascan intertropical forests. *Coffea arabica* L. is both the most widely cultivated species of *Coffea* and the only tetraploid species ( $2x = 44$ ) in the genus. Arabica coffee has its primary centre of genetic diversity in the highlands of South West Ethiopia and the Boma Plateau of Sudan. Populations of *C. arabica* have been also reported in Mount Imatong (Sudan) and Mount Marsabit (Kenya). Carvalho (1952) suggested an allotetraploid origin since *C. arabica* presents a diploid meiotic behaviour and a centre of genetic diversity situated outside the distribution area of the diploid coffee species. According to Grassias and Kammacher (1975), and based on cytogenetic observation, *C. arabica* has to be considered as a segmental allotetraploid.

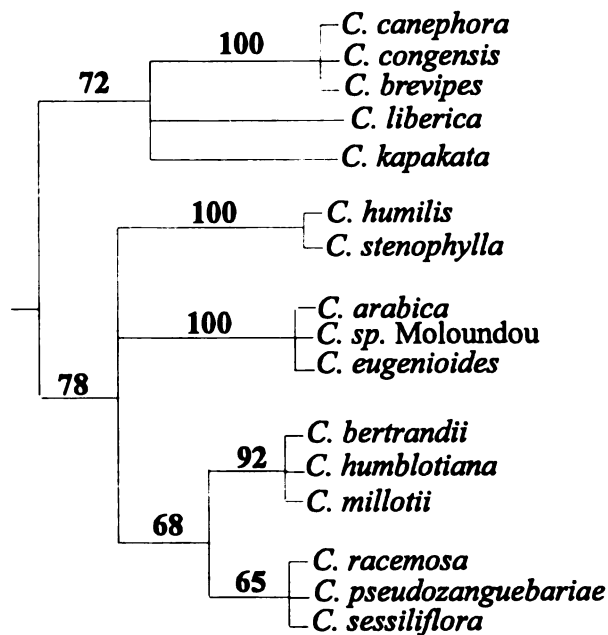
In recent years, DNA-based genetic markers have been developed which offer new potential in analysis of genetic diversity and in elucidating the evolutionary history of plants. In this report, recent results obtained with *C. arabica* are presented.

## **Molecular genetic characterisation of *C. arabica***

### *Phylogenetic relationships inferred from chloroplast DNA variation*

The low frequency of structural changes in the chloroplast molecule (cpDNA) together with a conservative rate of sequence evolution (Olmstead and Palmer, 1994) make it an ideal target for plant phylogenetic study. Maternal inheritance of cpDNA in coffee has been established in interspecific hybrids between *C. arabica* and *C. canephora* (4x) and in an intraspecific progeny of *C. canephora* (Berthou et al., 1983 ; Lashermes et al., 1996).

CpDNA variations have been investigated in the main coffee species and undetermined taxa (Cros et al., 1998). RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis of cpDNA using homeologous probes from lettuce (*Lactuca sativa*) was accomplished. In addition, the sequence of the *trnL-trnF* intergenic region was established. The overall chloroplast genome showed a low level of polymorphism while the intergenic sequence (*trnL-trnF*) appeared more polymorphic. A phylogenetic analysis (Figure 1) using Wagner parsimony was performed.



**Figure 1.** Phylogenetic tree of *Coffea* species based on chloroplast DNA variation. Strict consensus of the most parsimonious Wagner trees is represented. Values (%) on branches are bootstrap indices of support.

Several clades are revealed which are to some extent consistent with the classical biogeographical grouping ( i.e. Madagascar, East Africa, West Africa). Results confirmed a monophyletic origin of *Coffea* species. CpDNA from *C. arabica* appeared similar to cpDNA from *C. eugenioides* and *Coffea sp.* Moloundou, suggesting that *C. arabica* could have diverged maternally from a species related to those species. Chloroplast genomes from *C. canephora* and *C. congensis* were found to be identical, as previously reported by Berthou et al. (1983) following a total cpDNA RFLP analysis.

#### *RFLP analysis using single-copy nuclear probes*

A study was conducted to determine relationships among a series of *Coffea* species including *C. arabica* by comparing restriction fragment patterns. Probes from nuclear genomic arabica and arabusta libraries were selected to be single-copy using doubled haploid genotypes of *C. canephora*. RFLP-based distances between *C. arabica* and a large number of species were estimated (Table 1). When several accessions from the same species were analysed, the average distance is reported. *C. congensis*, *C. canephora* and *C. eugenioides* seemed to be the closest species to *C. arabica*. All distance values were higher than the expected one if *C. arabica* was an autotetraploid resulting from the duplication of one of the diploid species studied.

**Table 1.** Distances (complement of the Jaccard index) between *C. arabica* and a representative panel of diploid *Coffea* species based on RFLP data obtained using nine nuclear single-copy probes.

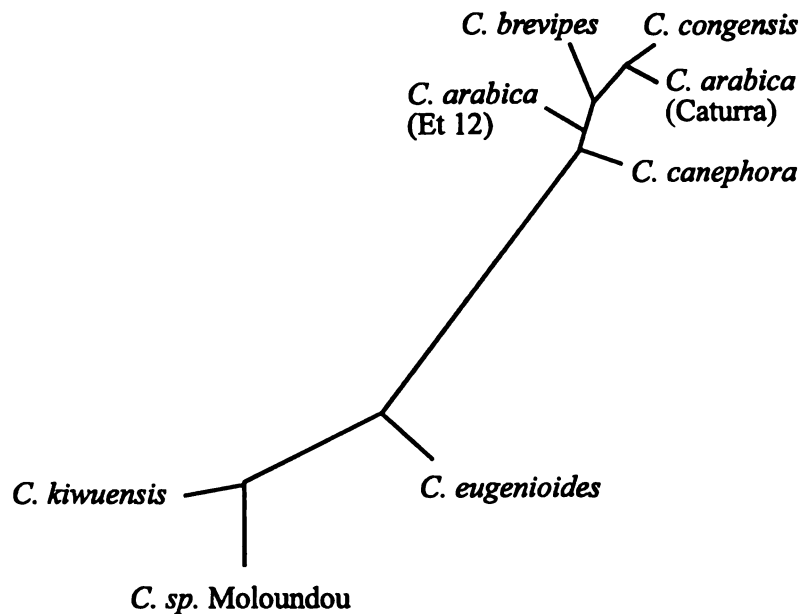
Species	Distribution area	Distance to <i>C. arabica</i>
<i>C. canephora</i>	West and Central Africa	0.70 - 0.80
<i>C. congensis</i>	West and Central Africa	0.70 - 0.80
<i>C. eugenoides</i>	Central Africa	0.70 - 0.80
<i>C. humilis</i>	West Africa	0.70 - 0.80
<i>C. sp. Moloundou</i>	Central Africa	0.80 - 0.85
<i>C. sp. X</i>	Unknown	0.80 - 0.85
<i>C. brevipes</i>	Central Africa	0.85 - 0.90
<i>C. kapakata</i>	Central Africa	0.85 - 0.90
<i>C. liberica</i>	West and Central Africa	0.85 - 0.90
<i>C. salvatrix</i>	East Africa	0.85 - 0.90
<i>C. stenophylla</i>	West Africa	0.85 - 0.90
<i>C. farafanganensis</i>	Madagascar	0.90 - 1
<i>C. humblotiana</i>	Comores islands	0.90 - 1
<i>C. millotii</i>	Madagascar	0.90 - 1
<i>C. pseudozanguebariae</i>	East Africa	0.90 - 1
<i>C. racemosa</i>	East Africa	0.90 - 1

#### *Nuclear ribosomal DNA sequence analysis*

Among nuclear gene regions, the rDNA repeat unit is attractive for phylogeny reconstruction and genetic studies because of its ubiquity in all organisms, rapid concerted evolution, and the diverse rates of evolution observed within and among component subunits and spacers (reviewed in Jorgansen and Cluster, 1988). The internal transcribed spacer region ITS2 of 18-26S nuclear ribosomal DNA was sequenced for a number of *Coffea* species, including two genotypes of *C. arabica* (Caturra and Et 12).

No evidence of ITS length variants or major sequence variants within arabica accessions was found. *C. arabica* genotypes showed only one major type of sequence although important ITS2 nucleotide sequence variations were observed between species (Lashermes et al., 1997).

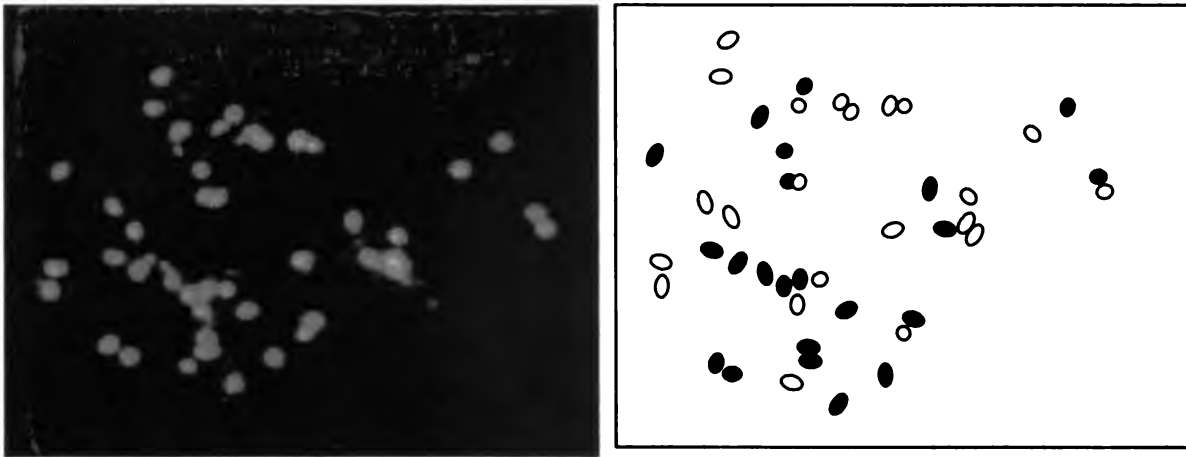
Analysis for a restricted number of species showed (Figure 2) that the ITS2 region of *C. arabica* diverged markedly from the sequences of *C. eugenoides* and its sister-group (*C. kiwuensis* and *Coffea sp. Moloundou*), and appeared almost identical to the sequences of canephoroid species (*C. canephora*, *C. congensis* and *C. brevipes*).



**Figure 2.** Parsimony analysis of ITS2 sequences of nuclear ribosomal DNA among *Coffea* species as putative ancestors of *C. arabica*. Branch lengths correspond to numbers of informative mutations.

#### *In situ hybridisation*

*In situ* hybridisation was carried out on chromosome preparations of *C. arabica* using digoxigenin-labelled total DNA from *C. canephora* as one probe and biotin-labelled total DNA from *C. eugenioides* as the second (Lashermes et al., 1999). The use of a specific filter to detect either FITC or Texas Red showed that two groups of chromosomes were clearly differentiated in *C. arabica* (Figure 3). Twenty two chromosomes showed a predominant yellow fluorescence suggesting a stronger affinity with the total genomic DNA probe from *C. canephora*. The remaining 22 chromosomes appeared in red-orange suggesting that the red coloration due to the total genomic DNA from *C. eugenioides* was more intense than the yellow-green one. Both genomic DNA hybridised strongly to the centromeric regions with weaker hybridisation along the chromosome arms.



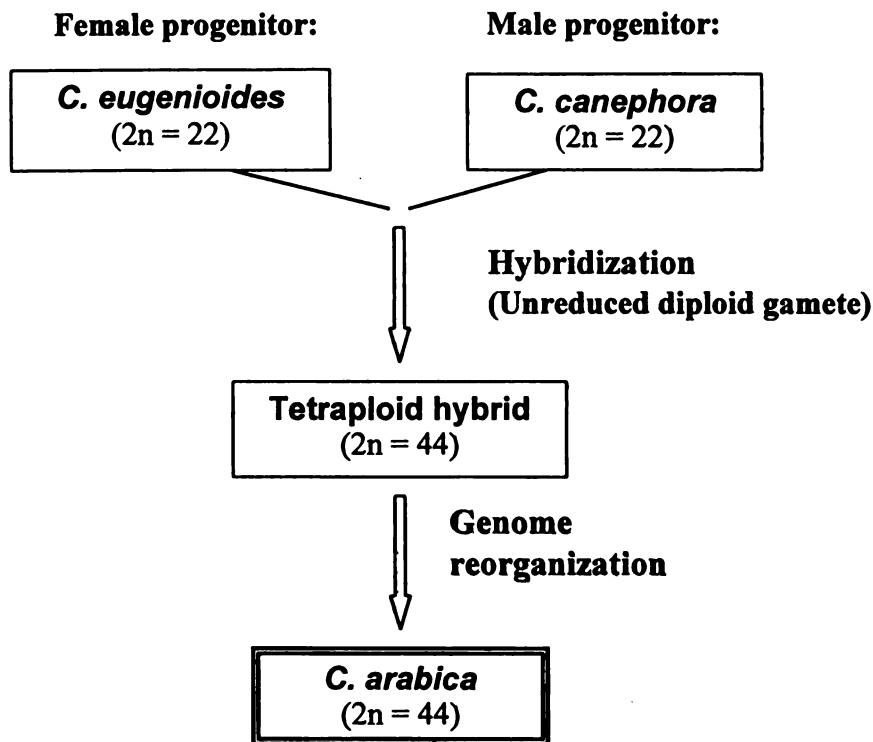
**Figure 3.** a) Preparation following simultaneous *in situ* hybridisation with digoxigenin-labelled total DNA from *C. canephora* and biotin-labelled total DNA from *C. eugenioides*. The two signals were superimposed by double exposure. b) Schematic representation of a) showing the specific origin of *C. arabica* chromosomes. The stippled ovals represent chromosomes that exhibit stronger hybridisation with the *C. eugenioides* probe.

### Origin of *C. arabica* tetraploid genome

Earlier attempts to determine the genetic origin of *C. arabica* relied on analysis of meiotic behaviour of *C. arabica*, karyotyping (Bouharmont, 1959), chromosome pairing in hybrids with diploid species (Krug and Mendes, 1940; Kammacher and Capot, 1972) and in dihaploid plants of *C. arabica* (Vishveshwara, 1960; Berthaud, 1976; Kammacher, 1980). These studies have revealed marked chromosome affinity and the absence of substantial chromosome differentiation between the two constitutive genomes of *C. arabica*, and between *C. arabica* and the diploid *Coffea* species. The normal diploid behaviour of *C. arabica* is thought to be due to a genetic system (Grassias and Kammacher, 1975). Investigation of the origin of *C. arabica* can be based on the results of the different DNA sequence evolution studies.

The allotetraploid origin of *C. arabica* is corroborated by the analysis of polymorphism observed by RFLP. In addition, hypotheses involving intergeneric combination or association of distant *Coffea* species are improbable. Work on the chloroplast genome strongly supports the notion that a species close to *C. eugenioides* donated the maternal genome of *C. arabica*. Analysis of rDNA showed that the paternal parent was a species from the canephoroid group (*C. canephora*, *C. congensis*). The very low divergence between ITS2 sequences of canephoroid species and *C. arabica*, as well as the similarity of the chloroplastic *trnL-trnF* intergenic sequences from *C. arabica*, *C. eugenioides* and *C. sp.* Moloundou, clearly indicate that formation and speciation of *C. arabica* are recent events and most likely occurred during the late quaternary period. Information on the origin of *C. arabica* is summarised in Figure 4.





**Figure 4.** Proposed mode of speciation for *Coffea arabica*

### **Arabica speciation process**

Results clearly suggested that *C. arabica* is an amphidiploid formed from the hybridisation between *C. eugenioides* used as female parent and *C. canephora* or ecotypes related to those species. Polyploidisation resulting into fertile hybrid types could have arisen by different ways such as chromosome doubling of a diploid interspecific hybrid or via backcrossing of a spontaneous triploid (Harlan and de Wet, 1975). Although the mode of origin remains obscure, it is likely to involve unreduced gametes. Such an event is easily conceivable in coffee trees. In particular, cold treatment has been reported in *C. canephora* and *C. liberica* to induce abnormal pollen development, including uninuclei microspore formation (Lanaud and Parvais, 1980). Later on, forms combining self-fertility and regular meiosis could have been retained during the evolutionary process. Breakdown of the self-incompatibility system occurring in most diploid species has often been observed in coffee interspecific hybrids (Charrier, 1978). The presence of pairing regulating genes has been recently established (Lashermes et al., 2000). However, further work is required to determine the genome reorganisation that occurred during the evolution of the tetraploid archetype to the present amphidiploid *C. arabica*.

## References

- Berthaud J (1976). Etude cytogénétique d'un haploïde de *Coffea arabica*. Café Cacao Thé (Paris) 20: 91-96.
- Berthou F, Mathieu C, Vedel F (1983). Chloroplast and mitochondrial DNA variation as indicator of phylogenetic relationships in the genus *Coffea* L. Theor. Appl. Genet. 65: 77-84.
- Bouharmont J (1959). Recherche sur les affinités chromosomiques dans le genre *Coffea*. INEAC (Brussels), Série Sci. 77, 94p.
- Carvalho A (1952). Taxonomia de *Coffea arabica* L., Caracteres morfológicos dos haploides. Bragantia 12: 201-212.
- Charrier A (1978). La structure génétique des caféiers spontanés de la région malgache *Mascarocoffea*. leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (*Eucoffea*). Mémoire ORSTOM 87, ORSTOM ed., Paris.
- Cros J, Combes MC, Trouslot P, Anthony F, Hamon S, Charrier A, Lashermes P (1998). Phylogenetic relationships of *Coffea* species: new evidence based on the chloroplast DNA variation analysis. Molecular Phylogenetics and Evolution 9: 109-117.
- Demarly Y (1975). Amélioration des caféiers liée aux progrès génétiques. 7<sup>th</sup> Conference of ASIC (Paris), pp. 423-435.
- Grassias M, Kammacher P (1975). Observations sur la conjugaison chromosomique de *Coffea arabica* L.. Café Cacao Thé (Paris) 19: 177-190.
- Harlan JR, deWet JM (1975). On a wing and a prayer: the origins of polyploidy. The botanical review 41: 361-390.
- Jorgansen RA, Cluster PD (1988). Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. Annals of the Missouri Botanical Garden 75: 1238-1247.
- Kammacher P (1980). Sur le comportement méiotique des dihaploïdes de *Coffea arabica* L.. 9<sup>th</sup> Conference of ASIC (Paris), pp. 717-724.
- Kammacher P, Capot J (1972). Sur les relations caryologiques entre *Coffea arabica* et *C. canephora*. Café Cacao Thé (Paris) 16: 289-294.
- Krug CA, Mendes AJT (1940). Cytological observations in *Coffea* - IV. Journal of genetics 39: 189-203.
- Lanaud C, Parvais JP (1980). Observations, avant mise en culture, des divisions anormales des noyaux de grains de pollen de caféier induits au froid. 9th conference of ASIC, London (UK), pp 547-554.
- Lashermes P, Cros J, Combes MC, Trouslot P, Anthony F, Hamon S, Charrier A (1996). Inheritance and restriction fragment length polymorphism of chloroplast DNA in the genus *Coffea* L.. Theor. Appl. Genet. 93: 626-632.
- Lashermes P, Combes MC, Trouslot P, Charrier A (1997). Phylogenetic relationships of coffee-tree species (*Coffea* L.) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Theor. Appl. Genet. 94: 947-955.

- Lashermes P, Combes MC, Robert J, Trouslot P, D'hont A, Anthony F, Charrier A (1999). Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular & General Genetics* 261: 259-266.
- Lashermes P, Paczek V, Trouslot P, Combes MC, Couturon E, Charrier A (2000). Single-locus inheritance in the allotetraploid *Coffea arabica* L. and interspecific hybrid *C. arabica* x *C. canephora*. *J. of Heredity* 91: 81-85.
- Olmstead RG, Palmer JD (1994). Chloroplast DNA systematics: a review of methods data analysis. *Am. J. Bot.* 81: 1205-1224.
- Vishveshwara S (1960). Occurrence of a haploid in *Coffea arabica* Kents. *Indian Coffee (Chikmagalure)* 24 (3): 123-124.

## UTILIZACIÓN DE LOS RECURSOS GENÉTICOS EN EL MEJORAMIENTO DEL CAFETO EN EL INSTITUTO AGRONÓMICO

Guerreiro-Filho O.<sup>1</sup>, Fazuoli L.C.<sup>1</sup>, Medina-Filho H.P.<sup>1</sup>,  
Gonçalves W.<sup>1</sup> & Silvarolla M.B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Agronômico de Campinas - Centro de Café - CP 28 - CEP 13001-970 - Campinas, SP - Brasil. <sup>2</sup> Beca CNPq.

---

### Introducción

Aunque existen muchas controversias con relación a la posición taxonómica de algunas especies de *Coffea*, las clasificaciones más recientes (Bridson, 1987; Bridson & Verdcourt, 1988; Bridson, 1994), agrupan los cafetos en 2 géneros: *Coffea* y *Psilanthus*. A su vez, el género *Psilanthus* se divide en los subgéneros *Psilanthus* y *Afrocoffea* y el género *Coffea* abarca los subgéneros *Coffea* y *Baracoffea*. Mientras el subgénero *Baracoffea* está representado por 7 especies, el subgénero *Coffea* reúne 80 especies siendo que aproximadamente 25 son oriundas de África Continental y 55 de Madagascar.

En el Banco Activo de Germoplasma (BAG) del Instituto Agronómico de Campinas (IAC), fue posible reunir hasta el presente, 18 de las principales especies del género *Coffea* y dos del género *Psilanthus*. Algunas especies tienen muchos representantes en este BAG, como es el caso de *C. arabica* y *C. canephora* y otras, muy pocos ejemplares. Ambas, *C. arabica* y *C. canephora*, son las más importantes en el mercado internacional. *C. arabica* es nativa de una región pequeña, marginal a las demás especies, localizada en el sudoeste de Etiopía, sudeste de Sudán y norte de Kenia (Chevalier, 1947; Charrier, 1978; Bridson, 1980; Leroy, 1982). Se trata de una especie noble que produce café de buena calidad y representa alrededor del 70% del mercado mundial. *C. canephora* tiene una distribución más amplia, ocurriendo en las regiones occidental, centro tropical y subtropical del continente africano. Esa amplia faja abarca la República de Guiné, Liberia, Sudán y Uganda. Una alta concentración de tipos se encuentra en la República Democrática del Congo (Chevalier, 1947); Charrier & Berthaud, 1985). La variabilidad existente dentro de esta especie es muy grande en relación al tamaño y forma de la planta, hojas, frutos y semillas. El sistema radicular de las plantas es bien desarrollado y la resistencia a las principales molestias y plagas es acentuada. El contenido de cafeína y de sólidos solubles en sus semillas es superior a los encontrados en el café arábica.

Las otras especies de *Coffea* no son cultivadas comercialmente, sino que ocurren de forma silvestre y poseen alta variabilidad para muchas características, principalmente resistencia a las molestias, plagas y nematodos. La mayor parte de las especies silvestres de *Coffea* posee una reducida producción de flores, característica responsable por la baja producción de frutos. Algunas de las especies son exentas o tienen bajo contenido de cafeína y sólidos solubles en las semillas. Otras especies tienen maduración extremadamente tardía o precoz y, por lo menos una, *C. racemosa*, tiene resistencia a la seca y hojas caducas.

## Biología de la reproducción

La especie *C. arabica* es tetraplóide con  $2n = 4x = 44$  cromosomas, autoincompatible y se multiplica exclusivamente por fecundación cruzada (Conagin & Mendes, 1961; Devreux *et al.*, 1959; Berthaud, 1980). Solamente una excepción es conocida: la especie *C. sp.* "Moloundou" es diplóide y autocompatible. La incompatibilidad en *C. canephora* fué determinada como siendo del tipo gametofítico, lo que también es verificado en *C. dewevrei* y *C. congensis*. Hay indicaciones de que esta incompatibilidad en *C. canephora* sea condicionada por una serie alélica S en un locus (Conagin & Mendes, 1961; Devreux *et al.*, 1959). No se sabe al cierto el número de genes que participan en la incompatibilidad. En lo que se refiere a las especies del género *Psilanthus*, se sabe que por lo menos la especie *Psilanthus bengalensis*, a pesar de diplóide, es autocompatible y, por la estructura floral se multiplica, probablemente, por autofecundación, lo mismo ocurriendo con *P. Travancorensis* (Medina Filho *et al.*, 1982).

## Aprovechamiento de genes de interés agronómico en el mejoramiento de *C. arabica*

### *Genes oriundos de C. arabica*

En el IAC, durante 68 años de observaciones, se realizó el análisis genético de 42 mutantes que permitieron tales análisis. Los genes estudiados afectan características de las hojas, flores, frutos, semillas y de las plantas, como altura, tipo de ramificación, resistencia a molestias y plagas (Carvalho *et al.*, 1991). Entre los genes que afectan la altura de las plantas, se destacan el Caturra (*Ct*), San Bernardo (*Sb*), Villa Lobos (*Vl*), y San Ramón (*Sr*), todos dominantes e independientes (Carvalho *et al.*, 1984b), con gran interés económico ya que reducen el largo de los internodios del tronco principal y de las ramas laterales, dándole a las plantas un tamaño reducido y un aspecto compacto, facilitando la cosecha y los tratamientos fitosanitarios y reduciendo los costos de producción. Un ejemplo del aprovechamiento del factor *Ct* ha sido la obtención de las variedades Catuaí Vermelho y Catuaí Amarelo de porte bajo, abundantemente plantadas en Brasil y en el exterior (Carvalho & Mônaco, 1972; Fazuoli, 1986; Carvalho & Fazuoli, 1993). También se comprobó que varios genes tienen efecto pleiotrópico notable, como el gen laurina (*lr*), que, además de afectar el porte y altura de la planta, tamaño de las hojas, forma y tamaño de los frutos y semillas, reduce el contenido de cafeína en las semillas (Krug *et al.*, 1959; Carvalho *et al.*, 1986).

El gen cera (*ce*) se ha mostrado valioso, debido a que presenta el fenómeno de xênia. Contribuyó para demostrar, por la primera vez, que la semilla de café es formada por endosperma verdadero y ha sido muy utilizado para la determinación de la tasa de fecundación cruzada natural (Krug & Carvalho, 1939; 1951). Como las semillas se presentan amarillentas, sirvió también para demostrar que el color verde de la semilla normal no se debe a los ácidos clorogénicos, ya que las semillas cera poseen la misma constitución en relación a estos compuestos que las verdes (Carelli *et al.*, 1974).

En lo que se refiere a la resistencia a molestias y plagas fueron detectadas en *C. arabica* fuentes de resistencia a la roya, la mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) y CBD o antracnosis de los frutos, provocada por *Colletotrichum kahawae* (Bettencourt & Carvalho, 1968; Moraes *et al.*, 1974; Van der Vossen & Walyaro, 1980). Con relación a los nematodos, fuentes de resistencia han sido encontradas en materiales procedentes de Etiopía (Fazuoli, 1981).

Resumiendo, en *C. arabica* existe razonable variabilidad con potencial para ser usada en programas de mejoramiento. Entretanto, la variabilidad para resistencia a molestias, plagas y nematodos, es menor en *C. arabica*, razón por la cual se depende de las especies diplóides que son fuentes de resistencia genética, posibles de ser transferidas a *C. arabica*.

#### *Genes oriundos de Coffea spp.*

El modelo de clasificación informal de las especies, propuesto por Harlan y De Wet (1971) aplicado al género *Coffea*, indicó que existe un grande potencial para el mejoramiento de *C. arabica* (reserva primaria) concentrado en la reserva genética secundaria (Medina Filho *et al.*, 1984). Las especies *C. canephora*, *C. congensis*, *C. racemosa* y *C. dewevrei*, esta última actualmente designada por *C. liberica* var. *dewevrei*, que pertenecen a la reserva secundaria, vienen siendo aprovechadas como fuentes importantes de resistencia a plagas, molestias, nematodos y a condiciones adversas del ambiente. Un ejemplo significativo de ese aprovechamiento fue el desarrollo en el IAC de las variedades Icatú Vermelho, Icatu Amarelo e Icatu Precoce, con resistencia a *Hemileia vastatrix* provenientes del cruzamiento entre *C. arabica* y *C. canephora* (Monaco *et al.*, 1974; Fazuoli, 1991; Carvalho & Fazuoli, 1993).

La utilización de la especie *C. canephora* ha sido también indirectamente efectuada a través del Híbrido de Timor, un derivado de retrocruzamiento espontaneo de un híbrido natural, entre *C. arabica* y *C. canephora* (Bettencourt, 1973). El Híbrido de Timor, posee fenotipo de *C. arabica*, tiene 44 cromosomas en las células somáticas, es auto fértil y está aparentemente estabilizado en cuanto al comportamiento meiótico (Rijo, 1974). Las variedades Obatã IAC 1669-20, Tupi IAC 1669-33 e IAPAR 59 (también derivada del IAC 1669), productivas y de porte bajo, tienen su alta resistencia a la roya derivada del Híbrido de Timor, por tanto, indirectamente, de *C. canephora* (Fazuoli *et al.*, 1996 y 1999; IAPAR, 1993). Es interesante resaltar que determinadas progenies de *C. canephora* constituyen también fuentes de resistencia a *Colletotrichum kahawae*, una molestia extremadamente grave (Carvalho *et al.*, 1976; Van der Graaf, 1981; Van der Vossen & Walyaro, 1981), conocida como CBD (Coffee Berry Disease) que ataca los frutos del café, provocando su caída. La especie *C. canephora* también presenta resistencia a los nematodos *Meloidogyne exigua*, *M. incognita*, *M. paranaensis* e *Pratylenchus coffeae*. El patrón Apotã IAC 2258, resistente a varios nematodos, viene siendo también recomendado para plantíos de cafetos no injertados de la especie *C. canephora* y puede ser considerado como una solución viable para la manutención del cultivo de café en varias regiones de Brasil, donde hay nematodos (Medina Filho *et al.*, 1999). Por tanto, *C. canephora* es bastante utilizada en el programa de

mejoramiento del IAC, sea como patrón o como fuente de resistencia a molestias y nematodos (Fazuoli, 1981; Fazuoli *et al.*, 1984, Carvalho & Fazuoli, 1993).

La especie *C. racemosa*, perteneciente a la reserva genética secundaria de *Coffea arabica*, se cruza bien con *C. arabica* produciendo triploides naturales o artificiales con facilidad. Ha sido usada como fuente de resistencia a la larva minadora de las hojas (*Perileucoptera coffeella*) y a la seca (Medina Filho *et al.* 1977a). Como el período de maduración de los frutos de *C. racemosa*, en Campinas, es bastante reducido (2 a 3 meses), esta característica viene siendo utilizada en el desarrollo de variedades de *C. arabica* con maduración precoz.

Una otra especie del grupo de la reserva genética secundaria es *C. dewevrei* ou *C. liberica* var. *dewevrei*, la cual además de producir bien, posee resistencia al agente de la roya, nematodos y bicho minero. Presenta maduración bastante tardía, llevando un año desde la florescencia hasta la maduración de sus frutos y tiene el endocarpo más espeso, lo que puede constituir una barrera física que dificultaría la penetración de la broca del café (*Hypotenemus hampei*) en sus frutos.

*C. congensis*, también viene siendo utilizada, en su forma tetraploide. Esta especie además de poseer un exuberante sistema radicular y buena producción, es resistente a los nematodos *M. exigua* y *M. incognita* (Fazuoli *et al.*, 1983) y a *H. vastatrix*. Otra especie que viene siendo usada es *C. stenophylla*, perteneciente al grupo de la reserva genética terciaria. Esta especie es casi inmune al bicho minero (Medina Filho *et al.*, 1977b). Entre tanto, su uso está limitado por la dificultad en las hibridaciones con *C. arabica* (Carvalho & Mônaco, 1967). En este caso es indicado el uso de métodos más sofisticados que puedan auxiliar la utilización de esta especie en programas de mejoramiento, tales como el cultivo *in vitro* de embriones o la fusión de protoplastos (Sondahl *et al.*, 1980).

La especie *C. salvatrix*, perteneciente a la reserva genética secundaria, también está siendo aprovechada en el programa de mejoramiento del IAC visando resistencia a *P. coffeella*. Cafetos tetraploides de *C. salvatrix* fueron cruzados con *C. arabica* con el propósito de transmitir esa resistencia. Entre tanto, debe ser dada una atención especial a la utilización de *C. salvatrix*, pues esta especie es altamente susceptible a la saúva (Carvalho & Mônaco, 1967; Mazzafera, 1991).

Otra característica importante, evaluada en el programa de mejoramiento del café en el IAC, es el contenido de cafeína, que es uno de los componentes químicos de grande interés, debido a su efecto estimulante. Reducir o aumentar su contenido es importante para atender distintos tipos de mercados. La reducción podrá ser conseguida por el empleo, en las hibridaciones, de cafetos silvestres de Madagascar sin cafeína, o entonces por la transferencia del gen recesivo laurina (*lr*) de *C. arabica* para las variedades comerciales, una vez que este factor reduce a la mitad el contenido de cafeína (Carvalho *et al.*, 1965; Carvalho *et al.*, 1983; Charrier & Berthaud, 1985).

Además de los varios ejemplos de la utilización exitosa del germoplasma de *Coffea* en el programa de mejoramiento de *C. arabica*, la reserva genética presente en la colección tiene

todavía potencial para contribuir intensivamente en el desarrollo de nuevas variedades con características específicas, principalmente en relación a la resistencia a los nematodos u otros problemas fitosanitarios, o también, para atender nuevas exigencias del mercado consumidor.

### Referencias bibliográficas

- Berthaud, J. 1980. L'incompatibilité chez *Coffea canephora* méthode de test et déterminisme génétique. *Café, Cacao, Thé* 24: 267-274
- Bettencourt, A. J. 1973. Considerações gerais sobre o Híbrido do Timor. Campinas, Instituto Agrônomo, Circ. n.º 23. 20 p.p.
- Bettencourt, A. J. & Carvalho, A. 1968. Melhoramento do cafeeiro visando resistência à ferrugem. *Bragantia*, 27:35-68.
- Bridson, D. M. 1982. Studies in *Coffea* in *Psilanthus* (Rubiaceae subfam. *Cinchonoideae*) for part 2 of Flora of Tropical East África: *Rubiaceae*. *Kew Bulletin* 36 (4): 817-859.
- Bridson, D. M. 1994. Additional notes on *Coffea* (Rubiaceae) from Tropical East África. *Kew Bulletin* 49 (2): 331-342.
- Bridson, D. M. 1987. Nomenclatura notes on *Psilanthus*, including *Coffea* sect. *Paracoffea* (Rubiaceae tribe Coffeae). *Kew Bulletin LR* (2) 453-460.
- Bridson D.M. & Verdcourt, B. 1988. Flora of Tropical East Africa – Rubiceae (Part 2). Polhill R.M.(eds), 727 pp.
- Carelli, M. L.; Lopes, C. R. & Mônaco, L. C. 1974. Chlorogenic acid content in species of *Coffea* and selections of *C. arabica*. *Turrialba*, 24: 398-401.
- Carvalho, A. & Fazuoli, L. C. 1993. Café. In: Furlani, A. M. C. & Viégas, G. A. eds. O melhoramento de plantas no Instituto Agrônomo, Campinas, Instituto Agrônomo. Cap. 2, p. 29-76.
- Carvalho, A.; Fazuoli, L. C. & Mazzafera, P. 1986. Melhoramento do café laurina. In. Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciências, 38, Curitiba. Anais. p. 908.
- Carvalho, A.; Medina Filho, H. P.; Fazuoli, L. C. & Costa, W. M. 1984b. Números de locos e ação de fatores para porte pequeno em *Coffea arabica*., *Bragantia*, Campinas, 43(2): 421-442.
- Carvalho, A.; Medina Filho, H. P.; Fazuoli, L. C.; Guerreiro Filho, O. & Lima, M. M. A. 1991. Aspectos genéticos do cafeeiro (Genetic Aspects of the coffee tree). *Revista Brasil. Genet.*, 14(1): 135-183.
- Carvalho, A. & Mônaco, L. C. 1967. Genetic relationships of selected *Coffea* species. *Ciência e Cultura*, 19(1):161-165.
- Carvalho, A. & Mônaco, L. C. 1972. Transferência do fator Caturra para o cultivar Mundo Novo de *Coffea arabica*. *Bragantia*, Campinas, 31 (31): 379-399.
- Carvalho, A.; Mônaco, L. C. & van der Vossen, H. A. M. 1976. Café Icatu como fonte de resistência a *Colletotrichum coffeanum*. *Bragantia*, 35: 343-347.
- Carvalho, A.; Tango, J.S. & Mônaco, L. C. 1965. Genetic control of caffeine content in coffee. *Nature*, 205: 314.



- Carvalho, A.; Sondahl, M. R. & Sloman, C 1983. Teor de cafeína em seleções de café. Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Poços de Caldas, MG., 10:111-113.
- Charrier, A. 1978. La structure génétique des caféiers spontanés de la region Malgashe (*Mascarocoffea*). Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (*Eucoffea*). Memories ORSTOM, Paris, 87, 223 p.p.
- Charrier, A. & Berthaud, J. 1985. Botanical classification of coffee. In: Clifford, M. N. & Willson, K. C. Eds Coffee. Botany, Biochemistry and production of beans and beverage. Westport, connecticut. The Avi Publishing, Inc. p. 13-47.
- Chevalier, A. 1947. Les caféiers du globe. III. Systématique des caféiers. Maladies et insects nuisibles. Encyclopedie biologique 28: 1-256 Fascicule III, Paul Lechevalier, Paris.
- Conagin, C. H. T. M. & Mendes, A. J. T. 1961. Pesquisas citológicas e genéticas de três espécies de *Coffea* – autoincompatibilidade em *C. canephora*. *Bragantia*, 20: 787-804.
- Devreux, M. ; Vallaeys, G. ; Pochet, P. & Gilles, A. 1959. Researches sur l'autosterilite du caféier Robusta (*Coffea canephora* Pierre), Publ. INEAC 78, 44 p.p.
- Fazuoli, L. C. 1981. Resistance of coffee to the root-knot nematode species *Meloidogyne exigua* and *M. incognita*. Colloque International sur protection des cultures tropicales, Lyon, France. p. 57.
- Fazuoli, L. C. 1986. Genética e Melhoramento do Cafeeiro. In: Rena, A. B. ; Malavolta, E. ; Rocha, M. ; Yamada, Y. Editores. Cultura do Cafeeiro. Piracicaba. Potafos, p. 87-113.
- Fazuoli, L. C. 1991. Metodologias, critérios e resultados da seleção em progênies do café Icatu com resistência a *Hemileia vastatrix*. Campinas, 322 p. (Tese de Doutorado-Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP).
- Fazuoli, L. C.; Costa, W. M.; Gonçalves, W. & Fernandes, J. A. R. 1983. Identificação de resistência em *Coffea canephora* e *C. congensis* ao nematóide *Meloidogyne incognita*, em condições de campo. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 35 (7): 20 (Suplemento).
- Fazuoli, L. C.; Costa, W. M.; Gonçalves, M.; Lima, M. M. A. & Fernandes, J. A. R. 1984. Café Icatu como fonte de resistência e/ou tolerância ao nematóide *Meloidogyne incognita*, In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 11, Londrina. Resumos. Rio de Janeiro, IBC/GERCA, p. 247-248.
- Fazuoli, L. C.; Medina, H. P.; Guerreiro Filho, O.; Lima, M. M. A.; Silvarolla, M. B.; Gallo, P. B. & Costa, W. M. 1996. Obatã (IAC 1669-20) e Tupi (IAC 1669-33), cultivares de café de porte baixo e resistentes a ferrugem. Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 22°, Águas de Lindóia, SP, p. 149-150.
- Fazuoli, L. C.; Medina, Filho, H. P.; Guerreiro Filho, O.; Gonçalves, W.; Silvarolla, M. B. & Lima, M. M. A. 1999, Coffee cultivars in Brazil. Association Scientifique International du Café, 18 Colloque Helsinki, Finlândia, p.396-404.
- Harlan, J.R. & De Wet, J.M.J. 1971. Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon*, 20(4): 509-517.
- IAPAR 1993. Café IAPAR 59. Londrina, PR., IAPAR. Folder.
- Krug, C.A. & Carvalho, A. 1939. Genetical proof of the existence of coffee endosperm. *Nature*, 144: 515.

- Krug, C. A. & Carvalho, A. 1951. The genetics of *Coffea*. *Advances in Genetics*, New York, 4: 127-158.
- Krug, C. A.; Carvalho, A. & Antunes Filho, H. 1959). *Genética de Coffea*. XXI. Hereditariedade dos caracteres de *Coffea arabica* L. var. *laurina* (Smeathman). DC. *Bragantia*, Campinas, 13: 247-255.
- Mazzafera, P. 1991. Análises químicas em folhas de cafeeiros atacados por *Atta spp.* *Revista de Agricultura*, Piracicaba, 66(1): 33-45.
- Medina Filho, H. P. ; Carvalho, A. & Medina, D. M. 1977a. Germoplasma de *Coffea racemosa* e seu potencial no melhoramento do cafeeiro. *Bragantia* 36, nota n.º 11: 43-46.
- Medina Filho, H. P. ; Carvalho, A. & Mônaco, L. C. 1977b. Melhoramento do cafeeiro XXXVII. Observações sobre a resistência de cafeeiro ao bicho mineiro. *Bragantia* 36: 131-137.
- Medina Filho, H. P.; Carvalho, A.; Fazuoli, L. C. 1982. *Coffea bengalensis* e *C. travancorensis*: espécies diplóides, autocompatíveis e autógamas de *Coffea*. *Ciência e Cultura*. Reunião Anual da SBPC, Campinas, São Paulo, 34: 713 (Resumo).
- Medina Filho, H. P.; Carvalho, A.; Sondahl, M. R.; Fazuoli, L. C. & Costa, W. M. 1984. Coffee breeding related evolutionary aspects. In: *Plant Breeding Reviews* (J. Janick, ed.). Avi Publish. Co. Connecticut, USA, V. 2, p. 157-193.
- Medina Filho, H. P.; Fazuoli, L. C.; Guerreiro Filho, O.; Gonçalves, W.; Silvarolla, M. B.; Lima, M. M. A. & Thomaziello, R. A. 1999. Increasing robusta production in Brazil: the potential of 200 thousand ha in São Paulo state. *Association Scientifique Internationale du café*. 18<sup>ème</sup> Colloque. Helsinki, Finlândia.
- Mônaco, L. C.; Carvalho, A.; Fazuoli, L. C. 1974. Melhoramento do cafeeiro. Germoplasma do café Icatu e seu potencial no melhoramento. In: *Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*, 2, Poços de Caldas, Resumos. Rio de Janeiro, IBC/GERCA, p. 103.
- Moraes, S. A.; Sugimori, M. H.; Thomaziello, F. M. & Carvalho, P. T. C. 1974. Resistência de cafeeiros a *Pseudomonas garcae*. In: *Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*, 2., Poços de Caldas – MG, 1974. Resumos. Rio de Janeiro, IBC, p. 183.
- Rijo, L. 1974. Observações cariológicas no cafeeiro Híbrido do Timor. *Portugaliae Acta Biologica*, Lisboa, 13: 157-168
- Sondahl, M. R.; Chapman, M. & Sharp, W. R. 1980. Protoplast liberation, cell wall reconstitution and callus proliferation in *Coffea arabica* callus tissues. *Turrialba*, 30 (2): 161-165.
- Van der Graaf, N. A. 1981. Selection of Arabica coffee types resistant to coffee berry disease in Etiopia. *Meded. Landbouwhogeschool*. Wageningen, 81: 11.
- Van der Vossen, H. A. M. & Walyaro, D. J. 1980 . Breeding for resistance to coffee berry disease in *Coffea arabica* L. II. Inheritance of the resistance. *Euphytica*, 29: 777-791.
- Van der Vossen, H. A. M. & Walyaro, D. J. 1981. The coffee breeding programme in Kenia: A review of progress made since 1971 and plan of action for the coming years. *Kenya Coffee*, 46(541).

# UTILIZACION DE LOS RECURSOS GENETICOS DE CAFÉ EN EL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENETICO DE *C. arabica*, EN COLOMBIA

**Moreno G.<sup>1</sup>, Cortina H.<sup>1</sup>, Alvarado G.<sup>1</sup>, Gaitan A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFE, Chinchiná, Caldas, Colombia.  
Email: German.Moreno@cafedecolombia.com

---

**Palabras claves:** Café, Recursos genéticos, Polimorfismo. Marcadores moleculares.

## **Introducción**

*Coffea arabica* L. es una especie autógama, tetraploide, originaria de Etiopía. La diversidad que de esta especie existe en Colombia, se conserva en CENICAFE en una Colección que sirve de soporte para el mejoramiento genético del café en Colombia y alrededor de la cual se desarrollan actividades de mantenimiento, caracterización, evaluación, documentación y utilización del germoplasma. En esta exposición se presenta un resumen de estas actividades, especialmente de la utilización dada al germoplasma en el mejoramiento genético.

De la Colección hacen parte tanto el material introducido al país como el seleccionado en CENICAFE dentro de las labores propias del mejoramiento genético. Se compone de unas 4000 entradas clasificadas por su origen en: a) introducciones traídas a Colombia en diferentes épocas y de muchos países, dentro de las cuales se destacan las introducciones recolectadas por la misión de la FAO y la de ORSTOM en el centro de origen y las procedentes del antiguo Congo Belga; y b) selecciones hechas en CENICAFE, resultantes de evaluaciones dentro de las introducciones o en las poblaciones segregantes (Guillaumet y Halle, 1978, Meyer et al, 1964).

La colección contiene germoplasma mayoritariamente de la especie *C. arabica* (85 %), y aunque existen ejemplares de otras nueve especies, estas están mal representadas por su bajo número (Moreno y Castillo, 1979).

## **Caracterización y evaluación**

La caracterización se ha hecho principalmente por rasgos morfológicos, como altura de la planta, tipo de ramificación, forma de las hojas, etc. La evaluación, se ha realizado teniendo en cuenta características agronómicas, como vigor vegetativo, producción, adaptación, tamaño y forma de los granos, resistencia a enfermedades, etc. y de calidad, bien sea de la bebida o del contenido de algunos compuestos del grano. Los resultados se han publicado principalmente en la revista CENICAFE y se pueden consultar en su página Web (Castillo, 1975, Castillo y Parra, 1973).

## **Utilización**

Los materiales de la colección se han utilizado para resolver problemas de la caficultura nacional a lo largo de su historia, especialmente en los siguientes casos:

### **1. Aumento de la producción**

La selección se ha enfocado considerando tanto la planta como la unidad de superficie. En el primer caso, los genotipos de porte alto, utilizados con densidades de siembra bajas, muestran mayor producción. Las variedades de tipo Borbón y algunas selecciones en la variedad Mundo Novo, presentan en Colombia las mayores producciones, del orden de 2,5 Kgr. de café pergamino seco/planta y año. El aprovechamiento de estos materiales de alta producción ha sido escaso, sin embargo recientemente se están usando como progenitores para obtener variedades de porte alto resistentes a la roya.

La otra forma de mejorar la producción es aumentar la densidad de siembra, aprovechando el "porte bajo" de algunas introducciones como la variedad Caturra, la más utilizada, traída en 1952, y con la cual se han alcanzado producciones superiores a los 5.000 Kgr. de c.p.s./hectarea año.

### **2. Resistencia a enfermedades**

El trabajo de mejoramiento se ha dirigido principalmente a combatir las enfermedades ampliamente difundidas en Colombia, y cuyas alternativas de control son poco eficientes y/o costosas, como la roya (*Hemileia vastatrix* Berk y Br.) y a enfermedades que en el momento no están presentes, pero que, por sus antecedentes, son amenazas graves para la caficultura.

Al comienzo se trabajó en la selección de materiales con los genes Sh1 a Sh4, existentes en *C. arabica*, pero la rápida aparición de las razas compatibles los relegó a un segundo plano. Actualmente se evalúan como fuentes de resistencia incompleta a esta enfermedad, encontrando bajos niveles de enfermedad en algunos, especialmente en el germoplasma de Etiopía (Fig. 1) (Alvarado y Castillo, 1996).

El germoplasma más utilizado en Colombia como fuente de resistencia a la roya ha sido el Híbrido de Timor que posee resistencia completa e incompleta a la enfermedad. La variedad Colombia, variedad compuesta obtenida de cruces entre Caturra y el Híbrido de Timor, es el resultado más importante conseguido en este campo (Castillo y Moreno, 1987).

Otra enfermedad que no está presente en Colombia pero que puede ser tan severa como la roya es el CBD (*Colletotrichum kahawae* Waller y Bridge). Numeroso germoplasma se ha evaluado en condiciones de invernadero, en un comienzo en Kenia y ahora en el CIFC (Centro Internacional de las Royas del Café), de Portugal. Para la prueba se utilizan inoculaciones en los hipocotilos, cuya respuesta está asociada con la que muestran posteriormente las plantas en el campo. En materiales reportados en la literatura como resistentes, como Rume Sudan, K7, Jackson, Blue Mountain, Pluma Hidalgo, existentes en

Colombia, no ha sido encontrada resistencia de interés. El único germoplasma promisorios son las progenies de cruzamiento de Caturra x Híbrido de Timor en las que se ha identificado resistencia a 1, 2 y a 3 de los aislamientos de *C. kahawae* evaluados. El vacío existente es su comprobación en campo.

### 3. Resistencia a plagas

La broca es sin duda la plaga más severa del café. Cerca del 80 % del material introducido se ha evaluado por antixenosis en condiciones de campo. No existen materiales inmunes, pero algunas introducciones, especialmente dentro de la Colección de la FAO, muestran sistemáticamente, menores ataques que la variedad Caturra, usada como testigo susceptible. Sin embargo, estos resultados requieren de confirmación (Fig. 2).

### 4. Utilización de especies diploides

Con el objetivo de ampliar la base genética de la especie arábica, se desarrolla un proyecto de hibridación interespecífica con las especies diploides: Como resultado, se han obtenido progenies de generaciones avanzadas, similares a *C. arabica*, que combinan buenas características agronómicas y de calidad con resistencia parcial a la roya.

## **Herramientas aportadas por la biología molecular para estudiar el germoplasma de la colección**

Los resultados mencionados provienen de caracterizaciones morfológicas y evaluaciones agronómicas efectuadas a través del tiempo. Ambas métodos se continúan aplicando, pero en la actualidad se complementan con las herramientas que ofrece la Biología Molecular, especialmente en dos campos:

### 1. Medida del polimorfismo

En la medida en que las técnicas de biología molecular se han desarrollado, se han aplicado para conocer el polimorfismo existente en la colección. Inicialmente, en un estudio que empleó 18 sistemas isoenzimáticos, se evaluaron las 3 introducciones del Híbrido de Timor, variedades cultivadas e introducciones semisilvestres de *C. arabica*, encontrando polimorfismo solo en 2 isoenzimas (Fosfatasa ácida y Fosfogluco-dehidrogenasa). Los materiales derivados del H. de T, presentaron mayor polimorfismo que las variedades cultivadas de *C. arabica* e igual al de las introducciones semisilvestres de esta especie (Moreno, 1989).

Recientemente fueron terminados dos estudios empleando marcadores RAPDs y microsatélites: En el primero, (Chaparro, 2000), se probaron 42 primers sobre 50 genotipos de *C. arabica* pertenecientes a la colección de la FAO y la variedad Caturra. Con estos primers se amplificaron 401 fragmentos, de los cuales 137, provenientes de 24 de los 42 primers, fueron polimórficos. El polimorfismo obtenido, 34 %, se considera relativamente alto. Solo 4 de los genotipos semisilvestres fueron clasificados en el mismo grupo de la variedad Caturra (Fig. 3).

En el segundo trabajo (Moncada, 2000), se utilizaron 34 microsatelites para probar el polimorfismo de 32 genotipos. El nivel de polimorfismo entre los 32 genotipos fue evaluado calculando el numero de alelos por loci y los valores PIC (polymorphism information content). Ambos valores fueron mayores para los materiales diploides, intermedios para los tetraploides etiopes y menores para los tetraploides cultivados. Sin embargo, el polimorfismo en estos ultimos fue mayor que el reportado con RFLPs y RAPDs, lo cual hace que este tipo de marcadores sea una herramienta de gran utilidad para el mejoramiento de tetraploides (Fig. 4).

## 2. Selección asistida por marcadores moleculares

Se adelantan estudios para apoyar la selección por resistencia a dos enfermedades, una ausente en Colombia, el CBD, y la otra presente, la roya.

En cuanto a la selección por resistencia al CBD, en germoplasma suministrado por CENICAFE Agwanda y Lashermes identificaron en Francia marcadores moleculares que siempre están presentes en plantas resistentes en pruebas de laboratorio. En CENICAFE se ha reproducido la técnica y se han empleado otros marcadores, con resultados interesantes en varios casos. La posterior confirmación de estos resultados permitirá la selección en Colombia por resistencia a esta enfermedad.

En el caso de roya, se busca identificar marcadores asociados con la resistencia incompleta, empleando la técnica de Análisis de Segregantes Agrupados. Se han encontrado marcadores asociados con las poblaciones resistentes, que hacen de esta técnica un apoyo muy importante para acelerar la selección (Fig. 5).

Finalmente, aunque los nematodos no son un problema limitante en Colombia, también se ha explorado la posibilidad de caracterizar molecularmente las diferentes especies de *Meloidogyne* presentes en la zona cafetera (Fig. 6). Con este propósito se culminó un trabajo usando marcadores RAPD e IGS, con los que se espera proveer de una herramienta de diagnóstico e identificación para estudios epidemiológicos y de búsqueda de resistencia (Quintana 2000).

## **Conclusión**

El uso que hasta el momento se ha hecho de los recursos genéticos existentes en la Colección Colombiana de Café ha permitido alcanzar los objetivos que se ha trazado la disciplina mejoramiento genético de CENICAFE.

La aparición de nuevas razas de hongos y de nuevas enfermedades y plagas, hace indispensable caracterizar y usar cada vez más y mejor nuestro germoplasma. Esta mayor utilización del germoplasma, debe reflejarse en un aumento en la diversidad en las variedades cultivadas.

Sea esta la oportunidad para insistir en la necesidad de enriquecer nuestro germoplasma con representantes de las especies diploides, y de fomentar el intercambio de acciones tendientes a la mejor conservación, caracterización y aprovechamiento de nuestras colecciones.

### **Bibliografía**

- Alvarado A., G.; Castillo Z., J.; 1996 Progreso de la roya del cafeto sobre genotipos resistentes y susceptibles a *Hemileia vastatrix*. *Cenicafé (Colombia)* 47 (1): 42 – 52.
- Castillo, Z. J.; 1975 Producción y características de grano de germoplasma de café introducido a Colombia. *Cenicafé (Colombia)* 26 (1): 3-26.
- Castillo, Z. J.; Parra, H. J.; 1973 Exploración en el contenido de cafeína, grasas y sólidos solubles en 113 introducciones de café. *Cenicafé (Colombia)* 24 (1): 3 –29.
- Castillo, Z. J.; Moreno G. 1987. La variedad Colombia: Selección de un cultivar compuesto resistente a la roya del cafeto. Manizales, Cenicafe, 169 p.
- Chaparro, A. P. 2000. Determinación de la variabilidad genética de introducciones de Etiopía de *Coffea arabica* L. empleando marcadores moleculares RAPD. Santafé de Bogotá, Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas, 122 p. (Tesis: Biología).
- Guillaumet J. L.; Hallé, F.; 1978. Echantillonnage du matériel *C. arabica* récolté en Ethiopie. En Étude de la structure et de la variabilité génétique des caféiers. Paris (Francia) ORSTOM – IFCC (Bulletin No. 14) pp 13 –18.
- Meyer F. G.; Fernie L. M.; Narasimhaswamy R.L.; Monaco L. C.; Greathead D. J. 1968 FAO Coffee Mission to Ethiopia 1964-1965. FAO, Rome 200 pp.
- Moncada., M. del P. 2000. Evaluation and utilization of genetic variation in rice (*Oryza* spp) and coffee (*Coffea* spp) using RFLP and SSLP markers. Geneva, Cornell University, 198 p. (Tesis: Doctor of Philosophy).
- Moreno, R. G.; Castillo, Z. J.; 1979. Germoplasma existente en la Colección Colombiana de Café e información disponible sobre algunas de sus características. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Centro Nacional de Investigaciones de café. Chinchiná, Caldas, Colombia. (sin paginación).
- Moreno., G. 1989. Etude du polymorphisme de l'hybride de Timor en vue de l'amelioration du Caféier Arabica: Variabilité enzymatique et agromique dans les populations d'origine; résistance incomplète à *Hemileia vastatrix* dans les croisements avec *Coffea arabica*. Montpellier, Ecole National Supérieure Agronomique de Montpellier, 153 p. (Tesis: Philosophy Doctor).
- Quintana, J.C. 2000. Caracterización molecular de monopoblaciones del nematodo del nudo radical *Meloidogyne* spp. provenientes de café. Santafé de Bogotá (Colombia), Pontificia Universidad Javeriana, 110 p. (Tesis Pregrado Microbiología).

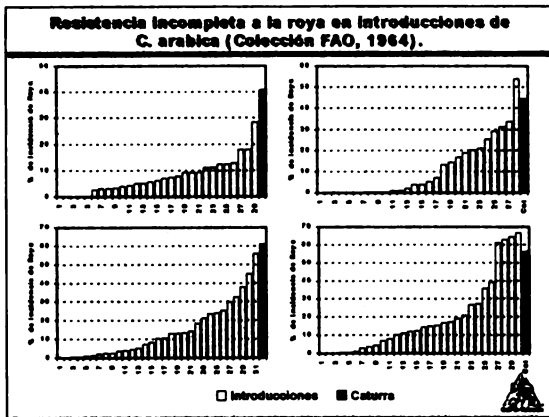


Figura 1.

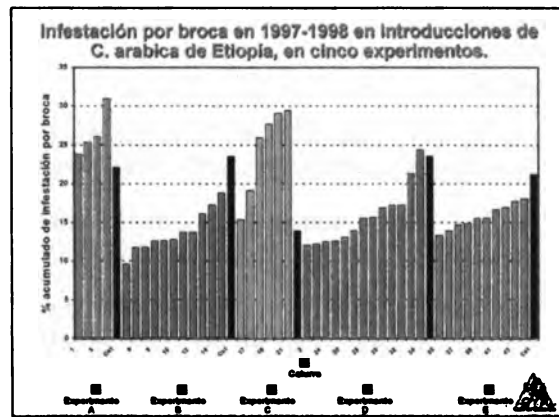


Figura 2.

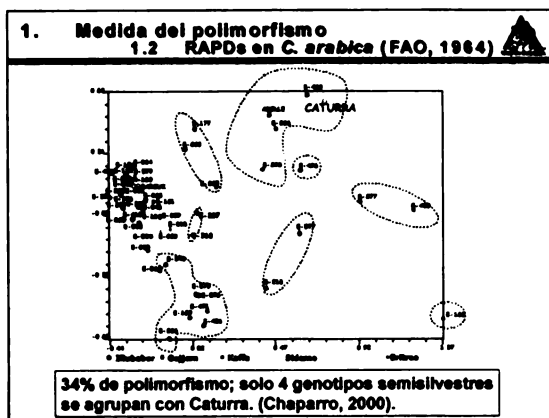


Figura 3.

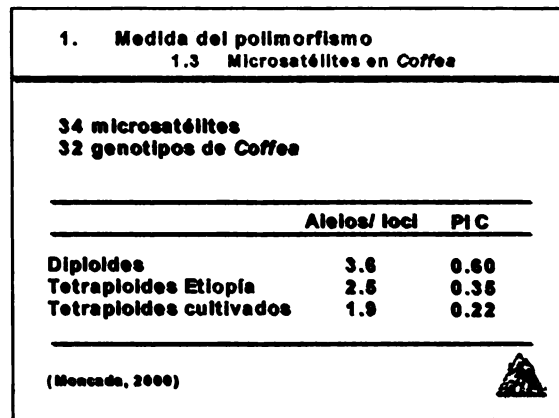


Figura 4.

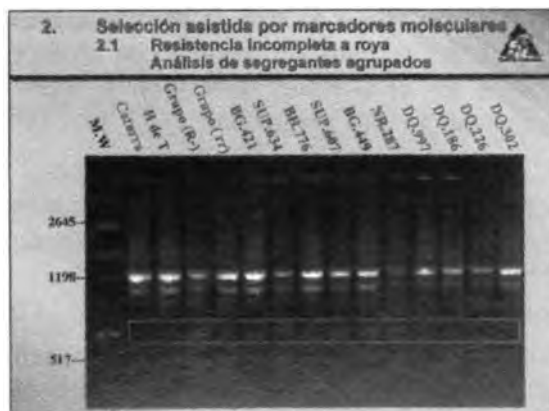


Figura 5.



Figura 6.



## UTILIZACIÓN DE LOS RECURSOS GENÉTICOS PARA LA CREACIÓN VARIETAL EN AMÉRICA CENTRAL

**Bertrand B.<sup>1</sup>, Santacreo R., Anzueto F., Peña de Moran X., Anthony F. & Etienne H.**

<sup>1</sup>Centre de Coopération Internationale en Recherche agronomique pour le développement, CIRAD/ PROMECAFE, IICA, AP 55, 2200 Coronado, Costa Rica.

---

Hasta los años 1950, las variedades tradicionales 'Típica' y Bourbon' son las únicas variedades cultivadas en toda la caficultura Americana. La base genética es muy estrecha. A partir de los años 1950, empieza una verdadera 'revolución verde' en donde la productividad es multiplicada por 2 o 3. La selección de la variedad Caturra de porte bajo y posteriormente del Catuai, permitieron la adopción del paquete técnico basado en altas densidades, fertilización intensiva y cultivo en luz plena o con sombra reducida.

Debido a la amenaza de la roya (*Hemileia vastatrix*) se empezaron en los años 70, las selecciones de los Catimores que derivan del híbrido interespecífico el 'Híbrido de Timor' a través de un programa de selección genealógica. Después de más de 20 años de selección se liberaron en 1990 y luego 1995 dos nuevas variedades resistentes a la roya, IHCAFE90 y Costa Rica 95. La primera se abandona progresivamente porque su calidad a la taza es cuestionada por parte de los compradores. La segunda esta todavía en curso de evaluación por medio de múltiples análisis sensoriales. Además de este material, más de 40 líneas de Catimores estan en curso de evaluación (IAPAR59, T5296, ICATU, etc.). Varias líneas presentan resistencia al nematodo *Meloidogyne exigua* y otras al *colletotrichum kahawae*. Se necesitan evaluaciones en experimentos multilocales antes de una selección definitiva. Sin embargo, estas líneas son de gran interés como progenitores. A partir de 1990, se empezó un programa de hibridación entre accessiones silvestres de Etiopia o de Sudan y algunas variedades de Catimor o el Caturra y el Catuai. Actualmente se han seleccionados 19 candidatos que producen de 10 a 50% más que las mejores variedades. A partir de 1999/2000 se esta creando una red de ensayos para experimentar estos nuevos clones que por el momento son reproducidos via embriogenesis somaclonal. Este programa debería concluirse en 2005. La próxima etapa del mejoramiento es la selección asistida por marcadores de caracteres de importancia agronómica o de resistencia.

**Parte 2:**

**LA RESISTENCIA DEL CAFÉ A LOS NEMÁTODOS**

**DISTRIBUTION OF *Meloidogyne* spp. ON COFFEE IN BRAZIL:  
IDENTIFICATION, CHARACTERIZATION  
AND INTRASPECIFIC VARIABILITY**

**Carneiro R.M.D.G. & Almeida M.R.A.**

EMBRAPA/CENARGEN, C.P. 02372, 70849-970 Brasilia, DF, Brazil

---

**Key words:** *Meloidogyne* spp., coffee, identification, morphology, isozymes, RAPD

**Introduction**

All root-knot nematodes are currently described in the large genus *Meloidogyne* which comprises about 80 species. Fifteen species of *Meloidogyne* have been associated with coffee in many countries of the world, including very damaging nematodes causing great losses to the coffee farmers and the local economy of developing countries.

Species characterization is based primarily on morphological features of females, males and second-stage juveniles. Information about host range and host specificity is also included in the original descriptions of some species (Eisenback, 1985). Precise and reliable morphological identification of species is a formidable task even for well-qualified taxonomists with expertise in the genus *Meloidogyne* (Eisenback, 1985; Hirschmann, 1985).

An explanation for the difficulties encountered in characterizing and identifying species has been provided by extensive cytogenetic studies of about 600 populations from many parts of the world (Triantaphyllou, 1985). Such studies have demonstrated that the most common *Meloidogyne* species do not constitute true biological species; they represent discrete, predominantly parthenogenetic forms derived along different lines of evolution. They present variation in mode of reproduction, from amphimictic to parthenogenetic (facultative and obligatory) and in degree of ploidy, ranging from haploidy to various levels of polyploidy. Somatic chromosome numbers of 14 to 74 illustrate the cytogenetic complexity of the genus *Meloidogyne* (Triantaphyllou, 1985).

The extensive morphological variation among and within root-knot nematodes species makes their identification difficult. Hartman & Sasser (1985) proposed a simple and practical method for identification of the four major species of *Meloidogyne* and races of *M. incognita* and *M. arenaria* based on their responses (host or non host) to a series of differential hosts. Without backup from morphological characters, this test is not reliable for identification of *Meloidogyne* populations (Hartman & Sasser, 1985).

Extensive enzymatic studies of about 674 populations have demonstrated that the several species of *Meloidogyne* (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985, 1990; Carneiro *et al.*, 1996a,

2000) can be differentiated by species-specific enzyme phenotypes which can be revealed by polyacrylamide-gel electrophoreses. Unfortunately, there are enzymatic profiles for only 26 species.

Many molecular techniques (RFLP, PCR, RAPD) have been shown to be valuable tools for species identification and isolate characterization of root-knot nematodes. However, these techniques have so far been limited in terms of survey and diagnosis study, because getting and understanding the obtained results is complex and time-consuming (Hyman, 1996). At the moment the most useful approach is to confirm identification by molecular procedures with available phenotypic traits based on morphological and biochemical criteria. Given the extreme variability among the conserved characters usually employed to define *Meloidogyne* spp. and races, integrative diagnosis must be the chosen method while the relatively young field of nematode molecular diagnostics awaits maturity.

## ROOT-KNOT NEMATODES FROM COFFEE IN BRAZIL

### Distribution

The most common damaging species in Brazil are *M. exigua*, *M. incognita* and *M. paranaensis*. Recent surveys on coffee plantations have shown a substantial increase in the distribution of *M. paranaensis* (70%) and a decrease of *M. incognita* (30%) in Paraná State (Krzyzanowski, 2000 unpublished). *M. exigua* was found in 100% of samples from Minas Gerais (Campos, 2000 unpublished) and Bahia (Souza, 2000 unpublished). In coffee plantations in São Paulo, *M. exigua* and *M. incognita* occurred in separate populations with the last one predominanting (Lordello, 2000 unpublished). Three races of *M. incognita* were detected on coffee in Brazil: races 1, 2 and 3 in São Paulo and races 1 and 2 in Paraná, with the predominance of races 1 and 2. *M. coffeicola* was detected recently in only one very old plantation in Pirajú, São Paulo State (Carneiro *et al.*, 2000). This species had probably been eradicated from many plantations during the renewal of damaged coffee after the great frost of 1975 (Campos, 1990).

### Symptomes of damage

*Meloidogyne exigua* causes typical rounded galls mostly on new roots formed after the first rains in spring and continues to produce them into the summer. The galls are white to yellowish brown and turn dark brown as the root becomes older. Egg masses are produced in the cortex under the root epidermis. Necrotic areas are also to be seen on the galled roots, which may be further damaged by secondary infections, and die off (Campos, 1990). *Meloidogyne paranaensis* and *M. incognita* causes peeling and cracking of cortical parts of root tissue, especially on the taproots in field plants, but it does not produce galls. The cortical cracking results from the hypertrophy of tissues adjacent to the female. Darker dots along the roots are observed where the females are located. Sometimes localized swellings on the roots are seen on lateral roots. Females feeding in roots kill the surrounding tissues leading to the root death, thus greatly reducing the root system. Young coffee plants of "Mundo Novo" inoculated with *M. paranaensis* shows typical swelling on lateral and

taproots. Plants inoculated with *M. incognita* does not form galls, the mature females break through the root surface , so that they protrude from the root and may seen as globular whitish bodies with yellowish or brownish egg masses attached.

Symptoms on infected plants in field include foliar clorosis, leaf drop, general decline, reduced growth and often the plant death.

*Meloidogyne coffeicola* causes similar symptoms on coffee plants and roots. The female is easily found in older tissues especially on the taproot. Attempts at artificial inoculation on coffee seedlings have failed. *M. coffeicola* seems to have a low capacity to infest coffee seedlings and young trees (Campos, 1990). This species is now only occasionally found in very old plantations.

## **Identification**

In practice, identification of the most common and the most important species on coffee in Brazil is made using perineal patterns, esterase phenotypes and differential host test (Carneiro *et al.* 1996; 2000). For the populations that presented atypical esterase phenotypes and atypical perineal patterns, other mophological and morphometric features of females, males and second-stage juveniles must be analysed.

### *Morphological characterization*

#### Female

Although variability of the pattern occurs within species and population, basic characteristics do not change significantly. For some species the perineal patterns can be a good feature (*M. javanica*, *M. arabicida*, *M. coffeicola*); for others like *M. incognita* ,*M. paranaensis* and *M. konaensis* this procedure is not recommended. Using this procedure *M. paranaensis* has been incorrectly identified as *M. incognita* for 22 years (Carneiro *et al.* 1996).

The stylet (10-24  $\mu$  m ) and shape of cone, shaft and knobs, and the shape of the knobs and type of junction with the shaft are the most important diagnostic features. The DEGO (dorsal esophageal gland orifice) distance has a broad range among the species ( 2-10  $\mu$ m) and seems variable within species and populations.

#### Male

The male head, composed of head cap and head region, provides many good diagnostic features. The size, height, shape and slope of head cap; the shape and proportion of labial disc and lips; the expression of labial and cephalic sensilla; and the presence or absence of annulations in the head region can be used to distinguish species and populations. The male stylet length has a broad range within the genus (13-30  $\mu$ m), with a low coefficient of variability (CV=4%), which makes it a good differentiating character. Size and shape of stylet cone, shaft and knobs are also excellent supporting characters for species

identification. The cephalic region and the shape of stylet are good features to differentiate *M. incognita*, *M. exigua*, *M. paranaensis* and *M. konaensis*. DEGO (2-13  $\mu\text{m}$ ) character exhibits much variation, although some species can be distinguished on the basis of DEGO distance. The hemizonid is usually located anterior to the excretory pore, and can be taxonomically helpful only in a few species in which it is located posterior to the excretory pore (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

### Second-stage juveniles (J2)

Due to the small size of the J2, it is difficult to discern the head morphology precisely. Second-stage juveniles have the same basic head characters as males. Stylet length shows generally low variability and maybe a useful supplemental character in certain exotic species. The DEGO distance 2-8  $\mu\text{m}$  seems to be a good differentiating feature and groups of species can be distinguished by this measurement. Tail length varies considerably among the species from 15 to 100  $\mu\text{m}$ . Juveniles have been grouped according to tail length and tail shape (Jepson, 1984). The tail shape is a good feature to differentiate *M. incognita*, *M. africana* and *M. megadora* from coffee. Some species are clearly distinct from each other in overall range of tail length (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

### *Biochemical and Molecular Characterization*

Using the esterase phenotypes (EST) it was possible to differentiate the most important species on coffee in Brazil. The phenotype I1 (Rm 1.0) and I2 (Rm 1.0, 1.1) were detected in *M. incognita* populations on coffee. The *M. incognita* races 2 and 3 had the phenotype I1 and races 1 and 4 the phenotype I2. This variation could be associated with intraspecific variability. Unfortunately, it was not possible to differentiate race 2 and race 3 using esterase phenotypes. The technique of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) was used to estimate the genetic polymorphism and relationships among 18 isolates of the root-knot nematode on Brazil (Randig *et al.*, 2000). Using the primer CO9 it was possible to differentiate the same two groups of *M. incognita*: races 1 and 4 from races 2 and 3. The phenotype P1 (Rm 1.4) was detected in populations of *M. paranaensis* isolated from coffee in Paraná State. This phenotype is the most useful characteristic to differentiate this species from *M. incognita* in coffee plantation surveys in Brazil (Carneiro *et al.*, 1996).

The phenotype K3 (Rm 1.1, 1.3, 1.4) was found in one population of *M. konaensis* isolated from coffee on the island of Hawaii, USA. One esterase band (Rm: 1.4) was similar to the P1 (F1) phenotype detected in *M. paranaensis* populations from Brazil. The esterase activity of the two bands (Rm 1.1, 1.3) was low and only by using more than two females is it possible to see the K3 EST-phenotype clearly. The original population of *M. konaensis* sent from Hawaii was mixed with *M. incognita* (EST-phenotype I2). These populations were purified prior to conducting this study on isozyme characterization. The phenotypes P1 and K3 were species-specific for *M. paranaensis* and *M. konaensis*, respectively (Carneiro *et al.*, 2000).

The phenotypes E1 (Rm 1.6) were detected on six populations of *M. exigua* isolated from coffee and rubber trees from São Paulo and Mato Grosso do Sul States, using a large number

(>10) of macerated females (Carneiro *et al.*, 1996a). It was possible to differentiate *M. exigua* in two phenotypes through the two minor bands (Rm 1.1 and 1.9) and through the ability of populations to reproduce on tomato (Carneiro *et al.*, 2000). The intraspecific variability was confirmed using the RAPD analysis, primer KO7 (Randig *et al.*, 2000). The phenotype C2 (Rm 0.5, 1.7) with high enzymatic activity was detected in one population of *M. coffeicola* isolated from coffee from Pirajú, São Paulo State (Carneiro *et al.*, 2000).

### Differential Hosts

The North Carolina Differential Host Test permitted the characterization of species and races from Brazilian populations from coffee. These results are presented in Table 1. Using this technique it was possible to differentiate *M. incognita* races 1, 2 and 3, *M. paranaensis*, *M. exigua* race 1, 2 and *M. coffeicola*.

**Table 1.** Usual response of the four common *Meloidogyne* species from coffee and their races to the North Carolina Differential Host Test.

Species and Races (R)	Differential Host Plants *					
	Cotton	Tobacco	Pepper	Water-melon	Peanut	Tomato
<i>M. incognita</i> R.1	-	-	+	+	-	+
<i>M. incognita</i> R.2	-	+	+	+	-	+
<i>M. incognita</i> R.3	+	-	+	+	-	+
<i>M. paranaensis</i>	-	+	-	+	-	+
<i>M. exigua</i> R.1	-	-	+	-	-	-
<i>M. exigua</i> R.2			+	-	-	+
<i>M. coffeicola</i>	-	-	-	-	-	-

\*Cotton, Deltapine 61; tobacco, NC95; pepper, Early California Wonder; watermelon, Charleston Gray; peanut, Florunner; tomato, Rutgers; (-) indicates a non host, (+) a host

### References

- Campos, V.P., Sivapalan, P & Gnanapragasam, N.C. (1990). Nematode parasites of coffee, cocoa, and tea. In M. Luc, R. A. Sikora, and J. Bridge, eds. Plant-parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. London: Cab International. pp. 113-126.
- Carneiro, R.M.D., Almeida, A.R.A. & Carneiro, R.G. (1996a). Enzyme phenotypes of Brazilian isolates of *Meloidogyne* spp. *Fundamental and applied Nematology* 19, 555-560.
- Carneiro, R.M.D.G., Carneiro, R.G., Abrantes, I.M.O., Santos, M.S.N. & Almeida, M.R.A. (1996b). *Meloidogyne paranaensis* n.sp. (Nemata: Meloidogynidae) a root-knot nematode parasitizing coffee from Brazil. *Journal of Nematology* 28, 177 - 189.
- Carneiro, R.M.D.G., Almeida, M. R. A. & Quénéhervé, P. (2000). Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology* (in press).

- Eisenback, J.D. (1985). Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp). In: Sasser, J.N. & Carter, C.C. (Eds). An advanced treatise on *Meloidogyne*. Vol. 1 Biology and Control. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, pp.95-112.
- Esbenshade, P.R. & Triantaphyllou, A.C. (1985). Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida). *Journal of Nematology* 17, 6-20.
- Esbenshade, P.R. & Triantaphyllou, A.C. (1990). Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 22, 10-15.
- Hartman, R.M. & Sasser, J.N. (1985). Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: Barker, K.R., Carter, C.C. & Sasser, J.N. (Eds). *An advanced treatise on Meloidogyne. Vol. 2. Methodology*. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, pp. 69-77.
- Hirschmann (1985). The genus *Meloidogyne* and morphological characters differentiating its species. In: Sasser, J.N. & Carter, C.C. (Eds). An advanced treatise on *Meloidogyne*. Vol. 1 Biology and Control. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, pp.79-93.
- Hartman, R.M. & Sasser, J.N. (1985). Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: Barker, K.R., Carter, C.C. & Sasser, J.N. (Eds). *An advanced treatise on Meloidogyne. Vol. 2. Methodology*. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, pp. 69-77.
- Hyman, B.C. (1996). Molecular systematics and population biology of phytonematodes: some unifying principles. *Fundamental and applied Nematology* 19, 309-313.
- Randig, O., Leroy, F., Bongiovanni, M., Carneiro, R.G. 2000. Genetic polymorphism and relationships of *Meloidogyne* spp. from Brazil. European Society of Nematologists: 25 th International Symposium on Nematology. Herzliya, Israel, pp.38 (abstract).
- Triantaphyllou, A. C. 1985. Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. In: Sasser, J.N. & Carter, C.C. (Eds). An advanced treatise on *Meloidogyne*. Vol. 1 Biology and Control. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, pp.113-126.



## NEMATÓIDES PARASITOS (*Meloidogyne* spp.) DO CAFEIEIRO: MANEJO GENÉTICO E QUÍMICO NO BRASIL

**Gonçalves W.\*, Silvarolla M.B., Guerreiro-Filho O.\*,  
Fazuoli L.C.\* & Medina-Filho H.P.\***

Instituto Agronômico de Campinas – Centro de Café e Plantas Tropicais – CP 28 – CEP 13001-970 – Campinas, SP – Brasil. \* Bolsistas do CNPq

---

### **Introdução**

Em termos gerais, a importância dos fitonematóides na produção brasileira de café é bastante variável e depende da espécie de café cultivada, das condições edafoclimáticas das regiões, das práticas culturais adotadas e dos nematóides presentes no solo.

Os nematóides associados à raízes do cafeeiro no Brasil compreendem 38 espécies em 31 gêneros (Campos, 1997), embora até o presente os danos causados por grande parte destas espécies ainda não estejam comprovados. Estima-se que a redução da produção brasileira de café devido à ação dos nematóides seja de 20%. Desse total, as espécies de *Meloidogyne* são responsáveis por 15% (Lordello, 1976). Das 14 espécies deste gênero que parasitam o cafeeiro nas diversas regiões produtoras de café do mundo, sete ocorrem no Brasil (Santos, 1997). Dentre essas, *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* são as que vêm causando os mais sérios danos.

O controle de fitonematóides é, de modo geral, operação difícil de ser realizada. Deve-se ter em mente que, estando uma área contaminada por eles, a sua erradicação é praticamente impossível. Entretanto, esses parasitos podem, muitas vezes, ter suas populações reduzidas e mantidas em níveis baixos através de integração de medidas de controle, ou seja, através do manejo integrado.

A adoção e o êxito de qualquer estratégia de manejo dependerão essencialmente, do conhecimento do número de espécies ou raças de nematóides presentes na gleba ou cafezal, em que se deseja realizar o manejo desses parasitos, assim como de uma análise crítica da sua aplicabilidade, em função do nível tecnológico e econômico do cafeicultor e das condições de condução das lavouras. No entanto, algumas estratégias de manejo de fitonematóides não vêm apresentando, na cultura cafeeira, a mesma eficiência alcançada em outros cultivos. Provavelmente, por tratar-se de uma cultura perene, na qual os cafeeiros propiciam condições para o aumento populacional dos nematóides durante quase o ano todo, além da hipersensibilidade do cafeeiro arábico a certas espécies de nematóides (*M. incognita* e *M. paranaensis*).

## Manejo genético

No Brasil, diversas instituições de pesquisas desenvolvem trabalhos com essa estratégia de manejo na cultura cafeeira, podendo citar além do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), o Instituto Agronômico do Paraná(IAPAR), a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais(EPAMIG) e outras. As etapas do programa de seleção do cafeeiro visando resistência a nematóides do gênero *Meloidogyne*, em execução no Centro de Café do IAC serem abordadas, a seguir:

### 1. Escolha da espécie(s) chave(s)

As espécies *M. incognita*, *M. paranaensis* e *M. exigua* são as que têm recebido ênfase em nossa seleção de fontes de resistência. Após a identificação das espécies (diagnoses morfológica e bioquímica) nos inóculos iniciais, coletados em cafezais infestados por estes nematóides, esses parasitos são mantidos isoladamente em culturas, servindo como fonte de inóculo, para testes de resistência, em condições de casa de vegetação.

Uma vez que a resistência a nematóides do gênero *Meloidogyne* pode ser específica a raças ou espécies (Roberts et al., 1998), o reconhecimento das quatro raças de *M. incognita* que ocorrem em cafeeiros (Carneiro et al., 1990) tem sido realizado através do teste de hospedeiros diferenciais (Taylor e Sasser, 1978). A complexidade da interação entre cafeeiros x *Meloidogyne* pode ser observada no Quadro 1.

**Quadro 1.** Reação de cafeeiros em relação à espécies de *Meloidogyne* (Gonçalves et al., 1998).

Cafeeiros	Mi				Mp	Me
	1	2	3	4		
Konillon	S	S	S	S	S	R
C 2291	S	R	S	S	R	R
C 67-5	R	R	R	R	R	R

(1) Plantas específicas de *C. canephora*; (2) Mi = raças de *M. incognita*;

(3) Mp = *M. paranaensis*; (4) Me = *M. exigua*

### 2. Métodos de avaliação dos níveis de resistência

A disponibilidade de técnicas para diferenciar plantas resistentes das suscetíveis é tão fundamental quanto a disponibilidade de fontes de resistência. A metodologia usada para isto é bastante variável e em nosso programa, a avaliação tem sido realizada através da combinação de métodos de casa de vegetação e de campo.

A seleção em casa de vegetação além de propiciar um melhor controle no nível de inóculo, permite avaliação da resistência num curto espaço de tempo e no início de desenvolvimento das plantas, o que traz inúmeras vantagens, sendo que as avaliações em condições de

campo são reservadas para seleções que já tenham sido testadas para resistência em casa de vegetação.

Para uma completa avaliação do comportamento do cafeeiro em relação a *Meloidogyne*, dois parâmetros têm sido considerados. O primeiro é a eficiência hospedeira, ou seja, a capacidade da planta em reproduzir ou não o nematóide, geralmente expressa qualitativamente pelo índice de galhas ou massas de ovos (em avaliações iniciais) ou quantitativamente pelo número total de ovos e larvas por sistema radicular. O fator de reprodução (FR), que é o quociente entre a população final (Pf) e a população inicial (Pi) do parasito é outro parâmetro utilizado para avaliar a reprodução do nematóide. Através da correlação entre a eficiência hospedeira com alguns parâmetros de desenvolvimento (altura, peso da matéria seca da parte aérea, etc) de cafeeiros inoculados e não inoculados com os nematóides, determina-se a severidade da doença no genótipo testado (Quadro 2).

**Quadro 2.** Aspectos parasitológicos e fitopatológicos da interação cafeeiros x *Meloidogyne*.

Conceituação Parasitológica Reprodução do nematóide	Conceituação Fitopatológica Parâmetro de desenvolvimento do cafeeiro*	
	Significativo	Não significativo
Fator de reprodução 1	Hipersensível	Resistente
Fator de reprodução 1	Suscetível	Tolerante

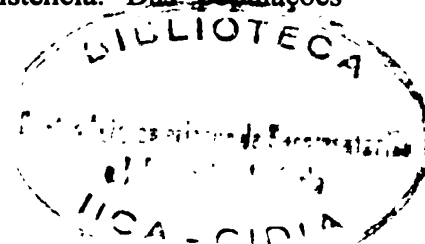
(\*) Diferenças estatísticas entre os parâmetros de desenvolvimento de cafeeiros inoculados e não inoculados com nematóides

### 3. Fontes de resistência

Até o momento não foram encontrados cultivares promissores de *C. arabica* resistentes a nematóides do gênero *Meloidogyne*. Quando detectados, como é o caso de alguns cafeeiros introduzidos da Etiópia, eles apresentam produções bem inferiores às dos cultivares Mundo Novo, Catuai e outros e pouca adaptação às condições brasileiras.

Ao contrário do que se verifica em *C. arabica*, fontes de resistência a nematóides estão presentes em outras espécies de café. As espécies *C. canephora*, *C. congensis* e *C. dewevrei* apresentam maior interesse. Isto ocorre, porque a resistência aos nematóides está aliada a um sistema radicular mais desenvolvido nessas espécies e porque as mesmas apresentam também resistência a outros patógenos.

Diversos autores tem reportado resistência de *C. canephora*, *C. congensis*, *C. dewevrei*, *C. liberica*, *C. racemosa* e *C. salvatrix* a *M. exigua*. Com relação à *M. incognita* e *M. paranaensis*, trabalhos conduzidos em campo e ou em casa de vegetação, sobre a reação de cafeeiros a esses parasitos, revelaram plantas resistentes pertencentes a *C. canephora* e *C. congensis*, porém a grande maioria segregando para a resistência. Das populações



segregantes, foram selecionados cafeeiros resistentes, sendo que alguns deles apresentam resistência simultânea às raças de *M. incognita* e a *M. paranaensis* (Carneiro e Alteia, 1992).

As combinações de *C. arabica* com *C. canephora*, como Icatu e outras apresentam também plantas resistentes a *Meloidogyne*, porém segregantes para essa característica, sendo que algumas plantas de Híbrido do Timor, Catimor e Icatu são homozigotas para a resistência a *M. exigua* (Gonçalves e Pereira, 1998; Silvarolla et al., 1998).

#### 4. Aproveitamento das fontes de resistência

A utilização das fontes de resistência a curto prazo consiste na enxertia hipocotiledonar, que usa como porta-enxertos cultivares resistentes aos nematóides. Foi desenvolvido o cultivar IAC - Apatã de *C. canephora* que é resistente a *M. exigua* e a algumas populações de *M. incognita*. Esses cafeeiros são resistentes aos nematóides, sem contudo serem imunes a eles. Nos Quadros 3, 4 e 5 pode-se observar os resultados da utilização dos porta-enxertos resistentes.

**Quadro 3.** Produção média de cafeeiros Mundo Novo enxertados sobre *C. canephora* cv Robusta e de cafeeiros não enxertados, no período de 1975 a 1978, em solo infestado com *M. exigua* (IAC, 1980).

Tratamentos	sacas/ha/ano	Índice
Mundo Novo/ Guarini	32,1	135,5
Mundo Novo	25,7	100,0

(\*) Sacas de 60 kg de café beneficiado

**Quadro 4.** Número de nematóides em 5g de raízes, porcentagem de plantas suscetíveis e produção média, no período de 1986 a 1990, de cafeeiros Mundo Novo enxertados em *C. canephora* cv Robusta e de pé franco, em área infestada por *M. incognita* raça 1 (adaptado de Costa et al., 1991).

Tratamentos	Nematóides		Plantas suscetíveis	sacas/ha/ano*
	N	%	%	
<u>Enxertados</u>				
M. Novo / C 1648-6M	1233 a	23	27	26,0
M Novo / C 1650-6M	848 a	16	26	25,6
M.Novo / C 1655-7M	803 a	15	17	26,8
Média	961	18	23	26,1
<u>Sem enxertia</u>				
Mundo Novo	5313 b	100	100	5,7

(\*) Sacas de 60 kg de café beneficiado

**Quadro 5.** Teores médios de cafeína(% do peso fresco em grãos) de amostras de café provenientes de cafeeiros enxertados em *C. canephora* cv Robusta e em cafeeiros de pé franco (Mello et al., 1976).

Cafeeiros	%
Mundo Novo	1,17
Mundo Novo / Robusta	1,18
Laurina	0,60
Laurina / Robusta	0,59
Robusta	2,12
Robusta / Laurina	2,07

A médio e longo prazo, as fontes de resistência estão sendo aproveitadas através de hibridações interespecíficas, com retrocruzamentos sucessivos para *C. arabica* e, posteriormente a utilização do método genealógico, sendo realizadas seleções para a resistência e outros caracteres agronômicos, em cada geração.

### 5. Tipo de resistência

A resistência do cultivar IAC-Apoatã a *M. incognita* parece estar mais relacionada a algum impedimento biológico durante o ciclo do nematóide do que à penetração propriamente dita (Lima et al., 1989) e não pode ser atribuída a compostos fenólicos (Mazzafera et al., 1989).

O fator que determina a resistência a *M. exigua* é de natureza dominante, podendo estar envolvido apenas um fator genético (Fazuoli et al., 1974).

### **Manejo químico**

O manejo químico dos fitonematóides em cafezais infestados tem sido realizado quase que exclusivamente com nematicidas sistêmicos granulados fosforados e carbamatos, que atuam diminuindo o nível populacional desses parasitos por um período de 2 a 4 meses. Esses produtos também controlam algumas pragas do cafeeiro, como o bicho mineiro (*Perileucoptera coffeella*), cigarras (*Quesada sp*) e outras.

Os nematicidas mais comumente utilizados na cafeicultura são aldicarb, carbofuran, terbufos e outros e que são aplicados uma ou duas vezes por ano, no período de outubro a fevereiro.

O uso de nematicidas não tem-se mostrado eficiente no manejo de *M. incognita* em cafeeiros novos implantados em áreas infestadas pelo nematóide e mesmo na recuperação de cafeeiros infestados e recepados.

Os nematicidas têm propiciado um aumento considerável na produtividade de cafezais decadentes e infestados por *M. incognita* e *M. paranaensis*, em relação aos infestados e não tratados. No entanto, os níveis de produtividade alcançados pelos cafeeiros tratados,

geralmente são bem inferiores aos de cafeeiros cultivados em solos sem a presença de fitonematóides. Essa menor produtividade dos cafeeiros infestados e tratados com nematicidas, provavelmente se deva à patogenicidade destas espécies de nematóides ao cafeeiro arábico, que reduz grande parte de seu sistema radicular, evitando que o cultivar apresente todo o seu potencial produtivo.

O uso de nematicidas, como de qualquer outra medida de manejo de fitonematóides, dependerá, por parte do cafeicultor, de uma análise econômica da relação custo/benefício das medidas de manejo adotadas.

### **Considerações finais**

A seleção de cafeeiros resistentes a nematóides do gênero *Meloidogyne* poderá ser uma importante tática de manejo desses parasitos na cultura cafeeira, notadamente em áreas de renovação da cultura. Para maximizar a eficiência dessa tecnologia, a mesma deverá ser integrada a outras táticas de manejo de nematóides que visam a redução das populações desses parasitos no solo. Além disto, a sua utilização em conjunto com outras tecnologias de produção, como a recuperação física, química e biológica dos solos, manejo de pragas e doenças e outras são fundamentais para a sustentabilidade econômica, social e ambiental da cafeicultura.

# SITUACIÓN DE LOS NEMATODOS DEL CAFETO EN GUATEMALA

Anzueto F., Molina A., Figueroa P., Martínez A.

ANACAFE, Guatemala

---

Palabras claves: nematodos, café, Guatemala, injerto, resistencia.

## Introducción

Los nemátodos provocan importantes pérdidas económicas en regiones cafetaleras de diferentes países, en varios casos se asocian con hongos del suelo, ocasionando un complejo patogénico conocido como "corchosis" de la raíz, reportada en Costa Rica (5), Nicaragua y México (9), donde se indican pérdidas de hasta 40 por ciento. En Guatemala, sobre la costa del Pacífico, se registran bajas de rendimiento cercanas al 50 por ciento, en las áreas afectadas por nemátodos (1).

En general, el problema de nemátodos parece ser más evidente luego de la renovación de las antiguas plantaciones, o modernización de la caficultura. En estos períodos se producen y comercializan fuertes cantidades de vivero, considerándose que el principal medio de dispersión nemátodos sería el transporte de plantas de vivero infestadas de una región a otra. En relación a factores agroclimáticos, en las zonas con problemas de nemátodos predominan los suelos franco arenosos y arenosos, lluvias de 2,500 a 4,000 milímetros anuales y altitudes muy variadas, comprendidas entre los 600 y 1,600 metros sobre el nivel del mar (1).

Los dos principales géneros o grupos de nemátodos parásitos del café presentes en Guatemala y Centroamérica son: los nemátodos "lesionadores" (Pratylenchus) y, los nemátodos "agalladores" (Meloidogyne). En Guatemala los cafetos afectados con Meloidogyne, también presentan síntomas de "corchosis" en las raíces, similares a los descritos en los otros países.

## Métodos de control

### *Áreas infestadas con Pratylenchus y Meloidogynes de "baja" agresividad*

En el caso de plantaciones nuevas (1 a 2 años), establecidas con plantas no injertadas, deben considerarse solamente las áreas con potencial productivo y buen manejo agronómico. Bajo estas condiciones, el uso de nematicida podría tener respuesta económica, la recomendación general es aplicar 1 gramo de ingrediente activo por planta. En cafetales adultos sin injerto debe evaluarse su rentabilidad, la utilización de nematicidas no es recomendable. En condiciones de baja productividad se aconseja la renovación, utilizando plantas injertadas.

### *Áreas infestadas con Meloidogyne "agresivos" (M. incognita y especies afines)*

En campo los daños más intensos son provocados por este tipo de nemátodos, en estos casos el control químico es poco efectivo y antieconómico. Estos lotes deben ser renovados con plantas injertadas. Debe considerarse la información de varios estudios que demuestran una respuesta variable de los Robustas frente a estos nemátodos y la necesidad de una selección estricta entre Robustas. Esto derivó un programa de selección de la variedad porta-injertos "Nemaya", que se amplía adelante (3).

### **La injertación como base del manejo integrado de los nemátodos**

Trabajos realizados en Guatemala en los años 60, mostraron la tolerancia y/o resistencia del Robusta a los nemátodos, propiciando el desarrollo del método "Reyna" de injertación. Esta técnica se realiza a escala comercial y ha demostrado a nivel práctico, una buena respuesta para el control de la plaga. Circunstancialmente, el nemátodo más distribuido en Guatemala es Pratylenchus, y las investigaciones indican que en general, los Robustas presentan un buen grado de tolerancia/resistencia a este nemátodo, lo cual explica los resultados satisfactorios obtenidos en el campo, a pesar de utilizar Robustas sin selección.

### **Selección en Robusta**

Los primeros trabajos de PROMECAFE conducidos en Costa Rica indicaron que casi todos los Robustas eran resistentes a las poblaciones locales de Meloidogyne spp (8). Por el contrario, investigaciones realizadas con una población de Meloidogyne de Guatemala, mostraron altos porcentajes de plantas susceptibles, entre 50 y 80%, en la mayoría de los Robustas evaluados (2).

En presencia de especies de Meloidogyne agresivas, la utilización de una variedad porta-injertos con elevado nivel de resistencia, se plantea como la mejor alternativa para su control. Por la importancia de este problema, PROMECAFE-CIRAD, iniciaron en 1990 una serie de trabajos orientados a la selección de Robustas (3). A partir de los dos clones de Robusta seleccionados en dicho proyecto, actualmente se establecen campos de producción de semilla, que será utilizada como porta-injertos dentro de los programas convencionales de injertación.

### **Programa de injertación en fincas cafetaleras**

En el cuadro 1 se presentan los datos de vivero asesorado en fincas y pequeños productores por ANACAFE, durante el ciclo 98/99. Dentro de las regiones se observan grandes diferencias en los porcentajes de vivero injertado y sin injerto, mismas que están asociadas a la problemática de los nematodos en el país.

Las regiones Suroccidente y Sur son las más afectadas por los problemas de nematodos, y en consecuencia son los sitios donde la práctica de injertación es más intensiva. Los datos de vivero injertado son de 94 y 83% respectivamente. La región central presenta una situación

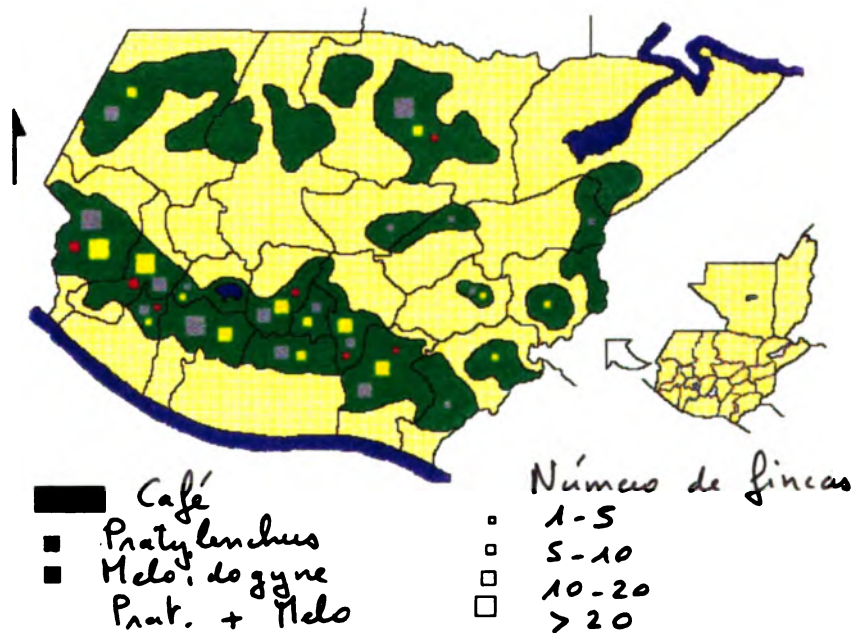


intermedia, aunque a nivel de algunas sub-regiones el injerto también es mayoritariamente practicado.

En las regiones de Noroccidente y Nororiente se trabaja actualmente con vivero sin injerto, debido a que los problemas con nematodos son mínimos o inexistentes.

**Cuadro 1.** Relación de vivero injertado en Guatemala. ANACAFE, Ciclo 98-99.

REGIÓN	Vivero Injertado	Vivero Sin Injerto	Vivero Total
Sur-Occidente	2,563,000 = 94%	176,000 = 6%	2,739,000
Sur	1,427,000 = 83%	289,000 = 17%	1,716,000
Central	785,415 = 46%	910,525 = 54%	1,695,940
Sur-Oriente	187,000 = 24%	587,200 = 76%	774,200
Nor-Occidente	31,000 = 2%	1,720,000 = 98%	1,751,000
Nor-Oriente	0 = 0%	1,909,000 = 100%	1,909,000
TOTALES	4,993,415 = 47%	5,591,725 = 53%	10,585,140



**Figura 1.** Mapa de distribución de los nematodos en Guatemala.

A nivel nacional el porcentaje de vivero injertado representa un 47%, contra 53% de vivero no injertado. Visto como un promedio notamos que casi la mitad del vivero es injertado en Guatemala, pero en realidad observamos que en las regiones con problemas de nematodos es una práctica común, con una clara tendencia a generalizarse. Las otras regiones la han adoptado de acuerdo a la evolución del daño provocado por estos parásitos.

Es muy probable que a nivel de la región Centroamericana, se presente en el futuro un proceso similar, tomando en cuenta que la utilización de un porta-injerto resistente pueda ser la base de un manejo integrado de nematodos. Esta práctica responde a una necesidad en el campo, y el productor está convencido de su valor, atendiendo la orientación del asesor técnico.

### **Discusión**

Entendiendo que esta nota fue orientada a discutir la situación de los nematodos en Guatemala, donde el enfoque de control se basa en la injertación de Arábicas sobre porta-injertos de Robusta, no pueden obviarse algunas reflexiones que vinculan las posibilidades de utilizar la resistencia a *Meloidogyne* spp observada en *C. arabica* (2,4, 5,6), tema central del proyecto INCO (7).

En el caso de Guatemala predomina el nematodo *Pratylenchus* spp, frente al cual no existen fuentes de resistencia identificadas dentro de *C. arabica* (2), lo cual limita las posibilidades de utilizar la resistencia referida para algunas especies de *Meloidogyne* (6), situación que aún debe ser estudiada más profundamente, considerando la amplia variabilidad intra e interespecífica de este género (6).

Los programas de selección de germoplasma resistente a nematodos deben considerar la posibilidad, o realidad evidente, de presencia simultánea de poblaciones de *Pratylenchus* spp y *Meloidogyne* spp en plantaciones, y también la gran variabilidad a nivel de género ya referida. En este tema deberán integrarse grandes esfuerzos entre nematólogos, mejoradores y biólogos moleculares, buscando soluciones y respuestas para una caficultura Centroamericana que se esfuerza en mantener un perfil de sostenibilidad.

### **Referencias bibliográficas**

1. ALVARADO, J. 1997. Diagnóstico sobre el parasitismo de los nemátodos y cochinillas de la raíz en la zona cafetalera del suroccidente de Guatemala. Tesis Lic. En Ciencias Agrícolas. Centro Universitario de Occidente, Universidad de San Carlos, Quetzaltenando, Guatemala. 60 p.
2. ANZUETO, F. 1993. Etude de la resistance du cafeier (*Coffea* spp.) a *Meloidogyne* spp et *Pratylenchus* sp. These docteur Ecole Nationale Superieur de Rennes, France. 123 p.
3. ANZUETO, F., BERTRAND, B., DUFOUR, M. 1995. "NEMAYA", Desarrollo de una variedad porta-injertos resistente a los principales nemátodos de América Central. Boletín 66 - 67, PROMECAFE-IICA, Guatemala. Pp 13-15.

4. BERTRAND B., ETIENNE H., SANTACREO R., ANZUETO F., ANTHONY F. 1999. El Mejoramiento genético en Centroamérica. In: Proceedings III International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agroindustry, Riede, Sera, Soccol and Roussos Eds., IAPAR/IRD, 24-28 may, Londrina, Brasil. 231-243.
5. CALDERÓN-VEGA. M. 1989. Reacción de diferentes genotipos de café a Meloidogyne arabicida López y Salazar (1989), gama de hospedantes y hongos fitopatógenos asociados. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, UCR/CATIE. 62 p.
6. HERNÁNDEZ, A. 1997. Étude de la variabilité intra et interspécifique des nématodes du genre Meloidogyne parasites des caféiers en Amérique Centrale. These doctorale Université de Montpellier II, Sciences et Gechniques du Languedoc, Montpellier, France. 102 p.
7. INCO. 1999. "Sustainable improvement of nematode resistanse in coffee cultivars (Coffea arabica L.) of Central America: Enhanced used of genetic resources by the development of marker-facilitated selection programes". 2o Informe Anual de Actividades en América Central (CATIE & PROMECAFE), octubre 1998 – Setiembre 1999, Costa Rica, CATIE. 21p
8. MORERA, G. 1986. Evaluación de la interacción entre genotipos de Meloidogyne exigua Goeldi (1887) y Coffea spp. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, UCR/CATIE. 59 p.
9. VARGAS, H.E. 1992. Determinación y cuantificación de los nemátodos asociados a las raíces del cafeto (Coffea arabica L.) en la cabecera Municipal de Tlaltetela, Ver., México. Tesis Lic. Biología. Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver. México. 48 p.

## GENETICS OF COFFEE RESISTANCE TO NEMATODE *Meloidogyne paranaensis*

**Tumoru Sera<sup>1</sup>, João Siqueira da Mata<sup>2</sup>, Rubens Saccheto Sanches<sup>2</sup>,  
José Alves de Azevedo<sup>1</sup>, Marcos Rafael Petek<sup>2</sup>, Marcos Zorzenom Alteia<sup>2</sup>,  
Sérgio Fadelli<sup>3</sup> & Larissa Abgariani Colombo<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Agronomic Inst. of Paraná (IAPAR), C.P. 481, 86001-970 Londrina, Paraná, Brazil.

<sup>2</sup> FUNAPE / Embrapa, Goiânia, Goiás, Brazil. <sup>3</sup> Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

---

**Key words:** Coffee breeding, coffee crop, nematode resistance, *Meloidogyne* resistance, *Meloidogyne paranaensis*

### Introduction

Among agronomic factors, the root knot nematodes *Meloidogyne incognita* is one of the worst constraints of the coffee crop in Paraná State (Brazil) (Carneiro & Carneiro, 1982 and Carneiro et al., 1990). The main races that occur are 1, 2, 3, 4, and 5, being more frequent the races 5, 2 and 1 (Carneiro et al, 1992). Carneiro et al (1996) described the race 5 of *M. incognita* as being *M. paranaensis* due to its high occurrence in Paraná. This parasite can reduce the productivity at uneconomical levels in the first production, in conditions of high population, both in sandy and loamy soils for highly susceptible cultivars as Mundo Novo, Catuaí and IAPAR-59.

One of the main sources of genetic resistance, are the materials of *C. canephora* (Fazuoli et al., 1987; Lima et al., 1987; Gonçalves et al., 1988), or materials of *C. arabica* that have the genes of *C. canephora* as "Icatu" and "Catuaí x Icatu".

In spite of the control techniques accomplished with several methods relative to *M. incognita* and *M. paranaensis*, most of them present low efficiency. Therefore, it is extremely appropriate to obtain resistant cultivars to those parasites, because it is effective, economic and ecologically correct. The objective of this work is to obtain resistant or partially resistant cultivars of *C. arabica* to *M. paranaensis*.

### Material and methods

Selected progenies were originated from field with high populations of *M. paranaensis*. These selections were promising plants considering the size of the fruit, architecture, productivity, more uniform maturation, quality and resistance or tolerance to other parasites. The seeds were placed in germinator of sand and in the cotyledonar seedling stage were transplanted to 500 liters boxes containing a mixture of loamy, sandy soil and organic matter in the proportion of 3:3:1 and covered with jute tissues. The experiment was installed at greenhouse, in randomized blocks design, with 70 progenies and 3 replications,

each plot constituted by 30 plants. The evaluated progenies belong to four families; being 23 of the IAPARLG-93500, 24 of the IAPARLG-93164, 19 of the IAPARLG-93179 and 3 of the IAPRLG-93167.

The inoculus was obtained from weeds and coffee roots with *M. paranaensis*, through the method proposed by Taylor & Sasser (1978). It was accomplished three inoculations, distributing similar concentration of suspension of eggs around the plants. When the seedlings were with six pair of leaves, the roots of plants were submitted to nematologic evaluation of knots and egg masses of nematodes for initial screens (Fazuoli et al., 1983) after colored by floxin B corant, for better visualization of egg masses.

Comparison of means was made with the Duncan test at 5%, facilitate the grouping of the plants according to parasitism levels.

For each replication the distribution of susceptible and resistant plants was compared with the susceptible and resistant pattern, to classify the progenies as susceptible and resistant homozygous or heterozygous.

### **Results and discussion**

The analysis of variance showed significance at the level of 1% and sufficient experimental precision to indicate, by Duncan test at 5%, 29 superior progenies that showed significantly lower levels of parasitism compared to the susceptible progeny (Table 1).

**Table 1.** Comparison among averages parasitism of *Meloidogyne paranaensis* and genotypic characterization of 29 selected arabic coffee progenies.

Progenie	Levels of parasitism <sup>(1)</sup>	Duncan test (5%)	Presumed genotype	V	F	FR	MA	CH%	CER	COR
93500-3-19	0,47	a	RR	9	5	4	3	2	0	A
93500-3-21	0,49	a	RR	9	4	4	3	2	0	A
93179-4-38	0,53	ab	RR	9	5	3	3	26	1	A
93500-1-15	0,57	abc	RS	9	5	3	3	2	0	A
93500-3-6	0,64	bcd	RR	9	5	3	3	0	0	A
93500-3-1	0,65	bcd	RR	9	5	4	3	8	0	A
93500-2-11	0,69	cd	RS	9	5	4	3	2	0	A
93164-2-27	0,71	de	RS	8	5	3	3	0	2	VA
93179-3-26	0,72	def	RR	9	5	3	3	20	2	VA
93164-3-40	0,73	defg	RS	8	5	3	2	14	1	VA
93179-4-12	0,75	defgh	RR	9	4	3	3	2	2	VA
93500-2-7	0,75	defgh	RS	9	5	4	2	8	0	A
93500-3-26	0,77	defghi	RS	9	5	4	3	0	0	A
93500-3-15	0,77	defghi	RS	9	5	4	3	8	0	A
93500-1-10	0,78	defghij	RS	9	5	4	4	8	0	A
93164-3-44	0,79	defghijk	RS	9	4	4	3	2	1	VA
93179-2-1	0,84	efghijkl	RS	9	5	4	4	6	2	V
93164-4-32	0,85	efghijklm	RS	9	5	3	2	8	2	VA
93164-4-19	0,86	efghijklmn	RS	8	5	4	3	6	2	V
93179-4-42	0,86	efghijklmn	RS	9	5	3	3	12	2	V
93500-2-16	0,86	efghijklmn	RS	8	4	4	3	8	0	A
93500-2-21	0,87	efghijklmn	RS	9	5	4	3	20	0	A
93179-4-39	0,88	fghijklmno	RS	8	5	3	3	8	2	A
93500-3-23	0,90	ghijklmnop	RS	10	2	2	3	16	0	VA
93164-4-24	0,90	hijklmnopq	RS	9	5	3	2	6	2	VA
93164-2-42	0,91	hijklmnopq	RS	9	5	3	2	4	0	V
93179-2-9	0,91	ijklmnopqr	RS	9	5	3	3	6	2	VA
93164-3-41	0,93	ijklmnopqr	RS	9	5	3	3	2	1	VA
93164-2-38	0,94	jklmnopqrs	RS	9	5	3	2	6	0	V
93179-7-1 <sup>(2)</sup>	1,65	t	SS	10	1	3	3	16	2	V

V=Vegetative vigour(1-10; 10=high vigour), F=Rust disease (1-5; 5=Highly susceptible), FR=Size of fruit(1-5; 5=big size), MA=Maturation (1-5; 5=early maturation), CH%=% of empty fruits, CER=*Cercospora coffeicola* (0-5; 5=highly susceptible) and COR=fruit color (V=Red and A=yellow), Presumed genotypes to nematode resistance: RR=homozigous resistant; RS=heterozigous; SS=homozigous susceptible).

(1) transformed data  $\log_{10}+0,5$ .

(2) Standard treatment.

By classifying the progenies according to the distribution of susceptible and resistant plants in homozygous progenies susceptible and resistant and in heterozygous progenies, it was possible to identify four (18%) homozygous resistant progenies in the family IAPARLN-93500, three (12%) in the family IAPARLN-93164, four (21%) in the family IAPARLN-93179, and zero in the family IAPARLN-93167. The family IAPARLN-93167 can be considered homozygous susceptible and the three other families can be considered heterozygous.

By classifying the progenies according to the distribution of susceptible and resistant plants in homozygous progenies susceptible and resistant and in heterozygous progenies, it was possible to identify four (18%) homozygous resistant progenies in the family IAPARLN-93500, three (12%) in the family IAPARLN-93164, four (21%) in the family IAPARLN-93179, and zero in the family IAPARLN-93167. The family IAPARLN-93167 can be considered homozygous susceptible and the three other families can be considered heterozygous.

This segregation indicates that the genetic control of the resistance to the nematode *M. paranaensis* is monogenic, incomplete and dominant.

In the family IAPARLN-93500 the progenies IAPARLN93500-3-19, 93500-3-6, 93500-3-21 and 93500-3-1 were homozygous for resistance and superior for other agronomic traits. Among the progenies of this family that were heterozygous resistant, IAPARLN 93500-3-26 and 93500-2-11 have sufficient general merit to continue selection.

Among progenies indicated as superiors of the family IAPARLN 93179, 93179-4-38 and 93179-4-12 were classified as homozygous resistant and they have better agronomic traits, and 93179-2-1 that is heterozygous with larger size of the fruits.

The progenies indicated as superiors of the family IAPARLN 93164 were all classified as heterozygous. The progenies 93164-3-44 and 93164-4-19 presented larger size of the fruits, and 93164-2-42 and 93164-2-38 had lower susceptibility to *Cercospora coffeicola*.

## **Conclusions**

The advanced progenies IAPARLN 93500-3-19, 93500-3-21, 93500-3-6, 93500-3-01, 93179-4-38, 93179-3-26 and 93179-4-12 were classified as homozygous for resistance and superiors in relation to other agronomic traits. They should be evaluated for the precise level of resistance by nematologists, including the reproductive rate and tolerance level. They will be appraised as experimental cultivars in regional trials, in areas with high population of *M. paranaensis*. All the 29 promising lineages should be tested for to other races of *M. incognita*. This segregation indicates that the genetic control of the resistance to the nematode *M. paranaensis* is monogenic, incomplete and dominant.

## Literature

- CARNEIRO, R. G.; ANTONIO, H.; BRITTO, J.A.; ALTÉIA, A. A. K. Identification of species and physiologic races of *Meloidogyne* in the Northwest of Paraná 1: regional nucleus of Emater of Paranavaí. *Nematologia Brasileira*, 14:2-3. Summary. 1990.
- CARNEIRO, R. G.; ALTÉIA, A. A. K.; BRITTO, J.A. Rising of the occurrence and species frequency and physiologic races of *Meloidogyne* in the Northwest of Paraná 1: regional nucleus of Emater of Paranavaí. In: *Annals of the XVII Brazilian Congress of Nematology*. Lavras, 1992.
- CARNEIRO, R. G.; CARNEIRO, R. M. D. G. Preliminary study of the root knot nematodes *Meloidogyne* spp associated to the coffee crop in the North of Paraná, in the period from 1978 to 1980. In: *Annals of the VI Brazilian Congress of Nematology*, 6:133-139. 1982.
- CARNEIRO, R. M. D. G., CARNEIRO, R. G., ABRANTES. I. M. O., SANTOS, M. S. N. A. & ALMEIDA, M. R. *Meloidogyne paranaensis*, new species (Nemata: *Meloidogynidae*), the root - Knot nematode parasitizing coffee in Brazil. *Journal of Nematology*. 1996. 28(2): 177-189.
- FAZUOLI, L. C.; COSTA, W. M. da & BORTOLETTO, N. Resistance of the progenies of coffee LC1669-31 and LC 1669-33 to the nematodes *M. incognita* and *M. exigua*. In: *Brazilian congress of coffee research, 1983*. Min. of Ind. and of the Trade - Inst. Bras. of the Coffee. Rio de Janeiro. P. 81 - 83.
- FAZUOLI, L.C.; M. M. de LIMA; W. GONÇALVES & W. M. COSTA, 1987. Improvement of the coffee aiming resistance to the nematodes: uses of resistant door-graft. In: *Agronomy Congress of São Paulo, 6, Piracicaba. Annals*, p. 171-180.
- LIMA, M.M.A. de; W. GONÇALVES; L.C. FAZUOLI & R.P. OLIVEIRA, 1987. Evaluation of the resistance of selections of *Coffea canephora* and *C. congensis* to the race 3 of *M. incognita*. In: *Brazilian Congress of Coffee Research, 14, Campinas. Summaries*, p. 87-88.
- TAYLOR, A.L. & J.N. SASSER, 1978. *Biology, identification and control of root-knot nematodes*. NCSU & USAID Coop. Publ., Raleigh, USES. 111p.



## THE COFFEE 'CORKY-ROOT' DISEASE, ETHIOLOGY AND GENETIC RESISTANCE

**Bertrand B.<sup>1</sup>, Araya A., Topart F. & Anthony F.**

<sup>1</sup>Centre de Coopération Internationale en Recherche agronomique pour le développement, CIRAD/ PROMECAFE, IICA, AP 55, 2200 Coronado, Costa Rica.

---

Coffee 'corky-root' disease, also called 'corchosis', was first detected in 1974 in a small area of Costa Rica where the root-knot nematode *Meloidogyne arabicida* is the dominant species. An epidemiological study revealed a constant *Meloidogyne* spp-*Fusarium* sp association in case of 'corky-root'. In parallel, there are apparently no cases of 'corky-root' reported in association with *Meloidogyne exigua*, which is the prevalent root-knot nematode on coffee in Costa Rica. The *Fusarium* spp. fungi are often cited as components of 'disease complexes' in association with nematodes. Combined inoculations of *M. arabicida* or *M. exigua* and *Fusarium oxysporum* under controlled conditions showed that only the combination *M. arabicida* with *F. oxysporum* can induce 'corky-root' symptoms on the roots of *C. arabica* cv. Caturra or cv. Catuai. *F. oxysporum* alone was nonpathogenic. *M. exigua* or *M. arabicida* alone induced galls and reduction in shoot height but did not induce any 'corky-root' symptoms. Coffee varieties susceptible and resistant to *M. arabicida* were studied under field conditions for five years. All of the susceptible varieties exhibited corky-root symptoms on 40-80% of their root systems. The resistant varieties which were resistant to *M. arabicida* but not to *M. exigua* did not show any corky-root development. These observations lead to the conclusions that 'corky-root' disease has a complex etiology and emphasizes *M. arabicida*'s dominant role as a predisposing agent to subsequent *F. oxysporum* invasions. Variable levels of genetic resistance exist in the *Coffea canephora* populations and some Ethiopian accessions are totally immuns. Consequently, genetic resistance to *M. arabicida* appears to be an effective strategy against 'corky root' disease.

# ESTUDIO GENÉTICO DE LA RESISTENCIA DEL CAFÉ

## A *Meloidogyne exigua* DE COSTA RICA

Bertrand B.<sup>1</sup>, Topart P.<sup>2</sup>, Ayara A.<sup>2</sup>, Avendaño J.<sup>2</sup>,  
Graziosi G.<sup>3</sup>, Lashermes P.<sup>4</sup> & Anthony F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> IICA-PROMECAFE, Ap. 55, 2200 Coronado, Costa Rica. <sup>2</sup> CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica. <sup>3</sup> Department of Biology, University of Trieste, P.le Valmaura 9, 34143 Trieste, Italy. <sup>4</sup> IRD, GeneTrop, BP 5045, F-34032, Montpellier, France.

---

**Palabras claves:** café, nematodos, *Meloidogyne exigua*, resistencia

### Introducción

Las variedades de café (*Coffea arabica*) derivadas de las bases genéticas Typica y Bourbon (Caturra, Catuaí, ...) son susceptibles a los nematodos del género *Meloidogyne*, los cuales se encuentran frecuentemente en los cafetales de Centroamérica. Una de las especies más común es *M. exigua* cuyas masas de huevos se desarrollan dentro de las raíces del café. La producción del café puede bajar de 10 a 20 % en caso de alta infestación en cafetales con alta densidad de plantas y en pleno sol (Bertrand et al., 1997).

La primera etapa del trabajo consistió a identificar materiales resistentes a *M. exigua*. Ahora se está haciendo el estudio genético de la resistencia a través la evaluación de híbridos F1 que provienen del cruce entre un progenitor resistente y otro susceptible a *M. exigua*, y de poblaciones F2 por autofecundación de los híbridos F1. Los resultados presentados son preliminares pues el proyecto está en curso.

### Búsqueda de fuentes de resistencia (Bertrand et al., 2000)

Las 29 accesiones silvestres de *C. arabica*, evaluadas por su resistencia a *M. exigua*, se clasificaron susceptibles. Al contrario las 14 accesiones de *C. canephora* mostraron una buena resistencia a *M. exigua*, con muchas plantas sin ninguna agalla. Las líneas introgresadas (Catimor, Sarchimor) se clasificaron resistentes (4), susceptibles (3) y en segregación (2), mostrando que no se ha conservado los mismos fragmentos introgresados en las líneas derivadas del Híbrido de Timor.

### Estudio genético de la resistencia

Unos 20 híbridos F1 que provienen del cruce de un Sarchimor resistente por cuatro silvestres susceptibles fueron introducidos *in vitro* y multiplicados por embriogenesis somática. La mayoría se encuentra en curso de aclimatación, pero todavía no ha sido inoculada.

Poblaciones F2 fueron obtenidas por autofecundación de estos híbridos F1 en el ensayo CICAFAE 1 del ICAFE (Instituto de Café de Costa Rica). Las segregaciones observadas en

las poblaciones con más de 100 plantas fueron bastante variables en las cuatro familias, con un rango de variación de 1:1 a 1:9. Sin embargo la mitad de las segregaciones observadas son de tipo 1:3, lo que corresponde a un determinismo genético de la resistencia por un gen recesivo. Pronto se analizarán más plantas F2, lo que permitirá precisar el número de genes involucrados y su herencia.

### **Agradecimientos**

El trabajo se desarrolló con el apoyo del CATIE, del IRD, del CIRAD y de la Comisión Europea (proyectos CI1\*CT92-0090 y ERBIC18CT970181).

### **Referencias bibliográficas**

- Bertrand B, Aguilar G, Bompard E, Rafinon A, Anthony F (1997). Comportement agronomique et résistance aux principaux déprédateurs des lignées de Sarchimor et Catimor au Costa Rica. Plantations, Recherche, Développement 4 (5): 312-321
- Bertrand B, Anthony F, Lashermes P (2000). Breeding for resistance to *Meloidogyne exigua* of *Coffea arabica* by introgression of resistance genes of *C. canephora*. Euphytica, sometido

**Parte 3:**

**SELECCIÓN ASISTIDA  
POR MARCADORES MOLECULARES**

# LAS BASES DE LA GENÉTICA MOLECULAR

Anthony F.

CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica.

---

Palabras claves: ADN, proteínas, genes, alelos, marcadores moleculares

## Introducción

La Genética molecular ha tenido un desarrollo rápido en los últimos 20 años. En 1883, W. Roux había postulado que los cromosomas eran los portadores de los factores hereditarios. Realizando experimentos con la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, T.H. Morgan (Premio Nobel en 1933) aportó pruebas experimentales a favor de la teoría del gen como pequeña unidad del cromosoma. Alrededor del año 1935, se desarrolló la técnica de electroforesis de proteínas solubles, la cual constituyó un primer paso hacia la realización de estudios genéticos al nivel molecular, utilizando marcadores isoenzimáticos, cuya expresión no depende del medio. Se determinó la estructura del ADN hace solamente 50 años, por J.D. Watson y F.H.C. Crick (Premio Nobel 1962). Desde 20 años, se está incrementando las herramientas disponibles para analizar la información genética que se encuentra en los ADNs y ARNs, desarrollando varias técnicas para producir marcadores moleculares: los RFLPs (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) en 1980, los minisatélites en 1985, los microsátélites en 1989, los RAPDs (ADN polimórfico amplificado al azar) en 1990 y los AFLPs (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados) en 1995.

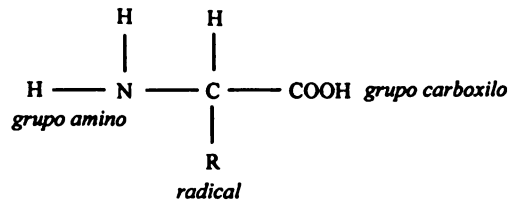
Esta presentación es un recordatorio sobre las bases de la genética molecular, con el objetivo de introducir los temas que se presentarán a continuación, sobre el uso de los marcadores moleculares para el mejoramiento genético del café.

## Del genotipo al fenotipo

Las principales etapas de la traducción de un genotipo en un fenotipo se encuentran resumidas en la figura 1. La información genética portada por el ADN se transmite a los ARNm (ARN mensajeros) mediante el proceso de transcripción. Los ARNm sirven de molde para la síntesis de proteínas, las cuales se asocian para formar compuestos orgánicos más o menos complejos, que actúan para definir el fenotipo.

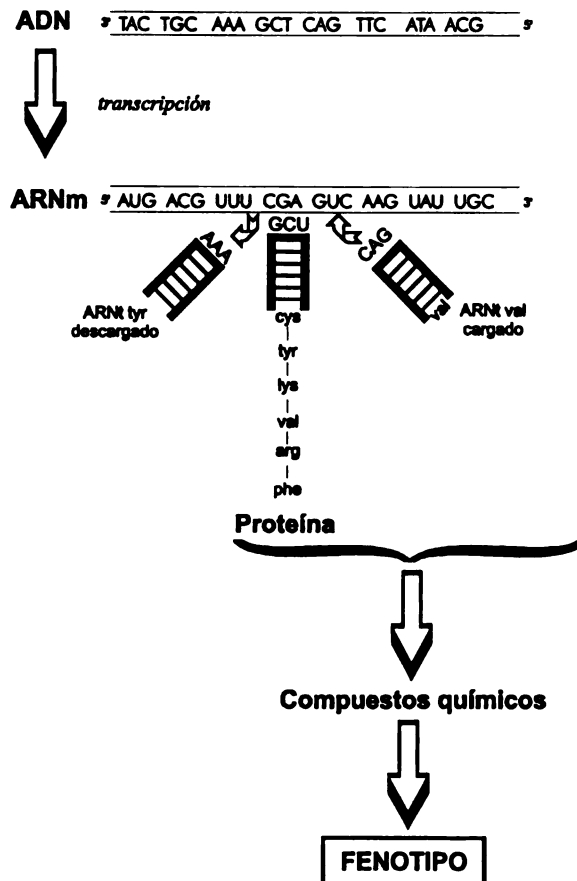
## Las proteínas

Químicamente, las proteínas son moléculas orgánicas gigantescas con distintas formas, tamaños y funciones. Son polímeros de aminoácidos. Los aminoácidos tienen la estructura básica siguiente:



Se encuentran 20 aminoácidos en las proteínas. Cada proteína posee un número de aminoácidos que varía desde 51 en la insulina hasta varios millares en las más voluminosas moléculas proteínicas. Por eso, el peso molecular de las proteínas varía mucho, siendo de 6,000 en el caso de la insulina, 66,200 en la hemoglobina y alrededor de 500,000 en otras proteínas. las proteínas se clasifican en dos principales categorías:

- las proteínas estructurales que contribuyen al crecimiento y al funcionamiento de las células,
- las proteínas funcionales que son principalmente enzimas, las cuales catalizan todas las reacciones químicas en las células. En una célula de un animal superior, existen 100,000 enzimas o más.



**Figura 1.** Esquema de las principales etapas de la traducción de un genotipo en un fenotipo.

## Los ADNs

Los componentes químicos del ADN son relativamente simples: un azúcar de 5 carbonos (la desoxirribosa), un grupo fosfato ( $-\text{PO}_4$ ) y compuestos orgánicos nitrogenados cíclicos llamados bases. Existen 4 bases: 2 de purinas (Adenina y Guanina) y 2 de pirimidinas (Citosina y Timina). Se habla de bases complementarias porque se asocia siempre la Adenina con la Timina, por medio de 2 ligaduras débiles de hidrógeno, y la Guanina con la Citosina, por medio de 3 ligaduras débiles de hidrógeno. Un nucleótido se compone de una base, un azúcar y un grupo fosfato. El fosfato hace la conexión entre 2 azúcares. En el hombre, existen alrededor de 3.5 mil millones de nucleótidos por célula.

El ADN de los cromosomas está constituido por dos filamentos o cadenas torcidas que forman una doble hélice muy larga. Cada filamento se presenta como una cadena de nucleótidos, que se puede identificar por la secuencia de sus bases, por ejemplo: GATGCA... Los dos filamentos se tuercen a causa de la ligadura de hidrógeno en la posición 1' de las bases. Como estas ligaduras son muy débiles si se comparan con otros tipos de ligaduras químicas, los dos filamentos de ADN pueden separarse con bastante facilidad, lo que es una característica necesaria para la duplicación del ADN.

El ADN se encuentra también en los cloroplastos (ADNcp), los ribosomas (ADNr) y las mitocondrias (ADNmt):

- El ADNcp codifica por aproximadamente 100 polipéptidos y 35 ARN (ARNr y ARNt). Se caracteriza por tener una frecuencia muy baja de cambios estructurales (a la escala de tiempo de la evolución) y muchas secuencias conservadas entre organismos/especies. En café, se demostró que el ADNcp tiene una herencia estrictamente maternal (Lashermes et al., 1996). Los datos de la secuenciación del espaciador entre los genes *trnL* y *trnF* permitieron identificar el progenitor maternal de la especie alotetraploide *C. arabica* (Cros et al., 1998).
- El ADNr se encuentra en todos los genomas (nuclear, cloroplástico y mitocondrial) y se caracteriza por tener regiones codificantes bastante conservadas y regiones no codificantes bastante variables. En café, se construyó un árbol filogenético de las especies utilizando los datos de secuenciación del espaciador interno transcrito ITS 2, lo cual permitió identificar el otro progenitor (paternal) de la especie *C. arabica* (Lashermes et al., 1997).
- El ADNmt se transmite por medio de la madre y presenta una acumulación de mutaciones. En consecuencia es muy polimórfico. Fue utilizado para realizar un estudio preliminar de filogenia entre cuatro especies de café (Berthou et al., 1983).

## Ventajas de los marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son marcadores genéticos, al nivel del ADN, en el sentido que cumplen con las leyes de Mendel. Permiten detectar diferencias (polimorfismos) entre los

individuos aun en las regiones del ADN que no codifican. Estos marcadores presentan muchas ventajas si se comparan con los marcadores de tipo agro-morfológico o proteínico (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Características de los principales marcadores (adaptado de de Vienne, 1997).

<b>Marcador:</b>	<b>Agro-morfológico</b>	<b>Proteínico</b>	<b>ADN</b>
<b>Neutralidad:</b>	no	si	si
<b>Número:</b>	limitado	< 100	casi ilimitado
<b>Codominancia:</b>	escasa	si	si: RFLP, SSR no: RAPD, AFLP ...
<b>Polimorfismo:</b>	bajo	bajo	alto
<b>Estado/Órgano:</b>	si	si	no
<b>Tecnicidad:</b>	baja	baja a mediana	baja a alta

### **Definiciones básicas**

Los genes corresponden a las unidades hereditarias que se transmiten de una generación a la siguiente. Se asocia una función fisiológica a cada gen. Se estima el número de genes humanos entre 50,000 y 100,000, lo que representa solamente 1 % de la longitud total del genoma, los otros 99 % contienen secuencias que no participan a la codificación de los caracteres.

Los cromosomas son nucleoproteínas constituidas por una asociación entre la doble hélice de ADN y proteínas. Poniendo un cromosoma detrás del otro dentro de una célula humana, se puede medir un filamento de 2 m de largo. En café son 22 cromosomas en las especies diploides (*C. canephora*, *C. liberica*, ...) y 44 en *C. arabica*.

Las células diploides (2n) contienen cromosomas que provienen por mitad de la madre y por la otra mitad del padre. Es el caso de las células somáticas (todas las células excepto las células sexuales) de la mayoría de los organismos superiores. Las células sexuales contienen la mitad de cromosomas y se llaman células haploides (n).

El genoma es el conjunto de los genes que se encuentra en una célula.

Un locus es la ubicación de un gen en un cromosoma.

Los alelos representan varias formas de un gen. Estas formas corresponden a modificaciones de la información genética codificada. Por ejemplo, el gen que codifica el tipo sanguíneo del hombre tiene tres principales alelos (*A*, *A<sup>B</sup>* y *a*) que definen cuatro



grupos sanguíneos: A (genotipos  $AA$  &  $Aa$ ), B ( $A^B A^B$  &  $A^B a$ ), AB ( $A^B A^B$ ) y O ( $aa$ ). La diversidad que existe en la naturaleza se fundamenta en la multiplicidad de los alelos.

Una mutación es un proceso mediante el cual un gen sufre un cambio estructural. Al nivel molecular, las mutaciones corresponden generalmente a sustituciones (o cambios) de bases en el ADN. Se puede estimar que en un organismo de 50,000 genes, aparece una nueva mutación cada 20 gametos por lo menos.

### **Referencias bibliográficas**

- Berthou F, Mathieu C, Vedel F (1983). Chloroplast and mitochondrial DNA variation as indicator of phylogenetic relationships in the genus *Coffea* L. Theor. Appl. Genet. 65: 77-84
- Cros J, Combes MC, Trouslot P, Anthony F, Hamon S, Charrier A, Lashermes P (1998). Phylogenetic relationships of *Coffea* species: new evidence based on the chloroplast DNA variation analysis. Molecular Phylogenetics and Evolution 9: 109-117
- Lashermes P, Cros J, Combes MC, Trouslot P, Anthony F, Hamon S, Charrier A (1996). Inheritance and restriction fragment length polymorphism of chloroplast DNA in the genus *Coffea* L.. Theor. Appl. Genet. 93: 626-632
- Lashermes P, Combes MC, Trouslot P, Charrier A (1997). Phylogenetic relationships of coffee-tree species (*Coffea* L.) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Theor. Appl. Genet. 94: 947-955
- de Vienne D (1997). Les marqueurs moléculaires et leurs applications. UNISAT Université audiovisuelle francophone. CNED y AUPELF-UREF. Rennes. 119 p.

## MAIN DNA MOLECULAR MARKERS AND THEIR USE IN BREEDING PROGRAMMES AND FOR CHROMOSOME MAPPING

Rovelli P.<sup>1</sup>, Martellosi C.<sup>1</sup>, De Nardi B.<sup>1</sup>, Lashermes P.<sup>2</sup>  
Anthony F.<sup>3</sup>, Anzueto F.<sup>4</sup>, Sera T.<sup>5</sup> & Graziosi G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, University of Trieste, P.le Valmaura 9, 34143 Trieste, Italy.

<sup>2</sup> IRD (ex ORSTOM), BP 5045, Montpellier, France. <sup>3</sup> CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica.

<sup>4</sup> IICA/PROMECAFE, 2200 Coronado, Costa Rica. <sup>5</sup> IAPAR, Londrina, Paraná, Brasil.

---

**Key words:** DNA, polymorphisms, RFLP, RAPD, AFLP, CFLP, microsatellites.

### Introduction

These days, you can buy for a couple of hundreds dollars a GPS (Global Positioning System). This pocket instrument allows you to determine your co-ordinate position on land, at sea or in the air with the approximation of a few metres. But suppose you do not have access to this instrument and you are travelling on the motorway from Rome to Venice and you want, moreover, to make a stopover in Florence. Imagine also that some joker has cancelled all the signposts along the motorway. Without GPS or signposts, there would be no way of knowing where you are and when you should get off the motorway to visit Florence or Venice.

As far as *Coffea arabica* is concerned, we can compare the genome of this organism to a lengthy motorway along which interesting spots to visit are lined up, restaurants and hotels, i.e. “interesting” or “useful”. Thus, to travel along the coffee genome and find the genes we are looking for, we need reference points and a reference chart.

The most useful reference points in a genome (signpost along the motorway) are the stretches of DNA which exhibit variability among different varieties and even between individual plants. These stretches of DNA are called polymorphic sequences and the genomes of possibly all Eukaryotes, *Coffea arabica* included, are thought to be rich in such sequences. The real problem is to find them, but once we have a reasonable number of polymorphic loci we can trace a reference map and associate polymorphisms to useful genes, as for instance the resistance to nematodes.

There are various types of DNA polymorphisms and various techniques to detect them, here we briefly mention the most important.

### *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*

This approach detects sequence variations (frequently single base mutations) and involves the digestion of DNA by a specific restriction enzyme, Southern blot and hybridisation with a labelled probe. The drawback with this technique lies in its complexity, in the fact that

you need a probe and in the low informative content (low number of alleles, usually two). Nevertheless the technique is well established and reliable and allows for the unambiguous identification of the homo and of the heterozygotes. RFLPs in the *Coffea* genus have been reported by Lashermes et al. (1996).

#### *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*

The RAPD technique allows for the identification of DNA polymorphisms in almost all organisms even when no other information is available on the DNA under study. It is based on the enzymatic amplification (PCR) of short DNA stretches (100-1,000 base pairs) lying between two inverted repeats homologous to arbitrary primers. The great advantage of this method is that there is no need for probes or for DNA sequences but the faint electrophoretic bands are difficult to reproduce and there is no way of recognising the heterozygotes. A number of publications report RAPD analysis in *C.a.* following the paper of Orozco-Castillo et al. (1994).

#### *Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)*

Following the digestion of the genomic DNA by two restriction enzymes, adapters are added at both ends of the DNA fragments and some of the DNA fragments are PCR amplified by priming the adapters. This approach is very informative because many electrophoretic bands (30-90 bands) are obtained with a single PCR and the probability of finding a polymorphic band is correspondingly relatively high. Unfortunately the technique is rather complex and, as for the RAPD technique, it is impossible to identify the heterozygotes for a given band. The use of this technique in breeding programmes of *C.a.* has been reported by Lashermes et al. (2000).

#### *Microsatellites*

Microsatellites are repeated sequences in tandem and the number of repeats can vary in different organism of the same species. This type of polymorphism is normally very informative because one locus can show many alleles and because all the genotypes can be identified. Moreover the analyses are carried out by PCR and are very easy and a large number of samples can be analysed at low cost and in a short time. However, the development of these polymorphisms is difficult and expensive. The first descriptions of microsatellites in *C. arabica* have recently been reported by us (Mettulio et al., 2000; Rovelli et. al., in press).

Here we report the results of the microsatellite analysis of two crosses and describe a new type of polymorphism in *Coffea arabica*: Cleavase Fragment Length Polymorphism (CFLP).

#### **Material and Methods**

The DNA was extracted from leaves of two families and from seven different varieties coming from Brazil. The two crosses were the following: 1) MRFPB H-25-1 (Icatuai) x

Catimor II III-2-6 (Iapar 59) plus 6 F<sub>1</sub> plants, performed at IAPAR; 2) Sarcimor T5296 x ET-6 plus 17 F<sub>1</sub> plants, performed at CATIE.

#### *DNA extraction*

2 ml of extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8; 4% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 0,07% freshly added  $\beta$ -mercaptoethanol) were added to 0,08 g of finely ground leaves and incubated for 1h at 65°C; the samples were extracted with 0,75 volumes of 24:1 CHCl<sub>3</sub>/IAA and the aqueous phase was precipitated twice with 0,6 volumes of propan-2-ol, resuspended in 350ul of CTAB 2% buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8; CTAB 2%; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA), extracted again with CHCl<sub>3</sub>/IAA and precipitated once in 50 mM Tris-HCl, pH 8 containing 1% CTAB. The pellet was resuspended, precipitated twice with ethanol, and kept in 50 ul TE for subsequent analysis.

#### *Microsatellite analysis*

The microsatellite analysis was performed as reported by Rovelli et al. (2000).

#### *CFLP analysis*

The PCR products were concentrated by freeze-drying and then resolved in 2% low-melting agarose using 1xTAE as the electrophoresis buffer. Recovery of the bands of interest from agarose gel and subsequent purification were performed using Boehringer-Mannheim Agarase®, following the manufacturer's protocol. The CFLP analysis was performed following the protocol in the Boehringer-Mannheim operating manual, with minor modifications: 2 ul of water per sample were added to the reaction mix, and the stop solution was replaced by a solution lacking the xylene-cyanol. All other technical details were as reported by Brow and Fors (1997). The extranuclear DNA was amplified using the universal primers reported by Demasure et al. (1995).

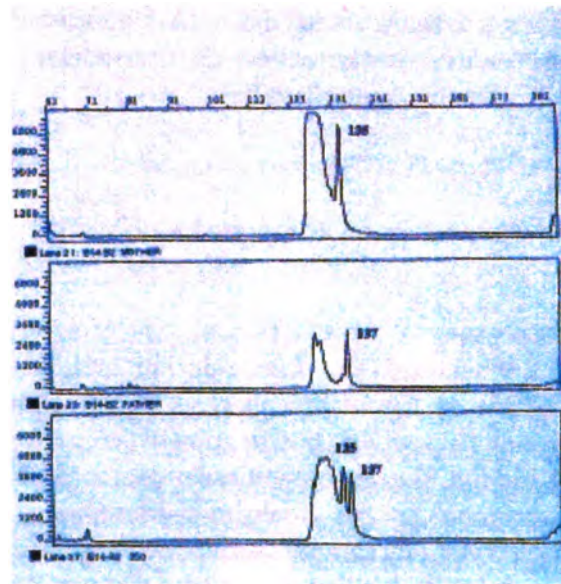
### **Results and Discussion**

#### *Microsatellite analysis of the two families*

The CATIE family was analysed for 51 microsatellite and the parents had different alleles for 4 systems. All the progeny had the same alleles as expected by Mendelian inheritance. Below (Fig.1) we report the results for the E10-3CTG microsatellite: the mother was homozygote for the 135bp allele and the father was homozygote for the 137bp allele, all the progeny were heterozygotes 135/137. This cross was performed with the aim of selecting plants resistant to nematodes and we should be able to follow the inheritance of the resistance gene/s when more polymorphisms become available.

The IAPAR family was analysed for 30 microsatellites, two of which were homozygote in the parents while all the progeny were heterozygotes as reported in the table below.

Microsat.	PARENTS		F <sub>1</sub> PROGENY					
	Icatuai	IAPAR-59	I-30-1-1	I-30-1-2	I-30-2-1	I-30-2-2	I-30-3-1	I-30-3-2
34-6CTG	108/108	112	108/112	108/112	108/112	108/112	108/112	108/112
37/6CTG	121/121	119	119/121	119/121	119/121	119/121	119/121	119/121



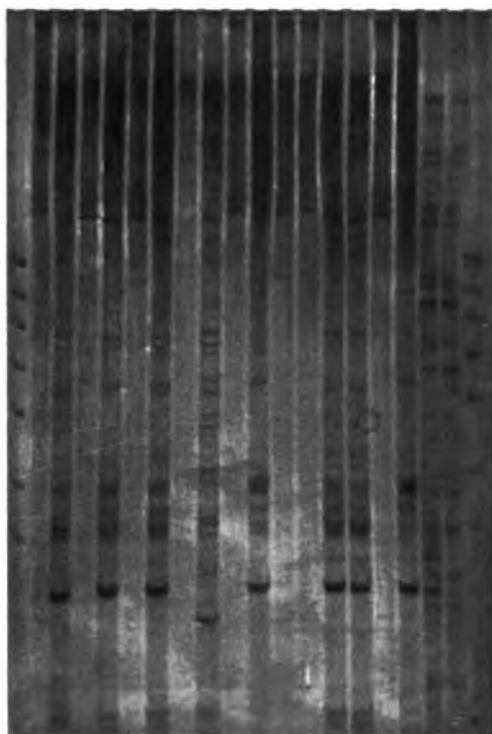
**Fig. 1.** GENESCAN analysis of the cross T5296 x ET6. Upper panel: mother homozygote for the 135bp allele. Middle panel: father homozygote for the 137bp allele. Bottom panel: F<sub>1</sub> progeny heterozygotes 135/137.

### *CFLP polymorphisms*

When double-stranded DNA is denatured and quickly cooled in a low-salt buffer, “hairpin” structures are formed. Cleavase I cuts the DNA at the 5’ region of the hairpin producing a set of fragments which can be analyzed on denaturing polyacrilamide gels. The banding pattern reflects single nucleotide substitution or deletion. This technique proved to be very sensitive; it can, in fact, detect single base mutations even in fragments of large size (up to 2.7 Kb in length. Brow & Fors, 1997).

We analysed about 20 microsatellites and 5 extranuclear systems. We conducted nearly 200 analyses but none of the microsatellites displayed a CFLP polymorphism. We do not know whether this negative result was due to the small dimension of the amplified microsatellites (200-400 bp) or to the particular nature of these sequences.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



**Fig. 2.** CFLP Polymorphism for the intergenic spacer between the *trnH* and the *trnK1* tRNA genes (fragment of 1,300 bp in *C.a.*) of the chloroplast. About 150 ng of ethanol-precipitated PCR product were digested at 52,5°C for 5 minutes and then run on 6% denaturing polyacrylamide gel at 200V overnight. Lanes: 1 and 20, molecular weight markers; 2 and 3, Aramosa, undigested and digested; 4 and 5, Bourbon undigested and digested; 6 and 7, ET-6, undigested and digested; 8 and 9, *C. canephora*, undigested and digested; 10 and 11, Rume Sudan, undigested and digested; 12 and 14, Amphilo, undigested and digested; 13 and 15, Catimor, undigested and digested; 16 and 17, Sarcimor, undigested and digested; 18, CFLP® kit 1059 bp Wild type Control DNA; 19, CFLP® kit 1059 bp Mutant Control DNA (differs from the wild type for a single nucleotide).

On the contrary the extranuclear DNA (chloroplastic and mitochondrial) showed relatively high polymorphism: 2 out of 5 systems proved to be polymorphic. In fig. 2 we report the analysis of the intergenic spacer between the *trnH* and the *trnK1* tRNA genes (fragment of 1,300 bp in *C.a.*) of the chloroplast. Almost all the varieties analyzed showed specific bands while *C. canephora* had a very different pattern. Clearly these polymorphisms cannot be used for mapping the genome but they could be very useful in assessing the maternal contribution in inter- and intra-specific crosses when there are doubts about the origin of the gametes.

In our opinion, the absence of CFLP in the microsatellite amplicons does not imply absence of this type of polymorphism in the nuclear DNA. Most probably the amplification of longer stretches of nuclear DNA could give results as good as the extranuclear DNA. Moreover, nuclear CFLPs could be a new source of polymorphisms for mapping the *Coffea arabica* genome and for molecular assisted breeding programs.

### **Acknowledgements**

We wish to thank Dr. Maro Sondhal (Fitolink) for providing us with samples of a number of varieties of C.a. This research has been supported by the European Community, grant: INCO-DC Contract n. ERBIC 18CT970181.

### **Literature**

- Brow M.A.D., Fors L. (1997) Cleavase Fragment Length Polymorphism Analysis for Mutation. *Biomedical Products: Tools and Techniques*, 9: 22-24
- Demesure B., Sodzi N., Petit R.J. (1995) A set of universal primers for the amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular ecology*. 4: 129-131
- Lashermes P., Andrzejewski S., Bertrand B., Combes M.C., Dussert S., Graziosi G., Trouslot P., Anthony F. (2000) Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100:139-146
- Lashermes, P., Cros, J., Combes, M.C., Trouslot, P., Anthony, F., Hamon S., Charrier A. (1996a), Inheritance and restriction fragment length polymorphism of chloroplast DNA in the genus *Coffea* L. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 626-632.
- Mettulio R., Rovelli P., Antony F.; Anzueto F. Lashermes P.; Graziosi G. (1999) Polymorphic microsatellites in *Coffea arabica*. In: 18<sup>th</sup> Int. Sci. Colloq. On Coffee. ASIC, Helsinki. 18:344-347
- Orozco-Castillo, C., Chalmes, K.J., Waugh, R., Powell, W. (1994): Detection of genetic diversity and selective gene introgression in Coffee using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 87: 934-940
- Rovelli P., Mettulio R., Anthony F., Anzueto F., Lashermes Ph., Graziosi G. (2000) Microsatellites in *Coffea arabica* L. In "Coffee Biotechnology and Quality" Sera, Soccol, Pandey and Roussos Eds., Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, in press.

## MOLECULAR MARKER-ASSISTED BREEDING: A COFFEE PERSPECTIVE

Lashermes P.<sup>1</sup>, Combes M.C.<sup>1</sup>, Herrera J.C.<sup>1</sup>, Noir S.<sup>1</sup>,  
Prakash N.S.<sup>1</sup>, Bertrand B.<sup>2</sup> & Anthony F.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> IRD, GeneTrop, BP 5045, F-34032, Montpellier, France. <sup>2</sup> IICA/PROMECAFE, Ap. 55, 2200 Coronado, San José, Costa Rica. <sup>3</sup> CATIE, Ap. 59, 7170 Turrialba, Costa Rica

---

Key-words: Genes, marker-assisted selection, DNA, breeding, coffee

### Introduction

*Coffea arabica* L. is characterised by low genetic diversity which has been attributed to the allotetraploid origin, reproductive biology and evolution process of this species (Lashermes *et al.*, 1999). However, spontaneous accessions collected in the primary centre of diversity as well as wild relative *Coffea* species constitute a valuable gene reservoir for different breeding purposes (Charrier and Eskes, 1997). Hence, transfer of desirable genes in particular for disease resistance from diploid species like *C. canephora* and *C. liberica* into tetraploid arabica cultivars without affecting quality traits has been the main objective of arabica breeding. In so doing conventional breeding methodology faces considerable difficulties. In particular, strong limitations are due to the long generation time of coffee-tree (5 years), the high cost of field trial, and the lack of accuracy of current strategy. One can estimate that a minimum of 25 years after hybridisation (five backcross-generations) is required to restore the genetic background of the recipient cultivar and there by ensure good quality of the improved variety. Combining various genes of resistance without reducing coffee quality appears therefore as a very difficult task in an acceptable time-frame through traditional breeding approaches.

In recent years, DNA-based genetic markers have gained widespread applications in many fields of plant genetics and breeding. In particular, the development of marker-assisted selection (MAS) programmes promises to overcome present limitations of conventional coffee breeding. In this report, recent molecular markers analyses as well as aspects of MAS are reviewed with regards to coffee breeding.

### Molecular analysis of arabica coffee introgression lines

Occurrence of spontaneous hybrids between tetraploid arabica and other diploid species is common especially when these species are cultivated together. Exploitation of such natural tetraploid interspecific hybrids gained priority in coffee breeding and still assumes greater significance. For instance, the Timor Hybrid, a natural hybrid between *C. arabica* and *C. canephora* is being extensively used world wide, as the main source of resistance to pests and diseases. Introgressed arabica genotypes derived from the Timor Hybrid were analysed for the presence of *C. canephora* genetic material using the amplified fragment length polymorphism (AFLP) approach (Lashermes *et al.*, 2000). Although varying between the



Timor Hybrid-derived genotypes (Fig. 1), the amount of alien genetic material appeared substantial and should justify the development of adapted breeding strategies.

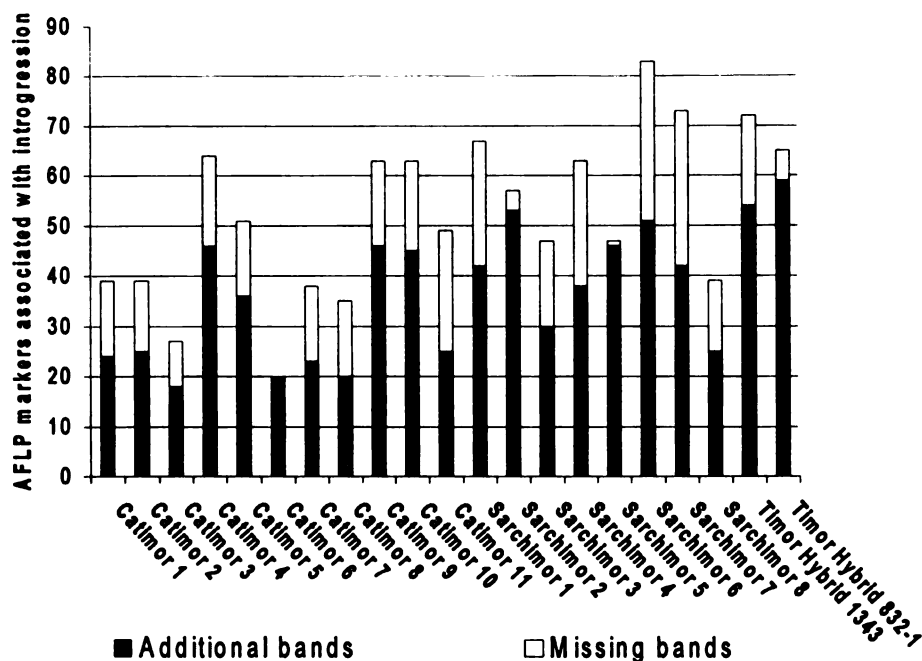


Fig. 1. Numbers of AFLP polymorphic bands attributable to introgression detected in Timor Hybrid-derived genotypes.

### Selection for major genes through linkage with molecular markers

An application of molecular marker in plant breeding is based on finding tight linkages between these markers and genes of interest. Once identified, it may be much more efficient to select for the marker than for the trait itself. Regarding Arabica coffee breeding, one straightforward applications concern the introgression of pest and disease resistance genes. Benefits obtained from marker-selection depend on several factors such as the degree of linkage between the marker and the target gene, savings in time, and the relative costs of direct vs. marker-facilitated selection. However, this technology shows undoubtedly considerable interests (Melchinger 1990) for the transfer of resistance genes in a variety of circumstances such as:

#### \* *Quarantined pathogens*

If a virulent pathogen does not naturally occur in the test environment, artificial inoculation is prohibited for safety reasons. For instance, CBD is still restricted to the continent of Africa, and the availability of markers linked to the resistance gene(s) could allow pre-

emptive breeding in countries (Asia, Latin America) where quarantine barriers are still effective.

*\* Reliability/limitation of direct testing for the resistance trait*

Conventional selection progress could be hampered by the difficulty to ensure reliable test. Seedling test could also present strong inconvenient. For instance, the present test for evaluation for root-knot nematode is destructive leading to important difficulties in the utilisation of identified plant resistance sources. In addition, expression of many resistance genes can be strongly influenced by environmental conditions.

*\* Developmentally regulated character*

Early selection based on the marker genotype of young seedlings would be particularly beneficial for late expressed traits.

*\* Transfer of recessive resistance genes*

The classical procedure of transferring a recessive resistance gene includes a progeny test after each backcross generation to determine the presence of the desired allele. With MAS, the transfer can be accomplished without interruptions leading to an important time saving.

*\* Pyramiding of resistance genes/Combining valuable traits*

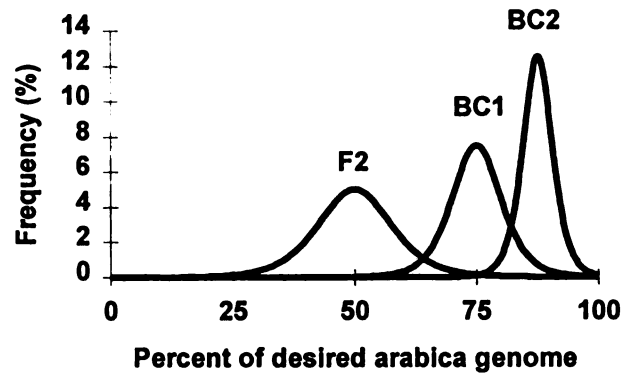
Pyramiding of resistance genes has been suggested as a strategy to provide durable resistance (i.e. coffee leaf rust). However, conventional breeding is complicated by the fact that, it is difficult or often impossible to distinguish the various resistance genotypes. Once the different genes conferring resistance to the same pathogen are tagged by tightly linked marker, they could be relatively easily be accumulated into a single genotype via marker-facilitated selection. Comparable advantages versus conventional are procured when trying to combine simultaneously resistance genes to different disease/pests.

**Molecular-assisted backcross breeding**

Repeated backcrossing simultaneously accomplishes two essential goals: 1) allow segregation to remove donor parent chromosomes unlinked to the target gene and 2) allow recombination to remove donor parent segments which are linked to the target gene. Both objectives could be considerably facilitated by the use of molecular markers.

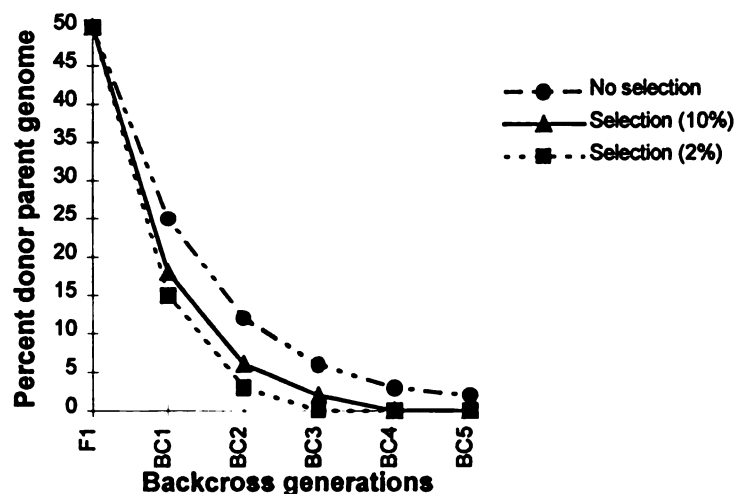
*Genome selection*

Beside the target trait, it is important to consider the complete genome of individuals. Chromosomal segments are segregating within backcross progenies and the individuals show various contents of the desired parental genome (Fig. 2).



**Fig. 2.** Frequency of individuals in F2, BC1, and BC2 having various contents (%) of the desired parental genome.

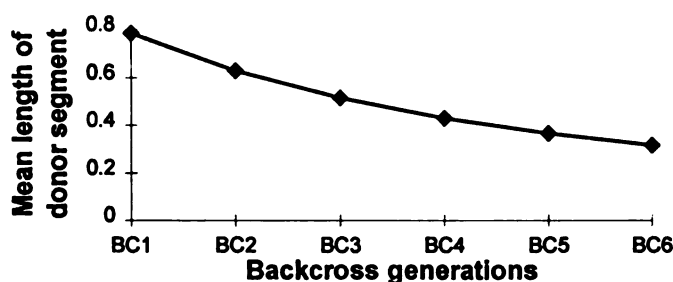
A genome selection could therefore be performed by the use of markers scattered throughout the genome resulting in a reduction of the number of backcross generations required to restore the genetic background of the recipient cultivar. Values were estimated for a hypothetical arabica genome of 22 chromosome pairs of, on average, 100 cM each (Total genome of 2200 cM). In the absence of selection, parental donor DNA is only removed by a factor of two in each generation. Simulations are given for MAS programme in which the either 10 or 2% best (in terms of percent recurrent parent genome) individuals in each generation were used as the parent for the next generation (Fig. 3). Results equivalent to BC5 generation without selection are obtained after only two marker-assisted BC generations allowing a considerable time saving.



**Fig. 3.** Average content (%) of the donor parental genome in backcross generations under various intensities of genomic selection.

### *Reducing linkage drag*

Removing of the linked donor segment could take many generations. Many examples of "linkage drag" are known in which undesirable traits that are closely linked to a target gene are carried out along during breeding programme. For instance in Arabica, even after 6 backcross generations, a region of 32cM flanking a target gene is expected to persist (Fig. 4). In most plant genomes 32cM is enough DNA to contain hundreds of genes. DNA markers can be used to eliminate, or at least significantly reduce, linkage drag by allowing the identification of rare recombinant individuals which are usually only selected by chance in classical breeding.



**Fig. 4.** Mean length of donor segment surrounding the target gene after various numbers of backcross generations. The length is expressed as a proportion of the carrier chromosome (chromosome of 100 cM long) (after Stam and Zeven 1981).

### **Conclusions and prospects**

The development of molecular markers in coffee trees, has opened new perspectives in breeding. The conventional selection of self or back-crossed coffee-tree progenies for further breeding is extremely laborious and time-consuming. Although still requiring important efforts, the cautious implementation of MAS is very promising (Young, 2000). In particular, the integration of MAS in coffee, promises to drastically increase the efficiency of breeding programmes by 1) allowing for selection at an early stage and on a large number of breeding lines, 2) reducing the number of backcross cycles required to restore the quality of the traditional cultivars. 3) combining in one-step, selection for various traits or genes of resistance.

Furthermore, new findings from genome research indicate that there is tremendous genetic potential locked up in wild and cultivated germplasm resources that can be released only by shifting the paradigm from searching for phenotypes to searching for superior genes with the aid of molecular linkage maps (Tanksley & McCouch 1997). Ongoing technological developments, including automation, allele-specific diagnostics and DNA chips, will make MAS approaches based on large-scale screening much more powerful and effective. In addition, it would particularly helpful to integrate the growing body of knowledge (e.g. genomics, bioinformatics) derived from model plants (Meinke et al., 1998).

## References

- Charrier, A., and A.B. Eskes (1997), Les caféiers. In: *L'amélioration des plantes tropicales*, Charrier A, Jacquot M, Hamon S, Nicolas D (eds). Collection Repères, CIRAD et ORSTOM, Paris, pp 171-196
- Lashermes, P., Combes M.C., Robert J., Trouslot P., D'Hont A., Anthony F., and A. Charrier (1999), Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Mol. Gen. Genet.*, 261:259-266
- Lashermes, P., S. Andrzejewski, B. Bertrand, M.C. Combes, S. Dussert, G. Graziosi, P. Trouslot, and F. Anthony (2000), Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 100: 139-146
- Meinke, DW, J.M. Cherry, C. Deam, S.D. Rounsley, and M. Koorneef (1998), *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282: 662-682
- Melchinger, A.E. (1990), Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant Breed.*, 104: 1-19
- Richter, T.E., and P.C. Ronald (2000), The evolution of disease resistance genes. *Plant Molecular Biology* 42: 195-204
- Stam, P., and A.C. Zeven (1981), The theoretical proportion of the donor genome in near-isogenic lines of self-fertilizers bred by backcrossing. *Euphytica*, 30: 227-238
- Tanksley, S.D., and S.R. McCouch (1997), Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science*, 277: 1063-1066
- Young, N.D. (1999), A cautiously optimistic vision for marker-assisted selection. *Molecular Breeding*, 5: 505-510

**ANEXOS**

## Anexo 1: Programa del taller

Martes 29 de Agosto, 2000

### 1. Utilización de los recursos genéticos para mejorar las variedades de café Arabica

- 8:30 – 9:00 : Introducción, presentación de los participantes
- 9:00 – 9:20 : Diversidad de los recursos genéticos de café, disponible para el mejoramiento genético del café (*Coffea arabica*) (F. ANTHONY)
- 9:20 – 9:40 : Relaciones filogenéticas entre las especies de café y origen del genoma tetraploide del *C. arabica* (P. LASHERMES & F. ANTHONY)
- 9:40 – 9:55 : Utilización de los recursos genéticos de café en el programa de mejoramiento genético de Brasil (O. FILHO)
- 9:55 – 10:15 : *Café*
- 10:15 – 10:30 : Utilización de los recursos genéticos de café en el programa de mejoramiento genético de Colombia (G. MORENO)
- 10:30 – 10:45 : Utilización de los recursos genéticos de café en el programa de mejoramiento genético de Centroamérica (B. BERTRAND)
- 10:45 – 12:00 : Foro  
*Almuerzo*

### 2. La resistencia del café a los nemátodos (*Meloidogyne* spp.)

- 13:30 – 13:45 : Taxonomía, caracterización y distribución de las especies de nemátodos (*Meloidogyne*) en Brasil (R. CARNEIRO)
- 13:45 – 14:00 : Taxonomía, caracterización y distribución de las especies de nemátodos (*Meloidogyne*) en Centroamérica (A. HERNANDEZ)
- 14:00 – 14:15 : Control químico y lucha genética en Brasil (W. GONÇALVES)
- 14:15 – 14:30 : Control químico y lucha genética en Hawai (M. SERRACIN)
- 14:30 – 14:45 : Control químico y lucha genética en Centroamérica (F. ANZUETO & A. HERNANDEZ)

- 14:45 – 15:00 : *Café*
- 15:00 – 15:20 : Estudio genético de la resistencia del café a *Meloidogyne konaensis* (M. SERRACIN)
- 15:20 – 15:40 : Estudio genético de la resistencia del café a *Meloidogyne paranaensis* (T. SERA)
- 15:40 – 15:50 : Estudio genético de la resistencia del café a *Meloidogyne arabicida* (B. BERTRAND)
- 15:50 – 16:00 : Estudio genético de la resistencia del café a *Meloidogyne exigua* (F. ANTHONY)
- 16:00 – 17:00 : Foro

**Miércoles 30 de Agosto, 2000**

**3. Selección de variedades de café, asistida por los marcadores moleculares**

- 8:00 – 10:30 : Gira a un cafetal infestado por *M. arabicida* (alrededor de Turrialba)
- 10:30 – 10:50 : *Café*
- 10:50 – 11:05 : Las bases de la Genética molecular (ADN, genes, alelos, ...) (F. ANTHONY)
- 11:05 – 11:25 : Principales marcadores moleculares y utilización de un mapa genético (G. GRAZIOSI)
- 11:25 – 11:45 : Relación entre la introgresión de genes de *C. canephora* y la calidad del café Arabica (B. BERTRAND)
- 11:45 – 12:05 : Método de selección asistida por los marcadores moleculares (P. LASHERMES)
- Almuerzo*
- 13:30 – 15:00 : Foro, síntesis del taller
- 15:00 – 15:20 : *Café*
- 15:20 – ... : Visitas, discusiones, ...



## **Anexo 2: Lista y dirección de los participantes**

1. Dra. Maria Elena AGUILAR : CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica  
Tel. +506 558.23.86 / Fax +506 556.15.33  
aguilarm@catie.ac.cr
2. Dr. François ANTHONY : CATIE, Ap. 59, 7170 Turrialba, Costa Rica  
Tel. +506 558.23.89 / Fax +506 556.15.33  
fanthony@catie.ac.cr
3. Dr. Francisco ANZUETO : ANACAFE, 5a Calle 0-50, Zona 14, Edificio Anacafé,  
Ciudad Guatemala, Guatemala  
Tel. +502 363.32.51 / Fax +502 337.41.73  
FranciscoA@anacafe.org
4. Ing. Adrian ARAYA : CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica  
Tel. +506 558.23.83 / Fax +506 556.15.33
5. MSc. Carlos ASTORGA : CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica  
Tel. +506 558.23.85 / Fax +506 556.15.33  
castorga@catie.ac.cr
6. MSc. Benoît BERTRAND : IICA, Ap. 55, 2200 Coronado, San José, Costa Rica  
Tel. +506 238.36.51 / Fax +506 237.19.75  
bertrand86@hotmail.com
7. Ing. Eliecer CAMPOS : CICAFAE, Ap. 131-3009, Santa Barbara, Heredia, Costa  
Rica  
Tel. +506 238.36.51 / Fax +506 260.18.74
8. Dra. Regina CARNEIRO : EMBRAPA, C.P. 02372, 70849-970 Brasília, DF.  
Brasil  
Tel. / Fax +55 61.340.36.60  
recar@cenargen.embrapa.br
9. Ing. Bernal CISNEROS : CICAFAE, Ap. 131-3009, Santa Barbara, Heredia, Costa  
Rica  
Tel. +506 238.36.51 / Fax +506 260.18.74  
bcisneros@icafe.go.cr
10. MSc. Marie-Christine COMBES : IRD, BP 5045, 34032 Montpellier, Francia  
Tel. +33 4.67.41.61.69 / Fax +33 4.67.54.78.00  
M-Christine.Combes@mpl.ird.fr
11. Dr. Marco CRISTANCHO : Cornell University, 3070 Bradfiel Hall, Ithaca NY  
14850, USA  
Tel. +1 607.257.4650 / Fax +1 607.255.6683  
mc245@cornell.edu
12. Ing. Jorge ECHEVERRI : IICA, Ap. 424-1150, San José  
Tel. +506 216.02.59 / Fax. +506 216.02.86  
jechever@iica.ac.cr

13. Dr. Oliveira GUERREIRO FILHO : IAC, Centro de Café - C.P. 28, 13.001-970 Campinas, SP - Brasil  
Tel. +55 19.241.51.88 ext. 370 / Fax +55 19.212.04.58  
oliveiro@cec.iac.br
14. Dr. Wallace GONÇALVES : IAC, Centro de Café - C.P. 28, 13.001-970 Campinas, SP - Brasil  
Tel. +55 19.241.51.88 ext. 370 / Fax +55 19.212.04.58  
wallace@cec.iac.br
15. Prof. Georgio GRAZIOSI : Università deli Studi di Trieste, P.le Valmaura 9, I-34148 Trieste, Italia  
Tel. +39 040.811.876 / Fax +39 040.810.860  
graziosi@univ.trieste.it
16. Dr. Adan HERNANDEZ : PROCAFE, Final Ave. Manuel Gallardo, frente a Monte Sión, Santa Tecla, El Salvador  
Tel. +503 288.30.88 / Fax +503 228.66.69  
procafe@es.com.sv
17. Dr. Philippe LASHERMES : IRD, BP 5045, 34032 Montpellier, Francia  
Tel. +33 4.67.41.61.85 / Fax +33 4.67.54.78.00  
Philippe.Lasherme@mpl.ird.fr
18. Ing. Amauri MOLINA : ANACAFE, 5a Calle 0-50, Zona 14, Edificio Anacafé, Ciudad Guatemala, Guatemala  
Tel. +502 363.32.51 / Fax +502 337.41.73  
amaurim@anacafe.org
19. Dr. German MORENO : CENICAFE, A.A. 2427 Manizales, Colombia  
Tel. +57 68.50.65.50 Ext. 311 / Fax +57 68.50.47.23  
fcgmor@cafedecolombia.com
20. MSc. Xenia PEÑA de MORÁN : PROCAFE, Final Ave. Manuel Gallardo, frente a Monte Sión, Santa Tecla, El Salvador  
Tel. +503 288.30.88 / Fax +503 228.66.69  
procafe@es.com.sv
21. Dr. Luis POCASANGRE : CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica  
Tel. +506 558.23.70 / Fax +506 556.15.33  
lpoca@catie.ac.cr
22. Dr. Huver POSADA : Cornell University, 3070 Bradfiel Hall, Ithaca NY 14850, US  
Tel. +1 607.257.4650 / Fax +1 607.255.6683  
hp19@cornell.edu
23. Ing. Olman QUIRÓS : CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica  
Tel. +506 558.23.96 / Fax +506 556.15.33  
labiotec@catie.ac.cr
24. Dra. Alba Stella RIVEROS : CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica  
Tel. +506 556.64.31 / Fax +506 556.15.33  
asrivero@catie.ac.cr

25. Ing. Carlos Mario RODRÍGUEZ : CICAFAE, Ap. 131-3009, Santa Barbara, Heredia, Costa Rica  
Tel. +506 238.36.51 / Fax +506 260.18.74  
crsolis@icafe.go.cr
26. Dr. Tumoru SERA : IAPAR, C.P. 481, CEP: 86001-970 Londrina, Paraná, Brasil  
Tel. +55 43.376.22.95 / Fax +55 43.376.21.01  
tsera@pr.gov.br
27. Dr. Mario SERRACIN : University of Hawaii 3190 Maile Way, St. John 313  
Honolulu, Hawaii 96822 USA  
Tel. +1 808.956.28.33 / Fax +1 808.956.28.32  
serracin@hawaii.edu
28. MSc. Patrick TOPART : CATIE, Ap. 22, 7170 Turrialba, Costa Rica  
Tel. +506 558.23.84 / Fax +506 556.15.33  
ptopart@catie.ac.cr
29. Dr. Luc VILLAIN : ANACAFE, 5a Calle 0-50, Zona 14, Edificio Anacafé,  
Ciudad Guatemala, Guatemala  
Tel. +502 363.32.51 / Fax +502 337.41.73  
lvillain@anacafe.org
30. Ing. Héctor ZELAYA : IHCAFE, Ba. El Centro, Honduras  
Tel. +504 893.43.80 / Fax +504 883.28.15  
padilla\_mario@hotmail.com