

Identificação e Caracterização de Espécies de *Meloidogyne* em Cafeeiro nos Estados de São Paulo e Minas Gerais Através dos Fenótipos de Esterase e SCAR-Multiplex-PCR

REGINA M. D. GOMES CARNEIRO¹, ONIVALDO RANDIG¹, MARIA RITTA ALVES ALMEIDA¹ & WALLACE GONÇALVES²

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 02372, 70849-970 Brasília, DF, ² Instituto Agronômico de Campinas (IAC)/Centro de Café, CP 28 – CEP 13001-970 Campinas (SP). E-mail para correspondência: recar@cenargen.embrapa.br

Recebido para publicação em 20/06/2005. Aceito em 10/10/2005

Resumo - Carneiro, R.M.D.G., O. Randig, M.R.A. Almeida & W. Gonçalves. 2005. Identificação e caracterização de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiro nos Estados de São Paulo e Minas Gerais através dos fenótipos de esterase e SCAR-Multiplex-PCR

Este estudo incluiu 54 populações de *Meloidogyne* de diferentes áreas cultivadas com café nos Estados de São Paulo e Minas Gerais e possibilitou a identificação das principais espécies de nematóides das galhas, sobretudo em campos do IAC de seleção para resistência de cafeeiros a esses nematóides. Com a utilização da eletroforese, os perfis das esterases confirmaram ser específicos e uma ótima ferramenta para identificação dos nematóides de galhas do cafeeiro: *M. incognita* (Est I1, Rm: 1,0 e Est I2, Rm: 1,55 e 2,05), *M. paranaensis* (Est P1, Rm: 1,36), *M. exigua* (Est E1, Rm: 1,55; E2, Rm: 1,55, 2,05) e uma população pura atípica (Est Br2, Rm: 0,92, 1,02). Outros fenótipos de esterase atípicos foram detectados misturados com as principais espécies. *M. incognita*, *M. paranaensis*, *M. exigua* e *Meloidogyne* sp. foram detectadas nas porcentagens de 42,9, 33,3, 21,4 e 2,4, respectivamente. As populações de *Meloidogyne* apareceram misturadas em 24% das amostras, com a predominância de *M. incognita* e *M. paranaensis*. As mesmas populações de *Meloidogyne* spp. foram analisadas usando os marcadores SCAR em reação de Multiplex-PCR. Essas análises foram realizadas usando seis primers SCAR (inc-K14-F, inc-K14-R, ex-D15-R, ex-D15-F, par-C09-F e par-C09-R) em uma única reação de PCR. O método SCAR-Multiplex-PCR permitiu uma diferenciação precisa das três principais espécies individualizadas ou misturadas, e o seu potencial para aplicação em diagnose de rotina foi confirmado.

Palavras-chave: nematóide de galhas, levantamento, isoenzimas, marcadores moleculares

Summary - Carneiro, R.M.D.G., O. Randig, M.R.A. Almeida & W. Gonçalves. 2005. Identification and characterization of *Meloidogyne* species on coffee from São Paulo and Minas Gerais States of Brazil using esterase phenotypes and SCAR-PCR multiplex.

This study included 54 populations of root-knot nematodes, originating from different coffee fields in São Paulo and Minas Gerais States, Brazil. Consequently, it provided the identification of main species parasitising coffee in these States, especially at IAC- screening areas for resistance to *Meloidogyne* spp. Applying the electrophoretic procedure, esterase phenotypes are confirmed to be species-specific and a good tool for identifying root-knot species from coffee: *M. incognita* (Est I1, Rm: 1.0; Est I2, Rm: 1.05, 1.1), *M. paranaensis* (Est P1, Rm: 1.36), *M. exigua* (Est E1, Rm: 1.55; Est E2, Rm: 1.55, 2.05) and one unknown population (Est Br2, Rm 0.92; 1.02). Other atypical Est phenotypes were detected mixed with the main species. *Meloidogyne incognita*, *M. paranaensis*, *M. exigua* and *Meloidogyne* sp. were detected at percentages of 42.9, 33.3, 21.4 and 2.4, respectively. Mixed populations were found in 24% of the samples with the predominance of *M. incognita* and *M. paranaensis*. The same populations of *Meloidogyne* spp. were analysed using Multiplex PCR amplifications. These analyses were performed using six SCAR primers (inc-K14-F, inc-K14-R, ex-D15-R, ex-D15-F, par-C09-F, and par-C09-R) together in a single PCR reaction. The multiplex PCR

allowed the unambiguous differentiation of the three main species alone or in mixtures and its potential for application in routine diagnostic procedure has been confirmed.

Keywords: Root-knot nematodes, survey, isozymes, molecular markers.

Introdução

Os nematóides do gênero *Meloidogyne* constituem uma ameaça aos cafezais em várias regiões produtoras do mundo. Durante as últimas décadas, estudos de levantamento mostraram uma extensiva gama de espécies capazes de parasitar as raízes do cafeeiro e que a distribuição das espécies diferiam muito de um país ao outro (Campos *et al.*, 1990). Os nematóides de galhas estão amplamente distribuídos em cafezais no Brasil, onde causam grandes perdas aos produtores e à economia do país. Levantamentos recentes realizados em cafezais detectaram a predominância de *M. exigua* Göldi, 1892 em Minas Gerais (V.P. Campos, comunicação pessoal) e um aumento significativo de *M. paranaensis* Carneiro *et al.* 1996 e *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 no Paraná (Krzyzanowski *et al.*, 2001) e São Paulo (Lordello *et al.*, 2001). *Meloidogyne coffeicola* Lordello & Zamith, 1960 foi reportado por muitos anos em cafezais nos Estados do Paraná e de São Paulo. Acredita-se que *M. coffeicola* tenha sido erradicado de muitas plantações durante a renovação dos cafezais, principalmente após a geada de 1975 (Campos *et al.*, 1990). Carneiro *et al.* (2004) sugeriram que as espécies de *Meloidogyne* spp. do cafeeiro do Brasil e de outros países são frequentemente identificadas incorretamente devido ao uso da região perineal e hospedeiros diferenciadores como parâmetros específicos.

Recentemente, um estudo baseado em 18 populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de cafezais de diferentes regiões do Brasil, América Central e E.U.A, estabeleceu a identificação das principais espécies e caracterizou a diversidade genética dos nematóides de galhas do café desses países, com respeito aos fenótipos de esterase, morfologia e polimorfismo molecular (Carneiro *et al.*, 2004). Os fenótipos de esterase (Est) mostraram-se específicos e uma ótima ferramenta para identificar espécies de *Meloidogyne* em café, a saber: *M. incognita* (Est I1, I2), *M. paranaensis* (Est P1, P2), *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949 (Est A2), *M. arabicida* López & Salazar, 1989 (Est AR2), *M. exigua* (Est E1), *M. mayaguensis* Rammah & Hirschmann, 1988 (Est M2) e duas populações desconhecidas, provavelmente novas espécies (Est SA2, SA4). Os padrões perineais foram um critério subjetivo e pouco preciso quando usados isoladamente. Mas, quando usado como um método complementar junto com caracteri-

zação enzimática foi essencial para conferir a consistência morfológica da identificação. As características de machos foram importantes para confirmar a diagnose de algumas espécies que podem ser diferenciadas usando machos. Este é o caso de *M. paranaensis*, *M. konaensis* Eisenback *et al.*, 1994 e *M. incognita*, estudados neste trabalho. Os resultados obtidos com os marcadores tipo RAPD foram consistentes com os fenótipos de esterase e características morfológicas. Baixos níveis de polimorfismo foram detectados em *M. exigua* (8.6%), *M. incognita* (11.2%) e *M. paranaensis* (20.3%). Por outro lado, *M. arenaria* e duas espécies não identificadas, exibiram níveis mais altos de variabilidade intra e inter específicas (34.9 e 29.9%, respectivamente).

Em outro estudo, marcadores espécie – específicos do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) foram identificados para as três principais espécies parasitas do cafeeiro do Brasil (*M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*) e transformados em marcadores tipo SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) (Randig *et al.*, 2002). Recentemente, Randig *et al.* (2004) utilizaram 15 populações de *Meloidogyne* spp. parasitas do cafeeiro no Brasil, América Central e Havaí para validar esses marcadores. Os primers SCAR em condição multiplex-PCR permitiram a identificação correta das três espécies parasitas do café a partir da amplificação de um fragmento de tamanho específico para cada espécie: 562pb para *M. exigua*, 399pb para *M. incognita* e 208pb para *M. paranaensis*. Nenhuma amplificação foi observada para as outras espécies testadas (*M. arabicida*, *M. mayaguensis*, *M. arenaria* e *Meloidogyne* spp.). Os mesmos fragmentos também foram amplificados de maneira específica, quando o DNA de duas ou três espécies foi misturado em diferentes proporções. O nível mínimo para detecção de misturas de espécies foi estimado em 1%. A técnica SCAR multiplex-PCR apresentou interesse para identificação de espécies em análises laboratoriais de rotina, permitindo um diagnóstico preciso de um juvenil de segundo estágio (J2), fêmea ou massa de ovos; relativamente rápido e de fácil interpretação. Foi também, muito sensível na detecção de misturas de espécie, situação muito frequente em condições de campo no Brasil (Randig *et al.*, 2004).

O objetivo deste trabalho foi identificar as espécies de *Meloidogyne* spp. ocorrentes nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, em áreas de seleção de cultivares resistentes do Insti-

tuto Agrônomo de Campinas (IAC), através dos fenótipos das esterases e marcadores SCAR em reação de multiplex-PCR, e validar esses marcadores moleculares para o diagnóstico em análises de rotina.

Material e Métodos

Cinquenta e quatro populações de *Meloidogyne* spp. foram estudadas (Tabela 1) e mantidas em tomateiros (*Lycopersicon esculentum* var. Santa Clara) e cafeeiros (*Coffea arabica* var. Mundo Novo), em condições de casa de vegetação no IAC. Fêmeas foram coletadas, individualmente, a partir de raízes infectadas de tomateiros ou cafeeiros. Para extração dos ovos, foi utilizada a metodologia descrita por Carneiro *et al.*, 2004. Eletroforeses foram realizadas em géis de poli(acrilamida) (11x18 cm, 1mm de espessura) em cuba Permatron CL18, usando a técnica proposta por Carneiro & Almeida (2001). *Meloidogyne javanica* foi usada como referência para as isoenzimas. Os fenótipos de esterase foram designados com uma letra sugestiva das espécies que eles designam e um número que indica a quantidade de bandas.

O DNA genômico foi extraído de alíquotas de 30 a 200 µl de ovos de cada população de *Meloidogyne* spp. de acordo com a metodologia descrita por Randig *et al.* (2002). Os pares de primers SCAR-café (Randig *et al.*, 2002, 2004), definidos para cada uma das três espécies, foram misturados em quantidades equimolares e utilizados em reação multiplex-PCR. As reações foram realizadas em volume final de 25 µl contendo: 5 ng de DNA; 0,5 U da Taq DNA polimerase (Pharmacia Biotechnology & Serviços); 1X tampão de reação Taq DNA polimerase; 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato – dNTPs (Pharmacia Biotec) e 40 pM de cada primer SCAR-café. Para as amplificações foi utilizado um termociclador PTC-100 (MJ Research) programado nas seguintes condições: desnaturação inicial do DNA por 5 min a 94°C; 25 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 64°C, e 1 min a 70°C; e um período final de extensão de 8 min a 70°C. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,4 % e visualizados em luz ultra violeta, após a coloração com brometo de etídio.

Resultados e Discussão

Este trabalho incluiu populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de cafeeiros, de diferentes áreas experimentais, onde o IAC realiza ensaios de seleção de genótipos de cafeeiro

quanto a resistência aos nematóides de galhas. Consequentemente, possibilitou a identificação das principais espécies de nematóides das galhas, presentes nessas áreas nos Estados de São Paulo e Minas Gerais (Tabela 1, Fig. 1). Com a utilização dos perfis das esterases (Fig. 2), pôde-se proceder ao reconhecimento de dois padrões para *M. incognita* (Est I1, Rm 1,0 e Est I2, Rm: 1,55 e 2,05), um padrão para *M. paranaensis* (Est P1, Rm: 1,36), dois padrões para *M. exigua* (Est E1, Rm: 1,55; E2, Rm: 1,55 e 2,05), e uma população atípica (Est Br2, Rm 0,92 e 1,02) (Fig. 2), que ocorreu em apenas uma área. Os perfis de esterase I1 e I2 foram descritos como pertencentes a *M. incognita* por Pais & Abrantes (1989) e Carneiro *et al.* (2002 e 2004) e estão provavelmente correlacionados a duas subespécies de *M. incognita* e recentemente reavaliadas por Randig *et al.* (2002) e Carneiro *et al.* (2004), utilizando técnicas moleculares e morfológicas. Entretanto, esses trabalhos analisaram poucas populações e um estudo detalhado de vários isolados e raças de *M. incognita* do café seria recomendado. O perfil de esterase Br2 (Fig. 2) observado na população P07/03 foi identificada como *Meloidogyne* sp. e é semelhante àquele previamente detectado nas culturas de soja (Castro *et al.*, 2003) e bananeira (Cofcewicz *et al.*, 2004, 2005). Estudos moleculares realizados com os isolados da bananeira, provenientes do Brasil e da Martinica, mostraram que essas duas populações se agruparam com 100% de “bootstrap” com *M. incognita*, mas com 62,4% de polimorfismo, evidenciando ser uma população próxima do grupo *M. incognita*, mas com uma grande variabilidade intraespecífica (Cofcewicz *et al.*, 2004, 2005). Assim, para a identificação a nível específico do fenótipo de esterase Br2, estudos detalhados, quanto à morfologia e morfometria das fêmeas, machos e juvenis do segundo estágio precisam ser realizados.

De uma maneira geral, alguns perfis de esterase atípicos apareceram nos géis de eletroforese misturados com as três principais espécies (Tabela 1). Esses perfis foram designados como *Meloidogyne* sp. e deverão ser purificados e estudados futuramente em maiores detalhes. Dois perfis de esterase (Est E1 e Est E2) foram detectados para *M. exigua* do cafeeiro (Fig. 2), sendo o perfil Est E2 o mais freqüente (Tabela 1). Esses dois perfis foram detectados em levantamentos realizados na Zona da Mata em Minas Gerais, confirmando a maior ocorrência do perfil Est E2 também nessa região (Oliveira *et al.*, 2001). Duas outras populações de *M. exigua* foram estudadas previamente por Carneiro *et al.* (2000): o isolado do cafeeiro (Est E1 b) e isolado da seringueira (Est E1a). Estudos moleculares (PCR-RAPD) com essas duas populações de *M. exigua* mostraram que ambas se agruparam com 100% de

Tabela 1: Identificação de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiros nos estados de São Paulo e Minas Gerais

Amostras	Local	Município	Espécie identificada	
			Eletroforese	SCAR
P01/03	Sítio Vadico (Café enxertado)	Garça, SP	-	-
P02/03	Sítio Vadico – Lavoura Velha (Caixa d'Água)	Garça, SP	<i>M. paranaensis</i> (P1) <i>Meloidogyne</i> sp.*	<i>M. paranaensis</i>
P03/03	Fazenda Boaventura (café enxertado / asfalto)	Gália, SP	<i>M. incognita</i> (I2)	<i>M. incognita</i>
P04/03	Fazenda Santo Antônio – Campo I	Herculândia, SP	<i>M. paranaensis</i> (P1)	<i>M. paranaensis</i> <i>M. incognita</i>
P05/03	Fazenda Santana	Garça, SP	<i>M. incognita</i> (I2)	<i>M. incognita</i>
P07/03	Fazenda São João da Fortaleza	Garça, SP	<i>Meloidogyne</i> sp. (Br2)	<i>M. incognita</i>
P08/03	Estância Audilex	Arco-Iris, SP	<i>M. incognita</i> (I2)	<i>M. incognita</i>
P09/03	Fazenda Primavera	Duartina, SP	<i>M. incognita</i> (I2)	<i>M. incognita</i>
P10/03	Fazenda Santo Antônio (Catuaí velho)	Herculândia, SP	<i>M. paranaensis</i> (P1) <i>Meloidogyne</i> sp.*	<i>M. paranaensis</i>
P11/03	Sítio São Pedro	Iacri, SP	<i>M. incognita</i> (I1)	<i>M. incognita</i>
P12/03	Fazenda Santo Antônio (Piscina)	Herculândia, SP	<i>M. javanica</i> (J3)	<i>M. exigua</i>
P13/03	Fazenda Santo Antônio (Seringueira – café enxertado)	Herculândia, SP	<i>M. incognita</i> (I2) <i>M. paranaensis</i> (P1)	<i>M. incognita</i> <i>M. paranaensis</i>
P15/03	Sítio São Pedro (café enxertado)	Tupã, SP	<i>M. paranaensis</i> (P1) <i>Meloidogyne</i> sp.*	<i>M. paranaensis</i>
P16/03	Fazenda Olhos d'Água	Graça, SP	<i>M. incognita</i> (I2) <i>M. paranaensis</i> (P1)	<i>M. paranaensis</i> <i>M. incognita</i>
P17/03	Fazenda Santo Antônio – Campo II	Herculândia, SP	<i>M. paranaensis</i> (P1)	<i>M. paranaensis</i>
P18/03	Fazenda Boaventura	Gália, SP	<i>M. incognita</i> (I2) <i>M. javanica</i> (J3)	<i>M. incognita</i>
P19/03	Sítio Pesk – Pag	Garça, SP	<i>M. incognita</i> (I2)	<i>M. incognita</i>
P20/03	Fazenda Boa Vista (estacas)	Pompéia, SP	<i>M. paranaensis</i> (P1) <i>Meloidogyne</i> sp.*	<i>M. paranaensis</i>
P21/03	Sítio Santo Antônio (Sumatra)	Garça, SP	<i>M. incognita</i> (I2)	<i>M. incognita</i>
P22/03	Fazenda São José	Iacri, SP	<i>M. paranaensis</i> (P1)	<i>M. paranaensis</i>
P24/03	Sítio São João (café enxertado)	Iacri, SP	-	<i>M. incognita</i>
P25/03	Fazenda São José	Iacri, SP	<i>M. paranaensis</i> <i>M. incognita</i> (I1)	<i>M. paranaensis</i> <i>M. incognita</i>
P26/03	Fazenda Santa Ana (café enxertado)	Marília, SP	<i>M. paranaensis</i> (P1) <i>M. incognita</i> (I1).	<i>M. paranaensis</i>
P27/03	Sítio São João	Garça, SP	<i>M. incognita</i> (I2)	<i>M. incognita</i>
P28/03	Sítio Nossa Senhora Aparecida	Vera Cruz, SP	<i>M. paranaensis</i> (P1)	<i>M. paranaensis</i>
P30/03	Fazenda Consuelo	Gália, SP	<i>M. incognita</i> (I2)	<i>M. incognita</i>
P31/03	Sítio Santo Antônio	Garça, SP	<i>M. incognita</i> (I2)	<i>M. incognita</i>
P32/03	Sítio Jambo	Garça, SP	-	<i>M. incognita</i>

Tabela 1: (continuação)

Amostras	Local	Município	Espécie identificada	
			Elektroforese	SCAR
P33/03	Fazenda Delicia	Cássia dos Coqueiros, SP	<i>M. paranaensis</i> (P1)	<i>M. paranaensis</i>
P34/03	Sítio Ribeirão Fundo	São Sebastião do Paraíso, MG	<i>M. exigua</i> (E2)	<i>M. exigua</i>
P35/03	Fazenda Experimental	São Sebastião do Paraíso, MG	<i>M. exigua</i> (E1)	-
P36/03	Fazenda Santa Lucia	São Tomás de Aquino, MG	<i>M. exigua</i> (E2)	<i>M. exigua</i>
P38/03	Fazenda Mundo Novo	São Tomás de Aquino, MG	<i>M. exigua</i> (E2)	-
P39/03	Fazenda Viradouro	Itirapuã, SP	<i>M. exigua</i> (E1)	-
P40/03	Fazenda Planalto	Ubirajara, Sp	<i>M. paranaensis</i> (P1)	<i>M. paranaensis</i>
P41/03	Fazenda Boa Esperança	Arco Íris, SP	<i>M. incognita</i> (I1) <i>Meloidogyne</i> sp.*	<i>M. incognita</i>
P42/03	Sítio Ipê	Garça, SP	<i>M. incognita</i> (I2) <i>M. exigua</i> (E2)	-
P44/03	Fazenda Túlia	São Sebastião do Paraíso, MG	<i>M. exigua</i> (E2)	<i>M. exigua</i>
P45/03	Fazenda Santo Amaro	São Sebastião do Paraíso, MG	<i>M. exigua</i> (E2)	-
P46/03	Estação Experimental de Ribeirão Preto	Ribeirão Preto, SP	<i>M. exigua</i> (E2)	-
XX/03	Sítio Boa Fé	São Sebastião do Paraíso, MG	<i>M. exigua</i> (E2)	<i>M. exigua</i>
Quiabo	Estação Experimental de Ribeirão Preto	Ribeirão Preto, SP	-	<i>M. incognita</i>
s/código	Fazenda Santana	Ribeirão Corrente, SP.	<i>M. incognita</i> (I1)	<i>M. incognita</i>
s/código	Fazenda Pontal – Gleba 1	Piumhi, MG	<i>M. exigua</i> (E1)	<i>M. exigua</i>
s/código	Fazenda Portal – Gleba 1	Piumhi, MG	-	<i>M. exigua</i>
s/código	Fazenda Santana	Ribeirão Preto, SP	-	<i>M. incognita</i>
01/04	Sítio Pica Pau	Garça, SP	<i>M. incognita</i> (I2)	<i>M. incognita</i>
02/04	Sítio São João	Pacaembu, SP	<i>M. javanica</i> (J3)	<i>M. incognita</i>
03/04	Sítio Santo Antônio	Adamantina, SP	<i>M. incognita</i> (I1) <i>M. paranaensis</i> (P1)	<i>M. paranaensis</i> <i>M. incognita</i>
04/04	Cooperativa Camada, Área experimental	Adamantina, SP	<i>M. paranaensis</i> (P1) <i>M. javanica</i> (J3)	<i>M. paranaensis</i>
05/04	Sítio Santa Marcela	Garça, SP	<i>M. incognita</i> (I2) <i>M. javanica</i> (J3)	<i>M. incognita</i>
06/04	Fazenda Santo Antônio	Herculândia, SP	<i>M. incognita</i> (I2) <i>M. javanica</i> (J3)	<i>M. paranaensis</i> <i>M. incognita</i>
07/04	Fazenda São João	Parapuã, SP	<i>M. paranaensis</i> (P1)	<i>M. paranaensis</i> <i>M. incognita</i>
08/04	Faz. São João – Talhão da entrada	Parapuã, SP	<i>M. paranaensis</i> (P1)	<i>M. paranaensis</i>

* presença de bandas de esterase suplementares

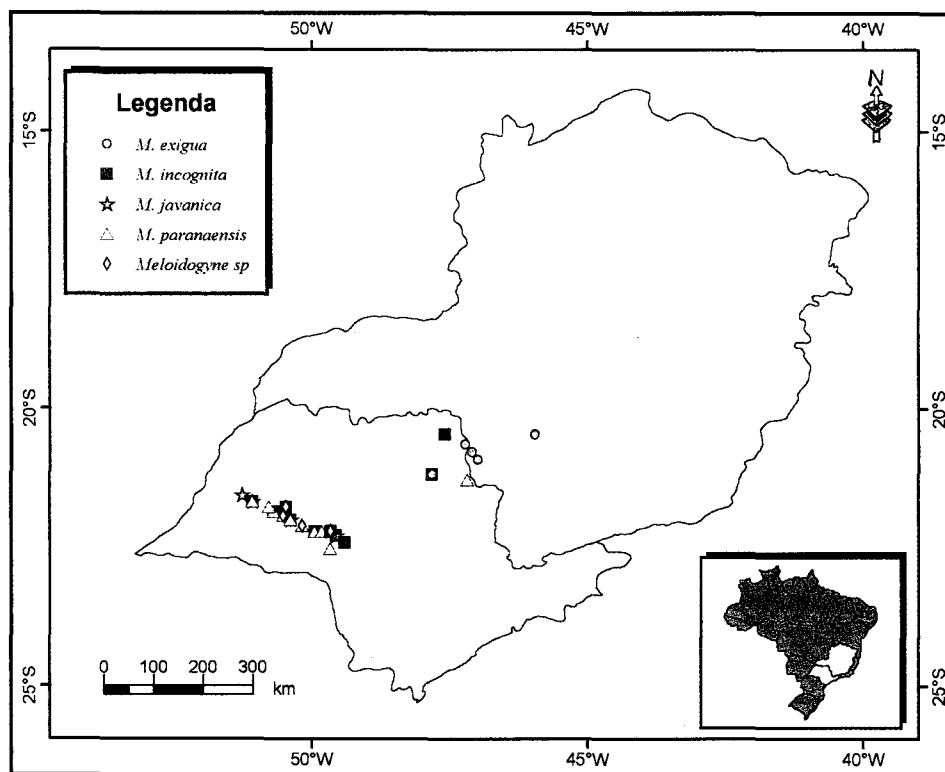


Figura 1. Ocorrência de espécies de *Meloidogyne* em áreas brasileiras produtoras de café dos Estados de São Paulo e Minas Gerais

“bootstrap”, mas com um polimorfismo de cerca de 67,5 % (Randig *et al.*, 2002). A alta variabilidade intraespecífica desses dois isolados de *M. exigua* pode ser explicada pela forma de reprodução, partenogenética meiótica facultativa, que favorece a variabilidade genética da espécie (Tryantaphyllou, 1985). Estudos morfológicos realizados ao microscópio eletrônico de Varredura mostraram que a população de *M. exigua* da seringueira, apresentou características morfológicas muito similares à população de *M. exigua* do caféiro (Santos, 1997), confirmando ser realmente a mesma espécie. Quanto às variações de ordem morfológica, D’Arc de Lima & Ferraz (1985) não encontraram apreciáveis diferenças entre as várias populações estudadas. Entretanto, as populações de *M. exigua* se diferenciam fisiologicamente e apenas algumas populações desse nematóide se reproduziram em tomateiro. Outras o fizeram em caféiro, mas não em seringueira. Algumas infectaram a seringueira, mas não o caféiro e muito poucas populações infectaram ambos os hospedeiros (Santos, 1997).

Duas raças de *M. exigua* do caféiro (raça café e raça tomate e café) (Est E1) (Fig. 2) foram estudadas recentemente por Carneiro *et al.* (2004), através de PCR-RAPD e apresentaram uma alta similaridade genética (cerca de 92 %).

A detecção de *M. javanica* foi feita sempre nos tomateiros plantados ao lado de cafeeiros em casa de vegetação (Tabela 1). Essas populações foram inoculadas em cafeeiros cv. Mundo Novo para confirmação da hospedabilidade e nenhuma reprodução de *M. javanica* foi observada nesses cafeeiros. Esses dados estão de acordo com os observados por Santos (1997) e Oliveira *et al.* (1998).

Meloidogyne incognita, *M. paranaensis*, *M. exigua* e *Meloidogyne* sp. foram detectadas nas porcentagens de 42,9, 33,3, 21,4 e 2,4 %, respectivamente. As populações de *Meloidogyne* apareceram misturadas em 24% das amostras, predominando *M. incognita* e *M. paranaensis* em populações múltiplas (Tabela 1). Outros levantamentos realizados no Estado de São Paulo (Lordello *et al.*, 2001) com técnicas tradi-

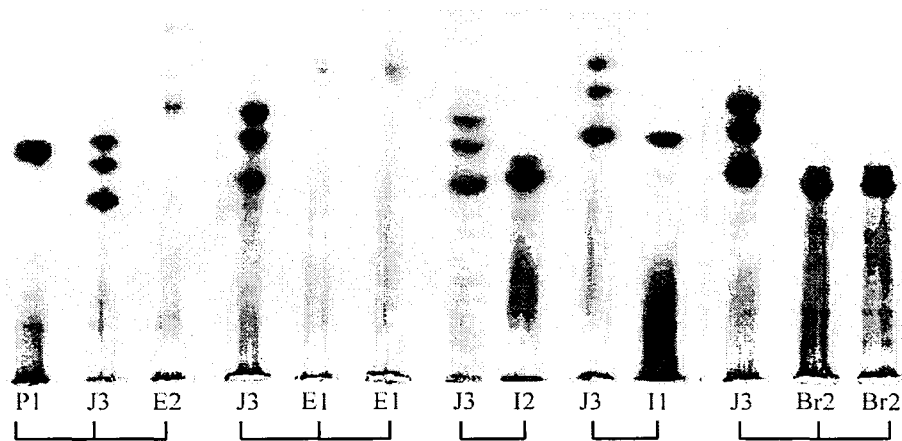


Figura 2. Fenótipos de esterase de populações brasileiras de *Meloidogyne* spp. detectadas em cafeeiros nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Fenótipos P1: *M. paranaensis*, J3: *M. javanica*, E2: *M. exigua*, E1: *M. exigua*, I2: *M. incognita*, I1: *M. incognita*, Br2: *Meloidogyne* sp.

cionais (configuração da região perineal e hospedeiros diferenciadores), detectaram uma ocorrência muito restrita de *M. paranaensis* (apenas 4,8%) e uma alta incidência de *Meloidogyne* sp. (32,2%), mostrando a pouca eficiência dos métodos tradicionais em prospecções de espécies, quando comparadas aos marcadores enzimáticos e moleculares. A detecção de espécies múltiplas, sobretudo *M. incognita* e *M. paranaensis* não foi referida por Lordello *et al.* (2001), pro-

vavelmente devido à grande semelhança dos padrões perineais dessas duas espécies (Carneiro *et al.*, 1996) e à grande variabilidade desses padrões em diferentes subespécies de *M. incognita* (Jepson, 1987, Carneiro *et al.*, 2004).

As mesmas populações de *Meloidogyne* foram analisadas usando os marcadores SCAR (inc-K14-F, inc-K14-R, ex-D15-R, ex-D15-F, par-C09-F e par-C09-R) (Figura 3). O método SCAR-Multiplex-PCR, permitiu uma diferenciação precisa

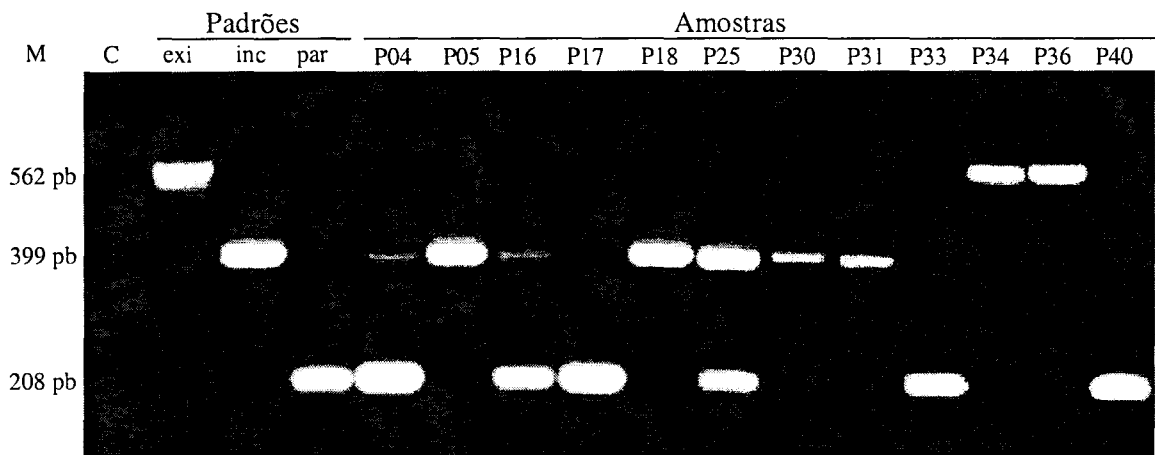


Figura 3. Perfis de amplificação do DNA genômico de doze populações de *Meloidogyne* spp. (códigos apresentados na Tabela 1). Padrões para *M. exigua* (exi), *M. incognita* (inc) e *M. paranaensis* (par). C: reação controle sem DNA. M: Marcador de peso molecular. pb: pares de base.

das três principais espécies através da amplificação de fragmentos específicos de acordo com Randig *et al.* (2002). Com esse método foi possível detectar misturas de espécies nas amostras como já foi demonstrado por Randig *et al.* (2004). A população atípica do cafeeiro (Est Br2) foi identificada como *M. incognita* pelo marcador SCAR. Entretanto, esse marcador não amplificou uma população da bananeira com o mesmo perfil de esterase Br2, proveniente da Martinica (O. Randig, inform. pessoal). Os marcadores SCAR não permitiram a diferenciação entre as duas populações de *M. incognita* (Est I1 e I2) e as duas populações de *M. exigua* (Est E1 e E2). Comparando-se os dois marcadores (enzimático e molecular) pode-se concluir que ambos foram precisos na detecção das espécies. Considerando que as amostras de café provenientes do campo e casa de vegetação, freqüentemente não se encontravam em bom estado de conservação, a utilização desses dois marcadores foi complementar e permitiu a identificação das espécies em praticamente todas as amostras. Deve-se ressaltar também que a extração de ovos para as análises com os marcadores SCAR foi realizada após a extração de fêmeas, ou seja, após uma manipulação intensiva das raízes para a eletroforese, que requer várias fêmeas em bom estado de conservação. Isso sem dúvida, deve ter diminuído um pouco a eficiência do método SCAR, que utilizou os ovos que restaram aderidos ao sistema radicular. O único limite dessa técnica, em levantamentos a campo, é a não detecção de populações diferentes das incluídas no kit, que aparecem como perfis atípicos nas análises enzimáticas. Essas populações devem ser futuramente estudadas e incluídas no Kit – SCAR-Café.

Embora outros autores (Zijlstra, 2000; Zijlstra *et al.* 2000) tenham caracterizado outras espécies de *Meloidogyne*, usando SCAR-PCR, este trabalho foi o primeiro a utilizar esses marcadores em um levantamento a campo, confirmando o seu potencial para aplicação em análise de rotina.

Literatura Citada

- CAMPOS, V.P.; P. SIVAPALAN & N.C. GNANAPRAGASAM. 1990. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: Luc, M., R.A. Sikora & J. Bridge (eds). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Wallingford, UK, CAB International, pp. 387-430.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; M.R.A. ALMEIDA & P. QUÉNÉHERVÉ. 2000. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology*, 2: 645-654.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & M.R.A. ALMEIDA. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira*, 25:35-44.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; M.S. TIGANO; O. RANDIG; M.R.A. ALMEIDA & J.L. SARAH. 2004. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology*, 6(2):287-298.
- CASTRO, J.M.C.; R.D. LIMA & R.M.D.G. CARNEIRO. 2003. Variabilidade isoenzimática de populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de regiões brasileiras produtoras de soja. *Nematologia Brasileira*, 27(1):1-12.
- CHITWOOD, B.G. 1949. Root-knot nematodes – Part I. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 16, 90-104.
- COFCEWICZ, E.T; R.M.D.G. CARNEIRO; P. CASTAGNONE-SERENO & P. QUÉNÉHERVÉ. 2004. Enzyme phenotypes and genetic diversity of root-knot nematodes parasitising *Musa* in Brazil. *Nematology*, 6(1):85-95.
- COFCEWICZ, E.T; R.M.D.G. CARNEIRO; O. RANDIG; C. CHABRIER & P. QUÉNÉHERVÉ. 2005. Diversity of *Meloidogyne* spp. on bananas in Martinique, Guadeloupe and French Guiane. *Journal of Nematology*, 37(3):313-322.
- D'ARC DE LIMA, R. & S. FERRAZ. 1985. Biologia de *Meloidogyne exigua* II Desenvolvimento pós-embriogênico em cafeeiro 'Mundo Novo'. *Revista Ceres*, 32:349-361.
- JEPSON, S.B. 1987. Identification of the root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Commonwealth Agr. Bureau, Farnham Royal. 265p.
- KRZYZANOWSKI, A.A.; R. FIGUEIREDO; D.C. SANTIAGO; L. FAVORETO. 2001. Levantamento de espécies e raças de *Meloidogyne* em cafeeiros no estado do Paraná. In 2º Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil, 24-27 Setembro 2000, Vitória, Brasil. Editado por A. N. da Rocha, J.L.S. Rufino, & W.M. Giusti. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Brasília DF, Brasil. p. 1175-1181.
- LORDELLO, A.I.L.; R. LORDELLO & L.C. FAZUOLLI. 2001. Levantamento de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiros no estado de São Paulo. In 2º Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil, 24-27 Setembro 2000, Vitória

- ria, Brasil. Editado por A. N. da Rocha, J.L.S. Rufino & W.M. Giusti. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Brasília DF, Brazil. P. 1182-1187.
- OLIVEIRA, C.M.G.; R.K KUBO; S.R.ANTEDOMENICO & A.R. MONTEIRO.1998. Reação de cafeeiros a *Meloidogyne javanica* Revista de Agricultura 73 (3): 307-313.
- OLIVEIRA, C.M.G.; A.R. MONTEIRO & W. GONÇALVES. 2001.Espécies de *Meloidogyne* e raças de *M. incognita* em cafezais do Estado de São Paulo. Revista de Agricultura, 76:155-164.
- OLIVEIRA, D.S.; R.D. LIMA; R.D. ROESE; R.V. SILVA. 2001.Caracterização Morfológica e Bioquímica de populações de *Meloidogyne* spp. In 2º Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil, 24-27 Setembro 2000, Vitória, Brasil. Editado por A. N. da Rocha, J.L.S. Rufino, and W.M. Giusti. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Brasília DF, Brasil. p. 1072-1079.
- RANDIG, O.; M. BONGIOVANNI; R.M.D.G CARNEIRO & P. CASTAGNONE-SERENO. 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. Genome, 45:862-870.
- RANDIG, O.; R.M.D.G CARNEIRO & P. CASTAGNONE-SERENO. 2004. Identificação das principais espécies de *Meloidogyne* parasitas do cafeeiro no Brasil com marcadores SCAR-café em Multiplex-PCR.. Nematologia Brasileira, 28(1):1-10.
- SANTOS, J.M. 1997. Estudos das principais espécies de *Meloidogyne* Goeldi que infectam o cafeeiro no Brasil com descrição de *Meloidogyne goeldii* sp.n. Tese de Doutorado em Proteção de Plantas, UNESP-Campus de Botucatu, 153 p.
- TRYANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. In: Sasser, J. N. & C.C Carter (eds). An advanced treatise on *Meloidogyne*: Biology and control. Raleigh: North Carolina State University Graphics, v.1, p. 113-126.
- ZIJLSTRA, C. 2000. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. falax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. European Journal of Plant Pathology, 106:283-290.
- ZIJLSTRA, C., T.H.M. DONKERS – VENNE & M. FARGETTE. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characters amplified region (SCAR) based PCR assay. Nematology, 2(8):847-853.