

## DIVERSIDADE DE POPULAÇÕES DE *Meloidogyne exigua* PROVENIENTES DO CAFEIEIRO

Maria de Fátima S. Muniz<sup>2</sup>, Vicente Paulo Campos<sup>3</sup>, Philippe Castagnone-Sereno<sup>4</sup>, Maria Ritta A. Almeida<sup>5</sup>, Regina M.D.G. Carneiro<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café

<sup>2</sup> Professora Doutora, UFAL – Centro de Ciências Agrárias, mf.muniz@uol.com.br

<sup>3</sup> Professor Doutor -UFLA – Departamento de Fitopatologia, vpcampos@ufla.br

<sup>4</sup> Pesquisador Doutor -INRA, UMR1064 IPMSV, Philippe.Castagnone@sophia.inra.fr

<sup>5</sup> Graduada em Química, EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia, ritta@cenargen.embrapa.br

<sup>6</sup> Pesquisadora Doutora, EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia, recar@cenargen.embrapa.br

**RESUMO:** Estudos isoenzimáticos e técnicas moleculares (SCAR e RAPD-PCR) foram realizados em 15 populações de três raças de *Meloidogyne exigua*, parasitas do cafeeiro no Brasil, Bolívia e Costa Rica e em uma população obtida de seringueira no Brasil. Esses estudos revelaram quatro fenótipos de esterase (E1, E2, E2a e E3) e três de malato-desidrogenase (N1, N1a e N2) para populações de *M. exigua*. O fenótipo enzimático mais comum foi E2N1.

Os primers SCAR ex-D15F/R em condição multiplex-PCR permitiram a identificação de dezesseis populações de *M. exigua*. Análises filogenéticas mostraram alto polimorfismo intra-específico (25,9-59,6%) para todas as populações estudadas. Entretanto, todas se agruparam com 100% de bootstrap, mostrando consistência na identificação da espécie. Em geral, não foi observada nenhuma correlação entre o perfil enzimático, raças e polimorfismo genético para as populações estudadas. A população do nematóide virulenta ao cafeeiro genótipo IAPAR 59, originária de Bom Jesus de Itabapoana, foi um *M. exigua* típico, considerando características morfológicas, citológicas, enzimáticas e moleculares.

**Palavras-Chave:** *Coffea arabica*, isoenzimas, caracterização morfológica, marcadores moleculares, SCAR, RAPD, nematóide das galhas.

## DIVERSITY OF *Meloidogyne exigua* POPULATIONS FROM COFFEE

**ABSTRACT -** Isozymes (esterase and malate dehydrogenase), SCAR and RAPD-PCR were studied in 15 populations of three races of *Meloidogyne exigua*, collected in coffee-producing areas in Brazil, Bolivia and Costa Rica and one population from rubber tree plantations in Brazil. This study revealed four esterase phenotypes (E1, E2, E2a, E3) and three malate dehydrogenase phenotypes (N1, N1a, N2) for *M. exigua* populations. The most common multienzyme phenotype was E2N1. Sixteen populations of *M. exigua* were tested in Multiplex PCR using SCAR primers ex-D15F/R that allowed the identification of all *M. exigua* populations. Phylogenetic analyses showed high intraspecific polymorphism (25.9–59.6%) for all *M. exigua* studied. However, all populations clustered together with 100% of bootstrap showing the consistency of species identification. In general, no correlation was found between enzymatic profile, race and genetic polymorphism of the studied populations. The virulent population from Bom Jesus de Itabapoana is a typical *M. exigua*, considering morphological, cytological, enzymatic and molecular approaches.

**Key words –** *Coffea arabica*, isozymes, morphological characterization, molecular markers, SCAR, RAPD, root-knot nematode.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Meloidogyne* compreende mais de 90 espécies descritas dentre as quais 17 já foram relatadas parasitando o cafeeiro (*Coffea arabica* L.) no mundo (Campos & Villain, 2005). No Brasil, *M. exigua* Göldi, *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood e *M. paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes, Santos & Almeida são consideradas as espécies mais importantes (Campos & Villain, 2005).

Em condição de campo no Noroeste do estado do Rio de Janeiro, Barbosa *et al.* (2004) estimaram perdas de produtividade de até 45% em cafeeiros afetados por *M. exigua*. Essa espécie foi a primeira reconhecida importante economicamente para a agricultura brasileira (Göldi, 1887). *Meloidogyne exigua* está amplamente disseminada em áreas produtoras de café no Brasil tendo sido relatada nos estados de São Paulo, Espírito Santo, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Paraná (Campos & Villain, 2005). Além do cafeeiro, *M. exigua* é também um importante patógeno da seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) no estado do Mato Grosso (Santos *et al.*, 1992).

A extensiva variação morfológica entre as espécies, o grande número de espécies descritas dentro do gênero *Meloidogyne* e a alta variabilidade intra-específica dificultam a identificação e a caracterização dos nematóides das galhas (Hartman & Sasser, 1985). A identificação dessas espécies foi inicialmente baseada em características morfológicas (configuração perineal) e hospedeiros diferenciais (Eisenback *et al.*, 1981). Entretanto, devido à grande variação e subjetividade dessas características, outros critérios taxonômicos que empregam marcadores enzimáticos (esterases) e moleculares (regiões amplificadas de sequência caracterizada - SCAR em multiplex - PCR, DNA-satélite) foram propostos por vários pesquisadores (Cenis, 1993; Carneiro *et al.*, 1996a, 2000, 2004; Zijlstra, 2000; Zijlstra *et al.*, 2000; Fourie *et al.*, 2001; Randig *et al.*, 2002 a, b). Vários estudos têm mostrado que o padrão de esterase permite

distinguir as principais espécies de *Meloidogyne* e é, particularmente, útil para sua identificação. Embora a caracterização das principais espécies de *Meloidogyne* tenha sido alcançada por meio de eletroforese de proteínas ou isoenzimas, essa técnica não pode distinguir raças de uma mesma espécie (Carneiro *et al.*, 1996a; 2000). Randig *et al.* (2002a) estabeleceram marcadores SCAR-PCR para as três principais espécies do nematóide das galhas ocorrentes em cafeeiro no Brasil: *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*. Randig *et al.* (2002a), estudando duas populações de *M. exigua* do cafeeiro e seringueira, mostraram uma variabilidade genética da ordem de 67,5 %, o que é extremamente alto para nematóides da mesma espécie.

Foram objetivos desse trabalho, examinar a variabilidade genética entre populações de *M. exigua* coletadas em diferentes áreas produtoras de café e seringueira no Brasil; verificar qualquer associação possível entre marcadores enzimáticos/molecular e raças em *M. exigua*; validar a especificidade de marcadores SCAR, previamente descritos, para diferentes populações de *M. exigua*; estudar, por meio de caracteres morfológicos, citogenéticos, enzimáticos e moleculares, uma população de *M. exigua* virulenta ao genótipo de cafeeiro 'IAPAR 59'.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Obtenção das populações de *Meloidogyne* spp.

Foram coletadas 21 populações de *Meloidogyne* spp. Treze dessas populações foram provenientes de áreas produtoras de café nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro e uma de raízes de seringueira (Rondonópolis-MT). As populações da Costa Rica e Bolívia foram obtidas da coleção da Embrapa/Cenargen. Foram incluídas quatro populações de *Meloidogyne* do cafeeiro (Brasil e Costa Rica) previamente identificadas por meio de fenótipos de esterase como *M. incognita*, *M. paranaensis* e *M. mayaguensis* e uma de *M. javanica* de tomateiro (Petrolina-PE) como referência nas análises de DNA.

A multiplicação das populações foi efetuada em cafeeiro cv. Catuaí e/ou tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Santa Cruz cv. 'Kada', em casa de vegetação, enquanto a população obtida de seringueira foi mantida nesse hospedeiro.

Para análises das isoenzimas (esterase e malato-desidrogenase) foi empregada a técnica descrita por Carneiro & Almeida (2001) utilizando eletroforese horizontal.

Para a obtenção de ovos, utilizados na extração de DNA, empregou-se o protocolo de Carneiro *et al.* (2004). Para extração, purificação, precipitação e a análise do DNA a metodologia descrita por Randig *et al.* (2002a), utilizando-se 33 primers (Muniz *et al.*, 2008). Para amplificação do SCAR-Multiplex-PCR foram utilizados os pares de primers SCAR e a metodologia descrita por Randig *et al.* (2002a) e Zijlstra *et al.* (2000). Os perfis de DNA amplificados foram convertidos em uma matriz 0-1, a partir da qual foi realizadas uma análise filogenética (parcimônia) usando-se o programa de computação PAUP (Swofford, 1998). Para a população virulenta de Bom Jesus de Itabapoana RJ, foram feitos estudos morfológicos (Eisenback, 1985), citológicos (Triantaphyllou, 1985), enzimáticos e moleculares, de acordo com a metodologia descrita acima.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise das isoenzimas: esterase e malato desidrogenase

Foram identificados quatro fenótipos de esterase (Est) entre as 16 populações de *Meloidogyne* parasitas principalmente de cafeeiro de diferentes áreas produtoras, incluindo uma população da seringueira (Tabela1), que confirmaram a diagnose de *M. exigua*: E1 (Rm 1,5), E2 (Rm 1,5 e 1,9) e um novo padrão designado E3 apresentando duas bandas fracas (Rm 1,7 e 1,8) e uma banda forte (Rm 1,5). A população proveniente de seringueira apresentou um perfil enzimático diferente, com duas bandas (E2a – Rm 1,5 e 1,6).

Foram identificados três fenótipos de malato-desidrogenase (Mdh) entre as populações de *Meloidogyne* parasitas principalmente do cafeeiro de diferentes áreas produtoras, incluindo uma população de seringueira. O fenótipo N1 (Rm 1,0) foi detectado na maioria das populações. Dois fenótipos não conhecidos (N1a, Rm 1,3; N2 Rm 1,0, 1,3) foram observados em quatro populações de *M. exigua*.

### Amplificação SCAR-Multiplex-PCR

As mesmas populações de *Meloidogyne* foram avaliadas empregando-se os marcadores SCAR. Os primers SCAR em condição Multiplex-PCR permitiram a identificação das três espécies de *Meloidogyne* que parasitam o cafeeiro no Brasil e de *M. javanica* a partir da amplificação de um fragmento de tamanho específico para cada espécie: 562 pb para *M. exigua*, 399 pb para *M. incognita*, 208 pb para *M. paranaensis* e 670 pb para *M. javanica*. Nenhuma amplificação foi observada para *M. mayaguensis* (Figura 1).

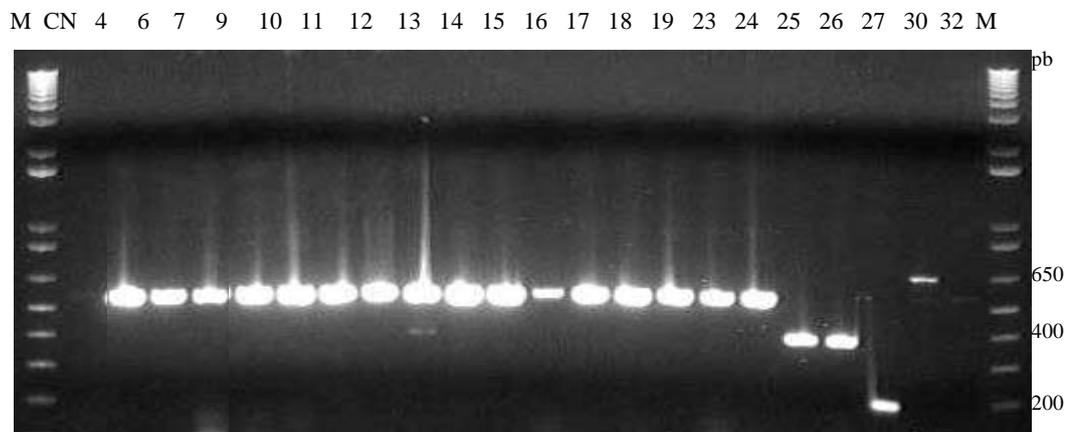
**Tabela 1** – Origem, hospedeiros, fenótipos enzimáticos e identificação de *Meloidogyne* spp.

Origem e código das populações	Nº da população	Reprodução em		Fenótipos enzimáticos		Espécie/Raça
		Café	Tomate	Est	Mdh	
Varginha, MG (7)	1	+	+	E1	N1	<i>M. exigua</i> Raça 2
São Sebastião do Paraíso, MG (4, 16, 17)	3	+	+	E2, E3, E3	N1, N1, N2	<i>M. exigua</i> Raça2
Lavras, MG (13, 14)	2	+, +	+, -	E1, E2	N1	<i>M. exigua</i>  Raças 1, 2
São Francisco do Glória, MG (10)	1	+	+	E1	N1a	<i>M. exigua</i> Raça 2
São Sebastião da Vargem Alegre, MG (9)	1	+	+	E3	N1	<i>M. exigua</i> Raça 2
Canaã, MG (6)	1	+	-	E2	N2	<i>M. exigua</i> Raça 1
Itirapuã, SP (15)	1	+	+	E2	N1	<i>M. exigua</i> Raça2
Campinas, SP (23)	1	+	-	E2	N1	<i>M. exigua</i> Raça 1
Varre-Sai, RJ (18)	1	+	+	E2	N1	<i>M. exigua</i>  Raça 1
Bom Jesus de Itabapoana, RJ (19)	1	+	-	E1	N1	<i>M. exigua</i>  Raça 1
Rondonópolis, MT (24) <sup>1</sup>	1	-	-	E2a	N1	<i>M. exigua</i>  Raça 3
Bolívia (12)	1	+	+	E1	N1	<i>M. exigua</i> Raça 2
Costa Rica (11)	1	+	+	E2	N1	<i>M. exigua</i> Raça 2
Avilândia, SP (25)	1	+	+	I1	N1	<i>M. incognita</i>
Londrina, PR (26)	1	+	+	I2	N1	<i>M. incognita</i>
Londrina, PR (27)	1	+	+	P1	N1	<i>M. paranaensis</i>
Petrolina, PE (30) <sup>2</sup>	1	-	+	J3	N1	<i>M. javanica</i>
Costa Rica (32)	1	+	+	M2	N1	<i>M. mayaguensis</i>

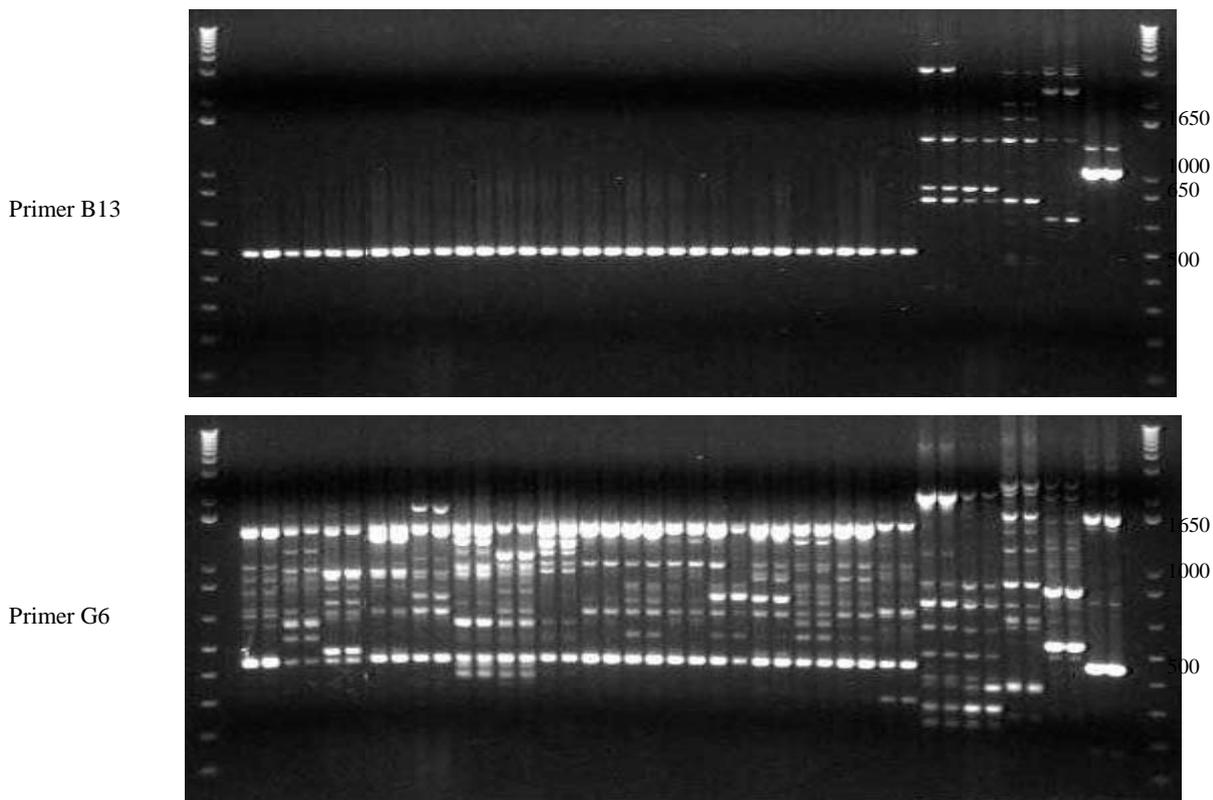
<sup>1</sup>População coletada de seringueira; <sup>2</sup>População coletada de tomateiro. As demais populações foram obtidas de caféiros. Est= esterase, Mdh= malato desidrogenase.

### Análise de RAPD-PCR

Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram a informação de que marcadores moleculares RAPD agrupam espécies de *Meloidogyne*, mas também mostraram alta variabilidade intraespecífica entre as populações de *M. exigua* (Figura 2). A capacidade do método RAPD em detectar polimorfismo depende, também da escolha dos oligonucleotídeos iniciadores que possibilitem revelar maior variabilidade entre as populações em estudo.



**Figura 1.** Perfis de amplificação do DNA extraído a partir de ovos de *Meloidogyne* spp. utilizando os primers SCAR em Multiplex-PCR. M: marcador de peso molecular de 1 Kb; pb: pares de bases; CN: controle negativo. Código das populações fornecido na Tabela 4.

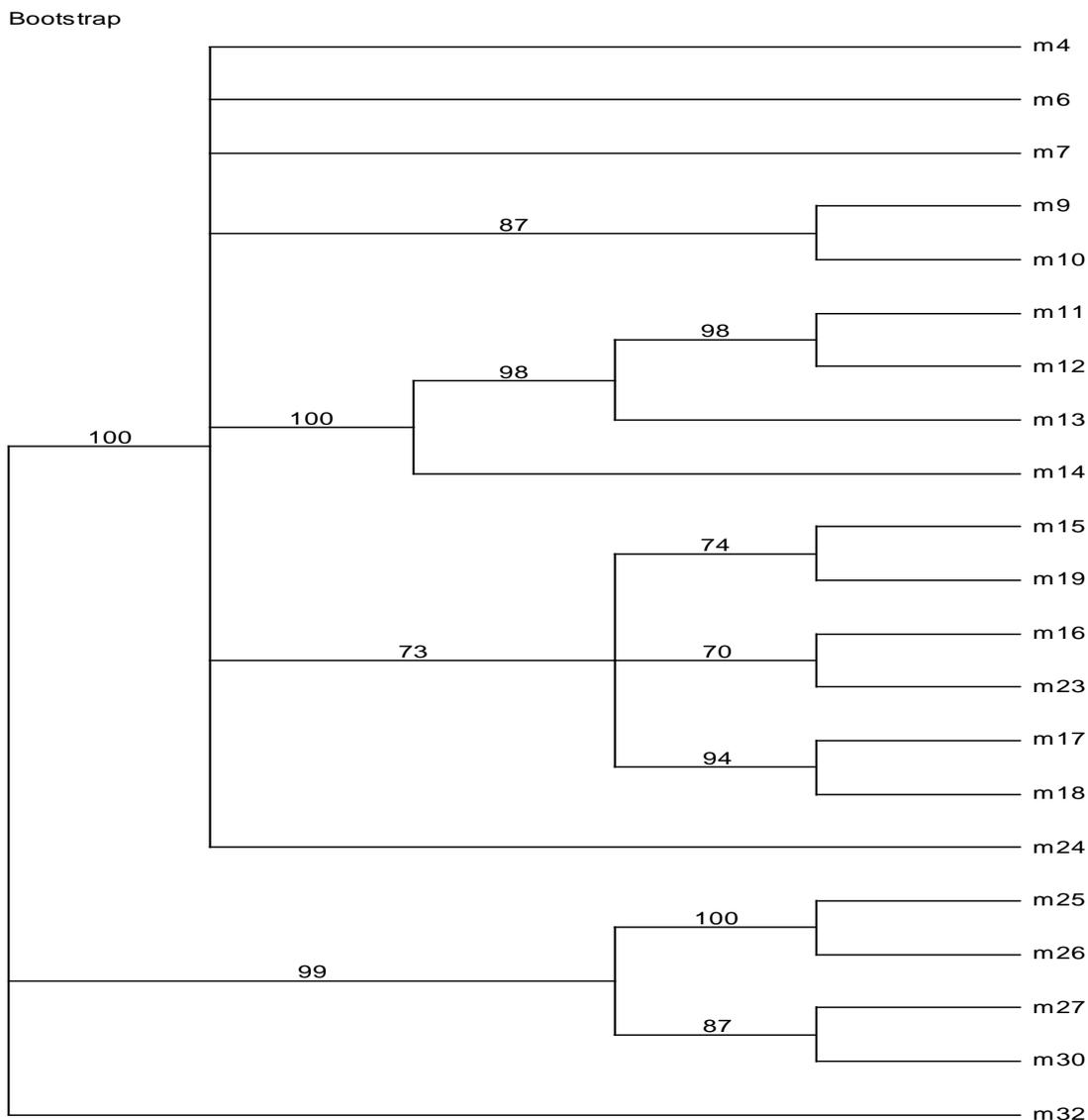


**Figura 2.** Perfis de RAPD para 21 populações de *Meloidogyne* spp. produzidos com os primers B13 e G6. Para cada população duas repetições foram aplicadas lado a lado no gel. M – marcador molecular em pb; CN: controle negativo. Código das populações fornecido na Tabela 4.

### Análise da Variabilidade Genética

Analisando-se o dendograma elaborado a partir dos dados do RAPD (Figura 3) observa-se variabilidade intraespecífica nas diferentes populações de *M. exigua*. Entretanto, as populações obtidas de cafeeiro e de seringueira agruparam-se com 100% de bootstrap, o que indica uma estreita relação neste grupo.

No dendograma, *M. incognita*, *M. paranaensis*, *M. javanica* e *M. mayaguensis* foram analisadas como grupos externos (outgroup). Observa-se que as duas populações de *M. incognita* agruparam-se com 100% de bootstrap na análise de parcimônia, enquanto *M. paranaensis* e *M. javanica* apresentaram-se com 87% bootstrap na referida análise, *Meloidogyne mayaguensis* apresentou-se como um grupo distinto (Figuras 3).



**Figura 3.** Dendograma obtido pelo método da parcimônia, construído a partir da análise de bandas geradas por RAPD-PCR de 21 populações de *Meloidogyne* spp. Percentagens de bootstrap são baseadas em 1000 repetições. As populações de 25-32 foram consideradas como grupos externos (outgroup). Códigos das populações são fornecidos na Tabela 4.

### Estudos morfológicos e citogéticos da população virulenta com relação à variedade ‘IAPAR 59’

Os estudos morfológicos mostraram que a população de Bom Jesus de Itabapoana (Tabela 1) apresentou características típicas de *Meloidogyne exigua* confirmando os resultados prévios do marcador enzimático (Est E1) e molecular Scar 650pb (Figura 1). A fêmea apresentou estilete delicado, 12,5–15,0 µm de comprimento, cone reto, haste cilíndrica, estreitando-se levemente na junção com os nódulos do estilete. A distância do orifício da glândula dorsal esofageana à base dos nódulos do estilete é longa, normalmente 5,0 – 7,5 µm. O padrão perineal da fêmea, a região cefálica dos machos e J2 ao microscópio de luz e MEV foram típicos de *M. exigua*. Todas as avaliações morfométricas de machos, fêmeas foram dentro dos intervalos descritos para *M. exigua* (Eisembach & Tryantaphyllou, 1991). A reprodução dessa população de *M. exigua* foi por partenogênese meiótica com um número de cromossomos haplóide (n=18).

### CONCLUSÕES

Existe grande variabilidade genética em populações de *M. exigua* do cafeeiro provenientes do Brasil ou outros países, caracterizadas por meio de fenótipos enzimáticos e moleculares.

Os marcadores enzimáticos e moleculares foram muito eficientes na identificação de populações diferentes de *M. exigua*.

Não foi observada nenhuma correlação entre o perfil enzimático, raças e polimorfismo genético para as populações estudadas.

A população virulenta não pode ser distinguida das outras através de morfologia, isoenzimas e marcadores moleculares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, D. H. S. G.; VIEIRA, H. D.; SOUZA, R. M.; VIANA, A. P.; SILVA, C. P. Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 49-54, 2004.
- CAMPOS, V. P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee and cocoa. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; Bridge, J. (ed.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. 2. ed. Wallingford, UK: CAB International, 2005. p. 529-579.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v.25, n.1, p. 35-44, 2001.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; CARNEIRO, R. G. Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. **Fundamental and Applied Nematology**, Paris, v. 19, n. 6, p. 555-560, 1996a.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. **Nematology**, Leiden, v. 2, n. 6, p. 645-654, 2000.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; TIGANO, M. S.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M. R. A.; SARAH, J. L. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida:Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. **Nematology**, Leiden, v. 6, n. 2, p. 287-298, 2004.
- CENIS, J. L. Identification of four major *Meloidogyne* spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 1, p. 76-78, 1993.
- EISENBACK, J. D. Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. In: BARKER, K. R.; CARTER, C. C.; SASSER, J. N. (Ed.). **An advanced treatise on Meloidogyne**. Raleigh, NC: North Carolina State University Graphics, 1985. v. 2, p. 79-105.
- EISENBACK, J. D.; HIRSCHMANN, H.; SASSER, J. N.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. **A guide to the four most common species of root-knot nematodes (Meloidogyne species) with a pictorial key**. Raleigh, NC: North Carolina State University Graphics, 1981. 48p.
- EISENBACK, J.D.; TRIANTAPHYLLOU, H.H. Root-knot nematode: *Meloidogyne* species and races. In: Nickle, W.R. (Ed.). **Manual of agricultural nematology**. NY, USA, Marcel Dekker, pp.191-274,1991.
- FOURIE, H.; ZIJLSTRA, C.; McDONALD, A. H. Identification of root-knot nematode species occurring in South Africa using the SCAR-PCR technique. **Nematology**, Leiden, v. 3, n. 7, p. 675-680, 2001.
- GÖLDI, E. A. **Relatório sobre a moléstia do cafeeiro na Província do Rio de Janeiro, 1887**/Emílio Augusto Göldi; reeditado por Romero Marinho Moura. Recife: UFRPE - Fadurpe, 1998, 121p.
- HARTMAN, K. M.; SASSER, J. N. 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. (Ed.). **An advanced treatise on Meloidogyne**. Raleigh, NC: North Carolina State University Graphics, 1985. v. 2, p. 69-77.
- HUSSEY R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter, Beltsville**, v.57, n.12, p.1025-1028, 1973.
- MUNIZ, M.F.S.; CAMPOS, V.P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CASTRO, J.M.C.; ALMEIDA, M.R.A.; CARNEIRO, R.M.D.G. Diversity of *Meloidogyne exigua* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations from coffee and rubber tree. **Nematology**, v. 10, n 6, p.897-910, 2008.
- RANDIG, O.; BONGIOVANNI, M.; CARNEIRO, R. M. D. G.; CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. **Genome**, Ontario, v. 45, n.5, p. 862-870, 2002 a.
- RANDIG, O.; BONGIOVANNI, M., CARNEIRO, R.M.D.G.; SARAH, J.L. & CASTAGNONE-SERENO, P. A species-specific satellite DNA family in the genome of the coffee root-knot nematode *Meloidogyne exigua*: application to molecular diagnostics of the parasite. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v.3, n.6, p.431-437, 2002 b.
- SANTOS, J. M.; MATTOS, C.; BARRÉ, L.; FERRAZ, S. *Meloidogyne exigua*, sério patógeno da seringueira nas plantações E. Michelin, em Rondonópolis, MT. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 16., 1992, Lavras, MG. Anais... Lavras, MG, 1992. p. 75.
- SWOFFORD, D.L. PAUP. Phylogenetic analyses using parsimony (and other methods). Version 4. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1998. 257p.
- TRIANANTAPHYLLOU, A. C. Cytological methods for the study of oogenesis and reproduction of root-knot nematodes. In: BARKER, K. R.; CARTER, C. C.; SASSER, J. N. (Ed.). **An advanced treatise on Meloidogyne**. Raleigh, NC: North Carolina State University Graphics, 1985b. v. 2, p.107-114.

ZIJLSTRA, C. Identification of *Meloidogyne chitwood*, *M. fallax* 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**, Dordrecht, v. 106, n. 3, p. 283-290, 2000.

ZIJLSTRA, C.; DONKERS-VENNE, D. T. H. M.; FARGETTE, M. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays. **Nematology**, Leiden, v. 2, n. 8, p. 847-853, 2000.