

Identificação das Principais Espécies de *Meloidogyne* Parasitas do Cafeiro no Brasil com Marcadores SCAR–Café em Multiplex–PCR

ONIVALDO RANDIG^{1*}, REGINA M. D. GOMES CARNEIRO^{1*} &
PHILIPPE CASTAGNONE-SERENO²

¹ EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Núcleo de Controle Biológico, CP 02372, CEP 70770-900, Brasília, DF, Brasil,
e-mail: recar@cenargen.embrapa.br;

² INRA, Unité Interactions Plantes–Microorganismes et Santé Végétale, BP 167, 06903 Sophia Antipolis Cedex, France.

* Bolsistas do CNPq de Recém-Doutor e Produtividade em Pesquisa

Recebido para publicação em 26/01/2004. Aceito em 07/06/2004

Resumo - Randig, O.; R.M.D.G. Carneiro & P. Castagnone-Sereno. 2004. Identificação das principais espécies de *Meloidogyne* parasitas do cafeiro no Brasil com marcadores SCAR–café em multiplex–PCR.

Os nematóides das galhas, gênero *Meloidogyne*, representam uma das principais pragas para diversas culturas de importância agrícola no Brasil e no mundo. Na cultura do café, um dos principais produtos de exportação do país, ocorrem três espécies principais: *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*, cuja diagnose consome muito tempo e esforço. A identificação correta dessas espécies é de fundamental importância para a escolha de métodos de controle mais adequados. Recentemente, marcadores espécie–específicos do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) foram identificados para essas três espécies e transformados em marcadores tipo SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). O potencial de uso desses marcadores na diagnose foi avaliado em quinze populações de *Meloidogyne* spp. parasitas do cafeiro no Brasil, América Central e Havaí. Os primers SCAR–café em condição multiplex–PCR (Polymerase Chain Reaction) permitiram a identificação correta das três espécies parasitas do café a partir da amplificação de um fragmento de tamanho específico para cada espécie: 562 pb para *M. exigua*, 399 pb para *M. incognita* e 208 pb para *M. paranaensis*. Nenhuma amplificação foi observada para as outras espécies testadas (*M. arabica*, *M. arenaria*, *M. mayaguensis* 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%. Os primers SCAR–café amplificaram igualmente os fragmentos espécie–específicos utilizando ¼ de DNA extraído de uma massa de ovos. A técnica SCAR–Multiplex–PCR apresentou potencial para a identificação de espécies de *Meloidogyne* em análises laboratoriais de rotina, permitindo um diagnóstico preciso a partir de suspensão de ovos ou de massa de ovos. Como vantagens, mostrou ser relativamente rápida, de fácil interpretação e sensível na detecção de misturas de espécies, situação muito frequente em condições de campo no Brasil.

Palavras-chave: nematóide das galhas, marcador molecular, *M. exigua*, *M. incognita*, *M. paranaensis*.

Summary - Randig, O.; R.M.D.G. Carneiro & P. Castagnone-Sereno. 2004. Identification of Brazilian coffee-damaging species of *Meloidogyne* using SCAR–coffee markers in multiplex–PCR.

The root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., are one of the most important pests for several crops in Brazil and worldwide. In coffee plantations in Brazil, *M. exigua*, *M. incognita* and *M. paranaensis* are the most important species, and their identification is very lengthy and difficult. The correct identification of *Meloidogyne* spp. is very important for the choice of more appropriate control methods based on IMP. Recently, specific RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers were identified for these three species and transformed into SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) markers. The diagnostic potential of these markers was tested with fifteen populations of *Meloidogyne* spp. parasites of coffee in Brazil, Central America and Hawaii. The primers SCAR–coffee in multiplex–PCR (Polymerase Chain Reaction) allowed the correct identification of the three most

important species parasitizing coffee by amplification of a specific size fragment for each species: 562 bp for *M. exigua*, 399 bp for *M. incognita* and 208 bp for *M. paranaensis*. No amplification was observed for the other tested species (*M. arabicida*, *M. arenaria*, *M. mayaguensis* and *Meloidogyne* spp.). The same fragments were unambiguously amplified when DNA of two or three species was mixed in different proportions. The minimum level for detection of species mixtures was estimated at 1%. The primers SCAR-coffee amplified the species-specific fragments using 1/4 of extracted DNA of a single egg-mass. The technique SCAR-Multiplex-PCR presents interest for identification of species in routine analyses allowing an exact diagnosis of eggs suspension or egg-mass. This technique is shown to be relatively fast, easy to interpret and very sensitive in the detection of mixture of species, frequently detected in field conditions in Brazil.

Keywords: root-knot nematodes, molecular markers, *M. exigua*, *M. incognita*, *M. paranaensis*.

Introdução

O Brasil é um dos principais produtores / exportadores de café no mundo e uma das principais pragas dessa cultura são os nematóides das galhas pertencentes ao gênero *Meloidogyne*. Atualmente, em torno de 15 espécies já foram descritas como parasitas do cafeiro no mundo (Campos *et al.*, 1990; Carneiro & Almeida, 2000). Mais particularmente no Brasil, as plantações de cafeiro são parasitadas, na maioria dos casos, por três espécies principais: *M. exigua* Goeldi, 1892, *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 e *M. paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes, Santos and Almeida, 1996 (Carneiro & Almeida, 2000; Gonçalves *et al.*, 2000). *Meloidogyne exigua*, exclusivamente presente no continente Americano (Campos *et al.*, 1990), é a espécie mais disseminada em algumas regiões do Brasil, sobretudo em Minas Gerais (Campos *et al.*, 1985). Em São Paulo, *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* e no Paraná, *M. paranaensis* e *M. incognita*, são as espécies predominantes (Lordello *et al.*, 2001; Krzyzanowski *et al.*, 2001). A ocorrência concomitante de *M. incognita* e *M. paranaensis*, parasitando plantas de café, tem sido freqüentemente observada nos campos de produção (R.M.D.G. Carneiro, dados não publicados).

As perdas ocasionadas por essas três espécies implicam em importante queda da produtividade global do café (Guerra Neto *et al.*, 1985; Campos *et al.*, 1990), sendo o controle desses nematóides de grande interesse agronômico. Os métodos de controle alternativos mais respeitosos ao ambiente, como a utilização de variedades resistentes associada a práticas culturais (como a rotação de culturas), são os mais recomendados. Porém, essas estratégias de controle são, na maioria das vezes, espécie-específicas (Carneiro & Carneiro, 1982a, 1982b; Carneiro *et al.*, 1999; Carneiro *et al.*, 2000). Estudo recente identificou o primeiro gene que confere resistência a *M. exigua*, denominado de *Mex-1* (Noir *et al.*, 2003). Fontes de resistência a outras espécies de *Meloidogyne*

também estão sendo investigadas (Gonçalves *et al.*, 1996; Anzueto *et al.*, 2001). Entretanto, as fontes de resistência identificadas até o presente não permitem o controle do conjunto das espécies do nematóide das galhas do cafeiro (Gonçalves, 1992; Campos *et al.*, 1990; Gonçalves & Pereira, 1998; Silvarolla *et al.*, 1998).

Dessa maneira, a identificação correta das espécies de *Meloidogyne* é aspecto muito importante, tanto para os testes de resistência em programas de melhoramento vegetal, como para a escolha de medidas de controle mais adaptadas a cada situação.

Os métodos usuais de identificação de espécies de *Meloidogyne* são baseados em critérios morfológicos (Hirschmann, 1985) e bioquímicos (Esbenshade & Triantaphyllou, 1987; 1990). Em geral, muito trabalhosos e empregados sobretudo para fêmeas. Para fins agronômicos, o ideal seria dispor de método de detecção rápido, aplicável a um só indivíduo, de qualquer estádio de desenvolvimento.

As primeiras técnicas de biologia molecular aplicadas para nematóides fitopatogênicos envolveram a análise do polimorfismo de fragmentos obtido pela digestão do DNA total com enzimas de restrição (RFLPs - Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Curran *et al.*, 1985). Mas foi somente graças a técnica de amplificação de DNA por PCR que uma melhor discriminação interespecífica pode ser obtida e que métodos de diagnóstico foram propostos, como por exemplo, a amplificação de regiões de DNA mitocondrial ou ribossômico (Powers & Harris, 1993; Petersen *et al.*, 1997). Atualmente, numerosas técnicas são disponíveis (Jones *et al.*, 1997), mas sua utilização, na maioria dos casos, permanece limitada aos laboratórios de pesquisa e não são generalizadas para condições de análise de rotina. O método de RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA (Williams *et al.*, 1990; Welsh e McClelland, 1990) tem sido utilizado para muitos estudos, uma vez que é sensível, rápido e relativamente simples, além de não requerer informações acerca da seqüência nucleotídica do DNA genômico.

Uma abordagem mais recente é a conversão dos marcadores de RAPD em SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), termo cunhado por Paran & Michelmore (1993) para definir marcadores RAPD cuja sequência interna tenha sido determinada, permitindo compor primers mais longos, ricos em GC e de sequência específica. Entre as vantagens dos marcadores SCAR, em relação aos de RAPD, destaca-se sua maior reproduzibilidade, pois a técnica RAPD, quando executada sob diferentes condições, tais como qualidade e quantidade do DNA, marcas de enzima e de termociclador, pode apresentar variação no perfil amplificado (Jones *et al.*, 1997). Os marcadores SCAR podem ser utilizados como pontos de referência física do genoma, servindo para mapeamento, ou como marcadores genéticos, quando estão associados a algum genótipo de interesse (Noir *et al.*, 2003; Mienie *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2001; Lecouls *et al.*, 1999).

Nos nematóides das galhas, marcadores SCAR já foram desenvolvidos para identificar duas espécies quarentenárias, *M. chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo and Finley, 1980 e *M. fallax* Karssen, 1996, ou ainda, para separar as três espécies: *M. incognita*, *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 e *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949, presentes principalmente em regiões tropicais e subtropicais ou em plantios em sistema protegido (Zijlstra, 2000; Zijlstra *et al.*, 2000; Fourie *et al.*, 2001).

Mais recentemente, marcadores SCAR espécie-específicos foram definidos para três principais espécies de *Meloidogyne* parasitas do café no Brasil, *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* (Randig *et al.* 2002). Avaliações preliminares, utilizando pequeno número de populações, confirmaram a

amplificação de fragmento específico para cada uma das três espécies estudadas.

Neste estudo, os primers SCAR-café definidos por Randig *et al.* (2002) foram utilizados em reação de multiplex-PCR, com o objetivo de: i) confirmar a sua especificidade testando-os em número maior de espécies e populações do cafeiro; ii) avaliar seu potencial para detectar misturas de espécies e iii) validar seu uso para o diagnóstico em análise de rotina de *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*.

Material e Métodos

Populações de *Meloidogyne* spp. parasitas do café

Quinze populações de *Meloidogyne* spp. parasitas de cafeeiros do Brasil, América Central e Havaí foram estudadas (Tabela 1). As espécies foram inicialmente identificadas pelos fenótipos de esterase a partir de fêmeas jovens (Carneiro & Almeida, 2001). Após identificação, as populações foram multiplicadas em cafeiro (*Coffea arabica* L.) 'Mundo Novo' ou tomateiro (*Lycopersicum esculentum* Mill.) Santa Cruz 'Santa Clara', em casa de vegetação. A extração dos ovos para obtenção de DNA foi feita a partir de raízes infestadas de cafeiro ou tomateiro utilizando o método descrito por Carneiro *et al.* (2004).

Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído de alíquotas de 200 a 300 µL de ovos para cada população de *Meloidogyne* spp. de acordo com a metodologia descrita por Randig *et al.* (2002).

Tabela 1. Populações de *Meloidogyne* spp. parasitas do cafeiro provenientes de diferentes regiões do Brasil, América Central e Havaí (EUA).

Espécies	Código	Origem
<i>M. exigua</i>	ex1	Lavras, MG, Brasil
<i>M. exigua</i>	ex2	Quintino, MG, Brasil
<i>M. incognita</i>	inc1	Santa Tereza, SP, Brasil
<i>M. incognita</i>	inc2	Londrina, PR, Brasil
<i>M. incognita</i>	inc3	Apucarana, PR, Brasil
<i>M. incognita</i>	inc4	Londrina, PR, Brasil
<i>M. paranaensis</i>	par1	La Providencia, Palin, Guatemala
<i>M. paranaensis</i>	par2	Panorama, San Marcos, Guatemala
<i>M. paranaensis</i>	par3	Los Manques, Quezaltenango, Guatemala
<i>M. paranaensis</i>	par4	Havaí, EUA
<i>M. arabica</i>	ara	Juan Vinas, Cartago, Costa Rica
<i>M. arenaria</i>	are	Monte Belo, Santiago Maria, El Salvador
<i>M. mayaguensis</i>	may	Petrolina, PE, Brasil
<i>Meloidogyne</i> sp.	sp1	Cruz Grande, Izalco, El Salvador
<i>Meloidogyne</i> sp.	sp2	El Rosario, Izalco, El Salvador

A extração do DNA a partir de massas de ovos individuais foi realizada conforme metodologia descrita a seguir. Cada massa de ovos foi transferida para microtubos de 1,5 mL e macerada, em nitrogênio líquido, com auxílio de uma pipeta Pasteur de ponta fechada. Em seguida, ao macerado foram adicionados 100 µL de solução NIB (NaCl 100 mM; Tris 30 mM, pH 8; EDTA 10 mM; β-Mercaptoetanol 0,7 µL/mL; Triton (NPHO) 5,6 µL/mL), centrifugado por 2 min a 10000 xg e o sobrenadante descartado. Ao pellet foram adicionados 15 µL de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM, pH 9; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; 0,1% Triton 100 X; BSA 0,2 mg/mL; Proteinase K 120 mg/mL) e após homogeneização, a suspensão foi incubada por 2 h a 55 °C. Em seguida, o volume foi completado para 100 µL com TE 1 X (Tris 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM, pH 8). O DNA obtido foi purificado com um volume de fenol seguido de um volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e precipitado com dois volumes de etanol absoluto por 2hs a -20 °C. O pellet de DNA foi lavado com etanol 70 %, seco e ressuspêndido em 10 µL de água bi-destilada esterilizada.

Amplificação SCAR-multiplex-PCR

Os pares de primers SCAR-café (Tabela 2) utilizados por Randig *et al* (2002) para separar as três espécies de *Meloidogyne*, 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 ou ¼ de DNA de uma massa de ovos; 0,5 U da Taq DNA polimerase (Phoneutria Biotecnologia & Serviços); 1 X tampão de reação Taq DNA polimerase; 200 mM de cada trifosfato de desoxinucleotídeo (dNTPs - Pharmacia Biotech) e 40 pM de cada primer SCAR-café (Invitrogen Life Technologies). 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 8min a 70 °C.

Para testar a sensibilidade de detecção em diferentes níveis de mistura, os DNA de cada ou das três espécies (*M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*) foram utilizados em proporções de 0 a 100 % (Tabela 3) e amplificados em reação de multiplex-PCR.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,4 % e visualizados sob luz ultra violeta após coloração com brometo de etídio.

Resultados

Especificidade de detecção

Inicialmente a especificidade dos primers SCAR-café foi testada em reação de multiplex-PCR utilizando como amostra

Tabela 2. Características dos marcadores SCAR-café desenvolvidos para a detecção de *Meloidogyne exigua*, *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne paranaensis*, segundo Randig *et al.* (2002).

Espécie	Primer	Seqüência do primer	Fragmento amplificado
<i>M. exigua</i>	ex-D15-F	5'CATCCGTGCTGTAGCTCGAG ^{3'}	562 pb
	ex-D15-R	5'CTCCGTGGGAGAAAGACTG ^{3'}	
<i>M. incognita</i>	inc-K14-F	5'GGGATGTGTAATGCTCCTG ^{3'}	399 pb
	inc-K14-R	5'CCCGCTACACCCTCAACTTC ^{3'}	
<i>M. paranaensis</i>	par-C09-F	5'GCCCGACTCCATTGACGGA ^{3'}	208 pb
	par-C09-R	5'CCGTCCAGATCCATCGAAGTC ^{3'}	

Tabela 3. Proporções de DNA genômico de *M. exigua* (ex1), *Meloidogyne incognita* (inc1) e *Meloidogyne paranaensis* (par3) utilizadas para avaliar a sensibilidade dos marcadores SCAR-café na detecção de misturas de espécies.

Espécie	Proporção de DNA de cada espécie na mistura (%)											
	0a*	0b	0c	1a	1b	1c	2a	2b	2c	3a	3b	3c
ex 1	100	0	0	98	1	1	96	2	2	90	5	5
inc 1	0	100	0	1	98	1	2	96	2	5	90	5
par 3	0	0	100	1	1	98	2	2	96	5	5	90

* Os códigos 0a, 0b, 0c, 1a ..., representam as proporções de DNA de cada espécie utilizados nas reações multiplex-PCR, conforme Figura 2.

o DNA genômico de 15 populações parasitas do cafeeiro pertencentes às espécies *M. arabicida* López & Salazar, 1989 (1), *M. arenaria* (1), *M. mayaguensis* Rammah & Hirschmann, 1988 (1), *M. exigua* (2), *M. incognita* (4), *M. paranaensis* (4) e duas populações não identificadas e provavelmente novas (Carneiro *et al.*, 2004). Após eletroforese (Figura 1), foi observada a presença de três fragmentos de peso molecular e distribuição esperados: um fragmento de 562 pb nas populações pertencentes à *M. exigua*, um fragmento de 399 pb nas populações de *M. incognita* e um fragmento de 208 pb nas populações de *M. paranaensis*. Nenhum outro fragmento foi amplificado, independente da espécie ou população testada.

Sensibilidade de detecção em mistura

A sensibilidade de detecção desta metodologia foi testada

com o DNA genômico das três espécies (*M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*) em diferentes níveis de mistura (Figura 2). Independente da proporção utilizada, os fragmentos de cada uma das três espécies foram amplificados especificamente, o que permitiu detectar a presença das diferentes espécies em cada mistura. Além disso, foi possível detectar a presença de cada uma das três espécies consideradas a partir de 1 % de DNA na mistura.

Detecção a partir de uma massa de ovos

A amplificação de marcadores SCAR-café foi avaliada igualmente com o DNA extraído de uma massa de ovos. Amplificações de um fragmento SCAR específico para *M. incognita*, obtido em reação multiplex-PCR, foram observadas em gel de agarose utilizando ¼ do DNA extraído de uma massa

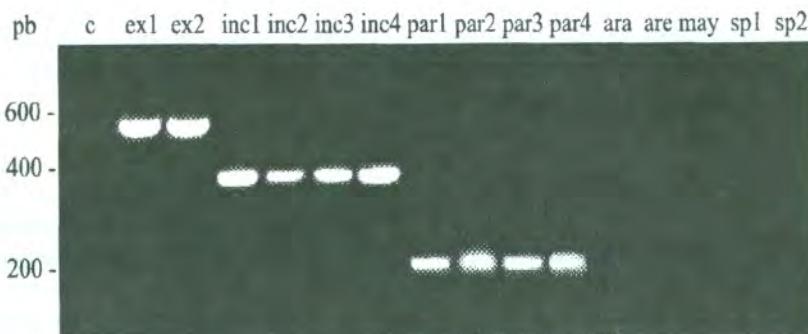


Figura 1. Perfis de amplificação do DNA de 15 populações de *Meloidogyne* spp., parasitas do café no Brasil, América Central e Havaí (EUA), utilizando os primers SCAR-café em multiplex-PCR. pb: pares de bases; c: controle negativo. Os códigos das populações utilizadas estão representados na Tabela 1.



Figura 2. Perfis de amplificação do DNA de *Meloidogyne exigua* (ex1), *M. incognita* (inc1) e *Meloidogyne paranaensis* (par3) puro ou em diferentes proporções na mistura, utilizando os primers SCAR-café em multiplex-PCR. pb: pares de bases; c: controle negativo; 0a, 0b, 0c, 1a ... : os códigos representam as proporções de DNA de cada espécie na mistura, conforme Tabela 3.

de ovos (Figura 3). Fragmentos SCAR-café específicos para *M. exigua* e *M. paranaensis* também foram amplificados a

partir de ¼ do DNA de uma massa de ovos (dados não mostrados).

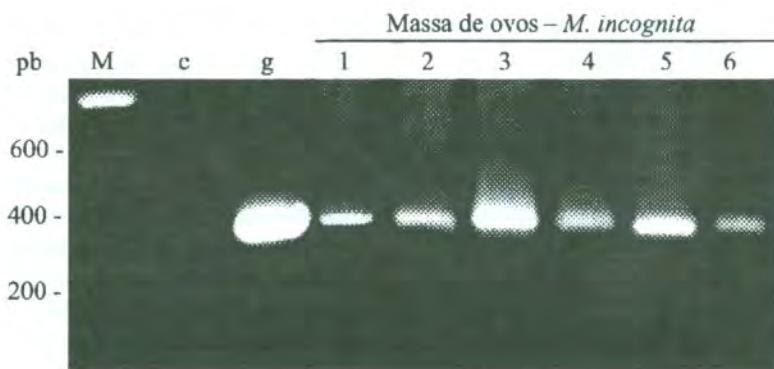


Figura 3. Perfis de amplificação do DNA de massas de ovos (1 a 6) de *Meloidogyne incognita* utilizando os primers SCAR-café em multiplex-PCR. M: marcador de peso molecular (200pb); pb: pares de bases; c: controle negativo; g: controle positivo (DNA de *Meloidogyne incognita* extraído a partir de ovos).

Discussão

Os primers SCAR-café, em condição multiplex-PCR, permitiram a identificação de populações de *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* sem ambigüidade, a partir da amplificação de um único fragmento SCAR específico para cada uma das três espécies. A resposta obtida é do tipo positiva / negativa, detectando diretamente a presença ou ausência da espécie considerada. Na maioria dos casos, o emprego de apenas um critério e/ou técnica de identificação não é suficiente para identificar uma espécie (Quader & Riley, 2002). Segundo Rammah & Hirschmann (1990), a morfologia do estilete dos nematóides, a forma da cabeça do macho e a configuração da região perineal da fêmea constituem critérios estáveis para identificar as principais espécies de *Meloidogyne*. Uma técnica ainda muito utilizada no Brasil para identificação de espécies parasitas do cafeiro é o exame da região perineal de fêmeas. Entretanto, Netscher (1978) e Carneiro *et al.* (2004) relataram que a região perineal de fêmeas pode às vezes levar à identificação pouco precisa de certas espécies, devido a grande variabilidade intraespecífica dessa região e a grande similaridade entre alguns tipos de padrões, como é o caso para *M. incognita* e *M. paranaensis*. Estes métodos são demorados e possuem poder de discriminação limitado, o que implica em problemas de confiabilidade quanto a identificação específica de certas populações de *Meloidogyne* spp. (Campos *et al.*,

1990). Por exemplo, *M. paranaensis* foi considerado, durante mais de dez anos, como patótipo particular de *M. incognita* (Carneiro *et al.*, 1996a). Devido à especificidade de ação dos genes de resistência, esse erro de identificação gerou e gera ainda dificuldades na seleção de genótipos resistentes nos programas de melhoramento de cafeeiros, visando à resistência aos nematóides das galhas.

A utilização de caracteres morfológicos e morfométricos para a identificação de nematóides exige normalmente um tempo de espera dos resultados, o que atrasa ainda mais uma tomada de decisão sobre as medidas de controle a empregar. As diferenças morfológicas são normalmente difíceis de serem observadas e exigem treinamento e boa experiência na área de taxonomia, e muitas vezes, ter a disposição um microscópio eletrônico de varredura (MEV). No caso dos marcadores SCAR, a simples visualização dos produtos de amplificação sobre luz ultra violeta, após eletroforese e coloração com brometo de etídio, é suficiente para obter os resultados sem ambigüidade. Além disso, o resultado pode ser obtido em poucas horas, sendo viável emitir o diagnóstico, mais tardar, em 24 horas.

O procedimento multiplex-PCR foi testado com diferentes populações de *Meloidogyne* parasitas do cafeiro provenientes de diferentes regiões produtoras, incluindo as três principais espécies que ocorrem no Brasil e outras espécies que parasitam o café na América Central e Havaí, porém ainda não detectadas

em nosso país. Em todos os casos, as três espécies foram claramente identificadas. Um número maior de isolados deverá ainda ser testado, em levantamentos a campo, a fim de validar esse método para uso em laboratórios de análise nematológica. Isso se justifica pois, após a definição dos primers SCAR para as três principais espécies tropicais *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. incognita* (Zijlstra *et al.*, 2000), sua utilização posterior mostrou uma amplificação do fragmento "específico" de *M. incognita* em um isolado particular de *M. arenaria* (Fourie *et al.*, 2001).

Trabalhando com um "pool" de DNA genômico, no qual a proporção de cada uma das espécies foi devidamente controlada, os primers SCAR-café, em reação de multiplex-PCR, permitiram detectar seguramente a composição de cada uma delas na mistura. Isto se deve principalmente ao fato de que os primers escolhidos amplificaram um fragmento de peso molecular diferente para cada uma das três espécies. As proporções testadas foram relativamente baixas, mostrando alto grau de sensibilidade do método em detectar misturas, colocando em evidência a presença da espécie a partir da proporção de 1% de DNA. Esse nível de sensibilidade dificilmente seria alcançado se utilizássemos o método bioquímico com caracterização das esterase, visto que neste caso, seriam necessárias, em média, mais de 100 fêmeas, o que tornaria a realização da técnica extremamente demorada. Um outro aspecto importante, é a detecção fácil de *M. exigua*, cujas bandas de esterase são dificilmente observadas, exigindo um grande número de fêmeas para sua visualização (Carneiro *et al.*, 1996b). Com os primers SCAR-café, maior número de análises pode ser realizado, uma vez que se pode trabalhar com um pool de DNA extraído de cada amostra, e não mais com fêmeas individualizadas, como no caso das esterase. Esse método torna-se ainda mais atrativo para o uso em rotina, uma vez que misturas de espécies em condições de campo são freqüentemente observadas. Entretanto, um dos limites da técnica é a não determinação de populações atípicas ou espécies ainda não identificadas, que comumente ocorrem em levantamentos realizados a campo. Nesse caso, como nenhum dos fragmentos específicos das três espécies apareceriam, o resultado indicaria a presença de espécie(s) diferente(s).

Os fragmentos SCAR-café foram igualmente amplificados a partir de 1/4 do DNA de uma massa de ovos. Randig *et al.* (2002) destacaram algumas vantagens dos marcadores SCAR-café, dentre elas que as análises podem ser realizadas a partir de indivíduos em qualquer estádio de desenvolvimento do nematóide, incluindo aqueles provenientes de amostras de solo e de raízes. Os resultados obtidos em nosso estudo ampliam

essas vantagens, mostrando que os fragmentos SCAR-café podem ser amplificados a partir do DNA de uma massa de ovos. Outros métodos de identificação de espécies de *Meloidogyne* a partir de um estádio preciso de desenvolvimento já foram propostos por outros autores (Powers & Harris, 1993; Zijlstra *et al.*, 1995; Zijlstra *et al.*, 1997; Zijlstra *et al.*, 2000). Entretanto, os procedimentos utilizados exigiam, na maioria dos casos, etapas suplementares para diferenciação das espécies, como por exemplo uma digestão dos produtos de amplificação obtidos após PCR, ou a realização de uma segunda etapa de amplificação.

As amplificações resultantes deste trabalho mostraram: i) a especificidade dos primers SCAR-café, quanto testados em condição multiplex-PCR, com diferentes populações das três espécies de nematóides que freqüentemente parasitam o café no Brasil e também com outras espécies que não ocorrem no país; ii) a sensibilidade de detecção de misturas entre as três espécies, utilizando um pool de DNA da amostra (a partir de 1%); iii) a identificação da espécie a partir do DNA obtido de uma massa de ovos; iv) a simplicidade de interpretação dos resultados de amplificação, com resposta do tipo "positiva / negativa".

Considerando os resultados obtidos, indiscutivelmente os primers SCAR-café representam ferramenta potencialmente interessante, dentro da óptica de desenvolvimento de método de identificação simples e confiável para as três principais espécies de *Meloidogyne* que parasitam o cafeeiro. Seu uso na prática permitirá a diagnose para fins de recomendações de controle e para auxiliar nos programas de melhoramento do cafeeiro, visando resistência a *Meloidogyne* spp.. Entretanto, a validação em grande escala dos primers SCAR-café deverá ser realizada, tanto em diferentes laboratórios, bem como com outras populações de *Meloidogyne* spp. do cafeeiro provenientes de diferentes áreas infestadas do país.

Literatura Citada

- ANZUETO, F.; B. BERTRAND; J.I. SARAH; A.B. ESKES & B. DECAZY. 2001. Resistance to *Meloidogyne incognita* in Ethiopian *Coffea arabica* accessions. *Euphytica*, 118:1-8.
- CAMPOS, V.P.; R.D. LIMA & V.F. ALMEIDA. 1985. Nematóides parasitas do cafeeiro. Belo Horizonte, Informe Agropecuário, 11:50-58.
- CAMPOS, V.P.; P. SILVAPALAN & N.C. GNANAPRAGASAM. 1990. Nematodes parasites of coffee, cocoa and

- tea. In : Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Luc, M., Sikora, A. and Bridge, J. (eds). Wallingford, UK, CAB International. p. 387-430.
- CARNEIRO, R.G. & R.M.D.G. CARNEIRO. 1982a. Levantamento preliminar dos nematóides do gênero *Meloidogyne* associados à cultura do café no norte do Paraná, no período de 1978 a 1980. Nematologia Brasileira, 6:133-139.
- CARNEIRO, R.G. & R.M.D.G. CARNEIRO. 1982b. Seleção preliminar de plantas para rotação de culturas em áreas infestadas por *Meloidogyne incognita* nos anos de 1979 e 1980. Nematologia Brasileira, 6:141-148.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & M.R.A. ALMEIDA. 2000. Distribution of *Meloidogyne* spp. on coffee in Brazil: Identification, characterization and intraspecific variability. In : Mejoramiento sostenible del café Arabica por los recursos genéticos, asistido por los marcadores moleculares, con énfasis en la resistencia a los nemátodos. Anthony, F. and Rodríguez, E. (eds). Turrialba, Costa Rica. CATIE/IRD. p. 43-48.
- 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.; R.G. CARNEIRO; I.M.O. ABRANTES; M.S.N.A. SANTOS & M.R.A. ALMEIDA. 1996a. *Meloidogyne paranaensis* a n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), root-knot nematodes parasitizing coffee in Brazil. Journal of Nematology, 28:177-189.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; M.R.A. ALMEIDA & R.G. CARNEIRO. 1996b. Enzyme phenotype of brazilian populations of *Meloidogyne* spp. Fundamental and Applied Nematology, 19:555-560.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; O. RANDIG; L.G. FREITAS & D.W. DICKSON. 1999. Attachment of endospores of *Pasteuria penetrans* to males and juveniles of *Meloidogyne* spp. Nematology, 1:267-271.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; O. RANDIG; R.M.A. ALMEIDA & A.D. CAMPOS. 2000. Resistance of vegetable crops to *Meloidogyne* spp.: Suggestion for a crop rotation system. Nematologia Brasileira, 24:49-54.
- 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, 6:287-298.
- CHITWOOD, B.G. 1949. Root-knot nematodes - Part I. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. Proceedings of Helminthological Society of Washington, 16: 90-104.
- CURRAN, J.; D.L. BAILLIE & J.M. WEBSTER. 1985. Use of restriction fragments length differences in genomic DNA to identify nematode species. Parasitology, 90:137-144.
- ESBENSHADE, P.R. & A.C. TRIANTAPHYLLOU. 1987. Enzymatic relationships and evolution in the genus *Meloidogyne* (Nematoda: Tylenchida). Journal of Nematology, 19:8-18.
- ESBENSHADE, P.R. & A.C. TRIANTAPHYLLOU. 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. Journal of Nematology, 22:10-15.
- FOURIE, H.; C. ZIJLSTRA & H. McDONALD. 2001. Identification of root-knot nematode species occurring in South Africa using the SCAR-PCR technique. Nematology, 3:675-680.
- GOELDI, E.A. 1892. Relatório sobre a moléstia do cafeiro na Província do Rio de Janeiro. Archivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro, 8: 7-123.
- GOLDEN, A.M.; J.H. O'BANNON; G.S. SANTO & A.M. FINLEY. 1980. Description and SEM observations of *Meloidogyne chitwoodi* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode on potato in the Pacific Northwest. Journal of Nematology, 12(4): 319-327.
- GONÇALVES, W. 1992. Melhoramento do cafeiro visando resistência a nematóides. Informe Agropecuario. EPAMIG, Minas Gerais, Brasil. 16:66-72.
- GONÇALVES W.; L.C.C.B. FERRAZ; M.M.A. LIMA & M.B. SILVAROLLA. 1996. Reações do cafeiro às raças 1 2 e 3 de *Meloidogyne incognita*. Summa Phytopathologica, 22:172-177.
- GONÇALVES, W. & A.A. PEREIRA. 1998. Resistência do cafeiro a nematóides IV - Reação de cafeeiros derivados do híbrido de timor a *Meloidogyne exigua*.

- Nematologia Brasiliera, 22:39-50.
- GONÇALVES, W.; M.B. SILVAROLLA; O. GUERREIRO-FILHO; L.C. FAZUOLI, & H.P. MEDINA-FILHO. 2000. Nematóides parasitos (*Meloidogyne* spp) do cafeiro: Manejo genético e químico no Brasil. In : Mejoramiento sostenible del café Arabica por los recursos genéticos, asistido por los marcadores moleculares, con énfasis en la resistencia a los nemátodos. Anthony, F. and Rodríguez, E. (eds). Turrialba, Costa Rica. CATIE/IRD. p. 49-54.
- GUERRA NETO, E.G.; A.M. D'ANTONIO & A.C.F. FREIRE. 1985. Influência do *Meloidogyne exigua* Goldi, 1887, no desenvolvimento de lavouras de *Coffea arabica* L., variedade Novo Mundo. In : XII Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras. Caxambú, Brasil. p. 36-37.
- HIRSCHMANN, H. 1985. The genus *Meloidogyne* and morphological characters differentiating its species. In : Sasser, J. N. and Carter, C. G. (eds). An advanced treatise on *Meloidogyne*. Vol. 1. Biology and control. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics. p. 79-93.
- JONES, C.J.; K.J. EDWARDS; S. CASTAGLIONE; M.O. WINFIELD; F. SALA; C. VAN DE WIEL; G. BREDEMEIJER; B. VOSMAN; M. MATTHES; A. BRETTSCHEIDER; R. BETTINI; M. BUIATTI; E. MAESTRI; A. MALCEVSCHI; N. MARNIROLI; R. AERT; G. VOLCKAERT; J. RUEDA; R. LINACERO; A. VAZQUEZ & A. KARP. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Molecular Breeding, 3:381-390.
- KARSSEN, G. 1996. Description of *Meloidogyne fallax* n.sp. (Nematoda: Heteroderidae), a root-knot nematode from the Netherlands. Fundamental and applied Nematology, 19: 593-599.
- 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: II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Vitória, ES, Brazil. 24-27 setembro, 2001. p.81
- LECOULS, A.C.; M.J. RUBIO-CABETAS; J.C. MINOT; R. VOISIN; A. BONNET; G. SALESSES; E. DIRLEWANGER & D. ESMENJAUD. 1999. RAPD and SCAR markers linked to the Mal root-knot nematode resistance gene in Myrobalan plum (*Prunus cerasifera* Ehr.). Theoretical and applied genetics, 99 (1/2):328-335.
- LÓPEZ, R. & L. SALAZAR. 1989. *Meloidogyne arabicida* sp. n. (Nemata: Heteroderidae) nativo de Costa Rica: un nuevo y severo patógeno del cafeto. Turrialba, 39: 313-323.
- LORDELLO, A.I.L.; R.R.A. LORDELLO & L.C. FAZUOLI. 2001. Levantamento de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiros no estado de São Paulo. In : II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Vitória, ES, Brazil. 24-27 setembro, 2001. p. 81-82.
- MIENIE, C.M.S.; H. FOURIE; M.A. SMIT; J. VAN STADEN & F.C. BOTHA. 2002. Identification of AFLP markers in soybean linked to resistance to *Meloidogyne javanica* and conversion to sequence characterized amplified regions (SCARs). Plant growth regulation 37 (2):157-166.
- NETSCHER, C. 1978. Morphological and physiological variability of species of *Meloidogyne* in West Africa and implications for their control. Meded. Landb Hogesch., Wageningen, 3:1-46.
- NOIR, S.; F. ANTHONY; B. BERTRAND; M.-C. COMBRES & P. LASHERMES. 2003. Identification of a major gene (*Mex-1*) from *Coffea canephora* conferring resistance to *M. exigua* in *Coffea arabica*. Plant Pathology, 52:97-103.
- PARAN, I. & R.W. MICHELMORE. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theoretical and Applied Genetics, 85:985-993.
- PETERSEN, D.J.; C. ZIJLSTRA; V. BLOK & T.C. VRAIN. 1997. Species probes efficiently distinguish root-knot nematodes species using signatures in the ribosomal intergenic spacer. Fundamental and Applied Nematology, 20:619-626.
- POWERS, T.O. & T.S. HARRIS. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. Journal of Nematology, 25:1-6.
- QUADER, M. & I.T. RILEY. 2002. The differential host test, mtDNA and rDNA PCR to distinguish *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* and *M. javanica* from vineyards. In : XL International Congress of Nematology. Tenerife, Canary Islands, Spain. 8-13 June, 2002. Nematology, 4:177.
- RAMMAH, A. & H. HIRSCHMANN. 1988. *Meloidogyne*

- mayaguensis* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode from Puerto Rico. *Journal of Nematology*, 20: 58-69.
- RAMMAH, A. & H. HIRSCHMANN. 1990. Morphological comparison of three host races of *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology*, 22:56-68.
- 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.
- SILVAROLLA, M.B.; W. GONÇALVES & M.M.A. LIMA. 1998. Resistência do cafeeiro a nematóides V - Reprodução de *Meloidogyne exigua* em cafeeiros derivados da hibridação de *Coffea arabica* com *C. canephora*. *Nematologia Brasileira*, 22:51-59.
- WELSH, J. & M. McCLELLAND. 1990. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18:7213-7218.
- WILLIAMS, J.G.K.; A.R. KUBELIK; K.J. LIVAK; J.A. RAFALSKI & S.V. TINGEY. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6531-6535.
- XU, J.; T. NARABU; T. MIZUKUBO & T. HIBI. 2001. A molecular marker correlated with selected virulence against the tomato resistance gene *Mi* in *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, and *M. arenaria*. *Phytopathology*, 91(4):377-382.
- ZIJLSTRA, C. 2000. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *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*, 106:283-290.
- ZIJLSTRA, C.; A.E.M. LEVER; B.J. UENK & C.H. VAN SILFHOUT. 1995. Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *Phytopatology*, 85:1231-1237.
- ZIJLSTRA, C.; B.J. UENK & C.H. VAN SILFHOUT. 1997. A reliable, precise method to differentiate species of root-knot nematodes in mixtures on the basis of ITS-RFLPs. *Fundamental and Applied Nematology*, 20:59-63.
- ZIJLSTRA, C.; D.T.H.M. DONKERS-VENNE & M. FARGETTE. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified regions (SCAR) based PCR assays. *Nematology*, 2:847-853.