

CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA E VARIABILIDADE INTRAESPECÍFICA DOS NEMATÓIDES DE GALHAS DO CAFEIRO NO BRAZIL¹

Regina M. D. Gomes CARNEIRO & Maria Ritta A. ALMEIDA, e-mail:
rekar@cenargen.embrapa.br
EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF,

RESUMO: O perfil de esterase foi altamente polimórfico e foi a técnica mais precisa na identificação das quatro principais espécies de *Meloidogyne* de café no Brasil, *M. incognita*, *M. paranensis*, *M. exigua* and *M. coffeicola*. As bandas secundárias do perfil das esterases forneceram informações para detectar variabilidade intraespecífica entre duas populações de *M. incognita* e três populações de *M. exigua*. A diferenciação de espécies e raças foi possível utilizando o teste de hospedeiros diferenciadores, mas este teste deve ser utilizado junto com os procedimentos morfológicos ou bioquímicos.

PALAVRAS-CHAVE: *Meloidogyne* spp., café, identificação, esterases, variabilidade intraespecífica, hospedeiros diferenciadores

ABSTRACT: Esterase activity was highly polymorphic and was the most precise technique in the identification of the four major species of *Meloidogyne* from coffee in Brazil, *M. incognita*, *M. paranensis*, *M. exigua* and *M. coffeicola*. The minor bands of esterase profiles provided information to detect intraspecific variability among two populations of *M. incognita* and three populations of *M. exigua*. The differentiation of species and races was possible using differential host test, but this test must be used together with morphological or biochemical approaches.

INTRODUÇÃO

Os nematóides das galhas, *Meloidogyne* spp., causam sem dúvida uma das doenças mais importantes do cafeeiro no Brasil (Campos, 1990). Devido a preocupação com o meio ambiente e com a saúde humana, alguns nematicidas, vem sofrendo cancelamentos e mesmo restrições de uso (Hague & Gowen, 1986). Dessa maneira, a implementação de medidas alternativas de controle, tais como resistência varietal, rotações de culturas e controle biológico são imprescindíveis para a manutenção ou aumento da produção agrícola nacional. Para a adoção dessas medidas de manejo é imprescindível uma identificação correta das espécies ou raças em questão. Devido ao carácter polífago, diferenças biológicas ligadas ao parasitismo das espécies ou raças e critérios taxonômicos subjetivos, demorados e pouco práticos, a identificação desses parasitas é até o momento uma tarefa árdua e passível de muitos erros, mesmo para experientes nematologistas.

De uma maneira geral, a identificação dos nematóides se baseia na observação de caracteres morfológicos e morfométricos realizadas ao microscópio ótico e microscópio eletrônico (Eisenback, 1985; Hirschmann, 1985). A aplicação de técnicas bioquímicas (sobretudo esterases) em questões taxonômicas constitui uma segunda etapa na identificação de espécies de *Meloidogyne* spp. e essa técnica vem sendo utilizada como rotina por alguns laboratórios no exterior e no Brasil. Carneiro *et al.* (1996a), estudando 90 populações de *Meloidogyne* spp. de diferentes regiões do Brasil, pode confirmar que essa técnica além de identificar as espécies mais frequentes, possibilitou ainda, a detecção e caracterização de uma espécie nova, *M. paranaensis*, que foi confundida com *M. incognita* durante 22 anos (Carneiro *et al.*, 1996 b).

São objetivos desse trabalho, caracterizar as principais espécies de *Meloidogyne* do cafeeiro, através do polimorfismo das esterases, assim como determinar para as principais espécies e raças a gama de plantas hospedeiras diferenciadoras.

MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e cinco populações de *Meloidogyne* provenientes de cafezais dos Estados do Paraná, São Paulo, Minas Gerais e uma proveniente de seringueira do Estado do Mato Grosso do Sul foram analisadas quanto ao fenótipo das esterases, usando a técnica descrita por Carneiro *et al.* (1996 a). Os fenótipos foram

representados através de letras maiúsculas, indicando a inicial do nome específico, acompanhado por um número que indica o número de bandas (Esbenshade & Triantaphyllou 1985). Para identificação de cada fenótipo e determinação do (RM), o extrato de proteína de *M. javanica* (J3), foi incluído em cada gel. Foram feitos também estudos com hospedeiros diferenciadores, utilizando o método descrito por Hartman & Sasser (1985).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização bioquímica

Através do fenótipo das esterases foi possível diferenciar as espécies mais importantes de *Meloidogyne* de café no Brasil. O fenótipo I1 (Rm 1,0) e I2 (Rm 1,0; 1,1) foram observados em seis populações de *M. incognita* do café. *M. incognita* raças 2 e 3 tiveram o fenótipo I1 e a raça 1 e 4 o fenótipo I2. Até o momento, apenas as raças 1,2 e 3 foram detectadas em café (Campos, 1990). Esta variação poderia estar associada com a variabilidade intraespecífica. Infelizmente, não foi possível diferenciar as raça 2 e 3 das raças 1 e 4 (Carneiro *et al.*, 2000). Resultados similares aos obtidos em eletroforese foram observados por Randig *et al.* (2000), utilizando RAPD e o primer CO9 para as mesmas populações de *M. incognita*. Foi possível diferenciar os mesmos dois grupos de *M. incognita*: raças 1, 4 das raças 2, 3. O fenótipo P1 (Rm 1,4) foi caracterizado em 12 populações de *M. paranaensis* coletadas em cafezais no Estado de Paraná. Este fenótipo é a característica mais útil para diferenciar esta espécie de *M. incognita* em plantação de café no Brasil (Carneiro *et al.*, 1996b; Carneiro *et al.*, 2000).

O fenótipo E1b (Rm 1,6) foi detectado em cinco populações de *M. exigua* isoladas de cafeeiros infestados provenientes de Minas Gerais e o fenótipo E1a em uma população de seringueira proveniente do Mato Grosso do Sul. Para caracterização de *M. exigua* utilizou-se um grande número de fêmeas (>10) maceradas (Carneiro *et al.*, 1996a). Foi possível detectar dois fenótipos de *M. exigua* através das duas bandas secundárias (Rm 1,1 e 1,9) e pela habilidade de uma das populações do café de se reproduzir em tomate (Tabela 1). Essa variabilidade intraespecífica foi confirmada usando a análise de RAPD, primer KO7 (Randig *et al.*, 2000). O fenótipo C2 (Rm 0,5; 1,7) com atividade enzimática alta foi detectado em uma população de *M. coffeicola* isolada de café em Pirajú, Estado de São Paulo (Carneiro *et al.*, 2000).

Identificação através de hospedeiros diferenciadores

Os hospedeiros diferenciadores da Carolina do Norte (Hartman & Sasser, 1985) permitiram a diferenciação das principais espécies de cafeeiro, *M. incognita*, *M. paranaensis*, *M. exigua* e *M. coffeicola*, possibilitando também a caracterização da variabilidade intraespecífica (raças) de *M. incognita* e *M. exigua*. Estes resultados são apresentados na Tabela 1. Embora essa técnica seja precisa, ela não pode ser usada isoladamente. A caracterização isoenzimática ou caracterização morfológica devem acompanhar sempre esses testes com hospedeiros diferenciadores, pois algumas espécies de *Meloidogyne* apresentam a mesma gama de hospedeiros diferenciadores, como é o caso de *M. javanica* e *M. paranaensis*. A utilização pura e simples dessa técnica poderá levar a erros de identificação.

CONCLUSÕES

O perfil das esterases é um método extremamente preciso para a identificação de espécies de *Meloidogyne* do cafeeiro. A presença de bandas secundárias permite a diferenciação intraespecífica de *M. incognita* e *M. exigua*. Embora o teste com hospedeiros diferenciadores também seja uma técnica de identificação precisa, ela deve ser usada concomitantemente com outras técnicas de identificação bioquímica ou morfológica.

| <i>Meloidogyne</i> spp. e raças fisiológicas (R) | Plantas Hospedeiras Diferenciadoras* | | | | | | Hospedeiros Naturais | |
|--|--------------------------------------|--------|------|---------|----------|----------|----------------------|-------------|
| | Algodão | Tomate | Fumo | Pimentã | Melancia | Amendoim | Café | Seringueira |
| <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. exigua</i> R.3 | - | - | - | - | - | - | - | + |
| <i>M. coffeicola</i> | - | - | - | - | - | - | + | - |

*Algodão, Deltapine 61; tomate, Rutgers; fumo, NC95; pimentã, Early California Wonder; melancia, Charleston Gray; amendoim, Florunner; (-) indica um não-hospedeiro, (+) indica um hospedeiro.

Tabela 1. Diferenciação de espécies e raças de *Meloidogyne* spp. do cafeeiro e seringueira, utilizando o teste com hospedeiros diferenciadores (Hartman & Sasser, 1985).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMPOS V. P., P. SIVAPALAN, & N. C. GNANAPRAGASAM. 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. 1990. pp. 113-126.
- CARNEIRO, R.M.D., ALMEIDA, A.R.A. & CARNEIRO, R.G. Enzyme phenotypes of Brazilian isolates of *Meloidogyne* spp. *Fundamental and applied Nematology* 19, 555-560. 1996 a.
- CARNEIRO, R.M.D.G., CARNEIRO, R.G., ABRANTES, I.M.O., SANTOS, M.S.N. & ALMEIDA, M.R.A. *Meloidogyne paranaensis* n.sp. (Nemata: Meloidogynidae) a root-knot nematode parasitizing coffee from Brazil. *Journal of Nematology* 28, 177 - 189. 1996 b.
- CARNEIRO, R.M.D.G., ALMEIDA, M.R. A. & QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology*. 2000. (no prelo).
- EISENBACK, J.D. 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. 1985.
- HAGUE & GOWEN. Principles and practice of nematode control in crops. London Academic Press, p.131-173. 1986.
- HARTMAN, R.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. (Eds). *An advanced treatise on Meloidogyne*. Vol. 2. Methodology. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, pp. 69-77. 1985.
- HIRSCHMANN, H. 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. 1985.
- RANDIG, O., LEROY, F., BONGIOVANNI, M., CARNEIRO, R.M.D.G & CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic polymorphism and relationships of *Meloidogyne* spp. from Brazil. European Society of Nematologists: 25 th International Symposium on Nematology. Herzliya, Israel, pp.38 (abstract). 2000.

AVISO

ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER ADQUIRIDA NOS
SEGUINTE ENDEREÇOS:

FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES

Edifício Sede, s/nº. - Campus Universitário da UFV
Viçosa - MG
Cep: 36571-000
Tels: (31) 3891-3204 / 3899-2485
Fax : (31) 3891-3911

EMBRAPA CAFÉ

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (Final)
Edifício Sede da Embrapa - sala 321
Brasília - DF
Cep: 70770-901
Tel: (61) 448-4378
Fax: (61) 448-4425