

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *PRATYLENCHUS* SPP.

Ednalva Patrícia de Andrade¹; Maria Cristina Rocha Cordeiro²; Vilmar Gonzaga³; Alexandre Goulart⁴; Juvenil Enrique Cares⁵

¹ Bolsista CNPq, Universidade de Brasília, eandrade@unb.br

² Pesquisadora, Embrapa Cerrados, cristina@cpac.embrapa.br

³ Pesquisador, Embrapa Cenargen, vilmar@cenargen.embrapa.br

⁴ Pesquisador, Embrapa Cerrados, goulart@cpac.embrapa.br

⁵ Professor, Universidade de Brasília, cares@unb.br

Introdução

Os nematóides das lesões radiculares são endoparasitas migratórios economicamente importantes. Estão amplamente distribuídos geograficamente e causam necroses em partes subterrâneas em um grande número de culturas de importância econômica para a agricultura brasileira, tais como: soja, cana-de-açúcar, citros, café, milho, algodão, batata e diversas ornamentais (Tenente *et al.*, 2002).

No Brasil e no mundo, esses fitonematóides ocupam o segundo lugar em importância econômica, sendo superados, apenas, pelos nematóides de galha (*Meloidogyne* spp.) (Sasser & Freckman, 1987; Tihohod, 1993). O gênero *Pratylenchus* spp. atualmente conta com 70 espécies válidas. Apesar do grande número de espécies no gênero, apenas seis são mais frequentemente encontradas associadas a diferentes culturas, no Brasil, a saber: *P. brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941, *P. coffeae* (Zimmermann, 1898) Goodey, 1959, *P. jaehni* Insearra *et al.*, 2001, *P. penetrans* (Cobb, 1917) Chitwood & Oteifa, 1952, *P. vulnus* Allen & Jensen, 1951 e *P. zaeae* Graham, 1951 (EMBRAPA, 2007). O diagnóstico da área infestada deve ser acurado e rápido e é essencial para estratégias de manejo.

A identificação de espécies de *Pratylenchus* é realizada usando morfometria e morfologia, o que dificulta a identificação pois, existem poucas diferenças entre as espécies (Figura 1). Técnicas moleculares tem sido desenvolvidas de forma a facilitar esta identificação como por exemplo o PCR-RFLP e a amplificação de fragmentos *primer* específico.

Os objetivos deste trabalho foram demonstrar o uso das técnicas de *Polymerase Chain Reaction* – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) e amplificação de fragmento *primer* específico para diferenciar espécies de *Pratylenchus*.

Os resultados demonstram que ambas metodologias são capazes de diferenciar as espécies. A amplificação por *primer* específico tem o potencial de ser mais rápida.

Resultados e Discussão

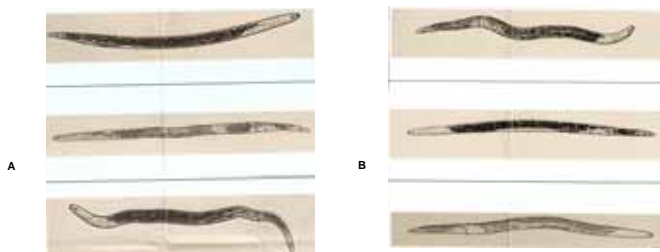


Figura 1. Fotos dos fitonematóides *Pratylenchus* spp. A – *P. brachyurus*; *P. coffeae*; *P. jaehni*. B – *P. zaeae*; *P. penetrans*; *P. vulnus*. Fotos : Gonzaga, 2006.



Figura 2. Esquema que demonstra a região ITS (Internal Transcribed Spacer) amplificada em PCR com posição e seqüências dos primers 18S e 26S utilizados.

Conclusões

A metodologia do PCR-RFLP é eficiente para demonstrar diferenças interespecíficas no gênero *Pratylenchus*.

As diferentes populações de *P. zaeae* e *P. jaehni* estudadas demonstraram ser iguais quando analisadas em PCR-RFLP.

A identificação interespecífica do gênero estudado utilizando os primers específicos selecionados pode ser uma alternativa para um diagnóstico rápido e acurado.

Material e Métodos

Nematóides - Diferentes populações de *Pratylenchus zaeae*, *P. jaehni*, *P. brachyurus* e *P. coffeae* foram obtidas a partir da multiplicação em hospedeiros específicos.

Extração do DNA - O DNA foi extraído de aproximadamente 100 nematóides, usando kit "Dneasy Blood and Tissue", Qiagen e quantificado em espectrofotômetro do tipo nanodrop.

PCR - Um nanograma do DNA foi utilizado para as amplificações em PCR utilizando o supermix (Invitrogene, Inc.), 220 µM dNTP; 0,4 µM primers específicos para as regiões 18S e 28S (Vrain *et al.*, 1992) (Figura 2). As reações foram colocadas em um termociclador (35 ciclos de 94 °C por 1 minuto; 53 °C por 1 minuto; 72 °C por 2 minutos após uma desnaturação inicial de 94 °C por 2 minutos e, por fim uma extensão de 72 °C por 6 minutos). As amostras amplificadas foram analisadas em eletroforese em gel de agarose 1% ou 2% e corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml). Após a corrida o gel foi fotodocumentado em um sistema EDAS 120, kodak.

Para a PCR-RFLP, o produto da PCR foi posteriormente digerido com 15 unidades das enzimas de restrição PstI, Hpa II e HindIII por 20h a 37 °C. O produto da digestão foi separado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O gel foi fotodocumentado em um sistema EDAS 120, kodak e analisado. A digestão dos produtos da PCR com as endonucleases foram repetidos para verificar a reprodutibilidade dos resultados.

Esquema consolidado da reprodução da digestão com a enzima PstI

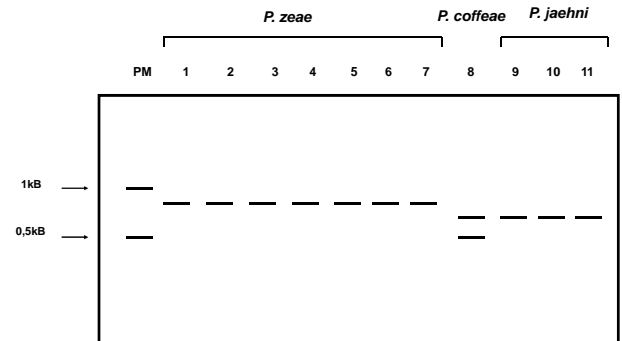
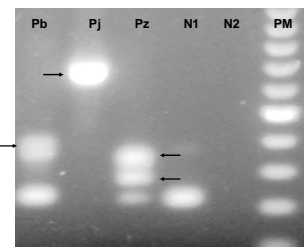


Figura 3 – Análise eletroforética em gel de agarose 2% demonstrando a amplificação específica em amostras monoespecíficas de *Pratylenchus* spp. As setas indicam os fragmentos. Pb- *P. brachyurus*; Pj- *P. jaehni*; Pz- *P. zaeae*; N1, N2-amostras de nematóide de vida livre. PM-marcador de peso molecular 50pb.



Literatura Citada

- GONZAGA, V. Caracterização morfológica, morfométrica e multiplicação in vitro das seis espécies mais comuns de *Pratylenchus* Filipjev, 1936 que ocorrem no Brasil. 2006. 79f. Tese (Doutorado em Agronomia - Produção Vegetal) – Departamento de Produção Vegetal, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2006.
- SASSER, J.N. & FRECKMAN, D.W. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. (eds). Vistas on Nematology. Hyattsville: Society of Nematologists, p.7-14, 1987.
- TENENTE, R. C. V.; GONZAGA, V.; MELO, L. A. M. P.; TENENTE, M. S. M. Bibliografia brasileira de nematóides. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 386 p. (Documentos, 76), 2002.
- TIHOHOD, D. Nematologia agrícola aplicada. Jaboticabal: FUNEP, 372 p., 1993.
- VRAIN, T.C.; WAKARCHUK, D.A.; LEVESQUE, J.C. & HAMILTON, R.I. – Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. Fund. Appl. Nematology, 15: 563-573, 1992.
- WAEYENBERGE L., RYSSA A., MOENS M., PINOCHET J., VRAIN T.C. Molecular characterisation of 18 *Pratylenchus* species using rDNA Restriction Fragment Length Polymorphism. Nematology, 2: 135-142, 2000.