

**Identificação Molecular
do Nematóide
*Pratylenchus brachyurus***



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 210

Identificação Molecular do Nematóide *Pratylenchus brachyurus*

*Maria Cristina Rocha Cordeiro
Alexandre Moura Cintra Goulart
Ana Maria Costa
Ravi Datt Sharma*

Planaltina, DF
2008

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73310-970 Planaltina, DF

Fone: (61) 3388-9898

Fax: (61) 3388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

sac@cpac.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *José de Ribamar N. dos Anjos*

Secretária-Executiva: *Maria Edilva Nogueira*

Supervisão editorial: *Fernanda Vidigal Cabral de Miranda*

Equipe de revisão de texto: *Fernanda Vidigal Cabral de Miranda*

Francisca Elijani do Nascimento

Jussara Flores de Oliveira Arbues

Normalização bibliográfica: *Rosângela Lacerda de Castro*

Editoração eletrônica: *Renato Berlim Fonseca*

Capa: *Renato Berlim Fonseca*

Foto da capa: *Guilherme Asmus*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Sousa*

Alexandre Moreira Veloso

Impresso no Serviço Gráfico da Embrapa Cerrados

1ª edição

1ª impressão (2008): 100 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Cerrados

119 Identificação molecular do nematóide *Pratylenchus brachyurus* / Maria Cristina Cordeiro...[et.al.] - Planaltina, DF: Embrapa Cerrados 2008.

16 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, ISSN 1676-918X ; 210)

1. Parasita. 2. Planta. 3. Solo. I. Cordeiro, Maria Cristina Rocha. II. Série.

632.6257 - CDD 21

© Embrapa 2008

Sumário

Resumo	5
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	9
Conclusões	14
Referências	15

Identificação Molecular do Nematóide *Pratylenchus brachyurus*

*Maria Cristina Rocha Cordeiro*¹; *Alexandre Moura Cintra Goulart*²; *Ana Maria Costa*³; *Ravi Datt Sharma*⁴

Resumo

O gênero *Pratylenchus* abrange cerca de 69 espécies diferentes, tais como *P. zaeae*, *P. jaehni*, *P. penetrans*, *P. thornei*, *P. brachyurus*, entre outras. Essas espécies são endoparasitas migradores, podendo ser parasitas de plantas de importância agrônômica, causando grandes perdas de produção. O *P. brachyurus* já foi observado em diversas culturas no Brasil, tais como batata, soja, algodão, amendoim, guandu, entre outras. A identificação das diferentes espécies do gênero *Pratylenchus* é realizada em nível morfológico por profissionais especializados e é bastante laboriosa. Por isso, a identificação molecular específica é uma estratégia que tem sido buscada nos últimos tempos e tem o potencial de diferenciar a presença dos nematóides em solo infestado. Oligonucleotídeos específicos foram desenhados com base nas seqüências gênicas para o gênero *Pratylenchus* spp. Quatro oligonucleotídeos foram selecionados porque amplificaram de forma específica e reprodutível dois fragmentos em amostras pura e de solo infestado para o *P. brachyurus*. Este trabalho representa mais uma iniciativa de seleção de oligonucleotídeos específicos capazes de amplificar seqüências gênicas para identificar especificamente *P. brachyurus*.

Termos para indexação: diagnóstico, solo, teste.

¹ Bióloga, D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Cerrados, cristina@cpac.embrapa.br

² Engenheiro Agrônomo, D.Sc., Pesquisador da Embrapa Cerrados, goulart@cpac.embrapa.br

³ Engenheira Agrônoma, D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Cerrados, abarros@cpac.embrapa.br

⁴ Engenheiro Agrônomo, Ph.D., Pesquisador aposentado da Embrapa Cerrados, dravidattsharma@hotmail.com

Pratylenchus brachyurus **Nematode Molecular Identification**

Abstract

The genus Pratylenchus cover around 69 different species as P. zeae, P. jaehni, P. penetrans, P. thornei, P. brachyurus, among others. These species are migratory endoparasites and, plant parasites from many agronomic important cultivars producing great yield losses. The P. brachyurus was observed as a plant parasite of many cultivars in Brazil as potato, soybean, cotton, peanut, guar-du bean among others. The identification of different species from Pratylenchus genus is realized at morphological level by specialized professionals and is very time-consuming. Because of that, the specific identification at molecular level is a strategy being used as it has the potencial to differentiate the different species from the genus in soil infested samples. Specific oligonucleotides were designed from characterized Pratylenchus spp. gene sequences. Four oligonucleotides were selected as they specifically and reproducibly amplified two fragments in pure and soil infested samples for the P. brachyurus. This work represent another iniciative to select specific primers capable to amplify gene sequences to identify specifically P. brachyurus.

Index terms: diagnostic, soil, test

Introdução

A família *Pratylenchidae* Thorne, 1949 (SIDDIQI, 1963) contém, pelo menos, oito diferentes gêneros, com aproximadamente 160 espécies diferentes, sendo constituída por nematóides fitoparasitas que são endoparasitas encontrados principalmente nas raízes das plantas infectadas, sendo que a fêmea é móvel (LOOF, 1991). Entre os principais gêneros, encontra-se *Pratylenchus Filipjev*, 1936. Esse gênero abrange cerca de 69 espécies diferentes, entre elas *P. zaeae* Graham, 1951, *P. jaehni* Inserra, Duncan, Troccoli, Dunn, Santos & Vovlas, 2001, *P. penetrans* (Cobb, 1917) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941, *P. thornei* Sher & Allen, 1953 e *P. brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941. Esses nematóides estão distribuídos pelo mundo, são endoparasitas migradores (móveis no interior das plantas e no solo) e infectam plantas de grande importância agrônômica, causando grandes perdas de produção.

A presença de *P. brachyurus* já foi observada em diversas culturas no Brasil, tais como batata, soja, algodão, amendoim, quando (LORDELLO, 1988). Além de causar reduções significativas de produção dessas culturas, também contribui para o aparecimento de infecções fúngicas e(ou) bacterianas secundárias em razão das lesões que causa nas raízes das plantas.

A identificação das diferentes espécies do gênero *Pratylenchus* é realizada por profissionais especializados com base em características morfológicas e morfométricas. Porém, essas características não são evidentes para qualquer profissional e, além disso, há necessidade de um número razoável de espécimes de indivíduos adultos para sua caracterização. A identificação molecular específica é uma estratégia que tem sido buscada nos últimos anos, e tem o potencial de diferenciar as espécies de *Pratylenchus* e identificar a presença desses nematóides em solo infestado, servindo de apoio à diagnose e

manejo em áreas infestadas. A identificação molecular tem sido utilizada visando a facilitar o processo de diagnose e manejo. Algumas estratégias já foram testadas com o objetivo da identificação molecular como, por exemplo, o PCR-RFLP (ORUI, 1996; WAEYENBERGE et al., 2000) e a amplificação com primers específicos (AL-BANNA et al., 2004; MACHADO et al., 2007). As metodologias que estão baseadas na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) têm a vantagem de ter um custo relativamente baixo, serem rápidas, sensíveis e reprodutíveis.

Este trabalho representa mais uma iniciativa que objetivou a seleção de pares de primers específicos capazes de amplificar seqüências gênicas com potencial de identificar especificamente *P. brachyurus*.

Material e Métodos

Nematóides – Os exemplares de *P. brachyurus* foram obtidos de duas amostras de solo cultivado com soja (*Glycine max*) e guandu (*Cajanus cajan*), respectivamente. Duas populações diferentes do nematóide foram estudadas. Os espécimes adultos foram extraídos do solo infestado segundo a técnica descrita por Jenkins (1964), identificados com uso de microscópio ótico e coletados manualmente. Como controle negativo, foram analisadas amostras de solo contendo somente nematóides de vida livre além de amostras que continham outras espécies de nematóides importantes no solo do Cerrado brasileiro como *Meloidogyne spp.*, *Heterodera glycines* e *Rotylenchulus reniformis*.

Extração do DNA dos nematóides – O DNA dos espécimes adultos foi extraído segundo a técnica descrita por Blacke et al. (1992) e Fallas et al. (1996), com modificações. Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro e analisado quanto à sua integridade em reações de RAPD.

Amplificação e análise de fragmentos específicos – Os fragmentos específicos, obtidos como marcadores para a identificação dos nematóides, foram gerados por intermédio da amplificação do tipo PCR, empregando-se primers desenhados a partir do alinhamento de seqüências depositadas em banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>) para todas as espécies analisadas neste estudo e comparadas por meio do programa Clustal W. Cada reação de amplificação constituiu-se de 40 ng de DNA total, 1,5 mM ou 2 mM de MgCl₂, conforme recomendação do fabricante da Taq polimerase, 0,25 μ M de cada primer e 1U de Taq polimerase em tampão apropriado. As amplificações foram efetuadas em termociclador (MJRes.) programado para 45 ciclos de: 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 51 °C ou 60 °C e 2 minutos a 72 °C. Antes dos 45 ciclos, foi realizada uma etapa de desnaturação do DNA por 3 minutos a 94 °C. Após os 45 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final durante 10 minutos a 72 °C. Após essa etapa, os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose a 2 % em TBE (Tris-Borato 100 mM, pH 8,3; EDTA 2 mM) e corados com brometo de etídio (0,5 μ g/ml) (SAMBROOK et al., 1989).

Os níveis de detecção dos fragmentos amplificados por par de primer foram determinados por meio da amplificação do DNA dos nematóides em diferentes concentrações e analisadas em gel de agarose.

Resultados e Discussão

Este trabalho analisou cinco pares de primers específicos para rDNA de *Pratylenchus*, e somente 40 % desses foram considerados positivos para a espécie *P. brachyurus* porque amplificaram um fragmento de forma específica e reproduzível. Na Tabela 1, podem ser observados os parâmetros relacionados a esses pares de primers como a temperatura de anelamento, o tamanho aproximado do fragmento amplificado e a especificidade obtida. Os dois pares de primers que amplificaram um fragmento específico para *P.*

brachyurus são mostrados nas Fig.1 e 2.

Tabela 1. Relação de pares de primers testados para o *Pratylenchus brachyurus*.

Pares de Primer	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho aproximado do fragmento amplificado (pB)	Gene alvo	Especificidade obtida
1	-	-	rDNA	-
2	60	~ 550	rDNA	<i>P.brachyurus</i>
3	-	-	rDNA	-
4	-	-	rDNA	-
5	51	~ 275	rDNA	<i>P.brachyurus</i>

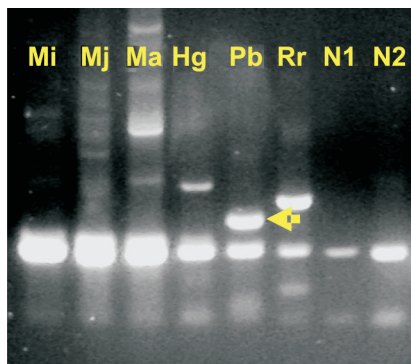


Fig. 1. Análise eletroforética em gel de agarose 2%, demonstrando a amplificação específica com o par de primer 2. A seta indica o fragmento F2; *Mi*- *Meloidogyne* incognita; *Mj*- *M. javanica*; *Ma*- *M. arenaria*; *Hg*- *Heterodera glycines*; *Pb*- *P. brachyurus*; *Rr*- *Rotylenchulus reniformis*; N1 e N2- amostras de nematóides de vida livre.

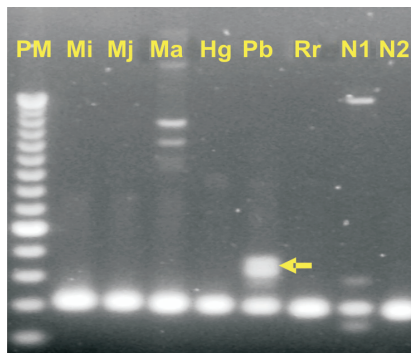


Fig. 2. Análise eletroforética em gel de agarose 2%, demonstrando a amplificação específica com o par de primer 5. A seta indica o fragmento F5; Mi- *Meloidogyne incognita*; Mj- *M. javanica*; Ma- *M. arenaria*; Hg- *Heterodera glycines*; Pb- *P. brachyurus*; Rr- *Rotylenchulus reniformis*; N1 e N2- amostras de nematóides de vida livre; PM- marcador de peso molecular 50 pB.

Nas Fig. 1 e 2, pode ser observado que os fragmentos específicos para *P. brachyurus* não foram amplificados em amostras de DNA de *Meloidogyne spp.*, *Heterodera glycines* e *Rotylenchulus reniformis* e nematóides de vida livre.

Fatores como a alta temperatura de anelamento, a reprodutibilidade interamostra e intra-amostra de nematóides e o fato de não ter amplificado nenhum fragmento reprodutível em amostra de DNA de outras espécies são parâmetros que apontam para a especificidade dos fragmentos amplificados. Porém, para excluir qualquer variabilidade genética entre diferentes populações de *P. brachyurus*, é recomendável a validação dessa amplificação em 10 a 30 populações diferentes e (ou) espécimes individuais, pois os resultados apresentados foram obtidos considerando-se somente duas populações diferentes desse nematóide. Também, faz-se necessária a confirmação, por meio do sequenciamento, da seqüência dos fragmentos amplificados, para confirmar sua homologia com a seqüência original, selecionada em banco de dados (seqüência relacionada com gene rDNA). Essas validações

representam um fator a mais para uma maior confiabilidade do uso desses fragmentos para a identificação molecular específica do nematóide *P. brachyurus*.

A sensibilidade do método foi avaliada por meio da determinação dos níveis de detecção dos fragmentos amplificados em *P. brachyurus*. Esses resultados podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Estudo dos fragmentos com potencial para identificação do *P. brachyurus*.

Fragmento	Nível mínimo de detecção (ng)	Especificidade
F2	10	<i>P. brachyurus</i>
F5	10	<i>P. brachyurus</i>

Os dois pares de primers positivos detectaram fragmentos em amostras que continham até 10 ng de DNA. Considerando que no ensaio do PCR é utilizado 40 ng de DNA, se a amostra é pura, 100 % do DNA é da mesma espécie. Porém, se a amostra é heterogênea, como lavado de solo infestado que contém além do fitoparasita, nematóides de vida livre, pode-se dizer que 10 ng equivale a 25 % do DNA da amostra. Assim, conhecendo-se o número de nematóides total presente na amostra lavada de solo infestado e utilizada para extrair o DNA, é possível estimar a quantidade total de *P. brachyurus* na amostra estudada pelo nível de detecção do fragmento amplificado. Os resultados de nível de detecção que têm o objetivo de quantificar a amostra teste de solo infestado podem ser mais acurados se o fragmento amplificado for quantificado em PCR quantitativo (qPCR). Os resultados obtidos neste trabalho para os níveis de detecção expressam que o ensaio foi bastante sensível para identificar o nematóide. Essa estimativa aponta um caminho de forma a cumprir os dois requisitos básicos, qualitativo e quantitativo para auxiliar o diagnóstico molecular do *P. brachyurus* visando o manejo em áreas infestadas.

Os resultados de nível de detecção do fragmento amplificado foram validados em amostra teste de solo infestado. Essa amostra foi obtida a partir de solo que continha *P. brachyurus* e nematóides de vida livre demonstrando que esse pode detectar o nematóide com cerca de 10 ng na amostra. Nas Fig. 3 e 4 é demonstrada a amplificação positiva na amostra dos fragmentos 2 e 5, respectivamente.

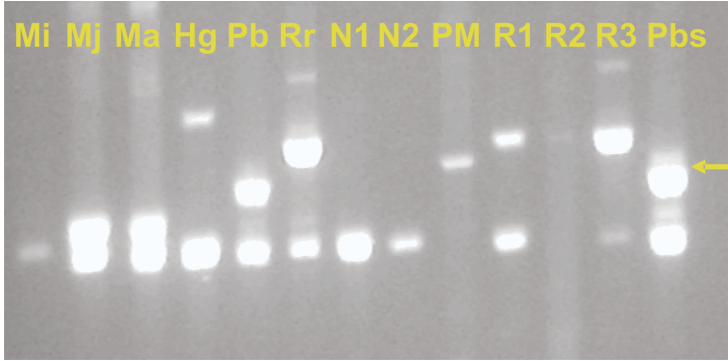


Fig. 3. Análise eletroforética em gel de agarose 2%, demonstrando a amplificação específica com o par de primer 2 em amostra teste. A seta indica o fragmento F2. Mi-*M. incognita*; Mj- *M. javanica*; Ma- *M. arenaria*; Hg- *H. glycines*; Pb- *P. brachyurus*; Rr- *R. reniformis*; N1 e N2- amostras de nematóides de vida livre; R1, R2, R3- amostras de solo com Rr; Pbs- amostra de solo com Pb; PM- marcador de peso molecular 1 Kb.

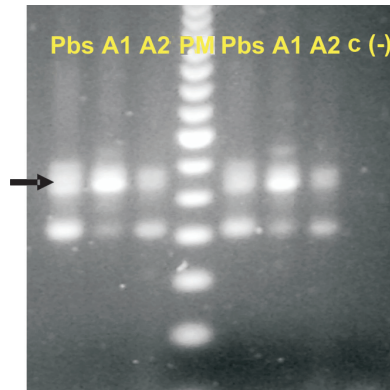


Fig. 4. Análise eletroforética em gel de agarose 2%, demonstrando a amplificação específica com o primer 5 em amostra teste. A seta indica o fragmento F5; A1, A2- amostras puras de *P. brachyurus*; Pbs- amostra de solo com Pb; PM- marcador de peso molecular 50 pb.

Na Fig. 3, pode ser observado também que o par de primer 2 amplifica um fragmento de peso molecular diferente em amostras de solo com *R. reniformis* em amostra do DNA puro e de solo infestado. Esses dois fragmentos são perfeitamente discriminados em gel de agarose a 2 %, pois apresentam pesos moleculares diferentes. Esse resultado demonstra que o par de primer 2 pode identificar também o nematóide *R. reniformis*. Assim, com um mesmo par de primer pode ser possível identificar duas espécies diferentes de fitonematóides em amostras de solo infestado. Já, na Fig. 4, pode ser observada a amplificação positiva pelo par de primer 5 nas duas populações analisadas, bem como, nas amostras teste de solo infestado.

Este trabalho de seleção de primers específicos para o *P. brachyurus* baseado unicamente na reação de PCR representa um fator de impacto a mais com respeito a outras abordagens encontradas na literatura pois, não necessita de etapas subsequentes de digestão enzimática (PCR-RFLP), como tem sido utilizada por outros autores. O estabelecimento de um método diagnóstico em nível molecular de forma qualitativa e quantitativa para esse nematóide fitoparasita representa uma facilidade na rotina do laboratório de nematologia.

Conclusões

Este trabalho selecionou quatro primers que têm o potencial para identificar *P. brachyurus* em amostras puras e de solo infestado.

A validação destes primers pode contribuir para orientar um rápido diagnóstico molecular de *P. brachyurus*. e seu manejo em áreas infestadas.

Referências

- AL-BANNA, L.; PLOEG, A. T.; WILLIAMSON, V. M.; KALOSHIA, I. Discrimination of Six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. **Journal of Nematology**, St. Paul, v. 36, n. 2, p. 142-146, 2004.
- BLACKE, M. C.; DUREAU, N. M.; PUTERKA, G. J.; NECHOLS, J. R.; PETTORINI, J. M. Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homóptera:Aphididae). **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 82, p. 151-159, 1992.
- FALLAS, G. A.; HAHN, M. L.; FARGETTE, M.; BURROWS, P. R.; SARAH, J. L. Molecular and biochemical diversity among isolates of *Radopholus* spp. From different areas of the world. **Journal of Nematology**, St. Paul, v. 28, p. 422-430, 1996.
- JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 48, n. 9, p. 692, 1964.
- LOOF, P. A. A. The family Pratylenchidae Thorne. In: NICKLE, W. R. (Ed.). **Manual of agricultural nematology**. New York: Marcel Dekker, 1991. cap. 8, p. 363-508.
- LORDELLO, L. G. E. **Nematóides das plantas cultivadas**. São Paulo: Nobel, 1988. 197 p.
- MACHADO, A. C. Z.; FERRAZ, L. C. C. B.; OLIVEIRA, C. M. G. Development of a species-specific reverse primer for the molecular diagnostic of *Pratylenchus brachyurus*. **Nematropica**, Auburn, v. 37, p. 249-257, 2007.
- ORUI, Y. Discrimination of the main *Pratylenchus* species (Nematoda:Pratylenchidae) Japan by PCR-RFLP analysis. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 31, n. 4, p. 505-514, 1996.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- WAEYENBERGE, I.; RYSS, A.; MOENS, M.; PINOCHET, J.; VRAIN, T. C. Molecular characterization of 18 *Pratylenchus* species using rDNA restriction fragment length polymorphism. **Nematology**, Leiden, v. 2, n. 2, p. 135-142, 2000.