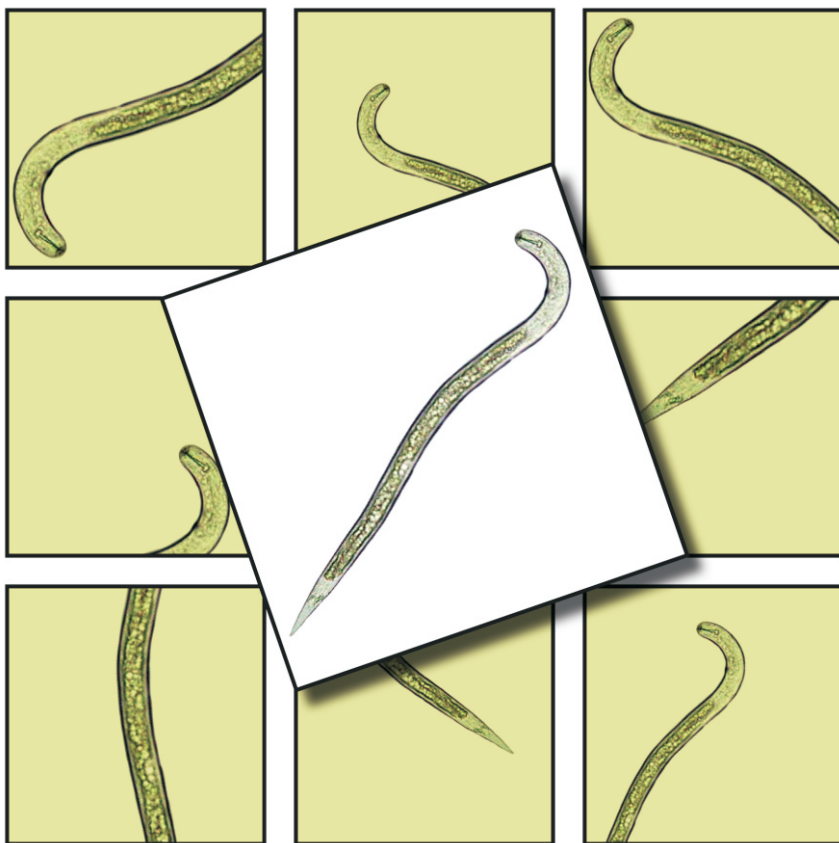


**Identificação Molecular de
Heterodera glycines, o
Nematóide-de-cistos-da-soja**



ISSN 1676-918X

Julho, 2008

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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 211

Identificação Molecular de *Heterodera glycines*, o Nematóide-de-cistos-da-soja

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

Embrapa Cerrados
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: *Fernanda Vidigal Cabral de Miranda,*

Francisca Elijane do Nascimento,

Jussara Flores de Oliveira Arpués

Normalização bibliográfica: *Shirley da Luz Soares Araújo*

Editoração eletrônica: *Fabiano Bastos*

Capa: *Fabiano Bastos*

Fotografia da capa: *Waldir Pereira Dias - Embrapa Soja*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*

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**

-
- I19 Identificação molecular de *Heterodera glycines*, o nematóide-de-cisto-da-soja / Maria Cristina Rocha Cordeiro ... [et al.]. - Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2008.

16 p. — (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Cerrados, ISSN 1676-918X; 211)

1. Nematóide - Soja. I. Cordeiro, Maria Cristina Rocha. II. Série.

632.65182 - CDD 21

© Embrapa 2008

Sumário

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

Identificação Molecular de *Heterodera glycines*, o Nematóide-de-cistos-da-soja

Maria Cristina Rocha Cordeiro¹; Alexandre Moura Cintra Goulart²; Ana Maria Costa³; Ravi Datt Sharma⁴

Resumo

Heterodera glycines é considerado um dos mais importantes fitonematóides da soja podendo causar perdas de até 100 % no rendimento da produção nos Estados Unidos da América. A identificação do nematóide, em nível qualitativo e quantitativo, é importante na diagnose e manejo das áreas afetadas. Essa identificação pode ser realizada em nível morfológico ou molecular específico. A última é uma estratégia bastante promissora, principalmente quando é realizada por meio da reação de polimerase em cadeia (PCR). Oligonucleotídeos específicos foram desenhados baseados em seqüências gênicas específicas para o *H. glycines* e testados em reação de PCR. Quatro fragmentos foram selecionados com o potencial de reconhecer, especificamente, o *H. glycines* quando em amostras puras e de solo infestado. O nível de detecção desses fragmentos variou de 40 ng a 1 ng. Este trabalho representa mais uma iniciativa para selecionar oligonucleotídeos específicos com o potencial de identificar o *H. glycines* utilizando seqüências gênicas iguais e diferentes a regiões do rDNA.

Termos para indexação: diagnóstico, amostras, solo.

¹ Bióloga, Ph.D. 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, drravidattsharma@hotmail.com

Heterodera glycines **Molecular Identification, the soybean cyst-nematode**

Abstract

Heterodera glycines is considered one of the most important plant-parasitic nematode from soybean which cause 100 % of yield losses in the United States of America. The nematode identification is important in the diagnosis and management of affected areas. It could be done at morphological or specific molecular level. The specific molecular identification is a very straightforward strategy principally when realized by polymerase chain reaction (PCR). Specific oligonucleotides were designed based on H. glycines gene sequences and tested in PCR. Four fragments were selected to be potentially indicated to recognize specifically the H. glycines using pure or soil infested samples. The level of detection for the fragments varied from 40 ng to 1 ng. This work present an iniciative to select potencial specific oligonucleotides to identify the nematode H. glycines using gene sequences similar or not to rDNA regions.

Index terms: diagnostic, samples, soil.

Introdução

O gênero *Heterodera* Schmidt, 1871 reúne espécies de nematóides fitoparasitas e é um gênero bastante diversificado no mundo. Existem pelo menos 60 espécies e também subespécies e raças, como *H. schachtii* Schmidt, 1.871; *H. avenae* Wollenweber, 1.924; *H. glycines* Ichinohe, 1.952; e outros (BALDWIN; MUNDO-CAMPO, 1991).

Heterodera glycines foi identificado pela primeira vez no Japão, em 1915, e hoje está amplamente distribuído em diversas regiões produtoras de soja do mundo (RIGGS; WRATHER, 1992). Há quase um século é considerado um dos mais importantes fitopatógenos dessa cultura, podendo causar perdas de até 100 % no rendimento da produção da soja nos Estados Unidos. É conhecido também como nematóide-de-cistos-da-soja. Esse termo é em virtude dos juvenis sobreviverem no solo por muito tempo dentro de estruturas em forma de cistos, que são, na verdade, as fêmeas mortas contendo ovos e juvenis viáveis (LORDELLO, 1988).

A identificação do nematóide em nível morfológico e a sua diferenciação das demais espécies são relativamente fáceis, quando realizadas por especialistas, porém, bastante laboriosas. A identificação-molecular-específica é uma estratégia que tem potencial de identificar a presença desses nematóides em diferentes amostras, facilitando sua diagnose e manejo em áreas afetadas e a diferenciação de uma espécie da outra, em atividade quarentenária, por exemplo. Esse tipo de identificação tem sido procurada recentemente, porque pode ser implementada sem a necessidade de um especialista com treinamento em identificação morfológica de nematóides em tempo integral. Esse, por sua vez, poderá dedicar-se a trabalhos mais específicos, como descrição de novas espécies, entre outros. Várias iniciativas já foram publicadas nesse sentido, especificamente para o gênero *Heterodera*, como a análise de amplificação de fragmentos com *primers* espécie-específicos para regiões ITS, utilizando o PCR-RFLP (SUBBOTIN et al., 2000; ZHENG et al., 2000; AMIRI et al., 2002). As metodologias que utilizam o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) são, em particular, promissoras, pelo fato de serem rápidas, de relativo baixo custo, sensíveis e reproduzíveis.

Este trabalho representa mais uma iniciativa para selecionar pares de *primers* específicos para identificar de forma específica, em nível molecular, o *H. glycines* em amostras de DNA puro e de solo infestado, utilizando seqüências gênicas iguais e diferentes às regiões do rDNA.

Material e Métodos

Nematóides

Exemplares de *H. glycines* foram obtidos por multiplicação em plantas hospedeiras de soja, cultivadas em solo estéril, sob condições de casa de vegetação a partir de inóculo selecionado em campos experimentais no Estado de Goiás, próximos ao Distrito Federal. Após completar o ciclo do nematóide na planta hospedeira, as raízes foram lavadas para a obtenção dos cistos. Os juvenis contidos nos cistos foram deixados eclodir, segundo a técnica descrita por Sharma (1985), coletados e contados em câmara de Peters para serem utilizados para extrair o DNA (amostra pura). Os nematóides presentes no solo das plantas infestadas também foram utilizados, e os exemplares de nematóides foram extraídos, segundo a técnica descrita por Jenkins (1964), contados e utilizados para extrair o DNA (amostra teste de solo infestado). Como controle negativo da amplificação do fragmento específico, também foram utilizadas amostras de nematóides de vida livre obtidas a partir do lavado de solo de plantas não infestadas com nematóides fitoparasitas e também amostras de cinco espécies de nematóides importantes nos solos do Cerrado brasileiro, como *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus brachyurus*, *Rotylenchulus reniformis*.

Extração do DNA dos nematóides

O DNA dos juvenis de segundo estágio dos nematóides 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

A obtenção de fragmentos da espécie de nematóide estudado foi obtida por pares de *primers* desenhados a partir da seleção de seqüências de genes específicos descritos e depositados no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>> . Cada amostra analisada em PCR continha 40 ng de DNA total; 1,5 mM ou 2 mM de $MgCl_2$, conforme recomendação do fabricante da Taq polimerase, 0,25 μM de cada primer, 1 U de Taq polimerase em tampão apropriado. Amostras de DNA de nematóide de vida livre foram utilizadas como controle negativo. Os *primers* foram utilizados em reação de PCR. 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 e, após os 45 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 10 minutos a 72 °C. Após a amplificação, os fragmentos foram analisados em gel de agarose a 2 % em TBE (Tris-Borato 100 mM, pH 8,3; EDTA 2 mM) com brometo de etídio (0,5 $\mu g/ml$) (SAMBROOK et al., 1989). A sensibilidade do método de amplificação dos fragmentos específicos foi analisada, tomando-se soluções de DNA de concentração diferente e identificando o nível de detecção obtido para cada amostra observado em gel de agarose.

Resultados e Discussão

Para este trabalho foram desenhados cinco pares de *primers* específicos para regiões gênicas de serina proteinases e regiões ITS de *H. glycines*. No banco de dados do NCBI, estão depositadas cerca de 26.536 seqüências gênicas para esse nematóide. Ou seja, essa grande quantidade de seqüências gênicas depositadas representa o potencial de desenvolvimento de novos pares de *primers*. As seqüências gênicas selecionadas para o *H. glycines* foram comparadas às outras seqüências similares em cinco espécies de importância nos solos do Cerrado brasileiro (*Meloidogynes incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *Pratylenchus* spp. e *Rotylenchulus reniformis*) por meio da ferramenta Clustal W. Com

essa comparação, as seqüências diferentes para o *H. glycines* foram selecionadas para o desenho dos *primers*.

As cinco combinações de *primers* analisados, sua temperatura de anelamento e o tamanho aproximado do fragmento amplificado podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Relação de *primers* desenhados e resultados obtidos.

Pares de <i>primer</i>	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho aproximado do fragmento amplificado (pB)	Especificidade
1	60	~ 700	<i>H.glycines</i>
2	-	-	<i>H.glycines</i>
3	51	~ 750	<i>H.glycines</i>
4	-	-	<i>H.glycines</i>
5	51	~ 450, ~ 500	<i>H.glycines</i>

Obs.: Em razão de uma possível proteção do teste diagnóstico apresentado, as seqüências dos *primers* não são apresentadas neste trabalho.

Sessenta por cento dos pares de *primers* desenhados e analisados foram positivos, dos quais quatro fragmentos potencialmente espécie-específicos para o *H. glycines* foram selecionados (Fig. 1, 2, 3).

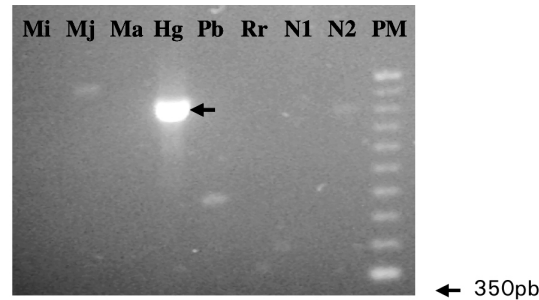


Fig. 1. Análise eletroforética em gel de agarose 2 %, demonstrando a amplificação específica com o par de *primer* 1. A seta indica o fragmento F1. Mi- *Meloidogyne incognita*; Mj- *M. javanica*; Ma- *M. arenaria*; Hg- *H. glycines*; Pb- *P. brachyurus*; Rr- *R. reniformis*; N1 e N2- amostras de nematóides de vida livre; PM- marcador de peso molecular 50pB.

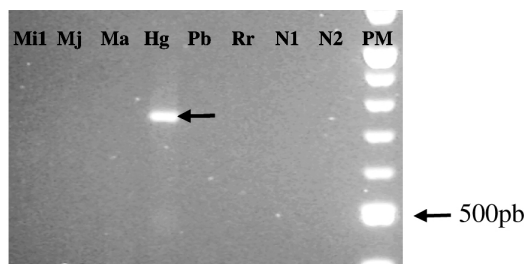


Fig. 2. Análise eletroforética em gel de agarose 2 %, demonstrando a amplificação específica com o par de *primer* 3. A seta indica o fragmento F3. Mi- *Meloidogyne incognita*; Mj- *M. javanica*; Ma- *M. arenaria*; Hg- *H. glycines*; Pb- *P. brachyurus*; Rr- *R. reniformis*; N1 e N2- amostras de nematóide de vida livre; PM- marcador de peso molecular 100pb.

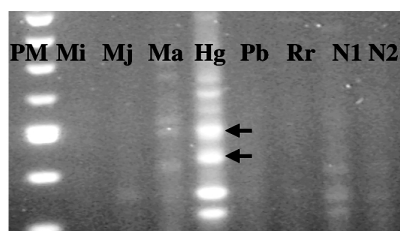


Fig. 3. Análise eletroforética em gel de agarose 2 %, demonstrando a amplificação específica com o par de *primer* 5. A seta indica os fragmentos F5 I e II. Mi- *Meloidogyne incognita*; Mj- *M. javanica*; Ma- *M. arenaria*; Hg- *H. glycines*; Pb- *P. brachyurus*; Rr- *R. reniformis*; N1 e N2- amostras de nematóides de vida livre; PM- marcador de peso molecular 100pb.

Todos os fragmentos foram testados também para as espécies *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus brachyurus* Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 e *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, 1940, além de nematóides de vida livre. Essas espécies de nematóides fitoparasitas estão presentes em grande quantidade nos solos do Cerrado. Porém, os pares de *primers* selecionados não amplificaram nenhum fragmento de peso molecular semelhante em nenhuma dessas espécies.

A especificidade dos fragmentos selecionados pode ser atribuída não somente à sequência do *primer*, mas à temperatura de anelamento alta, pela não amplificação de fragmentos de peso molecular semelhante

em outras espécies e pelo reconhecimento em amostras-testes de solo infestado. Porém, esses fragmentos devem ser validados em outras populações para confirmar sua especificidade frente à variabilidade genética entre diferentes populações. Além dessa validação, também é importante seqüenciar esses fragmentos para comprovar que os pares de *primers* estão amplificando as seqüências corretas.

A reprodutibilidade dos fragmentos 1, 3 e 5 foi testada interamostra e intra-amostra. Ademais, esses fragmentos também foram amplificados de forma reprodutível em amostras-testes de solo infestado.

O par de *primer* 5 foi o único que amplificou dois fragmentos reprodutíveis, de peso molecular diferentes e analisáveis em gel de agarose 2 % (fragmento 5 I e 5 II).

Os fragmentos F1, F3 e F5 I e II também foram testados quanto ao nível de detecção, além das amostras-teste (Tabela 2).

Tabela 2. Estudo dos fragmentos com potencial para identificar especificamente *H. glycines*.

Fragmento	Nível de detecção (ng)	Amostras-testes			
		Hg 1		Hg 2	
		Quant. (ng)	Deteção	Quant. (ng)	Deteção
1	1	15,4	+	15,7	+
3	40	15,4	-	15,7	-
5 (I e II)	10	15,4	+	15,7	+

O nível de detecção dos fragmentos demonstra a sensibilidade alcançada por essa identificação molecular. Na Tabela 2, observa-se que os três *primers* podem amplificar fragmentos específicos, tendo em vista diferentes quantidades de DNA na amostra. O fragmento 3 é aquele que somente pode ser detectado em amostras abundantes (40 ng), e o fragmento 1, em amostras cuja quantidade de DNA do nematóide seja bastante baixa (1 ng DNA). Os fragmentos 5 I e 5 II são

detectados em amostras com quantidade intermediária (10 ng de DNA). Esse parâmetro de nível de detecção também pode auxiliar em uma estimativa de quantificação do número de nematóides em uma amostra de solo infestado. No ensaio de PCR utilizado, foram adicionados 40 ng de DNA total. Essa quantidade equivale a 100 % de DNA do nematóide em uma amostra pura. Considerando que uma amostra obtida de solo infestado é heterogênea porque contém o nematóide fitoparásita além de outros de vida livre, 10 ng do DNA obtido desse lavado são associados a 25 % da amostra, e 1 ng, a 0,25 %. Se o número total de nematóides é conhecido na amostra, pode-se estimar o quantitativo do *H. glycines* pelo nível de detecção do *primer*. Os fragmentos 1 e 5 oferecem o melhor nível de sensibilidade ao método. Também a análise quantitativa com os três pares de *primers* pode auxiliar a obtenção de uma estimativa mais acurada. Ademais, a acuracidade dessa estimativa pode ser melhorada com a utilização da PCR quantitativa (qPCR). Assim, a identificação molecular para *H. glycines* proposta neste trabalho pode cumprir dois quesitos: o qualitativo e o quantitativo.

Com respeito à detecção do nematóide em amostras de solo infestado, foi constatado que obedeceu ao nível já observado (Fig. 4, 5). Tendo as amostras quantidades intermediárias (cerca de 15,4 ng e 15,7 ng), somente os pares de *primers* 1 e 5 foram capazes de reconhecer o DNA do nematóide nas amostras testadas. Na Fig. 5, também se pode observar que o par de *primer* 1 não amplificou nenhum fragmento de mesmo peso molecular, igual em amostras-teste de solo infestado com *R. reniformis*. Esse resultado também ocorreu para o par de *primer* 5, embora não seja mostrado. Os fragmentos que podem ser observados nas amostras R2 e R3 são inespecíficos e não reprodutíveis. Na Fig. 6, também pode ser observado o reconhecimento dos fragmentos 5 I e 5 II em duas amostras diferentes de DNA de *H. glycines*, além das amostras-teste de solo infestado com *H. glycines*.

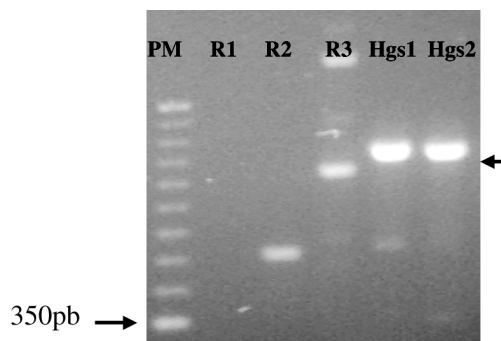


Fig. 4. Análise eletroforética em gel de agarose 2 %, demonstrando a amplificação específica com o par de *primer* 1 em amostras-teste de solo infestado. A seta indica o fragmento F1. R1, R2, R3 – amostras de solo infestado com *R. reniformis*; Hgs1, Hgs2 – amostras de solo infestado com *H. glycines*; PM – marcador de peso molecular 50pB.

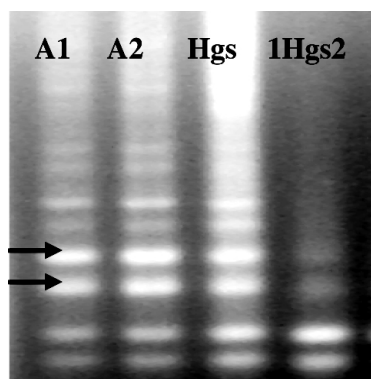


Fig. 5. Análise eletroforética em gel de agarose 2 %, demonstrando a amplificação específica com o par de *primer* 5 em amostras de solo infestado. As setas indicam os fragmentos F5 I e II. A1, A2 – amostras de DNA puro de *H. glycines*; Hgs1, Hgs2 – amostras-teste de solo infestado com *H. glycines*.

O método de identificação relatado neste trabalho representa um diferencial, pois, uma vez utilizando *primers* específicos, não são necessárias etapas adicionais de digestão enzimática do fragmento amplificado, como é realizado por alguns autores que se baseiam na técnica do PCR-RFLP. Sem essa etapa adicional, o método é mais rápido e mais simples para ser introduzido como rotina em um laboratório de nematologia. Um diagnóstico em nível molecular de forma qualitativa e quantitativa representa uma facilidade que pode ser introduzida na rotina de um laboratório de nematologia.

Conclusões

1. O trabalho selecionou seis *primers* que amplificam quatro fragmentos de peso molecular diferentes que são potencialmente específicos para identificar o *H. glycines* em amostras de DNA puro e de solo infestado.
2. Os *primers* selecionados, nas condições experimentais utilizadas, não amplificam nenhum fragmento reprodutível em amostras de DNA dos nematóides *Meloidogyne* spp., *R. reniformis* e *P.brachyurus*.

Referências

- AMIRI, S.; SUBBOTIN, S. A.; MOENS, M. Identification of the beet cyst nematode *Heterodera schachii* by PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 497-506, 2002.
- BALDWIN, J. G.; MUNDO-CAMPO, M. Heteroderinae, cyst and non-cyst-forming nematodes. In: NICKLE, W. R. (Ed.). **Manual of Agricultural Nematology**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 191-362 .
- 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**, 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**, v. 28, n. 422-430, 1996.
- JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v. 48, n. 9, p. 692, 1964.
- LORDELLO, L. G. E **Nematóides das plantas cultivadas**. São Paulo: Nobel, 1988. 197 p.
- RIGGS, R. D.; WRATHER, A. Biology and Management of the Soybean Cyst Nematode. St. Paul: APS Press, p. 186, 1992.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. Paginação irregular.

SHARMA, R. D. Comparação de métodos para coletar ovos de *Meloidogyne* spp. de raízes, incluindo uma nova técnica. **Nematologia Brasileira**, 15, p. 184, 1985.

SUBBOTIN, S. A.; WAYENBERGE, L.; MOENS, M. Identification of cyst forming nematodes of the genus *Heterodera* (Nematoda:Heteroderidae) based on the ribosomal DNA-RFLP. **Nematology**, v. 2, p. 153-164, 2000.

ZHENG, J. ;SUBBOTIN, S. A.; WAYENBERGE, L.; MOENS, M. Molecular characterization of Chinese *Heterodera glycines* and *H.avenae* populations based on RFLPs and sequences of rDNA-ITS regions. **Russian Journal of Nematology**, v. 8, p. 109-113, 2000.