

DIAGNOSE DE *PRATYLENCHUS* SPP. DE CAFEZAIS PAULISTAS PELA APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA DO CÓDIGO DE BARRAS DO DNA

Claudio Marcelo G. de Oliveira²; Roberto K. Kubo³; Ricardo Harakava⁴

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café- CBP&D/Café, subprojeto 02.06.10.014.00.05

²Pesquisador Científico, PhD, Laboratório de Nematologia, Centro Experimental Central do Instituto Biológico, Campinas, (SP) Brasil, marcelo@biologico.sp.gov.br.

³Pesquisador Científico, DSc, Laboratório de Nematologia, Centro Experimental Central do Instituto Biológico, Campinas, (SP) Brasil, kubo@biologico.sp.gov.br.

⁴ Pesquisador Científico, PhD, Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Vegetal do Instituto Biológico, São Paulo (SP) Brasil, harakava@biologico.sp.gov.br.

RESUMO: O objetivo do presente trabalho foi demonstrar a utilidade da técnica do código de barras do DNA na diagnose de 12 subpopulações de *Pratylenchus* spp. coletadas principalmente em cafezais do estado de São Paulo. O DNA genômico foi extraído de um único espécime de *Pratylenchus* spp. oriundos de raízes de café, *Aglaonema*, braquiária e citros. Através do uso de PCR, amplificou-se a região D2/D3 rDNA das subpopulações de *Pratylenchus* spp. Os fragmentos de DNA amplificados de cada população foram purificados e seqüenciados diretamente em ambas as direções. A seguir, as seqüências consenso de *Pratylenchus* spp. foram comparadas às seqüências de outras espécies de nematóides depositadas no banco de dados (GenBank) para a identificação da porcentagem de homologia. O uso da técnica do código de barras mostrou-se eficiente na identificação de *Pratylenchus brachyurus*, *P. jaehni* e pelo menos duas espécies provavelmente ainda não descritas.

Palavras-chave: *Coffeae arabica*, diagnose molecular, identificação de nematóide, nematóide das lesões radiculares

DIAGNOSIS OF *PRATYLENCHUS* SPP. FROM SÃO PAULO STATE COFFEE PLANTATIONS THROUGH APPLICATION OF DNA BARCODE TECHNOLOGY

ABSTRACT: The objective of the present work was to demonstrate the usefulness of DNA barcode methodology to diagnose 12 root lesion nematode populations mainly from coffee plantations. The genomic DNA was extracted from one individual *Pratylenchus* spp. from *Coffeae Arabica*, *Aglaonema*, *Brachyaria* or *Citrus* sp. roots. The D2/D3 region of rDNA of each *Pratylenchus* populations were amplified by PCR. Purified DNA fragments were sequenced directly in both directions using each primer pair. Thereafter the consensus sequences of *Pratylenchus* spp. were compared with other nematode species sequences deposited in the on line data base (GenBank) to identification of percentage of homology. The use of DNA barcode technology provided an accurate identification of the plant-parasitic nematode *P. brachyurus*, *P. jaehni* and at least two undescribed *Pratylenchus* species from coffee.

Key words: *Coffeae arabica*, molecular diagnostic, nematode identification, root lesion nematodes.

INTRODUÇÃO

O uso de um código de barras do DNA para identificação de organismos foi proposto em duas conferências realizadas no laboratório de Cold Spring Harbor, Estados Unidos (EUA), em 2003 (Powers, 2004). O princípio do uso de um código de barras genético seria o de que, em um pequeno trecho do genoma do organismo, específico para cada espécie, geralmente o DNA mitocondrial ou DNA ribossômico, existiria variação suficiente para separar as espécies que habitam o planeta atualmente, inclusive os nematóides parasitos de plantas (Powers, 2004).

Recentemente, através da aplicação da tecnologia do código de barras do DNA, pesquisadores do Instituto Biológico (http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=62) relataram que, inadvertidamente, tubérculos de batata provenientes do Canadá apresentavam-se com o nematóide *P. penetrans*. Nesse material, devido as condições de transporte e armazenagem, os poucos nematóides presentes na amostra apresentavam-se com a morfologia alterada devido à anidrobiose, sem condições para a segura identificação específica. Para resolver tal questão, lançou-se mão de uma técnica bastante segura, mas que ainda não se encontra em uso rotineiro em laboratórios de diagnose de nematóides no Brasil, o chamado código de barras do DNA (DNA *barcode*), através do sequenciamento de um pequeno trecho do genoma do organismo, específico para cada espécie.

Nesse sentido, utilizou-se metodologia semelhante no presente estudo com o objetivo de demonstrar a utilidade da técnica do código de barras do DNA para a diagnose de 12 subpopulações de *Pratylenchus* spp. (K5, M2, IB01Pc, IB02Pc, IB04Pc, IB06Pb, IB07Pb, IB08Pb, IB10Pb, IB11Pb, IB12Pb e IB13Pj) (Tabela 1).

MATERIAL E MÉTODOS

Para nematóides do gênero *Pratylenchus*, a região genômica mais estudada é a D2/D3, situada no DNA ribossômico (rDNA). Essa região apresenta-se atualmente com maior número de seqüências depositadas no GenBank e, de acordo com Subbotin *et al.* (2008), é a mais adequada para identificação molecular de *Pratylenchus* spp. Portanto, procedeu-se ao estudo dessa região com o objetivo de elucidar a identificação das espécies de *Pratylenchus* coletadas em cafezais paulistas em análise, além de IB13Pj proveniente de plantas cítricas, IB12Pb de braquiária cv. Tanzânia cultivada em área abandonada de café e M2, da ornamental *Aglaonema*.

Para a extração do DNA genômico foi utilizado o método da Proteinase-K (WLB: *Worm Lysis Buffer*), segundo Williams *et al.* (1994). Separadamente, um único indivíduo do gênero *Pratylenchus* foi selecionado, seccionado em três partes (com auxílio de uma agulha) em uma gota de 15 µl WLB e colocados em tubos de microcentrífuga, sendo incubados a -20 °C por 15 min. Posteriormente, os tubos foram incubados a 60 °C por 1 hora, 95 °C por 15 min e resfriados a 4 °C.

A seguir, em um tubo de microcentrífuga de 0,5 ml foi adicionada uma esfera do kit de PCR (*pureTaq Read-To-Go Bead*, Amersham Pharmacia Biotech), que num volume final de 25 µl de reação contém os seguintes reagentes necessários para a reação de PCR: 2,5 U puReTaq, 200 µM de cada dNTP, 10 µM Tris-HCl, 50 µM KCl e 1,5 mM MgCl₂, quando dissolvida em 17,5 µl de água mili-Q. Em seguida, foi adicionado 5 µl de DNA genômico, 1 µl de cada par de *primers* (D2A: 5' – ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG – 3' e D2B: 5' – TCGGAAGGAACCAGCTACTA – 3'). Esta mistura foi levada ao termociclador.

Os sequenciamentos realizados no presente trabalho foram feitos no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, SP. O sequenciamento direto dos fragmentos amplificados da região D2/D3 foi feito por meio de PCR utilizando o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA). Os fragmentos foram purificados por meio do kit Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega). Para cada reação, foi preparada uma mistura contendo 2 µl de TRR mix (*terminator ready reaction mix*), 3,2 µmol do primer para o sentido anverso ou para o sentido reverso, 3,0 µl do produto previamente amplificado contendo aproximadamente 400 ng de DNA e 2,0 µl de água. A amplificação para sequenciamento foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante (PE Applied Biosystems, Norwalk, CT, EUA). Foi feita nova purificação do produto amplificado por precipitação com isopropanol em microtubos. Após a desnaturação das amostras a 95 °C por 3 min., foi realizada eletroforese em aparelho ABI Prism 377 DNA Sequencer® (PE Applied Biosystem, Norwalk, CT, EUA).

As seqüências obtidas foram alinhadas e comparadas com auxílio do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999) com a finalidade de identificar polimorfismo nas seqüências nucleotídicas e análise do eletroferograma de cada seqüência. A seguir, as seqüências consenso de *Pratylenchus* spp. foram comparadas às seqüências de outras espécies de nematóides depositadas no banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a identificação de homologia utilizando-se o programa BLASTN 2.2.19+ (Zhang *et al.* 2000).

Análises filogenéticas: Para essa etapa, foi utilizado inicialmente o programa CLUTALX v. 1.81 (Thompson *et al.*, 1997), para criação dos alinhamentos múltiplos entre as diferentes seqüências da região D2/D3 das subpopulações analisadas e várias outras espécies de *Pratylenchus* depositadas e disponíveis no banco de dados. As análises filogenéticas foram feitas através do programa TREE-PUZZLE (Strimmer & Von Haeseler, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As seqüências da região D2/D3 obtidas no presente estudo foram individualmente confrontadas aos dados existentes no banco de dados GenBank, para a identificação de homologia com seqüências de outras espécies de nematóides. Baseando-se nessa comparação, elaborou-se a Tabela 1 contendo a porcentagem de homologia entre as subpopulações coletadas e as seqüências depositadas no GenBank.

Na Tabela 1, os resultados evidenciaram que IB01Pc apresentou maior porcentagem de homologia com *Pratylenchus zaei*. No entanto, esse nível de homologia (apenas 78%) é insuficiente para caracterizar IB01Pc como sendo *P. zaei*. Normalmente, para afirmarmos com segurança a diagnose correta através do código de barras, a porcentagem de homologia deve ser de no mínimo 95%, uma vez que deve-se considerar a possibilidade de variabilidade intraespecífica. Portanto, nesse caso, é mais provável que IB01Pc trata-se de espécie não descrita ou que ainda não há informações disponíveis no banco de dados de espécie semelhante. O mesmo é válido em relação a IB02Pc e M2, que apresentaram 94% de homologia com *P. brachyurus* e *P. penetrans*, respectivamente. Já IB04Pc apresentou 97% de identidade genética com *P. jaehni*, que corresponde a *P. coffeae* isolado C2 de Duncan *et al.* (1999).

No que tange à diagnose da subpopulação K5, através da comparação das seqüências, concluiu-se que se tratava de *P. jaehni*, uma vez que apresentou alto grau de homologia (99 %) com outra subpopulação dessa espécie – isolado C2 (Duncan *et al.*, 1999). Da mesma forma, a identificação da subpopulação IB13Pj foi confirmada como *P. jaehni* (homologia de 99 %).

Com relação a comparação das seqüências das subpopulações inicialmente classificadas como *P. brachyurus* (IB06Pb, IB07Pb, IB08Pb, IB10Pb, IB11Pb e IB12Pb) com as seqüências depositadas no GenBank, os resultados evidenciaram que IB08Pb e IB12Pb são similares a *P. brachyurus*, apresentando homologia de 96%. No entanto, para as subpopulações IB06Pb, IB07Pb e IB10Pb, as porcentagens de homologia são menores em relação a *P. brachyurus*, variando de 85 a 94%. Já IB11Pb apresentou maior valor de similaridade com *P. zaei*, porém com apenas 82%. Nesse

caso também, é mais provável que a subpopulação IB11Pb trata-se de espécie não descrita ou que ainda não há informações disponíveis no banco de dados.

Variabilidade genética intrapopulacional também foi encontrada quando se analisou a região D2/D3 de espécies de *Pratylenchus*. Tal variabilidade, pelo menos no caso de *P. coffeae*, tem sido relatada em trabalhos prévios (Duncan *et al.*, 1999; Waeyenberge *et al.*, 2002). Recentemente, Subbotin *et al.* (2008) relataram que existe diversidade genética de até 3,6% entre as sequências da região D2/D3 de várias populações de *P. coffeae*, até 5,9% para *P. zaeae* e 6,5% entre subpopulações de *P. thornei*. Ademais, há evidências de que várias espécies correlatas a *P. coffeae* são, na verdade, complexos de espécies (Duncan *et al.*, 1999).

Em função do maior número de trabalhos que utilizaram a região D2/D3 de diferentes espécies de *Pratylenchus*, foi possível realizar uma comparação direta das seqüências obtidas no presente trabalho com outras do banco de dados GenBank, através de alinhamentos múltiplos e aplicação da tecnologia do código de barras do DNA.

Tabela 1. Comparação das seqüências da região D2/D3 das subpopulações de *Pratylenchus* spp. com as seqüências de outras espécies de nematóides depositadas no banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a identificação de homologia (% de identidade genética).

Subpopulação (Código)	Hospedeiro	Local de coleta	Espécie	% de identidade	Código de acesso no GenBank
M2	<i>Aglaonema</i> sp.	Rio de Janeiro – RJ	<i>Pratylenchus penetrans</i> isolate CA85 clone 3	94%	EU130860.1
K5	Café (<i>Coffea arabica</i>)	Marília – SP	<i>P. jaehni</i> isolate C2	99%	AF170427.1
IB01Pc	Café (<i>C. arabica</i>)	Presidente Prudente – SP	<i>P. zaeae</i> isolate CA70 clone 2	78%	EU130894.1
IB02Pc	Café (<i>C. arabica</i>)	Itatiba – SP	<i>P. brachyurus</i> isolate CA83 clone 1	94%	EU130842.1
IB04Pc	Café (<i>C. arabica</i>)	Valinhos – SP	<i>P. jaehni</i> isolate C2	97%	AF170427.1
IB06Pb	Café (<i>C. arabica</i>)	Gália – SP	<i>P. brachyurus</i> isolate CA83 clone 1	94%	EU130842.1
IB07Pb	Café (<i>C. arabica</i>)	Garça – SP	<i>P. brachyurus</i> isolate CA83 clone 1	90%	EU130842.1
IB08Pb	Café (<i>C. arabica</i>)	Dracena – SP	<i>P. brachyurus</i> isolate CA83 clone 1	96%	EU130842.1
IB10Pb	Café (<i>C. arabica</i>)	Presidente Prudente – SP	<i>P. brachyurus</i> isolate CA83 clone 1	85%	EU130842.1
IB11Pb	Café (<i>C. arabica</i>)	Patrocínio Paulista – SP	<i>P. zaeae</i> isolate CA70 clone 1	82%	EU130893.1
IB12Pb	Braquiária	Getulina – SP	<i>P. brachyurus</i> isolate CA83 clone 1	96%	EU130842.1
IB13Pj	Citros	Conchal – SP	<i>P. jaehni</i> isolate C2	99%	AF170427.1

Com base nos sequenciamentos da região D2/D3 do rDNA e análise do código de barras do DNA concluímos que, no caso específico da subpopulação K5, a hipótese de que se trate de espécie ainda não descrita foi descartada. Essa subpopulação se alinhou filogeneticamente a *P. jaehni*, apresentando pela análise do código de barras identidade genética de 99%. Esses resultados contradizem relatos anteriores (Duncan *et al.*, 1999; Inomoto *et al.*, 2007; Wilcken *et al.*, 2008). No entanto, Campos (2002) considerou K5 morfologicamente igual a *P. jaehni*; porém, K5 não consegue se multiplicar em *Citrus limonia*, provavelmente se tratando de uma raça que seria diferente de *P. jaehni*, segundo Silva & Inomoto (2002).

Além disso, a análise da região D2/D3 de diferentes espécies de *Pratylenchus* mostrou que a subpopulação M2 ficou próxima filogeneticamente a *P. penetrans*, embora não sendo idêntica a essa espécie (94% de similaridade quando analisada através do código de barras do DNA), e não se alinhou com outras subpopulações de *P. coffeae*. O fato de que M2 poderia ser espécie diferente de K5 e de *P. coffeae* já havia sido sugerido por Inomoto *et al.* (2007) e Wilcken *et al.* (2008), uma vez que os autores encontraram diferenças na habilidade dessa subpopulação em se multiplicar em plantas de cafeeiro (*C. arabica*) e nos danos causados nas plantas (Figura 1).

CONCLUSÕES

De maneira geral, com base nas análises da região D2/D3, as subpopulações classificadas inicialmente como *P. cf. coffeae* provenientes de cafezais do Estado de São Paulo não se alinharam filogeneticamente as outras subpopulações de *P. coffeae* procedentes dos estudos realizados por Duncan *et al.* (1999) e Subbotin *et al.* (2008). Por outro lado, as

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMPOS, A. S. Distribuição de *Tylenchulus semipenetrans* e *Pratylenchus jaehni* em citros no estado de São Paulo, e estudo morfométrico comparativo de populações anfigmáticas de *Pratylenchus* spp. Dissertação de Mestrado, FCAV/UNESP, Jaboticabal, 2002.
- DUNCAN, L. W.; INSERRA, R. N.; THOMAS, W. K.; DUNN, D.; MUSTIKA, I.; FRISSE, L. M.; MENDES, M. L.; MORRIS, K. & KAPLAN, D. T. Molecular and morphological analyses of isolates of *Pratylenchus coffeae* and closely related species. *Nematropica*, 29:61-80, 1999.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- INOMOTO, M. M.; KUBO, R. K.; SILVA, R. A.; OLIVEIRA, C. M. G.; TOMAZINI, M. D. & MAZZAFERA, P. Pathogenicity of two *Pratylenchus coffeae* populations from Brazil on coffee plants. *Nematology*, 1-6. 2007.
- POWERS, T. 2004. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 367-383.
- SILVA, R. A. & INOMOTO, M. M. Host-range characterization of two *Pratylenchus coffeae* isolates from Brazil. *Journal of Nematology*, 34(2):135-139, 2002.
- STRIMMER, K.; VON HAESLER, A. Quartet puzzling, a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Molecular Biology and Evolution*, Chicago, v. 13, p. 964-969, 1996.
- SUBBOTIN S. A; RAGSDALE E. J; MULLENS T.; ROBERTS P. A; MUNDO-OCAMPO M.; BALDWIN J. G. A phylogenetic framework for root lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda): Evidence from 18S and D2-D3 expansion segments of 28S ribosomal RNA genes and morphological characters. *Molecular phylogenetics and evolution* 48(2):491-505. 2008.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface, flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 24, p. 4876-4882, 1997.
- WAEYENBERGE, L.; RYSS, 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.
- WILCKEN, S. R. S.; MORI, E. S.; BACCI, M.; FERRAZ, L. C. C. B.; OLIVEIRA, C. M. G. & INOMOTO, M. M. Relationships among *Pratylenchus jaehni* and *P. coffeae* isolates from Brazil. *Nematologia Brasileira* 32(3): 194-199, 2008.
- WILLIAMS, B.D.; SCHRANK, B.; HUYNH, C.; SHOWNKEEN, R. & WATERSTON, R.H. A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. *Genetics* 131: 609-624. 1994.
- ZHANG, Z., S. SCHWARTZ, L. WAGNER & W. MILLER. 2000. "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *Journal of Computational Biology*; 7(1-2): 203-14.