

TÉCNICAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES NA DIAGNOSE DE FITONEMATÓIDES

Renata Cesar Vilardi Tenente
Soraya Cristina de Macedo Leal-Bertioli



Recursos Genéticos e Biotecnologia

Brasília, DF
1999

Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Boletim de Pesquisa, N.º 6

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cliente

Parque Estação Biológica - PqEB W3Norte Final

CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372

PABX: (0XX61) 340-3600 Tel.: (0XX61) 448-4700

Fax: (061) 340-3624

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

e.mail: sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual

Membros: Antonio Emídio Dias Feliciano da Silva

Marcos Rodrigues de Faria

Marta Aguiar Sabo Mendes

Marisa de Góes

Rui Américo Mendes

Suplentes: Maria Isabel de Oliveira Penteado

Sueli Correa Marques de Mello

Editoração Eletrônica: Márcio P. Cardoso

Rita de Cássia Sales.

Tiragem: 150 exemplares

TENENTE, R.C.V.; BERTIOLI, S.C. de M. **Técnicas bioquímicas e moleculares na diagnose de fitonematóides.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 37p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa, 6).

ISSN 0102-0129

1. Nematóide 2. Doença de Planta 3. Diagnóstico 4. Bioquímica 5. Molecular . I. Título. II. Série.

CDD 632.65182

APRESENTAÇÃO

O Brasil é um dos países com potencial para a agricultura, possuindo cerca de 19% dos solos agricultáveis do globo terrestre.

Apesar de ser uma nação que ostenta 20% da biodiversidade do planeta, o agronegócio é bastante dependente dos produtos exóticos, com enorme utilidade para a alimentação, o que requer a constante introdução de genótipos de outros países.

Para evitar a entrada de condicionantes biológicos na agricultura brasileira é efetuada a prática de inspeção fitossanitária e quarentena do germoplasma introduzido, com a firme participação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Dentre as pragas de interesse quarentenário analisados, freqüentemente, tem sido detectados os fitonematóides, em cujos parasitas existe a necessidade da aplicação de métodos não convencionais visando a caracterização de gêneros, espécies e populações com similitudes morfológicas.

As técnicas bioquímicas e moleculares são ferramentas poderosas na diagnose dos fitonematóides visando facilitar os trabalhos de identificação e controle dos referidos parasitas.

O mérito deste trabalho de revisão reside juntamente no fato de considerar estas alternativas de diagnose, instruindo a maneira clara para difundir a aplicação das citadas técnicas.

É com grande prazer que a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia oferece esta publicação aos usuários interessados no assunto, resultado do grande empenho e dedicação dos seus autores, na certeza de estar contribuindo para o desenvolvimento da agricultura sustentável do Brasil.

AFONSO CELSO CANDEIRA VALOIS
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

SUMÁRIO

Resumo	07
Abstract.....	08
Introdução	09
Técnicas Bioquímicas	10
Técnicas Moleculares..	13
Considerações Finais	23
Referências Bibliográficas	24

TÉCNICAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES NA DIAGNOSE DE FITONEMATÓIDES

Renata Cesar Vilardi Tenente¹
Soraya Cristina de Macêdo Leal-Bertioli²

RESUMO: Diversos parâmetros afetam a identificação de fitonematóides e esta deve ser precisa em relação a gêneros, espécies e raças, devido a adoção de medidas quarentenárias e de controle desses parasitas. A identificação normalmente é baseada na análise de caracteres morfológicos, através de microscópio ótico, de varredura ou de transmissão. Entretanto, para espécies afins, a morfologia dos indivíduos apresenta baixa sensibilidade. Contudo, as características fisiológicas, citogenéticas, sorológicas e moleculares podem estabelecer e apresentar diferenças entre gêneros, espécies ou até populações morfológicamente semelhantes. A identificação destes é possível através de hospedeiros diferenciais, padrões enzimáticos e protéicos e pela análise direta do material genético. Com exceção das técnicas de análise de DNA (ex. RFLP, PCR e AFLP), as demais estão sujeitas a variações fenotípicas, influência do meio ambiente e estágio de desenvolvimento dos nematóides. Apesar de cada uma dessas técnicas apresentar limitações de uso em diagnóstico de rotina, elas estão sendo utilizadas na identificação de diferentes gêneros de nematóides, apresentando portanto um enorme potencial para diferenciação destes organismos ao nível subespecífico.

¹ Nematologista, PhD. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Biologista Molecular, PhD. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

INTRODUÇÃO

A identificação de nematóides deve ser precisa, em relação aos gêneros, espécies, e raças, pois é fundamental para a adoção de medidas de controle dos parasitos, bem como para o manejo da cultura (uso de variedades resistentes, rotação de culturas, controle biológico) ou para as medidas quarentenárias

O uso de critérios morfológicos é ainda (e deve continuar sendo) o primeiro passo na identificação (Mota e Eisenback, 1993), mas podem não ser completamente acurados porque (1) algumas diferenças ao nível subcelular podem não ser expressas ao nível de característica morfológica (2) algumas diferenças em características morfológicas podem ser devidas ao ambiente. No caso de nematóides fitoparasitas, o estágio juvenil, que é o estágio infectivo é extremamente difícil de distinguir espécies semelhantes. Portanto, freqüentemente resultados baseados em critérios fenotípicos devem ser confirmados utilizando métodos mais acurados, como por exemplo, métodos baseados em características genéticas.

Entretanto, para espécies afins de nematóides, a morfologia dos indivíduos é menos sensível e demanda um longo período de observações e mensurações dos nematóides.

As características citogenéticas são válidas na taxonomia e na sistemática dos fitonematóides, embora apresentem aplicação limitada, quanto ao uso em análises de rotina nos laboratórios (Triantaphyllou, 1971).

As características fisiológicas possibilitam a identificação de alguns nematóides parasitos de plantas, através do grau de diferenciação de parasitismo, como os testes diferenciais em plantas seletivas ou indicadoras, para espécies

morfologicamente iguais, para raças ou patótipos com diferentes hábitos alimentares (Hartman e Sasser, 1985). A utilização dessas características é longa e laboriosa, e envolve atividades como a obtenção de plantas indicadoras, multiplicação do nematóide com objetivo de obter populações puras, para a inoculação nas plantas seletivas e aguardar pelo menos um ciclo do nematóide. A essas dificuldades, soma-se ainda, o fenômeno da diapausa em nematóides fitoparasitas, que é uma estratégia para sobreviver longos períodos em condições não favoráveis. A diapausa pode ocorrer na maioria dos indivíduos de uma geração, podendo afetar os resultados obtidos nos testes de plantas indicadoras ou seletivas (Watson e Lownsberry, 1970; Rivoal, 1978; 1979; Antoniou e Evans, 1987 e Tenente e Evans, 1995; 1997a). Além disso, algumas raças apresentam segregação ou retrocruzamento e recombinação dos caracteres que controlam a preferência de hospedeiros, com o retrocruzamento entre raças de *Ditylenchus dipsaci* que originou progênes híbridas com patogenicidade diferente da dos tipos parentais. (Webster, 1967 e Stuhlan, 1971).