

RESEARCH/INVESTIGACIÓN

ANÁLISES MORFOMÉTRICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *PRATYLENCHUS COFFEA* OCORRENTES NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL, EM INHAME

Vanessa Lopes Lira^{1,2}, Juliana Magrinelli Osório Rosa³, Samara Azevedo de Oliveira³, Cláudio Marcelo Gonçalves de Oliveira³, Romero Marinho de Moura^{*1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória. Alto do Reservatório, s/n. Vitória de Santo Antão – PE – CEP. 55.608-680, Brasil; ²Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória. Alto do Reservatório, s/n. Vitória de Santo Antão – PE – CEP. 55.608-680, Brasil; ³Instituto Biológico, Caixa Postal 70, 13001-970 Campinas (SP), Brasil. *Corresponding author: romeromoura@yahoo.com.br

ABSTRACT

Lira, V. L., J. M. O. Rosa, S. A. Oliveira, C. M. G. Oliveira, and R. M. Moura. 2014. Morphometric and molecular analysis of *Pratylenchus coffeae* populations from yam tubers, Pernambuco State, Brazil. *Nematropica* 44:152-165.

The coffee root-lesion nematode, *Pratylenchus coffeae*, is an important pathogen in several countries. A number of authors have questioned the taxonomic status of this group, suggesting the existence of different races or species in the taxon currently named *P. coffeae*. The objective of the present study was to characterize 10 putative *P. coffeae* populations that were collected from yam tubers (*Dioscorea cayennensis*) in Pernambuco State, Brazil, genetically using sequencing of D2/D3 region from 28S rDNA, and morphologically using light microscopy. Additionally, DNA barcode technology and specific primers were used in this study to demonstrate the utility of these techniques for the diagnosis of the *P. coffeae* populations studied. Based on morphological taxonomic studies, the following characteristics were observed: labial region with two distinct annuli, female tail terminus hemispherical, oval and functional spermatheca, and the presence of males. The specimens from the 10 populations that were included in the morphometric analysis showed high similarity to *P. coffeae*. According with the molecular analyses, it was concluded that all populations are *P. coffeae* since they showed high homology level (100%) with an isolate of this species deposited in the GenBank. In the same manner, diagnosis using specific primers confirmed the populations as *P. coffeae*, justifying and validating the utility of these molecular tools in the identification of nematode species.

Key words: DNA barcode, identification, root-lesion nematodes, sequencing.

RESUMO

Lira, V. L., J. M. O. Rosa, S. A. Oliveira, C. M. G. Oliveira e R. M. Moura. 2014. Análises morfológica e molecular de isolados de *Pratylenchus coffeae* ocorrentes no Estado de Pernambuco, Brasil, em inhame. *Nematropica* 44:152-165.

O nematoide das lesões radiculares do cafeeiro, *Pratylenchus coffeae*, é considerado um patógeno importante e limitante à produção de diversas culturas em muitos países. Entretanto, vários autores têm questionado a posição taxonômica desse grupo de nematoides, sugerindo a possibilidade da existência de diferentes raças ou espécies no grupamento taxonômico atualmente chamado *P. coffeae*. Dessa forma, o principal objetivo do presente estudo foi caracterizar geneticamente populações de *P. coffeae*, coletadas em túberas de inhame (*Dioscorea cayennensis*) no Estado de Pernambuco, Brasil, através do sequenciamento da expansão D2/D3 da região 28S rDNA e realizar estudos morfológicos e morfométricos utilizando-se técnicas de microscopia de luz. Além disso, utilizou-se no presente estudo a metodologia de diagnose das populações de *P. coffeae* pela aplicação da tecnologia do código de barras do DNA e primers específicos, com o objetivo de demonstrar a utilidade dessas técnicas para a diagnose das 10 populações de *P. coffeae* estudadas. Com base nos estudos taxonômicos morfológicos dessas populações, observaram-se as seguintes características: região labial com dois anéis distintos, ponta da cauda da fêmea hemisférica, espermateca oval, funcional e presença de machos. Os valores das características morfométricas de todas as populações estudadas foram semelhantes a *P. coffeae*. De acordo com as análises moleculares,

concluiu-se que todas as populações, através da comparação das sequências com outras presentes no banco de dados GenBank, tratam-se de *P. coffeae*, uma vez que apresentaram alto grau de homologia (100%) com um isolado dessa espécie. Da mesma forma, a diagnose de *P. coffeae* foi confirmada pelo uso de primers específicos, justificando e validando a aplicação dessas técnicas moleculares na identificação de espécies de nematoides.

Palavras chave: código de barras, identificação, sequenciamento, nematoide das lesões.

INTRODUÇÃO

Os nematoides das lesões radiculares (*Pratylenchus* Filipjev) são reconhecidos como um dos principais problemas fitossanitários de muitas culturas de importância econômica. Atualmente, este gênero comporta 97 espécies válidas, que se encontram mundialmente distribuídas (Handoo *et al.*, 2008). Entre essas espécies, algumas apresentam alto polifagismo, com capacidade de parasitar ampla gama de espécies vegetais de diferentes famílias botânicas (Goulart, 2008).

Os nematoides em geral são organismos difíceis de serem identificados taxonomicamente, por apresentarem dimensões diminutas e pela dificuldade de observação de muitas das suas características básicas para o diagnóstico, quando utilizado a microscopia de luz convencional (Oliveira *et al.*, 2009). Em outros casos, as dificuldades ocorrem pelo alto grau de semelhança entre as espécies mais afins e variabilidade morfológica intraespecífica (Handoo *et al.*, 2008).

O “status” taxonômico de *P. coffeae* tem sido questionado nos últimos anos, devido à diversidade morfológica e principalmente genética relatada entre diferentes populações do nematoide (Duncan *et al.*, 1999; Wilcken *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2011), bem como em relação ao comportamento de algumas espécies vegetais a esse nematoide (Silva e Inomoto, 2002).

Inserra *et al.* (1990) sugeriram a possibilidade da existência de diferentes raças ou espécies no grupamento taxonômico atualmente chamado *P. coffeae*. Essa suspeita foi confirmada quando as espécies de *P. loosi* e *P. pseudocoffeae* foram propostas para designação de populações de *P. coffeae* coletadas em diversas espécies de plantas nativas na Flórida (Inserra *et al.*, 1996; 1998).

Como objetivo de esclarecer essa questão, Duncan *et al.* (1999) realizaram estudos morfométricos e moleculares, por meio de RAPD e sequenciamento da expansão D2/D3 do DNA ribossômico, visando caracterizar as espécies de nematoides das lesões que ocorrem em citros na Flórida e outras populações de *P. coffeae* de várias localidades, inclusive algumas brasileiras [C1, C2, e C7 (citros), M1 (*Colocasia esculenta*), M2 (*Aglaonema*), Y2 (*Dioscorea cayennensis*) e K5 (*Coffeae arabica arabica*)]. Os resultados mostraram que as 33 populações avaliadas puderam ser separadas em pelo menos sete

grupos distintos, com base em suas características morfométricas ou moleculares. As populações brasileiras foram classificadas dentro dos grupos III e V. Ademais, o sequenciamento da expansão D2/D3 da região 28S rDNA de algumas populações brasileiras produziu sequências distintas das demais populações estudadas. Os autores sugeriram que as populações brasileiras, devido ao fato de serem morfológica e molecularmente distintas das outras populações tidas como *P. coffeae* de outras localidades, muito provavelmente são espécies não descritas ou representam complexos de espécies.

Nas últimas décadas, técnicas moleculares têm sido desenvolvidas com o intuito de facilitar a identificação de fitonematoides, incluindo-se a reação de polimerização em cadeia (PCR) que visa amplificar, detectar e comparar fragmentos de DNA. Recentemente, pesquisadores propuseram também a técnica do código de barras de DNA, que vem se tornando cada vez mais atraente para identificação de espécies, considerando os baixos custos, rapidez e objetividade (Hajibabaei *et al.*, 2007). De acordo com Hebert e colaboradores (2003) esta técnica baseia-se na amplificação de um fragmento de aproximadamente 648 pares de bases (pb) da extremidade 5' da porção subunidade I do gene mitocondrial citocromo C oxidase (COI), sendo capaz de identificar indivíduos de diferentes espécies, pois a variabilidade genética entre espécies diferentes é maior que aquelas apresentadas dentro das mesmas espécies. Segundo Subbotin *et al.* (2008), para nematoides do gênero *Pratylenchus*, a região genômica mais estudada é a expansão D2/D3, situada no DNA ribossômico (rDNA), pois esta região apresenta rápida evolução do genes rDNA, sendo mais útil para caracterizar espécies de *Pratylenchus* e suas relações filogenéticas (Duncan *et al.*, 1999; De Luca *et al.*, 2004). Em consequência do uso desses novos métodos, novas espécies têm sido descritas, a exemplo de *P. pseudocoffeae*, *P. loosi* e *P. jaehni*, todas anteriormente consideradas populações de *P. coffeae* (Inserra *et al.*, 1996; 1998; 2001).

O objetivo do presente estudo foi caracterizar morfológicamente, morfometricamente e geneticamente 10 populações de *Pratylenchus* sp., encontradas parasitando o inhame-da-costa (*Dioscorea cayennensis* Lam.), em diferentes municípios produtores de inhame do Estado de Pernambuco, Brasil, procurando-se a identificação específica dessas populações coletadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção das populações de P. coffeae

Para a obtenção das 10 populações de *P. coffeae*, foram coletadas túberas comerciais de inhame-da-costa, infestadas pelos nematoides das lesões radiculares, em 10 diferentes locais, de oito municípios do Estado de Pernambuco: Aliança (AL); Carpina 1 (CP1); Carpina 2 (CP2); Camaragibe (CM); Condado (CD); Feira-Nova (FN); Goiana (GN); Lagoa de Itaenga 1 (LI1); Lagoa de Itaenga 2 (LI2) e Paudalho (PA). Após as coletas, as amostras foram submetidas à extração de nematoides por meio da técnica de Jenkins (1964), obtendo, assim, uma suspensão contendo machos, fêmeas e juvenis. Para as observações, foram retiradas apenas fêmeas adultas para as montagens de lâminas. Seguiram-se as identificações específicas morfológicas preliminares dos espécimes, com base nas características descritas por Handoo e Golden (1989) para *P. coffeae*. Confirmada a identidade inicial da população, deu-se início às mensurações de nove variáveis morfológicas, apenas em fêmeas, utilizando-se 10 espécimes por população. Os dados obtidos foram comparados manualmente com os dados dos grupos descritos por Duncan *et al.* (1999), considerados padrão.

Análise morfométrica

As variáveis morfométricas utilizadas para mensurações foram: comprimento do corpo, maior largura do corpo, comprimento do estilete, comprimento do esôfago e da cauda. Em seguida, foram determinadas as relações corporais designadas: a (comprimento do corpo dividido pela maior largura), b (comprimento do corpo dividido pelo comprimento do esôfago), c (comprimento do corpo dividido pelo comprimento da cauda) e V (distância da extremidade anterior do corpo à vulva, expressa em números percentuais em relação ao comprimento do corpo).

Para as 10 repetições das mensurações de cada variável utilizou-se o cálculo de média aritmética (M), o desvio padrão (DP) e o intervalo de confiança da média (ICM). Como critério de comparação estatística das mensurações das variáveis morfométricas obtidas com as apresentadas por Duncan *et al.* (1999), considerou-se que, no caso em que a média obtida se enquadrasse no ICM da correspondente descrita por Duncan *et al.* (1999) para *P. coffeae*, ambas passavam a ser consideradas equivalentes e, portanto, enquadradas na mesma espécie e grupo de *P. coffeae*. Para a documentação fotográfica, as lâminas correspondentes às diferentes populações foram devidamente etiquetadas e os espécimes fotografados em um sistema de aquisição de imagens digitais, constituído por uma câmara LEICA, modelo ICC50 HD, montada sobre um microscópio LEICA, modelo DM 500, acoplada a um microcomputador, usando-se

o programa LAS EZ (Leica Application Suite)

Análise molecular

Extração de DNA. Para a extração do DNA genômico, foi utilizado o método da Proteinase-K (HLB: Holterman Lysis Buffer), segundo Holterman *et al.* (2006). Para isto, separadamente, um espécime de cada população de *P. coffeae* foi selecionado e seccionado ao meio, com auxílio de uma fina agulha, em uma gota de 25 µL HLB + 25 µL água Mili-q, centrifugado a 14.000 rpm e colocado em tubo de microcentrifuga, sendo incubado a 65°C por 2 horas e a 99°C por 5 min; a seguir, as amostras foram mantidas a -20°C (Consoli *et al.*, 2012).

Reação de PCR. Para a reação de PCR, foi utilizado o kit de PCR Go Taq® Hot Start Green Master Mix, fabricante Promega Corporation – São Paulo/SP. Para início, em um tubo de microcentrifuga de 0,2 mL, foi adicionado 12,5 µL do Go Taq®, 10 µL de NFW (Nuclease Free Water), 1 µL do primer D2 (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3'), 1 µL do primer D3 (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3') (Al-Banna *et al.*, 2004) e 0,5 µL de DNA genômico, totalizando um volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram 94°C por 4 minutos (1 ciclo), 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55 °C por 1,5 minuto, 72°C por 2 minutos, seguido por extensão final a 72°C por 10 minutos. Após a amplificação do DNA, 5 µL do produto da PCR foram utilizados para eletroforese, em tampão 1X TBE (Sambrook *et al.*, 1989), em gel de agarose, a 1%, com 0,003 % de brometo de etídio (0,02 µg/mL), visualizado em um transiluminador de luz UV e fotografado.

Sequenciamento e identificação. O sequenciamento dos fragmentos amplificados da expansão D2/D3 foi realizado utilizando o kit Big Dye Terminator, fabricante Applied Biosystems - São Paulo/SP e foram realizados no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, SP.

Para cada reação, foi preparada uma mistura contendo 2 µL de reagente Big Dye, 3,2 µM 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 mL de água. A reação para sequenciamento foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante (Applied Biosystems). Foi realizada nova purificação do produto amplificado por precipitação com isopropanol em microtubos. Após a desnaturação das amostras a 95°C por 3 minutos, foi realizada eletroforese em aparelho ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystem).

As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com auxílio do software BioEdit Sequence Alignment Editor. As sequências de *Pratylenchus* foram comparadas às sequências de outras espécies de nematoides depositadas no banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para a identificação de similaridade, 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 sequências dos fragmentos da expansão D2/D3 da região 28S rDNA das diferentes populações analisadas. Após o alinhamento, foi realizada uma edição manual através do programa GeneDoc (Nicholas *et al.*, 1997), onde as colunas filogeneticamente não informativas foram excluídas das análises. As análises filogenéticas foram realizadas com o programa TREE-PUZZLE (Strimmer e Von Haeseler, 1996) e com os aplicativos do programa PHYLIP v.3.6^a, sub-rotina DNAML (Felsenstein e Churchill, 1996). O programa TREE-PUZZLE estimou os seguintes parâmetros: taxa esperada de transição/transversão (Ts/Tv) e o parâmetro alfa associado à distribuição gama. O modelo original de substituição selecionado para as análises filogenéticas foi o F84 + G+I, de acordo com o programa DNAML, dentro do pacote PHYLIP. *Radopholus similis* foi selecionada como grupo externo. A árvore filogenética de máxima verossimilhança foi estimada com o aplicativo PHYLIP DNAML, sendo que as análises de bootstrap foram feitas a partir de 1000 repetições, utilizando-se os aplicativos PHYLIP SEQBOOT e CONSENSE.

Primers específicos

Uehara *et al.* (1998) desenvolveram *primers* específicos para duas espécies de *Pratylenchus*: *P. coffeae* e *P. loosi*. No presente estudo, utilizou-se a mesma técnica descrita por Uehara *et al.* (1998) para a identificação dos nematoides presentes em túberas de inhame. Dessa forma, os *primers* PC1 (5'-ATGCGCACATTGCATTACAGC-3') e PC2 (5'-GAGCGAGAAACACCTCTCAC-3'), localizados na região ITS, foram testados com o DNA genômico extraído das 10 populações de *Pratylenchus* provenientes do inhame. As condições da PCR foram: 94°C por 11 min., seguido por 45 ciclos de 94°C por 30 seg., 50°C por 1 min., 72°C por 1 min., e extensão final a 72°C por 5 min.

RESULTADOS

Caracterização morfológica de *P. coffeae*

As 10 populações de *Pratylenchus* sp. oriundas de diferentes municípios de Pernambuco eram anfimíticas, apresentando abundante presença de machos. Nas populações estudadas, os bulbos do estilete eram redondos (Fig. 1A). A espermateca, ligeiramente oval a redonda, normalmente contendo espermatozoides (Fig. 1B), os ovários nos espécimes adultos ocupavam mais da metade do comprimento do corpo (Fig. 1C),

além de apresentarem cauda predominantemente hemisférica (Fig. 1D). A vulva exibiu contornos definidos, muitas vezes salientes (Fig. 1D), as glândulas esofagianas sobrepostas à extremidade anterior do intestino, em posição ligeiramente lateral (Fig. 1E) e o poro excretor localizado próximo à junção esôfago-intestino (Fig. 1E).

Análise morfométrica de 10 populações de *P. coffeae*

A morfometria das fêmeas das 10 populações de *P. coffeae* é apresentada na Tabela 1. O comprimento do corpo, considerando todas as 10 populações analisadas, variou de 550,0 a 900,0 μm (CV= 7, 5%). A maior largura do corpo apresentou amplitude de 20,0 a 50,0 μm (CV= 14,7%). O estilete variou de 15,0 a 20,0 μm (CV= 8,0 %) de comprimento. Quanto ao esôfago, verificou-se uma amplitude de 70,0 a 130,0 μm (CV= 11,4%). O comprimento da cauda variou de 30,0 a 47,5 μm (CV= 9,7%). No que concerne às relações corporais, o valor de a esteve entre 15,0 a 37,5 μm (CV= 15,5%), o valor de b entre 4,4 a 11,7 μm (CV= 14,5%), o valor de c entre 15,5 a 27,2 μm (CV= 9,9%) e o valor de V esteve entre 71,7 a 90,0% (CV= 3,9%).

Ao serem confrontados os dados morfométricos obtidos com os apresentados por Duncan *et al.* (1999), constatou-se que em todas as populações ora estudadas havia diferenças entre uma ou algumas variáveis, ou seja, não se enquadravam no intervalo de confiança publicado por aqueles autores. Por exemplo, na população Paudalho (PA), das nove variáveis morfológicas estudadas, três não se enquadraram nos valores de Duncan *et al.* (1999), sendo estas: a maior largura do corpo (36,0 μm), o comprimento do estilete (17,5 μm) e o valor de V= 83,1%.

Na população Carpina 1 (CP1), foram diferentes a maior largura do corpo (41,0 μm), o comprimento do estilete (18,0 μm) e o valor de a= 19,3. Para a população Carpina 2 (CP2), não se enquadraram as variáveis: maior largura do corpo (38,0 μm) e o comprimento do estilete (19,2 μm). A população Lagoa de Itaenga 1 (LI1), apenas o estilete com 17,7 μm de comprimento não se enquadraram. Para a população Lagoa de Itaenga 2 (LI2) as seguintes variáveis foram divergentes: o comprimento do estilete (19,5 μm), o comprimento da cauda (39,5 μm) e o valor de V= 83,3%.

Para a população Camaragibe (CM), três variáveis não se enquadraram: maior largura (36,0 μm), comprimento do estilete (17,5 μm) e o valor de V= 83,1%. Na população Goiana (GN), apenas a variável maior largura do corpo, não se enquadraram em nenhum grupo de Duncan *et al.* (1999), por apresentar 38,0 μm . Na população Feira Nova (FN) apenas o comprimento do estilete (17,5 μm) não se enquadraram. A população Aliança foi divergente apenas para as variáveis largura do corpo (37,0 μm) e o comprimento do estilete (18,0 μm). Por último, a população Condado (CD) não se enquadraram no sistema de Duncan *et al.* (1999) apenas o do estilete (18,0 μm). Estes dados podem ser

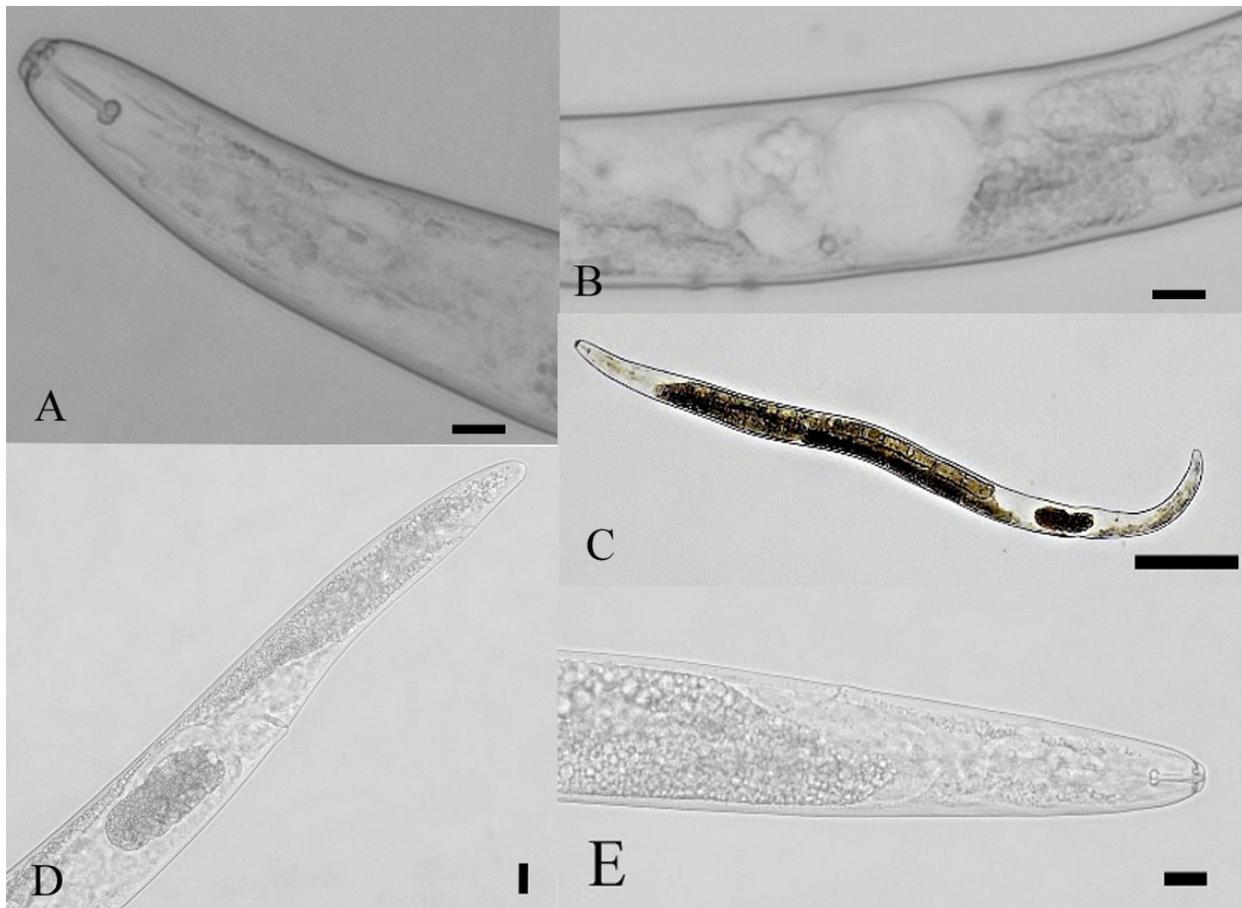


Fig. 1. Fotomicrografia dos caracteres morfológicos utilizados para identificação de *Pratylenchus coffeae*. A) Bulbos do estilete exibindo uma forma arredondada, B) Espermateca funcional ovalada, C) Ovário, D) *P. coffeae* fêmea, indicando a posição da vulva, cauda hemisférica e ânus, E) Poro excretor e glândula esofágica. (A, B, D e E: barra = 10 µm; C: barra = 100 µm).

observados na Tabela 1.

Análise molecular das populações de Pratylenchus

Nos estudos moleculares realizados no presente trabalho, a amplificação da expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA das 10 populações de *P. coffeae* (duas sequências por população) produziu fragmentos de 747 pares de bases (pb). As sequências foram depositadas no GenBank e receberam os códigos de acesso números KJ603439 a KJ603448 (Fig. 2). O sequenciamento da referida região e o alinhamento das sequências resultantes e já editadas, com 404 pb, usando-se o programa BLASTN Blastn (Basic local alignment search tool nucleotide) do NCBI (National Center for Biotechnology Information) foi confirmado. As sequências da expansão D2/D3 do gene 28S (rDNA) obtidas para as 10 populações de *Pratylenchus* de Pernambuco foram idênticas às sequências de *P. coffeae* depositadas no GenBank, considerando e-value 0,0 e similaridade 100% para

todas. Com esses resultados, concluiu-se que as 10 populações estudadas pertenciam à espécie *P. coffeae*.

Análise filogenética de Pratylenchus spp.

Com o objetivo de se estudar a heterogeneidade e agrupamentos entre espécies do gênero *Pratylenchus*, foram incluídas no presente estudo filogenético as sequências da expansão D2/D3 da região 28S de várias espécies de *Pratylenchus* depositadas no GenBank, juntamente com as 10 populações de *P. coffeae* provenientes de inhame.

As 55 sequências (incluindo *R. similis*, utilizado como grupo externo) da expansão D2/D3, após o alinhamento, apresentaram-se no tamanho de 508pb. A partir do alinhamento das sequências de *Pratylenchus* spp., produziu-se uma árvore filogenética (Fig. 2), onde verificou-se que todas as populações provenientes do inhame permaneceram no mesmo grupo que a espécie *P. coffeae* (Y2), assim nomeada por Duncan *et al.* (1999).



Fig. 2. Relação filogenética de *Pratylenchus coffeae* população inham e sua similaridade com populações obtidas do GenBank baseada no alinhamento da sequência da região D2/D3 28S DNAr. A árvore filogenética de máxima verossimilhança foi estimada com o aplicativo PHYLIP DNAML. O modelo original de substituição selecionado para as análises filogenéticas foi o F84 + G+I. *Radopholus similis* foi utilizado como grupo externo.

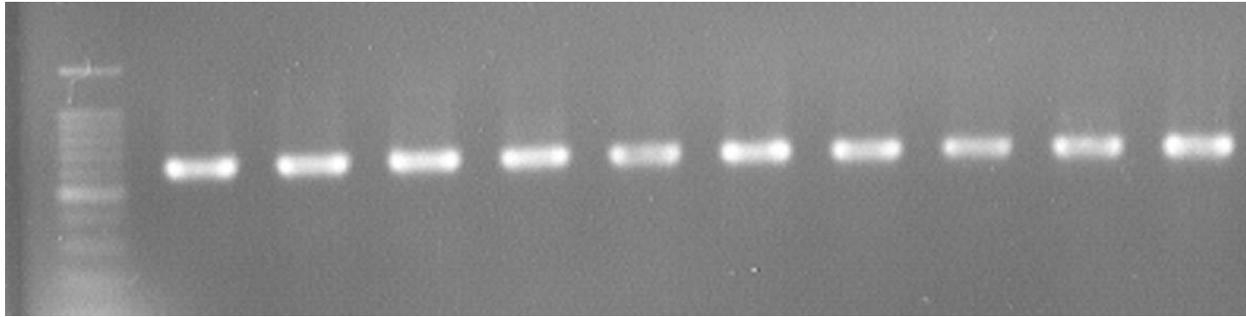


Fig. 3. Análise eletroforética em gel de agarose a 1% de fragmentos específicos amplificados (632 pb) pelos *primers* PC1 e PC2 (Uehara *et al.*, 1998) de indivíduos (fêmeas) das populações Aliança (AL), Carpina 1 (CP1), Carpina 2 (CP2), Camaragibe (CM), Condado (CD), Feira-Nova (FN), Goiana (GN), Lagoa de Itaenga I (LI1), Lagoa de Itaenga 2 (LI2) e Paudalho (PA) de *Pratylenchus coffeae*. M = marcador de peso molecular VIII (Roche).

Primers específicos

Testes com os primers específicos PC1 e PC2 desenvolvidos por Uehara *et al.* (1998) demonstraram sua especificidade ao produzir os fragmentos esperados de 632 pb para as 10 populações de *P. coffeae* provenientes de inhame. Assim, a identificação das populações Aliança (AL), Carpina 1 (CP1), Carpina 2 (CP2), Camaragibe (CM), Condado (CD), Feira-Nova (FN), Goiana (GN), Lagoa de Itaenga 1 (LI1), Lagoa de Itaenga 2 (LI2) e Paudalho (PA) foi confirmada como *P. coffeae* (Fig. 3).

DISCUSSÃO

A posição taxonômica de *P. coffeae* tem sido objeto de muitos estudos (Inserra *et al.*, 2001; Mizukubo, 1992; Duncan *et al.*, 1999; Ryss, 2002a; Van den berg *et al.*, 2005) devido à alta variabilidade genética e morfométrica quando comparadas diferentes populações. No presente estudo, mais de 50% de todas as populações analisadas apresentaram diferenças quanto ao comprimento da largura do corpo e 90% apresentaram diferenças quanto ao comprimento do estilete em relação a todos os grupos descritos no sistema, segundo Duncan *et al.* (1999). No entanto, 70% das demais variáveis do restante das populações enquadraram-se no citado sistema de Duncan, sendo consideradas, portanto, da mesma espécie e grupo, confirmando, através das características morfométricas, a espécie como sendo *P. coffeae*. (Tabela 1). Igualmente, ficou demonstrado que os espécimes estudados apresentaram alto grau de semelhança com os descritos na literatura por outros autores (Gonzaga, 2006; Inserra *et al.*, 2001). As variações morfométricas existentes nas populações aqui estudadas podem ser consideradas normais da espécie e que, inclusive, ocorrem comumente em indivíduos de uma mesma população de *P. coffeae*.

A forma da espermateca das fêmeas, de acordo com Ryss (2002b), é a melhor característica a ser utilizada para distinguir espécies do gênero

Pratylenchus, devido à redução desta estrutura, ocorrido em cinco etapas transitórias de espécies anfimíticas para partenogênicas. A partir da espermateca, por exemplo, foi possível a separação da espécie *P. coffeae* de *P. loosi*, como mostra o estudo realizado por Pourjame *et al.* (1997).

O comprimento e a forma da cauda da espécie *P. coffeae*, de acordo com a literatura (Nguyen, 2010), pode ter alta variabilidade. No presente estudo, tal fato não ocorreu, apresentando apenas a forma hemisférica.

O comprimento do estilete e o valor de V, foram utilizados para distinção de *P. jaehni* das espécies *P. coffeae* e *P. loosi*, como mostrado por Inserra *et al.* (2001). Para as populações de Pernambuco ora estudadas, o comprimento do estilete foi uniforme, com o coeficiente de variação da ordem de 8%. No entanto, o menor coeficiente de variação das variáveis estudadas foi para o valor de V% (3,7%), semelhante ao estudo realizado por Nguyen (2010). Este autor, ao analisar a morfometria de 10 populações de *P. coffeae* do Vietnã, constatou um coeficiente de variação igualmente baixo para o valor de V% (3,1%). O comprimento do estilete e o valor de V%, portanto, mostraram-se estáveis e devem ser considerados como dos mais básicos na taxonomia de *P. coffeae*. Para todas as demais variáveis morfométricas taxonômicas analisadas nas populações de Pernambuco, o coeficiente de variação foi alto, confirmando-se a instabilidade morfológica e morfométrica existente em populações de *P. coffeae*. Doucet *et al.* (1996; 2001), sugeriram que tais variações podem ocorrer por influências do isolamento geográfico da espécie, interação com plantas hospedeiras e também pela influência da temperatura do solo na biologia do nematoide.

Finalmente, a técnica do código de barras com base na expansão D2/D3, do gene 28S (rDNA), mostrou-se como uma ferramenta segura para a identificação da espécie em estudo. Os resultados foram conclusivos e confirmaram as populações como *P. coffeae*, estando todas intimamente relacionadas com as sequências das populações de *P. coffeae* obtidas a partir do GenBank,

Tabela 1. Dados morfométricos de fêmeas de 10 populações de *Pratylenchus coffeae* coletadas em túberas de inhame-da-costa (*Dioscorea cayennensis*), em diferentes Municípios do Estado de Pernambuco, Brasil [Aliança (AL); Carpina 1 (CP1); Carpina 2 (CP2); Camaragibe (CM); Condado (CD); Feira-Nova (FN); Goiana (GN); Lagoa de Itaenga 1 (LI1); Lagoa de Itaenga 2 (LI2) e Paudalho (PA)]. Todas as mensurações estão μm e representadas pelas médias \pm desvio padrão, seguidas pelos intervalos obtidos.

Populações	Comprimento do corpo	largura do corpo	Comprimento do estilete	Comprimento do esfago	Comprimento da cauda	a	b	c	V%
PA	770,0 \pm 65,4 732,8-807,1	36,0 \pm 5,1 32,30-39,6	17,5 \pm 1,6 16,3-18,6	104,0 \pm 11,7 95,6-112,3	37,5 \pm 2,3 35,8-39,1	21,7 \pm 3,0 19,5-23,8	7,3 \pm 1,0 6,5-8,0	20,5 \pm 1,5 19,4-21,5	83,1 \pm 5,3 79,3-86,8
CP1	790,0 \pm 64,7 743,7-836,2	41,0 \pm 3,1 38,7-43,2	18,0 \pm 1,9 16,6-19,3	98,0 \pm 18,1 85,0-110,9	35,7 \pm 6,2 31,2-40,1	19,3 \pm 1,5 18,2-20,3	8,3 \pm 2,0 6,8-9,7	22,4 \pm 2,6 20,5-24,2	82,8 \pm 1,9 79,0-86,5
CP2	760,0 \pm 89,9 695,6-824,3	38 \pm 4,2 34,9-41,0	19,2 \pm 1,2 18,3-20,0	96 \pm 14,2 85,8-106,1	35,2 \pm 1,8 33,9-36,4	20,2 \pm 3,5 17,6-22,7	8,0 \pm 1,6 6,8-9,1	21,5 \pm 2,5 19,7-23,2	80,8 \pm 2,4 79,0-82,5
LI1	690,0 \pm 69,9 639,9-740,0	30 \pm 4,7 26,6-33,3	17,7 \pm 0,7 17,1-18,2	109,0 \pm 11,0 101,1-116,8	33,5 \pm 3,1 31,2-35,7	23,2 \pm 2,5 21,4-24,9	6,3 \pm 0,8 5,7-6,8	20,6 \pm 2,0 19,1-22,0	82,0 \pm 3,3 79,3-84,3
LI2	712,0 \pm 42,8 681,3-742,6	35,0 \pm 5,2 31,2-38,7	19,5 \pm 1,0 18,7-20,2	96,0 \pm 11,7 87,6-104,3	39,5 \pm 5,1 35,8-43,1	20,8 \pm 3,8 18,0-23,5	7,5 \pm 0,9 6,8-8,1	18,2 \pm 1,7 16,9-19,4	83,3 \pm 3,6 80,7-85,8
CM	770,0 \pm 65,4 703,2-816,7	36,0 \pm 5,1 32,3-39,6	17,5 \pm 1,6 16,3-18,6	104,0 \pm 11,7 95,6-112,3	37,5 \pm 2,3 35,8-39,1	21,7 \pm 3,0 19,5-23,8	7,3 \pm 1,0 6,5-8,0	20,5 \pm 1,5 19,4-21,5	83,1 \pm 5,3 79,3-86,8
GN	750,0 \pm 42,4 716,6-780,3	38,0 \pm 4,2 34,9-41,0	16,7 \pm 1,2 15,8-17,5	100,0 \pm 10,5 92,4-107,5	36,2 \pm 2,9 34,1-38,2	19,9 \pm 2,2 8,3-21,4	7,5 \pm 0,8 6,9-8,0	20,8 \pm 2,0 19,3-22,2	81,2 \pm 2,9 79,1-83,2
FN	742,5 \pm 65,6 695,5-789,4	29 \pm 5,6 24,9-33,0	17,5 \pm 1,4 16,4-18,5	105,0 \pm 10,8 97,2-112,7	33,2 \pm 3,5 30,6-35,7	26,5 \pm 6,0 22,2-30,7	7,1 \pm 1,0 6,3-7,8	22,5 \pm 2,7 20,5-24,4	81,3 \pm 3,6 8,7-83,8
AL	737,5 \pm 63,7 691,9-783,0	37,0 \pm 9,4 30,2-43,7	18,0 \pm 1,0 17,2-18,7	105,0 \pm 7,0 99,9-110,0	36,5 \pm 2,4 34,7-38,2	20,9 \pm 5,1 17,2-24,5	7,0 \pm 0,8 6,4-7,5	20,2 \pm 1,1 19,4-20,9	80,2 \pm 3,1 77,9-82,4
CD	757,5 \pm 37,3 730,8-784,1 7,9	34,0 \pm 5,1 30,3-37,6 14,7	18,0 \pm 1,5 16,9-19,0 8,0	102,0 \pm 9,1 95,4-108,5 11,4	36,7 \pm 3,3 34,3-39,0 9,7	22,1 \pm 2,5 20,3-23,8 15,5	7,4 \pm 0,6 6,9-7,8 14,5	20,7 \pm 2,0 19,2-22,1 9,9	80,0 \pm 2,0 78,5-81,4 3,7
DUNCAN <i>et al.</i> , 1999	725 \pm 13,8 588,5-821,0	30,1 \pm 0,49 27,0-35,0	16,5 \pm 0,09 15,5-17,0	97,9 \pm 1,7 87,0-116,5	35,4 \pm 0,6 30,0-39,0	24,2 \pm 0,36 19,6-27,0	7,4 \pm 0,16 6,1-8,9	20,6 \pm 0,5 17,3-24,8	81,3 \pm 0,29 79,0-83,0

a = comprimento do corpo dividido pelo maior comprimento da largura

b = comprimento do corpo dividido pelo comprimento do esfago

c = Comprimento do corpo dividido pelo comprimento da cauda;

V = comprimento da região cefálica à vulva em relação ao comprimento do corpo expresso em porcentagem.

com taxa de similaridade entre as seqüências de 100%.

Nguyen (2010) estudou 10 populações de *P. coffeae* do Vietnã usando a mesma região D2/D3 e obteve produtos de sequenciamento com 759 pb, usando os primers D2 e D3. O autor encontrou, entre as populações estudadas, similaridade de mais de 99%, com exceção de uma população de Gana, que apresentou diferenças em 18 dos 23 sítios diagnósticos entre as populações do Genbank e as populações do Vietnã.

Esta técnica, embora ainda não rotineira em laboratórios, apresenta-se muito eficiente para a diagnose de fitonematoides do gênero *Pratylenchus*. A sua aplicação, além de ser uma poderosa ferramenta para a taxonomia e pesquisa da biodiversidade (Hajibabaei *et al.*, 2007), já que se baseia em sequenciar um pequeno trecho do genoma do organismo específico para cada espécie, mantém segura a identificação até mesmo de espécimes danificados, com a morfologia alterada, devido a anidrobiose (Oliveira *et al.*, 2009).

Para uma segura identificação de nematoides é necessária a complementação dos dados morfológicos com os dados moleculares, de acordo com o conceito proposto pela taxonomia polifásica e integrativa (Pires e Marinomi, 2010). A exemplo de Duncan *et al.* (1999), que ao realizar um estudo morfométrico e molecular por meio do sequenciamento da região D2/D3 do DNA ribossômico e RAPD, tendo por objetivo estimar as relações filogenéticas entre 33 populações originalmente caracterizadas como *P. coffeae*, *P. loosi*, *P. pseudocoffeae* e *P. gutierrezii*, observaram que as populações apresentavam alta diferença, tanto morfológica como molecular, podendo ser separadas em pelo menos sete grupos. Isto sugeriu que, devido ao fato de algumas espécies serem muito distintas de outras de diferentes localidades, provavelmente eram espécies não descritas ou complexos de espécies, algo que mais tarde foi comprovado por Inserra *et al.* (2001), que descreveu a espécie *P. jaehni*, anteriormente considerada *P. coffeae*. No entanto, Subbotin *et al.* (2008) consideraram a espécie *P. coffeae* como monofilética.

No presente trabalho, de acordo com os estudos taxonômicos morfológicos, morfométricos e análises moleculares (código de barras do DNA, análise filogenética e uso de primers específicos), concluiu-se que todas as populações provenientes do inhame tratam-se de *P. coffeae*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo auxílio financeiro à presente pesquisa.

LITERATURA CITADA

Al-Banna, L., A. T. Ploeg, V. M. Williamson and

- I. Kaloshian. 2004. Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. *Journal of Nematology* 36:142-146.
- Consoli, E. A., S. A. Oliveira, R. Harakava, R. and C. M. G. Oliveira. 2012. Desenvolvimento de diagnóstico molecular para identificação de *Pratylenchus jaehni*. *Nematologia Brasileira* 36: 62-70.
- De Luca, F., E. Faneelli, M. Divito, A. Reyss and C. De Giorgi. 2004. Comparison of the sequences of the D3 expansion of 26S ribosomal genes reveals different degrees of heterogeneity in different population and species of *Pratylenchus* from the Mediterranean region. *European Journal of Plant Pathology* 110:949-957.
- Doucet, M., J. Pinochet, and J. A. Di Rienzo. 1996. Comparative analysis of morphological and morphometrical characters in six isolates of *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen, 1951 (Nemata: Tylenchida). *Fundamental and Applied Nematology* 19:79-84.
- Doucet, M., P. Lax, J. A. Di Rienzo, J. Pinochet, and P. Baujard. 2001. Temperature-induced morphometrical variability in an isolate of *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen, 1951 (Nematoda; Tylenchida). *Nematology* 3:1-8.
- Duncan, L. W., R. N. Inserra, W. K. Thomas, D. Dunn, I. Mustika, L. M. Frisse, M. L. Mendes, K. Morris, and D. T. Kaplan. 1999. Molecular and morphological analyses of isolates of *Pratylenchus coffeae* and closely related species. *Nematropica* 29: 61-80.
- Felsenstein, J. and G. A. Churchill. 1996. A hidden Markov model approach to variation among sites in rate of evolution. *Molecular Biology and Evolution* 13:93-104.
- Gonzaga, V. 2006. Caracterização morfológica, morfométrica e multiplicação in vitro das seis espécies mais comuns de *Pratylenchus* Filipjev, 1936 que ocorrem no Brasil. Ph.D. Thesis, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 79 pp.
- Goulart, A. M. C. 2008. Aspectos gerais sobre nematoides das lesões radiculares (gênero *Pratylenchus*). Planaltina: Embrapa Cerrados. 30 p. (Documentos, 219).
- Hajibabaei, M., G. A. C. Singer, P. D. N. Hebert, and D. A. Hickey. 2007. DNA barcoding: How it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* 23: 167-172.
- Handoo, Z. A., and A. M. Golden. 1989. A key and diagnostic compendium to the species of the genus *Pratylenchus filipjev*, 1936 (lesion nematodes). *Journal of Nematology* 21:202-218.
- Handoo, Z. A., L. K. Carta, and A. M. Skantar. 2008. Taxonomy, morphology and phylogenetics of coffee associated root-lesion nematodes,

- Pratylenchus* spp. Pp. 29-50 in: R. M. Souza, ed. Plant-parasitic nematodes of coffee. Dordrecht, The Netherlands, Springer.
- Hebert, P. D., A. Cywinska, S. L. Ball and J. R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes Proc Biol Sci 270:313-321.
- Holterman, M., A. Van Der Wurff, A., S. Van Den Elsen, H. Van Meegen, T. Bongers, O. Holovachov, J. Bakker, and J. Helder. 2006. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. Molecular Biology and Evolution 23:1792-1800.
- Inserra, R.N., J.H. O'Bannon, and L.W. Duncan. 1990. Native hosts of *Pratylenchus coffeae* in Florida. Nematology Circular no. 182. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Gainesville, Florida, USA.
- Inserra, R. N., L.W. Duncan, N. Vovlas, and P. A. A. Loof. 1996. *Pratylenchus loosi* from pasture grasses in central Florida. Nematologica 42:159-172.
- Inserra, R. N., L.W. Duncan, D.T. Kaplan, and D. Porozinska. 1998. *Pratylenchus pseudocoffeae* from Florida and its relationship with *P. gutierrezii* and *P. coffeae*. Nematologica 44:683-712.
- Inserra, R. N., L.W. Duncan, A. Troccoli, D. Dunn, J. M. Santos, D. Kaplan, and N. Vovlas. 2001. *Pratylenchus jaehni* sp. n. from citrus in Brazil and its relationship with *P. coffeae* and *P. loosi* (Nematoda: Pratylenchidae). Nematology 3:653-665.
- Jenkins, W. R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Report 48:692.
- Mizukubo, T. 1992. Morphological and statistical differentiation of *Pratylenchus coffeae* complex in Japan (Nematoda: Pratylenchidae). Applied Entomology and Zoology 27:213-224.
- Nicholas, K. B., H. B. Nicholas, Jr., and D. W. Deerfield II. 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. EMBnet News 4:14.
- Nguyen, T. T. 2010. A comparative polyphasic study of 10 *Pratylenchus coffeae* populations from Vietnam. Ph.D. Thesis, Ghent University, Ghent. 163 pp.
- Oliveira, C. M. G., A. C. Z. Machado, R. K. Kubo, and R. Harakava. 2009. Diagnose de *Aphelenchoides fragariae* e *Pratylenchus* spp. pela aplicação da tecnologia do código de barras do DNA. Nematologia Brasileira 33:218-225.
- Oliveira, C. M. G.; R. Bessi, R. Harakava, A. C. Z. Machado, and R. K. Kubo. 2011. Uso de técnicas moleculares e microscopia eletrônica de varredura no esclarecimento da posição taxonômica da população K5 de *Pratylenchus* sp. Nematologia Brasileira 35:36-45.
- Pires, A. C., and L. Marinoni. 2010. DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. Biota Neotropica 10:339-346.
- Pourjam, E., A. Kheiri, and E. Geraert. 1997. The genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (Tylenchida: Pratylenchidae) from North of Iran. Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, University Gent 62:741-756.
- Ryss, A. Y. 2002a. Genus *Pratylenchus* Filipjev: multientry and monoentry keys and diagnostic relationships (Nematoda: Tylenchida: Pratylenchidae). Zoosystemat Ross 10:241-255.
- Ryss, A. Y. 2002b. Phylogeny and evolution of the genus *Pratylenchus* according to morphological data (Nematoda: Tylenchida). Zoosystematica Rossica 10:257- 273.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Vols. I-III. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Strimmer, K., and A. Von Haeseler. 1996. Quartet puzzling, a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. Molecular Biology and Evolution 13:964-969.
- Subbotin, S. A., E. J. Ragsdale, T. Mullens, P. A. Roberts, M. Mundo-Ocampo, and J. G. Baldwin. 2008. 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 48:491-505.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies from multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25:4876-4882.
- Uehara, T., T. Mizukubo, A. Kushida, and Y. Momota. 1998. Identification of *Pratylenchus coffeae* and *P. loosi* using specific primers for PCR amplification of ribosomal DNA. Nematologica 44:357-368.
- Van Den Berg, E., P. Queneherve, and L. R. Tiedt. 2005. Six known plant-feeding nematodes from Guadeloupe, Martinique and French Guiana (Nematoda: Tylenchida). Journal of Nematode Morphology and Systematics 7:109-129.
- Wilcken, S. R. S., E.S. Mori, M. Bacci, L.C.C.B. Ferraz, C.M.G. Oliveira, and M.M. Inamoto. 2008. Relationships among *Pratylenchus jaehni* and *P. coffeae* isolates from Brazil. Nematologia Brasileira 32:194-199.
- Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner, and W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology 7:203-214.

Received:

5/VI/2014

Accepted for publication:

19/VII/2014

Recibido:

Aceptado para publicación: