

# SEPARAÇÃO DE DUAS POPULAÇÕES DE NEMATÓIDES DO GÊNERO *Meloidogyne*. COM DIFERENTES PATOGENICIDADES EM CAFEIEIRO, ATRAVÉS DE ELETROFORESE

RAUL MACHADO NETO, RUBENS R. A. LORDELLO e  
LUIZ GONZAGA E. LORDELLO

Escola Superior de Agricultura "Luz de Queiroz"  
Universidade de São Paulo — Piracicaba

## INTRODUÇÃO

A existência de raças fisiológicas, entre os nematóides, já vem sendo relatada, há tempos, com os trabalhos de GOODEY (1933), FILIPJEV & SCHUURMANS-STECKHOVEN (1941), DUCHARME & BIRCHFIELD (1956) etc. Desses trabalhos, o de DUCHARME & BIRCHFIELD sobre *Radopholus similis* (Cobb., 1893) Thorne, 1949, é talvez o mais completo. Estes autores fizeram seu trabalho baseado em parasitismo do referido nematóide em citrus e banana, sendo que uma das "raças" parasitava banana e a outra banana e citru, sendo inseparáveis morfologicamente.

Com referência ao nematóide *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887, CURTI, et al. (1970) sugeriram a existência de três raças fisiológicas do mesmo, atacando cafeeiros (*Coffea arabica* L.), no País. Deve-se notar que o conceito de raça fisiológica neste caso expressa também nematóides inseparáveis morfologicamente, porém com diferenças na patogenicidade através de experimentos conduzidos em vasos. Neste trabalho, foi possível observar as diferenças que o ataque de nematóides provenientes de Flórida Paulista e Ribeirão Preto apresentaram, concluindo-se serem os de Flórida Paulista mais patogênicos.

## OBJETIVOS

O uso de análises bioquímicas para a separação de animais é re-

cente e constitui o que se convencionou chamar de taxonomia química, usada quando os recursos morfológicos são insuficientes ou duvidosos.

No presente trabalho, o objetivo foi confirmar a separação dos nematóides provenientes das mesmas fontes usadas por MACHADO NETO (1975), através de provas bioquímicas, ou seja da eletroforese, que é um processo usado para separar proteínas que se comportam diferentemente ao efeito de uma corrente elétrica. Com esse método, para a separação de proteínas, caso seja observada uma ou um grupo de proteínas que apresentam caminhamentos diferentes, poderemos concluir que os nematóides são diferentes fisiologicamente, pois essa proteína ou grupo, que reagiu diferentemente, faz parte da constituição dos nematóides dessa população ou é algum enzimo ou enzimos produzidos pelos mesmos, que a outra população não apresenta.

#### MATERIAIS E MÉTODOS

Os nematóides foram obtidos em cafezais infestados, que apresentavam sintomas característicos de diferentes patogenicidades. A população considerada menos patogênica foi coletada em Ribeirão Preto que é tida como *M. exigua* típica e a outra em Flórida Paulista.

No material proveniente de R. Preto, as fêmeas foram obtidas pela dissecação manual das raízes com o uso de um microscópio estereoscópio. Porém, no material proveniente de Flórida Paulista, esse processo foi inexequível, em virtude do seu baixo rendimento. Para a obtenção das fêmeas desse material, as raízes foram picadas e batidas em liquidificador durante 30 segundos. O líquido obtido foi passado numa peneira de 20 malhas por polegada, e recebido numa de 100, sendo retiradas as fêmeas desse material que não atravessou esta última peneira, com o uso de um microscópio estereoscópio e de uma pequena espátula especialmente adaptada a esse fim.

As fêmeas obtidas, em número de 100, para cada material, foram maceradas juntamente com 1,0ml de tampão fosfato, com pH próximo de 6,8 em solução de sacarose a 20%. Após a maceração, o material sofreu uma centrifugação a 16.100 rpm durante 20 minutos, com o objetivo de separarmos as proteínas solúveis, sobrenadantes, desprezando-se o precipitado.

Para a execução da eletroforese, foram feitas algumas modificações no processo da poliacrilamida, de DAVIS (1964), cujos objeti-

vos foram obter maior número e melhor nitidez das bandas. As modificações foram a eliminação do gel espessador, o não congelamento do material, sendo utilizado logo após a obtenção, o uso de recipiente de porcelana com sílica e não vidro para a maceração, bem como a retirada do excesso de "amido black" pelo aparelho de baixa voltagem.

O gel fino, que constitui o meio em que as proteínas são corridas, é preparado com a seguinte fórmula: 3,0ml de A (HC1 + TRIS + TEMED) + 4,2ml de C (acrilamida + BIS) + 6,3ml H<sub>2</sub>O; esses 13,5ml são misturados com igual volume de uma solução de persulfato 140 mg/100ml. Usamos 1,2ml da mistura acima para cada tubo e em seguida colocamos, com o uso de micro-pipeta, uma fina película de H<sub>2</sub>O, cuja finalidade é evitar a oxidação do gel. Após essa operação, colocamos os tubos na vertical numa estufa, polimerizando durante 30 minutos.

Após a polimerização das colunas, nos tubos, distribuímos, com uma micro-pipeta, o sobrenadante obtido das fêmeas, da seguinte forma:

Flórida Paulista		Ribeirão Preto	
Tubo 1	0,05 ml	Tubo 5	0,05 ml
Tubo 2	0,05 ml	Tubo 6	0,05 ml
Tubo 3	0,05 ml	Tubo 7	0,05 ml
Tubo 4	0,10 ml	Tubo 8	0,10 ml

Colocamos em seguida um frente de 2,0ml de bromo-fenol (0,005%), por tubo, que irá correr na frente das proteínas, indicando sua posição na coluna de gel.

Os dois reservatórios em que as extremidades dos tubos foram fixados, continham TRIS GLY pH 8,3 suficiente para cobri-los. O tempo para o frente percorrer a coluna de gel foi de 1 h 45 min, com uma amperagem de 3 miliamper por tubo.

Após a retirada das colunas de gel polimerizado dos tubos, este foi colocado em uma solução de 0,4g de amido black + 100ml de ácido acético 7%, durante 8 horas. Depois desse período, a retirada do excesso do corante foi feita de duas formas, 1 tubo de cada nematóide pelo processo já consagrado de lavagem em solução de ácido acético a 7% e os 3 outros tubos de cada nematóide foram colocados no aparelho de baixa voltagem novamente, com ácido acético 7%, nos reservatórios. O ácido acético usado foi o glacial.

### RESULTADOS

Após a execução do processo de eletroforese, cada material apresentou uma distinta distribuição de bandas.

Podemos pela comparação das distribuições das bandas de ca-

da material, constatar facilmente que essas distribuições eram diferentes, pois uma das bandas, no material procedente de Ribeirão Preto, correu 21 mm e no material de Flórida Paulista essa banda não apareceu; porém, nesse material constatou-se uma banda que correu 44 mm e não apareceu no outro material.

Para melhor compararmos os resultados, utilizamos o cálculo de Rf, que é a relação entre a distância percorrida pela amostra e a distância percorrida pelo fronte.

Os valores a seguir são médias de três repetições.

Os valores de Rf são Rf (A1) = 0,3818, Rf (B1) = 0,5636, Rf (C1) = 0,6363, Rf (D1) = 0,9818, Rf (B2) = 0,5614, Rf (C2) = 0,6140, Rf (E2) = 0,7719, Rf (D2) = 0,9649.

As laudas B1, C1 e D1 evidenciadas com material de Ribeirão Preto, encontram correspondência com B2, C2 e D2 obtidas com material de Flórida Paulista. Porém, as laudas A1, reveladas no primeiro material, e E2, no segundo material, não encontram correspondentes.

#### CONCLUSÃO

Os resultados obtidos são significativos, permitindo-nos afirmar que essas duas populações de nematóides apresentam diferenças em sua composição proteica.

#### LITERATURA CITADA

- CURI, S. M., L. G. E. LORDELLO, ARLETE DE BONA & A. F. CINTRA, 1970 — Atual distribuição geográfica dos nematóides do cafeeiro (*Meloidogyne coffeicola* e *M. exigua*), no Estado de São Paulo. *Biológico* 36 (1): 26-28.
- DAVIS, B. J., 1964 — Disc-electrophoresy. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121: 404-27.
- DUCHARME, E. & W. BIRCHFIELD, 1956 — Physiologic races of the burrowing nematode *Phytopathology* 46 (11): 615-16.
- FILIPJEV, I. N. & J. H. SCHUURMANS-STEKHOVEN, Jr., 1941 — A manual of agricultural helminthology, E. J. Brill, Leiden, 878 pp.
- GOODEY, T., 1933 — *Plant parasitic nematodes and the diseases they cause*, 306 pp., E. P. Dutton & Co., Inc., New York.
- MACHADO NETO, R., 1972 — Nota prévia sobre possíveis raças fisiológicas de *Meloidogyne exigua* no Estado de São Paulo. *Rev. Agricultura, Piracicaba*, 57 (2): 86.
- MACHADO NETO, R., 1975 — Estudo sobre diferentes patogenicidades de *Meloidogyne exigua* em cafeeiros no Estado de São Paulo. *Solo*. (em publicação).