

Introdução a nematoides

E. C. McGawley¹, C. Overstreet², M. J. Pontiff³ e A. M. Skantar⁴

⁽¹⁻³⁾Nematologistas, LSU AgCenter, Baton Rouge, LA 70803 e ⁴Pesquisador em biologia molecular, USDA-ARS Nematology Laboratory, Beltsville, MD 20705
(Julho, 2011)

Traduzido para Português por Déborah M. Xavier⁵ e Janete A. Brito⁶

⁵Estudante de mestrado do Department of Plant Pathology and Crop Physiology da Louisiana State University e ⁶Nematologista, Division of Plant Industry, Gainesville, FL 32608
(Outubro, 2011)

Este documento contém slides numerados, comentários no conteúdo, onde necessário, e explicações sobre abreviações usadas em slides nessa apresentação, “Introdução a nematoides”. Créditos não reconhecidos no slide 98 estão incluídos aqui. Todo conteúdo relacionado à essa apresentação é para uso sem fins lucrativos nas áreas de nematologia, fitopatologia, proteção de plantas e helmintologia. Os principais veículos de disseminação dessa apresentação são: The Society of Nematologists (SON) e The Organization of Nematologists of Tropical America (ONTA). É indispensável aos usuários visitar os websites dessas duas organizações (<http://www.nematologists.org> e <http://www.ontaweb.org>) para conhecer suas contribuições à ciência e agricultura e para se familiarizar com as atividades filantrópicas das fundações N. A. Cobb e ONTA.

Os materiais nessa apresentação são focados primariamente em nematoides parasitas de plantas agriculturalmente importantes. Leitores e narradores dessa apresentação devem estar cientes de transmitir ao público-alvo a grande diversidade e imensa importância de outros membros desse grupo especial de animais, agrupados no Filo Nematoda; ao qual, injustificavelmente, é dada pouca ênfase. Encoraja-se aos usuários dessa apresentação que deem feedback via email (contatos no final deste documento). Contribuições de fotos ou dados formatados que possam melhorar seções já existentes, ou adicionar novas seções, especialmente relacionados a biologia molecular, ou a outros nematoides não parasitas de plantas são muito bem vindos. Essa apresentação NÃO deve ser considerada como um produto finalizado. Felizmente, com contribuições de pessoas interessadas em nematoides este projeto se desenvolverá gradativamente, em um contínuo projeto que reflita os conhecimentos biológicos, ecológicos e científicos acumulados sobre nematoides e suas funções na natureza.

- 1.) **Introdução.** O propósito desse slide introdutório é convencer do fato de que nematoides vivem em praticamente todos os nichos ecológicos conhecidos na Terra. Nematoides estão entre os animais multicelulares mais abundantes na Terra. Os primeiros invertebrados apareceram a cerca de 600 milhões de anos atrás. Espécimes fossilizados de âmbar no Líbano indicam que o primeiro nematoide (nematoides mermitídeos - parasita de insetos) data de 135-120

milhões de anos atrás (Poinar, G. O. et al., 1994. Fundam. Appl. Nematol., 17 (5) 475-477).

- 2.) **Os Seis Reinos.** Os dados aqui apresentados são do projeto “Tree of Life web project” (<http://tolweb.org/tree/>) e ilustram a abundância e os agrupamentos dos organismos vivos na Terra. Atualmente estima-se que haja um milhão de animais entre 1.5 milhões de organismos vivos descritos.
- 3.) **Vermes.** Estabelecendo as posições relativas dos vermes e dos “vermes-like” organismos no reino Animalia. Os animais podem ter tanto simetria radial quanto bilateral. Organismos de simetria bilateral são deuterostomados ou protostomados. O primeiro “Build-in” explica esses termos e fornece a embriologia necessária para o entendimento da formação do tecido mesodérmico presente no organismo triploblástico. Tanto vermes quanto “vermes-like” animais são protostomados e dividem-se em dois superfilos: aqueles que contêm animais com cílios externos e/ou “filter comb” (Lophotrochozoa) e aqueles que sofrem ecdise e tem cutículas (Ecdysozoa). Detalhes podem ser encontrados em http://www.wormbook.org/toc_nematodeevolecol.html no segundo capítulo de Paul DeLey. Existem nove filos (Platyhelminthes, Bryozoa, Sipuncula, Mollusca, Nemertea, Entoprocta, Annelida, Phoronida e Brachiopoda) de Lophotrochozoa e oito filos (Arthropoda, Onychophora, Tardigrada, Nematomorpha, Kinorhyncha, Loricifera, Priapulida e Nematoda) de Ecdysozoa. A partir desse ponto built-in 2 apresenta a tênia (cisto), *Taenia pisiformis*, e sua porção anterior (scolex) aderida ao intestino de um coelho (www.thiagoodview.com).
- 4.) **Filo Nematoda.** Os seis build-ins introduzem características de animais do filo Nematoda. Os termos celomado, pseudocelomado e acelomado estão explicados no build-in 1. **Observação:** alguns especialistas assumem que Pseudocelomata é um grupo artificial parafilético. Porém, o pseudoceloma continua sendo uma característica de nematoídeos e é usado aqui apenas para uma visão geral e não para confirmar a validade filogenética desse grupo.
- 5.) **Parasitas de animais.** Parte superior direita: cegueira do rio causada por *Onchocerca volvulus*. Esse nematoídeo é transmitido pela mosca preta *Simulium damnosum*; parte central direita: *Toxocara canis*, lombriga de cachorro; parte inferior direita: *Toxocara cati* parasita do gato doméstico (modificado de petcaregt.com/cat-worm.html); parte inferior esquerda: vermes que atacam o coração, *Dirofilaria immitis*; parte superior esquerda: ancilóstomo, *Ancylostoma duodenale*; build-ins 1.) o nematoídeo *Loa loa* sendo removido de um olho humano; 2.) o verme Guinéa, *Dracunculus medinensis*, sendo removido de um pé humano; 3.) o símbolo da medicina, o caduceu, tido como representante dos vermes Guinéa e uma ferramenta usada para sua remoção de uma pessoa (observação: fora da América alguns profissionais e centros ou organizações de pacientes usam o bastão de Asclepius, que contém uma serpente em volta do bastão, como seu símbolo); 4.) perna inchada de uma pessoa infectada com o

nematoide da elefantíase, *Wuchereria bancrofti*; 5.) referências bíblicas sobre infecção pelo verme Guiné, *Dracunculus medinensis*, e migração cutânea larval, em humanos, causada pelo ancilóstomo, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*; 6.) representação colorida de um verme de aves domésticas.

- 6.) **Espécies de vida livre.** Parte superior direita: micrografia eletrônica da parte anterior de *Acrobeles* sp.; parte central direita: *Caenorhabditis elegans*; parte inferior direita: *Mononchus* sp. alimentando-se em outro nematoide; parte inferior central: vídeo; esquerda: *Dorylaimus* sp.; Build-ins: 1 A.) *Thoracostoma* sp.; B.) *Acromoldavicus mojaviensis*; C.) *Enoploides* sp.; D.) *Pontonema* cf. *parpapilliferum*; E.) *Ceramonema* sp.; F.) *Latronema* sp.; G.) *Actinca irmae*; 2.) *Mononchus* sp. alimentando-se em outro nematoide.
- 7.) **Espécies marinhas (incluindo parasitas da fauna marinha).** Parte superior direita: *Rhabditis* sp.; parte inferior direita: *Eustrongyloides* sp. parasita do peixe Northern Snakehead, *Channa argus*; parte inferior central: *Trissonchulus* sp.; parte inferior esquerda: desenho de um macho de *Glochinema bathyperuvensis* (dpc.uba.uva.nl); parte central esquerda: *Onyx* sp.; parte superior esquerda: espécie marinha desconhecida (www.arcodiv.org); Build-in: (parte superior) *Phocanema* sp. em um filé de peixe; (parte inferior) parte anterior de *Camallanus cotti*.
- 8.) **Parasitas de plantas.** Parte superior esquerda: (esôfago em vermelho) ilustração colorida de B. Y. Endo; Build-ins 1-6: principais características de nematoides parasitas de plantas; 7.) diagrama ilustrativo do tamanho relativo dos gêneros mais comuns de nematoides parasitas de plantas(modificado de *Plant Pathology* by G.N. Agrios, 5th Edition, 2005, Elsevier Academic Press); 8.) introdução preliminar à anatomia de nematoides. **Observação**: alguns especialistas alegam que 90% dos nematoides são marinhos, sendo apenas uma insignificante minoria parasitas de plantas e animais. Estudantes devem estar atentos para o fato de que a maioria dos nematoides parasitas de plantas não necessariamente causam danos á culturas agronômicas, sendo apenas parte dos ecossistemas naturais.
- 9.) **Agentes etiológicos de doenças de plantas.** Para cada grupo de patógenos apresenta-se: a ordem cronológica da descoberta, a primeira doença e os descobridores. (Modelo: disponível em Mactode Publications). Diagrama celular (*Plant Pathology* by G.N. Agrios, 5th Edition, 2005, Elsevier Academic Press).
- 10.) **O instrumento de trabalho.** C= parte apical, S= haste, K= nódulos basais do estilete. DEGO= orifício da glândula dorsal esofageana, EL= lúmen do esôfago, A= ampola/porção dilatada. Buid-out: envoltório do estilete. Build-ins: 1.) funções do estilete; 2.) nota de observação; 3.) ilustração dos estiletos de Tylenchs, Trichodorids and Dorylaims (Trichodorid é o *Paratrachodorus hispanus* de F. Roca and M. Arias [Nematol. Medit. 14:181-185]); 4.) vídeo: *Bursaphelenchus xylophilus*, nematoide da

madeira do pinheiro alimentando-se no micélio do fungo *Gliocladium virens* (em tempo real).

11.) **Ciclo de vida.** Ilustração dos ovos (individualizados, em massa de ovos e em um cisto, indiferenciados e completamente diferenciados); juvenis eclodindo do ovo (ectoparasita e endoparasita); estágios mais avançados de desenvolvimento e adultos (fêmeas e partes da cauda de machos mostrando espículas). Build-ins: 1.) juvenil de nematoide da galha eclodindo do ovo (400X em tempo real); 2.) juvenil de reniforme eclodindo do ovo (aumento de 1000X em tempo real); 3.) duração do ciclo de vida dos nematoides. **Observação:** o estágio infectivo da maioria dos nematoides parasitas de plantas é o juvenil de segundo estágio (J2), porém, isso não ocorre com todos os nematoides parasitas de plantas. Em *Rotylenchulus reniformis*, por exemplo, a juvenil de quarto estágio (fêmea pré-adulta) é quem infecta as plantas.

12-14) **Breve história da fitonematologia.** Figuras no plano de fundo: Ebers Papyrus e *Enterobius vermicularis* de picturesofparasites.com; Build-ins: 1.) sintomas de infestação de nematoides em grãos; semente (escurecida); juvenis de segundo estágio emergindo de grãos; juvenis (parte inferior) em anidrobiose (de M. McClure); 2.) texto literário de Needham sobre o assunto. Slides 13 e 14 são autoexplicativos.

15.) **Agrupamento fenotípico de nematóides.** Build-in: *Scutellonema brachyurum*, a classificação original dos nematoides era baseada na presença ou ausência de fasmídeos (indicado na fotografia).

16.) **Agrupamento filogenético de nematóides.** Características de Adenophorea e Secernentea. Localização do orifício da glândula dorsal esofagiana (DEGO) em Tylenchina e Aphelenchina. Build-ins: agrupamento filogenético de nematoides como apresentado em De Ley, P. Uma rápida abordagem sobre a diversidade e a organização filogenética dos nematoides (January 25, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.41.1, <http://www.wormbook.org>. Outro excelente website para consulta é: <http://insects.tamu.edu/research/collection/hallan/Nematoda/Family/0NematodaIndex0.htm>.

17.) **Identificação.** Importância do esôfago (referido como esôfago ou faringe) na identificação de nematoides; Build-ins: 1.) esôfago de criconema; 2.) desenho humorístico; 3.) partes do esôfago; 4.) corte transversal de Tylenchid na região do bulbo mediano, mostrando o lúmen do esôfago; 5.) animação da válvula do bulbo mediano (P.M. Sforza and J.D. Eisenback).

18.) **Morfologia.** As figuras dos nematoides macho e fêmea não são ilustrativas de nenhum gênero em particular. Eles são “híbridos” com o objetivo de fornecer aos estudantes informações sobre as características comuns da morfologia externa básica da maioria dos nematoides parasitas de planta. **Observação:** valores de DeMan, usados na identificação de gênero e espécie, são baseados em medidas de regiões

específicas do corpo do nematoide. Build-ins: 1.) outros valores de DeMan; 2.) cutícula e campo lateral; 3.) região da cabeça (en face); 4.) tipos de sensila.

19.) **Sistemas internos do corpo.** Build-ins: 1.) tipos de reprodução dos nematoides parasitas de planta; 2 e 3.) ovários monodelfo e didelfo; 4.) termos usados para descrever a disposição do útero em nematoides; 5.) ilustração modificada de *C. elegans* mostrando útero e músculos da vulva.

20.) **Posição da vulva.** Variação da localização da vulva em fêmeas de nematoides parasitas de plantas.

21.) **Sistema reprodutivo.** Parte superior direita: macho – espículas, tipos de bursa (leptoderan - não chega no término da cauda, peloderan – envolve a cauda); Build-in 1: cauda de macho (modificação da ilustração de *C. elegans*) mostrando cloaca e gubernáculo; Parte inferior direita: vídeos (*C. elegans*) mostrando acasalamento e cópula; Esquerda: vulva de *C. elegans* e nematoide das galhas; Build-in 2: desenvolvimento do ovo (*C. elegans*); ovos (coloridos em vermelho) no tecido de raiz (nematóide das lesões); e juvenis eclodindo de ovos (em laranja – nematóide desconhecido (David Spears), em verde – *Heterodera schachtii*).

22.) **Sistema nervoso.** Parte superior direita: ilustração modificada de estruturas sensoriais da cauda do macho de *C. elegans*: B= bursa, R= radiação dos neurônios da bursa, NR= anel nervoso; Parte inferior direita: *Contraecum rudolphii*: S= sensilio; Parte inferior – centro: *Steinernema riobraviss*; Parte inferior esquerda: *Xiphinema americanum*: CS= sensilio cefálico (seta indica abertura do anfídeo); Parte superior esquerda: NR= anel nervoso; Parte superior central: cauda do macho de *C. elegans*; Build-ins: 1.) (topo) porção anterior de *Laxus oneistus* (A= abertura do anfídeo); (parte inferior): abertura do fasmídeo de *Scutellonema brachyurum* (colorido com hematoxylin); (direita para esquerda): regiões da cabeça de *Rotylenchus* sp.; *Dolichodorus* sp. e *Neopsilenchus* sp. (de K.B. Nguyen); 3.) A= anfídeo e ilustração da complexidade desse órgão sensorial.

23.) **Sistema digestivo.** Parte direita central: porção anterior de um juvenil de segundo estágio de *Heterodera glycines* em raiz de soja 'Lee' (B. Y. Endo); Build-ins: 1.) parte anterior de um nematoide, mostrando o orifício do estilete; 2.) ilustração da musculatura do estilete e conexão com o lúmen do esôfago (em verde a conexão do estilete com o lúmen do esôfago); 3.) parte anterior de *Hoplolaimus galeatus*; 4.) região anterior do esôfago (*H. galeatus*); 5.) ilustração da parte anterior de um nematoide e da junção entre o esôfago e o intestino; 6.) C= cardia de *Tylenchorhynchus claytoni* (BBE= bulbo basal do esôfago, INT= intestino); 7.) DS= sistema digestivo, os círculos indicam o começo e o final do sistema digestivo.

24.) **Sistemas excretor e secretor.** Parte superior esquerda: ilustração (modificada) de *Plectus* sp.; parte superior direita: o poro excretor de *C. elegans*; Build-in: localização do poro excretor e da glândula excretora na figura.

25.) **Sistema muscular.** Elementos do sistema muscular (em letras vermelhas) nas porções mediana (A) e anterior (B) do corpo do nematoide. Ilustrações modificadas de The Atlas of *C. elegans* Anatomy (Altun, Z.F., R. Lints and D.H. Hall, 2002-2006). OBSERVAÇÃO: o website www.wormatlas.org é uma rica e excelente fonte de informação para interessados em qualquer tipo de nematoide, e vale a pena revisá-lo. Build-ins: 1.) figura A= seção transversal da imagem refletida de um ovário; 2.) funções da hipoderme.

26.) **Habitats dos nematoides.** Nematoides ecto e endoparasitas. Parte superior esquerda: nematoides das lesões e “sting nematode”; direita: juvenis (em vermelho), machos (em verde) e fêmeas (em azul escuro) de RK (nematoide das galhas), CN= nematoide dos cistos. A ilustração da parte inferior foi modificada de: Hesling, J.J. and H.R. Wallace, 1961. Observations on the biology of chrysanthemum eelworm *Aphelenchoides ritzemabosi* (Schwartz) Steiner in florists chrysanthemum. I. Spread of eelworm infestation. Annals of Applied Biology 49:195-209.

27.) **Raízes parasitadas.** Parte superior esquerda: raiz de soja com fêmeas do nematoide dos cistos da soja (SCN) (www.entm.purdue.edu); parte superior direita: juvenil de SCN saindo do ovo (ucdnema.ucdavis.edu) e fêmea do nematoide das lesões; parte inferior direita: nematoides anelados alimentando-se em raiz de alfafa; parte inferior central: *Longidorus africanus* alimentando-se na extremidade de uma raiz (www.faculty.ucr.edu); parte inferior esquerda: sistema radicular da cana de açúcar com e sem nematoides (o tamanho dos nematoides foi exagerado para dar ênfase); a lupa inserida mostra fêmea dilatada do nematoide das galhas e fêmeas vermiformes do nematoide espiralado verdadeiro próximas à raiz. Build-ins: 1.) juvenis de SCN coloridos em tecido de raiz de soja (www.extension.missouri.edu); 2.) sintomas de (danos de parte aérea) em culturas hortícolas: A e B.) viveiro de buxinho campo e planta, respectivamente, infestados com nematoide das galhas (Alexandria, LA); C.) declínio de árvores de pêsego devido ao “dagger nematode” (Clinton, LA); D.) declínio do gramado de golfe devido à “lance nematode” e “sting nematode”(Bastrop, LA); 3.) sintomas de danos na parte aérea em culturas agrônômicas; A-C.) (LA) A.) *Meloidogyne incognita*, infestação em campo de milho (linha esquerda tratada com Telone e linha direita não tratada); B.) *Rotylenchulus reniformis* infestando algodão (plano da frente não tratado e plano de fundo tratado com Telone); C.) campo de algodão infestado com *M. incognita* e *R. reniformis*; D.) campo de soja infestado com *Heterodera glycines* (www.entm.purdue.edu).

28.) **Sintomas de danos causados por nematoides foliares (da parte aérea).** Arroz (Crowley, LA), anêmona (www.ppd.l.purdue.edu), flox (plantdisease.ippc.orst.edu), trigo, alfalfa (www.agf.gov.bc.ca), coco (nematology.ifas.ufl.edu), pinheiro (www.oznet.ksu.edu); Build-ins: 1.) tulipa (www.eppo.org); 2.) autoexplicativo; 3.) um ponto a se considerar!

29.) **Estimativa de perdas na produção causadas por nematoides.** Perdas na produção variam de 6.3% para cevada (esquerda, cultura de subsistência) a 20.6%

para tomate (direita, culturas economicamente importantes). Mundialmente o valor dessas perdas é estimado em mais de 77 bilhões de dólares.

30.) **Movimento e disseminação dos nematoides.** Build-outs: 1.) *C. elegans* (www.abac.edu) movimentando-se; 2.) padrão de movimento, modificado de Brusca, R.C. & J.G. Brusca. 1990. Invertebrates; 3.) humor, porém uma boa referência é Robinson, A.F., et al. 2005. Vertical distribution of *Rotylenchulus reniformis* in cotton fields. *Journal of Nematology* 37 (3): 265-271. Fotos: haste propagativa (blog.agriculture.ph), pneu (www.istockphoto.com), resíduo de plantas. Build-in: cartoon descrevendo a disseminação de nematoides através de pássaros, como no nematoide do cisto da batata, *Globodera rostochiensis*. Veja também o trabalho de Poinar e Yanoviak resumido no slide 94.

31.) **Metodologia de amostragem de nematoides.** Modificado de Zuckerman, Mai & Rhode. Build-in: uma simples, mas eficiente, mensagem aos produtores (imagem esquerda modificada de G. L. Tylka).

32.) **Técnicas de extração de nematoides.** Técnicas ilustradas (parte superior esquerda e parte inferior) incluem: método de Baermann (usando funis externos, normalmente para solo) ou dentro de uma câmara úmida (normalmente para raízes), ou uma modificação do método de Baermann utilizando um “sanduíche” de tela rígida entre camadas de tubos de PVC (geralmente 15-20 cm de diâmetro) utilizado para extração de grandes volumes de solo; e o elutriador semi-automático (parte superior direita e parte inferior). Build-in: técnica de laboratório usando método de extração por flotação centrífuga em solução de sacarose.

33-36.) **Dinâmica da população de nematoides.** A informação no slide 36 foi modificada de: Norton, D.C., 1978. Pp. 59-79 *In*, Ecology of Plant-Parasitic Nematodes. John Wiley & Sons, New York. Observação: No ambiente agrícola o número de gêneros compreendidos numa comunidade é, geralmente, no máximo de 6 a 8. Porém, numa comunidade natural o número de gêneros é, frequentemente, de 30 a 60.

37.) **Ações, perdas e limiar de dano econômico de nematoides.** Fotos (da esquerda para a direita): estágio de cisto de *Heterodera glycines*, reboleira de plantas raquíticas (soja) “típico” dano de nematoide, galhas em raiz de tomate devido ao nematoide das galhas, fêmea de reniforme em raiz (algodão). Build-in: informação sobre limiar de dano econômico de nematoides em outros estados. Termos: ET- definido no slide 37; DT (limiar de dano) - nível de nematoides no qual espera-se ter danos significativos, quando comparado com solo livre de nematoides; AT (limiar de ação) – nível de nematoides no qual algum tipo de tática de manejo deve ser adotada. A tabela na parte inferior mostra as atuais recomendações de acordo com o limiar de dano (ET, DT, ou AT) para os estados listados. Esta tabela foi fornecida por: AR (T. Kirkpatrick), DE (R. Mulrooney), GA (R. Kemerait), IL (G. Noel & J. Bond), IA (G.L. Tylka), MS (G. Lawrence), SC (J. Mueller), TN (P. Donald & M. Newman) e VA (P. Phipps).

38.) **Táticas de manejo de nematoides.** Parte superior direita: sistema de plantio sem preparo de solo (www.prebleswcd.com).

39.) **Nematicidas.** Brometo de metila (entwew.clemson.edu), Temik (www.bayercropscience.cl), Furadan (www.sonti.cn). Build-ins: 1.) “buraco” na camada de ozônio na atmosfera acima da Antártica, causado por produtos industrializados que liberam cloro e gases brometo (www.nasa.gov); 2.) informações sobre nematicidas não-fumigantes. Observação: a partir de 11/2009, fumigantes de uso descontinuado incluem: Meth-O-Gas, Brom-O-Gas, Terr-O-Gas e Vorlex. Não-fumigantes de uso descontinuado incluem Dasanit e Namacur. Observe também que nematicidas formulados para o tratamento de sementes incluem Avicta Complete Cotton e Avicta Complete Corn (ambos produzidos pela Syngenta, para algodão e milho, respectivamente) e AERIS Seed-Applied inseticida/nematicida (produzido pela Bayer Cropscience).

40.) **Novas táticas para manejo de nematoides.** Fotos (da esquerda para a direita): aplicação de baixa dose de nematicida no plantio, aplicação em cova ; satélite (www.fcc.gov) e tecnologia GPS na agricultura, fungo predador de nematoides (*Arthrobotrys* sp.).

41.) **Exemplo de redução da dose de nematicida.** (da presente pesquisa do programa de nematologia da Louisiana State University AgCenter com um colóide experimental). Build-ins: 1.) ilustração de 12 culturas testadas em experimentos em Louisiana; 2.) a maior e mais consistente resposta de produção está ocorrendo em algodão (experimentos de campo de 3 acres); 3.) autoexplicativo; 4.) métodos de aplicação avaliados com o produto (em todos os experimentos foi aplicada uma dose de 10 GPA (galões por acre) em solução de 1%, o tratamento de “imersão das mudas” ocorreu por 8 segundos em solução de 1%).

42.) **Exemplo de agricultura de precisão.** O uso da tecnologia GPS para documentar o exato local de um específico campo agrícola (de Google Earth). Build-in: um campo de algodão de 100 acres no Norte de Louisiana, onde o solo foi co-infestado com altos níveis de nematoide das galhas (*Meloidogyne incognita*) e reniformes (*Rotylenchulus reniformis*).

43.) **Agricultura de precisão 2.** Parte superior esquerda: foto e vídeo, Build-in: 1.) Veris 3100 sistema de mapeamento da condutividade elétrica do solo; parte inferior esquerda: diagrama da Veris 3100 e explicações (direita) de como ela é usada pra determinar a condutividade elétrica (EC) do solo. Outros Build-ins: 2.) mapa de campo produzido de acordo com o delineamento e mapeamento dos valores de EC; 3.) estabelecimento de faixas de verificação; 4.) indicadores de áreas no campo que responderam e que falharam em responder ao tratamento com o nematicida (telone) no primeiro ano.

44.) **Agricultura de precisão 3.** Um mapa de zonas de manejo mostrando áreas no campo que devem ou não devem ser tratadas com nematicida no segundo ano. Build-in: implemento para aplicação de fumigantes.

45.) **Agricultura de precisão 4.** O ponto de partida.

46.) **Agricultura de precisão 5.** Software e hardware disponíveis para produtores agrícolas.

47.) **Parasitas de nematoides: *Pasteuria penetrans*.** Build out: informações sobre *P. penetrans*. Ciclo de vida (modificado de www.pasteuriabio.com), eletromicrografias (www.rothamsted.ac.uk by B. Kerry & K. Davies) e endósporo de *P. penetrans*; Build-ins: 1.) (esquerda) foto de baixa magnificação da fêmea do “sting nematode”, (direita) porção anterior de uma fêmea do “sting nematode”; 2.) “sting nematode” com endósporos (em laranja) de *P. penetrans* aderidos à cutícula.;3.) informações sobre outras espécies de *Pasteuria* e os nematoides que elas parasitam.

48.) **Parasitas de nematoides: Fungos.** Parte superior esquerda: eletromicrografia de um nematoide preso por *Arthrobotrys* sp.; parte superior direita: nódulos adesivos de aprisionamento de *Dactylaria brochopaga* (www.iwf.de); parte inferior: (esquerda e direita) ovos de RK (nematoide das galhas) parasitados por fungo; centro: J4 de SCN (nematoide do cisto da soja) parasitado por um fungo ARF.

49.) **Agrupamento fenotípico de nematoides expandido.** (Mai & Lyon, 1975). DEGO (orifício da glândula dorsal esofagiana). Parte superior direita: (centro) macho de *Tylenchorhynchus martini*, (esquerda) fêmea de *Gracilacus* sp., (direita) fêmea de *Paratylenchulus* sp.; parte inferior direita: fêmea de *Hemicriconemoides* sp.; esquerda: (de cima para baixo, respectivamente) fêmeas de *Helicotylenchus* sp., *Hoplolaimus* sp. e *Pratylenchus* sp.

50.) **Importante gênero: *Tylenchida*.** Autoexplicativo.

51.) **Evolução do parasitismo de *Secernentea*.** Fotos e créditos (exceto parte superior esquerda (*H. galeatus* infectando raízes de grama)) previamente identificados.

52.) **Ilustração dos modos de parasitismo.** Modificado da arte de R. P. Esser. Autoexplicativo.

53-67.) **Chave para gênero de nematoides parasitas de plantas.** Algumas imagens incluídas nessa seção foram inicialmente escaneadas em alta resolução do Pictorial Key to Genera of Plant Parasitic Nematodes de W.F. Mai e H. H. Lyon (veja agradecimentos). Nos pontos onde havia falta de qualidade (aos olhos do primeiro autor), a literatura original foi obtida, imagens escaneadas e usadas com “camadas” e “ajuste de imagens”, funções do Photoshop CS3, para produzir imagens modificadas nessa seção da apresentação. Observação: imagens surgindo aos pares servem para

esclarecer a descrição do personagem ou para ilustrar um gênero (linha vermelha conecta foto ou ilustração ao nome do gênero).

68.) **Comparação dos gêneros comuns de nematoide.** Onde há significativa diferença entre espécies de um gênero, como por exemplo o estágio de cisto da espécie *Heterodera*, um tamanho “médio” é representado. E também, ao lado dos nematoides parasitas de plantas, um nematoide de vida livre (*Rhabditis* spp.) está incluído na parte esquerda inferior do círculo.

69.) **Gêneros de nematoides de maior importância ou potencial de importância econômica.** Autoexplicativo. Fotos: parte superior direita: juvenil de *Rotylenchulus reniformis* em anidrobiose; centro: juvenil de “sting nematode” em ecdise, ovo de *R. reniformis*; parte inferior direita: cauda de macho de *Bursaphelenchus xylophilus*; parte inferior central: porção anterior do “lance nematode” e fêmea do nematoide das lesões; parte inferior esquerda: porção anterior de fêmea de *Hoplolaimus galeatus*; parte superior esquerda: juvenil do nematoide das galhas.

70.) **Nematoide reniforme.** Fotos: parte superior: juvenil em anidrobiose, esôfago de juvenil; linha do meio (esquerda para direita): fêmea em raiz (LM= micrografia óptica), fêmea em raiz (EM= micrografia eletrônica), juvenil infectivo (quarto estágio) na raiz e macho; linha inferior (esquerda para direita): fêmeas em raiz, campos de soja e algodão infestados com *R. reniformis* e massa de ovos; Build-ins: 1.) massa de ovos colorida e não-colorida; 2.) gama de hospedeiros; 3.) vídeo.

71.) **Nematoide do cisto da soja.** Fotos: A.) campo de soja infestado com o nematoide dos cistos; B.) “fêmeas amareladas” em raízes de soja; C.) cisto com ovos internos visíveis; D.) cisto (branco a marron); E.) tecido de raiz de soja com juvenis coloridos; F.) juvenil; G.) célula individual do esperma de macho; H.) juvenil de segundo estágio eclodindo do ovo. Build-ins: 1.) desenho mostrando o desenvolvimento de adultos e cistos (modificado, fonte original desconhecida); 2.) (esquerda) fêmea e macho, (direita) cisto cheio de ovos; 3.) fêmeas de nematoides comparadas com o tamanho de um nódulo em soja; 4.) vídeo (continuando a comparação entre tamanho de cistos e nódulos em raízes – de G. L. Tylka); 5.) cistos cheios de ovos de *Heterodera glycines* (100X).

72.) **Nematoide das galhas.** Fotos: A.) fêmea endoparasítica inchada e massa externa de ovos (ambos coloridos) em tecido de galha na raiz; B.) tecido de raiz com juvenis coloridos; C.) (esquerda para direita) progressivos estágios de vida (exceto ovo) do nematoide; D.) raiz de tomate com galhas; E.) plantas utilizadas no teste de hospedeiro (para identificação de espécies e raças “comuns”... veja slide 73); F.) raiz de cenoura com galhas; Build-ins: 1.) (esquerda) fêmea dissecada de tecido fresco de pepino, (direita) fêmea e massa de ovos de *Chenopodium* (E. C. Bernard); 2.) campo de soja infestado com nematoide das galhas (*M. incognita*) em Alexandria, LA (Louisiana) e sistema radicular com galhas; 3.) vídeo.

73.) **Método de hospedeiros diferenciadores para nematoide das galhas.** Este método foi desenvolvido por J. N. Sasser em 1954 e tem sido de grande importância para a Nematologia. Um valor positivo (+) indica hospedeiro susceptível e um valor negativo (-) indica hospedeiro resistente. Build-in: além do método dos hospedeiros diferenciadores a morfologia da configuração perineal da fêmea do nematoide das galhas (parte superior central) também pode ser usada para diferenciar entre espécies: *Meloidogyne hapla* (Mh), *M. javanica* (Mj), *M. incognita* (Mi) e *M. arenaria* (Ma). O uso de fenótipos de esterase (parte inferior central) é utilizado como método para confirmação de espécies.

74.) **Nematoide das lesões.** Build-out: nematoide das lesões se alimentando em tecido da raiz; parte superior esquerda: modelo de nematoide das lesões (disponibilizado por Mactode Publications); parte inferior direita: fêmea; Build-in: autoexplicativo.

75.) **“Sting nematode”.** Autoexplicativo. Parte inferior esquerda: dano causado pelo “sting nematode” em morango; Build-in: autoexplicativo.

76.) **Murcha do pinheiro 1.** Build-outs: sintomas de murcha do pinheiro em árvores individuais: 1- Louisiana, 1981; 2- Portugal, 1995 coleta de exemplares de madeira de pinheiro próximo a Setubal, PT (observações e coletas feitas por E. C. McGawley durante sua licença sabática pela Fulbright em Portugal, onde primeiramente introduziu essa doença aos agricultores e silvicultores, alertando-os sobre a provável presença de *Bursaphelenchus xylophilus* no país); 3- Japão, 2008; 4- sintomas de murcha do pinheiro em floresta de pinheiros no Japão; Fotos: linha superior: esquerda- *M. alternatus* (L. D. Dwinell), besouro da família Cerambycidae em fascículos e em tronco do pinheiro, mostrando sinais de infestação com o ‘blue-stain fungi’ (www.forestryimages.com) e seção transversal da traquéia de *M. caroliniensis* com juvenis de *B. xylophilus*; centro- pinheiros negros japoneses, muito susceptíveis a *B. xylophilus*; direita: paletes de pinheiro, um provável veículo de disseminação do nematóide; linha inferior: esquerda: toras de pinheiro mostrando discoloração indicativa da infestação com o ‘blue-stain fungi’; centro: cauda do macho de *B. xylophilus* com espícula característica em formato de “espinho de rosa” (L. D. Dwinell); direita: fêmea de *B. xylophilus* (www.metla.fi). O ciclo da murcha do pinheiro no centro foi modificado de www.forestresearch.gov.uk.

77.) **Murcha do pinheiro 2.** Fotos: parte superior esquerda: culturas de *G. virens* infestadas com *B. xylophilus* mostrando crescimento reduzido e ausência de esporulação (esquerda), culturas de idades semelhantes esporulando na ausência do nematoide (direita); o segundo quadro mostra o desenvolvimento de culturas infestadas com nematoide durante 12 dias; parte superior direita: cultura de *G. virens* com fiálides em forma de “pinos de boliche”; parte inferior esquerda: *B. xylophilus* (respectivamente) cauda do macho (baixa e alta magnificações, respectivamente), juvenis do nematoide alimentando-se no micélio de *G. virens*, esôfago e vulva da fêmea e desenho de nematoides adultos; parte inferior direita plântulas dos pinheiros slash e loblolly usadas em estudos de inoculação conduzidos na LSU.

78.)“**Lance nematode**”. Autoexplicativo.

79-80.) **Complexo de doença de nematoides**. Uma boa referência para esse assunto é: Sikora, R. A. e W. W. Carter, 1987. Nematode Interactions with Fungal and Bacterial Pathogens – Fact or Fantasy. Pp. 307-312 em: Vistas on Nematology, J. A. Veech e D. W. Dickson, Eds., E. O. Painter Printing Co.

81.) **Complexo nematoide-fungo**. Fotos: esquerda: (de cima para baixo) culturas de *Sclerotium rolfii* (www.bspp.org.uk), *Fusarium oxysporum*, e raiz de soja infectada com *Rhizoctonia solani*; parte superior: (da esquerda para a direita) juvenis (www.rennes.inra.fr) de *Heterodera schachtii* e fêmeas de *H. glycines*, fêmea e massa de ovos do nematoide das galhas, juvenis de *H. glycines* coloridos, micélio de fungo crescendo a partir de tecido de planta; ; Build-ins: 1.) um exemplo de associação aditiva: dados da produção de morango são cumulativos do período de 1989-1991. Para mais detalhes consulte o Journal of Nematology (citação indicada); 2.) um exemplo de sinergismo. Para mais detalhes consulte o Journal of Nematology (citação indicada); 3.) um exemplo de antagonismo. Para mais detalhes consulte Nematropica (citação indicada).

82.) **Complexo nematoide-bactéria**. Fotos: parte superior: cultura de *Ralstonia solanacearum* (www.cals.ncsu.edu); parte inferior: fêmea de *Aphelenchoides ritzemabosi* (modificado); Build-ins: 1.) secção de nódulos de raízes de soja parasitadas por nematoides e saudáveis, respectivamente (www.micro.biol.ethz.ch); 2.) micrografia eletrônica colorida de *Rhodococcus fascians* (www.mikrobenscout.de).

83.) **Toxicidade de azevém**. Build-out: ovelha afetada por ARG1. Fotos: planta de azevém (members.iinet.net.au), semente de azevém, nematoides em anidrobiose (www.invasive.org).

84.) **Associações vírus-nematoide**. Fotos: sintomas em folha (www.agf.gov.bc.ca); eletromicrografias (www.ncbi.nlm.nih.gov). Desenhos de esôfagos de nematoides (modificado). Setas indicam áreas de maior retenção de vírus.

85.) **Interações nematoide-nematoide 1**. Build-out: informações gerais sobre estudos de interações nematoide-nematoide. Introdução e citação à metodologia de “séries de substituição” de De Wit.

86.) **Interações nematoide-nematoide 2**. Aplicação da metodologia de DeWit para avaliação de interações entre nematoide das galhas e nematoide reniforme. Para mais detalhes consulte o Journal of Nematology (citação indicada no slide).

87.) **Interações nematoide-planta daninha**. Um exemplo: nesse trabalho demonstrou-se que exsudados das plantas daninhas *Ipomoea* (MG), cânhamo sesbaia (HS) e grama Johnson (JG) inibem a reprodução de *Rotylenchulus reniformis* em algodão (C). A foto superior mostra a configuração do experimento instalado, no qual exsudados das raízes de cada planta daninha foram coletados (os vasos suspensos usados como

controle (na frente) continham apenas meio de crescimento, Perlite, esterelizado). A tabela da direita contém dados sobre as médias da população do nematoide reniforme analisadas em dois ensaios. Fotos da parte inferior ilustram a filtração dos exsudados das raízes e a avaliação da influência deste na eclosão dos ovos de *R. reniformis*.

Build-ins: 1.) dados mostrando o número de ovos indiferenciados (8-16 células), ovos totalmente desenvolvidos e juvenis eclodidos (eixo Y) em um período de 10 dias (eixo X) de incubação em cavidades plásticas contendo exsudados de raízes e suspensões controle. Exsudados das três plantas daninhas reduziram a taxa de desenvolvimento do ovo. Para mais detalhes consulte Nematropica (citação indicada); 2.) associação nematoide-planta daninha mais comum na agricultura; 3.) pontos-chave relacionados à interação nematoide-planta daninha na agricultura; 4.) campo de soja cheio de plantas daninhas (parte superior: www.extension.iastate.edu) e foto de fêmea de SCN (nematoide do cisto da soja) em *Lamium purpureum* (E. Creech, Purdue University). Outra referência atual é: Johnson, W. G., Creech, J. E., e Mock, V. A. 2008. Role of winter annual weeds as alternative hosts for soybean cyst nematode. Online. Crop Management doi:10.1094/CM-2008-0701-01-RV.

88.) Interações nematoide-fungo-inseto. Nesse estudo, o fungo do cancro da haste (DPC) reduziu o número de juvenis de SCN (nematoide do cisto da soja) presentes em tecido da raiz. Ao mesmo tempo, defoliação por SBL (largata falsa-medidora, *Pseudoplusia includes*) resultou em significativo aumento no número de juvenis presentes nas raízes. Geralmente, o efeito destes três patógenos no crescimento de plantas e uns nos outros (interação) foi **aditivo**. Para mais detalhes consulte o Journal of Nematology (citação indicada).

89.) Nematoides entomopatogênicos 1. **Build-outs:** 1.) posição taxonômica da maioria das espécies de nematoides entomopatogênicos; 2.) esôfago de nematoides da ordem Rhabditida; **Build-ins:** 1.) fotos de *Heterorhabditis bacteriophora* (www.biocontrol.nl) e *Steinernema carpocapsae* (www.db.uac.pt); 2.) intestino de *S. carpocapsae* mostrando infecção com *Xenorhabdus nematophilus* (www.uconn.edu).

90.) Nematoides entomopatogênicos 2. Ciclo de vida de *Photorhabdus luminescens* (curiosidadesdelamicrobiologia.blogspot.com); **fotos:** esquerda: nematoides saindo do cadáver de inseto; direita: lagartas (*Manduca sexta*) fluorescentes (www.nature.com) infectadas com *P. luminescens*; **Build-in:** *Photorhabdus luminescens* (www.sci.muni.cz). *Photorhabdus* significa hastes brilhantes; elas são as únicas bactérias bioluminescentes terrestres conhecidas.

91.) Nematoides entomopatogênicos 3. Fotos: A.) nematoide mermitídeo emergindo da formiga (S. Porter); B.) nematoides emergindo da traça-da-cera (*Galleria mellonella*); C.) camarão infectado com nematoide (mygrassshrimp.googlepages.com); D.) juvenil do gênero *Heydenius* emergindo de um macho alado do gênero *Prenolepis*. Este espécime está preservado em âmbar báltico há aproximadamente 40 milhões de anos (G. Poinoir, 2002); E.) nematoides atacando um cupim (bexar-tx.tamu.edu); F.) juvenil de *Romanormis culicivora* emergindo de uma larva de mosquito (University of Nebraska, Lincoln Dept. of Entomology).

92.) **Nematoides entomopatogênicos 4.** Fotos: A.) larva de mosquito infectada com o fungo *Steinernema feltiae* (www.omafra.gov.on.ca); B.) larva infectada com *Heterorhabditis bacteriophora* (www.yardscaping.org); C.) gafanhoto infectado com *Mermis nigrescens*; D.) larva de mosquito infectada com *R. culicivorax*; Build-ins: 1.) *Psammomermis* sp. (M. Hodda and www.csiro.gov.au); 2.) pacote de Skeeter Doom garantindo conter 500 estágios de desenvolvimento mistos de *Reesimermis nielsenii* por grama do conteúdo.

93.) **Nematoides entomopatogênicos 5.** Produtos comerciais de nematoides entomopatogênicos. Autoexplicativo.

94.) **Nematoides entomopatogênicos 6.** Relação entre *Myrmeconema neotropicum* e *Cephalotes atratus*. Autoexplicativo.

95.) **Diagnóstico molecular.** Slide título.

96.) **Por que usar métodos moleculares?**

97.) **Diagnóstico molecular** inclui métodos bioquímicos, métodos relacionados a DNA e métodos de genômica.

98.) **Métodos bioquímicos:** o método bioquímico mais usado para diagnóstico de nematoides é a separação eletroforética e análise de padrões de enzimas e isoenzimas. Essas incluem: esterase, malato desidrogenase e outras. Essas enzimas são normalmente separadas através de um sistema de gel PHAST (Pharmacia, Inc. pode ser extinto). Limitações: exige presença de fêmeas jovens; variações observadas dentro de espécies; método bom para identificação de RKN (nematóide das galhas) tropical.

99.) **DESS:** versátil e preservativo para PCR de nematoides (descrito em detalhes em Yoder et al., *Nematology*, 2006, Vol. 8(3), 367-376). DESS = **DMSO**, **EDTA**, **Sal Saturado**. 0.25M EDTA dissódico pH 8.0; 20% dimetilsulfóxido; NaCl saturado. Preserva a morfologia do nematóide; inativa nucleases que degradam o DNA. Imagem da esquerda = 4W5G5, espécime do Mar Negro; imagem da direita = 5M7G5 de Kern Co.; cortesia de Paul DeLey e Melissa Yoder.

100.) **vCenema.** Clipes de filme, cortesia de Paul DeLey, Luis Mundo e Manuel Mundo. Região do bulbo da glândula e ponta do ovário de *Pratylenchus penetrans*.

101.) **Métodos baseados em DNA:** todos os tipos de espécimes podem ser analisados molecularmente; porém, cistos e ovos podem exigir esforço extra para serem quebrados e abertos para liberar o DNA. A disponibilidade de espécimes muitas vezes é limitada a poucos juvenis nos diagnósticos de rotina. Por isso é muito importante que métodos de extração de DNA e análise molecular sejam desenvolvidos, para que seja possível a utilização de um único nematóide para diagnose.

102.) **Preparação de nematoides para análise molecular.** A cutícula do nematoide pode ser resistente, por isso normalmente é necessário rompimento físico; químicos usados individualmente geralmente são inadequados ou muito severos (NaOH por exemplo, deve ser neutralizado antes de ser usado em PCR). Enquanto PCR pode ser feito com um extrato relativamente bruto de um único indivíduo, quando um grupo de nematoides é utilizado geralmente necessita-se um kit comercial para a preparação de DNA, para que o rendimento e a pureza do DNA sejam mais favoráveis à análise molecular.

103.) **Logística da análise molecular.** A reação em cadeia da polimerase emprega DNA polimerase termoestável (Taq polimerase) para sintetizar cópias do DNA alvo, resultando em um crescimento exponencial na quantidade de DNA.

104.) **Uma análise detalhada em métodos de PCR.** Os próximos slides mostram os componentes de uma típica reação de PCR e enfatizam maneiras de evitar contaminação e outros erros. A foto mostra uma capela esterilizada, usada como espaço de trabalho para reações de PCR, com os equipamentos e aparatos necessários para a reação dispostos corretamente.

105.) **Higiene em PCR.** Limpeza é extremamente importante para PCR, mas existem muitos procedimentos que podem ser feitos para reduzir a possibilidade de contaminação ou degradação de reagentes. A extração de DNA de “nematoide amassado” não é difícil, mas o DNA resultante dessa extração não é puro e as nucleases presentes no nematoide podem ser ativadas em temperatura ambiente. Manter extratos e os componentes dos kits de PCR resfriados pode ajudar a prevenir a degradação do DNA. Ponteiras com barreiras de aerosol podem ajudar a prevenir a contaminação das pipetas com DNA, o que poderia carregar DNA de um experimento para outro. É sempre mais fácil jogar fora uma pequena quantidade de reagente do que depender semanas tentando descobrir o que aconteceu errado. Para evitar excessivos ciclos de congelamento e descongelamento que podem interferir negativamente na performance dos reagentes, como Taq buffer, nucleotídeos, etc., esses devem ser estocados em pequenas alíquotas. Separação física de análises de pré-PCR e pós-PCR ajuda a diminuir a possibilidade de contaminação cruzada.

106.) **Pós-PCR.** Fotos nos buildouts: 1) Centro: agarose é pesada; esquerda: solução de gel de agarose é aquecida em forno de microondas até fervura; direita: agarose resfriada é vertida no suporte para moldagem do gel. 2) Esquerda: buffer para correr eletroforese é misturado em uma placa de agitação; direita: buffer de corrida é vertido dentro da caixa de gel. 3) Esquerda: solução corante a 1% é adicionada a cada uma das amostras; direita: as amostras são colocadas dentro das células. 4) Esquerda: corrente elétrica passa pelo gel; direita: corante de rastreamento é usado para acompanhar o progresso da eletroforese. 5) Esquerda: gel de agarose imerso em brometo de etídio; direita: sistema Alpha Imager usado para documentação digital de imagens do gel. Todo laboratório tem seu próprio equipamento e seu próprio ritmo de trabalho, mas esses são passos típicos para análise de reações de PCR. Na pesagem

de agarose aconselha-se usar uma espátula; lembre-se de descartar o excesso de agarose de acordo com os corretos regulamentos de eliminação de resíduos (não coloque-o de volta no frasco). Ao preparar a solução de agarose evite poeira (as partículas absorvem luz UV e fazem com que o gel pareça sujo). Antes de verter o gel de agarose fundido deixe-o esfriar um pouco, para evitar o empenamento das bandejas de gel. Equipamentos de imagem modernos tornam o arquivamento de imagens de gel muito mais fácil, mas adaptadores para capa escura da câmera que encaixam sobre a caixa de luz UV são baratos e fáceis de usar.

107.) **Resultado típico de gel em amplificação por PCR.** Foto: eletroforese em gel de produtos da reação de PCR. Considere qual o tamanho do gel necessário e qual a porcentagem de agarose irá permitir a melhor separação dos produtos esperados na reação de PCR (geralmente quanto menor o comprimento (em bp) do produto, maior a porcentagem de agarose necessária). Certifique-se que o pente do gel é grande o suficiente para acomodar o volume da amostra, verta o gel a uma profundidade suficiente e não se esqueça de deixar espaço para as amostras-controle e para o marcador de DNA. As bandas de gel podem então ser excisadas com uma lâmina estéril, purificadas do gel de agarose e usadas em outras aplicações como sequenciamento direto, digestão de restrição, ou clonagem. Não se esqueça de usar proteção para os olhos enquanto estiver trabalhando sobre uma fonte de luz UV!

108.) **Marcadores moleculares frequentemente usados para identificação de nematóides-1.** Genes ribossomais são os genes-alvo mais comuns para o diagnóstico de nematoides através de PCR. A disposição das multicópias do conjunto de genes ribossomais fornece um amplo espectro de detecção, mesmo a partir de um único nematoide. Frequentemente pequenas variações entre séries de rDNA ocorrem dentro dos indivíduos devido à processos de homogeneização conhecidos como evolução concertada, através da qual cópias de rDNA individuais não se desenvolvem independentemente umas das outras. Conseqüentemente, pequenas variações serão observadas em genes de rDNA dentro de um único nematoide ou dentro de uma população. Certamente há exceções. Assim, quando há múltiplas variações de sequência o processo de homogeneização pode ser incompleto.

109.) **Marcadores moleculares frequentemente usados para identificação de nematóides-2.** A região ITS rDNA é composta de espaçadores internos transcritos entre as regiões de codificação 18S e 5.8S (ITS1) e entre o gene 5.8S e o rDNA 28S (ITS2). Devido ao alto nível de conservação da sequência em regiões codificadoras que fortificam o ITS, um único conjunto universal de primers (como TW81 e AB28, por exemplo) pode amplificar essa região da maior parte dos nematoides fitoparasitas e de vida livre. O ITS rDNA é, sem dúvida, o marcador diagnóstico mais comumente amplificado e mais útil para nematoides fotiparasitas.

110.) **Marcadores moleculares frequentemente usados para identificação de nematóides-3.** 18S rDNA é conhecida como a menor subunidade ribossomal de RNA (SSU). Esse marcador é mais frequentemente usado em análises poligenéticas, e tem também mostrado algumas vantagens na identificação de espécies em gêneros pouco

estudados, como por exemplo em amostras de pesquisas em ambientes terrestres ou marinhos.

111.) **Marcadores moleculares frequentemente usados para identificação de nematóides-4.** 28S rDNA é também conhecida como a maior subunidade ribossomal (LSU). Os domínios D2 e D3 da estrutura do 28S são mais frequentemente usados para análise da sequência de nematoides e identificação. A previsão da estrutura secundária é baseada em domínios de curvas e grampos, que podem ser usados para informar sequências de DNA importantes ou conservadas. Essas estruturas podem ajudar no alinhamento de sequências para análise filogenética. Figuras A e B de: 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* (2008), doi: 10.1016/j.ympev.2008.04.028

112.) **Marcadores moleculares frequentemente usados para identificação de nematóides-5.** IGS rDNA significa região espaçadora intergênica entre o gene 28S e a subunidade ribossomal 5S (IGS1) e o espaço entre 5S e 18S (IGS2). Esse marcador tem sido útil na distinção entre espécies de nematoide das galhas, principalmente *Meloidogyne mayaguensis*.

113.) **Marcadores moleculares frequentemente usados para identificação de nematóides-6.** Marcadores mitocondriais de DNA. Compreende o intervalo entre o gene da citocromo oxidase II, incluindo o His gene do tRNA, e o gene 16S. Comumente usado para discriminação de espécies de nematoide das galhas. Para algumas espécies o tamanho dos produtos do PCR ou os polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição são também diagnósticos.

114.) **Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP).** Produtos de PCR são digeridos por enzimas de restrição resultando em padrões de fragmentos que podem ser analisados por eletroforese em gel. Esse método tem sido utilizado para uma ampla variedade de nematoides parasitas de plantas e é relativamente barato e simples de realizar.

115.) **Comparando desconhecidos às espécies controle de referência.** Ter uma referência confiável de espécies para comparar com as amostras desconhecidas é um fator chave para a aplicação bem sucedida de RFLP no diagnóstico de nematoides.

116.) **PCR em tempo real.** O maior benefício do PCR em tempo real é sua versatilidade; porém, assim como em toda análise de PCR, demonstração de sensibilidade e especificidade são essenciais. PCR em tempo real requer equipamentos especiais, quando comparado com o PCR convencional, e o custo dos reagentes e de manutenção dos equipamentos pode ser limitante. Treinamento apropriado em design experimental e em interpretação de dados são considerados vitais.

117.) **PCR múltiplo.** Esse método é geralmente composto de primers espécie-específicos usados em combinação para, simultaneamente, detectar ou discriminar espécies de nematoides. Uma das mais conhecidas aplicações desse método é o PCR múltiplo baseado em ITS rDNA para detecção de nematoide do cisto da batata *Globodera pallida* e *G. rostochiensis*. O método foi recentemente modificado para também permitir a detecção de *G. tabacum*. Quando há a possibilidade de variação intraespecífica no marcador escolhido esse método deve ser usado cautelosamente. É sempre desejável a validação de novos testes contra uma ampla variedade geográfica de populações e espécies controle.

118.) **Seção de créditos:** Autoexplicativo.

119.) **Ecossistemas tamponados e não-tamponados.** Ecossistema tamponado: um grupo de plantas e animais interdependentes habitando na mesma região ou área e interagindo entre si por comida e outras relações nas quais todos os atos que influenciam no ambiente são anulados por outros atos, resultando em um sistema estável, balanceado, ou imutável, no qual nenhuma espécie predomina.

120.) **Estudantes: o mais importante produto.** Linha superior (da esquerda para a direita): C. Overstreet, K.L. Winchell, K.C. Hadden, J.P. Bond and I. Wenefrieda; linha do meio (da esquerda para a direita): E. Wosula, A. Sankaralingam and M.J. Pontif; linha inferior (da esquerda para a direita): F. Garces, S. R. Stetina and J. Bruce. Build-in: L - M. Parish; R – A. Staszkiwicz.

121.) **Encerramento.** Autoexplicativo.

122.) **Agradecimentos.** Nós sinceramente esperamos que os créditos nesse sumário e no slide 98 forneçam adequado reconhecimento às pessoas e websites dos quais nós coletamos materiais para utilizar nessa apresentação. Materiais dos autores dessa apresentação não foram creditados aqui. Usuários deste material são encorajados a contatar os autores se encontrarem materiais não-creditados, assim os mesmos poderão adicionar os créditos apropriadamente.

123.) **Observação adicional.** Autoexplicativo.

Email para contato dos autores: emcgawley@agctr.lsu.edu,
coverstreet@agcenter.lsu.edu, mpontif@agcenter.lsu.edu e
andrea.skantar@ars.usda.gov