



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Reitoria

Pró-Reitoria de Graduação

Diretoria de Processos Seletivos

Divisão de Correção

Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco A, Térreo - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902

Telefone: (34) 3239-4127/4128 - www.portalselecao.ufu.br



COMUNICADO

ESPELHO DE CORREÇÃO DA PROVA ESCRITA

EDITAL PROGEP Nº 138/2024/ICIAG

A Comissão Julgadora torna público o espelho de correção da Prova Escrita do Concurso Público para contratação de Professor Efetivo do Instituto de Ciências Agrárias - ICIAG, área: Agronomia, subárea: Nematologia.

TEMA SORTEADO: Detecção e diagnose de fitonematoides: métodos tradicionais e moleculares.

O que deveria ser abordado na dissertação do(a) candidato(a) para a obtenção da nota máxima:

1. INTRODUÇÃO

Os fitonematoides são vermes filiformes e microscópicos que atacam diversas partes vegetais, causando perdas em cultivos agrícolas na ordem de bilhões de dólares em todo o mundo. Desta forma, métodos eficazes de detecção e diagnose são fundamentais para conhecer a sua distribuição e quantificação numa área para a tomada de decisão quanto a medidas de manejo. A diagnose é de suma importância para evitar disseminação de nematoides para outras áreas ou países (barreiras quarentenárias). A detecção refere-se à utilização de métodos para verificar a presença do nematoide no solo e ou nos tecidos vegetais. A diagnose é baseada em características de dimorfismo sexual, sintomatologia, características morfológicas e morfométricas, bem como análises moleculares. Desta forma, a detecção e a diagnose de fitonematoides dependem de conhecimento sobre sintomatologia, da correta amostragem de solo e ou partes vegetais, métodos de extração adequados, observações microscópicas e técnicas bioquímicas e ou moleculares. A seguir, serão abordados cada um desses temas.

2. SINTOMATOLOGIA

Os sintomas causados por fitonematoides podem ocorrer em órgãos subterrâneos e na parte aérea das plantas. Os principais sintomas causados por fitonematoides de importância econômica no Brasil são nanismo, deficiências nutricionais, carijó, clorose, desfolha, seca de ponteiros, murcha, galhas radiculares, lesões radiculares, necroses, rachaduras, redução da produção e morte das plantas. *Meloidogyne* spp. são responsáveis por formação de galhas em raízes de várias culturas de importância econômica, porém algumas espécies (*M. incognita*, *M. paranaensis*, *M. coffeicola*) causam desfolha, necroses radiculares, rachaduras, cancro e morte de cafeeiros. Em plantas atacadas por *Pratylenchus* spp. pode ser observada redução do crescimento devido a necroses radiculares, causando danos em várias culturas, tais como cafeeiro, milho e soja. *Herodera glycines* causa importantes danos em soja, com sintomas de nanismo, amarelecimento, seca de ponteiros, necroses radiculares, sendo possível a visualização de cistos em raízes. O nematoide-cavernícola da bananeira *Radopholus similis* causa necrose em raízes e rizomas, amarelecimento foliar, sintoma de guarda-chuva fechado e tombamento. *Rotylenchulus reniformis* em algodoeiro causa sintoma típico de carijó nas folhas baixas, além de necroses radiculares e redução de crescimento nas plantas. *Tylenchulus semipenetrans* provoca redução de crescimento, folhas lanceoladas, amarelecimento, desfolha,

subdesenvolvimento do sistema radicular, sintoma de raiz suja, e morte lenta dos citros. *Bursaphelenchus cocophilus* causa amarelecimento de folhas baixas com sintoma de guarda-chuva fechado, queda prematura dos frutos, e formação de um anel vermelho típico no parênquima do estipe de coqueiro ou dendezeiro. Em alho e cebola, *Ditylenchus dipsaci* infecta as partes aéreas causando enrolamento das folhas (charuto), hipertrofia e podridão do bulbo. *Aphelenchoides besseyi* provoca a ponta branca do arroz, além de causar danos como superbrotamentos em soja e algodoeiro. Quanto aos sinais observados para fitonematoides em raízes de plantas, os principais exemplos são as fêmeas aberrantes em forma de pêra (*Meloidogyne* spp.), de limão (*Herodera glycinis*), de rim (*Rotylenchulus reniformis*) e as fêmeas obesas de *Tylenchulus semipenetrans*.

3. AMOSTRAGEM DE SOLOS E PARTES VEGETAIS PARA ANÁLISE NEMATOLÓGICA

A amostragem deve ser realizada de forma adequada para que represente a realidade do campo. Para isso é importante levar em consideração a sintomatologia das plantas com ataque de nematoides, o grupo trófico dos nematoides, e a produtividade na área de cultivo.

A distribuição espacial dos fitonematoides em lavouras infestadas geralmente segue o padrão chamado de “reboleiras” ou “agregados” (dispersão agrupada de indivíduos). Assim, nas lavouras é comum observar a presença “reboleiras”, com plantas apresentando sintomas causados pelos nematoides. A amostragem de nematoides radiculares deve ser realizada na rizosfera das plantas. Em áreas sem sintomas típicos de nematoides mas com baixa produtividade a amostragem é feita em “zig-zag”, ao passo que em áreas com reboleiras é feita a amostragem direcionada e orientada. Na prática a amostragem é feita nas bordas da reboleira por meio da coleta de sub-amostras que são misturadas para formar a amostra composta. No mínimo, 10 a 20 sub-amostras compostas para compor uma amostra composta, contendo cerca de 80 g de raízes e 400 g de solo. O número de amostras compostas dependerá do tamanho da área, variando de uma a dez amostras compostas em áreas de seis a 40 hectares. Em viveiros, o recomendado é coletar 1% do total de mudas. Para culturas anuais, a época recomendada para amostragem é o final do ciclo da cultura, e para culturas perenes, é o verão. Vale ressaltar que em culturas perenes devem-se coletar as sub-amostras nos quatro quadrantes da planta (posições norte, sul, leste e oeste), enquanto em culturas anuais a amostragem é na rizosfera da planta, coletando o solo e o sistema radicular.

No caso de nematoides que atacam tecidos das partes aéreas, tais como folhas, sementes, caules e outros, a amostragem deve incluir também estes tecidos vegetais.

As amostras devem ser colocadas em saco plástico e inserida em uma caixa de isopor para ser enviada ao laboratório de Nematologia o mais rápido possível. Deve-se evitar a coleta em períodos que o solo esteja muito seco ou muito úmido. A identificação das amostras deve ser criteriosa, incluindo a data de coleta, talhão de origem, detalhes das plantas cultivadas, coordenadas geográficas, dentre outros detalhes, os quais indicarão onde será necessária a adoção de medidas de manejo.

4. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE FITONEMATOIDES

A extração de fitonematoides consiste em removê-los do solo e ou tecidos vegetais de tal forma que estes fiquem suspensos em água. A escolha do método de extração deve levar em consideração o modo de parasitismo dos fitonematoides. Abaixo, serão abordados os principais métodos de extração.

4.1. Método do Funil de Baermann (1917)

A metodologia do Funil de Baermann é eficiente para a extração de nematoides filiformes móveis (migradores) presentes em amostras de raiz. Algumas modificações podem ser feitas para extrações com amostras de solo. Essa metodologia se baseia no movimento e no geotropismo positivo, em que os espécimes saindo da raiz, passam pelos poros do papel filtro e, após 24 a 48 h, são coletados. Algumas das vantagens de sua utilização estão na simplicidade, no baixo custo, além da limpeza da suspensão final contendo os nematoides extraídos. Essa técnica só permite a extração de nematoides vivos com movimentação ativa.

4.2. Método de Jenkins (1964) ou Flotação e Centrifugação

Essa metodologia é utilizada para a extração de nematoides ectoparasitas e formas livres de temporárias de endoparasitas no solo. O princípio básico dessa técnica baseia-se nas diferenças de densidade entre os nematoides ($1,02$ a $1,09 \text{ g.cm}^{-3}$), água ($1,0 \text{ g.cm}^{-3}$), solução de sacarose ($1,15$ a $1,18 \text{ g.cm}^{-3}$) e solo ($1,2 \text{ g.cm}^{-3}$). O solo (100 g ou 100 cm^3) é colocado em recipiente contendo água e agitado por 20 segundos, e em seguida, o sobrenadante é vertido sobre conjunto de peneiras (20 e 325 *mesh*). O Nematoides são recolhidos da peneira de 400 *mesh* e colocados em tubos de 50 mL. A seguir, os tubos são centrifugados a 1750 rpm (550 G) por 1 minuto. Após descarte do sobrenadante e adição de sacarose 1 M (454 g.L^{-1} sacarose) é feita uma segunda centrifugação na mesma rotação por 1 minuto. A seguir, o sobrenadante é vertido sobre peneiras de 325 *mesh* e os nematoides recolhidos com água para leitura.

4.3. Método de Coolen & D'Herde (1972)

Esse método é utilizado para extração de espécimes ativos e inativos de tecidos vegetais e limpeza de suspensão de nematoides. Os tecidos vegetais (raízes, cascas, etc.) são lavados, cortados em pedaços de aproximadamente 1 cm e macerados em água. A suspensão é vertida sobre conjunto de peneiras (20 *mesh* sobreposta a outra de 500 *mesh*), lava-se com água, e os nematoides são recolhidos na última peneira. A suspensão é colocada em tubos de centrifuga com caulin, que são centrifugados por 4 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante é descartado seguido de adição de solução de ZnSO_4 ou MgSO_4 (opcionalmente sacarose), com posterior nova centrifugação por 1 minuto. A seguir, o sobrenadante é recolhido em peneira de 400 ou 500 *mesh*, onde os nematoides são lavados e recolhidos com pisseta contendo água para um frasco. Após esses procedimentos a amostra estará pronta para leitura em microscópio.

4.4. Método de Hussey & Baker (1973)

Essa técnica é usada para extração de ovos de *Meloidogyne* spp. de raízes com galhas e massas de ovos. Para isso, as raízes são cortadas e colocadas em um recipiente com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e agitadas por 4 minutos. A seguir, a suspensão é vertida sobre conjunto de duas peneiras, 200 e 500 *mesh*, sendo os ovos recolhidos desta última.

4.5. Método de Hussey & Baker (1973), modificada por Bonetti & Ferraz (1981)

Essa metodologia é uma modificação do método proposto por Hussey & Baker (1973). Esta técnica é utilizada para extração de nematoides de partes vegetais, tais como raízes, sementes, etc. Pode ser utilizada para extração de formas móveis quanto imóveis do tecido vegetal, abrangendo ovos, juvenis e adultos. Consiste em triturar os tecidos vegetais em liquidificador em solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, conjunto de peneiras (100, 200 e 500 *mesh*), flotação e centrifugação. O hipoclorito de sódio é importante na remoção de massas gelatinosas que envolvem os ovos. Para processar as amostras, caulin é adicionado durante a flotação e centrifugação.

4.6. Extração de cistos de *Heterodera glycines*

4.6.1. Solo seco (Sherpherd, 1970): Amostra de solo (100 cm^3) homogeneizada e seca à sombra (24–48 horas) é colocada em béquero de 2 L, agitada e vertida sobre conjunto de peneiras, 60 e 100 *mesh* (opcionalmente 20 e 60 *mesh*). Os cistos extraídos (retidos na peneira de 100 *mesh*) podem ser observados diretamente no microscópio estereoscópico ou esse material pode ser filtrado em funil de Buchner forrado com papel de filtro, o qual é observado em microscópio estereoscópico, sob luz incidente para efetuar a leitura.

4.6.2. Solo úmido ou método de sacarose (Dunn, 1969): A amostra de solo é preparada conforme mencionado no método anterior, e o sobrenadante é vertido sobre o conjunto de peneiras. O material retido na peneira de 100 *mesh* é recolhido em solução de sacarose (615 g.L^{-1}), seguido de centrifugação a 420 G por 2,5 minutos. Após isto, o sobrenadante é vertido sobre a peneira de 100 *mesh*, lavado e colocado em placa de fundo quadriculado ou funil com papel de filtro para observação e avaliação em microscópio estereoscópico.

4.7. Método de detecção de fitonematoide no interior do tecido vegetal

Esse método consiste em visualizar o nematoide no inteiro na raiz. Para isso, a raiz lavada é clarificada com hipoclorito de sódio (1,5 a 2,5%) por 20 minutos ou mais, dependendo da idade do

tecido vegetal. Em seguida, as raízes são lavadas novamente, e aquecidas em banho-maria com solução corante, em água em ebulição por 5 minutos. Os corantes usados são fucsina ácida ou corantes da indústria alimentícia. Após resfriamento ambiente por 24 horas, as amostras são colocadas em solução de glicerina 50% e montadas em lâminas de vidro com glicerina pura e levadas para visualização em microscópio de luz. Este método pode ser usado para quantificar o número de juvenis infectivos de *Meloidogyne* spp., fêmeas e outras fases dos nematoides no interior da raiz. Pode ser usado para detectar outros gêneros de fitonematoides, como *Pratylenchus*, por exemplo.

5. ANÁLISES MICROSCÓPICAS E IDENTIFICAÇÃO DE FITONEMATOIDES

5.1. Morfologia e morfometria

A morfologia compreende o estudo das características gerais dos nematoides de um ponto de vista mais descritivo, incluindo órgãos e estruturas externas e internas de seus corpos. Dentre os principais aspectos morfológicos usados para a identificação de fitonematoides, podemos citar: tamanho e forma geral, tipos de cutícula e suas estrias (lisa, ornamentada, campo lateral, configuração perineal, asas caudais), região cefálica, região labial, estilete e esôfago, formato e tamanho da cauda, posição da vulva, dimorfismo sexual, posição e característica da espícula e da bursa dos machos. Um dos primeiros passos na identificação é indicar a presença do estilete, que pode do tipo odontoestílico, estomatoestílico ou onquioestílico. Quanto ao esôfago, pode ser composto de procorpo, bulbo mediano, istmo e bulbo basal, sendo classificado em tilencóide (nematoides que atacam órgãos subterrâneos) ou afelencóides (nematoides que atacam partes aéreas). A cauda é bastante variável, podendo ser filiformes, mucronadas, arredondadas, conoides, digitadas, e outras formas, sendo fundamental para a identificação de vários gêneros de fitonematoides. Algumas dessas características morfológicas devem ser medidas para fins de identificação.

Além da descrição detalhada dos órgãos do nematoide, a morfometria estabelece medidas obtidas a partir dos componentes corporais e de relações entre vários componentes corporais. Algumas medidas obrigatórias a serem tomadas independentemente da espécie de nematoide são o comprimento total do corpo, do esôfago, da cauda e do estilete. Para isso, formas abreviadas de medidas representadas por letras são usadas para cada componente corporal e suas relações como padrões de biometria. Por exemplo, algumas abreviações usadas são: L = Comprimento total do corpo do nematoide (mm ou μm); V = (Distância externa anterior a vulva/Comprimento do corpo) $\times$ 100 (em %); c = Comprimento do corpo/Comprimento da cauda); a = Comprimento total do corpo/Largura máxima do corpo (região mais larga). A partir dessas informações, chaves taxonômicas são utilizadas para a identificação a nível de gênero ou espécie. A morfometria também é indispensável na identificação de táxons superiores. A identificação do hospedeiro também auxilia na identificação do nematoide, uma vez que alguns gêneros e ou espécies de nematoides apresentam círculo restrito de hospedeiros.

A seguir, serão relatados brevemente algumas características morfológicas dos principais gêneros e espécies de fitonematoides de importância econômica.

No gênero *Meloidogyne* ocorre dimorfismo sexual, ou seja, as fêmeas são piriformes e de coloração branca leitosa, estomatoestilete robusto, pescoço usualmente curto (*M. exigua*, *M. incognita*) e às vezes longo (*M. coffeicola*), região labial com armadura esclerosada e disco labial de seis lábios. Os machos são vermiformes, região labial similar ao das fêmeas, armadura labial forte, estilete robusto, curto, com três bulbos basais, cauda abruptamente arredondada, com espículos em pares, campo lateral com quatro incisuras. Os juvenis de segundo estágio (J2) são vermiformes e delgados, apresentando estilete robusto e curto, com três bulbos basais, região labial com seis lábios mais ou menos fundidos em pares, e cauda afilando gradualmente, com término arredondado da porção terminal hialina. Os machos e juvenis podem ser utilizados para a identificação do gênero e espécies, porém as fêmeas são mais utilizadas para identificação de espécies por meio da configuração da região perineal, o qual será abordado abaixo.

Heterodera glycines também apresenta dimorfismo sexual, com fêmeas liminiformes, quando

jovens de cor branca a amarelada, e de cor marrom ou pretas após a morte, sendo denominadas cistos. O comprimento da abertura vulvar e o comprimento e largura da fenestra são importantes na identificação. A fêmea possui estilete desenvolvido, com bulbo basal proeminente, e pescoço curto. O macho é bem desenvolvido, estilete robusto, cauda curta e arredondada, espícula bem desenvolvidas e na região terminal da cauda. Juvenil apresenta estilete robusto, cauda com porção hialina de 50% do comprimento da cauda, corpo esguio e delgado, porém é mais robusto que em *Meloidogyne*.

Em *Pratylenchus* spp., é mais comum a presença de fêmeas e juvenis, sendo a ocorrência de machos mais rara. Na espécie *P. brachyurus*, as fêmeas são mais robustas que as fêmeas de *P. zaeae*. As fêmeas possuem corpo cilíndrico, esguio, vulva na posição posterior (V entre 70 a 80%), armadura cefálica esclerosada (não distintamente *off-set*), região labial plana, estilete curto e robusto, com grandes bulbos basais, bulbo mediano ovalado, bulbo basal do esôfago sobrepõe o intestino ventralmente, cauda variável, podendo ser hemisférica com término liso (*P. brachyurus*) ou truncada (*P. coffeae*).

Em suspensões contendo populações de *Radopholus similis*, é comum a presença de juvenis, fêmeas e machos. Nesta espécie não há dimorfismo sexual. As fêmeas apresentam região cefálica esclerotizada (endurecida), pequena e chata, estilete bem desenvolvido, cauda alongada e cônica, com ponta redonda irregular, dois ovários (didélfica), vulva na região mediana do corpo (V entre 50 a 70%). Os machos possuem região cefálica muito saliente (*off-set*) e arredondadas, estilete e esôfago são reduzidos, cauda cônica com ponta redonda irregular, presença de espícula na região posterior da cauda, com bursa compreendendo a parte inicial até a parte terminal da cauda.

O gênero *Aphelenchoides* possui estilete delicado com bulbos pequenos, metacorpo largo, intestino liga-se diretamente ao metacorpo, glândulas esofagianas possuem longo lóbulo sobrepondo o intestino, ovário distendido, cauda conoide com extremidade pontuda, denominada mucro (mucronada). Macho possui espículos, mas com ausência de bursa.

Helicotylenchus é um fitonematoide de comum ocorrência, e tem apresentado grande importância econômica, causando danos e perdas na cultura da soja. É um ectoparasita migrador com corpo bem desenvolvido na forma de espiral ou “C”, com estilete bem desenvolvido e moderadamente longo, cauda curta hemisférica, com ou sem projeção ventral, cauda mais curva dorsalmente, vulva na região posterior (próximo à cauda), glândulas esofagianas sobrepõem o intestino dorsalmente. A posição da abertura da glândula dorsal esofagiana é importante na identificação das espécies.

Assim, a montagem de lâminas temporárias ou permanentes e sua observação em microscópio de luz são fundamentais para as caracterizações morfológicas e morfométricas e a identificação de gêneros e espécies de fitonematoides.

5.2. Configuração perineal de *Meloidogyne* spp.

A técnica da configuração perineal de fêmeas pode ser utilizada para a caracterização de espécies de *Meloidogyne*. A região do períneo das fêmeas compreende a vulva e o ânus, e é possível verificar-se nela a ocorrência de certo padrão para cada espécie de *Meloidogyne* em particular. A observação cuidadosa de tais padrões pode possibilitar a identificação das espécies do gênero. Para essa análise recomenda-se que se extraiam 20 fêmeas jovens com aspecto branco leitoso por sistema radicular. Após o corte e montagem da lâmina da região perineal da fêmea são observadas algumas características para a identificação de certas espécies. Resumidamente, *M. incognita* possui arco dorsal no formato trapezoidal, *M. javanica* apresenta um sulco rompendo as estrias das linhas laterais de um lado ao outro do arco dorsal, *M. arenaria* possui arco dorsal na forma de crânio humano e dobras laterais, ao passo que *M. hapla* possui pontuações na região onde seria a ponta da cauda. No entanto, existem mais de 125 espécies de *Meloidogyne* e esse método dificulta a identificação de algumas espécies. Assim, esse método é usado em associação métodos bioquímicos e moleculares para uma identificação mais precisa dessas espécies.

A obtenção de cultura pura de populações de *M. javanica* normalmente é usada nas análises

de eletroforese de isoenzimas, sendo obtida a partir da identificação da fêmea pela configuração da região perineal. Em seguida, a massa de ovos dessa fêmea é inoculada em planta hospedeira e multiplicação do nematoide. A partir dessas fêmeas é que são feitas as análises de eletroforese para identificação de espécies de *Meloidogyne*.

6. IDENTIFICAÇÃO DE RAÇAS DE FITONEMATOIDES

Raças são populações dos nematoides que apresentam preferência por determinado hospedeiro (raça fisiológica). O método de identificar raças de fitonematoides consiste na inoculação de populações dos nematoides em plantas hospedeiras diferenciadoras. A espécie *M. incognita* possui quatro raças (raças 1, 2, 3 e 4), enquanto *M. exigua* possui 2 raças, e *M. arenaria*, 2 raças. Por sua vez, *H. glycines* tem 16 raças.

Para a identificação de raças e espécies de *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. hapla* são usadas hospedeiras diferenciadoras como algodoeiro cv. DP61, Fumo cv. NC95, pimentão cv. Early California Wonder, melancia cv. Charleston, amendoim cv. Florunner e tomateiro cv. Rutgers. Quando o nematoide se multiplica na planta diferenciadora, esta recebe sinal positivo (+) devido a reação de suscetibilidade a população do nematoide. Caso a população do nematoide não se multiplique, a diferenciadora recebe sinal negativo (-), devido a reação de resistência. As combinações dos diferentes resultados (+ ou -) em cada planta diferenciadora indicam as diferentes raças (e espécies, em alguns casos).

Para a identificação de raças de *H. glycines* são usadas cultivares diferenciadoras de soja com reações de resistência ou suscetibilidade, de modo similar ao sistema utilizado para *Meloidogyne* spp.

7. IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE *Meloidogyne* spp.

A identificação de *Meloidogyne* spp., baseada unicamente em caracteres morfológicos, não é considerada suficientemente segura e precisa. De maneira complementar a esse método clássico de identificação, é possível e recomendável a utilização de técnicas bioquímicas, como a análise de isoenzimas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Essa técnica, devido à relativa simplicidade, baixo custo, reprodutibilidade e rapidez, torna-se alternativa segura para uso em rotina laboratorial.

Isoenzimas são formas moleculares de uma mesma enzima, com propriedades catalíticas similares, mas que diferem em suas mobilidades eletroforéticas. A análise de isoenzimas tem sido extensivamente utilizada por vários pesquisadores, especialmente quando da descrição de novas espécies ou mesmo para caracterização de diferentes populações.

A análise de isoenzimas é limitada a presença de fêmeas, para nematoides vermiformes a utilização é restrita, uma vez que o tamanho reduzido dos indivíduos, aliado à dificuldade de extração de proteínas, limitam a sua utilização.

A eletroforese de isoenzimas é uma técnica baseada na migração de moléculas de acordo com sua carga elétrica e peso molecular em campo elétrico. Os padrões de isoenzimas são simples e, na maioria das vezes, facilmente visualizados. A identificação de *Meloidogyne* spp. é feita principalmente pela enzima esterase (EST), mas outras, como malato desidrogenase (MDH), superóxido dismutase (SOD) e glutamato transaminase (GOT) podem ser utilizadas para complementar a informação gerada pela EST. A eletroforese pode ser realizada em dois sistemas diferentes, o horizontal e o vertical, sendo classificada como contínua e descontínua. O gel de poliacrilamida é o que proporciona melhor separação das moléculas, devido ao seu elevado poder de resolução que permite ampla variação no diâmetro de seus poros.

8. MÉTODOS MOLECULARES E IDENTIFICAÇÃO DE FITONEMATOIDES

A partir do desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) e do progressivo aumento da disponibilidade de sequências de nucleotídeos do genoma de diferentes espécies, a caracterização de fitonematoides passou por uma transformação intensa.

Muitos métodos de identificação de nematoides foram desenvolvidos baseados na ocorrência de polimorfismo nas sequências do ácido desoxirribonucleico (DNA) entre as diferentes espécies de nematoides. As regiões do genoma dos fitonematoides mais indicadas para a caracterização de espécies são o DNA ribossomal (rDNA) e DNA mitocondrial (mtDNA).

Uma grande vantagem dos métodos moleculares em relação a isoenzimas é a possibilidade de se obter o DNA de ovos, formas vermiformes, além dos adultos. Contudo, o diagnóstico molecular deve abarcar três critérios. Primeiramente, o diagnóstico molecular deve ser robusto e validado contra todas as possíveis reações cruzadas com organismos semelhantes que co-existam no mesmo habitat. Segundo o teste molecular deve ser simples, preferencialmente permitindo o diagnóstico numa única etapa de PCR. Terceiro, deve ser suficientemente sensível para detectar pequena quantidade de nematoides presentes na amostra.

Os principais métodos moleculares para a caracterização de espécies de fitonematoides baseiam-se na PCR, PCR *multiplex*, PCR quantitativa. Além disso, amplificação isotérmica de DNA mediada por *loop* (LAMP) e o DNA-código de barras são ferramentas úteis na identificação de fitonematoides.

8.1 PCR espécie-específico

Nas últimas décadas, centenas de conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos foram desenvolvidos para diagnose de fitonematoides. O desenho do *primer* é crucial para o sucesso desta abordagem. *Primers* espécie-específicos devem abranger qualquer variação intra-específica e não amplificar nematoides não-alvo. Vários *primers* projetados para identificação de espécies tropicais de nematoides de galhas são baseadas em SCAR (Região amplificada de sequência caracterizada), incluindo *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. paranaensis*, *M. exigua* e *M. enterolobii*. Marcadores SCAR são desenvolvidos a partir da caracterização e sequenciamento de bandas polimórficas resultantes de análise RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso).

O processo de caracterização de fitonematoides por PCR pode ser dividido em três etapas. A primeira é a extração do DNA total, existindo várias metodologias a depender do estágio de nematoide (ovo, juvenil ou fêmea). A segunda etapa é a amplificação do DNA-alvo (PCR), onde a enzima Taq DNA polimerase amplifica a quantidade de DNA-alvo direcionada pelo par de *primers*. A PCR é conduzida com auxílio de um termociclador, programado para temperaturas de desnaturação das fitas duplas de DNA (95 °C), anelamento dos *primers* nas regiões-alvo (entre 50 e 60 °C), e reação de polimerização do DNA complementar ao DNA-alvo pela Taq DNA polimerase (72 °C). A terceira etapa é a análise do produto de PCR (*amplicon*) por meio de eletroforese em gel de agarose na presença de marcadores de DNA fluorescentes observados sob luz UV.

8.2 PCR Multiplex

Neste método, dois ou mais pares de *primers* para diferentes alvos podem ser incluídos na mesma reação. Como resultado, os *amplicons* dos distintos alvos são visualizados em um único gel, diminuindo o tempo, mão de obra e custos. No Brasil, grande avanço ocorreu na PCR *multiplex* devido aos trabalhos da equipe da Dra. Regina Carneiro (Embrapa), que desenvolveu kits PCR *multiplex* para vários patossistemas. No entanto, esta abordagem requer condições de reação semelhantes para todos os conjuntos de *primers* utilizados. A capacidade de detectar espécies com baixas densidade populacional na amostra também pode ser inibida quando uma alta concentração de DNA de outro alvo está presente. O kit diagnóstico SCAR/café foi desenvolvido para várias espécies de *Meloidogyne* do cafeeiro, e vem sendo utilizado no Brasil e na América Central. Outro exemplo é o kit diagnóstico SCAR/arroz, usado para identificar *Meloidogyne* spp. que atacam a cultura do arroz no Brasil.

8.3 PCR em tempo real (qPCR)

PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR) permite a detecção e a quantificação da amplificação de sequências-alvo em tempo real. Assim, a qPCR é mais rápida e mais sensível que a PCR convencional, não requerendo análise de eletroforese em gel de agarose. A sensibilidade de detecção pode chegar a casa de femtogramas de DNA, ou seja, mil vezes mais sensível que a PCR convencional. No entanto, os altos custos dos equipamentos e reagentes ainda são as principais desvantagens da qPCR. O método é baseado na detecção e quantificação do DNA amplificado por meio de moléculas fluorescentes (*SyBr Green*, por exemplo) com afinidade a fitas-duplas de DNA. Uma vez que ocorra a emissão de sinal de fluorescência, termocicladores com detectores registram sua intensidade, a cada ciclo de PCR. Desta forma, a intensidade do sinal é registrada graficamente

por meio de um *software* na tela do computador. Este sinal é diretamente proporcional à quantidade de DNA, permitindo assim realizar estimativas de quantificação por meio de curvas de diluição e modelos de regressão linear. Atualmente existem metodologias de detecção via qPCR para algumas espécies de *Meloidogyne*, *Pratylenchus* e *Aphelenchoides*, por exemplo. O grande desafio da qPCR é ser representativa, pois nesse procedimento, geralmente, apenas 0,5 gramas de solo ou material vegetal são utilizados. Contudo, trabalhos recentes têm mostrado alta correlação entre quantidade de nematoides encontrados nas leituras microscópicas com aqueles aferidos por qPCR.

8.4 DNA – Código de barras

A extração e sequenciamento de certas regiões de DNA dos fitonematoides, normalmente, rDNA e mtDNA, e sua comparação com sequências depositadas em bancos de dados permite a identificação. Esta técnica vem sendo utilizada no Brasil, principalmente, por pesquisadores do Instituto biológico de São Paulo, e já permitiu a identificação de várias espécies de fitonematoides quarentenários identificados em amostras coletadas nas alfandegas.

No entanto, para que esta técnica seja precisa é imperativo que as sequências depositadas nos bancos de dados (*GenBank*, por exemplo) - que servem de referência - sejam obtidas de espécimes corretamente identificados, de preferência por um taxonomista experiente, baseando-se nas características morfológicas e morfométricas, antes das sequências de DNA serem submetidas e depositadas em qualquer base de dados pública.

8.5 Amplificações isotérmica de DNA mediada por *loop* (LAMP)

Nesta técnica o DNA é amplificado com alta especificidade, sensibilidade (até 10 vezes mais sensível que PCR convencional), eficiência e velocidade sob condições isotérmicas. Este procedimento requer o uso de pelo menos quatro pares de *primers* e uma DNA polimerase com atividade de deslocamento de fita (Bst polimerase). Todo o procedimento leva de 30 minutos a menos de 2 horas, dependendo no protocolo, em condições isotérmicas (57–65 °C) com a utilização de equipamentos simples como banhos-maria ou blocos de aquecimento. A amplificação pode ser detectada através da visualização a olho nu, devido a formação de uma camada branca precipitado de pirofosfato de magnésio ou a mudança de cor da solução pelo uso de corantes (*SYBR Green*, calceína). Esta técnica tem sido amplamente estudada em muitos campos da ciência, embora poucos diagnósticos para fitonematoides tenham sido desenvolvidos até agora. No Brasil, pesquisadores da Universidade Federal de Viçosa (UFV) tem trabalhado no desenvolvimento de métodos diagnóstico de nematoides-das-galhas no café baseados em LAMP.

Documento assinado digitalmente
 SILVINO INTRA MOREIRA
Data: 06/01/2025 13:48:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Silvino Intra Moreira
Presidente da Comissão Julgadora do Edital 138/2024-ICIAG
Portaria de pessoal UFU nº 6366, de 19 de novembro de 2024
