

DALILA SÊNI DE JESUS

**TAXONOMIA INTEGRATIVA DE ESPÉCIES DE *Aphelenchoides* ASSOCIADAS A
SEMENTES DE GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS E DESENVOLVIMENTO DE
DIAGNÓSTICO BASEADO EM PCR EM TEMPO REAL**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

J58t
2015

Jesus, Dalila Sêni de, 1984-

Taxonomia integrativa de espécies de *Aphelenchoides*
associadas a sementes de gramíneas forrageiras e
desenvolvimento de diagnóstico baseado em PCR em tempo real
/ Dalila Sêni de Jesus. – Viçosa, MG, 2015.

ix, 79f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Rosângela D Arc de Lima Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Fitonematóides. 2. *Aphelenchoides*. 3. Plantas
forrageiras - Sementes. 4. Diagnóstico molecular.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Fitopatologia. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia.
II. Título.

CDD 22. ed. 591.57

DALILA SÊNI DE JESUS

**TAXONOMIA INTEGRATIVA DE ESPÉCIES DE *Aphelenchoides* ASSOCIADAS A
SEMENTES DE GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS E DESENVOLVIMENTO DE
DIAGNÓSTICO BASEADO EM PCR EM TEMPO REAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA 26 de Fevereiro de 2015.

Rosângela D'Arc de Lima Oliveira
(Orientadora)

Claudio Marcelo Gonçalves de Oliveira
(Coorientador)

Claudine Márcia de Carvalho
(Coorientadora)

Silvia Renata Siciliano Wilcken

Danilo Batista Pinho

*Com amor, agradecimento e admiração,
dedico aos meus amados pais, Zaira e
Vicente, e ao meu noivo Edielton.*

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Fitopatologia da UFV, por oferecer uma excelente infraestrutura que foi essencial para realização de grande parte deste trabalho.

À Coordenação de Pós-Graduação em Fitopatologia, pelo incentivo constante ao aperfeiçoamento profissional por meio de recursos para participação em cursos, congressos e treinamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo de Doutorado Sanduíche.

Aos meus queridos Rosângela D'Arc de Lima Oliveira e Claudio Marcelo Gonçalves de Oliveira, pela orientação, treinamento, conselhos e apoio ao longo deste trabalho.

À Associação Paulista dos Produtores de Sementes e Mudas (APPS), pelo envio de amostras, as quais foram essenciais para o andamento desta pesquisa.

Aos pesquisadores Luciany Favoreto (EPAMIG), César Bauer Gomes (Embrapa Clima Temperado), Moacil Alves de Souza (UFV), Marta Cristina Corsi de Filippi (Embrapa Arroz e Feijão), Katsumi Togashi (University of Tokyo/Japão), Miguel Escuer (Instituto de Ciencias Agrarias, ICA-CSIC/Espanha), Thomas Prior (Food and Environment Research Agency (FERA –York/ Reino Unido), Nestor Felipe Chaves-Barrantes (Universidade da Costa Rica/Costa Rica) e Idowu Rotifa (Scottish Agricultural College/Edimburgo-Reino Unido), pelo envio de material vegetal com *Aphelenchoides* spp. utilizados neste estudo.

A Dr^a. Rosana Bessi, pelo treinamento e orientação no preparo de amostras e análise de nematoides para Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Dr. Thomas Prior, pela análise morfológica, confirmação da identidade das populações de *A. besseyi* e pela paciência em me ensinar um pouco mais sobre a morfologia de *Aphelenchoides* spp..

Aos pesquisadores Vivian Blok, David Roberts e Roy Neilson, The James Hutton Institute, Dundee, Escócia, pelo treinamento e suporte para a finalização deste trabalho, e por me ensinarem uma nova dinâmica de trabalho.

Ao Professor Julio Alejandro Di Rienzo, da National University of Cordoba, Argentina, pela ajuda e orientação na realização das análises estatísticas.

Aos estudantes Huarlen Balbino e José Flavio R. D. Monteiro e a técnica de Laboratório Cássia Gondim, pelo auxílio na manutenção *in vitro* das populações de *Aphelenchoides* spp.

Aos colegas do Laboratório de Nematologia/UFV Elói, Aline, Huarlen, Inorbert, Cássia, Patrícia e Luciana.

Ao meu amado noivo, Edielton, que mesmo nos momentos mais difíceis esteve ao meu lado, incentivando-me a sempre superar minhas limitações.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

DALILA SÊNI DE JESUS, filha de Vicente das Dores de Jesus e Zaira Aparecida de Jesus, nasceu em 12 de Fevereiro de 1984, em Patos de Minas, Minas Gerais.

Em Janeiro de 2009, graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais.

Em Fevereiro de 2011, obteve o título de *Master Scientiae* em Fitopatologia, pela Universidade Federal de Viçosa.

Em Março de 2011, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, em nível de Doutorado, na Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERÊNCIAS	5
Capítulo 1: Caracterizações morfológica e molecular de populações de <i>Aphelenchoides besseyi</i> associadas a sementes de gramíneas forrageiras	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Extração e multiplicação in vitro de populações de <i>A. besseyi</i>	12
3.2. Caracterizações morfológica e morfométrica.....	14
3.3. Preparação de nematoides para microscopia de luz	14
3.4. Preparação de nematoides para microscopia eletrônica de varredura (MEV)...	14
3.5. Caracterização molecular	15
3.6. Extração do DNA genômico a partir de um único nematoide	15
3.7. Amplificação e sequenciamento	16
3.8. Clonagem de produtos de PCR.....	18
3.9. Análise filogenética.....	19
4. RESULTADOS	20
4.1. Caracterização morfológica das populações de <i>Aphelenchoides besseyi</i> associadas a sementes de gramíneas forrageiras.....	20
4.2. Análise das sequências e inferência filogenética	25
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÕES.....	37
7. REFERÊNCIAS	38

Capítulo 2: Diagnóstico de <i>Aphelenchoides besseyi</i> e <i>A. fujianensis</i> baseado em PCR quantitativo (qPCR) e estudo da variabilidade intraindividual em <i>A. besseyi</i>	44
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1. Desenvolvimento de diagnóstico para detecção	47
3.1.1. Seleção da região alvo e desenho de primers e sondas Taqman	47
3.1.2. Preparação dos plasmídeos para geração de curva padrão	47
3.1.3. Condições dos ensaios de qPCR.....	48
3.1.4. Testes de especificidade, sensibilidade e quantificação absoluta do DNA alvo a partir de um único nematoide.	49
3.1.5. Análise estatística	51
3.2. Detecção quantitativa de <i>Aphelenchoides</i> spp.....	52
3.3. Variabilidade intraindividual na expansão D2-D3 da região LSU em <i>Aphelenchoides besseyi</i>	52
3.4. Análise filogenética	53
4. RESULTADOS	54
4.1. Teste de Sensibilidade	54
4.2. Teste de Especificidade	58
4.3. Variabilidade intraindividual na expansão D2-D3 da região LSU em <i>Aphelenchoides besseyi</i>	62
5. DISCUSSÃO.....	64
5.1. Desenvolvimento de protocolos, utilizando qPCR, para diagnóstico de populações de <i>A. besseyi</i> e <i>A. fujianensis</i>	64
5.2. Variabilidade intraindividual entre as sequências da região LSU do rDNA em <i>A. besseyi</i>	66
6. CONCLUSÕES.....	68
7. REFERÊNCIAS	68
CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
ANEXO.....	74

RESUMO

JESUS, Dalila Sêni de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2015. **Taxonomia integrativa de espécies de *Aphelenchoides* associadas a sementes de gramíneas forrageiras e desenvolvimento de diagnóstico baseado em PCR em tempo real.** Orientadora: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira. Coorientadores: Claudio Marcelo Gonçalves de Oliveira e Claudine Márcia de Carvalho.

A associação de *Aphelenchoides besseyi* a sementes de gramíneas forrageiras tem implicações quarentenárias que limitam a sua comercialização para muitos dos países importadores das sementes brasileiras. Como várias outras espécies de *Aphelenchoides* sem importância econômica são relatadas em associação a sementes de forrageiras, é imprescindível a identificação precisa de *A. besseyi*. Deste modo, realizaram-se as caracterizações morfológica, morfométrica e molecular de populações de *A. besseyi* associadas a sementes de forrageiras cultivadas no Brasil, comparando-as com populações de *A. besseyi* provenientes da Costa Rica, Espanha e Japão. Primers e sondas específicos foram desenhados, a partir da região LSU rDNA, e testados usando PCR em tempo real. A caracterização das regiões SSU, LSU e COI comprovaram a ocorrência de uma espécie geneticamente distante de *A. besseyi* associada às sementes de forrageiras no Brasil. De acordo com as análises filogenéticas das regiões SSU e COI, esta outra espécie, trata-se de *A. fujianensis*. Foi possível desenvolver e usar os ensaios diagnósticos para a detecção de *A. besseyi* e *A. fujianensis*. Com o uso dos primers/sonda específicos foi possível detectar o DNA alvo extraído a partir de um único nematoide. Ainda, foram identificadas duas sequências distintas na região LSU em uma população de *A. besseyi*, constituindo o primeiro relato da ocorrência de variabilidade intraindividual na região LSU do rDNA nesta espécie. Em adição, a alta identidade de uma destas sequências à *A. fujianensis* reforçou a proximidade filogenética destas espécies e a necessidade de uma extensiva investigação para se estimar a frequência deste fenômeno.

ABSTRACT

JESUS, Dalila Sêni de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Integrative taxonomy of *Aphelenchoides* species associated with gramineous forage seeds and development of diagnostic based on real-time PCR.** Advisor: Rosângela D'Arc de Oliveira Lima. Co-Advisors: Claudio Marcelo Gonçalves de Oliveira and Claudine Márcia de Carvalho.

The association *Aphelenchoides besseyi* gramineous forage seed has quarantine implications that limit their marketing for many of the importing countries of these seeds. As many other *Aphelenchoides* species with no economic importance are reported in association with forage seeds, it is essential an accurate identification of *A. besseyi*. Thus, morphological, morphometric and molecular characterizations was undertaken using *A. besseyi* populations associated with gramineous forage seeds grown in Brazil, comparing to populations of *A. besseyi* from Costa Rica, Spain and Japan. Specific primers and probes were designed from LSU rRNA gene, and tested using real time PCR assays. The characterization of SSU, LSU, and COI proved the occurrence of a species genetically distinct from *A. besseyi* associated with gramineous forage seeds in Brazil. According to the phylogenetic analyzes of SSU and COI regions, this species is *A. fujianensis*. It was possible to develop diagnostic assays and use them to detect *A. besseyi* and *A. fujianensis*. The primers and probes were able to detect the DNA target extracted from a single nematode. Furthermore, two different sequences were identified in the LSU gene in one of *A. besseyi* populations studied, constituting the first report of intra-individual variation in LSU rDNA for this species. In addition, the high identity of one of these sequences with *A. fujianensis* reinforced the phylogenetic proximity of these species and the need for extensive research to estimate the frequency of this phenomenon.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção brasileira de sementes forrageiras tropicais teve impulso somente a partir de 1970, mas, em curto período de 30 anos, o Brasil se estabeleceu como maior produtor, consumidor e exportador mundial desse insumo. O mercado brasileiro de sementes de pastagens é dominado por gramíneas, especialmente pelo gênero *Brachiaria*, que corresponde a aproximadamente 85% desse mercado (Macedo, 2005).

A expansão de novas áreas de formação de pastagens, a necessidade de recuperação daquelas degradadas e as crescentes exportações brasileiras são fatores que sustentam uma alta demanda por sementes de gramíneas forrageiras. Aproximadamente 95% da produção dessas sementes são destinadas ao mercado interno e o restante exportado principalmente para países da América Central e Sul (Souza, 2001). Apesar do volume de exportação ainda ser pequeno, esse setor apresentou uma taxa de crescimento de 19% ao ano, durante os últimos anos. Segundo dados do Ministério do Comércio Exterior, durante o período de 2000 a 2011 foram exportadas 97 mil toneladas de sementes forrageiras com faturamento em torno de US\$ 476 milhões (Aliceweb, 2012). Além disso, este setor é responsável por gerar mais de 50 mil empregos no país, que tende a crescer com a sua expansão (Vechiato & Aparecido, 2008).

Apesar de ser um mercado com potencial de expansão, principalmente para exportações, o sistema de produção de sementes de gramíneas forrageiras é afetado pela incidência de patógenos, que promovem a redução da produção e qualidade, além de constituir grandes entraves às exportações brasileiras, devido às barreiras fitossanitárias (Marchi *et al.*, 2007). Análises fitossanitárias são exigidas somente para as sementes destinadas ao mercado externo, com isso, patógenos tem sido inadvertidamente disseminados para novas áreas, inclusive para os campos de produção dessas sementes. Como exemplo, têm-se os relatos de altas incidências das espécies fúngicas *Claviceps maximensis* e *Ustilago operta* em lotes comerciais e mesmo em campos de produção de sementes de gramíneas forrageiras (Marchi *et al.*, 2008; Marchi *et al.*, 2009). Estes, além de causar expressiva redução na produtividade e qualidade das sementes, são entraves às exportações de gramíneas forrageiras para muitos países.

Neste cenário, merece destaque a frequente associação de nematoides do gênero *Aphelenchoides* relatada em sementes de gramíneas forrageiras (Marchi *et al.*, 2007; Favoreto *et al.*, 2011; Mallmann *et al.*, 2013). Dentre as espécies relatadas, destaca-se *A. besseyi* Christie, que hoje é um dos principais limitadores as

exportações desse insumo, por ser listada como praga quarentenária em muitos dos países importadores das sementes brasileiras. México, Paraguai, Guatemala, Honduras e Niguarágua são alguns países onde *A. besseyi* é listado como praga quarentenária. Juntos, estes países importaram 39% das sementes de forrageiras brasileiras exportadas durante o período de 2000 a 2011 (Aliceweb, 2012).

Aphelenchoides spp. pertence à subordem Tylenchina Thorne, 1949, infraordem Tylenchomorpha De Ley & Blaxter, 2002, superfamília Aphelenchoidea Fuchs, 1937, família Aphelenchoididae Skarbilovick, 1947 e subfamília Aphelenchoidinae Skarbilovick, 1947 (Hunt, 2008). O gênero *Aphelenchoides* está entre um dos gêneros com maior número de espécies descritas em Nematoda, abrigando mais de 150 espécies (Hunt, 2008). As espécies dentro do gênero possui hábito micófago, mas abriga importantes patógenos que infectam partes aéreas de plantas tais como folhas, inflorescências e sementes em uma extensa gama de hospedeiros (Hunt, 1993).

Aphelenchoides besseyi é conhecido por causar a ponta-branca-do-arroz e o nanismo de verão em morangueiro, mas é relatado infectando mais de 200 espécies de plantas distribuídas em 35 gêneros (Cheng *et al.*, 2013). No século passado, este nematoide foi responsável por severas perdas econômicas no Japão e nos Estados Unidos, mas hoje se encontra sob controle devido a adoção de medidas fitossanitárias como a utilização de cultivares resistentes e o tratamento de sementes (Cares *et al.*, 2008). Porém, em vários países da Ásia e África, *A. besseyi* tem sido responsável por reduzir a produtividade em 10-71% em lavouras orizícolas (Bridge *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2013). Ainda, esta espécie é relatada causando severos danos em plantas ornamentais tais como *Asplenium nidus* e *Polianthes tuberosa* na China, Taiwan, Vietnã e Índia (Tzeng & Lin, 2005; Cuc & Pilon, 2007; Hisieh *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2012) e mais recentemente descrito infectando folhas de feijoeiro na Costa Rica (Chaves *et al.*, 2013). No Brasil, apesar de *A. besseyi* ser amplamente disseminado e relatado em associação a diferentes hospedeiros, informações sobre danos causados por este patógeno são raras (Silveira & Curi, 1990; Oliveira & Kubo, 2007; Cares *et al.*, 2008; Favoreto *et al.*, 2011).

Aphelenchoides besseyi exibe hábito endo ou ectoparasita, dependendo da espécie hospedeira (Allen, 1952). Nas lavouras orizícolas, este nematoide infecta plântulas, movendo-se até as bainhas das folhas jovens, onde se alimentam nas regiões do meristema apical. Durante a fase de perfilhamento da planta, estes nematoides movem para a região de formação das estruturas reprodutivas da planta hospedeira, onde entram nas espiguetas e se alimentam ectoparasiticamente nos

tecidos do ovário, estames, lodículas e embrião (Huang & Huang, 1972; Bridge *et al.*, 2005). Com a maturação dos grãos e consequente redução da umidade, ocorre o declínio da reprodução do nematoide. Estes entram em anidrobiose formando aglomerados de nematoides entre o pericarpo e a casca (pálea e lema), com a predominância de fêmeas, onde podem sobreviver por até três anos, sob condições adequadas de armazenamento das sementes (Huang & Huang, 1972; Bridge *et al.*, 2005). A capacidade de entrar em anidrobiose é um caráter adaptativo importante que permite a *A. besseyi* além de sobreviver à desidratação natural nas sementes, serem disseminados a longas distâncias.

Os sintomas mais comuns do ataque de *A. besseyi* em arroz é o amarelecimento, seca e a torcedura da ponta das folhas, sintoma esse denominado “ponta-branca-do-arroz”. Também pode ocorrer a distorção e o encurtamento da folha bandeira chegando a impedir a abertura da panícula. As panículas são mais curtas e com muitas flores abortadas e, geralmente os grãos são menores. Em morangueiro, os sintomas mais frequentes incluem o encarquilhamento, a distorção foliar, o nanismo das plantas e redução na floração. Em outras dicotiledôneas, as lesões provocadas pelo nematoide levam ao surgimento de manchas foliares (Bridge *et al.*, 2005; Cares *et al.*, 2008). As medidas adotadas para o manejo deste nematoide incluem o uso de material propagativo sadio, os tratamentos térmico ou químico das estruturas propagativas, o uso de cultivar resistente ou tolerante e rotação de culturas (Tenente, 2003; Bridge *et al.*, 2005; Cuc *et al.*, 2010).

A ampla gama de hospedeiros, o potencial de danos a culturas de importância econômica (arroz, morangueiro e espécies ornamentais) e a capacidade de sobreviver nas sementes, são fatores que colocam *A. besseyi* entre os fitonematoides de maior importância econômica. Assim, a identificação deste nematoide em sementes, tais como de gramíneas forrageiras se faz necessário para evitar sua disseminação e adoção de medidas de manejo.

Além de *A. besseyi*, as seguintes espécies já foram relatadas em sementes de gramíneas forrageiras: *A. bicaudatus*, *A. fragariae*, *A. sexlineatus* (Favoreto *et al.*, 2011) e *A. subtenuis* (Sharma *et al.*, 2001). Alguns trabalhos relatam a alta frequência de *Aphelenchoides* nestas sementes, mas a identificação foi feita somente a nível somente de gênero (Sharma, 1978; Marchi *et al.*, 2007; Mallmann *et al.*, 2013). Isto reforça a falta de nematologistas clássicos treinados na identificação desses organismos, realidade discutida no meio científico ao longo dos últimos anos (Ferris, 1994; Luc *et al.*, 2010). Como fator complicador, os espécimes frequentemente encontrados nas amostras para análise estão em anidrobiose, que resulta na alteração

normal da morfologia destes nematoides, limitando a realização de diagnose segura. Além da similaridade morfológica em *Aphelenchoides* spp., as descrições e caracterizações inadequadas de muitas espécies limitam a elaboração de uma chave-taxonomica que possa ser usada nas análises fitossanitárias (Hockland, 2001). Neste sentido, o uso de tecnologias baseadas no DNA representa um caminho para superar essas limitações.

Apesar do recente aumento de pesquisas buscando desvendar aspectos moleculares e biológicos de espécies de *Aphelenchoides* (Fu *et al.*, 2012; Hsieh *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014), poucos trabalhos têm se concentrado no desenvolvimento de diagnósticos moleculares baseados em DNA para detecção de espécies de importância econômica dentro do gênero. Recentemente, Rybarczyk-Mydlowska *et al.* (2012) desenvolveram um protocolo de detecção molecular para quatro espécies de *Aphelenchoides* baseado na região SSU-ribossomal, incluindo *A. besseyi*, por meio da técnica de PCR em tempo real quantitativo (qPCR). Entretanto, como nos demais métodos de detecção, para a implantação na rotina laboratorial é necessária uma extensiva análise da variabilidade genética em diferentes populações da espécie alvo, além de avaliar a especificidade de detecção no maior número de espécies possível, evitando resultados falso-positivos.

Até o presente, nenhum trabalho de caracterização molecular de populações brasileiras de *A. besseyi* foi realizado. Há ainda pouca informação disponível nos bancos de dados (por exemplo, GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), o que limita a realização de análise *in silico* para seleção de potenciais marcadores moleculares específicos para o desenvolvimento de diagnósticos mais robustos para o uso em análises fitossanitárias. Em vista disso, é urgente a necessidade do estudo taxonômico dessas populações de *Aphelenchoides* para determinar a identidade desses nematoides, os quais têm barrado a exportação das sementes brasileiras para países em que *A. besseyi* é uma praga quarentenária. Complementarmente, o desenvolvimento de protocolos para diagnóstico molecular de espécies de fitonematoídes de importância econômica, como *A. besseyi*, faz-se necessário a fim de tornar ágil e assegurar a confiabilidade das análises fitossanitárias.

2. REFERÊNCIAS

- Aliceweb - Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio. Secretaria de Comércio Exterior. Sistema Aliceweb. Disponível em: <http://alicesweb.desenvolvimento.gov.br>. Acesso em: 1 Junho de 2012.
- Allen, M. W. Taxonomic status of the bud and leaf nematodes related to *Aphelenchoides fragariae* (Ritzema Bos, 1891). Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 19: 108-120, 1952.
- Bridge, J., Plowright, R.A., Peng, D. Nematodes parasites of rice. In: Luc, M., Sikora, R.A. & Bridge, J. (eds.). Plant parasitic nematodes in tropical and subtropical agriculture. Second edition. Wallingford, CAB International. p. 87-130, 2005.
- Cares, J. E., Santos, J. R. P., Tenente, R. C. V. Taxonomia de nematoides de sementes, bulbos e caules – parte II. Revisão Anual de Patologia de Plantas, 16: 39-84, 2008.
- Chaves, N., Cervantes, E., Zabalgoitia, I., Araya, C. M. *Aphelenchoides besseyi* Christie (Nematoda: Aphelenchoididae), agente causal del amachamiento del frijol común. Tropical Plant Pathology, 38(3): 243-252, 2013.
- Cheng, X., Xiang, Y., Xie, H., Xu, C-L., Xie, T-F., Zhang, C., Li, Y. Molecular characterization and functions of fatty acid and retinoid binding protein gene (Ab-far-1) in *Aphelenchoides besseyi*. PLoS ONE 8(6): e66011, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0066011
- Christie, J. R. A description of *Aphelenchoides besseyi*, n. sp., the summer-dwarf nematode of strawberries, with comments on the identity of *Aphelenchoides subtenuis* (Cobb, 1926) and *Aphelenchoides hodsoni* Goodey, 1935. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 9(2): 82-84, 1942.
- Cuc, N. T. T. & Pilon, M. An *Aphelenchoides* sp. nematode parasitic of *Polianthes tuberosa* in the Mekong Delta. Journal of Nematology, 39(3): 248-257, 2007.

Cuc, N. T. T., Son, N. T., Trung, T. M., Van Trang, N., Dang, L. M., Pilon, M. Hot water treatment prevents *Aphelenchoides besseyi* damage to *Polianthes tuberosa* crops in the Mekong Delta of Vietnam. *Crop Protection*, 29: 599–602, 2010.

Favoreto, L., Santos, J. M., Calzavara, S. A., Lara, L. A. Estudo fitossanitário, multiplicação e taxonomia de nematoides encontrados em sementes de gramíneas forrageiras no Brasil. *Nematologia Brasileira*, 35(1-2): 20-35, 2011.

Feng, H., Shao, Y., Wei, L., Gao, C., Zhou, Y. The white-tip nematode, *Aphelenchoides besseyi*, exhibits an auxin-orientated behaviour affecting its migration and propagation. *Nematology*, 00:1-9, 2014. doi:10.1163/15685411-00002812

Ferris, V. R. The future of nematode systematic. *Fundamental Applied Nematology*, 17 (2): 97-101, 1994.

Fu, Z., Agudelo, P., Wells, C. E. Differential expression of a β -1,4-endoglucanase induced by diet change in the foliar nematode *Aphelenchoides fragariae*. *Nematology*, 102(8): 804-811, 2012. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-12-11-0336>

Hockland, S. A pragmatic approach to identifying *Aphelenchoides* species for plant health quarantine and pest management programmes. PhD Thesis. University of Reading. Reading, England, UK, 2001.

Hsieh, S-H., Lin, C-J., Chen, P. Sexual compatibility among different host-originated isolates of *Aphelenchoides besseyi* and the inheritance of the parasitism. *PLoS ONE* 7(7): e40886, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0040886

Huang, C. S.; Huang, S. P. Bionomics of white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi* in rice florest and developing grains. *Botanical Bulletin Academia Sínica, Taipei*, 13(1): 1-10, 1972.

Hunt, D. J. A checklist of the Aphelenchoidea (Nematoda: Tylenchina). *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, 10(2): 99-135, 2008.

Hunt, D. J. Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: their systematic and bionomics. CAB International, Wallingford, UK, 1993.

Khan, M., Handoo, Z. A., Rao, U., Rao, S. B., Prasad, J. S. Observations on the foliar nematode, *Aphelenchoides besseyi*, infecting tuberose and rice in India. *Journal of Nematology* 44(4):391–398, 2012.

Luc, M., Doucet, M. E., Fortuner, R., Castillo, P., Decraemer, W., Lax, P. Usefulness of morphological data for the study of nematode biodiversity. *Nematology*, 12(4): 495-304, 2010.

Macedo, M. C. M. Pastagem no ecossistema cerrados: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: Anais da 42º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Goiabita: SBZ, 56-84, 2005.

Mallmann, G., Verzignassi, J. R., Fernandes, C. D., Santos, J. M., Vechiato, M. H. Inácio, C. A., Batista, M. V., Queiroz, C. A. Fungos e nematoides associados a sementes de forrageiras tropicais. *Summa Phytopathologica*, 39 (3): 201-203, 2013.

Marchi, C. E., Fernandes, C. D., Anache, F. C., Fabris, L. R. Progresso e controle da mela-das-sementes (*Claviceps maximensis*) de *Brachiaria brizantha*. *Summa Phytopathologica*, 34(3): 241-247, 2008.

Marchi, C. E., Fernandes, C. D., Borges, C. T., Santos, J.M., Jerba, V.F., Trentin, R.A., Guimarães, L.R.A. Nematofauna fitopatológica de sementes comerciais de forrageiras tropicais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 42 (5): 655-660, 2007.

Marchi, C. E., Fernandes, C. D., Machado, J. C., Vechiato, M. H., Fabris, L. R., Batista, M. V., Sorgatto, M., Salles, N.E.P.C., Barbosa, C. S. Incidência de *Ustilago operta* em sementes comerciais de braquiária. *Arquivo do Instituto Biológico*, 76 (1): 121-125, 2009.

Oliveira, C. M. G. & Kubo, R. K. Novos assinalamentos de nematoides de parte aérea (*Aphelenchoides* spp.) em plantas de begônia no Brasil. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 12(2): 134-137, 2007.

Rybarczyk-Mydlowska, K., Mooyman, P., Van Megen, H., Van Den Elsen, S., Vervoort, M., Veenhuizen, P., Van doorn, J., Dees, R., Karssen, G., Bakker, J. & Helder, J. Small subunit ribosomal DNA-based phylogenetic analysis of foliar nematodes

(*Aphelenchoides* spp.) and their quantitative detection in complex DNA backgrounds. *Phytopathology*, 102(12): 1153-1160, 2012. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-05-12-0114-R>

Sharma, R. D. Nematodes associated with gramineous forage crops in Cerrado soils. *Sociedade Brasileira de Nematologia*, 3: 53-56, 1978.

Sharma, R. D., Cavalcante, M. J. B. & Valentim, J. F. Nematoides associados ao capim *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no estado do Acre, Brasil. *Nematologia Brasileira*, 35(2): 217-222, 2001.

Silveira, S. G. P. & Curi, S. M. Dois novos hospedeiros de *Aphelenchoides besseyi* no Brasil. *Nematologia Brasileira*, XIV, 146-150, 1990.

Souza, F. H. D. Produção de sementes de gramíneas Tropicais. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos (SP), 43p. (Documento, 30), 2001.

Tenente, R. C. V. Tratamento físico contra nematoides de sementes. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. Circular Técnica, n° 21, 8 p. 2003.

Tzeng, C. Y., Lin, Y.Y. The intraspecific variation of *Aphelenchoides besseyi* populations in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin* 14: 67–75, 2005.

Vechiato, M. H. & Aparecido, C. C. Fungos em sementes de gramíneas forrageiras: restrição fitossanitária e métodos de detecção. Comunicado Técnico, Instituto Biológico, 89, 2008. Disponível em<
http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=89>

Wang F., Li D., Wang Z., Dong A., Liu L., Wang, B., Chen, Q., Liu, X. Transcriptomic analysis of the rice white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi* (Nematoda: Aphelenchoididae). *PLoS ONE* 9(3): e91591, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0091591

Zhou T., Gao C., Du L., Feng H., Wang L., Lan, Y., Sun, F., Wei, L., Fan, Y., Shen, W., Zhou, Y. Genetic analysis and QTL detection for resistance to white tip disease in rice. *PLoS ONE* 9(8): e106099, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0106099

Capítulo 1

Caracterizações morfológica e molecular de populações de *Aphelenchoides besseyi* associadas a sementes de gramíneas forrageiras

1. INTRODUÇÃO

A produção brasileira de sementes forrageiras tropicais teve impulso somente a partir de 1970, mas, em curto período de 30 anos, o Brasil se estabeleceu como maior produtor, consumidor e exportador mundial desse insumo. O mercado brasileiro de sementes de pastagens é dominado por gramíneas, especialmente do gênero *Brachiaria*, que corresponde a aproximadamente 85% desse mercado (Macedo, 2005).

A expansão de novas áreas de formação de pastagens, a necessidade de recuperação daquelas degradadas e as crescentes exportações brasileiras são fatores que sustentam uma alta demanda por sementes de gramíneas forrageiras. Aproximadamente 95% da produção de sementes forrageiras é destinada ao mercado interno e o restante exportado principalmente para países da América Central e Sul (Souza, 2001). Apesar do volume de exportação ainda ser pequeno, esse setor apresentou taxa de crescimento de 19% ao ano, durante os últimos 11 anos. Segundo dados do Ministério do Comércio Exterior, durante o período de 2000 a 2011 foram exportadas 97 mil toneladas de sementes forrageiras, com faturamento em torno de US\$ 476 milhões (Aliceweb, 2012).

Apesar de ser um mercado com alto potencial de expansão, principalmente para exportações, o sistema de produção de sementes de gramíneas forrageiras é constantemente ameaçado pela incidência de patógenos, que promovem redução da produção e qualidade, além de constituir grandes entraves às exportações brasileiras, devido às barreiras fitossanitárias (Marchi *et al.*, 2007).

Dentre os fitonematoides relatados em associação às sementes de gramíneas forrageiras destaca-se *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942, importante patógeno das culturas do arroz, morangueiro e muitas espécies ornamentais. Apesar de frequentemente associado a sementes de forrageiras (Marchi *et al.*, 2007; Favoreto *et al.*, 2011), não há evidência científica que confirmem sua patogenicidade nessas gramíneas. Ainda, a variabilidade morfométrica observada nesses espécimes, quando comparados as mensurações da descrição original de *A. besseyi*, tem gerado dúvidas quanto a real identidade dessas populações.

A presença de *A. besseyi* em sementes de gramíneas forrageiras tem implicações quarentenárias que limitam a sua comercialização para muitos dos países importadores desse insumo. Além disso, como várias outras espécies de *Aphelenchoides* sem importância econômica são relatadas em associação a sementes

de forrageiras, é imprescindível a identificação precisa de *A. besseyi* (Sharma *et al.*, 2001; Favoreto *et al.*, 2011), e, principalmente, a elucidação da correta identidade desses espécimes identificados até então como *A. besseyi*.

A identificação de rotina de fitonematoides se baseia em caracteres morfológicos e morfométricos, os quais dependem tanto de especialista treinado como da presença de espécimes com morfologia bem conservada, sem alterações, o que nem sempre ocorre (Oliveira *et al.*, 2011). Em adição, a sistemática instável em *Aphelenchoides* spp. e a presença de várias espécies descritas inadequadamente têm limitado o desenvolvimento de uma chave taxonômica adequada ao uso em laboratórios de análise fitossanitária/quarentenária (Hunt, 1993; Hockland, 2001; Hunt, 2008). Neste sentido, o uso de tecnologias baseadas no DNA representa um caminho para superar essas limitações.

Apesar do recente aumento de pesquisas buscando desvendar aspectos moleculares e biológicos de espécies de *Aphelenchoides* (Fu *et al.*, 2012; Hsieh *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014), poucos trabalhos têm se concentrado no desenvolvimento de diagnósticos moleculares baseados em DNA, para detecção de espécies de importância econômica dentro do gênero. Recentemente, Rybarczyk-Mydlowska *et al.* (2012) desenvolveram um protocolo de detecção molecular para quatro espécies de *Aphelenchoides* baseado na região SSU-ribossomal, incluindo *A. besseyi*, por meio da técnica de PCR em tempo real quantitativo (qPCR). Entretanto, como nos demais métodos de detecção, para a implantação na rotina laboratorial é necessária uma extensiva análise da variabilidade genética em diferentes populações da espécie alvo, além de avaliar a especificidade de detecção no maior número de espécies possível, evitando resultados falso-positivos.

Até o presente, nenhum trabalho de caracterização molecular de populações de *A. besseyi* foi realizado no Brasil. Há ainda pouca informação disponível nos bancos de dados (por exemplo, GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), o que limita a realização de análise *in silico* para seleção de potenciais marcadores moleculares específicos para o desenvolvimento de diagnósticos mais robustos para o uso em análises fitossanitárias. Deste modo, é imperativo a caracterização tanto morfológica quanto molecular das populações de *A. besseyi* associadas a sementes de forrageiras no Brasil. Estas caracterizações permitirão o desenvolvimento de protocolo diagnóstico molecular que auxiliará na identificação rápida e precisa de *A. besseyi*.

2. OBJETIVOS

Realizar as caracterizações morfológica, morfométrica e molecular de espécimes de *A. besseyi* associadas a sementes de forrageiras cultivadas no Brasil e comparar com espécimes de *A. besseyi* provenientes da Costa Rica, Espanha e Japão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Extração e multiplicação in vitro de populações de *A. besseyi*

Um total de 50 amostras de sementes de forrageiras (Anexo, Tabela 4) e seis amostras de sementes de arroz foram processadas segundo Coolen & D'Herde (1972) (Tabela 1). Foram selecionados entre cinco a 20 exemplares de *A. besseyi* de cada amostra com o auxílio de microscópio estereoscópico, seguindo-se a desinfestação em solução de ampicilina a 0,1%. Em seguida, os nematoides foram colocados em placas de petri com colônias de *Fusarium solani* com aproximadamente 10 dias de idade, crescidas em meio batata-dextrose-ágar (BDA) (Favoreto *et al.*, 2011). As placas foram incubadas em B.O.D. (demanda bioquímica de oxigênio) a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ no escuro, e após 15-20 dias os nematoides foram recuperados em funil de Baermann. Uma população de *A. besseyi*, obtida a partir de folhas de feijoeiro proveniente da Costa Rica, foi adicionada ao estudo. Neste caso, a extração dos nematoides foi feita por borbulhamento contínuo por 24h, seguindo a multiplicação em *F. solani* como descrito anteriormente.

As populações obtidas de sementes de arroz cultivado no Brasil, Espanha e Japão e feijoeiro (Costa Rica) foram utilizadas como populações de referência para *A. besseyi* em estudo comparativo com populações obtidas de sementes de forrageiras brasileiras (Tabela 1).

Tabela 1. Populações de nematoides da superfamília Aphelenchoidea (Hunt, 2008) usadas neste estudo.

Código	Hospedeiro	Origem/ Instituição	Localidade	Cultivado em <i>Fusarium solani</i>
DJ01	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. BRS Piatã	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Brasil	Sim
DJ02	<i>B. decumbens</i> cv. Basilisk	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Brasil	Sim
DJ03	<i>B. decumbens</i> cv. Basilisk	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Brasil	Sim
DJ04	<i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça	desconhecida	Brasil	Sim
DJ05	<i>Oryza sativa</i> cv. BRS7-Taim	EMBRAPA Clima Temperado (Dr. César Bauer Gomes)	RS - Brasil	Sim
DJ06	<i>O. sativa</i> cv. Hinohikari	Universidade deTóquio (Dr. Katsumi Togashi)	Japão	Sim
DJ07	<i>O. sativa</i> cv. Hinohikari	Universidade deTóquio (Dr. Katsumi Togashi)	Japão	Sim
DJ08	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Brasil	Sim
DJ10	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Brasil	Sim
DJ11	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Universidade da Costa Rica (Dr. Nestor Felipe Chaves-Barrantes)	Costa Rica	Sim
DJ12	<i>O. sativa</i> cv. Selecta	Universidade Federal de Viçosa (Dr. Moacil Alves de Souza)	Viçosa/MG	Sim
DJ13	Forrageira não identificada	-	Brasil	Sim
DJ14	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Brasil	Sim
DJ15	<i>O. sativa</i> cv. Primavera	EMBRAPA Arroz e Feijão (Drª Marta Cristina Corsi de Filippi)	GO- Brasil	Sim
DJ16	<i>B. brizantha</i>	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Brasil	Sim
DJ17	<i>B. decumbens</i>	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Brasil	Sim
DJ18	<i>O. sativa</i>	Instituto de Ciencias Agrarias, ICA-CSIC (Dr. Miguel Escuer)	Espanha	Não
S1	<i>B. brizantha</i> cv. BRS Piatã	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Brasil	Não
S2	<i>B. humidicola</i> cv. Tupi	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Brasil	Não
S3	<i>P. maximum</i> cv. Aruana I2-5	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Brasil	Não
S4, S5, S6 e S7	<i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Brasil	Não
S9 e S10	<i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Brasil	Não
S11 e S12	<i>B. ruziizensis</i>	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Brasil	Não
<i>A. ritzemabosi</i>	desconhecido	The Food Environment Research Agency (FERA) (Dr. Thomas Prior)	York, Reino Unido	Não
<i>A. fragariae</i>	<i>Woodwardia fimbriata</i>	Scottish Agricultural College (Idowu Rotifa)	Edimburgo, Reino Unido	Não

3.2. Caracterizações morfológica e morfométrica

A identificação das populações de *A. besseyi* foi realizada inicialmente com auxílio da chave politômica proposta pela *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO) com consultas a descrições das espécies morfológicamente semelhantes (OEPP/EPPO, 2004). Os códigos de identificação gerados pela chave foram comparados aos das espécies relacionadas. Nos casos em que a identificação das populações caracterizadas neste estudo se sobrepôs aos de algumas espécies listadas na chave, a descrição original foi consultada e os caracteres diagnósticos foram comparados aos das populações estudadas.

3.3. Preparação de nematoides para microscopia de luz

Nematoides obtidos pela multiplicação *in vitro* e extraídos diretamente de sementes de arroz foram mortos em banho-maria a 60 °C, por 4 min, e fixados por meio de solução de formalina (TAF) na proporção de 1:1. Após 48 h, os nematoides foram submetidos ao processo de infiltração em glicerina, segundo Seinhorst (1959). Lâminas permanentes de fêmeas e machos (quando presente) foram preparadas em glicerina e examinadas sob microscópio de luz equipado com câmara clara. Os seguintes caracteres foram mensurados: comprimento do corpo (L), cauda, estilete, diâmetro do corpo na região do ânus e na região mediana do corpo, distância da extremidade anterior até a vulva, distância da vulva até o ânus (VA), comprimento do saco pós-vulval (PVS), altura e largura dos lábios, altura e largura do bulbo mediano, e tamanho dos espículos. Com base nestas medidas foram calculados os seguintes índices: $V\%$ (expressa de forma proporcional a distância entre a extremidade anterior até a vulva em relação a L); c (razão entre L e comprimento da cauda); c' (razão entre o comprimento da cauda e o diâmetro do corpo na região do ânus) e a (razão entre o comprimento do corpo e o diâmetro máximo do corpo) (Siddiqi, 2000), além da razão PVS/VA . Em adição, análise morfológica foi realizada e contrastada com descrições de espécies da literatura pertinente e consulta a holótipos e/ou parátipos de *A. besseyi* e espécies relacionadas, disponível no acervo do *The Food Environment Research Agency* (FERA), York, Reino Unido.

3.4. Preparação de nematoides para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Espécimens de seis populações cultivadas *in vitro* foram preparados para a MEV, sendo que três populações foram obtidas de sementes de gramíneas forrageiras (DJ01, DJ02 e DJ03) e três de sementes de arroz (DJ5F, DJ06F e DJ07F). Estes foram transferidos ainda vivos, um a um, para frascos do tipo pesa filtro de 10 ml, e adicionada solução fixadora de glutaraldeído 3% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 mantida a 4 °C. Os indivíduos fixados foram transferidos para cápsulas “beem” de polietileno, adaptadas segundo metodologia descrita por Eisenback (1991). A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio 1% por 2 h à temperatura ambiente, seguida de desidratação em série de concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100 %). As amostras completamente desidratadas foram secas ao ponto crítico, utilizando-se CO₂ como fluido de transição. Após a secagem, as amostras foram armazenadas em recipiente hermeticamente fechado, contendo sílica gel. Os nematoides foram acomodados sobre *stubs* contendo fita adesiva de carbono e um fio de cabelo, como suporte para obter um ângulo de inclinação. Em seguida, foram cobertos com fina camada de ouro e examinados a microscópio eletrônico LEO 435 VP, a 20 kV, no Núcleo de Apoio à Pesquisa Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária, ESALQ/USP, Piracicaba (SP).

3.5. Caracterização molecular

Além das populações de *A. besseyi* obtidas como descrito anteriormente, outros *Aphelenchoides* spp. associados às sementes de gramíneas forrageiras foram isolados individualmente e utilizados na caracterização molecular descrita a seguir. Estes espécimes foram codificados como S1 até S12 (Tabela 1).

3.6. Extração do DNA genômico a partir de um único nematoide

Um único nematoide foi transferido para tubo de microcentrífuga de 0,2 ml contendo 18 µL de tampão para PCR 1X (Promega, Reino Unido) e adicionadas aproximadamente cinco microesferas de vidro de 1 mm de diâmetro (Thistle Scientific, Glasgow, Reino Unido) por tubo. Os microtubos foram acomodados em um disruptor de tecido Retsch M300, sob agitação por 30 seg a uma frequência de 30 Hz. Em seguida, foram adicionados 2 µl de Proteinase K (100 mg/ml) e os microtubos levados a um termociclador com a seguinte programação: incubação a 60°C por 60 min; 95°C

por 15 min e 15°C por 2min. O DNA extraído foi imediatamente utilizado na reação de PCR e/ou armazenado a -20 °C.

3.7. Amplificação e sequenciamento

Os fragmentos das regiões SSU (subunidade menor do RNA ribossomal), expansão D2-D3 da LSU (subunidade maior do RNA ribossomal) e COI (subunidade I da citocromo oxidase) foram obtidos por reações de PCR utilizando os primers universais nas combinações mostradas na Tabela 2. As reações de PCR para a amplificação dos genes LSU e COI foram preparadas em 15 µl de reação final que continham os reagentes nas seguintes concentrações: 1X do tampão para PCR High Fidelity (Invitrogen, Reino Unido), 2mM de MgSO₄ (Invitrogen, Reino Unido), 0,2 mM de cada dNTP (Promega, Reino Unido), 0,4 µM de cada primer (Tabela 2), 1U da polimerase *Taq Platinum High Fidelity* (Invitrogen, Reino Unido), 1 µl de DNA, e água estéril para completar o volume da reação. Reações sem DNA sempre foram incluídas como controle negativo. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 55°C (LSU) ou 51°C (COI) por 45 s, e extensão a 72°C por 2 min e extensão final à 72°C por 10 min.

A amplificação da região SSU foi obtida com a combinação dos primers universais 988F e 18SR_Burs (Tabela 2). As reações de PCR foram preparadas utilizando 25 µl de BIO-X-ACT short mix (Bioline, Reino Unido), 5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada primer, 1 µl de DNA e água estéril para completar o volume da reação para 50 µl. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 55°C por 90 s, extensão a 72 °C por 2 min, com extensão final a 72 °C por 5 min.

Tabela 2: Primers utilizados para amplificação da subunidade menor do RNA ribossomal (SSU), expansão D2-D3 da subunidade maior do RNA ribossomal (LSU) e subunidade I da citocromo oxidase (COI).

Região alvo	Primer	Sequência (5' » 3')	Referência
SSU	988F	CTCAAAGATTAAGCCATGC	Holterman <i>et al.</i> , 2009
	18SR-Burs	CTACGGCTACCTTGTTACGACTTTT	Ye <i>et al.</i> , 2007
	F22	TCCAAGGAAGGCAGCAGGC	Blaxter (http://www.nematodes.org/research/barcoding/sourhope/nemoprimer.shtml)
	R23	TCTCGCTCGTTATCGGAAT	Blaxter (http://www.nematodes.org/research/barcoding/sourhope/nemoprimer.shtml)
LSU	D2A	ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG	Ye <i>et al.</i> , 2007
	D3B	TCGGAAGGAACCAGCTACTA	Ye <i>et al.</i> , 2007
COI	COI-F1	CCTACTATGATTGGTGGTTTTGGTAATTG	Kanzaki & Futai 2002
	COI-R2	GTAGCAGCAGTAAAATAAGCACG	Kanzaki & Futai 2002

Após a amplificação, 5 µL do produto da reação foram utilizados na corrida eletroforética em tampão TBE 1X e gel de agarose a 1 %, corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Reino Unido). O tamanho dos fragmentos amplificados foi comparado com o marcador molecular de 1 kb (Promega, Reino Unido) e o gel foi fotodocumentado em um transiluminador de luz UV (UVITEC-Cambridge, Reino Unido). Os produtos de PCR foram purificados usando o kit EXOSAP-IT PCR Clean-up (GE Healthcare, Reino Unido) de acordo com as orientações do fabricante e enviados para o laboratório de sequenciamento genômico no The James Hutton Institute (Dundee, Reino Unido).

Para o sequenciamento da região SSU, além dos primers 988F e 18SR_Burs utilizados na amplificação por PCR, foram utilizados os primers internos SSU_F22 e SSU_R23 como ilustrado na Figura 1. As sequências resultantes foram editadas no programa *Sequencher*® 5.2.4, *sequence analysis software Gene Codes Corporation*, Ann Arbor, MI USA (<http://www.genecodes.com>) para obtenção do fragmento completo da região SSU.

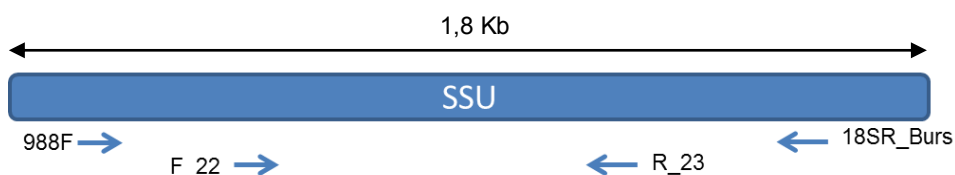


Figura 1. Representação esquemática das regiões de anelamento dos primers utilizados para a amplificação da região SSU completa.

3.8. Clonagem de produtos de PCR

Os produtos de PCR que geraram sequências de baixa qualidade foram clonados em vetor plasmidial. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Reino Unido). Em seguida, reações para a adenilação dos produtos de PCR foram preparadas como segue: 1X do tampão GoTaq, 2mM de MgCl₂, 0,4 mM dATP, 0,05 u/µl de GoTaq (Promega, Reino Unido) e 5,1 µl do produto de PCR, em 10 µl de reação final. As reações foram incubadas a 72 °C por 10 min no termociclador G-STORM GS-1. Os produtos de PCR adenilados foram inseridos no vetor pGEM®-T Easy (Promega, Reino Unido) por meio

de reações de ligação, seguindo as recomendações do fabricante, e incubadas *overnight* a 4°C. Estas reações de ligação foram utilizadas na transformação de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen, Reino Unido). Estas células bacterianas foram transformadas por eletroporação utilizando 1 µl de reação de ligação. As células transformadas foram resuspendidas em 1 ml de meio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) e incubação a 37°C por 1 h sob agitação (250 rpm). Foram plaqueados 100 µl da suspensão com os transformantes em placas de Petri com o meio seletivo ampicilina/IPTG/X-Gal e incubadas *overnight* a 37°C. Após a incubação, colônias brancas individuais foram selecionadas e resuspendidas em 30 µl de água esterilizada. Utilizaram-se 2 µl desta suspensão de células para a confirmação da presença do inserto por meio de reações de PCR com os primers M13 (Promega, Reino Unido). Após esta confirmação, 5 µl da mesma suspensão de células foram cultivados em placas com meio ampicilina/IPTG/X-Gal e incubadas *overnight* a 37°C. A colônia bacteriana foi transferida para um tubo tipo falcon com 5 mL de meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina seguido por incubação *overnight* a 37°C. Os plasmídeos foram extraídos das células bacterianas utilizando o kit GeneJET *plasmid miniprep* (ThermoScientific, Reino Unido) e enviados para o laboratório de sequenciamento genômico no The James Hutton Institute (Dundee, Reino Unido).

3.9. Análise filogenética

As sequências de DNA geradas foram editadas no programa Sequencher® 5.2.4 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA <http://www.genecodes.com>). Alinhamentos múltiplos das sequências geradas juntamente com as sequências disponíveis nos bancos de dados foram executados no programa MAFFT versão 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (Katoh & Standley, 2013). Regiões não informativas e *gaps* foram removidas usando o programa BMGE versão 1.0 (Criscuolo & Gribaldo, 2010). As árvores filogenéticas consensos foram inferidas por Inferência Bayesiana (IB) baseadas nos genes SSU, LSU e COI independentemente, sendo que a escolha dos melhores modelos de substituição de nucleotídeos foi determinada pelo MrModeltest v. 2.2 (Nylander, 2004). O critério de informação de Akaike (AIC) (Akaike, 1974) indicou que o modelo de substituição com melhor ajuste foi o GTR+I+G (Lanave *et al.*, 1984, Tavaré, 1986; Rodríguez *et al.*, 1990) para as sequências das três regiões genômicas. Esse modelo foi utilizado para estimar as topologias das árvores filogenéticas no programa MrBayes v. 3.2.3 disponível no CIPRES Science

Gateway v. 3.3 (Miller *et al.*, 2010). Cada análise foi executada utilizando simultaneamente duas corridas com quatro cadeias de 10.000.000 de gerações cada. As cadeias de Markov (MCMC) foram amostradas a intervalos de 1.000 gerações e ao final descartadas 25% das primeiras árvores geradas. As probabilidades posteriores foram determinadas com base em 50% das árvores consensos geradas. Confirmada a convergência das árvores, a árvore consenso para cada gene foi visualizada e editada no programa FigTree v. 1.3.1 (Rambaut, 2009).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização morfológica das populações de *Aphelenchoides besseyi* associadas a sementes de gramíneas forrageiras

O processamento das sementes de forrageiras, extração de *A. besseyi* seguida da multiplicação *in vitro* foram bem sucedidos em apenas 20% das amostras, resultando em 10 populações finais. A partir das sementes de arroz, cinco populações foram facilmente multiplicadas *in vitro* (DJ05, DJ06, DJ07, DJ12 e DJ15). As populações de *A. besseyi* cultivadas em *F. solani* caracterizaram-se pela ausência de machos, exceto a população DJ11, associada à ausência de espermatozoides na espermateca das fêmeas. Na população DJ11, os machos foram encontrados na proporção 1:1 (fêmeas: machos), com frequente visualização de espermatozoides na espermateca das fêmeas.

As populações de *A. besseyi* estudadas apresentaram ligeiras diferenças morfológicas (Tabela 3) e, por isso, foram separadas em dois grupos. Um grupo, formado pelas populações obtidas das sementes de forrageiras e arroz cultivadas em *F. solani* (DJ01, DJ02, DJ03, DJ04, DJ05F, DJ06F, DJ07F, DJ08, DJ10, DJ12F, DJ13, DJ14, DJ15F, DJ16 e DJ17), que arbitrariamente foi chamado de “Grupo-forrageira” e o outro, formado por DJ06S, DJ07S, DJ11, DJ12S, DJ15S e DJ18S, denominado de “Grupo-arroz”. As populações DJ06S, DJ07S, DJ12S, DJ15S e DJ18S representam espécimes extraídos diretamente das sementes de arroz.

As populações de *A. besseyi* estudadas apresentaram médias de *L* semelhantes, com presença de populações ligeiramente maiores no Grupo-forrageira (Tabela 3). Ainda, as médias do tamanho do estilete foram maiores nas populações do Grupo-forrageira (12,3-12,8 μm) quando comparadas aos do Grupo-arroz (10,9-11,7 μm). O tamanho relativo do saco pós-vulval (PVS/VA%) variou de 31,0 a 34,7 em Grupo-forrageira e de 22,0-35,6 no Grupo-arroz. Vale destacar que dentro deste

último, somente a população DJ11 apresentou PVS/VA superior a 33%, nas demais populações (DJ06S; DJ07S; DJ12S; DJ15S e DJ18S) as médias variaram de 22-30% (Anexo, Tabelas 1 e 2).

A posição da saída do poro excretor foi variável no Grupo-arroz, sendo anterior, próximo ou ligeiramente posterior ao anel nervoso (Figura 2B, F). Contudo, esta variação está associada à observação deste caractere tanto em fêmeas multiplicadas *in vitro* (DJ11), quanto em fêmeas que sofreram desidratação do corpo antes de serem fixadas (DJ18S). Já no Grupo-forrageira a saída do poro excretor foi observada usualmente próxima ao anel nervoso (Figura 3A). As populações do Grupo-arroz apresentaram corpo mais delgado (*a* entre 42,8 a 49,0) e cauda mais longa (*c'* entre 4,0 - 4,5) que as populações do Grupo-forrageira (*a* entre 30,5 - 38,4; *c'* entre 2,9 - 3,7) (Tabela 3). Ambas as populações apresentaram ovário curto, com as células dos oócitos organizadas em duas fileiras de células (Figura 2C-D e Figura 3B-C).

As fêmeas das populações DJ01, DJ02, DJ03, DJ05F, DJ06F e DJ07F estudadas por MEV não diferiram nos caracteres observados. Os espécimes foram caracterizados pela presença de quatro linhas no campo lateral, múcron com quatro processos terminais e região labial destacada e expandida (Figura 4). Todas estas populações foram incluídas no Grupo-forrageira, como mencionado acima. Apesar dos espécimes do Grupo-arroz não terem sido observados em MEV, os mesmos caracteres foram visualizados em microscópio de luz para estas populações, sendo que nenhuma diferença foi observada para os mesmos caracteres.

Machos foram encontrados somente nas populações do grupo-arroz. Estes apresentaram cauda curvada ventralmente quando mortos pelo calor, menores que as fêmeas (médias de *L* entre 538-619 μ m) e os espículos com médias de 14,1 a 18,3 μ m (Anexo, Tabela 3). Os espículos foram caracterizados por rostro (rostrum) arredondado, capítulo (capitulum) deprimido, côndilo (condylus) presente, pequeno e ligeiramente destacado do limbo dorsal e limbo dorsal arredondado (Figura 2G) e múcron com dois processos terminais.

A identificação das populações de ambos os grupos utilizando a chave politômica proposta pela EPPO (OEPP/EPPO, 2004) gerou os códigos apresentados na Tabela 4. As espécies relacionadas para as quais esses códigos de identificação se sobrepuseram também estão listadas nesta tabela. Apesar de outras espécies presentes na chave também terem apresentado sobreposição nos códigos de identificação, após a verificação das descrições originais, as dúvidas foram sanadas.

Tabela 3. Caracteres morfológicos e morfométricos das populações de *Aphelenchoides besseyi* e comparação com espécies morfológicamente similares.

Espécie	L (µm)	Estilete (µm)	PVS /VA%	a	c	c'	Cauda (µm)	Forma da cauda	Posição do poro excretor em relação ao anel nervoso	Ovário	Espículos
<i>A. besseyi</i> grupo forrageira ^b	603,0-868,5 ^a	12,3-12,8	31,0-34,7	30,5-38,4	15,5-19,2	2,9-3,7	36,1-50,7	Conoide, ligeiramente curvada ventralmente, múcron em forma de estrela, com 4 processos terminais	No nível do anel nervoso	Curto, com arranjo das células em duas fileiras	Machos ausentes
<i>A. besseyi</i> grupo arroz ^c	654,6-751,2 ^a	10,9-11,7	22,0-35,6	42,8-49,0	15,6-17,5	4,0-4,5	39,1-48,2	Conoide, múcron em forma de estrela com 4 processos terminais	Variável, podendo ser anterior, no nível ou ligeiramente posterior ao anel nervoso	Curto, com arranjo das células em duas fileiras	14,1-18,3 µm; cõndilo arredondado ligeiramente destacado do limbo dorsal
<i>A. besseyi</i> (Christie, 1942)	660-750	n/d	33	32-42	17,0-21,0	n/d ^d	34-37	Conoide,	Ligeiramente anterior ao anel nervoso	Curto, com arranjo das células em uma única fileira	N/d
<i>A. oryzae</i> (Yokoo, 1948) ^g	500-700	12	curto	38-48	n/d	n/d	n/d	Conoide, com 3 processos terminais	N/d	N/d	N/d
<i>A. besseyi</i> (Fortuner, 1970)	681-683	11,7-11,9	2,5-3,0 vezes o diâmetro do corpo	47,7-58,8	17,1-17,7	4,2 ^f	38,6-39,8	Conoide	Anterior ou no nível do anel nervoso	Curto, com arranjo das células de 2-4 fileiras	17-21 µm; cõndilo ausente
<i>A. fujianensis</i> (Zhuo et al., 2010)	803-941	12,5-14,0	32,0-44,4	31,5-36,3	15,1-18,2	3,5-4,4	46-58	Conoide, ligeiramente curvada ventralmente, múcron em forma de estrela com 3 processos terminais	Anterior ou no nível do anel nervoso	Longo, com arranjo das células em 1-2 fileiras	24-30 µm; cõndilo curto e arredondado
<i>A. goodeyi</i> (Siddiqi & Franklin, 1967)	460-610	11,5-12,5	3 vezes o diâmetro na altura da vulva (maior que 33%)	29,0-39,0	14,0-18,0	3,7 ^f	34	Conoide-convexa (ligeiramente curvada ventralmente)	Na altura da extremidade posterior do anel nervoso	Curto, com arranjo das células em várias fileiras	Machos ausentes

^aEstes valores morfométricos referem-se ao menor e maior valor médio tido nas populações de cada grupo. ^bGrupo formado pelas populações DJ01, DJ02, DJ03, DJ04, DJ05, DJ06, DJ07, DJ08, DJ10, DJ12, DJ13, DJ14, DJ15, DJ16 e DJ17 cultivados em *F. solani*. ^cGrupo formado pelas populações D06, DJ07, DJ12, DJ15 e DJ18 extraídos diretamente de sementes de arroz juntamente com DJ11 cultivado em *F. solani*. ^dInformação não disponível. ^eNúmero de linhas no campo lateral. ^fValor calculado a partir da ilustração presente na descrição original. ^gEsta espécie foi sinonimizada com *A. besseyi* por Allen (1952).

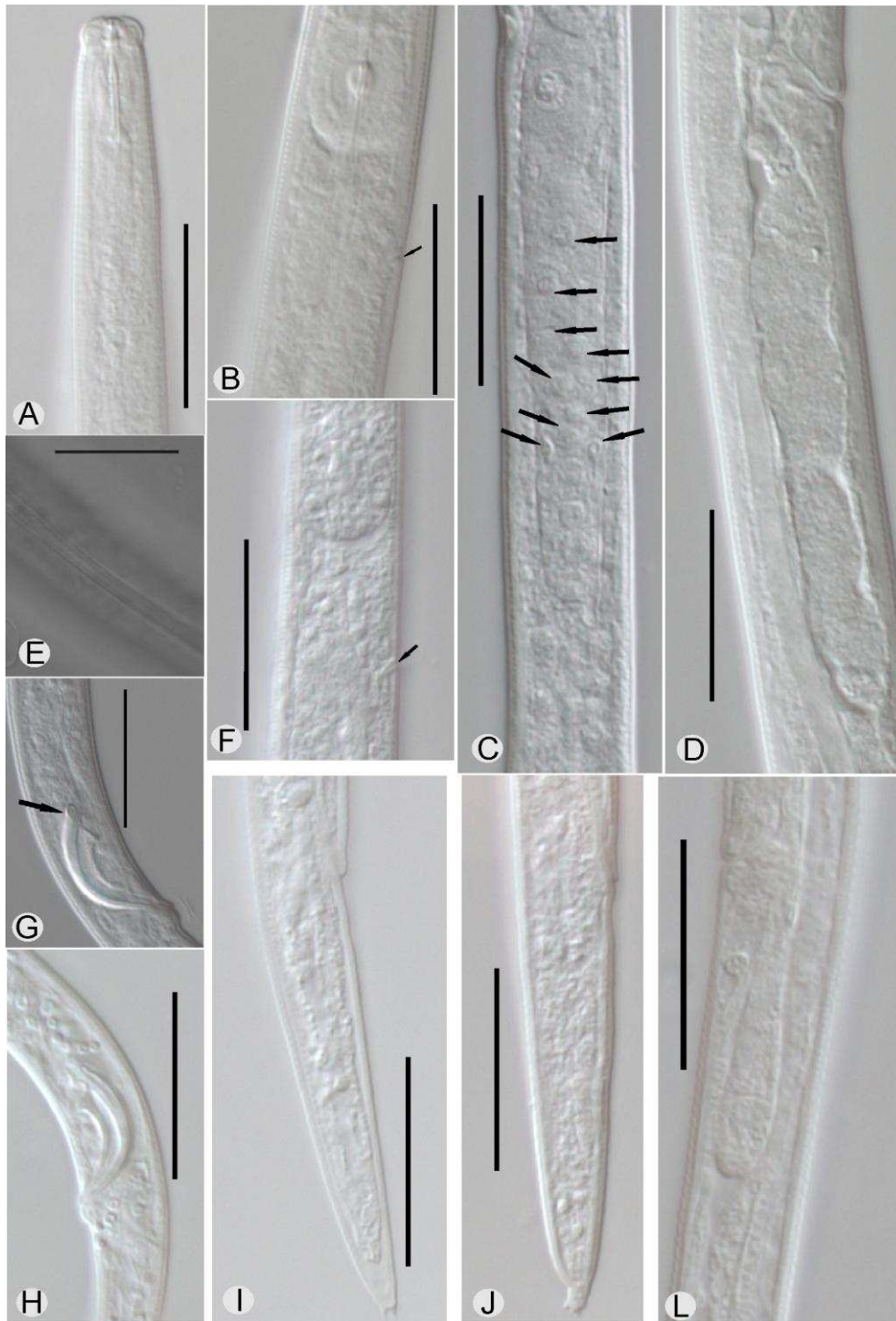


Figura 2. Morfologia de fêmeas e machos do Grupo-arroz. **Fêmeas:** **A.** Região anterior do corpo em espécime da população DJ18S. **B, F.** Posição da saída do Poro excretor (setas) **B.** próximo ao anel nervoso (DJ11) e **F.** ligeiramente posterior (DJ18S). **E.** Número de linhas no campo lateral (DJ11). **D, L.** Saco pós-vulval: **D.** DJ18S, **L.** espécime de *A. besseyi* da coleção nematológica mantida na FERA, York, Reino Unido. **I-J.** Forma da cauda em fêmeas: **I.** DJ18S e **J.** DJ11. **C.** Arranjo das células dos oócitos no ovário (setas) (DJ11). **Macho:** **G.** Morfologia dos espículos destacando a presença de côndilo ligeiramente destacado da lâmina dorsal (setas) em espécime da população DJ11 e **H.** a ausência de côndilo em macho de *A. besseyi* da coleção nematológica mantida na FERA, York, Reino Unido. (Escala = 20 µm).

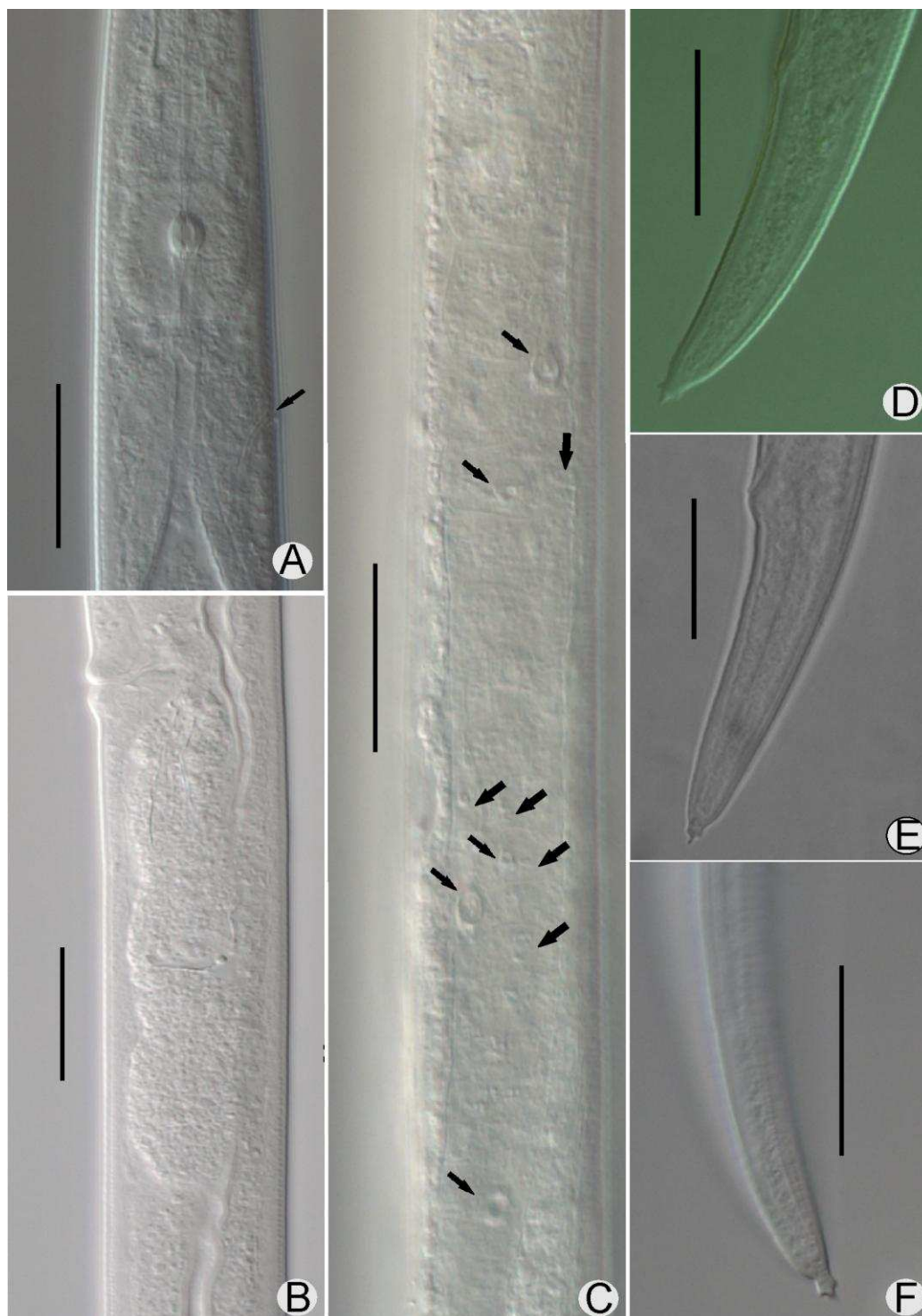


Figura 3. Morfologia de fêmeas de *Aphelenchoides besseyi* pertencentes ao Grupo-forrageira. **A.** Saída do poro excretor (seta) próximo ao anel nervoso em espécime da população DJ01. **B.** Saco pós-vulval (DJ01). **C.** Arranjo das células dos oócitos no ovário (setas) (DJ06F). **D-F.** Forma da cauda e término caudal em diferentes fêmeas: D. população DJ01, E. DJ02 e F. DJ06F. (Escala = 20 μ m).

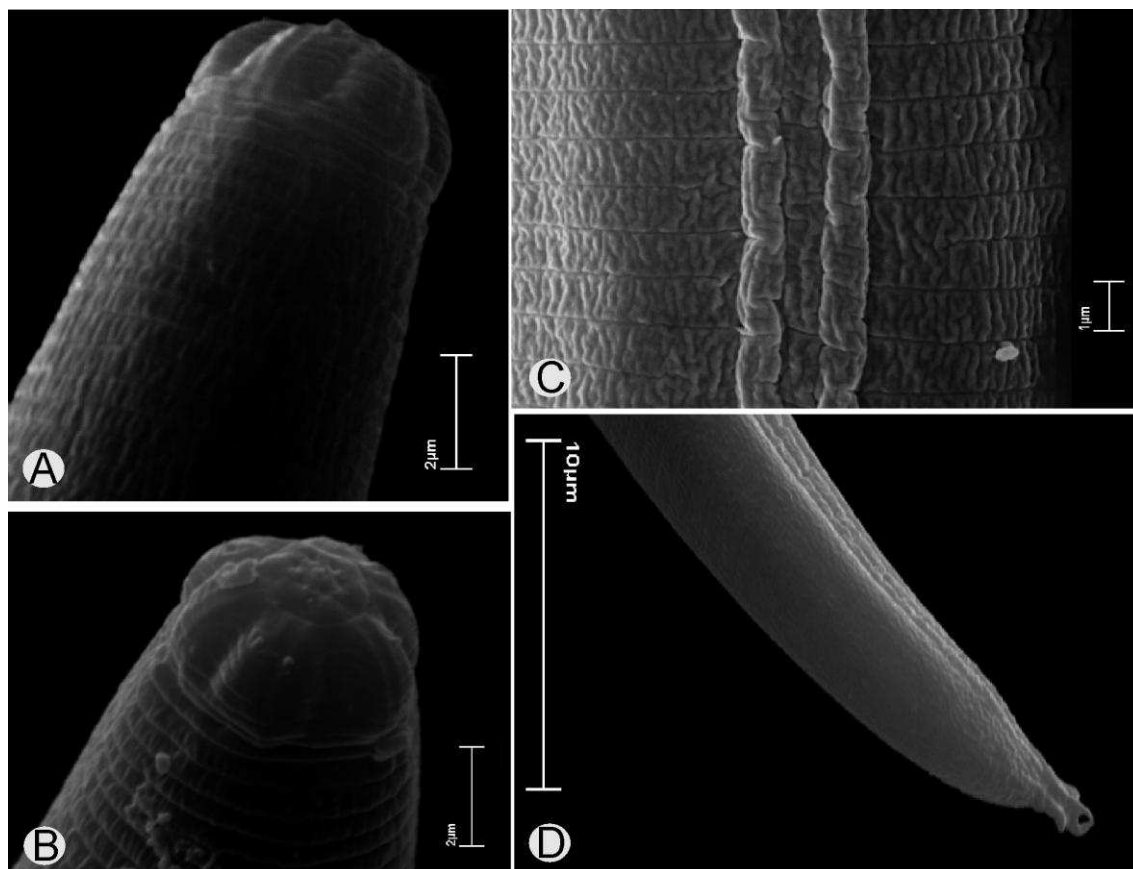


Figura 4. Morfologia de fêmeas de *Aphelenchoides besseyi* pertencentes ao Grupo-forrageira observadas em MEV **A-B**. Região labial, A. população DJ05F e B. DJ06F. **C**. Número de linhas no campo lateral (DJ01). **D** Forma do múcron e número de processos terminais visto em espécime da população DJ07F.

4.2. Análise das sequências e inferência filogenética

Foi possível obter os produtos de PCR para as três regiões genômicas, SSU, LSU e COI e o tamanho dos fragmentos amplificados pode ser visto na Figura 5. Para algumas amostras a amplificação da região SSU não ocorreu sob a temperatura de anelamento inicialmente testada. Para resolver este problema foi necessário determinar uma nova temperatura de anelamento (51°C) para a amplificação dessa região a partir destas amostras, por meio de teste de gradiente de temperatura de anelamento dos primers. Não foi possível amplificar a região SSU de algumas amostras (DJ11, S1.1, S1.2, S3.1, S4.1, S5.2, S6.1, S6.2, S7.2, S9.1, S9.2, S10.3, S11.1, S12.1 e S12.2), mesmo após várias tentativas com diferentes DNA-polimerases e diferentes combinações de primers universais e temperaturas de anelamento.

As sequências obtidas abrangeram aproximadamente toda a extensão SSU do rDNA com sequências variando de 1438 a 1727 pb, 619-808 pb para o domínio D2-D3

da região LSU do rDNA e 534-691 pb para gene mitocondrial COI. O alinhamento múltiplo das sequências após a remoção de gaps e colunas pouco informativas resultou em um conjunto de 1360, 388 e 590 caracteres para SSU, LSU e COI, respectivamente. As informações sobre as sequências geradas a partir de nematoides da superfamília Aphelenchoidea associados às sementes de forrageiras, estão na Tabela 5.

Tabela 4. Códigos de identificação de espécies de *Aphelenchoides* spp. gerados pela chave politômica proposta pela *European and Mediterranean Plant Protection Organization* - OEPP/EPPO (2004).

Espécie	Código ^a					
	A	B	C	D	E	F
<i>A. besseyi</i> ^b	1	1	1	1	1	1
<i>A. besseyi</i> grupo-forrageira ^c	1	1/2	1/3	1	1	2
<i>A. besseyi</i> grupo-arroz ^d	1	1/2	1/2	1	1	1/2/3
<i>A. fujianensis</i> ^e	1	2	1	1/3	1	1/2
<i>A. goodeyi</i> ^b	1	2	1	1	1	3

^aOs códigos de identificação referem-se A: forma do múcron: 1= estrela; 2=múcron com um único processo terminal; 3= bifurcada; 4= outros; 5= sem múcron; B: comprimento do saco pós-vulval: 1= menor ou igual a 33% da distância entre a vulva e o ânus; 2=maior que 33%; 3=saco pós-vulval ausente; C: forma da cauda: 1=conoide, forma de cone com ambos os lados da superfície da cauda afunilando em ângulos iguais até a ponta da cauda. O comprimento total não ultrapassa 5X o valor do diâmetro na região do ânus; 2=conoide-alongada cone alongado, com comprimento de 5X ou mais o valor do diâmetro na região do ânus; 3= conoide convexa dorsalmente, forma que em um primeiro momento parece curvada ventralmente. O lado dorsal da cauda é curvado de maneira convexa antes de se juntar à superfície ventral. A superfície ventral é usualmente côncava, mas dependendo do ponto de vista pode parecer reta. Pode ser de qualquer tamanho. 4= subcilindroide: ambos os lados da cauda são paralelos ao longo de quase todo o seu comprimento, e com ápice da cauda hemisférica ou sub-hemisférica. D: comprimento do estilete (µm): 1= 10-13; 2= menor que 10; 3= maior que 13. E: número de linhas no campo lateral: 1= 4 linhas; 2= 3 linhas; 3= 2 linhas; 4= desconhecido; F: posição relativa do poro excretor: 1= poro excretor anterior ou no nível com a extremidade anterior do anel nervoso. 2= poro excretor no nível com o anel nervoso; 3= poro excretor posterior ou oposto a extremidade posterior do anel nervoso. (OEPP/EPPO, 2004).

^bCódigo de identificação descrito em OEPP/EPPO (2004).

^cGrupo formado pelas populações DJ01, DJ02, DJ03, DJ04, DJ05F, DJ06F, DJ07F, DJ08, DJ10, DJ12F, DJ13, DJ14, DJ15F, DJ16 e DJ17 cultivados em *F. solani*.

^dGrupo formado pelas populações D06S, DJ07S, DJ12S, DJ15S e DJ18S extraídos diretamente de sementes de arroz juntamente com DJ11 cultivado em *F. solani*.

^eCódigo de identificação descrito por Zhuo *et al.* (2010).

As relações filogenéticas entre as populações estudadas foram inferidas pela análise bayesiana. Os alinhamentos das sequências SSU, LSU e COI geraram topologias de árvores semelhantes (Figuras 6-8) com a separação das populações de *A. besseyi* reunidas em dois grupos. A região SSU gerou uma clara separação dentro

de *A. besseyi*, com altos valores de probabilidade-posterior (Figura 6). Um dos *clusters* apresentou relacionamento irmão à *A. ritzemabosi* agrupando as populações obtidas diretamente de sementes de arroz (chamado aqui de grupo-arroz e codificados com a letra “S”, ex. DJ15S) juntamente com *A. besseyi* (JQ957878 e JQ957877) e *Aphelenchoides* sp. (GU337995 e EU084036). O segundo grupo foi formado por populações de *A. besseyi* cultivadas *in vitro* (oriundas de sementes de forrageiras e arroz) juntamente com *A. besseyi* 98 (AY508085), *A. fujianensis* e *Aphelenchoides* sp. (AB614246).

Pelas relações filogenéticas inferidas a partir da expansão D2-D3 do gene LSU (Figura 7) observou-se a separação entre os grupos arroz e forrageira, apesar de ser suportada por baixa probabilidade-posterior (54%). Todavia, a consistência do Grupo-forrageira é suportada por alta probabilidade-posterior confirmando que este forma um grupo filogeneticamente distinto do Grupo-arroz. Já a população DJ11 formou um terceiro *cluster* juntamente com uma população de *A. besseyi* (HQ540538). A relação filogenética entre o Grupo-forrageira e *A. fujianensis* baseada na região LSU não pôde ser verificada pela ausência destas sequências nos bancos de dados, apesar dos esforços em se obter exemplares ou DNA desta espécie.

Em contrapartida, a análise filogenética do gene mitocondrial *COI* gerou a separação das populações estudadas dentro de quatro clados bem suportados que foram nomeados como Grupo-forrageira I, Grupo-forrageira II, Grupo-arroz I e Grupo-arroz II (Figura 8). Assim, dentro do Grupo-forrageira I as populações DJ01, DJ02, DJ12F, DJ14, DJ05F, DJ03, DJ06F, DJ08, DJ15F, DJ13 e DJ16 posicionaram-se junto com *Aphelenchoides* sp. (GU367868) (ramo com 100% de probabilidade posterior) em relacionamento irmão à *A. fujianensis*. Dentro do Grupo-forrageira II as populações DJ04, DJ07F, DJ17, DJ10 agruparam-se à *A. besseyi* (EU325686; AY508072) (ramo com 82% probabilidade-posterior) e proximamente relacionados a outro ramo formado por *A. besseyi*. Já no Grupo-arroz I agruparam-se no mesmo ramo DJ06S, DJ07S, DJ12S, DJ15S, DJ18S e *A. besseyi* (ramo com 99% probabilidade-posterior) este proximamente relacionado à S1.1 e S12.2. E o Grupo-arroz II formado por DJ11 e *A. besseyi* (HQ540533) (probabilidade-posterior de 100%).

Tabela 5. Identidade das sequências SSU, LSU e COI obtidas de nematoides associados a sementes de gramíneas forrageiras comparadas as sequências disponíveis no GenBank.

SSU		LSU		COI		
Código	Cobertura/ Identidade %	Espécie relacionada	Cobertura/ Identidade %	Espécie relacionada	Cobertura/ Identidade %	Espécie relacionada
S1.1	-	-	91/99	<i>Aphelenchoides besseyi</i> (DQ328684)	100/88	<i>A. besseyi</i> (KJ739799)
S1.2	100/98	<i>Paraphelenchus</i> sp.(AY284642)	-	-	99/85	<i>Ektaphelenchus</i> sp. (JX979197)
S2.1	-	-	91/99	<i>A. besseyi</i> (DQ328684)	-	-
S3.1	-	-	-	-	-	-
S4.1	-	-	100/90	<i>Paraphelenchus acontioides</i> (HQ218322)	-	-
S5.2	-	-	-	-	99/86	<i>Bursaphelenchus abruptus</i> (AY508036)
S6.1	-	-	100/82	<i>Aphelenchoides</i> sp. (KF638651)	-	-
S6.2	-	-	-	-	100/87	<i>A. paradalianensis</i> (GU367865)
S7.2	-	-	100/99	<i>A. besseyi</i> 98 (AY508109)	99/85	<i>Aphelenchoides</i> sp. (GU367866)
S9.1	-	-	100/86	<i>A. varicaudatus</i> (HQ283353)	100/87	<i>Aphelenchoides</i> sp. (GU367859)
S9.2	-	-	100/99	<i>A. besseyi</i> 98 (AY508109)	-	-
S10.3	-	-	97/89	<i>A. varicaudatus</i> (HQ283353)	-	-
S11.1	-	-	95/99	<i>P. acontioides</i> (HQ218322)	99/83	<i>Schistonchus caprici</i> (GU190761)
S12.1	-	-	95/99	<i>A. besseyi</i> (DQ328684)	-	-
S12.2	-	-	-	-	97/88	<i>A. besseyi</i> (KJ739799)

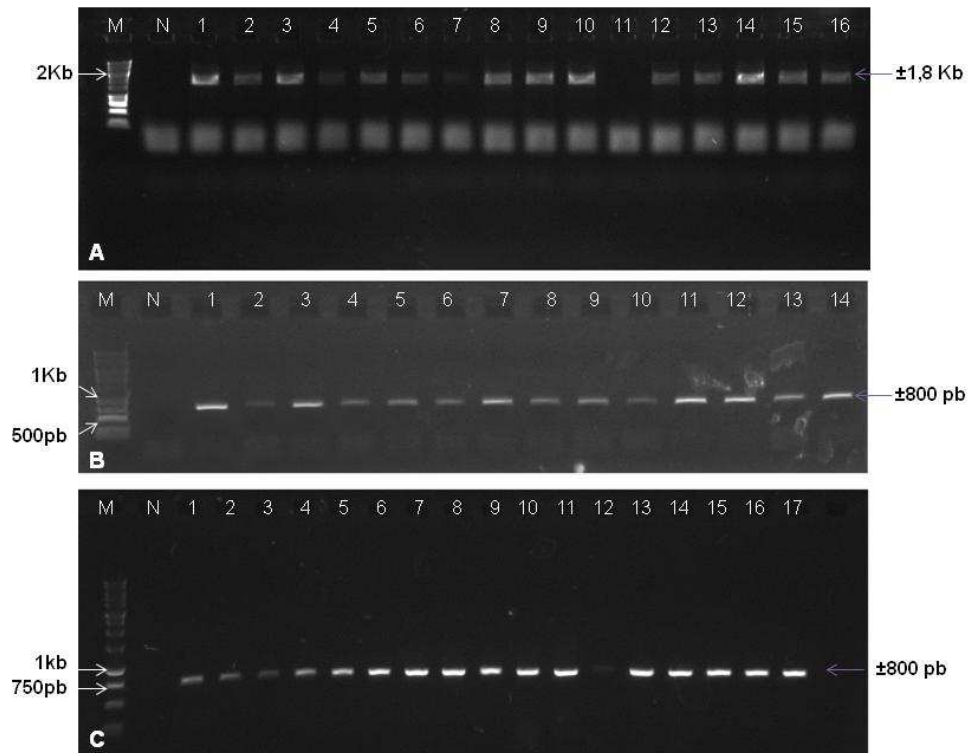


Figura 5. Visualização dos produtos de PCR amplificados a partir de DNA extraído de um único espécime de *Aphelenchoides besseyi*. **A.** Fragmentos correspondentes à região SSU. M: Marcador molecular; N: controle negativo; 1: DJ01; 2: DJ02; 3: DJ03; 4: DJ04; 5: DJ05F; 6: DJ06S; 7: DJ06F; 8: DJ07F; 9: DJ08; 10: DJ10; 11: DJ11 (amostra falhou em várias tentativas de amplificação desta região genômica); 12: DJ12F; 13: DJ13; 14: DJ14; 15: DJ15S; 16: DJ15F. **B.** Fragmentos correspondentes a expansão D2-D3 da região LSU do rDNA, referente as mesmas amostras descritas em A. **C.** Fragmentos correspondentes ao gene mitocondrial COI. M: Marcador molecular; N: controle negativo; 1: DJ01; 2: DJ02; 3: DJ03; 4: DJ04; 5: DJ05F; 6: DJ06S; 7: DJ07S; 8: DJ07F; 9: DJ08; 10: DJ10; 11: DJ11; 12: DJ12F; 13: DJ13; 14: DJ14; 15: DJ15S; 16: DJ16.



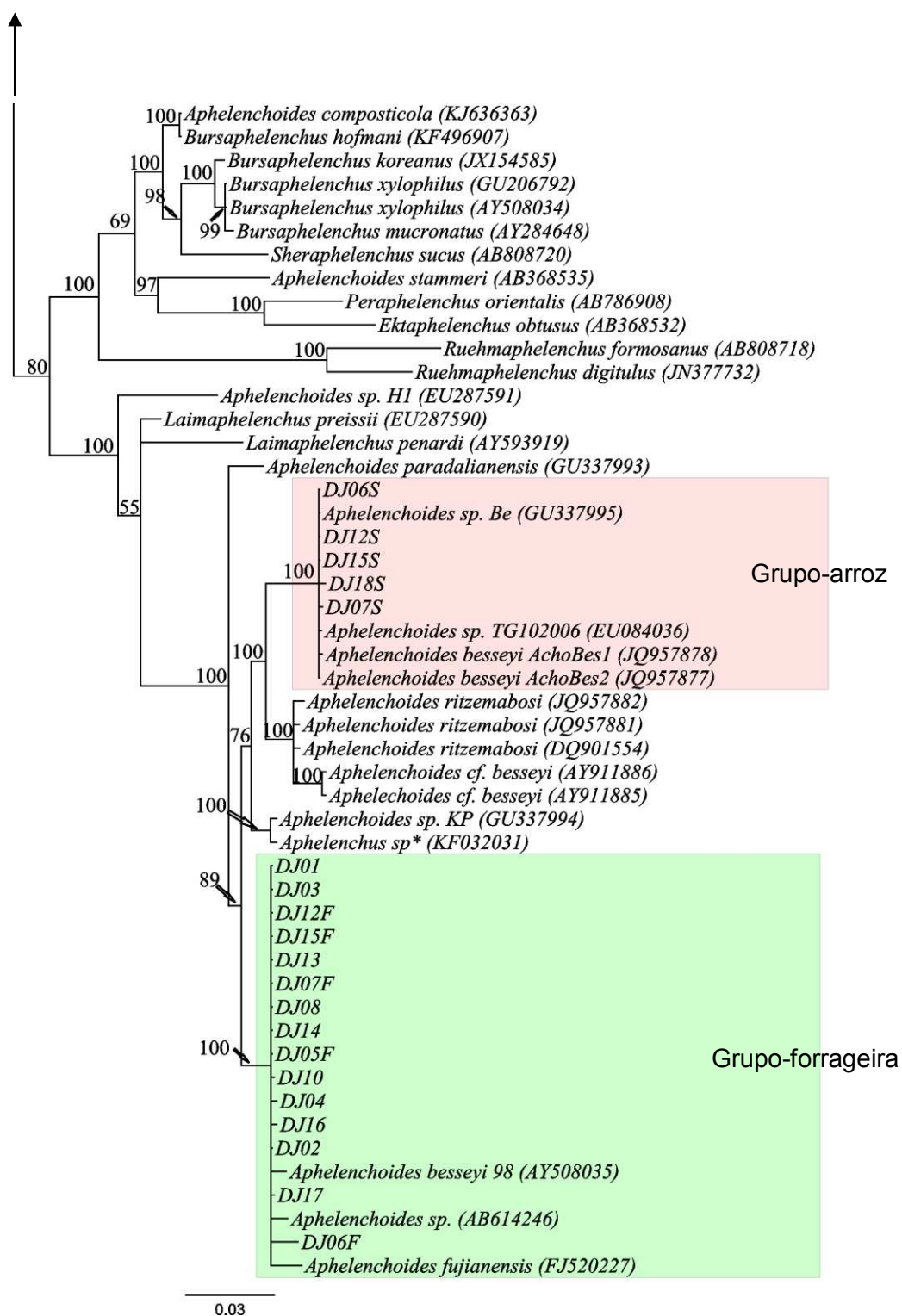


Figura 6. Árvore filogenética não enraizada obtida por Inferência Bayesiana usando sequências da região SSU. Valores de probabilidade posterior são indicados próximos aos ramos. A sequência marcada com (*) refere-se à *Aphelenchoides* sp., confirmação feita em Ye & Giblin-Davis (2013).

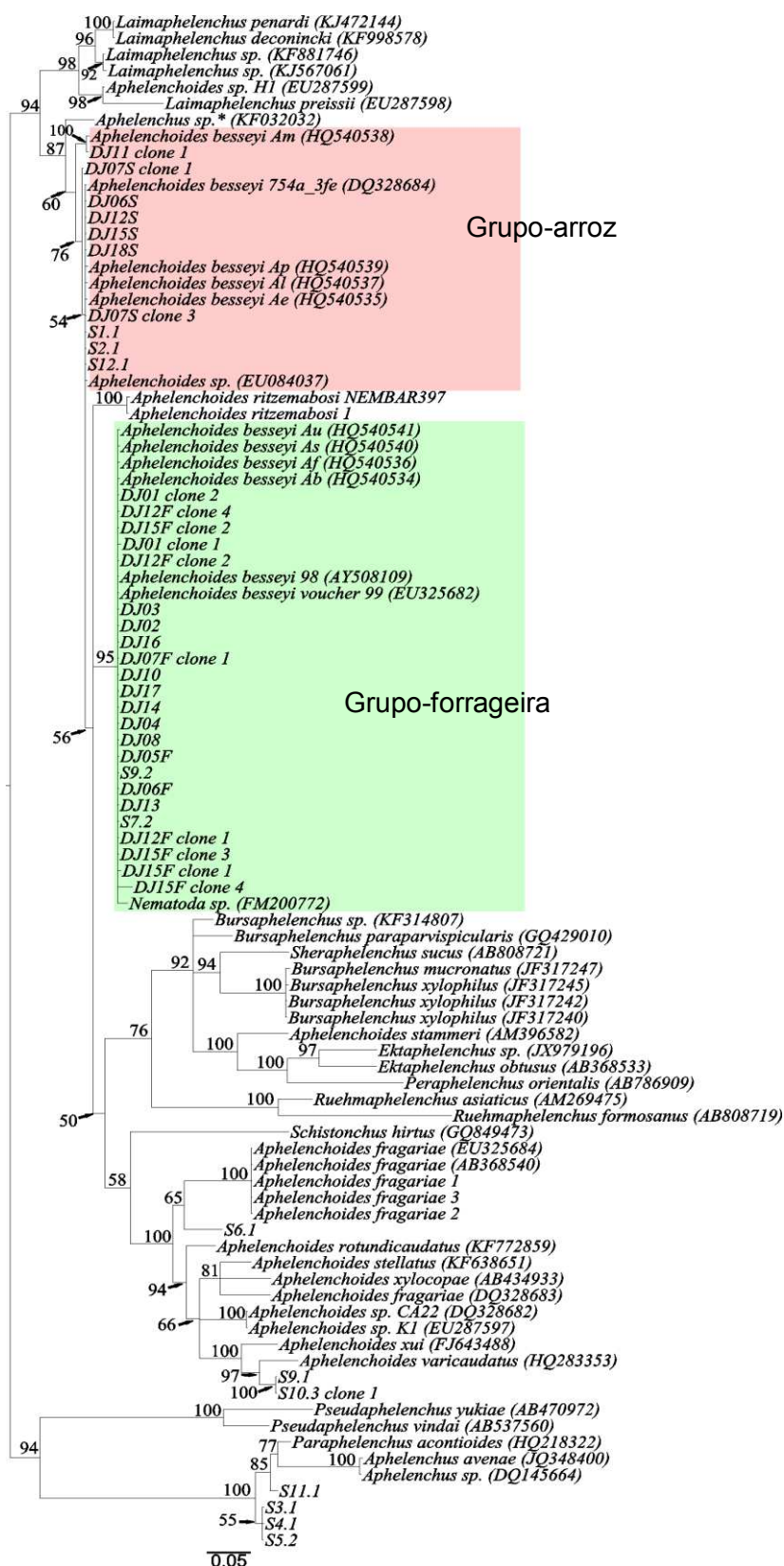


Figura 7. Árvore filogenética não enraizada obtida por Inferência Bayesiana usando sequências da região LSU. Valores de probabilidade posterior são indicados próximos aos ramos. A sequência marcada com (*) refere-se à *Aphelenchoides* sp., confirmação feita em Ye & Giblin-Davis (2013).

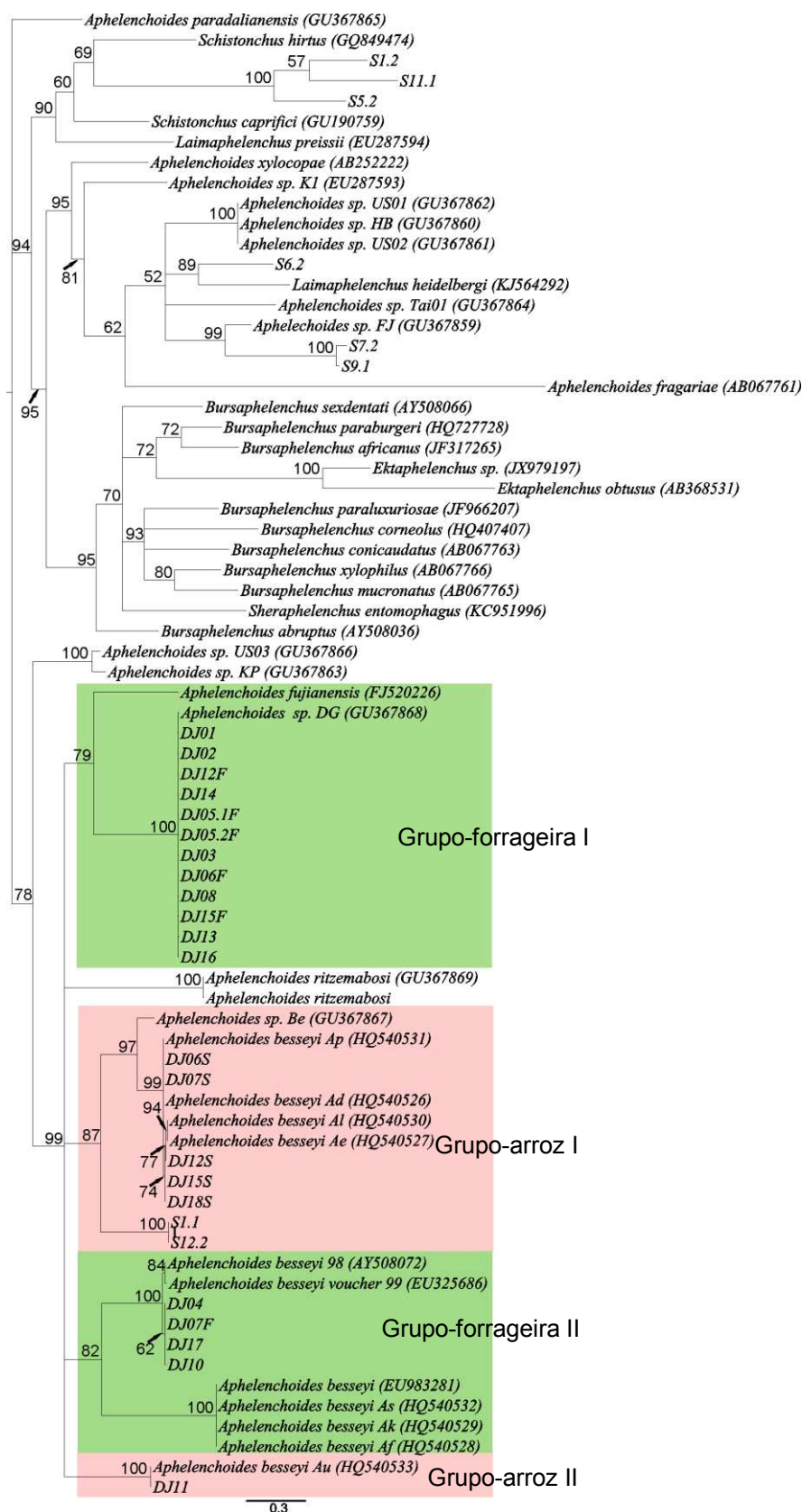


Figura 8. Árvore filogenética não enraizada obtida por Inferência Bayesiana usando sequências do gene COI. Valores de probabilidade posterior são indicados próximos aos ramos.

5. DISCUSSÃO

As populações de *A. besseyi* estudadas foram divididas em dois grupos baseados em ligeiras diferenças morfológicas e morfométricas. O uso da chave proposta pela EPPO mostrou que nem as populações do Grupo-arroz nem do Grupo-forrageira apresentaram códigos de identificação que se ajustassem completamente ao esperado para *A. besseyi* e, ainda, apresentaram uma clara sobreposição aos códigos para *A. fujianensis* Zhou *et al.* e *A. goodeyi* Siddiq & Franklin. Contudo, esta última pode ser diferenciada pela região labial ligeiramente destacada, mas não expandida como observado em *A. besseyi* e nos Grupos arroz e forrageira, além de apresentar *L* muito menor (460-610 µm) (Tabela 3). Em adição, o Grupo-forrageira foi mais semelhante a *A. fujianensis* diferindo somente em relação ao ovário (curto *versus* longo), já o Grupo-arroz foi mais semelhante a *A. besseyi*. *Aphelenchoides fujianensis* foi relatada ocorrer somente na ilha de Fuji, na China, na ocasião de sua descrição, onde foi encontrada associada árvore de *Pinus mossoniana* morta, representando assim uma nova ocorrência para o Brasil (Zhuo *et al.*, 2010).

Zhuo *et al.* (2010) diferenciaram *A. fujianensis* de *A. besseyi* por meio do tamanho e forma dos espículos (24-30 µm *versus* 18-21 µm; côndilo curto *versus* côndilo ausente), estilete, cauda das fêmeas e saco pós-vulval mais longos (Tabela 3). Hockland (2001), em uma extensiva revisão do gênero, avaliou o poder discriminativo dos caracteres diagnósticos usados para a identificação em *Aphelenchoides* spp. Segundo a autora, a forma do término caudal, comprimento do saco pós-vulval e número de linhas laterais possuem “alto poder discriminante”, sendo que a posição do poro excretor em relação ao anel nervoso, *L* e razão “*a*” possuem “poder discriminante mediano” dentro do grupo. Apesar disso, a variação nos caracteres diagnósticos observados nos Grupos arroz e forrageira e a sobreposição destes aos caracteres descritos para *A. besseyi* e *A. fujianensis* demonstra que estes caracteres não são suficientes para uma diagnose segura e outras ferramentas, por exemplo, uso do código de barras do DNA ou desenvolvimento de primers específicos, deve ser empregado.

Fatores ambientais, tais como temperatura, hospedeiro, disponibilidade de alimento e origem geográfica podem induzir extensivas variações intraespecíficas na morfologia e morfometria em nematoides (Tarte & Mai, 1976; Doucet *et al.* 2001; Fu *et al.*, 2012; Fonderie *et al.*, 2013). Progênie de *Pratylenchus penetrans*, obtidas a partir de uma única fêmea grávida, inoculadas em diferentes plantas hospedeiras tiveram ampla variação em caracteres qualitativos (forma do bulbo mediano, anelações na

cauda e formato dos nódulos do estilete) e quantitativos (comprimento do ovário, *L*, diâmetro do corpo, comprimento do esôfago, estilete e razões “*a*” e “*b*”) quando comparados à população original (Tarte & Mai, 1976). Ainda, populações de *A. fragariae* mantidas em planta hospedeira foram significativamente maiores e mais delgadas que aquelas populações cultivadas em cultura fúngica (Fu, *et al.*, 2012). Isso reforça a fragilidade das delimitações das fronteiras entre espécies baseadas em caracteres morfométricos.

Variabilidade no tamanho do saco pós-vulval foram observadas entre as populações dentro do Grupo-arroz. Nas populações DJ06S, DJ07S, DJ12S, DJ15S e DJ18S, o tamanho relativo do saco pós-vulval foi menor (22 – 30%) que o observado em DJ11. Esta variação pode ser atribuída às diferenças na idade reprodutiva das fêmeas e/ou a fonte de alimento, visto que DJ11 foi cultivada *in vitro* e as demais, extraídas de sementes de arroz e eventualmente os espécimes estavam em anidrobiose. Variabilidade morfométrica entre populações de *A. besseyi* cultivados em cultura fúngica e obtidos de sementes infectadas já foi relatada por Lal & Mathur (1990).

A ausência de machos nas populações do Grupo-forrageira é um indício que estas se reproduzam por partenogênese. Nas populações do Grupo-arroz, machos foram frequentemente encontrados com visualização de espermatozoides na espermateca das fêmeas, indicando que estas se reproduzam por anfimixia. A variação no modo de reprodução em *A. besseyi* foi relatada em vários trabalhos (Huang *et al.*, 1979; Gokte & Mathur, 1989; Gokte-Narkhedkar *et al.*, 2001), mas em *A. fujianensis* somente reprodução anfimítica é relatada (Zhou *et al.*, 2010). Os caracteres morfológicos e morfométricos dos machos do Grupo-arroz foram semelhantes aos descritos para *A. besseyi*, exceto pela presença de côndilo nos espículos (veja Figura 2G côndilo presente; H côndilo ausente). Na descrição original de *A. besseyi* a morfologia dos machos não é descrita. Contudo, em uma revisão desta espécie, os machos, foram descritos com cauda curvada quando mortos pelo calor, apresentaram forma do múcron variada, com a presença de 2-4 processos terminais e côndilo ausente (Fortuner, 1970).

Em contrapartida, as análises filogenéticas baseadas nas regiões SSU, LSU e COI suportam a distinção dos grupos forrageira e arroz (Figuras 6-8). As filogenias inferidas a partir das regiões SSU e COI mostraram que as populações do grupo-forrageira agruparam com *A. fujianensis* e isto, associado à similaridade morfológica, indica que as populações DJ01, DJ02, DJ03, DJ04, DJ05F, DJ06F, DJ07F, DJ08,

DJ10, DJ12F, DJ13, DJ14, DJ15F, DJ16 e DJ17 podem ser classificadas como *A. fujianensis*. Ainda, a separação de *A. besseyi* em dois grupos distintos, sendo um deles associado a *A. fujianensis* (Figuras 6 e 8), indica possíveis falhas na identificação dessas duas espécies. Fato que pode ser explicado pela recente descrição de *A. fujianensis*, pois as sequências de *A. besseyi* que formaram um consistente grupo juntamente à *A. fujianensis* foram depositadas no banco de dados antes da descrição desta nova espécie. Ainda, a similaridade morfológica entre *A. besseyi* (Grupo-arroz) e *A. fujianensis* é suportada pela análise filogenética em que estas são proximamente relacionadas, indicando que possivelmente essas espécies divergiram recentemente.

Apesar da separação entre os grupos forrageira e arroz ter sido suportada pelas três regiões genômicas, LSU e COI mostram-se mais divergente que SSU. Na análise filogenética da região LSU as populações do Grupo-arroz foram divididas em subgrupos, contudo estes foram distintos do grupo-forrageira, que se agruparam consistentemente em um ramo bem suportado (Figura 7).

Já a inferência filogenética de COI, segregou as populações estudadas em quatro subgrupos do mesmo clado, apesar de a relação entre estes não estar bem resolvida (ramos em politomia). Ainda, *A. fujianensis* posicionou-se proximamente relacionado ao Grupo-forrageira confirmando a estreita relação entre estes (Figura 8). A maior segregação das populações geradas pelo gene COI que em SSU e LSU, se explica pelas diferenças no modo e velocidade evolutiva do genoma nuclear e mitocondrial. O genoma mitocondrial evolui muito mais rapidamente com taxas de mutação até 10 vezes superior a do DNA nuclear em animais (Blouin *et al.*, 1998; Howe *et al.*, 2009; Molnar *et al.* 2011), explicando a separação dos grupos em diferentes ramos. A separação dos grupos (forrageira e arroz) em subclados pode estar relacionada a presença de diferentes “linhagens” associadas a diferentes hospedeiros ou origens geográficas. Isto é parcialmente suportado pela presença predominante de populações oriundas de arroz no Grupo-arroz I com a formação de um subgrupo formado por S1.1 e S12.2 de forrageiras (Figura 8).

A análise filogenética do gene SSU apresentou maior resolução no relacionamento dentro de *Aphelenchoides* spp., confirmando a presença de sinal filogenético suficiente para distinção entre espécies, já relatado em outros trabalhos (Van Megen *et al.*, 2009; Rybarczyk-Mydlowska *et al.*, 2012). *Aphelenchoides* spp. mostrou ser polifilético com *A. besseyi*, *A. ritzemabosi*, *A. fujianensis* e *A. paradalianensis* juntamente a *Laimaphelenchus* spp. residindo em um ramo

robustamente separado dos outros membros do gênero *Aphelenchoides*, semelhante ao observado por Rybarczyk-Mydlowska *et al.* (2012).

As análises filogenéticas mostraram que nenhuma das populações de forrageiras obtidas pela multiplicação *in vitro* era *A. besseyi*. Em contrapartida, o agrupamento de S1.1, S2.1 e S12.1 (Figura 7) e S12.2 (Figura 8) no Grupo-arroz comprovam que *A. besseyi* também é encontrado em associação às sementes de forrageiras. Aparentemente, *A. besseyi* ocorre em menor frequência que seu morfotipo *A. fujianensis*, mas um estudo mais abrangente ainda precisa ser realizado.

Ademais, cabe destacar o trabalho de Allen (1952), que realizou a sinonimização de *A. oryzae* à *A. besseyi*. *Aphelenchoides oryzae* foi descrita em 1948 infectando plantas de arroz com sintomas semelhante à doença conhecida hoje como ponta-branca, no Japão (Yokoo, 1948). Já *A. besseyi* foi descrita em 1942 nos Estados Unidos, causando o enfezamento do morangueiro. Allen (1952) analisou espécimes de *A. besseyi* e *A. oryzae* e atestou se tratar da mesma espécie, pois ambas apresentavam quatro linhas no campo lateral, saco pós-vulval curto, múcron estrelar e poro excretor anterior ao anel nervoso. A única variação observada pelo autor foi a presença de espécimes na mesma população com arranjo dos oócitos variáveis (arranjo em uma única linha ou em várias) em ambas as espécies. Esta variação não foi considerada suficiente para separá-las, prevalecendo o binômio *A. besseyi*. Contudo, baseado nas observações descritas neste trabalho, há uma forte evidência de que a sinonimização possa ter sido equivocada. A hipótese que emerge a partir dos resultados obtidos no presente estudo é que o grupo-arroz possa ser *A. oryzae* descrito por Yokoo (1948) e o grupo-forrageira seria *A. fujianensis*.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados comprovam que há a ocorrência de uma espécie geneticamente distinta de *A. besseyi* associada às sementes de gramíneas forrageiras no Brasil. E, muito provavelmente, esta tem sido identificada como *A. besseyi* em análises fitossanitárias no Brasil devido a sua similaridade morfológica. De acordo com as análises filogenéticas usando as regiões genômicas SSU e COI, esta outra espécie, referida aqui como Grupo-forrageira, trata-se de *A. fujianensis*. Deste modo, o desenvolvimento de diagnóstico molecular capaz de discriminar ambas as espécies é essencial.

Em adição, há necessidade de mais estudos buscando desvendar o potencial patogênico de *A. fujianensis*, que ainda é desconhecido pela ciência. E, finalmente, estudar a natureza da associação entre *A. besseyi* e forrageiras.

7. REFERÊNCIAS

Akaike, H. "A new look at the statistical model identification". IEEE Transactions on Automatic Control 19(6): 716–723, 1974.

Aliceweb - Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio. Secretaria de Comércio Exterior. Sistema Aliceweb. Disponível em: <http://alicesweb.desenvolvimento.gov.br>. Acesso em: 1 Junho de 2012.

Allen, M. W. Taxonomic status of the bud and leaf nematodes related to *Aphelenchoides fragariae* (Ritzema Bos, 1891). Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 19: 108-120, 1952.

Blouin, M.S., Yowell, C.A., Courtney, C.H., Dame, J.B., Substitution bias, rapid saturation and the use of mtDNA for nematode systematics. Molecular Biology Evolution 15, 1719–1727, 1998.

Christie, J.R. A description of *Aphelenchoides besseyi*, n. sp., the summer-dwarf nematode of strawberries, with comments on the identity of *Aphelenchoides subtenuis* (Cobb, 1926) and *Aphelenchoides hodsoni* Goodey, 1935. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 9(2): 82-84, 1942.

Coolen, W. A., D'Herde, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent: State Agricultural Research Center, 77 p, 1972.

Criscuolo, A., Gribaldo, S. BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. BioMed Central Evolutionary Biology 10(210): 1-21, 2010.

Doucet, M., Lax, P., Di Rienzo, J. A., Pinochet, J., Baujard, P. Temperature-induced morphometrical variability in an isolate of *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen, 1951(Nematoda: Tylenchida). Nematology, 3(1):1-8, 2001.

Eisenback, J. D. Preparation of nematodes for scanning electron microscopy. In: Nickle, W.R. (ed) Manual of Agricultural Nematology, New York, p. 87-96. 1991.

Favoreto, L., Santos, J. M., Calzavara, S. A., Lara, L. A. Estudo fitossanitário, multiplicação e taxonomia de nematoides encontrados em sementes de gramíneas forrageiras no Brasil. Nematologia Brasileira, 35(1-2): 20-35, 2011.

Feng, H., Shao, Y., Wei, L., Gao, C., Zhou, Y. The white-tip nematode, *Aphelenchoides besseyi*, exhibits an auxin-orientated behaviour affecting its migration and propagation. Nematology, 00:1-9, 2014. doi:10.1163/15685411-00002812

Fonderie, P., Steel, H., Moens T., Bert. W. Experimental induction of intraspecific morphometric variability in a single population of *Halicephalobus* cf. *gingivalis* may surpass total interspecific variability. Nematology, 15: 529–544, 2013. doi:10.1163/15685411-00002699

Fortuner, R. On the morphology of *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 and *A. siddiqii* n. sp. (Nematoda, Aphelenchoidea). Journal of Helminthology, VLIX(2): 141-152, 1970.

Fu, Z., Agudelo, P., Wells, C. E. Differential expression of a β -1,4-endoglucanase induced by diet change in the foliar nematode *Aphelenchoides fragariae*. Nematology, 102(8): 804-811, 2012. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-12-11-0336>

Gokte, N. & Mathur, V. K. Reproduction and development of *Aphelenchoides besseyi*. Phytoparasitica, 17(4): 263-267, 1989.

Gokte-Narkhedkar, N., Mathur, V. K., Ramasundaram, P., Sabesh, M. Reproductive variations in *Aphelenchoides besseyi* populations. Indian Journal of Nematology, 31(2): 115-119, 2001.

Hockland, S. A pragmatic approach to identifying *Aphelenchoides* species for plant health quarantine and pest management programmes. PhD Thesis. University of Reading. Reading, England, UK, 2001.

Holterman, M., Karssen, G., van den Elsen S., van Megen, H., Bakker, J., Helder, J. Small subunit rDNA-based phylogeny of the Tylenchida sheds light on relationships among some high-impact plant parasitic nematodes and the evolution of plant feeding. *Phytopathology* 99:227-235, 2009. doi:10.1094/PHYTO-99-3-0227

Howe, D. K., Baer, C. F., Denver, D. R. High rate of large deletions in *Caenorhabditis briggsae* mitochondrial genome mutation processes. *Genome Biology Evolution*, 2:29–38, 2009. doi:10.1093/gbe/evp055

Hsieh, S-H., Lin, C-J., Chen, P. Sexual compatibility among different host-originated isolates of *Aphelenchoides besseyi* and the inheritance of the parasitism. *PLoS ONE* 7(7): e40886, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0040886

Huang, C. S., Huang, S. P., Chiang, Y. C. Mode of reproduction and sex ratio of rice white-tip nematode, *Aphelenchoides besseyi*. *Nematologica*, 25: 255-260, 1979.

Hunt, D. J. Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: their systematic and bionomics. CAB International, Wallingford, UK, 1993.

Hunt, D. J. A checklist of the Aphelenchoidea (Nematoda: Tylenchina). *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, 10(2): 99-135, 2008.

Kanzaki, N., Futai, K., A PCR primer set for determination of phylogenetic relationships of *Bursaphelenchus* species within the xylophilus group. *Nematology* 4: 35–41, 2002.

Katoh, K. & Standley, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology Evolution* 30(4): 772–780, 2013. doi:10.1093/molbev/mst010

Lal, R. A. & Mathur, V. K. Host range and morphological studies on four isolates of *Aphelenchoides besseyi* Christie. *Indian Journal of Nematology*, 20 (2): 177-183, 1990.

Lanave, C., Preparata, G., Saccone, C., Serio, G. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *Journal of Molecular Evolution*, 20: 86-93, 1984.

Macedo, M. C. M. Pastagem no ecossistema cerrados: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: Anais da 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Goiabita: SBZ,. p.56-84, 2005.

Marchi, C. E., Fernandes, C. D., Borges, C. T., Santos, J.M., Jerba, V.F., Trentin, R.A., Guimarães, L.R.A. Nematofauna fitopatológica de sementes comerciais de forrageiras tropicais. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 42 (5): 655-660, 2007.

Miller M.A., Pfeiffer W., Schwartz T. "Creating the CIPRES Science Gateway for 14 inference of large phylogenetic trees. In: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, LA, pp. 1-8, 2010.

Molnar, R. I., Bartelmes, G., Dinkelacker, I., Witte, H., Sommer, R. J. 2011. Mutation rates and intraspecific divergence of the mitochondrial genome of *Pristionchus pacificus*. Molecular Biology Evolution, 28(8):2317–2326, 2011. doi:10.1093/molbev/msr057

Nylander J. A. A. MrModeltest v. 2.2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden, 2004.

OEPP/EPPO. EPPO Standards PM 7/39(1): Diagnostic protocols for regulated pests: *Aphelenchoides besseyi*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 34: 155 –157, 2004.

Oliveira, C. M. G, Monteiro, A. R. & Blok, V. C. Morphological and molecular diagnostics for plant-parasitic nematodes: working together to get the identification done. Tropical Plant Pathology, 36(2): 65-73, 2011.

Rambaut, A. FigTree v 1.3.1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>, 2009.

Rodríguez, F., Oliver, J., Marín, A; Medina, J. The general stochastic model of nucleotide substitution. Journal of Theoretical Biology, 142: 485-501, 1990.

Rybarczyk-Mydlowska, K., Mooyman, P., Van Megen, H., Van Den Elsen, S., Vervoort, M., Veenhuizen, P., Van doorn, J., Dees, R., Karssen, G., Bakker, J. & Helder, J. Small subunit ribosomal DNA-based phylogenetic analysis of foliar nematodes (*Aphelenchoides* spp.) and their quantitative detection in complex DNA backgrounds.

Phytopathology, 102(12): 1153-1160, 2012. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-05-12-0114-R>

Seinhorst, J. W. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica* 4: 67-69, 1959.

Sharma, R. D., Cavalcante, M. J. B. & Valentim, J. F. Nematoides associados ao capim *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no estado do Acre, Brasil. *Nematologia Brasileira*, 35(2): 217-222, 2001.

Siddiqi, M. R. Morphological characters and taxonomic methods. In: *Tylenchida Parasites of Plants and Insects*. 2nd Ed. CAB International, 37-85, 2000.

Siddiqi, M.R., Franklin, M. T. *Aphelenchoides goodeyi* n. sp. (Nematoda: Aphelenchoidea), a mycophagous nematode from South India. *Nematologica*, 13: 125-130, 1967.

Souza, F. H. D. Produção de sementes de gramíneas Tropicais. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos (SP), 43p. (Documento, 30), 2001.

Tarte, R., Mai, W. F. Morphological variation in *Pratylenchus penetrans*. *Journal of Nematology*, 8(3): 185-195, 1976.

Tavare, S. Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences. *Lectures Mathematics Life Sciences*, 17: 57-86, 1986.

Van Megen, H., Van Den Elsen, S., Holterman, M., Karssen, G., Mooyman, P., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J., and Helder, J. A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology* 11:927-950, 2009.

Wang F., Li D., Wang Z., Dong A., Liu L., Wang, B., Chen, Q., Liu, X. Transcriptomic analysis of the rice white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi* (Nematoda: Aphelenchoididae). *PLoS ONE* 9(3): e91591, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0091591

Ye, W., Giblin-Davis R.M., Braasch H., Morris K., Thomas W.K. Phylogenetic relationships among *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae)

inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(3):1185-1197, 2007. doi: 10.1016/j.ympev.2007.02.0

Yokoo, T. *Aphelenchoides oryzae* Yokoo n. sp., a nematode parasitic to rice plant. *Annuaire of the Phytopathology Society of Japan*, 13: 40-43, 1948.

Zhou T., Gao C., Du L., Feng H., Wang L., Lan, Y., Sun, F., Wei, L., Fan, Y., Shen, W., Zhou, Y. Genetic analysis and QTL detection for resistance to white tip disease in rice. *PLoS ONE* 9(8): e106099, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0106099

Zhuo, K., Cui, R., Ye, W., Luo, M., Wang, H., Hu, X., Liao, J. Morphological and molecular characterization of *Aphelenchoides fujianensis* n. sp. (Nematoda: Aphelenchoididae) from *Pinus massoniana* in China. *Zootaxa*, 39–52, 2010.

CAPÍTULO 2

Diagnóstico de *Aphelenchoides besseyi* e *A. fujianensis* baseado em PCR quantitativo (qPCR) e estudo da variabilidade intraindividual em *A. besseyi*

1. INTRODUÇÃO

A identificação de fitonematoides em análise fitossanitária é uma tarefa difícil por se basear em caracteres morfológicos e morfométricos, que dependem tanto de um especialista treinado como da presença de espécimes com morfologia bem conservada, o que nem sempre ocorre (Oliveira *et al.*, 2011). O crescente aumento do movimento de material vegetal entre os países e consequente risco de introduções de novos patógenos têm aumentado a demanda por métodos de detecção que sejam rápidos e acurados.

A frequente associação de *Aphelenchoides besseyi* a sementes de gramíneas forrageiras tem restringido as exportações brasileiras por esta espécie ser listada como praga quarentenária em vários países importadores desse insumo. Em adição, várias outras espécies de *Aphelenchoides* também são encontradas nessas sementes, sendo que a maioria delas não é fitoparásita (Sharma *et al.*, 2001; Favoreto *et al.*, 2011). A alta similaridade morfológica entre essas espécies dificulta a identificação segura de *A. besseyi*, que é feita com base em seus caracteres morfológicos. Como fator complicador, os espécimes frequentemente encontrados nas amostras para análise estão em anidrobiose, que resulta na alteração normal da morfologia destes nematoides, limitando a realização de diagnose segura. Neste cenário tem crescido a utilização dos métodos moleculares baseados em DNA que, além de serem mais sensíveis, permitem a detecção a partir de qualquer estágio de vida do nematoide (ovo, juvenis ou adultos), inclusive espécimes em anidrobiose (Castagnone-Severo *et al.*, 2011).

As regiões do DNA ribossomal nuclear (rDNA) tem sido empregadas com sucesso em diagnósticos para detecção de diferentes espécies de fitonematoides, pelo fato de serem facilmente amplificadas e, em geral, possuírem variabilidade genética suficiente para a discriminação entre as espécies (Castagnone-Severo *et al.*, 2011, Rybarczyk-Mydlowska *et al.*, 2012). O rDNA está presente no genoma de nematoides em múltiplas cópias de suas subunidades SSU, LSU e 5.8S, estas subunidades são separadas pelas regiões intergênicas ITS-1 e ITS-2 (Castagnone-Severo *et al.*, 2011). Genes organizados em múltiplas cópias no genoma, como as subunidades do rDNA, apresentam evidências de evoluírem sob o fenômeno conhecido como evolução concertada (*concerted evolution*) (Naidoo *et al.*, 2013). Este processo de evolução concertada impede que genes individuais dentro de um agrupamento de genes acumulem mutações, levando a homogeneização entre as múltiplas cópias (Naidoo *et al.*, 2013).

Contudo, variabilidade intraindividual nos espaçadores intergênicos (ITS) já foi comprovada para vários eucariotos incluindo, espécies de fitonematoides (Hugall *et al.* 1999; Draisma *et al.*, 2012; Naidoo *et al.*, 2013). Já a variabilidade intraespecífica entre as cópias dos cítrons ribossomais é rara, mas tem sido observado em alguns metazoários (Carranza *et al.* 1996; McTaggart & Crease 2009). Recentemente, foi feito o primeiro relato de variabilidade intraindividual ocorrendo na região SSU de uma espécie de fitonematoide. Nyaku *et al.* (2013) identificaram a presença de dois variantes distintos na região SSU em *Rotylenchulus reniformis*. A ocorrência de variabilidade intraindividual entre as cópias dos cítrons ribossomais deve ser investigada em outras espécies de fitonematoides como *A. besseyi*. Especialmente, por estas regiões do genoma constituírem os marcadores mais frequentemente utilizadas para o desenvolvimento de diagnósticos para detecção de fitonematoides.

A presença de *A. fujianensis* juntamente à *A. besseyi* em sementes de gramíneas forrageiras representa um sério problema, dada a impossibilidade de segura discriminação dessas espécies com base somente na morfologia, como foi discutido no capítulo 1. *A. besseyi* é listada como praga quarentenária em muitos países importadores das sementes brasileiras e possivelmente *A. fujianensis* tem sido identificado erroneamente como *A. besseyi*. A caracterização molecular destas duas espécies (Capítulo 1) direcionará o desenvolvimento de diagnóstico molecular que auxilie na discriminação destas duas espécies em análises fitossanitárias.

PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR) merece destaque pela sua alta sensibilidade ao permitir a detecção e quantificação da molécula alvo, mesmo quando presente na amostra em baixas concentrações. Muitos estudos revelam o potencial desta técnica para a detecção de patógenos (Oliveira *et al.*, 2011, Yan *et al.*, 2012; Luchi *et al.*, 2013). Nos últimos anos, vários diagnósticos foram propostos para a detecção de fitonematoides empregando qPCR, por exemplo: *Pratylenchus thornei* (Yan *et al.*, 2012), *Globodera* spp. (Nakhla *et al.* 2010), *Bursaphelenchus xilophilus* (Ye & Giblin-Davis, 2013), *Rotylenchulus reniformis* (Sayler *et al.*, 2012), *Aphelenchoides* spp. (Rybarczyk-Mydlowska *et al.*, 2012), *Xiphinema* spp. (Ghelder *et al.* 2014).

O uso de sondas moleculares tem sido empregado para aumentar a especificidade em ensaios de PCR em tempo real para detecção de patógenos (Ye & Giblin-Davis, 2013; Ghelder *et al.* 2014). Sondas do tipo Taqman (sondas hidrolíticas) são as mais frequentemente utilizadas. Estas sondas são constituídas por um oligonucleotídeo linear com um corante fluorogênico (repórter) ligado a sua extremidade 5' e uma molécula supressora (*quencher*) na extremidade 3'. Após o anelamento da sonda na região complementar do DNA alvo, esta é degradada pela

Taq polimerase durante a fase de extensão, liberando o corante repórter, que passa a emitir um sinal de fluorescência (Yao *et al.*, 2006). Desta forma, o sinal de fluorescência somente será emitido na presença do DNA alvo.

2. OBJETIVOS

- a) Desenvolvimento de protocolos, utilizando qPCR, para diagnóstico de espécimes de *A. besseyi* e *A. fujianensis*.
- b) Estudo da variabilidade intraindividual na expansão D2-D3 da região LSU em *A. besseyi*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenvolvimento de diagnóstico para detecção

3.1.1. Seleção da região alvo e desenho de primers e sondas Taqman

Alinhamentos múltiplos da subunidade menor do RNA ribossomal (SSU), expansão D2-D3 da subunidade maior do RNA ribossomal (LSU) e subunidade I da citocromo oxidase (COI) das populações de *A. besseyi* (Grupo-arroz) e *A. fujianensis* (Grupo-forrageira) (Capítulo 1) foram analisados para a seleção do marcador alvo para desenho de conjuntos de primers/sonda para detecção das duas espécies. O critério usado foi a maior porcentagem de sítios variáveis associados ao maior número de sequências de espécies relacionadas depositadas nos bancos de dados. Com base nesse critério, foi selecionada a região LSU. Após a escolha da região alvo, os conjuntos de primers/sonda para detecção de cada espécie foram desenhados, sintetizados e validados pela PrimerDesign (Southampton, Reino Unido). As sequências dos primers e sondas são mostradas na Tabela 1, e o esquema mostrando os sítios de anelamento está representado na Figura 1.

3.1.2. Preparação dos plasmídeos para geração de curva padrão

Produtos de PCR da expansão D2-D3 do gene LSU de *A. besseyi* e *A. fujianensis* (obtidos como descrito no capítulo 1) foram purificados utilizando o kit

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Reino Unido). Em seguida, foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega, Reino Unido), segundo as instruções do fabricante e células eletrocompetentes de *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen, Reino Unido) foram transformadas. Os transformantes foram obtidos pela seleção de colônias brancas e a presença do inserto confirmada por reação de PCR utilizando os primers M13 direto e reverso (Promega, Reino Unido). Seguiu-se a extração do DNA plasmidial utilizando o kit GeneJET plasmid miniprep (ThermoScientific, Reino Unido) conforme as instruções do fabricante.

Após sequenciamento e confirmação da identidade do inserto, a concentração do DNA plasmidial foi mensurada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Labtech Internacional Ltd., Reino Unido). Os valores das concentrações foram utilizados para estimar o número de cópias de plasmídeos presentes na solução estoque dos clones selecionados (Daniell *et al.*, 2012). Estes cálculos foram realizados com auxílio da ferramenta disponibilizada pela ThermoScientific (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/copynumber/>). Após o cálculo do número de cópias do plasmídeo, seguiu-se a linearização do DNA com a enzima *NotI* segundo as instruções do fabricante (Promega, Reino Unido). A partir do DNA linearizado, diluições seriadas de 1×10^8 a 1×10^1 cópias/μl foram preparadas e armazenadas a -20 °C. As diluições seriadas do DNA plasmidial de cada espécie alvo foi inicialmente desafiada contra seu respectivo conjunto de primers/sonda para se verificar o limite de detecção destes em ensaio de PCR quantitativo. Ainda, estas diluições seriadas foram utilizadas para geração de curva padrão nos demais ensaios de qPCR.

3.1.3. Condições dos ensaios de qPCR

Em todos os ensaios de qPCR, cada reação foi realizada em um volume total de 20 μl, contendo 0,5X do master mix Precision Fast 2X Real-Time PCR (Primerdesign Ltda, Reino Unido), 1 μl do mix primers/sonda Taqman (0,3 pg/μl dos primers e 0,15 pg/μl da sonda) específicos para *A. besseyi* ou *A. fujianensis*. Foram utilizados 2 μl da suspensão de DNA extraídos ou a partir de um único nematoide ou a partir de diluições seriadas do DNA-padrão. As reações foram preparadas em placas MicroAmp® Fast Optical com 96 cavidades (Applied Biosystems, Reino Unido) e seladas com fita adesiva Max Ultraclear Sealing Film. Todas as reações foram preparadas dentro de uma cabine de fluxo laminar previamente tratada com luz UV. As condições de amplificação foram: 95 °C por 20 s, 40 ciclos a 95 °C 1 s e 62 °C por

20 s, implementadas no aparelho StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Reino Unido). Reações sem o DNA-alvo (NTC) e controles positivos consistindo das oito diluições do DNA-padrão foram incluídos em todas as corridas. Todas as reações, incluindo o controle negativo e positivos foram realizadas em duplicatas. As curvas de amplificação foram visualizadas e analisadas ao plotar a fluorescência (ΔRn : normalização da fluorescência do *dyer reporter*) contra o número de ciclos de quantificação (C_q) no programa StepOne versão 2.1 (Applied Biosystems).

Os valores de C_q , ΔRn e número de cópias da molécula alvo estimados para cada amostra testada foram exportados para o programa Microsoft Excel 2007 para organização dos dados para realização de análise estatística e plotagem das curvas de amplificação. As curvas-padrão foram geradas em todos os ensaios e as respectivas eficiências foram calculadas pela fórmula $E=10^{-1/m}-1$ em que m é o coeficiente angular da equação de regressão linear da curva padrão.

3.1.4. Testes de especificidade, sensibilidade e quantificação absoluta do DNA alvo a partir de um único nematoide.

Após se estabelecer o limite de detecção de cada conjunto de primers/sonda pelos testes com diluições seriadas do DNA-padrão (DNA plasmidial de clones representativos de *A. besseyi* ou *A. fujianensis*), buscou-se estimar o número de cópias da molécula alvo presente em um único nematoide. Esta estimativa foi realizada por meio da quantificação absoluta em ensaios de qPCR. Este método utiliza padrões de concentrações conhecidas para gerar uma curva padrão, que serve para determinar o número de cópias da molécula alvo presente em uma amostra de concentração desconhecida, neste caso, em amostra de DNA extraída de um único nematoide. Assim, pôde-se verificar a sensibilidade dos ensaios diagnósticos em detectar a presença de um único espécime da espécie alvo na amostra testada. As populações usadas neste ensaio estão listadas na Tabela 2.

Testou-se também a especificidade do diagnóstico proposto para *A. besseyi* ao desafiá-lo contra amostras de DNA de *A. fujianensis* e vice-versa (Tabela 2). A especificidade também foi avaliada ao desafiar ambos os conjuntos de primers/sonda contra outras espécies relacionadas [*A. fragariae*, *A. ritzemabosi* e *Aphelechoides* sp. (S10.3)].

Tabela 1. Lista de primers e sondas Taqman desenhadas e usadas para a detecção de *Aphelenchoides besseyi* e *A. fujianensis*

Espécie alvo	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Sonda (5'-3')	Amplicon (pb)
<i>A. fujianensis</i>	GTAATGAAAGTGAGACTCTTGGAG	GGCGATGTTGCACGAAGAA	TCGAAACGCGCCCCGTTACATC	73
<i>A. besseyi</i>	GTAATGAAAGTGAGACATTGGATG	GATGTTGCGCGCCGGA	CGAAACGCCAACGCTCACATCGTC	70

Aphelenchoides besseyi (DJ07S)

5' GCGAAACTCAAAGGC***GTAATGAAAGTGAGACATTGGATG***TCGACGATGTGAGCGTTGGCGTTTCGACG***TCCGGCGCGCAACATCGCCCCGTGACT*** 3'

Aphelenchoides fujianensis (DJ01)

5' GTCGAAACTCAACGGC***GTAATGAAAGTGAGACTCTTGGAG***TCGACGATGTGAACGGGGCGCGTTTCGACG***TTCTTCGTGCAACATCGCCCCGTGACT*** 3'

Figura 1. Sítios dos primers e sondas Taqman espécie-específica desenhadas para *A. besseyi* e *A. fujianensis*. Os sítios dos primers estão destacados em negrito e itálico e das sondas estão sublinhados. Estes foram desenhados na porção final da região D2-D3 (LSU) para ambas as espécies.

Tabela 2. Lista das populações de *Aphelenchoides* spp. utilizadas para obtenção dos espécimes testados no ensaio de sensibilidade e especificidade.

Populações de <i>A. fujianensis</i>		Populações de <i>A. besseyi</i>	
Código da população ^a	Nº de espécimes individualmente testados de cada população	Código da população ^a	Nº de espécimes individualmente testados de cada população
DJ01	20	DJ06S	10
DJ02	18	DJ07S	10
DJ03	10	DJ12S	10
DJ04	10	DJ15S	9
DJ05F	10	DJ18S	10
DJ06F	10		
DJ07F	10		
DJ08	10		
DJ10	10		
DJ12F	10		
DJ13	10		
DJ14	10		
DJ15F	10		
DJ16	10		
DJ17	10		
Total de espécimes testados	168	Total de espécimes testados	49
Outras espécies de <i>Aphelenchoides</i> spp.			
Espécie	Código	Hospedeiro	Fonte
<i>A. fragariae</i>	Frag1	<i>Woodwardia fimbriata</i> Sm.	Idowu Rotifa (Scottish Agricultural College – Edimburgo, Reino Unido)
<i>A. ritzemabosi</i>	Ritz1	desconhecido	Dr. Thomas Prior (Food and Environment Research Agency -York/Reino Unido)
<i>Aphelenchoides</i> sp.	S10.3	Semente de forrageira	Presente estudo

^aMesmas populações obtidas e caracterizadas no Capítulo 1. Veja os detalhes na Tabela 1 do Capítulo 1.

3.1.5. Análise estatística

Buscou-se determinar o número de cópias esperado para uma amostra positiva para *A. besseyi* ou *A. fujianensis* utilizando os protocolos diagnósticos propostos usando qPCR. Para isso, calculou-se a média do número de cópias da molécula alvo estimado para cada nematoide testado nos ensaios de qPCR. Uma das amostras obtidas da população DJ15F (amostra 304) não foi considerada para esta análise devido a forte reação cruzada.

Esses valores foram utilizados em análise discriminante linear com a geração de uma função discriminante para *A. besseyi* e *A. fujianensis*. Os scores gerados pela função discriminante foram utilizados na análise de árvores de classificação para gerar o valor que separa completamente as amostras positivas para *A. besseyi* das positivas para *A. fujianensis*. A análise foi realizada no programa InfoStat versão 2014 (Di Rienzo *et al.*, 2014).

3.2. Detecção quantitativa de *Aphelenchoides* spp.

Duas séries quantitativas de espécimes de *A. besseyi* e *A. fujianensis* foram preparadas com 1, 3, 6 e 10 indivíduos de cada espécie. Os nematoides foram separados e colocados, individualmente, em microtubos de 0,2 ml contendo tampão para PCR na concentração de 1X, seguindo-se o método de extração de DNA com Proteinase K, como descrito no Capítulo 1. O DNA extraído foi utilizado em ensaio de qPCR nas condições descritas anteriormente. Os resultados foram utilizados para verificar a relação entre o número de nematoides e o número de cópias estimado. Ainda, verificou-se a ocorrência de reações cruzadas ao se desafiar o conjunto de primers/sonda Taqman para *A. besseyi* na presença de até 10 indivíduos de *A. fujianensis*, e vice versa.

3.3. Variabilidade intraindividual na expansão D2-D3 da região LSU em *Aphelenchoides besseyi*

A ocorrência de forte reação cruzada em espécimes de *A. besseyi* da população DJ18S e um espécime de *A. besseyi* encontrado em mistura em uma população de *A. fujianensis* (DJ15F, amostra 304) testado nos ensaios diagnósticos, levou a investigação da existência de variabilidade intraindividual na região LSU em *A. besseyi*. Deste modo, nematoides extraídos de duas amostras de sementes de arroz (DJ07S e DJ18S) foram utilizados neste ensaio, sendo que cinco nematoides de cada uma destas amostras foram utilizados para a extração de DNA a partir de um único indivíduo, como descrito no Capítulo 1. O DNA da amostra 304, previamente extraído, também foi adicionado nesta investigação.

As amostras de DNA foram utilizadas para a amplificação da expansão D2-D3 da região LSU sendo que as reações foram preparadas em duplicatas para cada amostra. As reações de PCR foram preparadas em 15 µl de reação final que continham os reagentes nas seguintes concentrações: 1X do tampão para PCR High Fidelity, 2mM de MgSO₄, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada primer (D2A e D3B, detalhes na Tabela 2, Capítulo 1), 1U de *Taq Polimerase* Platinum (Invitrogen, Reino Unido), 1 µl de DNA, e água esterilizada para complementar o volume da reação. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 55°C por 45 s, e extensão a 72°C por 2 min e extensão final a 72°C por 10 min. Após a amplificação do DNA, todo o volume da reação de PCR foi utilizado na corrida eletroforética em tampão 1X TBE

em gel de agarose a 1 %, corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Reino Unido), seguindo-se a visualização das bandas sob transiluminador de luz UV. As bandas visualizadas foram cortadas do gel e o DNA purificado usando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Reino Unido). Os produtos purificados foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega, Reino Unido), segundo as instruções do fabricante e células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α (Invitrogen, Reino Unido) foram transformadas. Foram selecionadas 20 colônias frescas de cada amostra de DNA clonado, resultando num total de 200 transformantes. Uma alíquota de 2 µl da suspensão de células de cada transformante foi imediatamente utilizada para montagem de reações de PCR com os primers D2A e D3B, nas mesmas condições descritas acima. Os produtos foram purificados e enviados para sequenciamento.

3.4. Análise filogenética

As sequências de DNA geradas a partir dos clones foram editadas no programa Sequencher® 5.2.4. (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA <http://www.genecodes.com>). Alinhamentos múltiplos das sequências geradas juntamente com sequências referência de *A. besseyi*, *A. fujianensis* e *A. fragariae* programa MAFFT versão 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (Kato & Standley, 2013). Este último foi usado como grupo externo (*outgroup*) nesta análise. Sequências de clones gerados da amostra DJ18S de um ensaio prévio, também foram adicionadas a análise filogenética. Regiões não informativas e *gaps* foram removidos usando o programa BMGE versão 1.0 (Criscuolo & Gribaldo, 2010). A árvore filogenética consenso foi inferida por Inferência Bayesiana (IB), sendo que a escolha do melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi determinada pelo MrModeltest v. 2.2 (Nylander, 2004). O critério de informação de Akaike (AIC) (Akaike, 1974) indicou que o modelo de substituição com melhor ajuste foi o GTR+I+G (Lanave *et al.*, 1984, Tavaré, 1986; Rodríguez *et al.*, 1990). Esse modelo foi utilizado para estimar a topologia da árvore filogenética no programa MrBayes v. 3.2.3 disponível no CIPRES Science Gateway v. 3.3 (Miller *et al.*, 2010). Cada análise foi executada utilizando simultaneamente duas corridas com quatro cadeias de 10.000.000 de gerações cada. As cadeias de Markov (MCMC) foram amostradas a intervalos de 1.000 gerações e ao final descartadas 25% das primeiras árvores geradas. As probabilidades posteriores foram determinadas com base em 50% das árvores consenso geradas. Confirmada a

convergência da árvore, esta foi visualizada e editada no programa FigTree v. 1.3.1 (Rambaut, 2009).

4. RESULTADOS

4.1. Teste de Sensibilidade

Foram obtidos dois clones de *A. besseyi* (DJ07SA e DJ11) e um clone *A. fujianensis* (DJ01) para a realização inicial dos testes de sensibilidade e limite de detecção dos respectivos conjuntos de primers/sonda. Selecionou-se o clone DJ11 como DNA padrão de *A. besseyi* para compor a curva padrão nos ensaios de qPCR subsequentes, e o clone DJ01 para *A. fujianensis*. As curvas de amplificação geradas pelas diluições seriadas do DNA padrão de *A. fujianensis* e *A. besseyi* estão representadas nas Figuras 2A e 4A, respectivamente. Com base nas curvas de amplificação das diluições seriadas do DNA padrão de ambas as espécies, o limite de detecção esperado foi de 10^1 cópias/ μ l.

Em seguida, foram realizados os testes de sensibilidade utilizando-se o DNA genômico extraído a partir de um único nematoide. Foram testadas 168 amostras de *A. fujianensis* e 49 amostras de *A. besseyi* (Tabela 2). Com base nesses ensaios, obteve-se a média de $7,5 \times 10^3$ e $3,7 \times 10^3$ cópias em *A. besseyi* e *A. fujianensis*, respectivamente. Contudo, houve grande variação nos valores estimados entre as amostras nos ensaios de ambas as espécies (Figura 3).

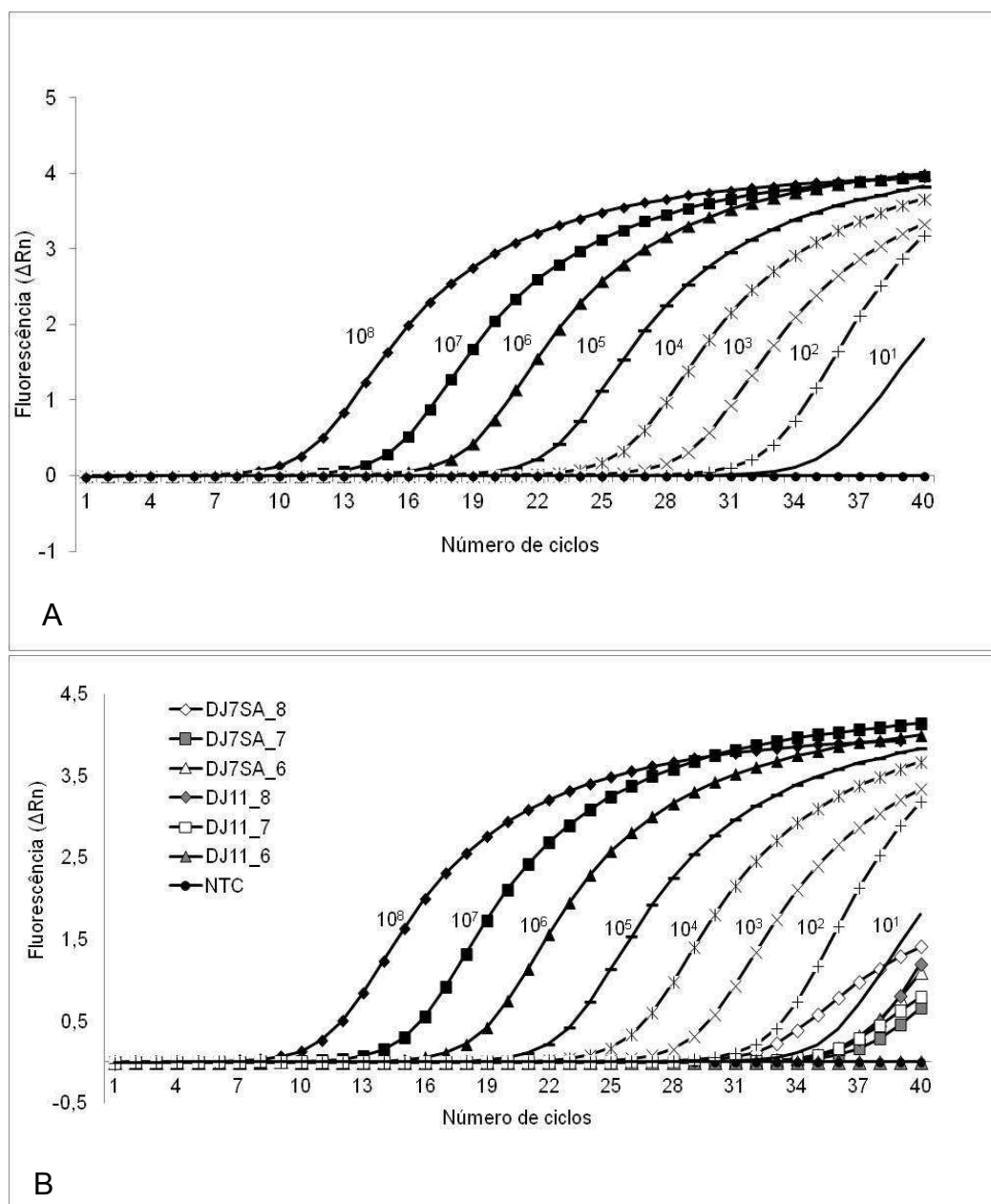


Figura 2. Curvas de amplificação geradas em ensaio de qPCR com o conjunto de primers/sonda Taqman para detecção de *A. fujianensis*. (A) Curvas de amplificação geradas a partir do DNA padrão de *A. fujianensis* em diluição serial de 10 vezes. (B) Curvas de amplificação gerada em teste de especificidade do conjunto de primers/sonda para *A. fujianensis* desafiados contra DNA plasmidial de *A. besseyi* (DJ7SA e DJ11) nas diluições de 10^8 - 10^6 cópias/ μ l. NTC representa as reações sem DNA e as curvas de amplificação marcadas com 10^8 - 10^1 as curvas geradas pelo DNA-padrão de *A. fujianensis*.

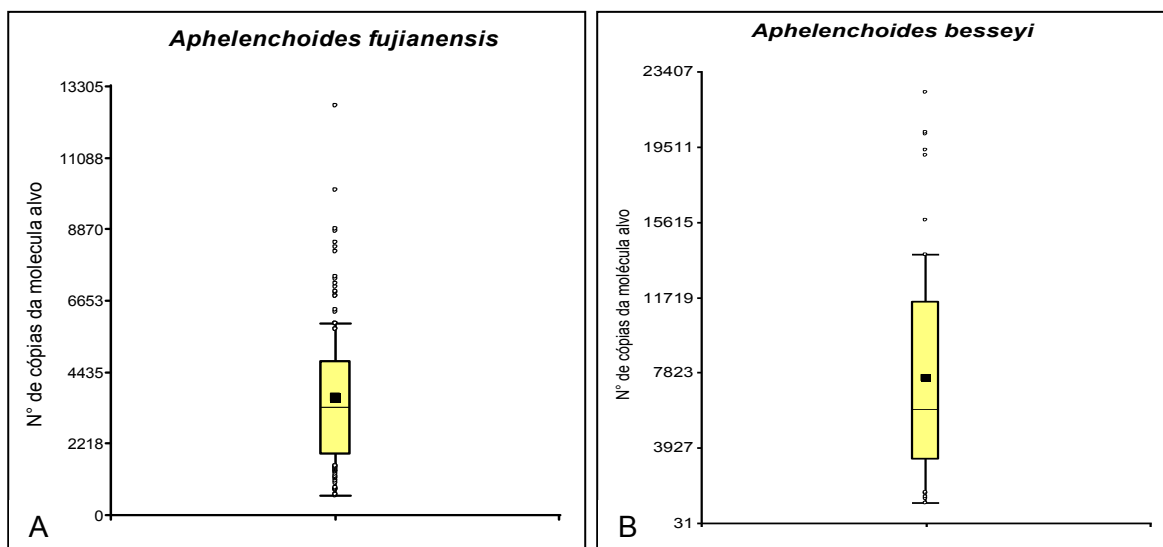


Figura 3. Dispersão dos dados resultantes dos ensaios de qPCR para estimar o número de cópias da molécula alvo presente em um único nematoide. A linha horizontal em cada caixa é o valor da mediana; o símbolo “■” representa a média; “○” representa valores extremos.

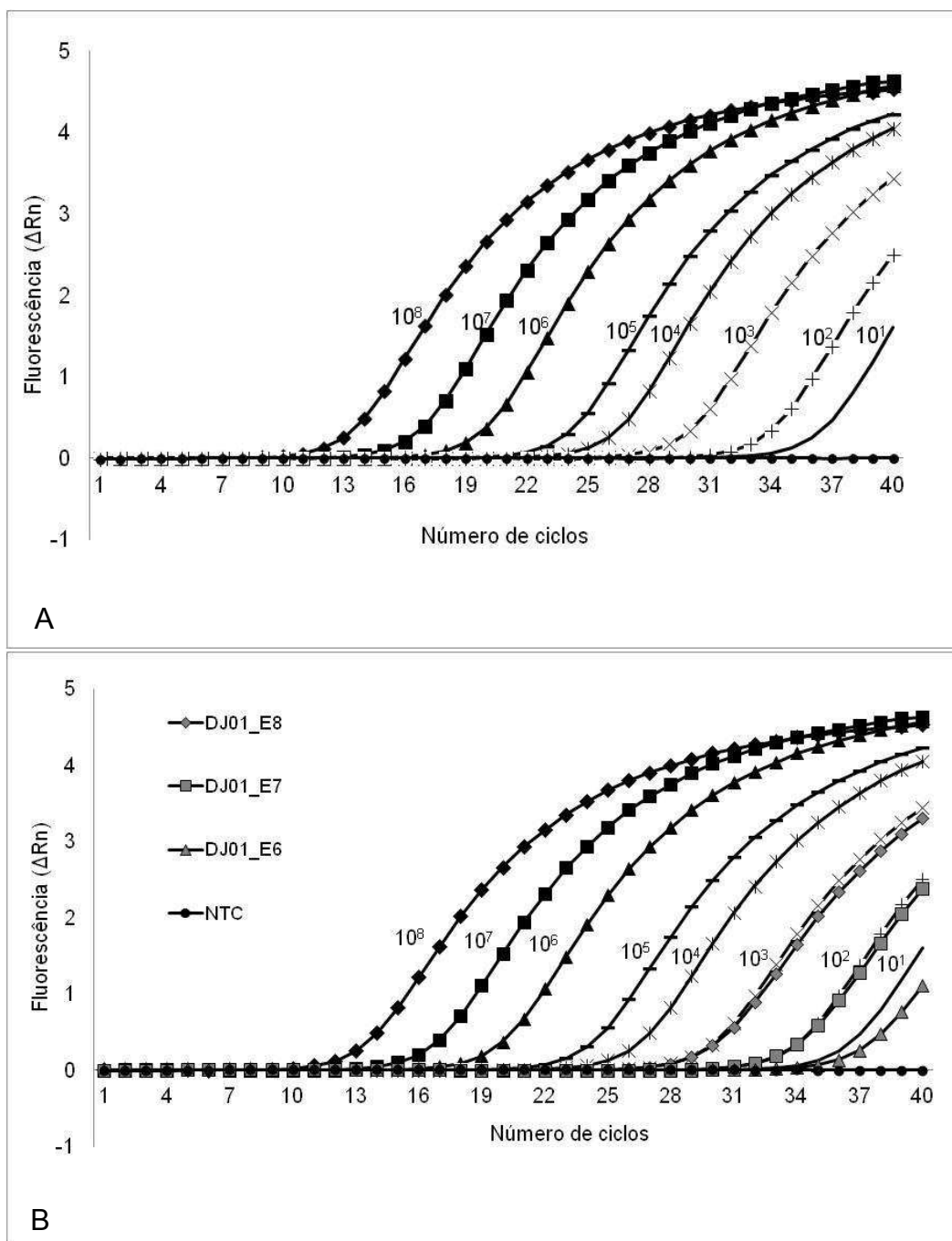


Figura 4. Curvas de amplificação geradas em ensaio de qPCR com o conjunto de primers/sonda Taqman para detecção de *A. besseyi*. (A) Curvas de amplificação geradas a partir do DNA padrão de *A. besseyi* em diluição serial de 10 vezes. (B) Curvas de amplificação gerada em teste de especificidade do conjunto de primers/sonda para *A. besseyi* desafiados contra DNA plasmidial de *A. fujianensis* (DJ01) nas diluições de 10^8 - 10^6 cópias/ μ l. NTC representa as reações sem DNA e as curvas de amplificação marcadas com 10^8 - 10^1 as curvas geradas pelo DNA-padrão de *A. besseyi*.

4.2. Teste de Especificidade

A especificidade do conjunto de primers/sonda Taqman para detecção de *A. besseyi* foi testada inicialmente para as diluições seriadas de DNA plasmidial de *A. fujianensis* (DJ01) nas concentrações de 10^8 - 10^6 cópias/ μ l. Como observado na Figura 4B, houve reação cruzada nas concentrações 10^8 e 10^7 cópias/ μ l resultando em uma curva de amplificação semelhante a 10^3 e 10^2 da curva padrão. O mesmo foi verificado nos testes usando DNA extraído de um único nematoide, apesar de o sinal de amplificação ter sido de magnitude inferior ao observado nas amostras positivas (Tabela 3). O mesmo ensaio foi realizado com o conjunto de primers/sonda Taqman para detecção de *A. fujianensis*, mas usando diluição serial de DNA plasmidial de *A. besseyi*. Estes se mostraram mais específicos, com ausência de sinal até o valor de C_q igual a 33, entre as diluições 10^2 e 10^1 da curva-padrão (Figura 2B). Testes prévios mostraram ausência de amplificação em concentrações inferiores a 10^6 cópias/ μ l de DNA plasmidial de *A. besseyi* testado contra o primers/sonda para *A. fujianensis*, o mesmo foi verificado em testes com primers/sonda para *A. fujianensis*. Teste de especificidade também foi realizado contra as espécies relacionadas *A. fragariae*, *A. ritzemabosi* e *Aphelenchoides* sp. (S10.3), com verificação de ausência de sinal de amplificação para todas as espécies testadas contra ambos os ensaios diagnósticos [Figura 5 (A-B)]. *Aphelenchoides* sp. (S10.3) foi encontrado associado a sementes de forrageiras e, com base na análise filogenética apresentada no Capítulo 1 (ver Figura 5, Capítulo 1), esta proximamente relacionado a *A. varicaudatus*. Para este teste, o DNA extraído a partir de um único nematoide foi diluído 10 vezes para obtenção de maior volume, dado o número limitado de amostras de *A. fragariae*, *A. ritzemabosi* e *Aphelenchoides* sp..

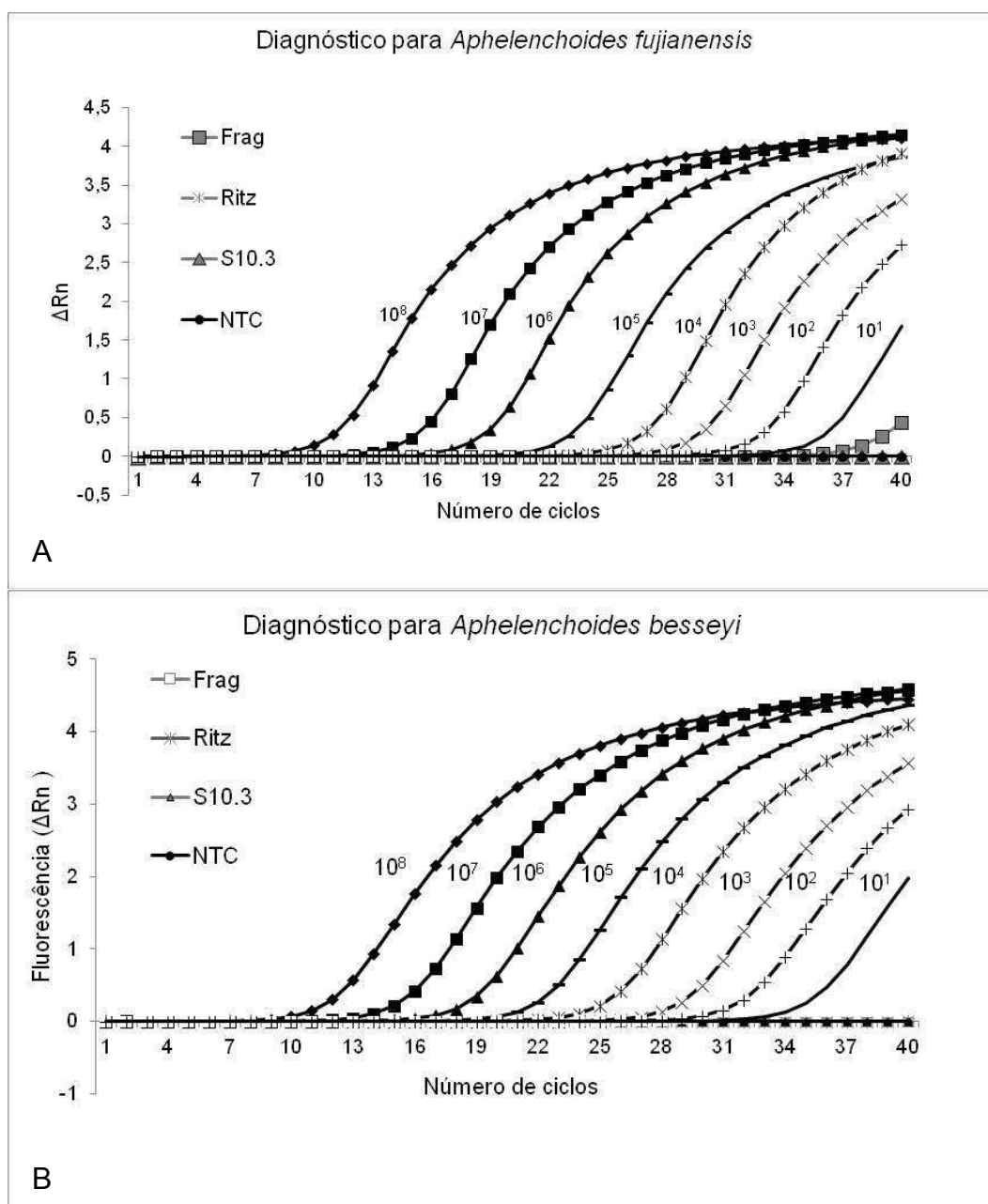


Figura 5. Curvas de amplificação geradas em ensaio de qPCR com o conjunto de primers/sonda Taqman (A) Diagnóstico para detecção de *A. fujianensis* desafiado contra *A. fragariae* (Frag), *A. ritzemabosi* (Ritz) e *Aphelenchoides* sp. (S10.3). (B) Diagnóstico para detecção de *A. besseyi* desafiado contra *A. fragariae* (Frag), *A. ritzemabosi* (Ritz) e *Aphelenchoides* sp. (S10.3). NTC representa as reações sem DNA e as curvas de amplificação marcadas com 10^8 - 10^1 as curvas geradas pelo DNA-padrão de cada espécie.

A quantificação do número de cópias e valores de C_q observados tanto em amostras positivas quanto negativas para ambas as espécies estão na Tabela 3. Ambos os diagnósticos geraram valores de C_q próximos a 25 e número de cópias variando entre 10^3 a 10^4 , para amostras positivas. Houve forte reação cruzada (sinal de amplificação foi semelhante ao utilizar ambos os diagnósticos) em 90% das amostras oriundos da população DJ18S (*A. besseyi*) e uma amostra da população DJ15F (população de *A. fujianensis*). Estas amostras não foram consideradas para os cálculos presentes na Tabela 3.

Houve alta correlação entre os valores de C_q e número de nematoides nos ensaios para quantificação das espécies de *Aphelenchoides* spp. (Figura 6). O coeficiente de correlação obtido para as séries quantitativas foram 97% e 85% para *A. besseyi* e *A. fujianensis* respectivamente. Este ensaio preliminar indica que a correção observada pode ser empregada na estimativa do número de nematoides presentes em uma amostra, no entanto, novos experimentos devem ser conduzidos. Ainda, nenhum sinal de amplificação foi observado quando a série quantitativa de *A. fujianensis* foi testada contra os primers/sonda para *A. besseyi*. O mesmo resultado foi observado ao se testar a série quantitativa de *A. besseyi* contra o conjunto de primer/sonda para *A. fujianensis*.

A função linear gerada pela análise discriminante é mostrada na Figura 7B. A árvore de classificação aplicada aos scores gerados a partir dessa função discriminante gerou um ponto de corte igual a 0,292, que separou completamente as amostras positivas para *A. besseyi* de *A. fujianensis*, como ilustrado na Figura 7A.

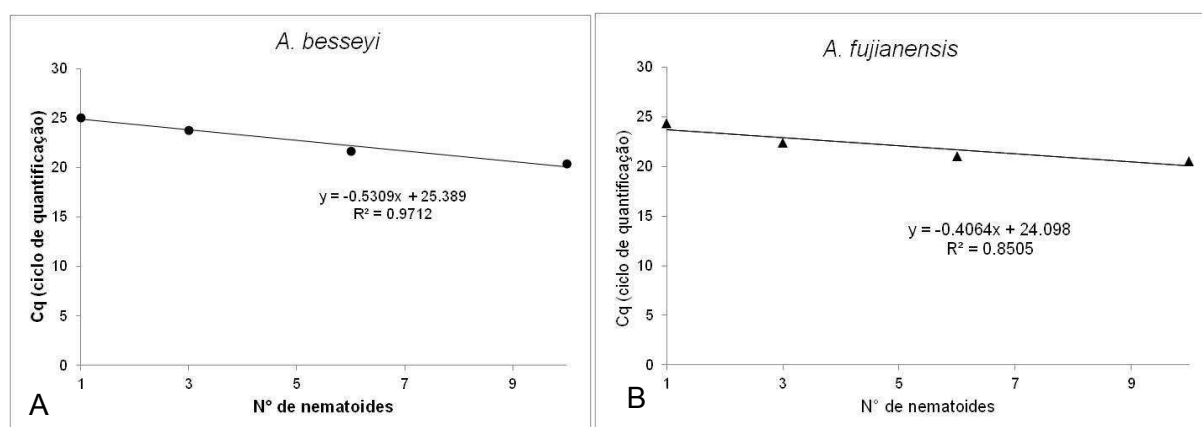


Figura 6. Relação entre o número de nematoides e o número de ciclo de quantificação para (A) *A. besseyi* e (B) *A. fujianensis* em série quantitativa de 1, 3, 6 e 10 nematoides. R^2 é o coeficiente de correlação linear.

Tabela 3. Ensaios de qPCR para detecção de *A. besseyi* e *A. fujianensis* a partir de DNA extraído de um único nematoide.

	Primers/sonda Taqman para detecção de <i>A. besseyi</i>		Primers/sonda Taqman para detecção de <i>A. fujianensis</i>	
	C _q	Nº de cópias	C _q	Nº de cópias
<i>A. besseyi</i> (n=39)	25 ± 2	8x10 ³ ± 5x10 ³	35 ± 2 ^a	1 ± 1,5 ^a
<i>A. fujianensis</i> (n=167)	34 ± 2	3x10 ¹ ± 5x10 ¹	24 ± 2	3,5x10 ³ ± 2,2x10 ³

^aAs amostras obtidas da população DJ18S e a amostra 304 da população DJ15F não foram consideradas para estes cálculos devido a forte reação cruzada observada.

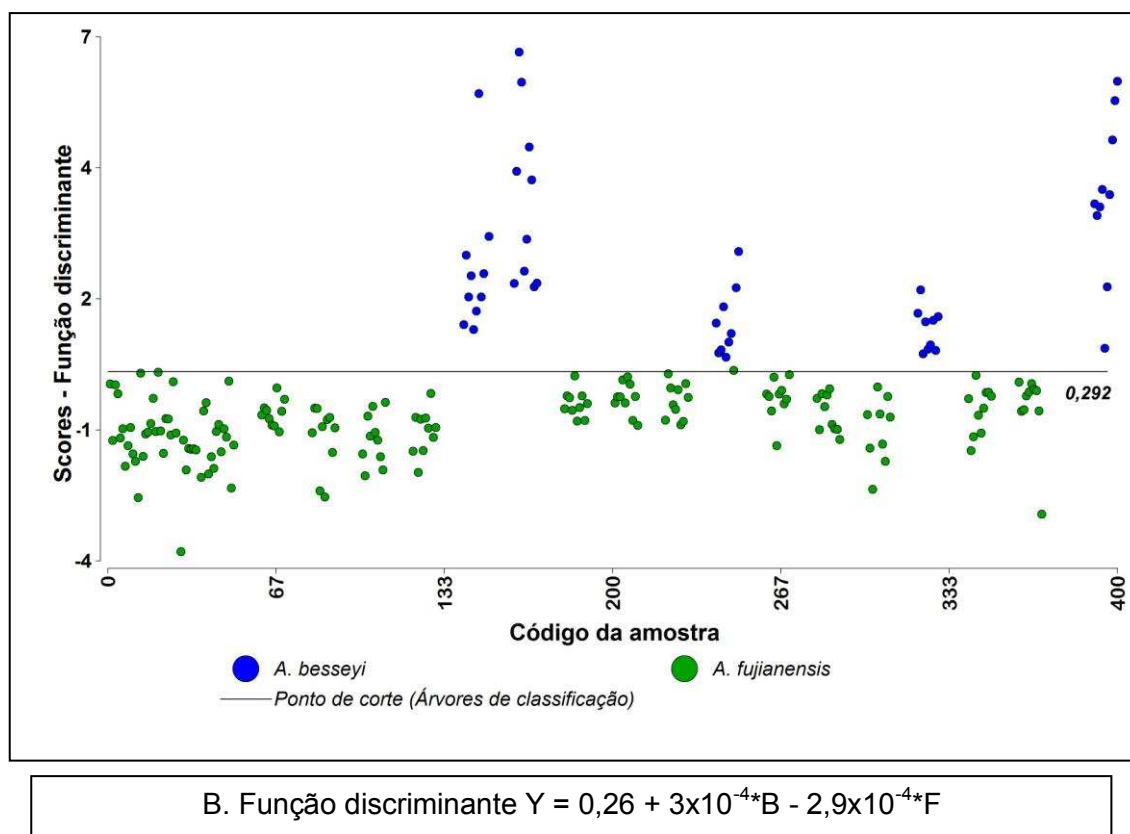


Figura 7. Análise de árvores de classificação e determinação do ponto de corte (nº de cópias) que discrimina amostras positivas de *Aphelenchoides besseyi* e *A. fujianensis* com base no valor de score gerado pela função discriminante. (A) Plotagem dos scores gerados pela função discriminante de *A. besseyi* e *A. fujianensis*. O ponto corte gerado pela análise de árvores de classificação é indicado pela linha em preto (0,292) mostrando que há a completa separação entre as amostras de *A. besseyi* (círculos em azul) e *A. fujianensis* (círculos em verde). (B) Função discriminante em que B e F são números médios de cópias para *A. besseyi* e *A. fujianensis*, respectivamente.

4.3. Variabilidade intraindividual na expansão D2-D3 da região LSU em *Aphelenchoides besseyi*

Foram geradas 176 sequências a partir dos clones selecionados. A análise filogenética a partir do alinhamento dessas é mostrada na Figura 8. Houve uma nítida separação dos clones em dois clados suportados por altos valores de probabilidade posterior (100%), comprovando a ocorrência de variação intraindividual nos espécimes de *A. besseyi* investigados. Curiosamente, alguns clones obtidos do mesmo indivíduo oriundo da população DJ18 tiveram alta identidade às sequências referência de *A. fujianensis* [DJ01 clone 2; *A. besseyi* 98 (AY508109)], resultando na formação de um pequeno grupo indicado na Figura 8 como Grupo *A. fujianensis*. Todos os clones obtidos dos espécimes da população DJ07S agruparam-se à sequência referência de *A. besseyi* (DQ328684), o mesmo foi observado para a amostra 304 (DJ15F). Aparentemente, somente alguns espécimes possuem essas diferentes cópias em seu genoma, e mesmo a porcentagem entre essas diferentes cópias pode variar de um indivíduo para outro como pode ser visto na Tabela 4. A porcentagem de clones do tipo *A. fujianensis* encontrados em *A. besseyi* variaram entre 14% e 60%.

Tabela 4. Variação intraindividual encontrada na expansão D2-D3 da região LSU de *A. besseyi*. O número de clones variantes encontrados em um mesmo indivíduo é listado abaixo.

Código do nematoide	Nº de clones do tipo <i>A. besseyi</i>	% cobertura/ identidade à <i>A. besseyi</i> (DQ328684)	Nº de clones do tipo <i>A. fujianensis</i>	% cobertura/ identidade à <i>A. fujianensis</i> (AY508109) *
DJ18	6/7 (86%)	97-98/99	1/7 (14%)	100/98
DJ18A	18/18 (100%)	97/99	0/18 (0%)	-
DJ18C	16/20 (80%)	97/99-100	4/20 (20%)	98/97-98
DJ18G	6/15 (40%)	97/99-100	9/15 (60%)	98-99/97
DJ18L	20/20 (100%)	97-98/99-100	0/20 (0%)	-
DJ18M	19/19 (100%)	97-98/99-100	0/19 (0%)	-
DJ07B	19/19 (100%)	97/99-100	0/19 (0%)	-
DJ07G	17/17 (100%)	97/99	0/17 (0%)	-
DJ07L	18/18 (100%)	97/99	0/18 (0%)	-
DJ07H	15/15 (100%)	97-98/99-100	0/15 (0%)	-
304	9/9 (100%)	97/99	0/9 (0%)	-

* A identidade entre a sequência AY508109 e DJ01 (representante do grupo-forrageira identificado como *A. fujianensis* no Capítulo 1) é de 99% com 100% de cobertura.

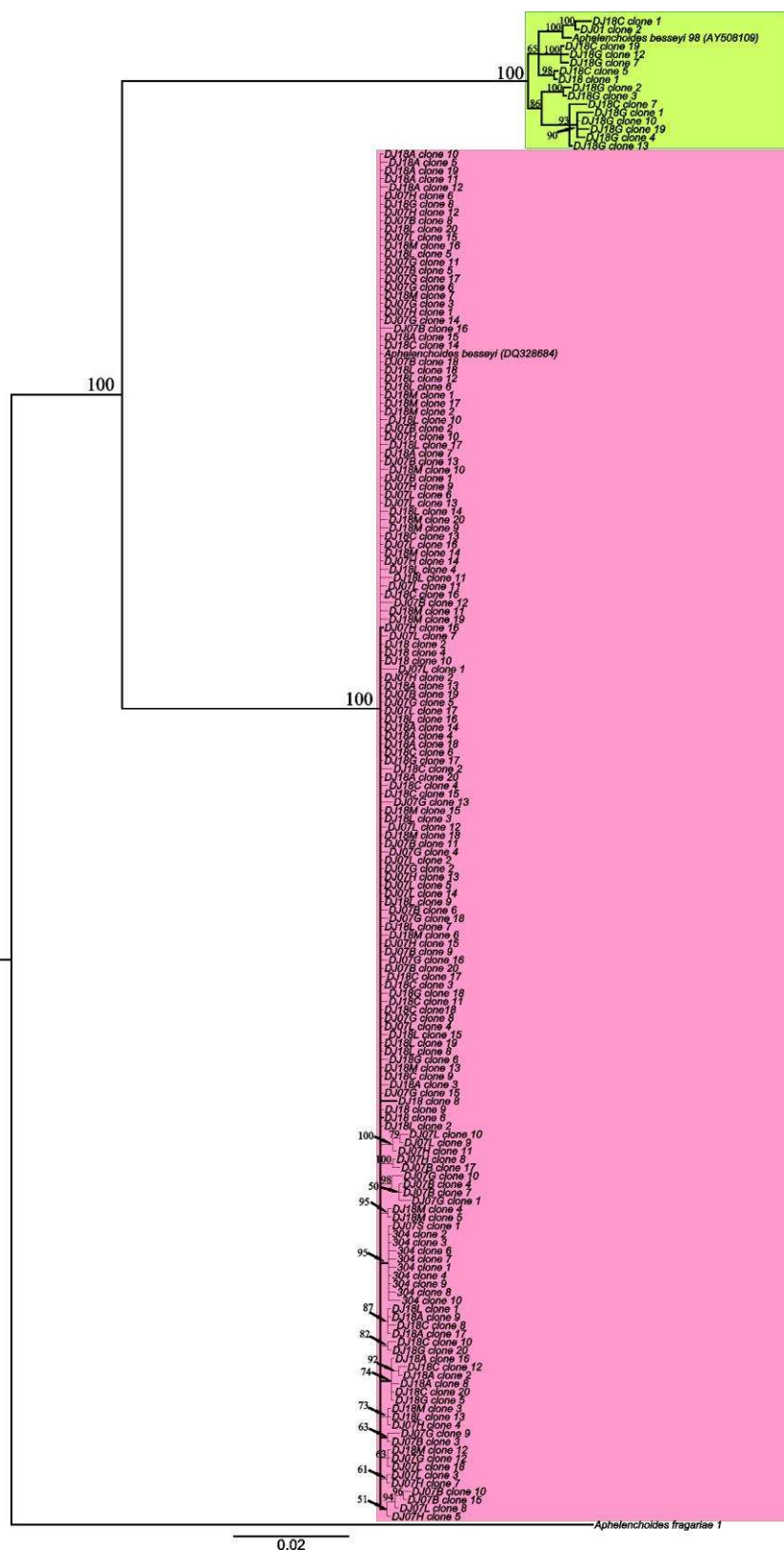


Figura 8. Árvore filogenética enraizada da região LSU de clones de *A. besseyi* gerada por Inferência Bayesiana. O comprimento dos ramos está em escala e os valores de probabilidade posterior são dispostos próximos aos ramos. A barra corresponde ao número de substituições esperadas por sítio.

5. DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento de protocolos, utilizando qPCR, para diagnóstico de populações de *A. besseyi* e *A. fujianensis*

A técnica de PCR em tempo real vem crescentemente sendo explorada para a detecção de fitonematoides por ser rápida e mais sensível que os métodos tradicionalmente empregados (tais como identificação morfológica, PCR-RFLP e PCR convencional). Além do uso na detecção, ensaios de quantificação molecular já foram propostos para algumas espécies economicamente importantes como: *Pratylenchus thornei* (Yan *et al.*, 2012), *Globodera pallida* e *G. rostochiensis* (Nakhla *et al.*, 2010) e *Xiphinema index* (Ghelder *et al.*, 2014). Contudo, ensaios para detecção e mesmo quantificação molecular de espécies de *Aphelenchoides* são escassos. Ibrahim *et al.* (1994) conseguiram diferenciar várias espécies de *Aphelenchoides* usando ITS-PCR-RFLP, mas não tiveram sucesso na identificação de populações de *A. besseyi*. McCuiston *et al.* (2007) desenvolveram um método sensível e rápido para detecção de *A. fragariae* com extração de DNA diretamente do tecido foliar usando primers específicos em ensaio de PCR. Os autores demonstraram a acurácia e confiabilidade do protocolo por meio de testes em amostras de tecido naturalmente infectado de mais de 120 plantas ornamentais hospedeiras de *A. fragariae*.

Em geral, é mais frequente o uso de regiões não transcrita do DNA ribossomal (ITS1 ou ITS2) por abrigarem maior variabilidade. No entanto em virtude da extensiva variação intraindividual observada em algumas espécies de fitonematoides (Hugall *et al.* 1999), outros marcadores moleculares têm sido explorados para a detecção. Por exemplo, Rybarczyk-Mydlowska *et al.* (2012) mostraram que a região codificadora SSU do rDNA abrigou nucleotídeos informativos o suficiente para o desenho de primers específico para detecção de quatro espécies economicamente importantes de *Aphelenchoides* spp. (*A. besseyi*, *A. fragariae*, *A. ritzemabosi* e *A. subtenuis*) em ensaios de qPCR, mas testes em diferentes populações das espécies alvo não foram realizados para a confirmação da especificidade dos ensaios.

Os protocolos de qPCR desenvolvidos no presente estudo podem ser utilizados para identificação e quantificação de nematoides na amostra, além de proporcionarem novas possibilidades para analisar um grande número de amostras, principalmente no serviço de certificação fitossanitária, através da automatização da extração e procedimentos moleculares que aumentam a velocidade e precisão dos resultados (Reid *et al.*, 2010). Por exemplo, o uso dos conjuntos de primers/sonda propostos aqui para detecção de *A. besseyi* e *A. fujianensis* nas condições testadas reduziram o

tempo gasto para detecção, uma vez que 96 amostras foram processadas e analisadas simultaneamente num período de apenas 30 minutos.

Os protocolos desenvolvidos foram sensíveis ao detectar o DNA alvo extraído a partir de um único nematoide e específicos quando desafiados contra espécies relacionadas e frequentemente associadas a sementes de forrageiras (*A. fragariae*, *A. ritzemabosi* e *Aphelenchoides* sp.). Cabe ressaltar que, *A. bicaudatus*, *A. sexlineatus* (Favoreto *et al.*, 2011) e *A. subtenuis* (Sharma *et al.*, 2001) também podem ocorrer em associação a sementes de forrageiras, mas, por indisponibilidade de material, não foram incluídas no presente estudo. No entanto, experimentos futuros devem ser conduzidos para verificar a especificidade dos primers e sondas a essas espécies. Ainda, houve reação cruzada quando o conjunto de primers/sonda para detecção de *A. besseyi* foi desafiado contra altas concentrações de DNA plasmidial de *A. fujianensis* (Figura 4B). Contudo, nenhum sinal de amplificação foi observado quando o conjunto primers/sonda para *A. besseyi* foram desafiados contra séries quantitativas de 1, 3, 6 e 10 espécimes de *A. fujianensis*, mas testes adicionais precisam ser realizados. Em adição, nos testes realizados na presença de somente um espécime de *A. fujianensis* foi verificado sinal de amplificação com valores de C_q próximo a 34, mas uma diferença de 10 ciclos foi observada entre a detecção do DNA alvo (amostras de *A. besseyi*) e o não alvo (amostras de *A. fujianensis*) (Tabela 3). Deste modo, a possibilidade de falso-positivo em amostras testadas para *A. besseyi* e que tenham alta densidade populacional de *A. fujianensis* precisa ser melhor investigada.

Teoricamente, o uso de sondas hidrolíticas (Taqman) deveria garantir a ausência de sinal fluorescente na ausência do DNA alvo. A possibilidade de amplificação não específica em ensaios com sonda Taqman já foi relado. Os efeitos de sequências divergentes em dois e cinco nucleotídeos presentes no sítio de anelamento de sonda Taqman foram avaliados por Yao *et al.* (2006) usando diferentes DNA plasmidiais. A alteração em dois nucleotídeos no sítio da sonda resultou na redução da eficiência, mas a sensibilidade foi mantida. Mesmo com cinco nucleotídeos divergentes no sítio de anelamento o sinal de amplificação foi detectado, mas com substancial redução na eficiência (de 99 para 81%) e na sensibilidade (de 10 para 100 cópias). Entretanto, nenhum sinal foi detectado quando a posição de um dos cinco nucleotídeos divergentes foi alterada.

Houve considerável variação na estimativa do número de cópias presente em um único nematoide em ambas as espécies. Esta extensiva variação pode estar associada a não homogeneização apropriada das amostras de DNA durante a montagem das reações. Apesar de sempre as amostras terem sido ressuspensas

por agitação em vortex, seguido por rápida centrifugação, a presença de microesferas de vidro no extrato final de DNA, pode ter limitado a homogeneização das mesmas. Outra fonte de variação pode ter sido a eficiência do método de extração de DNA utilizado, associado ao uso de uma técnica tão sensível como qPCR.

Mesmo considerando essas fontes de variação mencionadas acima, o número médio de cópias estimado em amostras de *A. besseyi* foi quase duas vezes maior que o observado em *A. fujianensis*. Esta variação pode estar associada à seleção ao acaso de fêmeas com a espermateca cheia de espermatozoides, que foi frequentemente observado nas populações de *A. besseyi* ao contrário de *A. fujianensis*. Isto indica que o estágio de vida do nematoide pode influenciar na quantificação do DNA presente na amostra. A influência do estágio de desenvolvimento do nematoide no sinal de fluorescência também foi relatado por Ghelder *et al.* (2014), em que os valores de C_q foram ligeiramente menores em amostra com juvenis do que com adultos de *Xiphinema index* com igual número de nematoides. Entretanto, Yan *et al.* (2013) não observaram nenhuma diferença significativa entre os valores de C_q entre juvenis, fêmea e ovo de *Pratylenchus neglectus*, sugerindo que a quantidade de DNA seja semelhante nos diferentes estádios de desenvolvimento desse nematoide. Apesar da variação no número de cópias da molécula alvo estimado nos ensaios de qPCR, estes foram superiores ao limite de detecção como visto nos testes usando as diluições seriadas (Figuras 2A e 3A).

O aumento na precisão da quantificação do DNA alvo presente nas amostras permitirá a determinação de valores de corte (*cut-point*) mais acurados, determinados por análise discriminante e árvores de classificação, por exemplo. Isso poderá ser alcançado pela eliminação da interferência das microesferas de vidros na homogeneização das amostras (pela transferência do extrato de DNA para novos microtubos logo após o processo de extração), ou mesmo testando-se outros métodos de extração.

5.2. Variabilidade intraindividual entre as sequências da região LSU do rDNA em *A. besseyi*

A comprovação da variação intraindividual entre as sequências da região LSU do rDNA em *A. besseyi*, explicou a ocorrência de reações cruzadas observadas nos ensaios de qPCR. Duas populações de *A. besseyi* foram usadas nesta investigação sendo uma oriunda do Japão (DJ07) e outra da Espanha (DJ18). A variabilidade intraindividual foi confirmada somente nesta última, o que está de acordo com o

observado nos ensaios de qPCR dada a ausência de reações cruzadas nos espécimes testados da população DJ07. O fato curioso é a coincidente identidade de uma das sequências variantes ao grupo *A. fujianensis* (Figura 8). A maioria dos clones obtidos agrupou-se à sequência referência de *A. besseyi* (DQ328684) usada na análise filogenética, mas 14 clones agruparam-se as sequências referência do grupo *A. fujianensis* (DJ01 clone 2; AY508109).

Genes organizados em arranjos multicópias no genoma, como os cístrons do rDNA, apresentam evidências de evoluírem sob o fenômeno conhecido como evolução concertada (*concerted evolution*) (Naidoo *et al.*, 2013). Este processo de evolução concertada impede que genes individuais dentro de um agrupamento de genes acumulem mutações, levando a homogeneização entre as múltiplas cópias (Naidoo *et al.*, 2013). Variabilidade intraindividual nos espaçadores intergênicos já foi comprovada para vários eucariotos incluindo, espécies de fitonematoides (Hugall *et al.* 1999; Draisma *et al.*, 2012; Naidoo *et al.*, 2013). A variabilidade intraespecífica entre as cópias dos cítrons ribossomais é rara, mas tem sido observado em alguns metazoários (Carranza *et al.* 1996; McTaggart & Crease 2009). No platelminto *Dugesia mediterranea* foram encontrados dois variantes da região SSU coexistindo no mesmo indivíduo. A análise da estrutura secundária destes variantes indicou que ambas eram funcionais, apesar de somente um tipo ter sido transcrito em RNA (Carranza *et al.* 1996). Recentemente, foi feito o primeiro relato de variabilidade intraindividual ocorrendo na região SSU de uma espécie de fitonematoide. Nyaku *et al.* 2013 identificaram a presença de dois variantes distintos na região SSU em *Rotylenchulus reniformis*. Segundo os autores esses variantes podem ter sido resultado de um evento de recombinação durante *crossing over* desigual entre cromátides irmã ou entre o rDNA dos cromossomos X e Y, levando a coevolução dessas sequências nesses cromossomos.

Deste modo, a presença de sequências variantes com alta identidade a *A. fujianensis* coexistindo em espécimes de *A. besseyi* poderia ser um indício de um evento recente de hibridização, ou mesmo que estas sejam espécies irmãs que divergiram recentemente e ainda compartilham este variante em seus genomas de uma linhagem parental comum. Investigações futuras devem ser realizadas para a elucidação dessas questões. Além disso, a triagem em mais espécimes de diferentes populações de *A. besseyi* deve ser realizada para estimar a frequência dessa sequência variante. Apesar de aparentemente não ocorrer variabilidade intraindividual na região LSU de *A. fujianensis*, esta espécie também deve ser investigada.

6. CONCLUSÕES

Foi possível desenvolver e usar os ensaios diagnósticos para a detecção de *A. besseyi* e *A. fujianensis*. Com o uso dos primers/sonda específicos foi possível detectar o DNA alvo extraído a partir de um único nematoide, reforçando a alta sensibilidade na detecção da técnica de PCR em tempo real.

A identificação da coexistência de duas sequências distintas do gene LSU em uma população de *A. besseyi* e a alta identidade de uma destas à *A. fujianensis* reforça a proximidade filogenética destas espécies e a necessidade de uma extensiva investigação para se estimar a frequência deste fenômeno. Apesar de a variabilidade intraindividual ter sido observada somente em uma população oriunda da Espanha, mais populações presentes no Brasil precisam também ser avaliadas para esta variação.

7. REFERÊNCIAS

- Akaike, H. "A new look at the statistical model identification". IEEE Transactions on Automatic Control 19(6): 716–723, 1974.
- Carranza S, Giribet G, Ribera C, Baguna J, Riutort M. Evidence that two types of 18S rDNA coexist in the genome of *Dugesia (Schmidtea) mediterranea* (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida). Molecular Biology and Evolution 13: 824–832, 1996.
- Castagnone-Sereno, P., Skantar, A., Robertson, L. Molecular tools for diagnostics. In: Jones, J., Gheysen, G., Fenoll, C. (Eds.). Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 443–463, 2011.
- Criscuolo, A., Gribaldo, S. BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. BioMed Central Evolutionary Biology 10(210): 1-21, 2010.
- Daniell, T. J., Davidson, J., Alexander, C. J., Caul, S., Roberts, D. M. Improved real-time PCR estimation of gene copy number in soil extracts using an artificial reference. Journal of Microbiological Methods, 91: 38-44, 2012.

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C. W. InfoStat version 2014. InfoStat Group, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Draisma, S. G. A., Eurlings, C. M., Lim, P. E. High intra-individual sequence variation in the nuclear rDNA LSU-5S intergenic spacer in the Sargassaceae (Fucales, Phaeophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 24: 1373-1379, 2012.

Favoreto, L., Santos, J. M., Calzavara, S. A., Lara, L. A. Estudo fitossanitário, multiplicação e taxonomia de nematoides encontrados em sementes de gramíneas forrageiras no Brasil. *Nematologia Brasileira*, 35(1-2): 20-35, 2011.

Ghelder, C. V., Reid, A., Kenyon, D., Esmenjaud, D. Development of a real-time PCR method for the detection of the dagger nematodes *Xiphinema index*, *X. diversicaudatum*, *X. vuittenezi* and *X. italiae*, and for the quantification of *X. index* numbers. *Plant Pathology*, 1-12, 2014. doi: 10.1111/ppa.12269

Hugall, A., Stanton, J., Moritz, C. Reticulate evolution and the origins of ribosomal internal transcribed spacer diversity in apomitic *Meloidogyne*. *Molecular Biology and Evolution* 16:157-164, 1999.

Ibrahim, S. K., Perry, R. N., Burrows, P. R., and Hooper, D. J. Differentiation of species and populations of *Aphelenchoides* and of *Ditylenchus angustus* using a fragment of ribosomal DNA. *Journal of Nematology* 26:412-421, 1994.

Katoh, K., Standley, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30:772-780, 2013. doi:10.1093/molbev/mst010

Lanave, C., Preparata, G., Saccone, C., Serio, G. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *Journal of Molecular Evolution*. v. 20, p. 86-93, 1984.

Luchi, N., Ghelardini, L., Belbahri, L., Quartier, Marion, Santini, A. Rapid detection of *Ceratocystis platani* inoculum by quantitative real-time PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17): 5394-5404, 2013.

McCuiston, J. L., Hudson, L. C., Subbotin, S. A., Davis, E. L., Warfield, C. Y. 2007. Conventional and PCR detection of *Aphelenchoides fragariae* in diverse ornamental host plant species. *Journal of Nematology*, 39(4): 343-355, 2007.

McTaggart S. J., Crease, T. J. Length variation in 18S rRNA expansion segment 43/e4 of *Daphnia obtusa*: ancient or recurring Polymorphism? *Journal of Molecular Evolution*, 69:142–149, 2009.

Miller M.A., Pfeiffer W., Schwartz T. "Creating the CIPRES Science Gateway for 14 inference of large phylogenetic trees. In: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, LA, pp. 1-8, 2010.

Naidoo K, Steenkamp E.T., Coetzee, M. P.A., Wingfield, M. J., Wingfield, B. D. Concerted evolution in the ribosomal RNA cistron. *PLoS ONE* 8(3): e59355. . 2013. doi:10.1371/journal.pone.0059355

Nakhla, M. K., Owens, K. J., Li, W., Wei, G., Skantar, A. M., and Levy, L. Multiplex realtime PCR assays for the identification of the potato cyst and tobacco cyst nematodes. *Plant Disease* 94:959-965, 2010.

Nyaku S.T., Sripathi V.R., Kantety R.V., Gu Y.Q., Lawrence K., Sharma, G. C. Characterization of the two intra-individual sequence Variants in the 18S rRNA Gene in the Plant Parasitic Nematode, *Rotylenchulus reniformis*. *PLoS ONE* 8(4): e60891, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0060891

Nylander J. A. A. MrModeltest v. 2.2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden, 2004.

Oliveira, C. M. G, Monteiro, A. R. & Blok, V. C. Morphological and molecular diagnostics for plant-parasitic nematodes: working together to get the identification done. *Tropical Plant Pathology*, 36(2): 65-73, 2011.

Rambaut, A. FigTree v 1.3.1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>, 2009.

Reid, A., Kenyon, D.M., Evans, F.F., Mulholland, V., Pickup, J., Blok, V.C., Paterson, A. and Phillips, M.S. (2010) Development of a high-throughput method for the detection and species determination of PCN. In: Haydock, P.P. (ed.). Proceedings of the 3rd Symposium on Potato Cyst Nematodes. The Association of Applied Biology, Harper Adams University College, England, UK, pp. 11-14.

Rodríguez, F., Oliver, J., Marín, A; Medina, J. The general stochastic model of nucleotide substitution. Journal of Theoretical Biology, 142: 485-501, 1990.

Rybarczyk-Mydlowska, K., Mooyman, P., Van Megen, H., Van Den Elsen, S., Vervoort, M., Veenhuizen, P., Van doorn, J., Dees, R., Karssen, G., Bakker, J. & Helder, J. Small subunit ribosomal DNA-based phylogenetic analysis of foliar nematodes (*Aphelenchoides* spp.) and their quantitative detection in complex DNA backgrounds. Phytopathology, 102(12): 1153-1160, 2012. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-05-12-0114-R>

Sayler, R. J., Walker, Goggin, F. L., Agudelo, P., Kirkpatrick, T. Conventional PCR detection and real time PCR quantification of reniform nematodes. Plant Disease, 96: 1757-1762, 2012.. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1033-RE>

Sharma, R. D., Cavalcante, M. J. B. & Valentim, J. F. Nematoides associados ao capim *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no estado do Acre, Brasil. Nematologia Brasileira, 35(2): 217-222, 2001.

Tavare, S. Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences. Lectures Mathematics Life Sciences, 17: 57-86, 1986.

Yan, G. P., Smiley, R. W., Okubara, P. A. Detection and quantification of *Pratylenchus thornei* in DNA extracted from soil using realtime PCR. Phytopathology, 102:14-22, 2012.

Yan, G. P., Smiley, R. W., Okubara, P. A., Skantar, A. M., and Reardon, C. L. Developing a real-time PCR assay for detection and quantification of *Pratylenchus neglectus* in soil. Plant Disease, 97:757-764, 2013.

Yao, Y., Nellaker, C., Karlsson, H. Evaluation of minor groove binding probe and Taqman probe PCR assays: influence of mismatches and template complexity on quantification. *Molecular and Cellular Probes*, 20: 311-316, 2006.

Ye, W. & Giblin-Davis R. M. Molecular characterization and development of real-time PCR assay for pine-wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). *PLoS ONE* 8(11): e78804, 2013.
doi:10.1371/journal.pone.0078804

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se comprovar a ocorrência de outra espécie morfologicamente similar a *A. besseyi*, associada às sementes de gramíneas forrageiras, mas geneticamente distintas. As reconstruções filogenéticas, a partir das regiões SSU e COI, indicaram que esta outra espécie trata-se de *A. fujianensis*, sendo este o seu primeiro relato no Brasil. Ainda, a similaridade morfológica entre as populações de *A. besseyi* e *A. fujianensis* caracterizadas neste trabalho, reforçam a necessidade de desenvolver métodos de detecção alternativos a identificação baseada na morfologia.

Comprovou-se que os primers e sondas específicos para a detecção *A. besseyi* e *A. fujianensis* foram eficientes ao detectar o DNA alvo extraído a partir de um único nematoide, reforçando a alta sensibilidade na detecção da técnica de PCR em tempo real. E ainda, o uso de qPCR, proporcionou maior rapidez (programa para amplificação com apenas 30 min) e capacidade de processamento de até 96 amostras/ corrida durante as análises fitossanitárias.

A identificação da coexistência de duas sequências distintas da região LSU em uma população de *A. besseyi* e a alta identidade de uma destas à *A. fujianensis* reforça a proximidade filogenética destas espécies e a necessidade de uma extensiva investigação para se estimar a frequência deste fenômeno. Apesar desta variabilidade intraindividual ter sido observada somente em uma população oriunda da Espanha, mais populações presentes no Brasil precisam também ser avaliadas para esta variabilidade, e esta informação será essencial para a validação do diagnóstico de detecção para *A. besseyi*.

A determinação da frequência de ocorrência de *A. besseyi* e *A. fujianensis* em mistura, em sementes de gramíneas forrageiras no Brasil, e ainda, testes de especificidade realizados em mais espécies de *Aphelenchoides*, auxiliarão no processo de validação destes protocolos diagnósticos.

Finalmente, a natureza da associação tanto de *A. besseyi* quanto *A. fujianensis* às gramíneas forrageiras ainda não foi esclarecida e estudos devem ser realizados.

ANEXO

Tabela 1. Dados morfométricos das populações de *Aphelenchoides fujianensis*. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (amplitude).

Caracteres	Fêmeas										
	DJ01 n=20	DJ02 n=20	DJ03 n=20	DJ04 n=20	DJ05F n=20	DJ06F n=20	DJ07F n=20	DJ08 n=20	DJ10 n=20	DJ11 n=20	DJ12F n=20
L (μm)	868,5 $\pm$ 40,2 (796,3-937,3)	817,6 $\pm$ 37,8 (732,6-887,3)	794,0 $\pm$ 38,9 (741,7-878,2)	832,4 $\pm$ 33,5 (750,8-878,2)	861,9 $\pm$ 39,4 (782,6-932,8)	855,4 $\pm$ 90,6 (650,7-991,9)	852,7 $\pm$ 51,8 (755,3-928,2)	631,6 $\pm$ 86,5 (473,7-752,3)	842,1 $\pm$ 49,5 (700,7-918,8)	751,2 $\pm$ 64,9 (622,3-872,9)	620,1 $\pm$ 35,5 (565,8-671,1)
Largura dos lábios (μm)	8,0 $\pm$ 0,3 (7,0-9,0)	7,9 $\pm$ 0,3 (7,0-8,0)	7,7 $\pm$ 0,4 (7,0-8,0)	8,0 $\pm$ 0,2 (7,0-8,0)	7,8 $\pm$ 0,4 (7,0-8,0)	7,7 $\pm$ 0,4 (7,0-8,0)	8,0 $\pm$ 0,3 (7,0-8,5)	7,2 $\pm$ 0,4 (6,5-8,0)	7,9 $\pm$ 0,3 (7,0-8,0)	6,8 $\pm$ 0,4 (6,0-7,0)	6,9 $\pm$ 0,3 (6,3-7,5)
Altura dos lábios (μm)	3,0 $\pm$ 0,1 (3,0-3,5)	3,0 $\pm$ 0,1 (3,0-3,5)	3,0 $\pm$ 0,1 (3,0-3,5)	3,1 $\pm$ 0,2 (3,0-3,5)	3,2 $\pm$ 0,3 (3,4-4,0)	3,0 $\pm$ 0,1 (3,0-3,5)	3,1 $\pm$ 0,3 (3,0-4,0)	3,1 $\pm$ 0,2 (3,0-3,5)	3,0 $\pm$ 0,0 (3,0-3,0)	3,0 $\pm$ 0,2 (2,5-3,0)	3,0 $\pm$ 0,3 (2,5-3,1)
Estilete (μm)	12,6 $\pm$ 0,3 (11,0-12,0)	12,5 $\pm$ 0,1 (11,0-11,5)	12,5 $\pm$ 0,0 (11,0-11,0)	12,7 $\pm$ 0,3 (11,0-12,0)	12,8 $\pm$ 0,4 (11,0-12,0)	12,5 $\pm$ 0,3 (10,0-12,0)	12,5 $\pm$ 0,0 (11,0-11,0)	12,3 $\pm$ 0,5 (10,0-11,5)	12,5 $\pm$ 0,4 (10,0-12,0)	11,7 $\pm$ 0,3 (10,0-11,0)	12,2 $\pm$ 0,4 (10,9-12,8)
Extr. anterior até centro do metacorpo (μm)	71,9 $\pm$ 2,7 (66,5-79,0)	70,0 $\pm$ 1,8 (67,0-73,0)	68,2 $\pm$ 1,9 (63,0-71,0)	67,8 $\pm$ 2,0 (65,0-72,0)	68,6 $\pm$ 1,9 (62,0-71,0)	72,7 $\pm$ 3,0 (67,0-78,0)	69,2 $\pm$ 1,0 (67,0-71,0)	65,8 $\pm$ 2,6 (60,0-71,0)	67,1 $\pm$ 2,7 (64,0-71,0)	63,0 $\pm$ 1,9 (59,5-67,0)	55,8 $\pm$ 6,5 (35,6-65,6)
Extr. anterior até início do metacorpo (μm)	61,0 $\pm$ 2,1 (57,4-64,4)	60,3 $\pm$ 2,1 (57,4-66,3)	58,4 $\pm$ 1,6 (54,4-61,4)	57,8 $\pm$ 1,9 (54,4-62,4)	57,9 $\pm$ 1,7 (53,5-61,4)	62,0 $\pm$ 2,5 (56,4-65,3)	58,9 $\pm$ 1,4 (55,4-61,4)	57,0 $\pm$ 2,1 (53,0-62,0)	57,0 $\pm$ 2,4 (54,5-61,4)	54,9 $\pm$ 2,0 (51,0-59,0)	46,8 $\pm$ 6,7 (25,6-56,3)
Comp. do metacorpo (μm)	19,5 $\pm$ 1,1 (17,0-21,0)	19,0 $\pm$ 0,9 (17,0-20,0)	18,9 $\pm$ 1,1 (17,0-21,0)	18,7 $\pm$ 0,7 (14,0-15,0)	19,2 $\pm$ 0,7 (13,0-16,0)	19,6 $\pm$ 1,1 (12,0-17,0)	18,8 $\pm$ 1,1 (13,0-16,0)	17,4 $\pm$ 1,4 (10,0-15,0)	18,8 $\pm$ 1,2 (14,0-16,0)	15,8 $\pm$ 0,5 (10,0-12,0)	17,7 $\pm$ 1,1 (15,6-20,0)
Largura do metacorpo (μm)	14,6 $\pm$ 0,9 (13,0-16,0)	14,2 $\pm$ 0,6 (13,0-15,0)	14,2 $\pm$ 0,6 (13,0-15,0)	14,8 $\pm$ 0,4 (17,0-20,0)	14,6 $\pm$ 0,8 (18,0-21,0)	15,1 $\pm$ 1,2 (17,0-21,0)	14,8 $\pm$ 0,8 (17,0-20,0)	13,0 $\pm$ 1,3 (15,0-20,0)	14,8 $\pm$ 0,7 (16,0-21,0)	10,8 $\pm$ 0,6 (15,0-17,0)	12,4 $\pm$ 1,1 (10,0-14,4)
Comp. PUS (μm)	54,6 $\pm$ 6,0 (39,0-67,0)	58,4 $\pm$ 6,0 (50,0-72,0)	53,3 $\pm$ 4,0 (46,0-61,0)	51,5 $\pm$ 4,8 (43,0-60,0)	51,7 $\pm$ 5,7 (45,0-61,0)	52,6 $\pm$ 4,4 (42,0-61,0)	53,4 $\pm$ 4,3 (46,0-61,0)	53,1 $\pm$ 6,1 (40,0-66,0)	52,6 $\pm$ 4,3 (43,0-60,0)	69,5 $\pm$ 6,9 (50,0-85,0)	42,7 $\pm$ 11,5 (28,1-60,6)
PUS/V-A% ¹	31,5 $\pm$ 3,7 (22,6-33,5)	34,7 $\pm$ 2,7 (29,3-40,6)	34,5 $\pm$ 2,4 (28,8-38,1)	30,5 $\pm$ 2,8 (25,6-35,6)	30,2 $\pm$ 3,1 (26,0-35,9)	32,2 $\pm$ 3,3 (24,9-38,0)	35,2 $\pm$ 3,2 (29,2-44,9)	31,6 $\pm$ 3,3 (23,7-35,7)	34,3 $\pm$ 3,2 (29,6-40,0)	35,6 $\pm$ 5,1 (24,1-43,5)	25,8 $\pm$ 7,7 (16,3-37,0)
Diâmetro máximo do corpo (μm)	22,7 $\pm$ 1,4 (20,8-24,8)	23,1 $\pm$ 1,7 (19,8-27,7)	24,1 $\pm$ 1,4 (21,8-27,7)	22,1 $\pm$ 1,3 (19,8-24,8)	22,5 $\pm$ 1,3 (19,8-24,8)	24,4 $\pm$ 2,3 (18,8-27,7)	22,6 $\pm$ 1,0 (20,8-24,8)	20,7 $\pm$ 2,1 (17,0-25,0)	24,9 $\pm$ 1,5 (19,8-26,7)	17,4 $\pm$ 1,7 (14,0-20,0)	17,9 $\pm$ 1,4 (14,4-20,0)
Cauda (μm)	50,7 $\pm$ 3,2 (43,5-56,8)	42,5 $\pm$ 1,8 (39,1-45,3)	45,8 $\pm$ 2,5 (41,7-52,4)	47,6 $\pm$ 2,6 (43,5-54,2)	46,8 $\pm$ 2,8 (42,6-54,2)	46,7 $\pm$ 2,8 (40,9-51,5)	46,4 $\pm$ 2,4 (42,6-50,6)	40,7 $\pm$ 4,2 (34,5-48,4)	48,0 $\pm$ 2,7 (42,6-52,4)	48,2 $\pm$ 3,3 (43,0-55,0)	38,6 $\pm$ 2,2 (34,9-42,8)
Diâmetro ânus (μm)	13,7 $\pm$ 0,6 (12,4-14,9)	13,4 $\pm$ 0,7 (12,9-14,9)	13,2 $\pm$ 1,0 (11,9-13,9)	13,3 $\pm$ 0,7 (11,9-14,9)	13,1 $\pm$ 0,7 (11,9-14,9)	15,0 $\pm$ 1,4 (11,9-17,8)	13,6 $\pm$ 0,9 (12,9-15,8)	12,9 $\pm$ 1,4 (11,0-15,0)	14,5 $\pm$ 1,1 (11,9-16,8)	10,8 $\pm$ 0,7 (10,0-12,0)	10,9 $\pm$ 0,6 (10,0-11,9)
a	38,3 $\pm$ 2,0 (35,1-42,0)	35,6 $\pm$ 2,7 (30,4-41,1)	33,1 $\pm$ 1,7 (30,7-37,0)	37,7 $\pm$ 2,6 (33,5-42,3)	38,4 $\pm$ 2,3 (33,5-42,2)	35,1 $\pm$ 1,9 (30,2-38,2)	37,7 $\pm$ 2,1 (34,4-41,6)	30,5 $\pm$ 3,1 (23,7-34,5)	33,8 $\pm$ 1,6 (31,0-36,6)	43,3 $\pm$ 2,6 (38,8-47,9)	34,8 $\pm$ 2,5 (30,5-40,3)
c	17,2 $\pm$ 0,9 (15,7-19,2)	19,2 $\pm$ 0,8 (17,9-20,6)	17,4 $\pm$ 1,2 (15,6-21,0)	17,5 $\pm$ 1,0 (15,6-19,9)	18,5 $\pm$ 1,2 (16,5-20,6)	18,3 $\pm$ 1,5 (14,9-20,3)	18,4 $\pm$ 1,0 (16,9-20,1)	15,5 $\pm$ 1,6 (11,0-18,4)	17,6 $\pm$ 0,7 (16,4-18,8)	15,6 $\pm$ 1,4 (12,5-18,2)	16,0 $\pm$ 0,9 (14,0-17,7)
c'	3,7 $\pm$ 0,3 (3,3-4,3)	3,2 $\pm$ 0,2 (2,8-3,5)	3,5 $\pm$ 0,3 (3,0-4,1)	3,6 $\pm$ 0,3 (3,1-4,2)	3,6 $\pm$ 0,3 (3,1-4,2)	3,1 $\pm$ 0,3 (2,6-3,7)	3,4 $\pm$ 0,2 (2,9-3,8)	3,2 $\pm$ 0,2 (2,6-3,6)	3,3 $\pm$ 0,2 (2,9-3,7)	4,5 $\pm$ 0,3 (4,0-5,4)	3,6 $\pm$ 0,3 (3,0-4,1)
V%	68,1 $\pm$ 1,1 (65,2-69,7)	69,4 $\pm$ 1,4 (67,0-72,8)	68,4 $\pm$ 1,0 (66,9-70,5)	68,8 $\pm$ 1,4 (66,3-71,1)	69,3 $\pm$ 1,0 (67,5-71,1)	70,0 $\pm$ 1,1 (68,2-72,0)	70,0 $\pm$ 1,6 (68,0-74,4)	69,2 $\pm$ 2,1 (66,7-73,5)	68,9 $\pm$ 0,8 (67,6-70,5)	69,5 $\pm$ 2,0 (65,6-73,4)	68,9 $\pm$ 1,4 (65,9-71,7)

¹PUS/V-A%= comprimento do saco pós-vulval pela distância da vulva ao ânus em porcentagem.

Tabela 2. Dados morfométricos das populações de *Aphelenchoides fujianensis* e *A. besseyi*. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (amplitude).

Caracteres	Fêmeas									
	DJ13 n=20	DJ14 n=20	DJ15F n=20	DJ16 n=20	DJ17 n=20	DJ06S n=9	DJ07S n=13	DJ12S n=4	DJ15S n=14	DJ18S n=20
L (μ m)	602,8 $\pm$ 33,8 (543,4-668,7)	631,1 $\pm$ 34,6 (571,2-678,0)	633,0 $\pm$ 42,1 (575,9-752,3)	646,2 $\pm$ 31,5 (585,1-710,5)	629,5 $\pm$ 24,2 (58,8-664,1)	674,4 $\pm$ 51 (611,8-756,6)	680,2 $\pm$ 46,9 (579,0-763,2)	654,6 $\pm$ 46,4 (605,3-717,1)	685,6 $\pm$ 43,3 (618,4-750,0)	686,8 $\pm$ 45,6 (617,7-775,6)
Largura dos lábios (μ m)	7,1 $\pm$ 0,2 (7,0-8,0)	7,2 $\pm$ 0,4 (7,0-8,0)	7,1 $\pm$ 0,2 (7,0-8,0)	7,2 $\pm$ 0,3 (7,0-8,0)	7,0 $\pm$ 0,0 (7,0-7,0)	6,5 $\pm$ 0,3 (6,3-6,9)	6,3 $\pm$ 0,2 (6,3-6,9)	6,5 $\pm$ 0,3 (6,3-6,9)	6,6 $\pm$ 0,8 (6,3-9,4)	6,5 $\pm$ 0,4 (6,0-7,0)
Altura dos lábios (μ m)	3,0 $\pm$ 0,0 (3,0-3,0)	3,0 $\pm$ 0,0 (3,0-3,0)	3,2 $\pm$ 0,4 (3,0-4,0)	3,0 $\pm$ 0,1 (3,0-3,5)	3,0 $\pm$ 0,0 (3,0-3,0)	3,0 $\pm$ 0,2 (2,5-3,1)	3,0 $\pm$ 0,3 (2,5-3,1)	3,1 [#] ...	3,0 $\pm$ 0,2 (2,5-3,1)	3,0 $\pm$ 0,0 (3,0-3,0)
Estilete (μ m)	12,5 $\pm$ 0,2 (10,5-11,5)	12,5 $\pm$ 0,2 (10,0-11,0)	12,4 $\pm$ 0,3 (10,0-11,0)	12,6 $\pm$ 0,2 (11,0-12,0)	12,5 $\pm$ 0,2 (10,0-11,0)	10,9 [#] ...	11,5 ...	...	...	11,4 $\pm$ 0,5 (9,0-11,0)
Extr. anterior até centro do metacorpo (μ m)	63,7 $\pm$ 3,3 (58,0-70,0)	69,2 $\pm$ 2,5 (65,0-74,0)	66,4 $\pm$ 1,4 (64,0-69,0)	67,0 $\pm$ 1,9 (63,0-72,0)	66,7 $\pm$ 2,0 (63,5-70,0)	60,6 $\pm$ 5,1 (54,4-69,4)	60,4 $\pm$ 3,3 (54,0-65,6)	53,3 $\pm$ 6,0 (46,3-56,9)	61,4 $\pm$ 3,8 (53,8-67,5)	64,5 $\pm$ 3,3 (58,0-74,0)
Extr. anterior até início do metacorpo (μ m)	54,5 $\pm$ 2,9 (50,0-60,0)	59,9 $\pm$ 2,1 (57,0-64,0)	56,4 $\pm$ 1,5 (55,0-59,0)	57,5 $\pm$ 1,7 (5,0-62,0)	57,5 $\pm$ 2,0 (55,0-61,0)	53,9 $\pm$ 4,5 (48,1-61,9)	53,3 $\pm$ 3,4 (47,4-58,8)	46,1 $\pm$ 6,5 (38,8-50,0)	53,8 $\pm$ 3,1 (47,5-59,4)	56,1 $\pm$ 3,7 (50,0-66,0)
Comp. do metacorpo (μ m)	17,2 $\pm$ 1,0 (11,0-14,5)	18,0 $\pm$ 0,8 (13,0-15,0)	19,6 $\pm$ 0,8 (14,0-16,0)	18,7 $\pm$ 0,8 (13,0-15,5)	18,2 $\pm$ 0,7 (12,0-19,0)	13,6 $\pm$ 1,1 (11,9-15,6)	13,9 $\pm$ 0,8 (13,1-15,6)	13,6 $\pm$ 0,6 (13,1-14,4)	13,8 $\pm$ 0,8 (11,9-15,0)	14,5 $\pm$ 0,7 (8,0-11,0)
Largura do metacorpo (μ m)	12,5 $\pm$ 0,9 (15,0-19,0)	14,0 $\pm$ 0,6 (17,0-19,0)	14,9 $\pm$ 0,5 (18,0-21,0)	14,2 $\pm$ 0,6 (17,0-20,0)	13,5 $\pm$ 1,4 (17,0-19,0)	8,1 $\pm$ 0,5 (7,5-8,8)	8,0 $\pm$ 0,7 (6,9-8,8)	8,3 $\pm$ 0,6 (7,5-8,8)	9,0 $\pm$ 1,2 (7,5-12,5)	8,7 $\pm$ 0,9 (13,0-16,0)
Comprimento PUS (μ m)	50,4 $\pm$ 4,2 (42,0-59,0)	48,0 $\pm$ 4,4 (41,0-56,0)	56,0 $\pm$ 5,9 (45,0-69,0)	56,8 $\pm$ 5,8 (49,0-72,0)	52,4 $\pm$ 6,4 (42,0-65,0)	33,5 $\pm$ 4,8 (25,6-38,8)	42,5 $\pm$ 8,8 (35,0-62,5)	39,2 $\pm$ 0,7 (38,8-40,0)	40,1 $\pm$ 5,0 (34,4-46,9)	46,9 $\pm$ 10,3 (35,0-74,0)
PUS/V-A% ¹	31,9 $\pm$ 2,3 (28,0-36,3)	31,1 $\pm$ 2,5 (26,3-35,1)	36,3 $\pm$ 3,4 (30,0-41,5)	33,8 $\pm$ 2,6 (27,6-38,4)	31,1 $\pm$ 3,5 (26,1-37,1)	22,0 $\pm$ 3,7 (17,5-28,9)	28,7 $\pm$ 5,5 (23,5-38,9)	24,6 $\pm$ 2,3 (22,4-27,0)	25,6 $\pm$ 3,8 (20,2-30,8)	29,7 $\pm$ 7,0 (19,7-49,0)
Diâmetro máximo do corpo (μ m)	19,4 $\pm$ 1,5 (17,0-22,0)	20,1 $\pm$ 1,3 (16,0-22,0)	20,7 $\pm$ 1,2 (19,0-23,0)	21,8 $\pm$ 2,0 (17,0-26,0)	19,1 $\pm$ 1,0 (16,0-20,0)	14,2 $\pm$ 1,4 (12,5-15,6)	13,9 $\pm$ 1,1 (12,5-15,6)	15,0 $\pm$ 1,0 (13,8-16,3)	16,1 $\pm$ 0,9 (15,0-18,8)	15,0 $\pm$ 2,0 (11,0-21,0)
Cauda (μ m)	36,1 $\pm$ 3,8 (28,1-45,6)	37,6 $\pm$ 3,3 (26,9-42,1)	38,4 $\pm$ 2,9 (33,0-43,3)	38,8 $\pm$ 2,8 (35,1-49,1)	39,7 $\pm$ 2,5 (34,3-43,3)	39,1 $\pm$ 2,9 (34,4-44,4)	39,1 $\pm$ 2,6 (34,4-43,1)	41,9 $\pm$ 4,8 (37,5-48,8)	39,3 $\pm$ 1,4 (37,5-41,3)	41,7 $\pm$ 2,9 (35,0-47,0)
Diâmetro ânus (μ m)	11,2 $\pm$ 0,6 (10,0-13,0)	13,1 $\pm$ 0,9 (11,0-14,0)	11,6 $\pm$ 0,9 (10,0-14,0)	12,3 $\pm$ 0,7 (11,0-14,0)	11,7 $\pm$ 0,6 (10,5-13,0)	9,4 $\pm$ 1,3 (7,5-11,9)	9,0 $\pm$ 0,6 (8,1-10,0)	9,7 $\pm$ 0,3 (9,4-10,0)	9,7 $\pm$ 0,5 (9,4-11,3)	9,7 $\pm$ 0,7 (8,0-11,0)
a	31,3 $\pm$ 2,0 (28,6-35,8)	31,5 $\pm$ 2,2 (27,9-36,6)	30,7 $\pm$ 3,0 (26,3-37,6)	29,8 $\pm$ 2,9 (24,1-37,4)	33,1 $\pm$ 2,4 (30,2-39,5)	47,8 $\pm$ 3,1 (41,8-50,8)	49,1 $\pm$ 3,9 (44,1-58,1)	43,8 $\pm$ 5,6 (40,0-52,0)	42,8 $\pm$ 3,5 (36,5-47,6)	46,5 $\pm$ 5,7 (33,8-59,5)
c	16,8 $\pm$ 1,5 (13,5-19,9)	16,9 $\pm$ 1,7 (14,4-21,8)	16,5 $\pm$ 1,2 (15,0-19,7)	16,8 $\pm$ 1,4 (13,0-19,6)	15,9 $\pm$ 0,9 (14,4-17,8)	17,3 $\pm$ 0,9 (16,3-18,5)	17,4 $\pm$ 1,2 (15,2-19,1)	15,8 $\pm$ 2,5 (13,2-19,1)	17,5 $\pm$ 1,1 (15,7-19,8)	16,5 $\pm$ 1,2 (14,6-19,2)
c'	3,2 $\pm$ 0,3 (2,7-4,1)	2,9 $\pm$ 0,3 (1,9-3,3)	3,3 $\pm$ 0,4 (2,4-4,0)	3,2 $\pm$ 0,3 (2,7-4,3)	3,4 $\pm$ 0,3 (2,0-3,8)	4,2 $\pm$ 0,5 (3,2-4,6)	4,4 $\pm$ 0,3 (3,9-5,1)	4,3 $\pm$ 0,4 (4,0-4,9)	4,0 $\pm$ 0,2 (3,6-4,4)	4,3 $\pm$ 0,4 (3,4-5,0)
V%	71,0 $\pm$ 1,6 (67,5-74,4)	70,8 $\pm$ 2,7 (62,1-75,6)	70,1 $\pm$ 2,3 (65,4-75,0)	70,2 $\pm$ 1,6 (67,2-73,8)	69,9 $\pm$ 1,3 (67,4-71,6)	70,9 $\pm$ 1,3 (68,7-72,7)	71,9 $\pm$ 1,4 (70,3-76,0)	69,6 $\pm$ 0,8 (68,7-70,6)	70,8 $\pm$ 1,5 (68,3-73,3)	70,8 $\pm$ 1,6 (68,4-73,7)

¹PUS/V-A%= comprimento do saco pós-vulvar pela distância da vulva ao ânus em porcentagem.

Tabela 3. Dados morfométricos de machos de *A. besseyi*. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (amplitude).

Caracteres	Machos				
	DJ06S n=2	DJ07S n=1	DJ11 n=20	DJ15S n=2	DJ18S n=20
L (μm)	575,6 (565,8-585,5)	592,1	619,0 $\pm$ 65,7 (487,6-752,3)	585,5 (579,0-592,0)	538,0 $\pm$ 41,5 (455,1-617,7)
Largura dos lábios (μm)	6,3 6,3	6,3	6,5 $\pm$ 0,4 (6,0-7,0)	6,3 6,3	6,4 $\pm$ 0,4 (6,0-7,0)
Altura dos lábios (μm)	2,8 (2,5-3,1)	3,1	2,9 $\pm$ 0,2 (2,5-3,0)	2,8 (2,5-3,1)	3,0 $\pm$ 0,0 ...
Estilete (μm)		...	11,2 $\pm$ 0,4 (9,0-10,0)	...	11,1 $\pm$ 0,6 (9,5-12,0)
Extr. anterior até centro do metacorpo (μm)	57,5 (55,0-60,0)	57,5	58,4 $\pm$ 1,9 (55,0-61,0)	57,5 (56,3-58,8)	59,4 $\pm$ 3,4 (50,0-67,0)
Extr. anterior até início do metacorpo (μm)	50,3 (48,1-52,5)	50,6	51,2 $\pm$ 1,4 (49,0-53,0)	50,9 (50,0-51,9)	51,6 $\pm$ 3,4 (43,0-59,0)
Comp. do metacorpo (μm)	13,2 (12,5-13,8)	12,5	14,4 $\pm$ 0,7 (13,0-15,0)	12,5 12,5	13,8 $\pm$ 1,0 (13,0-16,0)
Largura do metacorpo (μm)	8,8 (8,1-9,4)	8,1	10,2 $\pm$ 0,6 (9,0-11,0)	10,3 (8,8-11,9)	8,7 $\pm$ 0,7 (8,0-10,0)
Diâmetro máximo do corpo (μm)	13,4 (13,1-13,8)	13,8	16,6 $\pm$ 1,7 (12,5-19,0)	14,7 (13,8-15,6)	14,6 $\pm$ 0,9 (13,0-16,0)
Cauda (μm)	31,9 (29,0-34,9)	35,5	33,4 $\pm$ 3,2 (28,3-41,2)	35,2 (34,2-36,2)	31,9 $\pm$ 3,2 (24,2-39,1)
Diâmetro ânus (μm)	11,3 (11,3)	10,6	12,6 $\pm$ 0,8 (11,0-14,0)	11,6 (11,3-11,9)	11,4 $\pm$ 0,5 (10,5-12,0)
a	43,6 (43,2-44,0)	43,1	37,5 $\pm$ 2,9 (32,0-44,3)	40,0 (37,9-42,1)	35,1 $\pm$ 8,8 (32,5-42,5)
c	18,4 (17,4-19,5)	16,7	18,6 $\pm$ 1,6 (16,0-22,5)	16,7 (16,0-17,3)	17,0 $\pm$ 1,8 (12,6-20,0)
c'	2,8 (2,6-3,1)	3,3	2,7 $\pm$ 0,3 (2,4-3,2)	3,0 (3,0)	2,6 $\pm$ 0,7 (2,2-3,3)
Espículos	14,8 (14,5-15,1)	17,1	18,3 $\pm$ 2,1 (13,4-22,7)	17,8 (16,5-19,1)	14,1 $\pm$ 1,3 (12,4-17,0)

Tabela 4. Amostras de sementes de gramíneas forrageiras usadas para extração de *Aphelenchoides besseyi* para multiplicação in vitro.

Amostra	Hospedeiro	Origem/ Instituição	Cultivado em <i>Fusarium solani</i>
1	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. BRS Piatã	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Sim
2	<i>B. decumbens</i> cv. Basilisk	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Sim
3	<i>B. decumbens</i> cv. Basilisk	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Sim
4	<i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça	desconhecida	Sim
5	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
6	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
7	<i>P. maximum</i> cv. Tanzânia 1	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
8	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Sim
9	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Sim
10	<i>B. brizantha</i> cv. Xaraes	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
11	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
12	Forrageira não identificada	-	Sim
13	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Sim
14	<i>B. decumbens</i> cv. Basilisk	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
15	<i>B. brizantha</i>	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Sim
16	<i>B. decumbens</i>	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Sim
17	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
18	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
19	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
20	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
21	<i>B. brizantha</i> cv. Xaraes	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
22	<i>B. brizantha</i> cv. Xaraes	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
23	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
24	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
25	<i>B. brizantha</i> cv. BRS Piatã	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
26	<i>B. humidicola</i> cv. Llanero	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
27	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
28	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
29	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
30	<i>P. maximum</i> cv. Tanzania	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
31	<i>B. brizantha</i> cv. BRS Piatã	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
32	<i>B. humidicola</i> cv. Tupi	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
33	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
34	<i>B. decumbens</i> cv. Basilisk	desconhecida	Não
35	<i>B. brizantha</i> cv. BRS Piatã	desconhecida	Não
36	<i>B. humidicola</i> cv. Llanero	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
37	<i>B. decumbens</i> cv. Basilisk	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
38	<i>B. decumbens</i> cv. Basilisk	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
39	<i>P. maximum</i> cv. Massai	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
40	<i>B. brizantha</i> cv. MG-5	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
41	<i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não

42	<i>B. decumbens</i> cv. Basilisk	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
43	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
44	<i>B. brizantha</i> cv. Xaraes	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
45	<i>B. decumbens</i> cv. Basilisk	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
46	<i>P. maximum</i> cv. Tanzânia 1	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
47	<i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
48	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
49	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não
50	<i>B. decumbens</i> cv. Basilisk	Empresa de Comércio e Exportação de Sementes	Não