

Nematoides de parte aérea

Gêneros *Aphelenchoides* e *Bursaphelenchus*

Viroses transmitidas por nematoides

Gêneros *Xiphinema* e *Paratrichodorus*

Nematoides em plantas ornamentais

23/11/18



Cláudio Marcelo G. de Oliveira
Instituto Biológico

CEP 13001 970, Caixa Postal 70, Campinas, SP
marcelo@biologico.sp.gov.br

Nematologia (LFN-0512)

09 de Novembro de 2018
ESALQ/USP

<http://www.biologico.sp.gov.br/>

Secretaria de Agricultura e Abastecimento
Instituto Biológico (IB)

GOVERNO DO ESTADO
SÃO PAULO

Quando o assunto é sanidade

apta
Agência Paulista de
Tecnologia das
Agronegócios

SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

O Instituto Biológico | Publicações | Notícias | Programas em P&D | Produtos e Serviços | Coleções | Pós-Graduação | Estágios

Quarta-Feira, 17 de Agosto de 2016

O Instituto Biológico

- » Missão
- » Quem somos
- » Direção
- » Unidades de pesquisa
- » Transferência do conhecimento
- » Administração
- » Centro de Memória
- » Museu
- » Organograma
- » Localização
- » Video Institucional

Home > O Instituto Biológico > Missão

Missão

Desenvolver e transferir conhecimento científico e tecnológico para o negócio agrícola nas áreas de sanidade animal e vegetal, suas relações com o meio ambiente, visando a melhoria da qualidade de vida da população.

Visão

Consolidar-se, até 2020, como um centro de referência em excelência técnico-científico nas áreas de sanidade animal e vegetal, comprometido com o desenvolvimento sustentável.

Valores

- » Comprometimento institucional e com a sociedade
- » Imparcialidade nos procedimentos internos e externos
- » Transparência na gestão

Busca

Unidades de pesquisa

Centro de P&D de Sanidade Animal

Centro de P&D de Sanidade Vegetal

Centro de P&D de Proteção Ambiental

Centro Experimental Central do Instituto Biológico

Centro de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola

Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bastos

Instituto Biológico



São Paulo, SP



Campinas, SP



Centro Experimental Central do Instituto Biológico

CENTRO AVANÇADO DE PESQUISA EM PROTEÇÃO DE PLANTAS E SAÚDE ANIMAL

Alameda dos Vidoeiros, 1097, Campinas, SP



LABORATÓRIOS:

- Acarologia
- Bacteriologia vegetal
- Fitopatologia
- Nematologia
- Controle biológico
- Ciência das plantas daninhas
- Entomologia econômica



Diagnóstico de nematoides parasitos de plantas

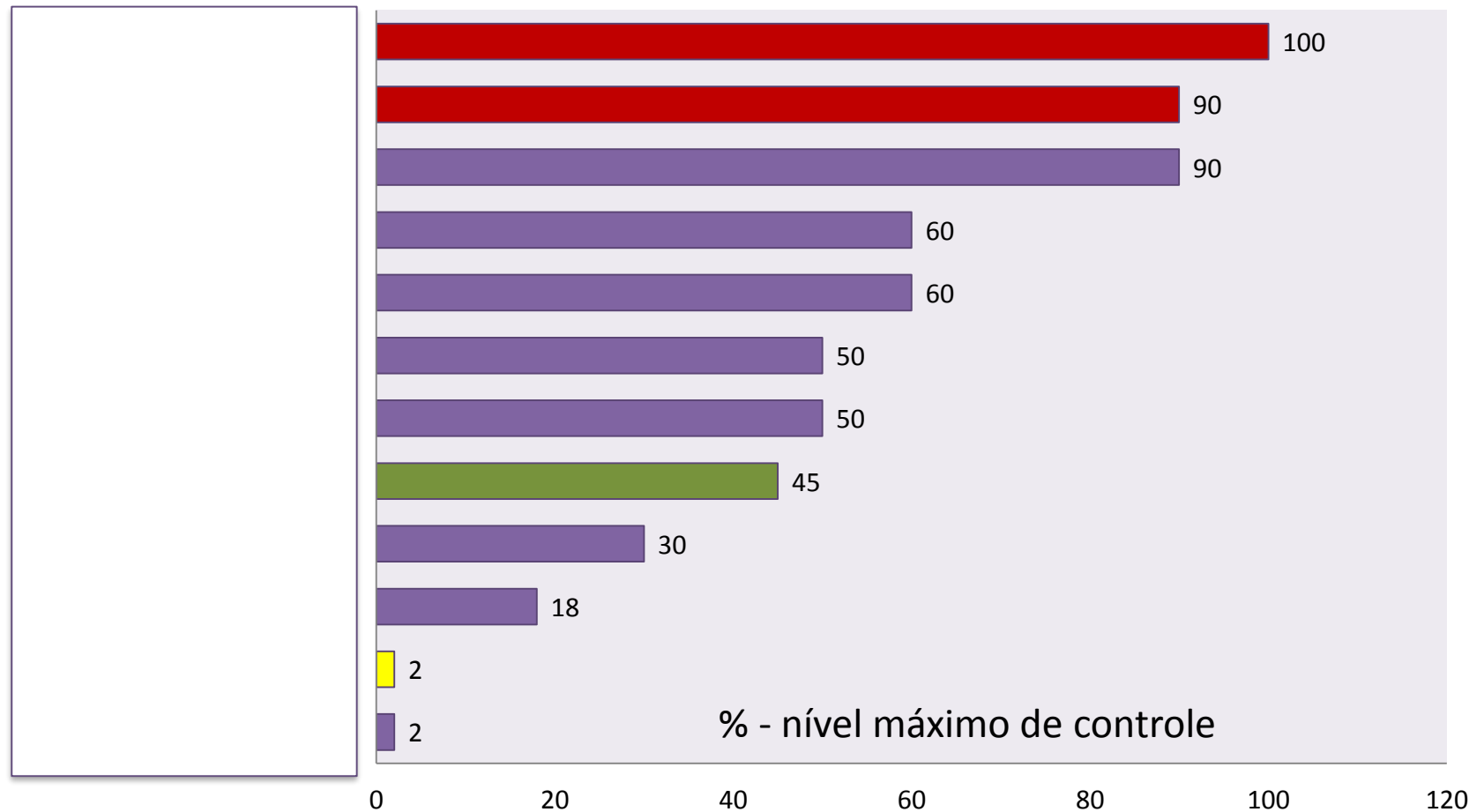
Desenvolvimento de métodos por biologia molecular para caracterização de fitonematoïdes e nematoides entomopatogenicos

Patogenicidade de nematoides na cultura do café

Desenvolvimento de técnicas de manejo de nematoides fitoparasitas nas principais culturas de importância econômica

- Por exemplo: resistência, solarização, hidrotérmodoterapia, controle químico e controle biológico

ESTIMATIVA DOS NÍVEIS DE CONTROLE DE NEMATOIDES PARASITOS DE PLANTAS ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE METODOLOGIAS DE CONTROLE



NEMATOIDES ASSOCIADOS ÀS PLANTAS

- Quais partes da planta os nematoides podem parasitar?

podem afetar todas as partes da planta

órgãos subterrâneos (raízes,
rizomas, tubérculos e bulbos)

parte aérea (caules, folhas e flores).



NEMATOIDES DE PARTE AÉREA

Família APHELENCHOIDIDAE

Morfologia :

Estilete fino, delicado

Esôfago com metacorpo (bulbo mediano) desenvolvido e sem istmo

Glândulas em longo lobo recobrindo o início do intestino pelo lado dorsal

Subfamília APHELENCHOIDINAE

Asas caudais (bursa) ausentes

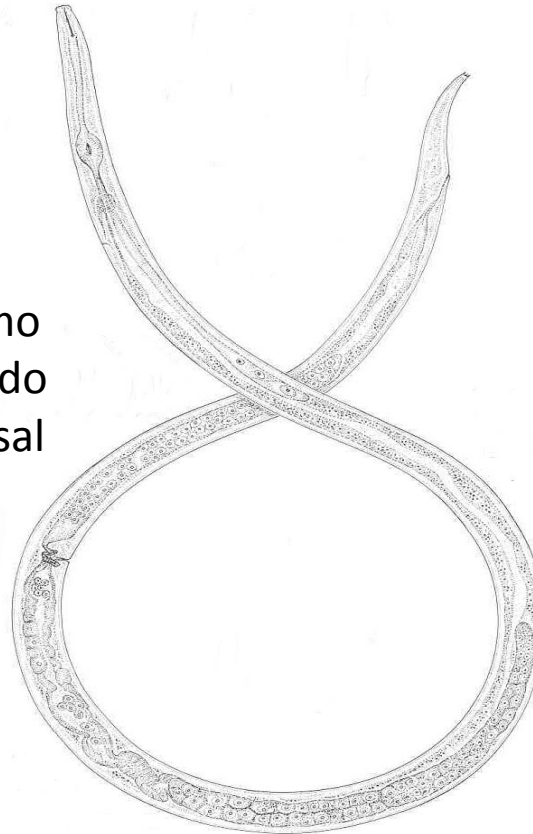
Gênero *Aphelenchoides*

Subfamília

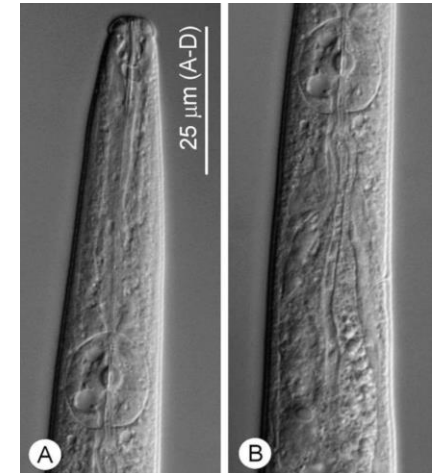
PARASITAPHELENCHINAE

Ponta da cauda do macho com bursa rudimentar

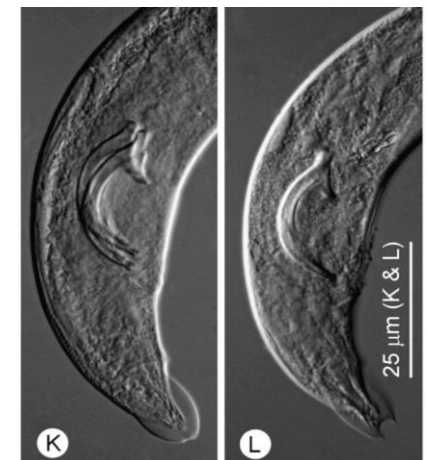
Gênero *Bursaphelenchus*



Aphelenchoides besseyi

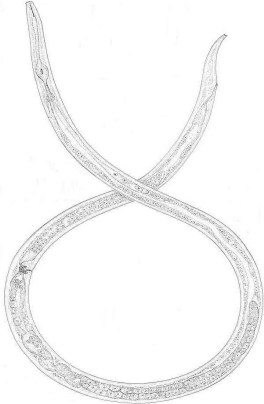


Bursaphelenchus masseyi



NEMATOIDES DE PARTE AÉREA

Aphelenchoides

Nome comum	morfologia da fêmea	Espécies	Hábito de parasitismo	Sintoma
Nematoides de parte aérea		<i>A. fragariae</i> <i>A. besseyi</i> <i>A. ritzemabosi</i>	Endo ou ectoparasito migrador	folhas com coloração anormal, necróticas e tamanho reduzido



Gênero *Aphelenchoides*

cerca de 200 espécies descritas

- embora nem todas válidas ou aceitas
- 153 espécies válidas até 2008 (Hunt, 2008)
 - +9 espécies descritas após 2008.
- incluem-se principalmente formas micófagas, ou seja, que se nutrem básica e exclusivamente de fungos.

habilidade de parasitar plantas

- tecidos dos órgãos aéreos, chegando a causar danos e perdas consideráveis em muitos casos.
- *Aphelenchoides besseyi*, *A. fragariae*, *A. ritzemabosi* e *A. arachidis*

Aphelenchoides spp. em folhas de plantas ornamentais, morango e arroz

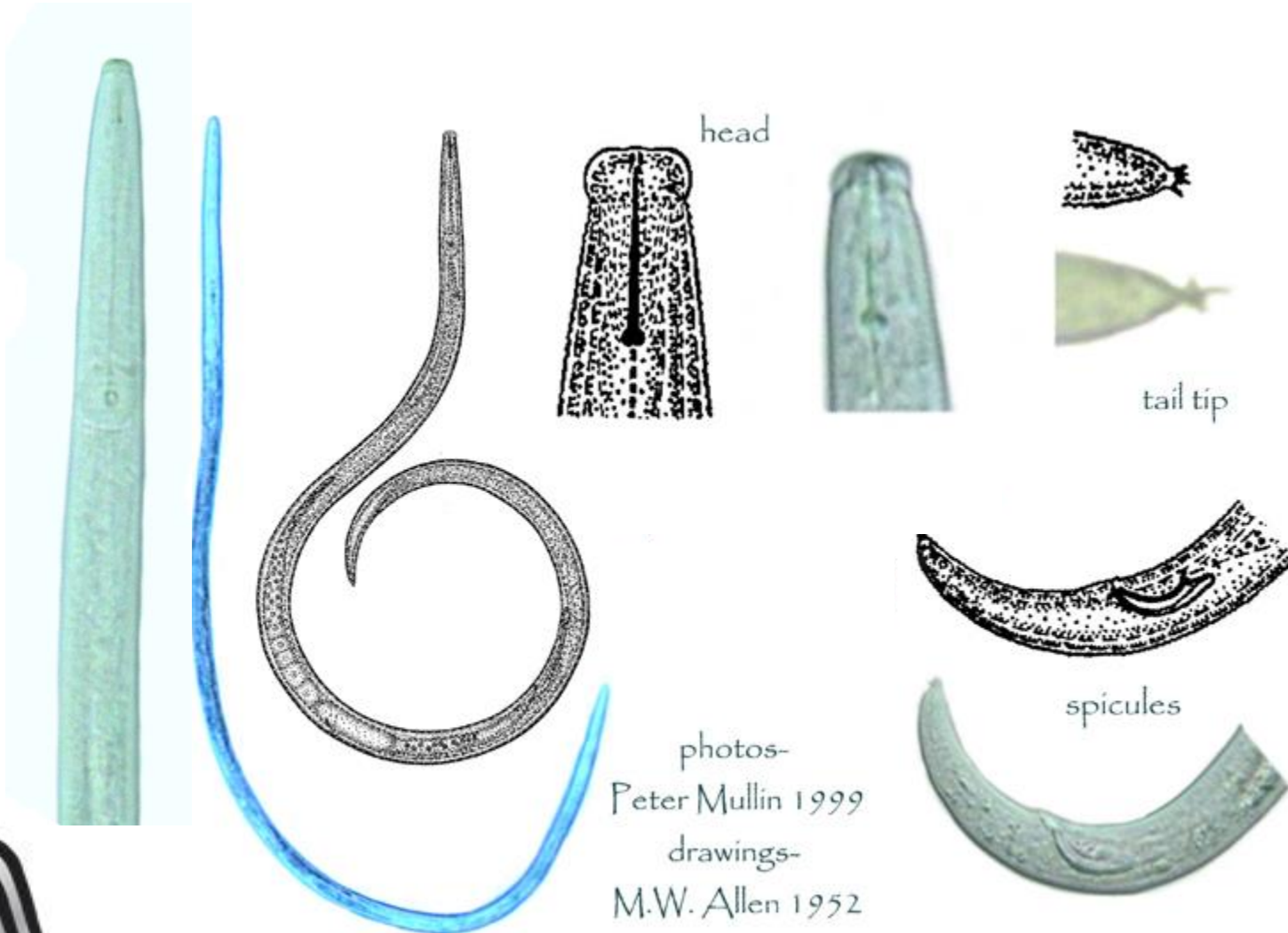
associação de espécies de *Aphelenchoides* com sementes de gramíneas forrageiras produzidas no Brasil

soja louca II ou “haste verde da soja”

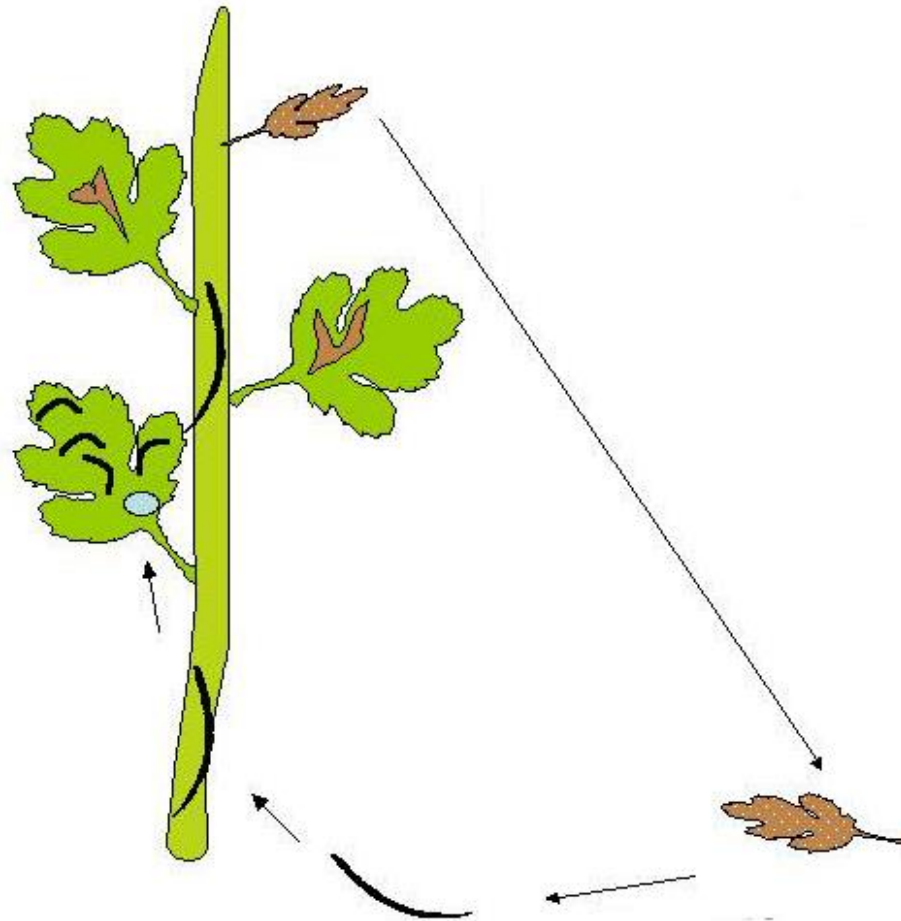
algodão



Aphelenchoides besseyi



CICLO DE *Aphelenchoides* EM ORNAMENTAIS



8 dias

T= 23°C

Aphenchoides besseyi EM FOLHAS DE MORANGO E ARROZ



ATAQUE DE *Aphelenchoides* EM BEGÔNIA



FOLÍOLO DE *Schefflera* COM *APHELENCHOIDES* SP.



Aphelenchoides EM FOLHAS DE *Asplenium*



*CRISÂNTEMO COM LESÕES NECRÓTICAS EM FORMA
DE V CAUSADAS POR *Aphelenchoides ritzemabosi*.*



VIOLETA COM *Aphelenchoides ritzemabosi*



Aphelenchoides fragariae EM FOLHAS DE LÍRIO



A. ritzemabosi EM FOLHAS DE ORQUÍDEA

A-C: Plantas de *Cattleya* híbrida parasitada por *Aphelenchoides fragariae*;

D: orquídea híbrida *Brassolaeliocattleya* com folhas necróticas devido ao ataque de *Aphelenchoides ritzemabosi*.



SOJA LOUCA II OU “HASTE VERDE DA SOJA”

Agente causal: *Aphelenchoides* sp.
Aphelenchoides besseyi (Favoreto et al., 2017).

OCORRÊNCIA:

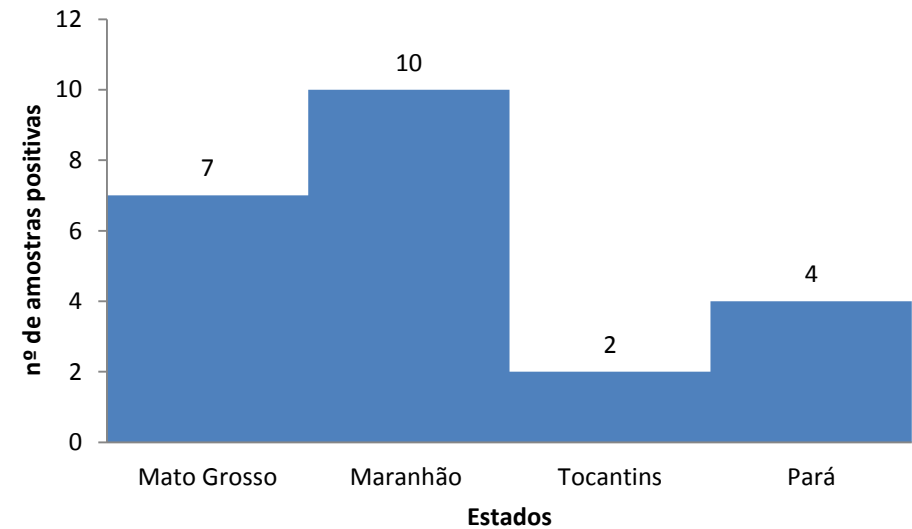
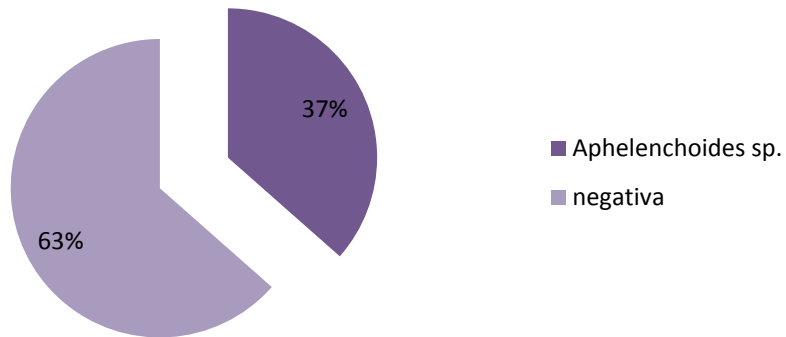
Em regiões quentes e de muita chuva
como os estados do Mato Grosso,
Maranhão, Tocantins e Pará.



Nematoide *Aphelenchoides* sp. visto no microscópio. Fonte: Epamig



levantamento



HOSPEDEIROS

Soja (BRS284)

Feijão (BRS Notável, BRS Esteio, BRS Pitanga e Jalo Precoce)

Algodão (TMG 47 B2RF)

Asplênio

Morangueiro

Crisântemo

Nabo forrageiro (IPR 116)

Trigo (TBIO Sossego)

Centeio (IPR 89)

Feijão caupi (Imponente, Aracê, Guariba, Tumucumaque, Nova Era, Tracuateua)



MÁS HOSPEDEIRAS

Braquiária (*Urochloa ruziziensis* e *U. brizantha*)

Crotalaria (*C. juncea*, *C. spectabilis* e *C. ochroleuca*)

Milho BRS4104)

Milheto (ADR 300)

Sorgo (BRS 659, ADV 2499, IAPAR)

Lírio

Arroz (IAPAR 09)



PLANTAS INVASORAS

Hospedeiras

Trapoeraba

Cordão de frade

Caruru

Agriãozinho do pasto

Não hospedeiras

Capim carrapicho

Capim pé de galinha

Joá de capote

Corda de viola

Capim colônia

Falsa serralha

Picão preto

Serralha

Amendoim bravo

Vassourinha de botão

Erva de Santa Luzia



SOJA LOUCA II OU “HASTE VERDE DA SOJA”

Agente causal: *Aphelenchoides sp.*
sintomas

observados no início da fase reprodutiva da cultura

afilamento

enrugamento

engrossamento das folhas do terço superior das plantas

As folhas com sintomas apresentam coloração mais escura e menor pilosidade em relação às normais.

As hastes podem exibir deformações e engrossamento dos nós

vagens podem apresentar lesões, rachaduras, apodrecimento e redução do número de grãos.

plantas afetadas apresentam uma alta incidência de abortamento de vagens, o que acaba induzindo uma nova floração e sintomas de superbrotamento.



Soja apresentando sintomas da doença. Fonte: Embrapa.

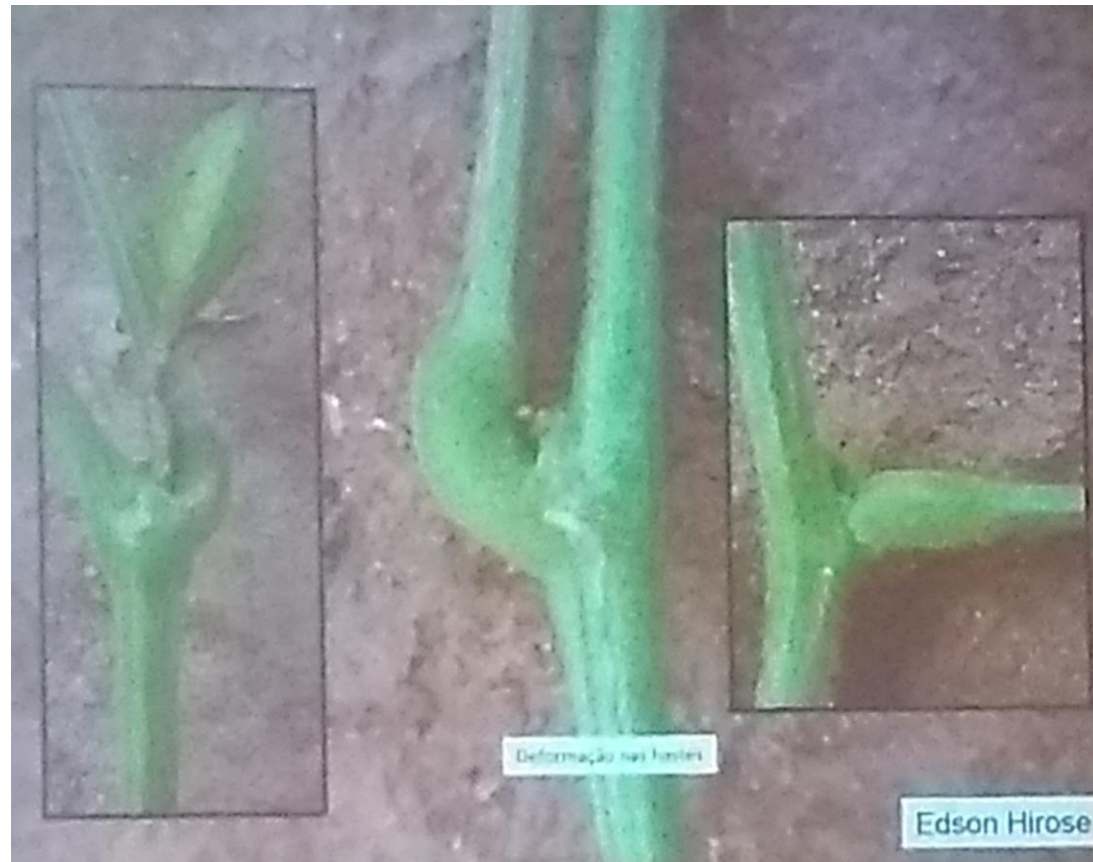


[fhhttp://s2.glbimg.com/dAqZc3KUJmwIRGVjIJKW__VUzFE=/780x440/e.glbimg.com/og/ed/f/original/2015/06/25/soja_louca_2_um_dos_sintomas_e_a_deformacao_foliar_afilamento_e_engrossamento_das_nervuras.jpg](http://s2.glbimg.com/dAqZc3KUJmwIRGVjIJKW__VUzFE=/780x440/e.glbimg.com/og/ed/f/original/2015/06/25/soja_louca_2_um_dos_sintomas_e_a_deformacao_foliar_afilamento_e_engrossamento_das_nervuras.jpg)



http://www.fatimanews.com.br/upload/dn_noticia/2015/09/soja-louca1.jpg

DEFORMAÇÕES NA HASTE



RETENÇÃO FOLIAR



<http://3.bp.blogspot.com/-Z6OuW8S4ZrE/TZCWHfJ5yUI/AAAAAAAAABaM/B2WMYxm8Yow/s1600/DSC04868.JPG>

First report of *Aphelenchoides besseyi* infecting aerial part of cotton plants in Brazil.



Figure 1. Symptoms on cotton plants (a-d): a- Leaf blistering on cotton younger leaves; b- Hole plant showing absence of cotton bolls; c- Foliar deformation; d- Flower abortion and bud proliferation; and e- morphological characteristics of *Aphelenchoides* sp. from cotton.

173x188mm (150 x 150 DPI)

MANEJO

Movimentação do solo, incorporação de restos de cultura?

Controle rigoroso das invasoras?

Nematicidas?





ISBN 978-85-66836-16-5

REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA AO NEMATOIDE *Aphelenchoides besseyi* /
Reaction of soybean cultivars to *Aphelenchoides besseyi*. M.C. MEYER¹, L.
FAVORETO², A. CALANDRELLI³, M.C.M. DA SILVA³; ¹Embrapa Soja, Londrina, PR/
²EPAMIG Oeste, Uberaba, MG/ ³Estudante de graduação – Unifil, Londrina, PR. E-mail:
mauricio.meyer@embrapa.br.

Aphelenchoides besseyi é o agente causal da haste verde e retenção foliar, uma nova doença em soja no Brasil, conhecida popularmente como Soja Louca II. A maior incidência dessa doença é observada nos Estados do Pará, Tocantins, Maranhão e Mato Grosso, causando elevadas perdas de produtividade na cultura. Com o objetivo de estudar a variabilidade genética da soja quanto à sensibilidade ao patógeno, foi conduzido um ensaio em casa de vegetação na Embrapa Soja, avaliando-se 64 cultivares de soja. Foram cultivadas quatro plantas por vaso (capacidade para 2 L de solo), três vasos por cultivar, sendo inoculado o nematoide em dois vasos, permanecendo um vaso como controle. A inoculação foi realizada aos 10 dias após a semeadura da soja (estádio V1). A suspensão foi inoculada em um orifício de 1,5 cm, no solo, próximo ao colo da planta, na concentração média de 840 nematoides por vaso. Aos 50 dias após a inoculação, foram determinadas as populações finais (PF) de *A. besseyi* na parte aérea, em duas plantas por vaso e, aos 68 dias após a inoculação, foi avaliado a intensidade de sintomas nas duas plantas restantes em cada vaso. Os valores de PF variaram de 0,3 a 16,5 *A. besseyi* / g de tecido da parte aérea da soja. Duas cultivares apresentaram baixa intensidade de sintomas. Esses resultados podem indicar a existência de variabilidade genética da soja para resistência a *A. besseyi*, e novos experimentos precisam ser realizados para confirmar esta condição.

Identificação

Características morfológicas



Pequenas diferenças
Conhecimento taxonômico

Diagnóstico molecular



Uso na rotina de laboratório de
fitossanidade



TAXONOMIA

Paciência

Literatura

Espécimes em boa condição de observação

Experiência: conhecimento taxonômico



CHAVE ILUSTRADA PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE APHELENCHOIDES JÁ ASSINALADAS NO BRASIL [baseada em características das fêmeas]

- 01** . Campo lateral com banda central delimitada por duas incisuras..... 2
 Campo lateral com mais de duas incisuras (três, quatro ou seis) 3
- 02**. Término caudal gradualmente afilado, sem mucros pontiagudos; L = 0,45-0,80 mm ***A. fragariae***
 Término caudal típico, bifurcado, com um mucro curto e outro mais longo, pontiagudos; L = 0,38-0,47 mm .
 ***A. bicaudatus***
- 03** . Ausência de machos na espécie (partenogenética); campo lateral com seis incisuras ***A. sexlineatus***
 Machos comuns na espécie (bissexual); campo lateral com três ou quatro incisuras
 4
- 04** . Campo lateral com duas bandas delimitadas por três incisuras; término caudal hemisférico com mucro
 único, pontiagudo ou digitiforme ***A. subtenuis***
 Campo lateral com quatro incisuras; término caudal conoide com dois a quatro mucros muito semelhantes
 entre si partindo praticamente do mesmo ponto 5
- 05** . Saco pós-vulvar de extensão igual à metade, ou mais, da distância da vulva ao ânus; L = 0,77-1,20 mm
 ***A. ritzemabosi***
 Saco pós-vulvar pouco desenvolvido, de extensão inferior a um terço da distância da vulva ao ânus; L =
 0,62- 0,88 mm ***A. besseyi***



Journal of Nematology 39(4):343–355. 2007.
© The Society of Nematologists 2007.

Conventional and PCR Detection of *Aphelenchoides fragariae* in Diverse Ornamental Host Plant Species

JAMIE L. MCCUISTON,¹ LAURA C. HUDSON,¹ SERGEI A. SUBBOTIN,² ERIC L. DAVIS,¹ COLLEEN Y. WARFIELD^{1,3}

Abstract: A PCR-based diagnostic assay was developed for early detection and identification of *Aphelenchoides fragariae* directly in host plant tissues using the species-specific primers AFragF1 and AFragR1 that amplify a 169-bp fragment in the internal transcribed spacer (ITS1) region of ribosomal DNA. These species-specific primers did not amplify DNA from *Aphelenchoides besseyi* or *Aphelenchoides ritzemabosi*. The PCR assay was sensitive, detecting a single nematode in a background of plant tissue extract. The assay accurately detected *A. fragariae* in more than 100 naturally infected, ornamental plant samples collected in North Carolina nurseries, garden centers and landscapes, including 50 plant species not previously reported as hosts of *Aphelenchoides* spp. The detection sensitivity of the PCR-based assay was higher for infected yet asymptomatic plants when compared to the traditional, water extraction method for *Aphelenchoides* spp. detection. The utility of using NaOH extraction for rapid preparation of total DNA from plant samples infected with *A. fragariae* was demonstrated.

Key words: *Aphelenchoides fragariae*, detection, diagnosis, foliar nematode, ITS1, method, NaOH, ornamental host, PCR, rDNA

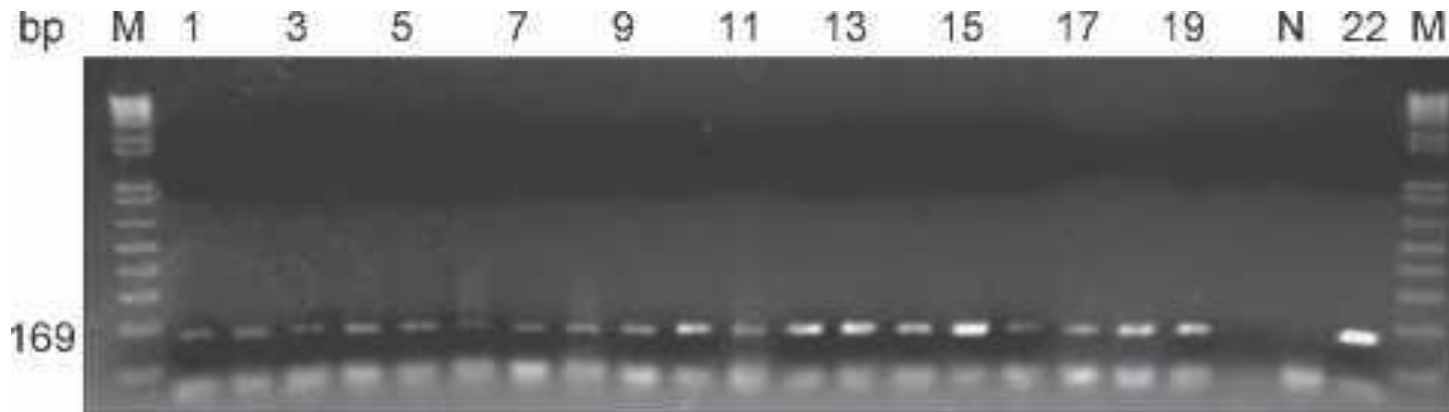


Conventional and PCR Detection of *Aphelenchoides fragariae* in Diverse Ornamental Host Plant Species

Jamie L. McCuiston, Laura C. Hudson, Sergei A. Subbotin, Eric L. Davis, Colleen Y. Warfield

Journal of Nematology 39(4):343–355. 2007

Sensitivity of *Aphelenchoides fragariae* species-specific PCR primers



Three 6-mm diam. *Asplenium nidus* (Bird's Nest Fern) leaf disks were spiked with increasing increments of individual *A. fragariae* ranging from 1 to 1,000 nematodes. Lane numbers 1 to 20 correspond to the number of nematodes in each DNA extraction (1 to 19 nematodes are shown). No amplification product was obtained with the 20 nematode extraction due to a processing error (Lane 20). Lane M contains DNA molecular size marker, lane N contains the PCR reaction without DNA template and lane 22 contains the PCR reaction with known *A. fragariae* DNA.



BRILL

Nematology 00 (2016) 1-20



Morphological and molecular characterisation of *Aphelenchoides besseyi* and *A. fujianensis* (Nematoda: Aphelenchoididae) from rice and forage grass seeds in Brazil

Dalila Sêni DE JESUS¹, Claudio Marcelo Gonçalves OLIVEIRA², David ROBERTS³,
Vivian BLOK³, Roy NEILSON³, Thomas PRIOR⁴, Huarlen Márcio BALBINO¹,
Katrin M. MACKENZIE⁵ and Rosângela D'Arc de Lima OLIVEIRA^{1,*}

¹ Department of Plant Pathology, Laboratory of Nematology, Viçosa Federal University,
36570-900 Viçosa, MG, Brazil

² Biological Institute, Campinas, SP, Brazil

³ The James Hutton Institute, Dundee DD2 5DA, UK

⁴ FERA, Sand Hutton YO41 1LZ, UK

⁵ Biomathematics and Statistics Scotland, Dundee DD2 5DA, UK

Received: 3 September 2015; revised: 16 December 2015

Accepted for publication: 16 December 2015; available online: ???

Summary – Morphologically similar *Aphelenchoides* spp. populations extracted from rice and forage grass seeds from different geographical regions in Brazil were morphologically and molecularly characterised. Overall, the populations studied separated into two groups based on morphological and phylogenetic analyses, referred to herein as ‘Group-rice’ and ‘Group-forage’. Bayesian phylogenetic analyses of SSU, LSU and mtCOI regions strongly supported the presence of two dichotomous groups with Group-rice and Group-forage populations genetically similar to *A. besseyi* and *A. fujianensis*, respectively. This study reports the presence of a morphologically similar species to *A. besseyi* associated with seeds of grasses, but genetically distinct based on three genomic regions, which our results strongly suggest to be *A. fujianensis*, this being a new geographical record for Brazil. Additional information regarding spicule morphology of male *A. besseyi* is also reported.



Taxonomia integrativa de espécies de *Aphelenchoides* associadas a sementes de gramíneas forrageiras e desenvolvimento de diagnóstico baseado em PCR em tempo real



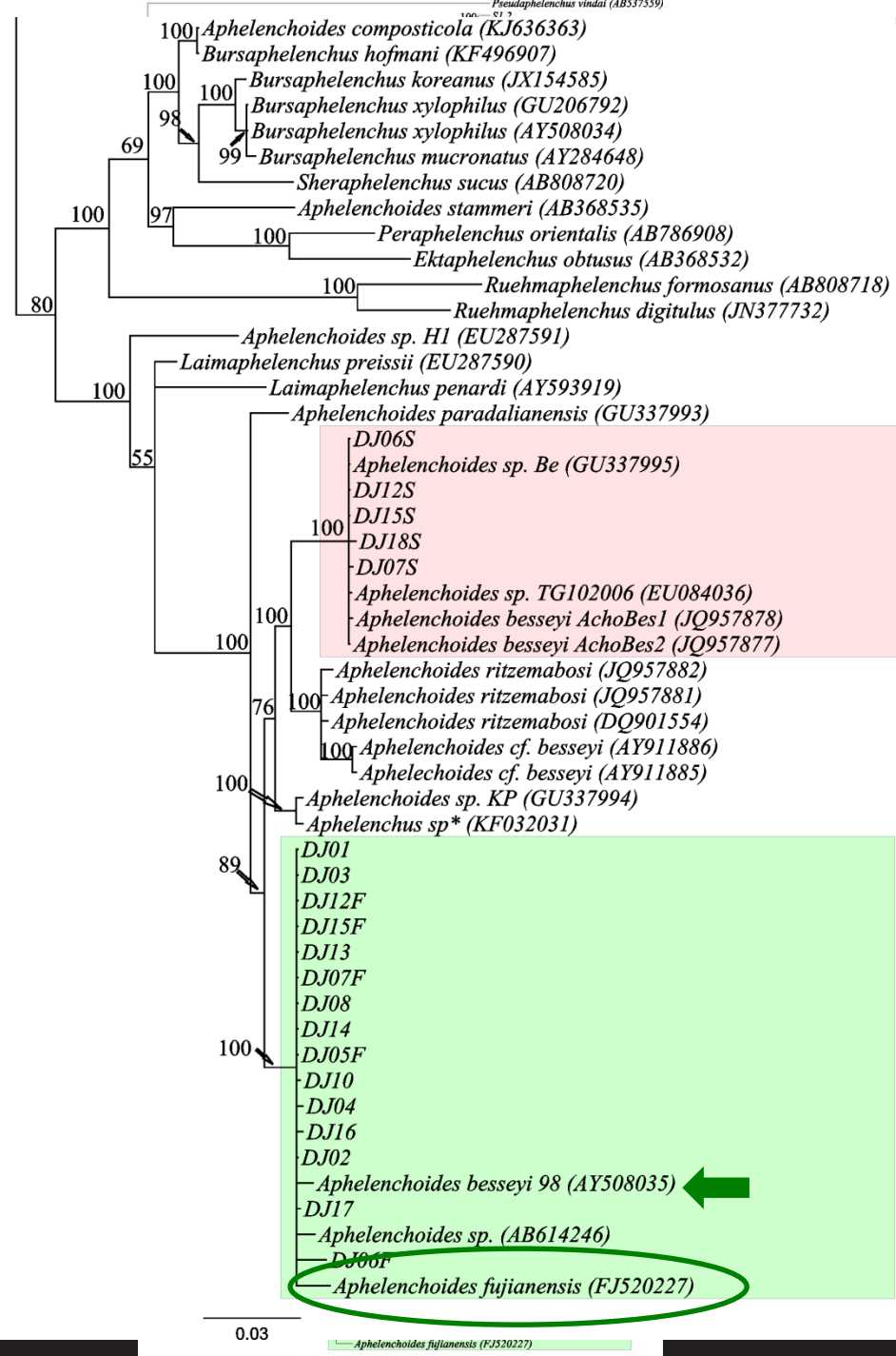
associação paulista produtores de sementes



D. Sc. Dalila Sêni de Jesus

Orientadores: Dr^a Rosângela D'Arc de Lima Oliveira

Dr. Claudio Marcelo Gonçalves de Oliveira



Grupo-arroz

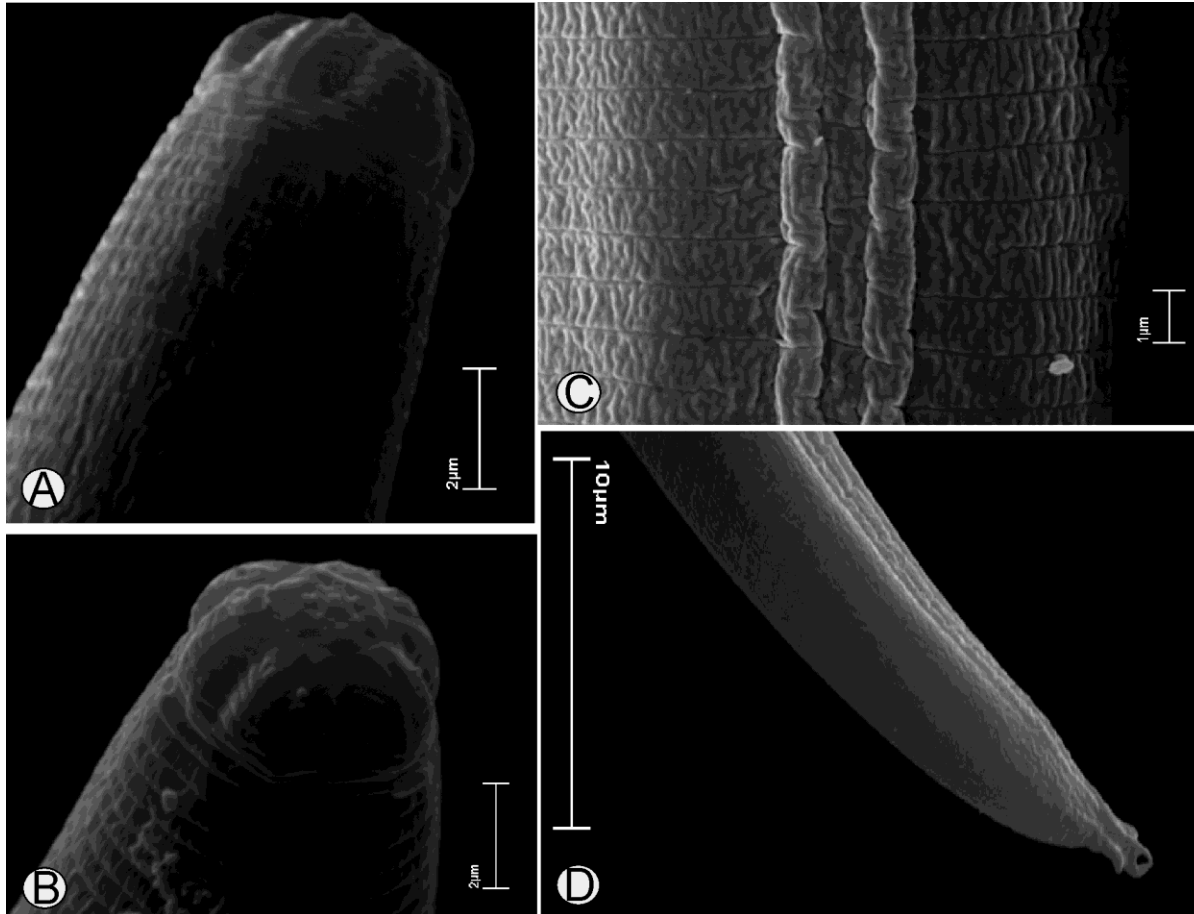
Grupo-forrageira

Gene SSU





Grupo-forrageira (*A. fujianensis*)



4 linhas no
campo
lateral

cauda 4
processos
terminais

Região labial
destacada e
expandida





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. fujianensis</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	na altura 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, na altura ou ligeiramente posterior ao anel nervoso	curto , com arranjo das células em duas fileiras	14,1-18,3 μm; côndilo 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. 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, com 4 processos terminais	anterior ou na altura do anel nervoso	curto , com arranjo das células de 2-4 fileiras	17-21 μm; côndilo 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 na altura do anel nervoso	longo , com arranjo das células em 1-2 fileiras	24-30 μm; côndilo curto e arredondado





CONCLUSÕES

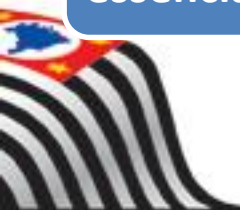
As análises filogenéticas comprovaram a ocorrência de uma espécie geneticamente distinta de *A. besseyi* associada às sementes de gramíneas forrageiras.

Esta outra espécie, baseado nos marcadores SSU e COI, trata-se de *A. fujianensis* (primeiro relato no Brasil).

A caracterização morfológica das populações de *A. besseyi* (grupo-arroz) e *A. fujianensis* (grupo-forrageira) mostrou que estas são muito semelhantes.

Provavelmente, *A. fujianensis* tem sido identificado como *A. besseyi* em análises fitossanitárias no Brasil devido a sua similaridade morfológica.

O desenvolvimento de **diagnóstico molecular** capaz de discriminar ambas as espécies é **essencial**.



A Rapid Diagnostic for Detection of *Aphelenchoides besseyi* and *A. fujianensis* Based on Real-Time PCR

Dalila Sêni Buonicontro,[†] Viçosa Federal University, Department of Plant Pathology, Laboratory of Nematology, 36570-900, Viçosa, MG, Brazil; **David Mark Roberts**, The James Hutton Institute, Dundee, DD2 5DA, Scotland, United Kingdom; **Claudio Marcelo Gonçalves Oliveira**, Biological Institute, 13001-970, Campinas, SP, Brazil; **Vivian Carol Blok** and **Roy Neilson**, The James Hutton Institute; and **Rosângela D'arc De Lima Oliveira**, Viçosa Federal University, Department of Plant Pathology, Laboratory of Nematology

Abstract

Aphelenchoides besseyi and *A. fujianensis* have been frequently found in mixed populations associated with forage grass seed in Brazil. The morphological similarity between both species has previously led *A. fujianensis* to be erroneously identified as *A. besseyi*. *A. besseyi* is a quarantine pest in many countries that import Brazilian forage seed; however, there is no current evidence suggesting that *A. fujianensis* is a plant-parasitic species. Two real-time polymerase chain reaction (qPCR) diagnostics were developed to detect each species and an operational envelope was established. A set of primers and hydrolysis probes for each species was designed targeting the large subunit (LSU) region. To assess their specificity, primers and probes

were tested with samples of nontarget *Aphelenchoides* and *Paraphelenchus* sp. also frequently associated with forage seed. Experiments using dilutions of purified plasmid standards underpinned the sensitivity of the qPCR assays, which detected as few as 10 copies of target nematode ribosomal DNA. Thus, the developed diagnostics were sufficiently sensitive to detect DNA extracted from a fragment of a single target nematode. There was a positive correlation between copy number of the target species and nematode abundance, suggesting the potential of this method for quantification. Evidence of intra-individual variability among cloned sequences of the LSU region in a single *A. besseyi* population is also reported.





Ensaio de qPCR

- **Master mix** (Precision Fast 2X Real-Time PCR - Primerdesign Ltda)
- **Mix sonda + primers** (- Primerdesign Ltda)
- **DNA** do nematoide teste
- **Água** esterilizada





MATERIAIS E MÉTODOS

Ensaio de qPCR



✓ Visualização das curvas de amplificação e curvas padrão no programa StepOne versão 2.1 (Applied Biosystems).

Condições de amplificação:

Desnaturação inicial: 95 °C por 20 s,

40 ciclos

Desnaturação: 95 °C 1 s

Anelamento: 62 °C por 20 s

30 minutos !



TESTE DE SENSIBILIDADE/ ESPECIFICIDADE – DNA DE UM ÚNICO NEMATOIDE

Ensaaios 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 *A. besseyi*

Primers/sonda Taqman para detecção
de *A. fujianensis*

	C_q	Nº de cópias	C_q	Nº de cópias
<i>A. besseyi</i> (n=39)	25 ± 2	$8 \times 10^3 \pm 5 \times 10^3$	35 ± 2^a	$1 \pm 1,5^a$
<i>A. fujianensis</i> (n=167)	34 ± 2	$3 \times 10^1 \pm 5 \times 10^1$	24 ± 2	$3,5 \times 10^3 \pm 2,2 \times 10^3$

^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.

Bursaphelenchus cocophilus

O NEMATOIDE DO ANEL VERMELHO

Para alguns autores, o gênero *Rhadinaphelenchus* é sinônimo de *Bursaphelenchus* e a sua única espécie, *R. cocophilus*, deveria ser referida como *Bursaphelenchus cocophilus*.

Essa espécie constitui problema muito sério em áreas produtoras de palmáceas de interesse econômico:

- coqueiro (*Cocus nucifera*)
- dendezeiro (*Elais guineensis*)
- tamareira (*Phoenix dactylifera*)
- palmeira imperial (*Roystonia regia*)
- *Oenocarpus distichus*, palmácea nativa da floresta amazônica



OCORRÊNCIA DE *Bursaphelenchus cocophilus*

América Latina:

- região do Caribe e da
- América do Sul
- No Brasil, o nematoide do anel vermelho ocorre principalmente:
 - na região Nordeste (Bahia, Pernambuco, Sergipe, Alagoas e Ceará)
 - Rio de Janeiro e São Paulo (Ilhabela).



CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

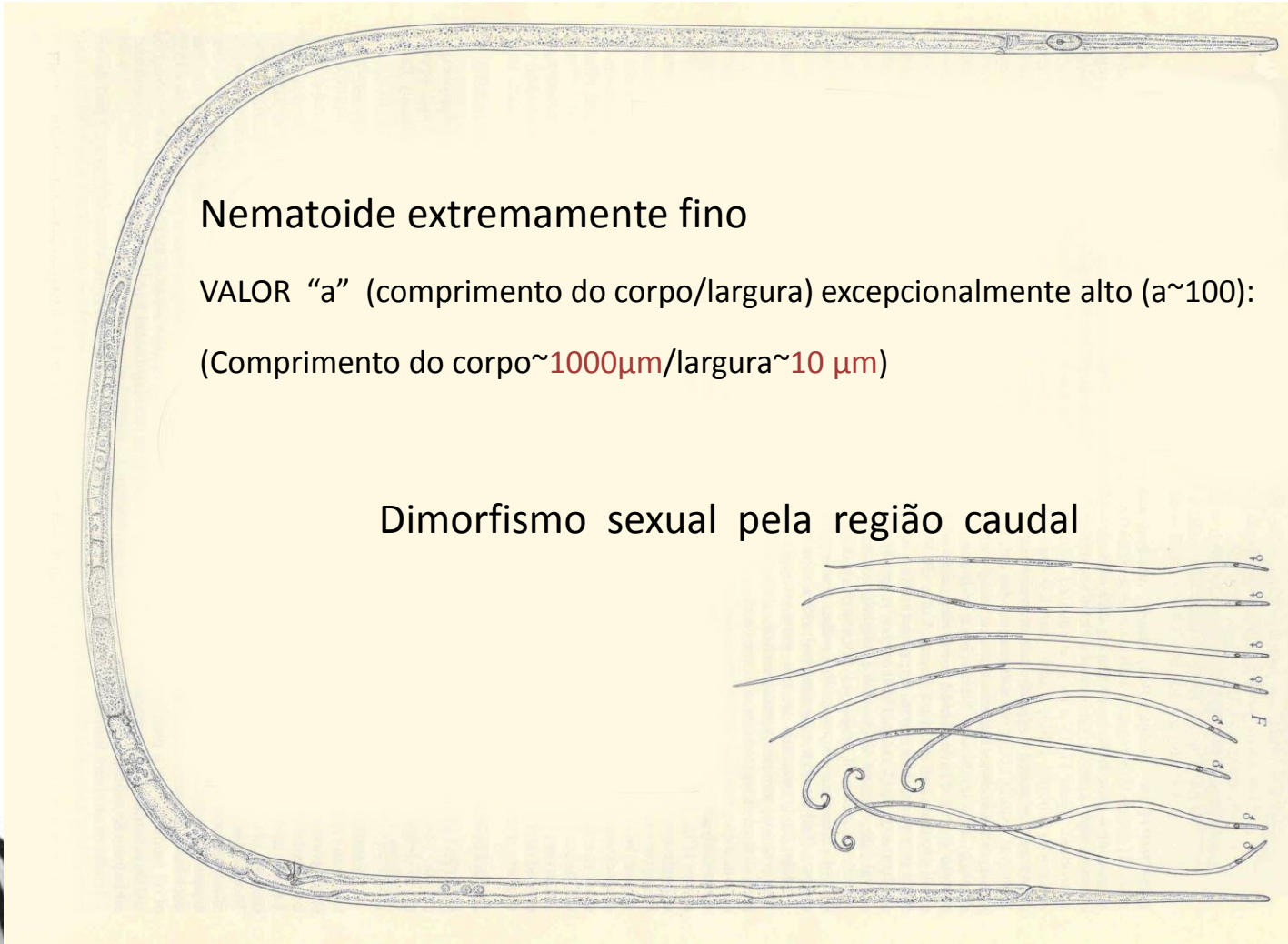
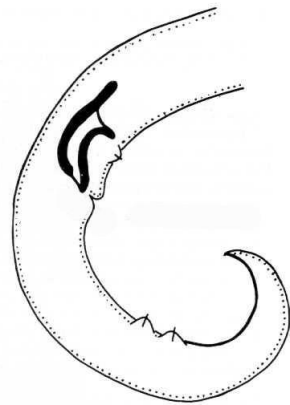
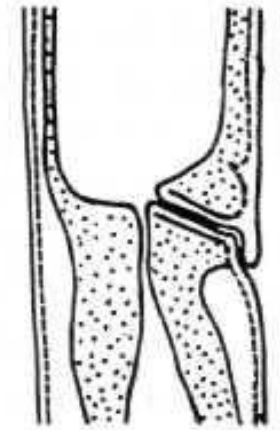
Nematoide extremamente fino

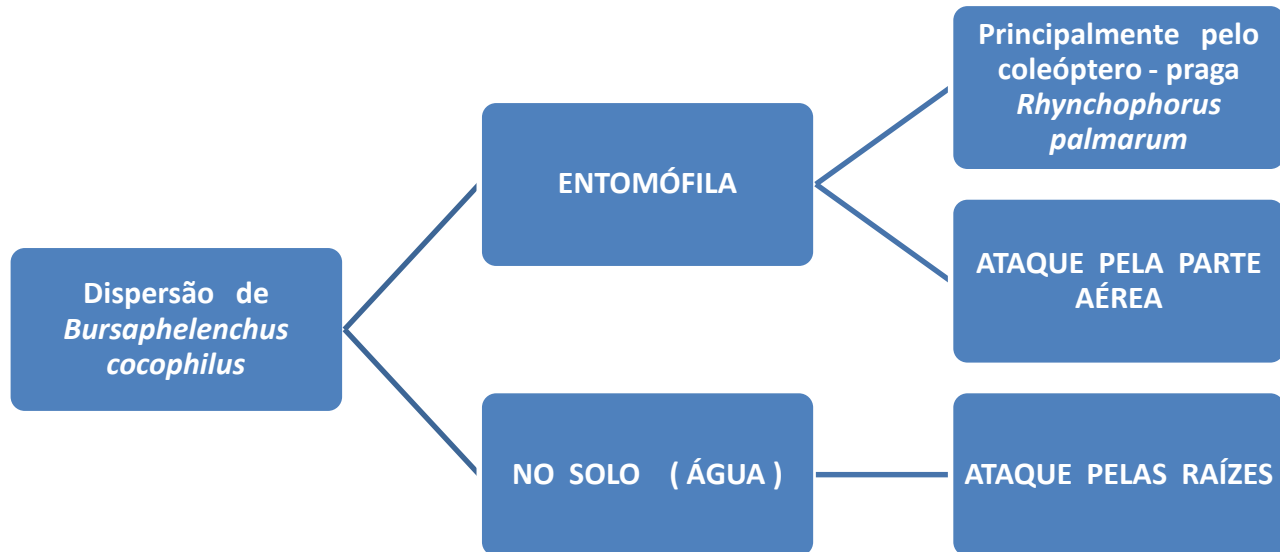
VALOR “a” (comprimento do corpo/largura) excepcionalmente alto ($a \sim 100$):

(Comprimento do corpo $\sim 1000 \mu\text{m}$ / largura $\sim 10 \mu\text{m}$)

Dimorfismo sexual pela região caudal

presença de
“flap” vulvar





DISPERSÃO ENTOMÓFILA DE *Bursaphelenchus cocophilus* PELO COLEÓPTERO *Rhynchophorus palmarum*

Fêmeas do coleóptero *Rhynchophorus palmarum* podem adquirir o nematoide ao alimentar-se de plantas doentes.

Os nematoides ficam retidos no hemoceloma e no tubo digestivo do coleóptero vetor, migrando para a região do ovipositor.

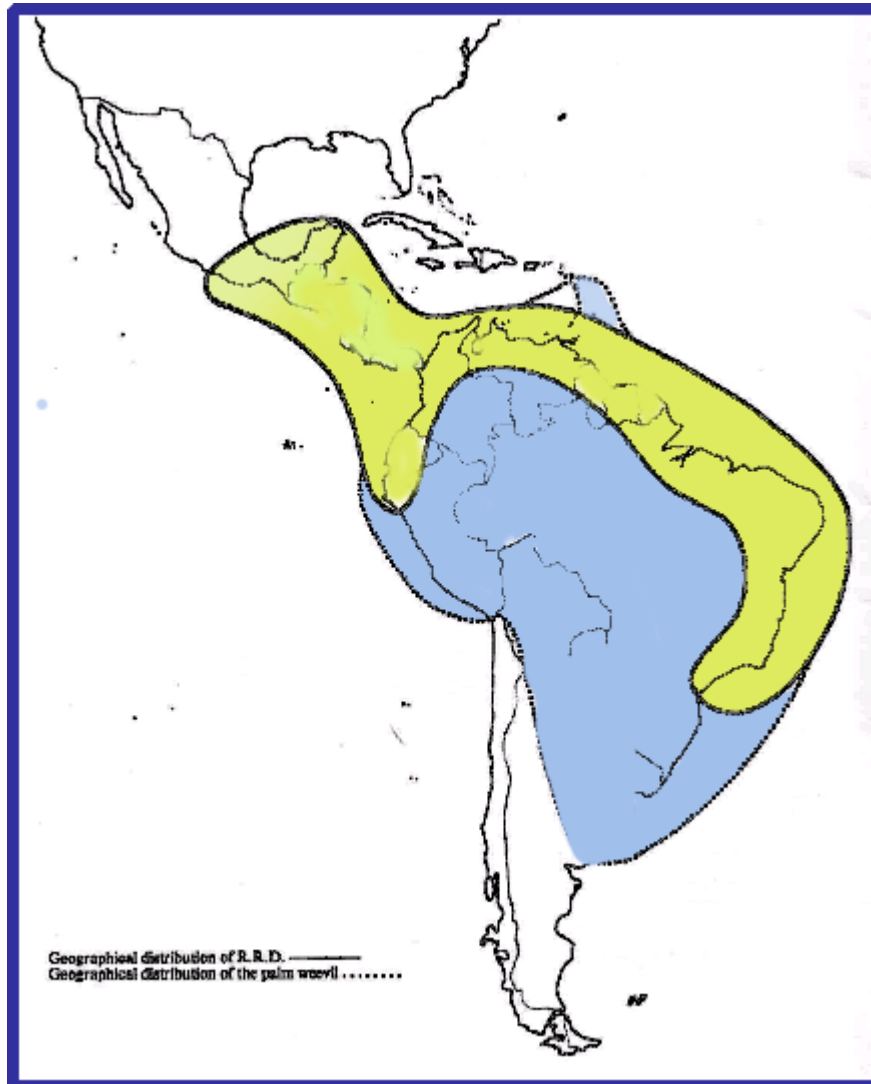
Ao alimentar-se de planta sadia, as fêmeas do coleóptero disseminam os nematoides durante a oviposição.

O local preferencial da oviposição do coleóptero é região da coroa

- a infestação de *B. cocophilus* inicia-se pelas axilas das folhas do topo das palmáceas.
- A seguir, movimentando-se via inter e intracelular do tecido parenquimático do estipe e das folhas, propagam-se para outras partes da planta, inclusive as raízes.
- Colapso celular: descoloração dos tecidos
- Nematóide NÃO invade o xilema e floema, mas induz a formação de tiloses que bloqueiam o transporte de nutrientes



DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO NEMATOIDE *B. cocophilus* E DO BESOURO *R. palmarum*



nematoide *R. cocophilus*

besouro *R. palmarum*

Bursaphelenchus cocophilus em coqueiro

SINTOMATOLOGIA E DANOS

1. clorose progressiva, nem sempre evidente;
2. queda anormal de frutos, ainda imaturos;
3. folhas pendentes ao redor do estipe, sem se desprender dele;
4. murcha generalizada da planta, que fica pardo-escura em sua totalidade;
5. secções transversais do estipe tomadas a 0,5 ou até 1,0 m de altura revelam típica camada de células descoloridas, situada a cerca de 5 cm da borda, de tonalidade avermelhada, denominada de “anel vermelho”.

Os sintomas internos desenvolvem antes dos sintomas externos



CLOROSE



“SAIA”





**ÁREA COM VÁRIAS PLANTAS
MORTAS POR *R. COCOPHILUS***



PLANTA RECÉM - MORTA

“ ANEL VERMELHO ”



MEDIDAS DE MANEJO

Eliminação imediata dos coqueiros atacados

- corte e a queima
- A queima das plantas eliminadas é importante, considerando se o longo período de sobrevivência do nematoide em estipes no campo.

Evitar o corte desnecessário de folhas do coqueiro que ainda não estejam completamente secas.

Ferramentas utilizadas no corte de plantas doentes ou na colheita de frutos devem ser limpas antes de serem utilizadas em plantas sadias.

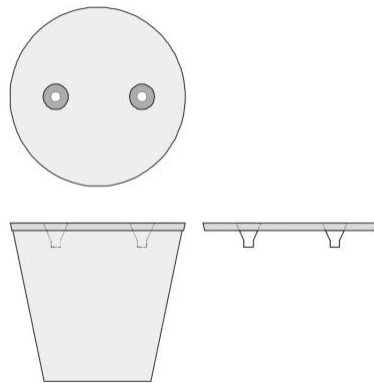
- Essa limpeza deverá ser feita pela imersão da ferramenta em solução preparada pela mistura de água sanitária (2,0% a 2,5% de cloro ativo) e água, em partes iguais.



MEDIDAS DE MANEJO

O controle efetivo da doença é feito combatendo-se o inseto vetor.

- coletar e destruir pupas, larvas e adultos encontrados em plantas mortas no pomar.
- armadilhas tipo alçapão
- Dentro dos baldes, são colocados pedaços de colmos de cana-de-açúcar que funcionam como atrativos dos besouros que, periodicamente, são removidos e mortos.
- A adição de uma calda preparada com 200 mL de melaço e 800 mL de água ou do feromônio comercial (agregação) pode aumentar a eficiência dessas armadilhas.
- As iscas devem ser trocadas a cada 15 dias, quando os insetos serão coletados e destruídos.



Desenho esquemático da armadilha tipo alçapão (a): a – tampa: vista frontal; b – balde: vista lateral, e c – detalhe: vista lateral da tampa com os funis. Armadilha tipo alçapão (b), feita com balde plástico, para captura do besouro adulto, *Rhynchophorus palmarum*

CARACTERIZAÇÕES MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE NEMATOIDES EXTRAÍDOS DE FIBRA DE COCO (*Cocos nucifera*) PROVENIENTES DE BELÉM, PA.



CARACTERIZAÇÕES MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Bursaphelenchus fungivorus* (Nematoda: Aphelenchida), DETECTADO PELA PRIMEIRA VEZ NO BRASIL

18S ribosomal DNA (rDNA)

species	% of identity	GenBank code
<i>Bursaphelenchus fungivorus</i> (German)	100	AY508016.1
<i>Bursaphelenchus seani</i>	99	AY508030.1
<i>Bursaphelenchus arthuri</i>	97	AM397010.1
<i>Bursaphelenchus paraparvispicularis</i>	96	GQ421483.1
<i>Bursaphelenchus thailandae</i>	96	AM397019.1
<i>Bursaphelenchus willibaldi</i>	96	AM397021.1
<i>Bursaphelenchus cocophilus</i>	96	AY509153.1
<i>Bursaphelenchus braaschae</i>	96	GQ845409.1
<i>Bursaphelenchus vallesianus</i>	96	AM397020.1
<i>Bursaphelenchus sexdentati</i>	96	AY508032.1
<i>Bursaphelenchus conicaudatus</i>	96	AB067757.1
<i>Bursaphelenchus clavicauda</i>	96	AB299221.1
<i>Bursaphelenchus poligraphi</i>	96	AY508028.1
<i>Bursaphelenchus fraudulentus</i>	95	AY508015.1
<i>Bursaphelenchus borealis</i>	95	AY508012.1

região D2 / D3 28S rDNA

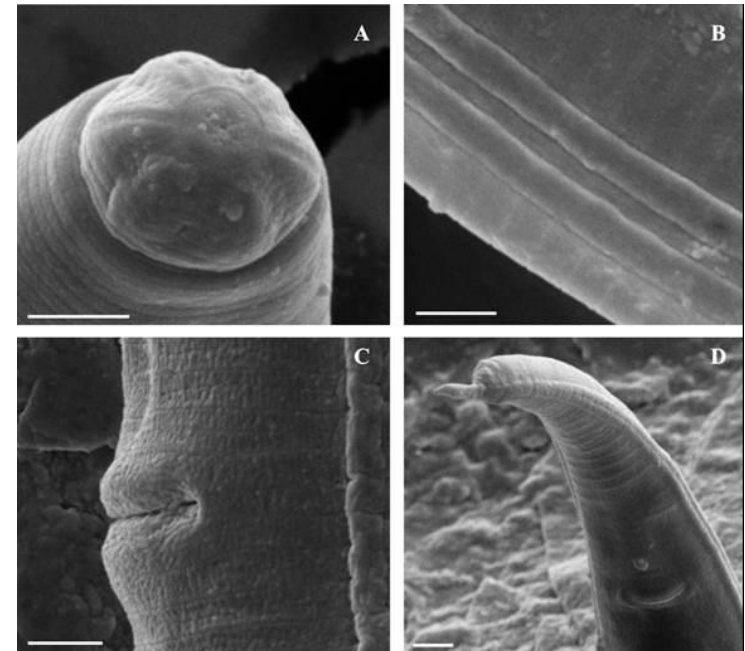
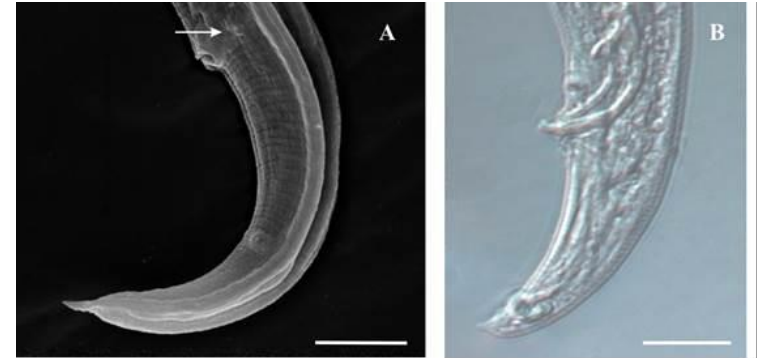
species	% of identity	GenBank code
<i>Bursaphelenchus fungivorus</i> (German)	100	AY508082.1
<i>Bursaphelenchus seani</i>	91	AY508098.1
<i>Bursaphelenchus arthuri</i>	87	AM396564.1
<i>Bursaphelenchus willibaldi</i>	87	AM396579.1
<i>Bursaphelenchus braaschae</i>	86	GQ845408.1
<i>Bursaphelenchus thailandae</i>	82	AM396577.1
<i>Bursaphelenchus rufipennis</i>	82	AB368530.1
<i>Bursaphelenchus yongensis</i>	82	AM396581.1
<i>Bursaphelenchus gerberae</i>	82	AY508092.1
<i>Bursaphelenchus anamurius</i>	82	FJ768949.1
<i>Bursaphelenchus clavicauda</i>	82	AB299222.1
<i>Bursaphelenchus hildegardae</i>	82	AM396569.1
<i>Bursaphelenchus tusciae</i>	81	AY508104.1
<i>Bursaphelenchus sexdentati</i>	82	AY508103.1
<i>Bursaphelenchus platzeri</i>	81	AY508094.1

Trata-se da primeira ocorrência de *B. fungivorus* fora do continente europeu, ampliando a sua abrangência geográfica



CARACTERIZAÇÕES MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Bursaphelenchus fungivorus* (Nematoda: Aphelenchida), DETECTADO PELA PRIMEIRA VEZ NO BRASIL

morphometric (μm)	Female (n= 14)	Male (n=13)
L (body length)	519,8 ±27 (471-566)	568,6 ± 42,3 (499,5-653,5)
stylet	12,1 ±1,1 (10-13)	11,5 ±0,8 (11,0-13,0)
Maximum body length	18,5 ±1,2 (17,5-20)	23,1 ±2,7 (17,5-27,5)
Tail	28,1 ±1,8 (26-31)	26,3 ±1,9 (22,0-29,0)
Body diameter at anus	8,7 ±1,3 (5-10)	11,9 ±1,0 (11,0-14,0)
V%	70,5 ±1,4 (68,5-73,8)	-
a	28,1 ±1,7 (25,2-31,7)	24,8 ±2,1 (22,2-29,1)
c	18,5± 0,9 (16,7-19,8)	21,7 ±1,7 (19,4-25,1)
c`	3,3±0,7 (2,9-5,6)	2,2 ±0,2 (1,8-2,6)
Spiculum	-	14,0 ±1,8 (10,0-16,0)



OBRIGADO

Cláudio **Marcelo** G. de Oliveira

Instituto Biológico

CEP 13001 970, Caixa Postal 70, Campinas, SP

marcelo@biologico.sp.gov.br

