

USO DA TAXONOMIA INTEGRADA NA DIAGNOSE DE TRICHODORIDAE, LONGIDORIDAE E APHELENCHOIDIDAE

Claudio Marcelo Gonçalves de Oliveira

Instituto Biológico, Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde
Animal, Alameda dos Videiros, 1097 – Campinas, SP, CEP13101 680

E-mail: marcelo@biologico.sp.gov.br

No geral, na América Latina, há nítida carência de informações de ocorrência, distribuição geográfica e diversidade de espécies de integrantes das famílias Trichodoridae, Longidoridae e Aphelenchoididae, refletindo a escassez de pesquisas que são dificultadas pela falta de taxonomistas capazes de caracterizar e descrever novas espécies ou mesmo de realizar sua identificação.

No entanto, a importância econômica de longidorídeos tem estimulado pesquisas de mapeamento e identificação em países principalmente da Europa e América do Norte. As informações geradas por esses estudos são importantes ferramentas para direcionar medidas fitossanitárias, visto que algumas das espécies desse grupo são pragas quarentenárias em muitos países, inclusive o Brasil. Por exemplo, *Xiphinema index* causa danos diretos e pode transmitir *Grapevine Fanleaf Nepovirus* (GFLV), mas, no Brasil, a sua identificação e ocorrência precisa ser confirmada, pois, nos dois relatos de ocorrência, não foram informadas as características morfológicas e biológicas. Além disso, a caracterização de perdas causadas por longidorídeos é insuficiente no Brasil. Por exemplo, a constante associação de *Xiphinema elongatum* e espécies de *Xiphidorus* à cana-de-açúcar sugere que esses nematoides podem causar danos a essa cultura, mas ainda não há estudos de patogenicidade dessas espécies. Ademais, poucos estudos têm sido feitos visando a identificação de nematoides transmissores de vírus das famílias Trichodoridae e Longidoridae, já que a maioria dos relatos de tobravirose e nepovirose não confirmaram a transmissão por vetor.

De forma similar, a identificação de integrantes de Aphelenchoididae, principalmente as espécies de *Aphelenchoides* e *Bursaphelenchus*, não é uma tarefa fácil, mesmo para profissionais treinados, além de consumir bastante tempo para análise. A maioria das espécies do gênero *Aphelenchoides* e *Bursaphelenchus* não atacam plantas cultivadas e a distinção entre essas e aquelas que são fitoparasitas é crucial para evitar a sua dispersão juntamente com materiais propagativos. Por exemplo, *Aphelenchoides besseyi* e *A. fujianensis* (recentemente detectada no Brasil por De Jesus et al., 2016) são espécies muito similares morfológicamente, mas *A. besseyi* é um importante fitonematoide que ataca a parte aérea de centenas de plantas cultivadas, inclusive está emergindo como problema na cultura da soja, além de ser praga quarentenária em vários países. Em contrapartida, não há nenhuma evidência científica de que *A. fujianensis* possa atacar plantas cultivadas.

A taxonomia clássica, baseada em estudos morfológicos e morfométricos, com auxílio de microscópio de luz, tem sido tradicionalmente utilizada na diagnose de nematoides. Adicionalmente, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e métodos bioquímicos também têm sido utilizados na identificação. Devido ao número limitado de características taxonômicas e o declínio no interesse em taxonomia clássica, observa-se um esforço crescente direcionado para o desenvolvimento de diagnóstico baseado em técnicas moleculares. Espera-se que as técnicas moleculares providenciem o diagnóstico rápido e fácil de nematoides, permitindo que pesquisadores e profissionais do serviço de extensão possam utilizar essas técnicas na rotina de um laboratório de fitossanidade. No entanto, para aprimorar a resolução e confiabilidade da filogenética e diagnose de nematoides, os estudos devem combinar os dados morfológicos com os moleculares. Além disso, no caso do uso do código de barras do DNA, fica evidente a necessidade de se utilizar ambas as técnicas, sendo essencial que as sequências das

espécies de nematoides previamente depositadas no Genbank tenham sido corretamente identificadas por um taxonomista.

Em conclusão, as técnicas moleculares não devem ser consideradas de maneira isolada, mas como ferramenta de auxílio para uma segura e correta identificação da espécie, de acordo com o conceito proposto de taxonomia integrada. Para exemplificar o uso da taxonomia integrada na diagnose de Trichodoridae, Longidoridae e Aphelenchoidea, destacamos os seguintes estudos:

Trichodoridae

No estudo conduzido por Duarte *et al.* (2010), baseando-se no sequenciamento da região 18S rDNA, os autores consideraram *Nanidorus* como gênero válido, tendo como representante as espécies *Nanidorus minor* (= *Paratrichodorus minor*) e *N. nanus*. Recentemente, durante levantamento em áreas cultivadas e de vegetação natural do sul da Espanha, sete novas espécies *Trichodorus* foram encontradas e descritas, baseando-se nas características morfológicas (comprimento do corpo e do onquioestilete, posição do poro excretor, comprimento e forma dos espículos dos machos e peças esclerotizadas da vagina nas fêmeas). Além disso, o estudo foi complementado com análises moleculares da expansão D2-D3 da gene 28S rDNA (Decraemer *et al.*, 2013). Portanto, atualmente, baseando-se no uso de taxonomia integrada, a Família Trichodoridae engloba 109 espécies agrupadas em seis gêneros; sendo que aproximadamente 90% das espécies descritas são didelfas (gêneros *Paratrichodorus*, *Trichodorus* e *Nanidorus*) e o restante monodelfas (gêneros *Allotrichodorus*, *Ecuadorus* e *Monotrichodorus*).

Longidoridae

O caso de estudo envolvendo populações de *Xiphinema krugi* relatado por Oliveira *et al.* (2006) claramente demonstra os problemas que nematologistas enfrentam atualmente. Por 50 anos, *X. krugi* foi aceito por vários taxonomistas como uma espécie com variação morfológica e morfométrica (Ferraz, 1980). Entretanto, o estudo conduzido por Oliveira *et al.* (2006) demonstrou que, de fato, *X. krugi* compreende pelo menos quatro morfotipos distintos, tratando-se de um complexo de espécies. De forma semelhante, combinando morfologia e técnicas moleculares para resolver a posição taxonômica de *Xiphinema cf. pyrenaicum* na Espanha, Gutierrez-Gutierrez *et al.* (2010) apresentaram provas inequívocas de que há variação genética entre as populações do grupo *X. pyrenaicum* estudadas.

Aphelenchooididae

Há uma grande dificuldade na identificação morfológica das espécies de *Aphelenchooides* em razão dos poucos caracteres taxonômicos discriminatórios, além das descrições inadequadas de algumas espécies (Hunt, 1993). Essa tarefa é particularmente desafiadora na análise de nematoides presentes em sementes de forrageiras, uma vez que várias espécies de *Aphelenchooides*, semelhantes morfológicamente, estão presentes, dificultando um diagnóstico rápido e preciso (Favoreto *et al.*, 2011). Recentemente, De Jesus *et al.* (2016) relataram espécies de *Aphelenchooides* em associação às sementes de gramíneas forrageiras, sendo que *A. fujianensis* pode, por vezes, devido a semelhança morfológica, ser confundido com *A. besseyi*. Portanto, devido à necessidade de um método mais acurado para identificação e distinção entre *A. besseyi* e *A. fujianensis* e garantir a correta identificação de *A. besseyi* em materiais voltados para exportação, pesquisadores do Instituto Biológico, Universidade Federal de Viçosa (UFV) e do *The James Hutton Institute*, Escócia, desenvolveram uma forma rápida e mais segura para diagnose de *A. besseyi* e *A. fujianensis*. Esse método é baseado no DNA, empregando-se a técnica de PCR em Tempo Real que, além de permitir a análise simultânea de até 78 amostras em 30 minutos, garante maior especificidade e sensibilidade na detecção dos nematoides alvos (Buonicontro *et al.*, 2018).

Referências

- Buonicontrò, D.S., D.M. Roberts, C.M.G. Oliveira, V.C. Blok, R. Neilson, R.D.L Oliveira. A rapid diagnostic for detection of *Aphelenchoides besseyi* and *A. fujianensis* Based on Real-Time PCR. *Plant Disease*, 102:519-526, 2018. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1160-RE>
- De Jesus, D.S., Oliveira, C.M.G., Balbino, H.M., Mackenzie, K.M., Neilson, R., Prior, T., Roberts, D., Blok, V., Oliveira, R.D.L. Morphological and molecular characterisation of *Aphelenchoides besseyi* and *A. fujianensis* (Nematoda: Aphelenchoididae) from rice and forage grass seeds in Brazil. *Nematology*, 18:337-356. 2016.
- Decraemer W., J.E. Palomares-Rius, C. Cantalapiedra-Navarrete, B.B. Landa, I. Duarte, T. Almeida, N. Vovlas. P. Castillo. Seven new species of *Trichodorus* (Diphtherophorina, Trichodoridae) from Spain, an apparent centre of speciation. *Nematology*, 15:57-100, 2013.
- Duarte I.M., De Almeida M.T.M., Brown D.J.F., Marques I., Neilson R., Decraemer W. Phylogenetic relationships, based on SSU rDNA sequences, among the didelphic genera of the family Trichodoridae from Portugal. *Nematology*, 12:171–180, 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*, 35:20-35, 2011.
- Ferraz, L.C.C.B. Observations on some *Xiphinema* species found in Brazil. *Nematologia mediterranea* 8: 141-151, 1980.
- Gutiérrez-Gutiérrez, C., Palomares-Rius, J.E., Cantalapiedra-Navarrete, C., Landa, B.B., Esmenjaud, D. & Castillo, P.. Molecular analysis and comparative morphology to resolve a complex of cryptic *Xiphinema* species. *Zoologica Scripta*, 39:483–498, 2010.
- Hunt, D.J. Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: Their Systematics and Bionomics. CAB International, Wallingford, UK, 1993.
- Oliveira C.M.G., Ferraz L.C.C.B., Neilson R. *Xiphinema krugi*, species complex or complex of cryptic species? *Journal of Nematology*. 38(4):418-428, 2006.