

UTILIZAÇÃO DO SOFTWARE QUANTONEMA COMO FERRAMENTA
APLICADA À NEMATOLOGIA

FELIPE DA SILVA COSTA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

AGOSTO – 2018

UTILIZAÇÃO DO SOFTWARE QUANTONEMA COMO FERRAMENTA
APLICADA À NEMATOLOGIA

FELIPE DA SILVA COSTA

Tese apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de doutor em Engenharia e Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. D.Sc. Angelus Giuseppe Pereira da Silva

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

AGOSTO – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

C837 Costa, Felipe da Silva.

UTILIZAÇÃO DO SOFTWARE QUANTONEMA COMO FERRAMENTA APLICADA À NEMATOLOGIA / Felipe da Silva Costa. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

91 f. : il.

Bibliografia: 81 - 91.

Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciência e Tecnologia, 2019.

Orientador: Angelus Giuseppe Pereira da Silva.

1. software. 2. progênie. 3. nematoide. 4. nematoda. 5. quantificação. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 620.11

UTILIZAÇÃO DO SOFTWARE QUANTONEMA COMO FERRAMENTA APLICADA À NEMATOLOGIA

FELIPE DA SILVA COSTA

Tese apresentada ao centro de ciência e tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de doutor em Engenharia e Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. D.Sc. Angelus Giuseppe Pereira da Silva

Aprovada em 10 de agosto de 2018.

Comissão Examinadora:

Cláudia de Melo Dolinski (Ph.D) – UENF

Liliana Parente Ribeiro (D.Sc.) – UENF

Eglon Rhuan Salazar Guimarães (D.Sc.) – IFES

Prof. Angelus Giuseppe Pereira da Silva (D.Sc.) – UENF
Orientador

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

Dedico este trabalho aos meus pais, José Freitas (in memoriam) e Célia Costa pelo incentivo aos estudos e por acreditar no verdadeiro amor e recuperar a fé. Dedico a Deus por sempre estar presente em minha vida, me dar saúde, iluminação, força nos momentos difíceis e proteção nas estradas para universidade por todos os dias, me fortalecendo com a força da fé.

AGRADECIMENTOS

A Deus;

A UENF, pela oportunidade de realização do curso e a Faperj pela concessão da bolsa;

A minha família, pais e irmãos;

Aos meus professores, Angelus Giuseppe e Cláudia Dolinski pela oportunidade, amizade, motivação e confiança;

Ao programador de software Eglon Guimarães pelo apoio na pesquisa desenvolvida;

A todos os funcionários do LAMAV e CCTA da UENF;

A Faculdade Santa Marcelina pela oportunidade de realização dos experimentos;

Aos amigos Liliana, Otávio e Saulo pelo incentivo aos estudos, pelas palavras de coragem e por acreditar na realização desta grande etapa de vida;

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na execução desse trabalho.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	VII
Lista de tabelas.....	IX
Lista de gráficos.....	X
Resumo.....	XI
Abstract.....	XII
1. Introdução.....	13
2. Justificativa.....	15
3. Ineditismo.....	16
4. Objetivos.....	17
4.1. Objetivo geral.....	17
4.2. Objetivos específicos.....	17
5. Revisão bibliográfica.....	18
5.1. Nematologia.....	18
5.1.1. Nematoides Entomopatogênicos (NEPs)	18
5.1.1.1. Família Steinernematidae.....	21
5.1.1.2. Família Heterorhabditidae.....	21
5.1.2. Testes de progênie	22
5.1.3. Quantificação de ovos de fitonematoides	23
5.1.4. Nematofauna.....	25
5.2. Uso de softwares aplicados em experimentos da nematologia.....	26
5.3. O Software Quanto.....	31
5.3.1. O Qt software	32
5.3.2. Biblioteca OpenCV	33
5.3.3. Etapas do desenvolvimento do software Quanto.....	34
5.3.3.1. Primeira etapa.....	35
5.3.3.1.1. Definição de recursos e interface.....	35
5.3.3.1.2. Desenvolvimento de códigos.....	36
5.3.3.2. Segunda Etapa.....	36
5.3.3.2.1. Definição de recursos e interface.....	36
5.3.3.2.2. Desenvolvimento de códigos.....	36
5.3.3.2.2.1. Seleção de escalas	36

5.3.2.2.2.2. Criação de formas	37
5.3.2.2.2.3. Realização de contagens.....	37
5.3.2.2.2.4. Contagem automática	38
5.3.3.2.3. Distribuição do Software.....	38
5.3.3.3. Terceira etapa	39
5.3.3.3.1. Definir recursos e interface	39
5.3.3.3.2. Desenvolver código	39
5.3.3.3.2.1. Salvamento e carregamento projeto (criação da extensão “.qto”)	39
5.3.3.3.2.2. Ação de Avançar e retornar imagens.....	40
5.3.3.3.2.3. Salvamento de relatório	40
5.3.3.3.2.4. Exportação de imagem.....	41
5.3.3.3.2.5. Fração volumétrica por fração de pontos	41
5.3.3.3.2.6. Área superficial por unidade de volume teste	41
5.3.3.3.2.7. Comprimento por unidade de volume teste	42
5.3.3.3.2.8. Distribuição do Software	42
5.3.2. Interface gráfica do software Quanto.....	42
6. Materiais e Métodos.....	44
6.1. Utilização do software QuantoNema para estudos de progênie.....	44
6.1.1. Multiplicação de nematoides entomopatogênicos.....	44
6.1.1.1. Criação de larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	44
6.1.1.2. Multiplicação de nematoides entomopatogênicos (NEPs)	46
6.1.2. Teste de progênie tradicional.....	48
6.1.3. Teste de progênie com software QuantoNema.....	49
6.2. Quantificação de ovos de nematoides fitoparasitas.....	52
6.2.1. Contagem de ovos pelo método tradicional.....	53
6.2.2. Contagem de ovos com uso de software.....	54
6.3. Uso de uma plataforma do software QuantoNema para levantamento de nematofauna.....	56
6.4. Avaliação Qualitativa.....	61
7. Resultados e discussão	62
7.1. Teste de progênie.....	62
7.1.1. Comparação de variância entre os grupos de contagem tradicional.....	62
7.2. Contagem de ovos de nematoides.....	65

7.1.2. Comparação de variância entre os grupos de contagem com o uso de software QuantoNema.....	64
7.1.3. Comparação da quantificação de JIs entre o método tradicional e com uso do software.....	66
7.1.4. Comparação do tempo de duração para contagem de JIs entre o método tradicional e com uso de software QuantoNema.....	68
7.2. Quantificação de ovos de fitonematoides.....	70
7.3. Uso do software para Nematofauna.....	74
7.4. Resultados Qualitativos.....	77
8. Conclusões.....	79
9. Trabalhos Futuros.....	81
9. Referências Bibliográficas.....	82

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Nematoides entomopatogênicos (NEPs) na fase juvenil infectante do gênero <i>Heterorhabditis</i> em microscopia óptica. Aumento 10x.....	19
Figura 2. Cadáver de uma larva de <i>Galleria mellonella</i> com NEPs.....	22
Figura 3. Ovos de <i>Meloidogyne</i> spp. em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário representados em A, B, C e D. Fonte: Dalzell 2010.....	23
Figura 4. Ovos de fitoparasita (<i>Meloidogyne</i> sp.) em uma galha indicados por uma seta.....	24
Figura 5. Diferentes grupos tróficos de nematoides. Fonte: KS3 & KS4.....	25
Figura 6. Material informatizado sobre nematologia elaborado por Eisenback.....	27
Figura 7. Multimídia sobre nematoides desenvolvido por Eisenback.....	27
Figura 8. Descrição do menu de acesso dos documentos informatizados. Fonte: Sociedade Brasileira de Nematologia.....	28
Figura 9. Página de acesso e download do software Mr.Bayes.....	29
Figura 10. Área de trabalho do software ClustalX versão1.83.....	29
Figura 11. Área de trabalho do software GDA Genetic Data Analysis.....	30
Figura 12. (A) Fotomicrografia de ovos de <i>Heterodera glycines</i> colonizados dentro do cisto pelo isolado de <i>Fusarium solani</i> (40X). (B) Fotomicrografia de hifas do isolado de <i>F. solani</i> em ovo de <i>Meloidogyne javanica</i> (100x). Fonte: Costa (2015)	31
Figura 13. Área de trabalho do software Quanto com contagem de elementos.....	31
Figura 14. Área de trabalho do software Quanto.....	32
Figura 15. Página da OpenCV versão 3.2 para downloads.....	34
Figura 16 - Interface gráfica do Quanto. Em 1) barra de menu; 2) caixas de ferramentas; 3) painel com lateral de funcionalidades; 4) ferramentas de criação de formas; 5) área de trabalho; 6) painel de <i>snapshot</i>	43
Figura 17. Larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	47
Figura 18. Potes de criação de larvas de <i>T. molitor</i> em dieta artificial.....	48
Figura 19. Larva de <i>Tenebrio molitor</i> infectada por NEPs, seta indica cadáver com coloração típica de infecção.....	46
Figura 20. Armadilhas de White para coleta de nematoides JIs.....	47
Figura 21. Em A, estrutura de uma armadilha de White e em B, nematoides juvenis infectantes <i>Heterorhabditis</i> indica após emergência.....	47

Figura 22. Amostra com JIs para quantificação em progênie através do método tradicional em microscópio.....	48
Figura 23. Software da AmScope, projetado para edição de imagens e captura de fotos por câmera digital para microscópio.....	49
Figura 24. Software QuantoNema com imagem de microscopia. O número 1 indica os nematoides marcados automaticamente e manualmente.....	51
Figura 25. Uso do software QuantoNema acoplado ao microscópio óptico para realização de progênie no Laboratório de Biologia da FASM Muriaé.....	52
Figura 26. O círculo vermelho indica a localização da galha de nematoide fitoparasita <i>Meloidogyne javanica</i> no sistema radicular de um tomateiro proveniente da casa de vegetação CCTA/UENF.....	53
Figura 27. Em A, preparação das raízes para processamento. Em B, seta indica uma galha de nematoide fitoparasita <i>M. javanica</i> no sistema radicular tomateiro <i>L. lycopersicum</i>	54
Figura 28. Dashboards do software QuantoNema utilizada para contagem manual de ovos de nematoides.....	55
Figura 29. Área de trabalho do software para contagem automática. Ovos marcados automaticamente a partir do modelo selecionado “Selecionar Template”.....	56
Figura 30 - Os diferentes grupos tróficos. A.Bacteriófago, B.Predador, C.Fitoparasita, D. Micófago. Imagem: Felipe Costa / 2012.....	57
Figura 31. Horto Florestal (Unidade de Conservação – Parque Municipal Guido Marlière), local de coleta das amostras de solo. Muriaé, MG. Fonte: Google Maps 18/10/18.	
Figura 32. Em A, processo de separação com peneiras de 60 e 500 Mesh. Em B, processo de centrifugação das amostras.....	58
Figura 33. Dashboards do software QuantoNema.....	59
Figura 34. Área de trabalho do software QuantoNema com amostra de um fitonematoide identificado, marcado e contabilizado.....	60
Figura 35. Operação do software com marcações e quantificação de ovos de nematoides.....	72
Figura 36. Fitonematoide identificado e marcado através do software QuantoNema.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias obtidas com método tradicional de contagem do número de nematoides JIs em três repetições, A, B e C.....	62
Tabela 2. Valores de tempo (s) em três repetições (A, B e C) durante a contagem de JIs através do método tradicional.....	63
Tabela 3. Médias obtidas com método de contagem do número de JIs através do software QuantoNema em três repetições, A, B e C.....	64
Tabela 4. Médias do tempo (em segundos) em três repetições (A, B e C) durante a contagem de JIs com uso do software QuantoNema.....	65
Tabela 5. Valores do tempo contabilizado entre o teste tradicional e com uso do software Quanto. * Valores em segundos (s)	70
Tabela 6. Quantificação de ovos entre as amostras pelo método de contagem tradicional e com uso do software QuantoNema.....	72
Tabela 7. Número de nematoides identificados por amostra entre os diferentes grupos tróficos (P – Predador, B – Bacteriófago, M – Micófago e F – Fitoparasita) em três repetições A, B e C.....	75

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Dados comparativos entre as médias do número de JIs entre o método tradicional com uso do software em três repetições (A, B e C), teste de progênie.....66
- Gráfico 2.** Dados comparativos entre as médias do tempo (segundos) de duração para contagem de JIs entre o método tradicional com uso do software em três repetições (A, B e C), teste de progênie.....68
- Gráfico 3.** Resultados de períodos de tempo (em segundos) da contagem de ovos de fitonematoides entre teste tradicional e com uso de software Quanto.....71
- Gráfico 4.** Dados comparativos do número de ovos de nematoide *M. javanica* entre os métodos de quantificação tradicional e com uso do software QuantoNema.....73
- Gráfico 5.** Resultados do número de nematoides em diferentes grupos tróficos (Nematofauna) de Mata Atlântica, Muriaé, MG. Em A, B e C repetições representadas por usuárias do software QuantoNema.....76

RESUMO

A área da nematologia apresenta diversas metodologias tradicionais que sustentam vários projetos científicos. A carência de metodologias com uso da informatização prejudica a otimização de muitos desses projetos. A progênie (produção de juvenis infectantes - JIs) de nematoides entomopatogênicos (NEPs), contagem de ovos de nematoides e estudo da nematofauna são algumas das metodologias utilizadas na nematologia. O objetivo da pesquisa foi utilizar a capacidade de um software simples para aprimorar diferentes testes aplicados à nematologia. Para realização do teste, foram realizados experimentos de progênie de NEPs, contagem de ovos de fitonematoides e identificação de nematofauna de solo. Os testes foram realizados a partir de metodologias tradicionais e com uso do software QuantoNema. O teste de progênie foi realizado com uso de larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera) infectadas por NEPs *Heterorhabditis indica* LPP30. Para quantificação de ovos de fitonematoides, foi utilizado o método de Hussey & Barker (1973), modificado por Boneti & Ferraz (1981). Em análise comparativa, o mesmo procedimento tradicional de contagem de ovos foi realizado com uso do software QuantoNema. Para realização do teste de levantamento de nematofauna de solo, foi utilizado o método de Jenkins (1964). O teste de progênie foi realizado, e as médias do número de JIs e os valores do tempo de duração da experimentação foram comparados estatisticamente entre o método tradicional e com uso do software. O tempo de duração pelo uso do software foi maior em relação ao tempo de experimentação pelo método tradicional. O teste de progênie realizado com o uso do software favoreceu o usuário em disponibilizar imagens das amostras para trabalhos futuros, revisões de contagem e flexibilidade de desenvolver o trabalho fora do laboratório. O software auxiliou nos estudos de nematofauna com ferramentas de suporte para identificação e contagem dos JIs. A vantagem na redução do tempo constatada durante as contagens de ovos com uso do software em comparação ao método tradicional, permitiu ao usuário menor tempo de execução de pesquisa, arquivamento das imagens para estudos futuros, além de proporcionar melhorias na ergonomia e amenização de estafa corpórea do pesquisador.

Palavras-chave: Software, Nematologia, Progênie.

ABSTRACT

The area of the nematology presents several traditional methodologies that support several scientific projects. The lack of methodologies with the use of computerization impairs the optimization of many of these projects. The progeny (infective juvenile production - JIs) of entomopathogenic nematodes (EPNs), nematode egg counts and nematode fauna are some of the methodologies used in nematology. The objective of the research was to use the ability of simple software to improve different tests applied to nematology. For the test, progeny experiments of EPNs, phytoematoid egg counting and identification of soil nematodes were carried out. The tests were carried out using traditional methodologies and using the software QuantoNema. The progeny test was performed using *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae infected by EPNs *Heterorhabditis indica* LPP30. For quantification of phytonematoid eggs, the Hussey & Barker (1973) method, modified by Boneti & Ferraz (1981), was used. In a comparative analysis, the same traditional egg counting procedure was carried out using the software QuantoNema. For the soil nematode test, the Jenkins method (1964) was used. The progeny test was performed, and the means of the number of JIs and the values of the duration of the experiment were compared statistically between the traditional method and with software use. The duration of software use was longer compared to the traditional method. The progeny test performed with the use of the software favored the user in making available samples images for future work, counting revisions and flexibility to develop the work outside the laboratory. The software assisted in the nematode fauna studies with support tools for identifying and counting JIs. The advantage in reducing the time found during counts of eggs using the software in comparison to the traditional method allowed the user less research execution time, archiving of the images for future studies, besides providing improvements in the ergonomics and mitigation of corporeal scam of the researcher.

Key words: Software, Nematology, Progeny.

1. Introdução

Os nematoides são animais que apresentam corpo cilíndrico e afilado nas extremidades do corpo. Os nematoides estão agrupados no filo Nematoda, considerado o segundo filo com maior número de espécies e o primeiro lugar com maior número de indivíduos entre grupos de animais. A nematologia é área da biologia que estuda as características morfofisiológicas, filogenéticas e comportamental das diversas espécies de nematoides, apresentam relevância ambiental e comercial, principalmente no setor agrônômico.

Os nematoides são diversos e agrupados em níveis tróficos, como por exemplo, os fitoparasitas (Parasitas de vegetais, possuem estilete para perfurar raízes e se alimentar de seiva), micófagos (Nematoides que se nutrem de hifas de fungos, possuem um estilete alongado), predadores (Nematoides que possuem esôfago musculoso desenvolvido e boca com dentes quitinosos) e bacteriófagos (Nematoides que se alimentam de bactérias), que incluem também os nematoides entomopatogênicos que são utilizados amplamente no manejo biológico de insetos pragas.

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) são representados por dois gêneros, *Heterorhabditis* e *Steinernema* Travassos. Ambos são patógenos obrigatórios de insetos. Esses nematoides possuem uma associação simbiótica com bactérias patogênicas dos gêneros *Xenorhabdus* Thomas & Poinar e *Photorhabdus* Boemare, Louis & Kuhl, associadas respectivamente aos nematoides dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Poinar, 1990). Os NEPs possuem habilidade de localizar e entrar no corpo de insetos hospedeiros através de aberturas naturais ou até mesmo através da perfuração de sua cutícula com uso de um dente quitinoso como ocorre nas espécies do gênero *Heterorhabditis*.

Diversos experimentos realizados com nematoides, em especial, com os NEPs, são executados de maneira tradicional com o uso manual de microscópios ópticos e lupas. Muitas metodologias de progênie (produção de nematoides), contagem de ovos de fitonematoides e levantamento de nematofauna conforme o nível, em sua maioria são realizadas sem auxílio de alguma programação informatizada, o que resulta em pesquisa exaustiva quando demanda tempo para contagens manuais, indução à uma

margem de erro durante a contabilização, aumento de gasto de energia e cansaço físico e visual.

A pesquisa desenvolvida nesta tese, teve como ferramenta importante, o uso de um software simples, o QuantoNema, capaz de substituir procedimentos manuais de contagem de elementos (nematoides e ovos) em imagens de microscópios por procedimentos supervisionados e auxiliados por um programa computacional. O software QuantoNema oferece ferramentas também que permite ao usuário realizar levantamento de nematofauna, ou seja, identificação e quantificação de grupos tróficos de nematoides de solo.

O software Quanto, foi desenvolvido por Guimarães (2016) e recebeu o nome de QuantoNema após modificações aplicadas às diversas tarefas da nematologia.

A pesquisa fundamentou-se em comparações dos dados obtidos entre os dois métodos (metodologia manual tradicional e com uso do software QuantoNema) de contagem de nematoides (progênie) e de ovos de fitonematoides. Além de auxiliar no levantamento de nematofauna com disponibilidade de ferramentas auxiliares que facilitem a identificação e classificação dos nematoides nos diferentes grupos tróficos. O uso de ferramentas digitais e informatizadas torna-se viável à área de nematologia, bem como em outras áreas da biologia. A carência de ferramentas que tendem aprimorar diversas metodologias na área, faz com que esta experimentação com uso do software seja um grande passo na informatização afim de auxiliar ao pesquisador na agilidade de suas pesquisas.

2. Justificativa

A pesquisa se justifica por investigar o impacto causado pelo uso de um software em procedimentos comuns na área de nematologia que são realizados manualmente. O uso de um software simples e de qualidade torna-se uma ferramenta útil aplicada aos diversos testes realizados na nematologia de modo tradicional manual. A carência de ferramentas informatizadas representa uma oportunidade de pesquisa que, se bem executada, trará contribuições importantes aos métodos empregados na área da nematologia.

Para muitos engenheiros de software, a qualidade do processo de software é tão importante quanto a qualidade do produto (Rocha, 2001). A qualidade do processo do software denominado, QuantoNema, permite a melhoria frente aos resultados poucos precisos e demorados em diversas práticas na área da nematologia, como a contagem por produção de NEPs em progênie, contagem de ovos de fitonematoides e identificação de grupos de nematoides (nematofauna) de solo. A possibilidade de suprir metodologias tradicionais de contagem de estruturas em imagens capturadas de microscópios por métodos informatizados, justifica a realização desta pesquisa. O uso do software QuantoNema tende a criar um novo recurso para futuros testes nematológicos em relação ao tempo de execução de pesquisa, armazenamento de dados e imagens, tratamento de fotos capturadas, melhor ergonomia e redução de estafa corpórea.

3. Ineditismo

A utilização de um software simples QuantoNema aplicado às diferentes metodologias aplicadas na área da nematologia é inédito. Não há software desenvolvido ou disponível para realizar contagens de nematoides de forma manual ou automatizada para testes de progênie, quantificação de ovos e com ferramentas no auxílio para identificação de nematofauna. Na internet encontra-se apenas alguns softwares de armazenamento de dados genéticos de nematoides disponíveis, apenas para consulta, registro e estabelecimento de linhas filogenéticas, portanto, não há nenhum software desenvolvido especificamente que auxilie nos métodos de experimentação na área. Uma pesquisa foi realizada no site de busca do “Scopus”, e nada foi encontrado sobre software aplicado na área da nematologia que ofereça ferramentas para progênie, quantificação de ovos e nematofauna. O software desenvolvido, o QuantoNema, além de possibilitar contagens manuais e automatizadas, apresenta operações capazes de editar imagens com filtros e zoom, realizar marcações, quantificação de elementos, e armazenamento de imagens editadas. O software apresenta também ferramentas que auxiliam na identificação de nematoides entre os diferentes grupos de nematofauna de solo. O software contribuirá para os estudos futuros e práticas metodológicas relacionados à nematologia, uma ferramenta totalmente nova e de grande relevância para pesquisadores da área que pretendem melhorar seus experimentos.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

Testar a capacidade de um software simples para aprimorar diferentes testes aplicados à nematologia.

4.2. Objetivos específicos

- ✓ Realizar teste de progênie tradicional (Contagem de juvenis infectantes) em análise comparativa com a progênie realizada com uso do software QuantoNema.
- ✓ Comparar a quantificação de ovos de fitonematoides entre a metodologia tradicional com o uso do software QuantoNema.
- ✓ Identificar nematoides de solo conforme os grupos tróficos (Nematofauna) com uso do software QuantoNema.
- ✓ Analisar estatisticamente número de elementos e o período de tempo utilizado entre as duas metodologias, a tradicional e com uso do software;

5. Revisão bibliográfica

5.1. Nematologia

Os nematoides estão incluídos no filo Nematoda, também chamado Nemata, que reúne animais triblásticos, pseudocelomados, com simetria bilateral, de corpo cilíndrico, alongado e afilado nas extremidades. A área da zoologia que estuda as características morfofisiológicas, filogenéticas e comportamental dos nematoides é conhecida como nematologia. O tamanho dos nematoides pode variar de menos de 100 μm (micrômetros) de comprimento a mais de 12 metros. Diversas espécies são endoparasitas de plantas e de animais.

A maioria dos nematoides, no entanto, é de “vida livre” e habita ambientes diversos como solos úmidos e ricos em matéria orgânica, rios, lagos e oceanos. Há mais de 24 mil espécies desse Filo descritas na literatura. Isso coloca o Filo Nematoda em segundo lugar no número de espécies, à frente dos moluscos e atrás apenas dos artrópodes (Amabis & Martho, 2009).

O filo Nematoda incluiu 24793 espécies descritas a partir de 2011. Em relação ao número de espécies de nematoides, apenas cerca de 2% foi descrita, compõem apenas uma pequena fração do número total de nematoides, o que é pensado para ser em torno de 1 milhão de espécies (embora alguns estimam em até para 75 milhões). Um grupo com grande diversidade e adaptação, os nematoides ocupam praticamente todas as áreas da Terra (Hodda, 2011).

5.1.1. Nematoides Entomopatogênicos (NEPs)

Os NEPs pertencem aos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* e são considerados parasitas obrigatórios de insetos. Estes gêneros de nematoides apresentam associação simbiótica com bactérias patogênicas, gênero *Xenorhabdus* sp. associado a *Steinernema* e *Photorhabdus* sp. a *Heterorhabditis* (Poinar, 1990).

Esses nematoides possuem forma cilíndrico-alongada, sem segmentação e ausência de apêndices, são patógenos obrigatórios capazes de colonizar alguns invertebrados. Apresentam certas adaptações como: ser letais a insetos, possuir

associação simbiote com bactérias entomopatogênicas e o seu terceiro estágio (J3), também chamado de juvenil infectante (JI), ter a capacidade de penetrar nos insetos e de sobreviver no solo por tempo limitado (Akhurst & Boemare, 1990; Sudhaus, 1993). Os JIs, considerados como única fase de vida-livre dos NEPs, entram no hospedeiro a partir das suas aberturas naturais, boca, ânus e espiráculos, mas em algumas situações, os juvenis do gênero *Heterorhabditis* também podem perfurar a cutícula.

Assim que os JIs atingem a hemocele do inseto, ocorre a liberação das bactérias simbiotas que causarão infecção e morte do hospedeiro. Estas mesmas bactérias após proliferarem servem de base para a nutrição dos nematoides e para defesa do cadáver contra invasores secundários (Poinar, 1990).

O ciclo de vida dos NEPs se inicia quando os juvenis infectantes (Figura 1) penetram no corpo do inseto hospedeiro (Grewal *et al.*, 2001).



Figura 1. Nematoides entomopatogênicos (NEPs) na fase juvenil infectante do gênero *Heterorhabditis* em microscopia óptica, aumento 10x.

Ao penetrarem no hospedeiro os JIs de *Steinernema* spp. passam ao último estágio juvenil (J4) e posteriormente a adultos de primeira geração (machos e fêmeas). Enquanto que, nos *Heterorhabditis* spp. os adultos da primeira geração são hermafroditas e a segunda é composta de machos e fêmeas (Adams & Nguyen, 2002). Dentro do inseto cadáver, ocorrem de duas a três gerações e quando as reservas de

alimentos se extinguem, os nematoides se desenvolvem em JIs, que saem do inseto cadáver e vão para o ambiente em busca de novos hospedeiros (Grewal *et al.*, 2001).

Antes dos JIs deixarem o cadáver, as bactérias simbiontes são apreendidas em uma vesícula especializada nos JIs do gênero *Steinernema*, já para as espécies pertencentes ao gênero *Heterorhabditis*, as bactérias simbiontes são apreendidas e armazenadas na região anterior do intestino dos JIs, que não possui vesícula (Adams & Nguyen, 2002). Outra característica apresentada pelos NEPs de suma importância está relacionada à sua capacidade de dispersão e busca pelo hospedeiro. Estes nematoides são atraídos por subprodutos das atividades metabólicas do hospedeiro, como a respiração, que ocasiona em diferentes teores de CO₂ (Zuckerman & Jansson, 1984; Gaugler *et al.*, 1989).

Em relação ao tipo de movimento e comportamento, os NEPs classificam-se em “ambusher” ou “cruiser”. Um exemplo típico “ambusher”, *Steinernema carpocapsae* Weiser, caracteriza-se por ficar parado sobre a cauda na superfície do substrato, aguardando a aproximação do hospedeiro. Este tipo de comportamento é conhecido como nictação, que permite aos NEPs alcançarem outros substratos ou hospedeiros mediante movimentos sincronizados e ondulatórios do corpo (Ishibashi & Kondo, 1990). *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar e *Steinernema glaseri* Steiner são exemplos típicos de “cruiser”, pois são móveis e buscam os hospedeiros em resposta aos fatores químico-atraentes (Kaya & Gaugler, 1993).

Os NEPs estão amplamente distribuídos nos continentes e apresentam grande diversidade. Os NEPs, por serem do solo, sofrem influência de características deste habitat, como tamanho dos poros, umidade, concentração de gás oxigênio, temperatura e pH (Barbercheck, 1992). As relações de todos estes fatores abióticos podem afetar desde a sobrevivência até a capacidade de infecção dos NEPs (Kaya, 1990). Alguns NEPs podem apresentar tolerância a temperaturas extremas, mas há possibilidade que a baixa taxa de umidade do solo altere sua capacidade de deslocamento e persistência (Kung *et al.*, 1991).

5.1.1.1. Família Steinernematidae

Segundo Kaya & Gaugler (1990), Steiner descreveu o primeiro NEP isolado na Alemanha em 1923, como *Aplectana kraussei*. Em 1927, Travassos estabeleceu o gênero *Steinernema* para abrigar esta espécie. Então, Steiner (1929) *apud* Glaugler e Kaya (1990) criou o gênero *Neoaplectana*, mas não estabeleceu características que o distinguisse claramente do gênero *Steinernema*. Filipjev, em 1934, observando a semelhança entre os dois gêneros, criou a subfamília denominada Steinernematinae, que logo depois foi elevada à condição de família por Chitwood & Chitwood, em 1937. Os dois gêneros foram admitidos como válidos, mas as espécies até então descritas já estavam incluídas em *Neoaplectana*. Isso prevaleceu por décadas. Em estudos posteriores concluíram não existirem diferenças em relação a *Neoaplectana* quanto ao número e arranjo das papilas labiais e, em razão disso, propuseram que *Neoaplectana* passasse a ser considerado sinônimo de *Steinernema* (Wouts et al., 1982). Este tipo de preposição proporcionou inevitável confusão no âmbito dos estudos envolvendo esse grupo de NEPs.

5.1.1.2. Família Heterorhabditidae

A família Heterorhabditidae Poinar 1976 contém um único gênero, *Heterorhabditis*, com a espécie tipo *H. bacteriophora*. Segundo Adams & Nguyen (2002), o ciclo de vida das espécies do gênero *Heterorhabditis* é semelhante aos representantes do gênero *Steinernema*, a diferença ocorre quando no primeiro ciclo dentro do hospedeiro a primeira geração formada é hermafrodita, e os machos e as fêmeas só aparecem na segunda geração.

5.1.2. Testes de progênie

Os testes de progênie são definidos como a avaliação da produção de juvenis infectantes (JIs) de nematoides entomopatogênicos em um determinado tipo de inseto hospedeiro (figura 2). Adams e Nguyen (2002) afirmam que a produção de NEPs é dependente da quantidade de reservas alimentares do hospedeiro. Embora a produção de JIs sofra influências das condições de temperatura, virulência, do tamanho do hospedeiro e das diferentes espécies de NEPs, a obtenção de progênie destaca a possibilidade do uso eficiente dos NEPs no controle de diversas pragas (Kaya e Stok, 1997).



Figura 2. Cadáver de uma larva de *Galleria mellonella* com NEPs.

O teste de progênie é uma metodologia importante que expressa dados de produção de juvenis infectantes em diferentes espécies de insetos hospedeiros. A quantificação da produção de NEPs torna-se uma ferramenta relevante para estabelecer espécies com maior capacidade de produção de juvenis infectantes. A produção de nematoides está amplamente relacionada à espécie e seu tamanho.

5.1.3. Quantificação de ovos de fitonematoides

Os fitonematoides (nematoides parasitas de plantas) são parasitos obrigatórios e sua alimentação é adquirida somente a partir de plantas vivas (Williamson & Hussey, 1996). Determinados fitonematoides são ectoparasitas, parasita-se fora do seu hospedeiro, outras espécies conservam parte de seu ciclo de vida no interior das raízes como endoparasitas migratórios ou sedentários. Os endoparasitas sedentários da família Heterorhabditidae causam a maior parte dos prejuízos econômicos em todo o mundo. Esta família pode ser dividida em dois grupos: os nematoides de cisto, que incluem os gêneros *Heterodera* e *Globodera*, e os nematoides de galhas, gênero *Meloidogyne* (Williamson & Hussey, 1996).

Segundo Ferraz (2001), a erradicação dos fitonematoides torna-se uma tarefa quase impossível, porque esses parasitas possuem um mecanismo de sobrevivência, a criptobiose, que permitem que os ovos permaneçam vivos por longos períodos no solo (figura 3). A busca por diversas medidas de manejo deve ser utilizada de modo coesa, buscando manter as populações em nível mínimo. A rotação de culturas e o uso de plantas resistentes é uma opção relevante para o manejo dos fitoparasitas.

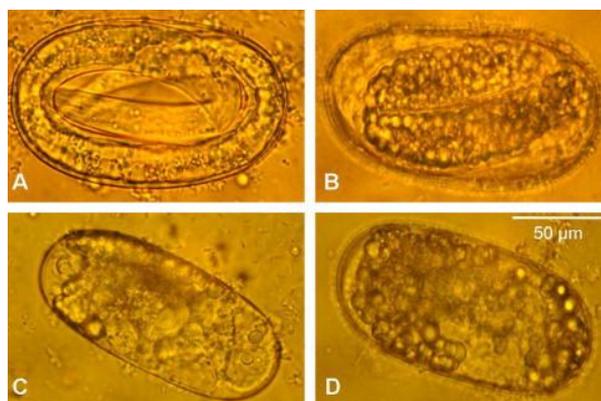


Figura 3. Ovos de *Meloidogyne* spp. em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário representados em A, B, C e D. Fonte: Dalzell 2010

Os fitonematoides do gênero *Meloidogyne*, conhecidos como nematoides das galhas, apresentam ampla dispersão e acarretam grandes prejuízos aos agricultores através da redução do volume de cultivo e qualidade dos produtos provenientes de áreas infestadas. No Brasil diferentes culturas de relevância econômica são acometidas pelos fitonematoides das galhas, como: algodão, cana-de-açúcar, café, feijão, soja, além de outras espécies de hortaliças e frutíferas (Silva, 2001).

Os fitonematoides de galhas são qualificados como endoparasitas sedentários, o grupo mais importante em relação à produção vegetal. E estes nematoides são considerados biotróficos obrigatórios, ou seja, seus juvenis infectantes estimulam células nutridoras no vegetal hospedeiro, e para se alimentar sobre essas células o fitonematoide cria um canal de alimentação. A partir dessa associação desarmônica entre o parasita e a planta hospedeira, formam fêmeas com estrutura semelhante com uma vesícula (figura 4), que perdem movimento e tornam-se verdadeiras máquinas de produzir ovos. As espécies *M. javanica* e *M. incognita*, originam ao redor de 400 ovos, em média, ao longo de período variável de quatro a seis semanas, sob condições adequadas de temperatura (Ferraz, 2001).

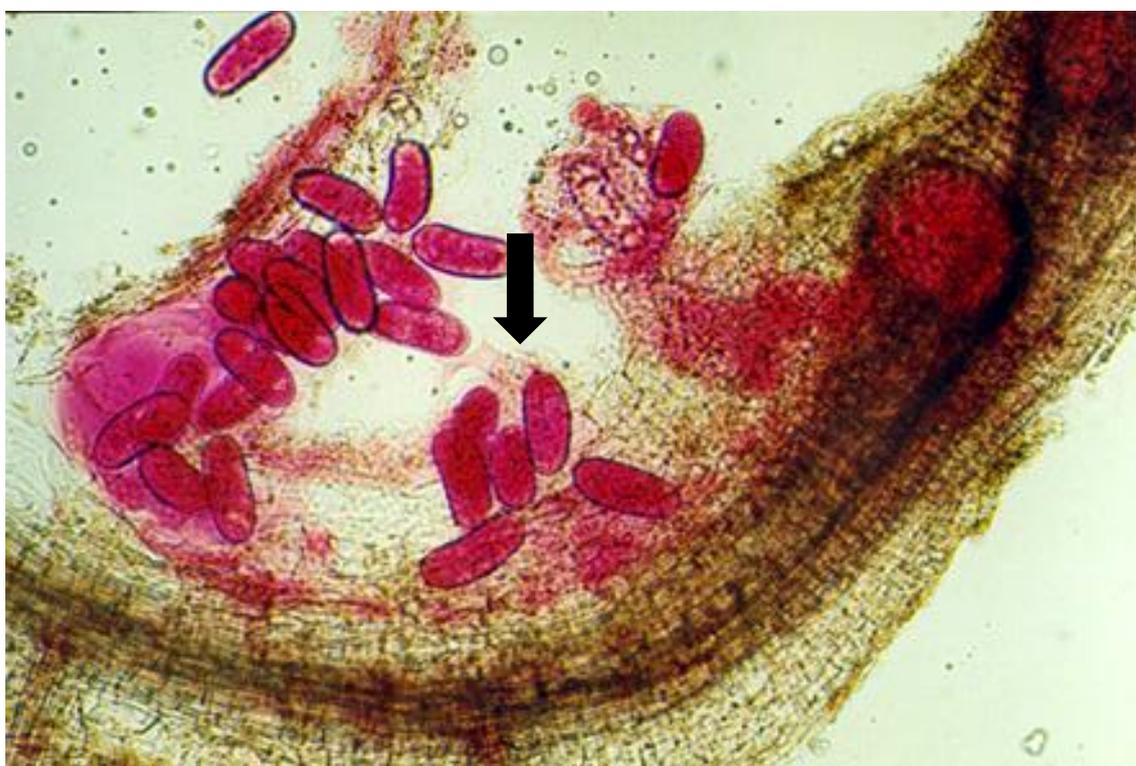


Figura 4. Ovos de fitoparasita (*Meloidogyne* sp.) em uma galha indicados por uma seta.

A quantificação de ovos de fitonematoides, bem como o conhecimento de todo seu ciclo de vida, torna-se imprescindível para adoção de estratégias que favorecem a redução da proliferação de fitonematoides no ambiente, para que a produção vegetal não seja danificada no transcorrer dos anos com diversas áreas infestadas por esses fitonematoides.

5.1.4. Nematofauna

O levantamento de nematofauna é caracterizado pelo agrupamento de nematoides em diferentes grupos tróficos (Micófagos, Bacteriófagos, Predadores e Fitoparasitas) representados na figura 5. Os estudos relacionados à avaliação da distribuição vertical e horizontal da comunidade de nematoides e das variáveis físicas do solo, são conhecidos como nematofauna (Rodrigues, 2010).

Os nematoides de solo são classificados de acordo com a morfologia adaptada e associada a sua alimentação. A elaboração de estudos de monitoramento da diversidade de grupos tróficos desses nematoides de solo em uma determinada área tende a indicar o estado ambiental do ecossistema, bem como o uso de informações para avaliar a qualidade do solo. Por sua abundância, especificidade alimentar, ciclo reprodutivo, morfologia e resposta rápida a mudanças ambientais, os nematoides são considerados excelentes bioindicadores (Oliveira, 2007).

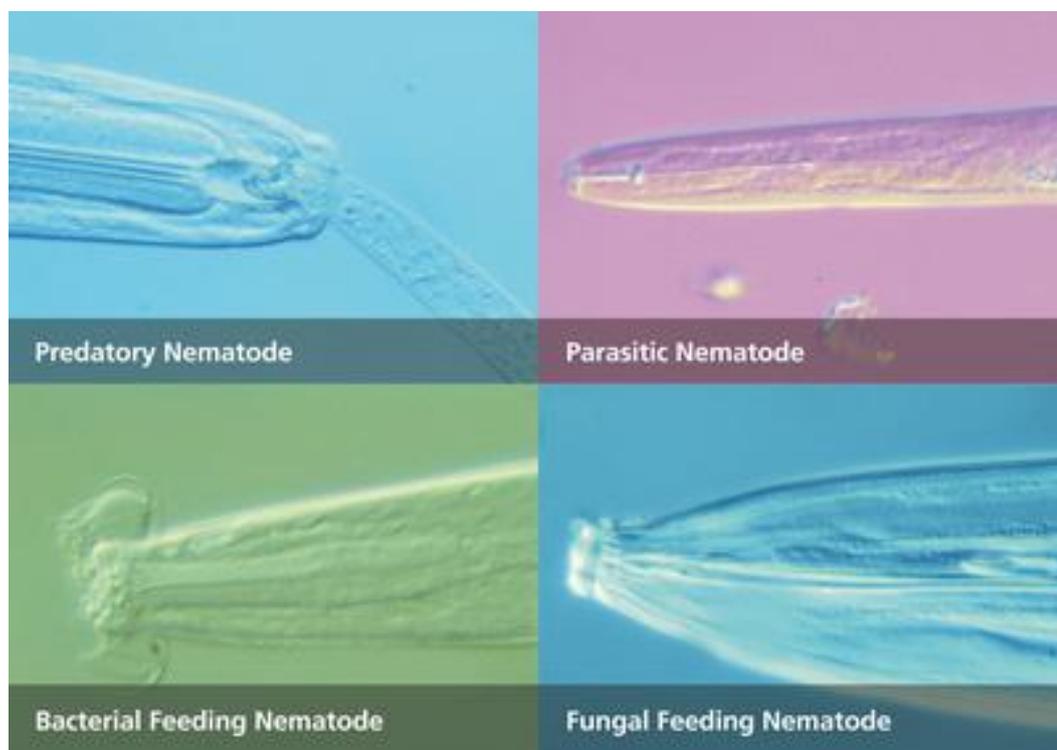


Figura 5. Diferentes grupos tróficos de nematoides. Fonte: KS3 & KS4

5.2. Uso de softwares aplicados em experimentos da nematologia

Os estudos relacionados à nematologia, apresentam relevância ambiental e comercial, principalmente no setor agrônomo.

Diversos experimentos realizados com nematoides, em especial, com os NEPs, são executados de maneira tradicional com o uso manual de microscópios ópticos e lupas. Muitas metodologias de progênie, quantificação de ovos e levantamento de nematofauna, em sua maioria são realizadas sem auxílio de alguma programação informatizada (Uso de Softwares).

Diversas pesquisas nematológicas são realizadas com uso de análise de PCR (Polymerase Chain Reaction), análise com extração de DNA e o uso de softwares para análise filogenética. A utilização de softwares em pesquisas torna-se viável por ser mais barato, que requer um investimento menor, além de maximizar os estudos.

De acordo com a ABES (Associação Brasileira das Empresas de Software), software é um conjunto de instruções lógicas, desenvolvidas em linguagem específica, que permite ao computador realizar as mais variadas tarefas do dia-a-dia de empresas, profissionais de diversas áreas e usuários em geral. Segundo Carmona (2008), o software como uma sequência de instruções a serem seguidas e/ou executadas.

Em relação à construção de softwares e programas como ferramentas nos experimentos e estudos na área da nematologia, percebe-se que há uma carência deste tipo de informatização que tende a otimizar o trabalho do pesquisador.

Eisenback (1993) desenvolveu um software de multimídia para técnicas e interação em nematologia. O software disponibilizava imagens, caixas de textos, descrição de técnicas e vídeos informativos representados na figura 6.

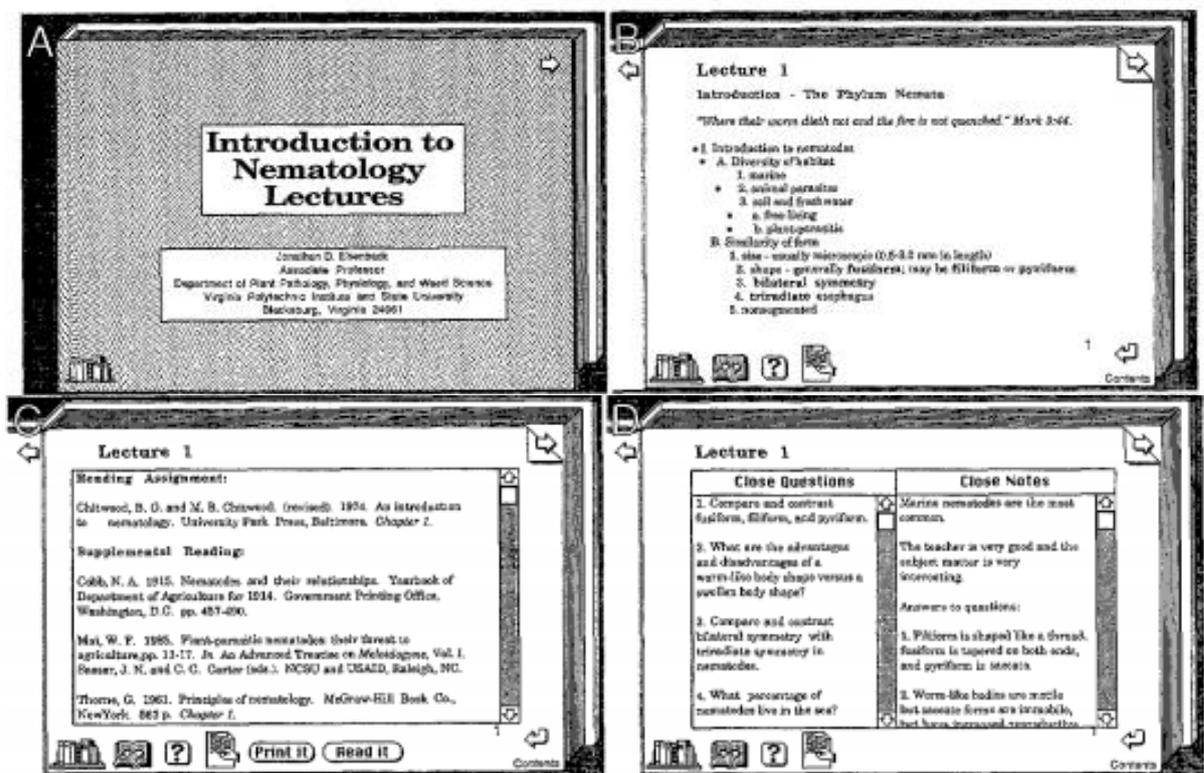


Figura 6. Material informatizado sobre nematologia elaborado por Eisenback (1993)

Em 1997, como resultado de muitos esforços despendidos na compilação, organização e indexação de artigos sobre a taxonomia dos nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.), Eisenback disponibilizou à venda de CD-ROM com seu trabalho (figura 7).

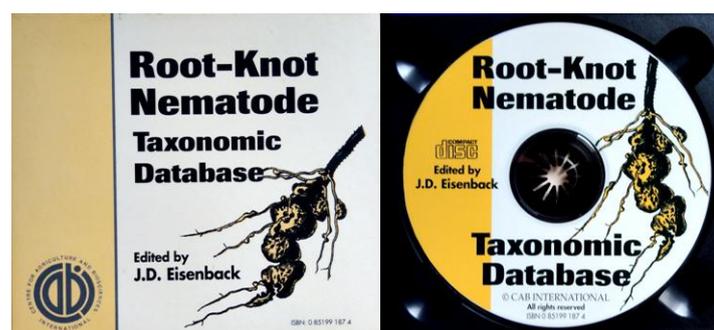


Figura 7. Multimídia sobre nematoides desenvolvido por Eisenback.

O recurso audiovisual na época, abordava uma grande quantidade de dados sobre os nematoides de galhas. Os dados apresentados neste material de multimídia contam com artigos sobre morfologia clássica, identificação molecular, sistemática, distribuição e caracterização das espécies. Os trabalhos são facilmente acessados pelo menu central que inclui links de todos os itens mencionados (figura 8).

O material de multimídia informatizado por Einseback (1997), incluía um pequeno número de imagens e de vídeos elucidativos de regiões perineais, dissecação de galhas e outros aspectos de *Meloidogyne*.

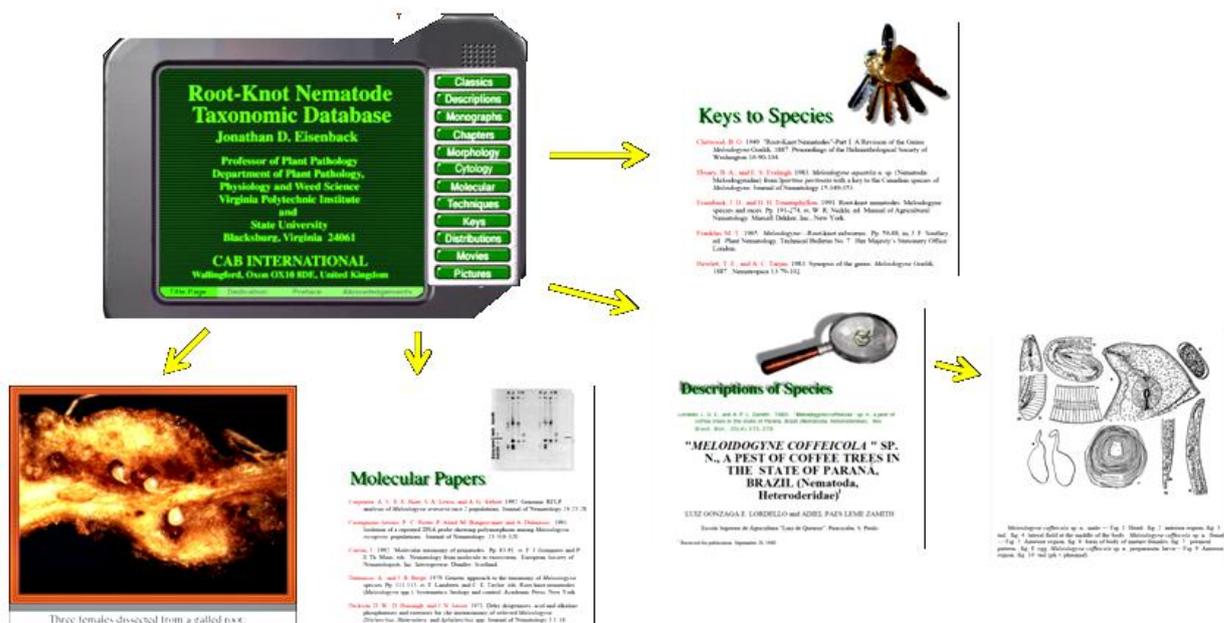


Figura 8. Descrição do menu de acesso dos documentos informatizados. Fonte: Sociedade Brasileira de Nematologia.

Em 2010, um software foi desenvolvido baseado no protocolo sugerido pela “International Organisation for Biological Control – IOBC” (Vainio, 1992) e modificado por Negrisoli Jr. et al. (2010) para avaliar a compatibilidade de produtos fitossanitários e NEPs. A análise do efeito dos produtos sobre os nematoides foi baseada na metodologia de Peters & Poullot (2004). Os usuários do programa registravam, no banco de dados, os valores referentes às variáveis obtidas no laboratório: mortalidade dos juvenis infectantes (JIs), infectividade dos JIs e fecundidade dos nematoides submetidos aos tratamentos, um software voltado apenas para análise estatística. A pesquisa não foi aplicada e o software não encontra-se disponibilizado livre (pela internet ou seus autores) para o público interessado em trabalhar com esse tipo de análise.

Segundo Tenente (2012), há alguns softwares desenvolvidos que estão disponíveis para análise filogenética de nematoides, o Treering, o ClustalX, o POY e o MrBayes. O MrBayes é um programa de inferência bayesiana e escolha de modelos em uma ampla gama de modelos filogenéticos e evolutivos. MrBayes usa métodos de

Monte Carlo da cadeia de Markov (MCMC) para estimar a distribuição posterior dos parâmetros do modelo (Figura 9)



MrBayes: Bayesian Inference of Phylogeny

- [Home](#)
- [Download](#)
- [Manual](#)
- [Bug Report](#)
- [Authors](#)
- [Links](#)



MrBayes is a program for Bayesian inference and model choice across a wide range of phylogenetic and evolutionary models. MrBayes uses Markov chain Monte Carlo (MCMC) methods to estimate the posterior distribution of model parameters.

Program features include:

- A common command-line interface across Macintosh, Windows, and UNIX operating systems;
- Extensive help available from the command line;
- Analysis of nucleotide, amino acid, restriction site, and morphological data;
- Mixing of data types, such as molecular and morphological characters, in a single analysis;

Figura 9. Página de acesso e download do software Mr.Bayes.

Os softwares Treeling, POY e PAUP são especializados em realizar apenas alinhamento e análise filogenética de nematoides, portanto, todos estes softwares não estão disponíveis na internet para livre acesso e uso. O software ClustalX encontra-se disponível apenas para alinhamento genético (figura 10).

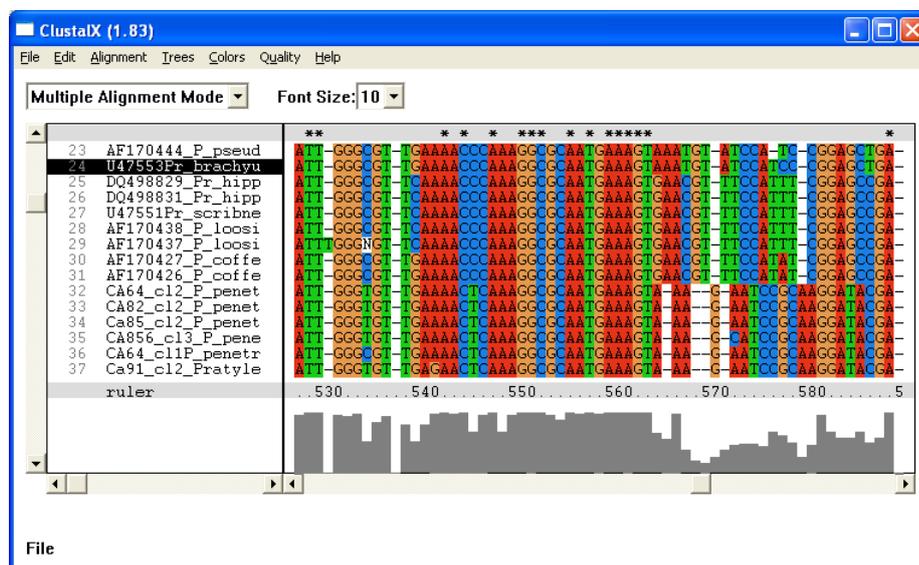


Figura 10. Área de trabalho do software ClustalX versão 1.83

No instituto de entomologia da Biology Center CAS utiliza-se softwares livres apenas para análise filogenética de nematoides, o MEGA, o GDA (figura 11), o DNAsp e o PAUP, são softwares programados apenas para este tipo de análise em contribuição nos estudos da nematologia.

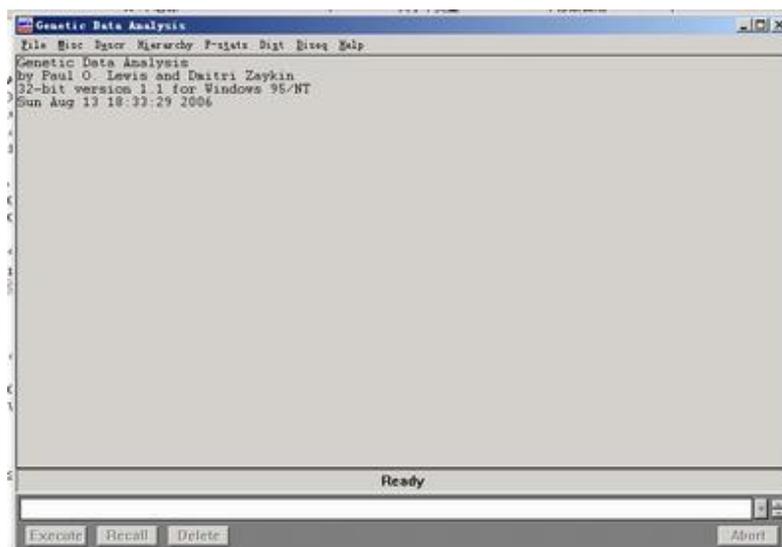


Figura 11. Área de trabalho do software GDA Genetic Data Analysis.

O GDA é um software desenvolvido para calcular o desequilíbrio linkage e hardy-weinberg, algumas distâncias genéticas, e que fornece também estimadores de método de momentos para estatísticas hierárquicas (sistemática) para diversas espécies de animais, inclusive para nematoides.

De acordo com Costa (2015), o software Image-Pro Express foi utilizado em seu experimento para medição e fotomicrografia de fungos entomopatogênicos e ovos de nematoides (Figura 12) em sua pesquisa intitulada como “Biocontrole de nematoides com fungos”. O software Image-Pro Express apresenta ferramentas de processamento de imagem para medição avançada e ferramentas de análise. O software Image-Pro Express não é livre.

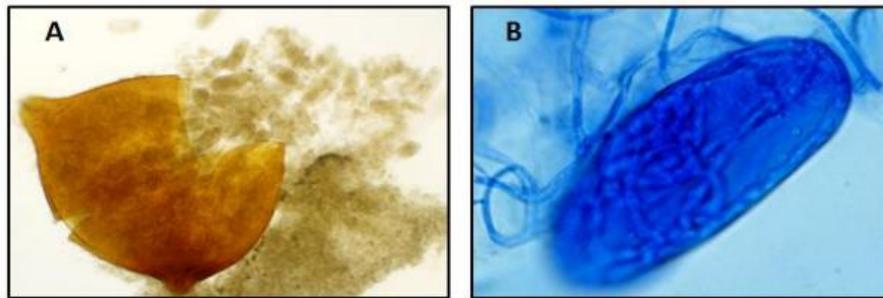


Figura 12. (A) Fotomicrografia de ovos de *Heterodera glycines* colonizados dentro do cisto pelo isolado de *Fusarium solani* (40X). (B) Fotomicrografia de hifas do isolado de *F. solani* em ovo de *Meloidogyne javanica* (100x). Fonte: Costa (2015).

5.3. O Software Quanto

Guimarães (2016) desenvolveu um software, nomeado Quanto, para utilizar seus recursos de contagem de elementos em experimentos na área da biologia (Parasitologia, Histologia e Nematologia) com intuito de otimizar a pesquisa.

Um teste de progênie de NEPs com uso do software Quanto (Figura 13) foi realizado e obteve resultados significativos em relação à contagem manual tradicional de nematoides. A partir dos resultados obtidos foi possível expor a relevância de um instrumento tecnológico com o uso do software Quanto (Guimarães, 2016).

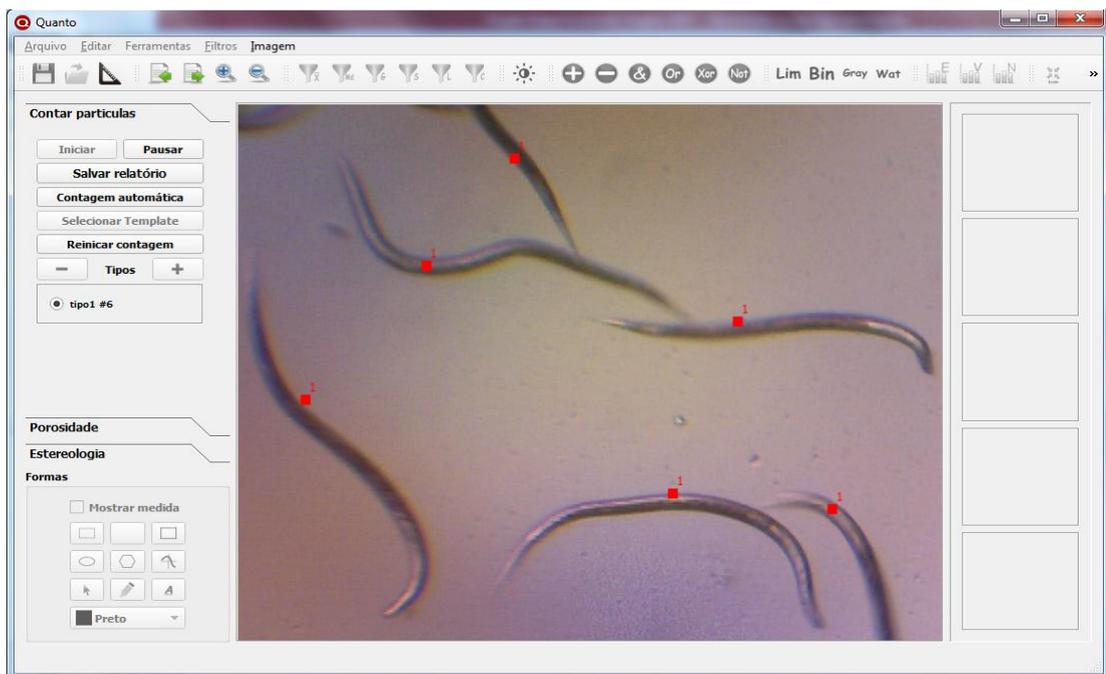


Figura 13. Área de trabalho do software QuantoNema com contagem de elementos.

O software QuantoNema foi criado na linguagem C++, empregando as ferramentas funcionais dos sistemas de programação de softwares (*framework* Qt Creator 5.6 e biblioteca OpenCv 3.1) para melhor adequação ao sistema de plataforma (Figura 14).

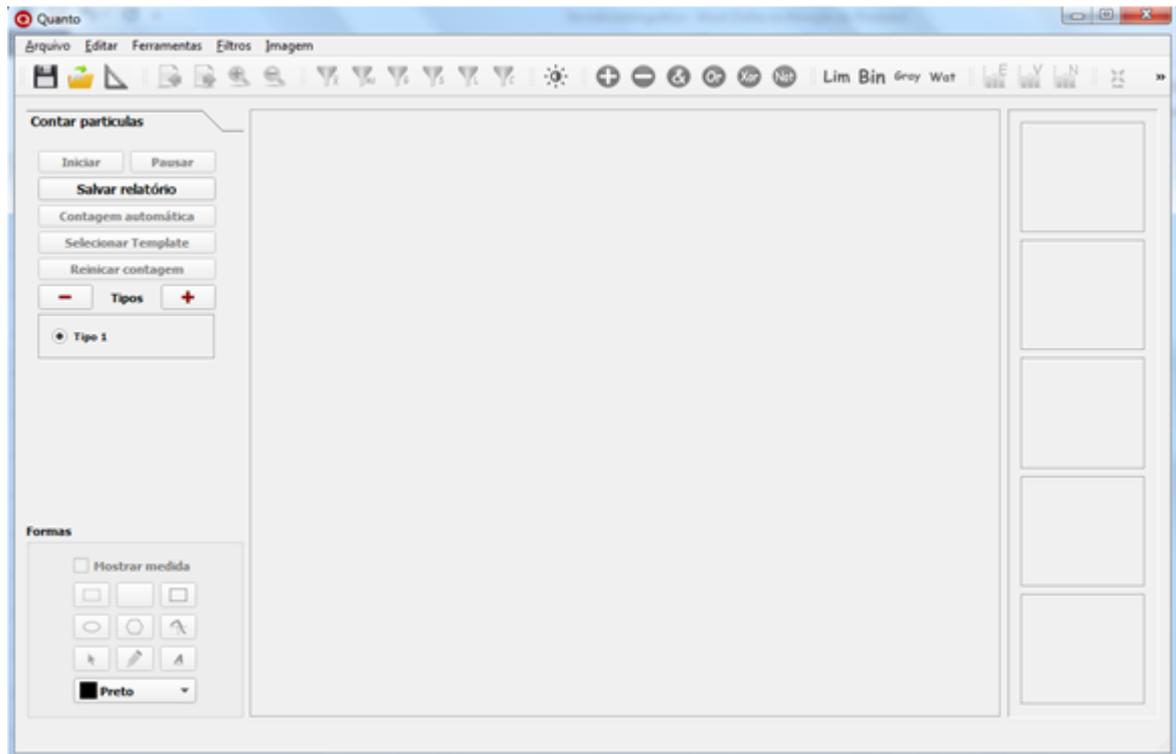


Figura 14. Área de trabalho do software Quanto.

5.3.1. O Qt software

O Qt *Creator* (Qt) une códigos comuns entre vários projetos de software provendo uma funcionalidade genérica, destinada para desenvolvimento de software com interface gráfica de usuário, pertencente à empresa finlandesa de software Digia Oyj. Atualmente é considerado um dos *toolkits* mais completos para desenvolvimento de softwares simples.

O Qt além de participar da construção de interfaces gráficas de usuário, funciona como uma biblioteca de propósito geral com recursos para *InterProcess Communication*, acesso a banco de dados, programação concorrente e distribuída, manipulação de XML, renderização 3D e outras opções funcionais (Santos e Andrade,

2013). O recurso de multiplataforma permite que o código desenvolvido neste pacote seja compatível em diferentes sistemas operacionais (Windows, Linux, iOS, Android). A abordagem utilizada pelo Qt é expressa da seguinte forma: “codifique uma vez, compile em qualquer lugar”, um tipo de recurso que aumenta significativamente a produtividade, porque o desenvolvedor não precisa empregar muito tempo no processo de compatibilidade em diferentes sistemas operacionais (Nogueira, 2013; Blanchette, 2008).

O Qt é distribuído por meio das licenças *Lesser General Public License* (LGPL) e disponibiliza diversos recursos para construção facilitada de interfaces gráficas de usuário, depuração, *syntax highlighting*, funções básicas de refatoração, *profiling* e integração com sistemas de controle de versão. A LGPL é um tipo de licença de software livre e o desenvolvimento de softwares é permitido desde que sejam distribuídos com a mesma regra. A licença comercial possui custos e os softwares possuem seus desenvolvimentos autorizados com restrições de licenças (Santos e Andrade, 2013). Determinadas ferramentas livres e proprietárias mais conhecidas e de ampla utilização que foram desenvolvidos em Qt são: KDE, VLC Media Player, Skype e Virtual Box. Além destes, as empresas mais conhecidas utilizadoras do Toolkit são: Google, Canon e AMD (Sales, 2014).

5.3.2. Biblioteca OpenCV

A plataforma OpenCV (*Open Source Computer Vision*) pode ser definida como uma biblioteca de programação voltada para o desenvolvimento de aplicativos sofisticados de visão computacional (Figura 15). Essa plataforma foi desenvolvida pela empresa Intel em 2000, utilizando a linguagem C++ e com código aberto. A OpenCV apresenta módulos de Álgebra Linear, Estrutura de Dados, Processamento de imagens e vídeos, e interface gráfica de usuário (Nogueira, 2013).

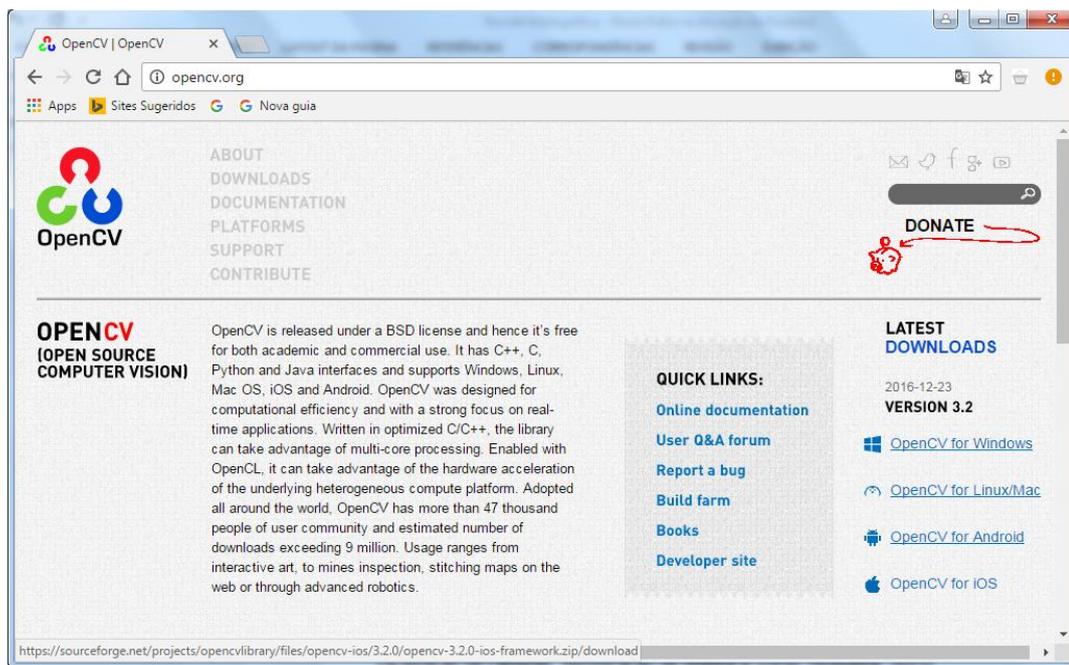


Figura 15. Página da OpenCV versão 3.2 para downloads.

Tanto o *QT creator*, assim também como o OpenCV, são modelos de multiplataformas e sua aplicação é feita com grande eficiência em várias tarefas de análise de imagens, tais como: segmentação, reconhecimento de faces, filtragem de imagens, aprendizado de máquina, calibração de câmeras, identificação de objetos e outras (Nogueira, 2013).

A biblioteca contém diversos métodos que envolvem diversas áreas computacionais, incluindo inspeções em geral, imagens médicas, segurança e robótica (Bradski e Kaehler, 2008; Sales, 2014). Para o desenvolvimento do software Quanto, a plataforma OpenCV apresentou grande relevância, principalmente para o aumento da produtividade. A plataforma OpenCV já apresenta operações codificadas como filtros, limiarização, binarização, operações lógicas e aritméticas que facilita a criação do software Quanto.

5.3.3. Etapas do desenvolvimento do software Quanto

O software Quanto foi desenvolvido em três etapas cíclicas contendo os mesmos procedimentos. Para cada etapa, uma nova versão foi distribuída e testada com novas funcionalidades. As vantagens desta metodologia sobre a prática de lançar

uma única versão do software completo ao final do desenvolvimento segundo Cusumano e Yoffie (1999) são:

- O software é testado continuamente e o retorno dos usuários permite correções de problemas e a aceitação de sugestões para implementações em versões futuras;
- A divulgação do software é realizada por um período mais longo, permitindo que um número maior de usuários o utilize durante a execução do trabalho;
- Resultados são produzidos durante a execução do trabalho, validando sua importância.

5.3.3.1. Primeira etapa

5.3.3.1.1. Definição de recursos e interface

Segundo Guimarães (2016) o software Quanto foi desenvolvido para tratamento de imagens de microscópios para facilitar e automatizar os processos de contagem de elementos e caracterização. Para definir suas funcionalidades e interface e tornar o software uma ferramenta útil na execução de tarefas que ainda não possuem auxílio, inicialmente foi realizada uma pesquisa de vários softwares já disponíveis no mercado para o uso que se propõem a executar tarefas semelhantes. Esta verificação foi realizada com o intuito de identificar recursos importantes que um programa deste segmento precisa ter, além de verificar quais funcionalidades ainda não foram observadas e que podem ser abrangidas no Quanto.

5.3.3.1.2. Desenvolvimento de códigos

No software Quanto foram desenvolvidas as opções para a abrir e salvar imagens nas extensões conhecidas de imagens "png", "pgm", "jpg", "jpeg", "bmp", "tif", "tiff" e "xpm". Além dessa opção, foram implementadas várias operações de tratamento de imagens. Foi desenvolvido também um recurso que permite ao usuário visualizar o histograma da imagem em questão. Para gerar o histograma foi criada uma estrutura de repetição passando por todos os pixels da imagem e contabilizando a intensidade de brilho de cada um. Ao final, é mostrada uma imagem gerada com o acumulado de cada valor em forma de histograma (Guimarães, 2016). Nesta etapa também foi disponibilizada a opção de zoom que serve para ampliar ou reduzir uma imagem melhorando a visualização de determinados elementos.

5.3.3.2. Segunda Etapa

5.3.3.2.1. Definição de recursos e interface

De acordo com Guimarães (2016), foram definidas as funcionalidades e recursos do Quanto em relação à contagem de elementos nesta etapa.

5.3.3.2.2. Desenvolvimento de códigos

5.3.2.2.2.1. Seleção de escalas

Nesta etapa de desenvolvimento, Guimarães (2016) definiu a opção selecionar escala para definir o tamanho da imagem em questão. Neste caso, o usuário deve traçar uma reta na imagem e informar o tamanho em uma determinada unidade de medida (UM) escolhida por ele. Após este processo, captura-se o tamanho em pixels dessa reta para que seja feito o cálculo desta grandeza em relação ao tamanho informado pelo usuário na unidade de medida escolhida, encontrando assim a relação pixel/UM. Com esta relação, pode-se encontrar qualquer medida na imagem em análise na plataforma.

5.3.2.2.2. Criação de formas

A opção de criar forma, permite que o usuário crie formas na imagem (retas, retângulos, elipses). Para realizar esta operação foram empregadas as classes do Qt *Creator QEventFilter*, que captura eventos executados pelo usuário, e *QPainter*, que cria as formas na imagem. Quando é selecionada a opção de criar formas, o *QEventFilter* é iniciado e captura o ponto exato em que o usuário realiza um clique na imagem (*MouseClicked*) e o ponto exato onde ele libera este clique (*MouseRelease*). Após estas informações serem capturadas, elas são submetidas ao *QPainter* que cria a forma selecionada pelo usuário. Um dos parâmetros do *QPainter* é a sua cor, que pode ser definida conforme a cor for selecionada pelo usuário na interface gráfica do software (Guimarães, 2016).

5.3.2.2.3. Realização de contagens

Segundo Guimarães (2016), esta ferramenta permite que o usuário realize a contagem de elementos (estruturas na amostra) uma imagem aberta no programa. A contagem envolve vários procedimentos no Quanto, tais como, adicionar e excluir tipos, incrementar elemento, marcar elemento na imagem, decrementar elemento e desmarcar elemento na imagem.

A função *QEventFilter* foi destinada para identificar o local onde o usuário fez um clique. Considera-se que neste local há um elemento a ser contabilizado na contagem. Assim, ao realizar um clique, o software armazena informações sobre o local exato na imagem e o tipo que o usuário selecionou para contabilizar o elemento, além de outras informações internas. As informações acerca de cada ponto clicado pelo usuário, tais como, localização, tipo e outros, são guardadas em uma estrutura de dados do tipo lista encadeada, que funciona de forma satisfatória, pois transforma cada ponto em um elemento único. Desta forma, caso o usuário deseje excluir um determinado ponto por ter feito uma contagem errada ou por qualquer outro motivo, necessita-se somente identificar o local onde o ponto se encontra e deletar este ponto da lista (Guimarães, 2016).

Outro recurso importante descrito por Guimarães (2016) é que a estrutura do tipo lista encadeada proporciona a possibilidade de plotar e apagar pontos na imagem quantas vezes for necessário. Desta forma foi criada uma função que passa por todos os índices da lista e plota cada ponto na imagem com uma cor diferente para cada tipo. Os pontos plotados na imagem pertencem à classe *QPainter*, de 8x8 pixels.

5.3.2.2.4. Contagem automática

Segundo Guimarães (2016), o procedimento de contagem automática tende a realizar uma busca na imagem para localizar elementos semelhantes a um *template*, previamente selecionado pelo usuário, e contabiliza estes elementos na contagem. Para construção desta tarefa, a plataforma utilizou a função *TemplateMatching* do OpenCv. Essa funcionalidade realiza um tipo de varredura em toda imagem, procurando por regiões que apresentam qualquer nível de semelhança com um *template* previamente definido que gera uma nova imagem em tons de cinza.

Guimarães (2016) explica que esta nova imagem gerada pela função aparece borrada com regiões mais escuras e mais claras seguindo a seguinte regra: De acordo com o contraste da imagem, quanto mais clara estiver a região da estrutura identificada, maior será a semelhança daquela estrutura com o *template*, um sistema de correlação utilizado. Desta forma, consegue-se identificar diversos elementos semelhantes com uma região de interesse para serem considerados na contagem. O método de contagem automática finaliza-se utilizando um grau de correlação informado pelo usuário e então percorre-se por toda a imagem, se a alguma região possuir correlação maior ou igual ao informado pelo usuário, aquela região é contabilizada.

5.3.3.2.3. Distribuição do Software

Segundo Guimarães (2016), a versão do software Quanto foi distribuída após uma avaliação interna e posteriormente distribuída aos usuários externos para testes de maior envergadura. O software Quanto tornou-se disponível para o Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, assim como para os técnicos e pesquisadores do Laboratório de Materiais Avançados (LAMAV-Uenf).

5.3.3.3. Terceira etapa

5.3.3.3.1. Definir recursos e interface

De acordo com Guimarães (2016), os testes realizados por pesquisadores que utilizaram o software Quanto para realizar a contagem de elementos na prática, mostraram os pontos positivos e as dificuldades de uso do software. Desta forma, foram identificadas funcionalidades adicionais a serem atualizadas.

5.3.3.3.2. Desenvolver código

5.3.3.3.2.1. Salvamento e carregamento projeto (criação da extensão “.qto”)

Ao realizar os testes com o software na segunda etapa do desenvolvimento, foi identificado que muitas vezes o usuário precisa realizar a contagem em diversas imagens do mesmo tipo e, diante da quantidade elevada de contagens, precisa interromper o processo e retomá-lo em outro momento. Mediante a este problema, foi necessário criar uma forma de salvar a imagem com marcações de contagem a qualquer momento para que ele fosse carregado posteriormente. Para resolver este problema, o recurso salvar imagem, implementado na primeira etapa do desenvolvimento, foi alterado de forma a criar uma extensão específica do Quanto, a extensão “qto”. Assim, os arquivos salvos com esta extensão possuem duas fases: a imagem que está sendo marcada para contagem e os dados numéricos referentes à contagem. A junção destes dois dados de tipos diferentes (a imagem e a lista encadeada dos pontos de contagem) é feita transformando-os em um tipo único, utilizando a classe do Qt Creator *QByteArray*. Além destes dados, o arquivo com extensão “qto” guarda algumas informações importantes, tais como, nome da imagem que foi trabalhada, caminho onde se encontra a imagem, entre outros (Guimarães, 2016).

A função abrir imagem também passou por alterações de forma a carregar os dados de contagem. Ao abrir uma imagem, primeiramente é realizada uma verificação do tipo de arquivo que foi selecionado, caso seja um arquivo de imagem padrão

(extensões "png", "pgm", "jpg", "jpeg", "bmp", "tif", "tiff" e "xpm"), a imagem é simplesmente carregada com auxílio do OpenCv, caso seja um arquivo do Quanto (extensão "qto") é necessário um tratamento diferenciado. Este tratamento exerce a função de separar a imagem dos dados da contagem e carregar a lista encadeada com os dados existentes no arquivo carregado. Após este processo a imagem passa a ser carregada na tela do programa e é possível continuar o processo de contagem normalmente (Guimarães, 2016).

5.3.3.3.2.2. Ação de Avançar e retornar imagens

Segundo Guimarães (2016), para facilitar a utilização do programa, foram implementadas ferramentas que permite avançar ou recuar imagens do diretório. Estas funções percorrem o diretório em busca do próximo arquivo ou do arquivo anterior e, ao encontrá-lo, chamam a função carregar projeto. Dessa forma, para que não sejam perdidas informações, a função salvar projeto sempre é chamada antes de carregar um novo projeto e, para não criar novos arquivos no diretório do usuário, o programa cria uma pasta chamada *Quanto Projects* em que são salvos automaticamente estes arquivos.

5.3.3.3.2.3. Salvamento de relatório

Ao final de toda contagem, sendo feita com o auxílio de softwares ou não, Guimarães (2016) descreve que é necessário que os dados sejam tabulados em uma planilha. Diante disto, a ferramenta que permite salvar relatório foi criada para facilitar este processo e aumentar a produtividade de dados armazenados para o usuário. Os dados capturados são exportados para um arquivo com extensão "csv", um arquivo de texto que pode ser lido pelos aplicativos de planilhas eletrônicas. Para organizar os dados de forma correta são utilizados os separadores ";" para indicar uma nova célula a frente e "\n" para indicar quebra de linha. A metodologia supracitada é repetida para todos os arquivos com extensão "qto" do diretório indicado pelo usuário.

5.3.3.3.2.4. Exportação de imagem

Conforme Guimarães (2016), ao se alterar o recurso de salvar imagem para salvar os projetos Quanto, o software impossibilitou o usuário de salvar somente a imagem com as segmentações e tratamentos realizados, sem os dados de alguma contagem. Assim, a função exportar imagem foi criada para auxiliar o procedimento, ela simplesmente salva a imagem em um formato padrão de imagem com o auxílio de funções do OpenCv.

5.3.3.3.2.5. Fração volumétrica por fração de pontos

Segundo Guimarães (2016), as funcionalidades relacionadas a cálculos estereológicos foram as últimas a serem implementadas. A fração volumétrica por fração de pontos realiza o cálculo através de uma malha de pontos que são inseridos igualmente espaçados na imagem, a qual deve ser previamente binarizada. Para realizar o cálculo, antes de inserir os devidos pontos na imagem, é feita uma verificação do pixel em que o ponto será inserido. Caso este pixel esteja em um local correspondente à fase de interesse, este será contabilizado para a realização do cálculo.

5.3.3.3.2.6. Área superficial por unidade de volume teste

Segundo Guimarães (2016), para realizar o cálculo da área superficial por unidade de volume teste, são inseridas linhas igualmente espaçadas na imagem, que deve ser previamente binarizada. Ao inserir estas linhas, a imagem será verificada pixel a pixel e, sempre que a linha intercepta a fase de interesse, este intercepto é automaticamente contabilizado em um contador. Após inserir todas as linhas, o número total de interceptos e o tamanho total das linhas é conhecido.

5.3.3.3.2.7. Comprimento por unidade de volume teste

O cálculo do comprimento por unidade de volume teste necessita-se realizar a contagem de quantos elementos da fase de interesse existem na imagem. Para isto, Guimarães (2016) utilizou o algoritmo conhecido como Flood Fill, que percorre toda imagem binarizada e, ao encontrar um objeto, realiza a marcação do mesmo, permitindo realizar a contagem de quantos elementos foram marcados.

5.3.3.3.2.8. Distribuição do Software

Segundo Guimarães (2016), a versão do software distribuída passou por uma avaliação interna, onde ocorreu a aprovação. Nesta terceira etapa foi disponibilizada uma versão mais completa. O Quanto foi disponibilizado para o Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, para os técnicos e pesquisadores do Laboratório de Materiais Avançados (LAMAV/ CCT -UENF), para o laboratório de biologia da Faculdade Santa Marcelina (LabBio FASM - Muriaé-MG) e também disponível para download no endereço: <https://sourceforge.net/projects/quantosoftware/?source=directory>.

5.3.2. Interface gráfica do software Quanto

A interface do Quanto foi desenvolvida para ser simples e eficiente, seguindo os padrões que são utilizados na maioria dos softwares que se propõem à análise e tratamento de imagens (Sales, 2014; Collins, 2007; Aguiar *et al.*, 2007; Francisco *et al.*, 2004). A interface é composta de barra de menu, caixas de ferramentas, painel lateral de funcionalidades, ferramentas de criação de formas, área de trabalho e painel de *snapshot*. A Figura 16 apresenta a tela de interface do Quanto com uma imagem carregada para análise (Guimarães, 2016).

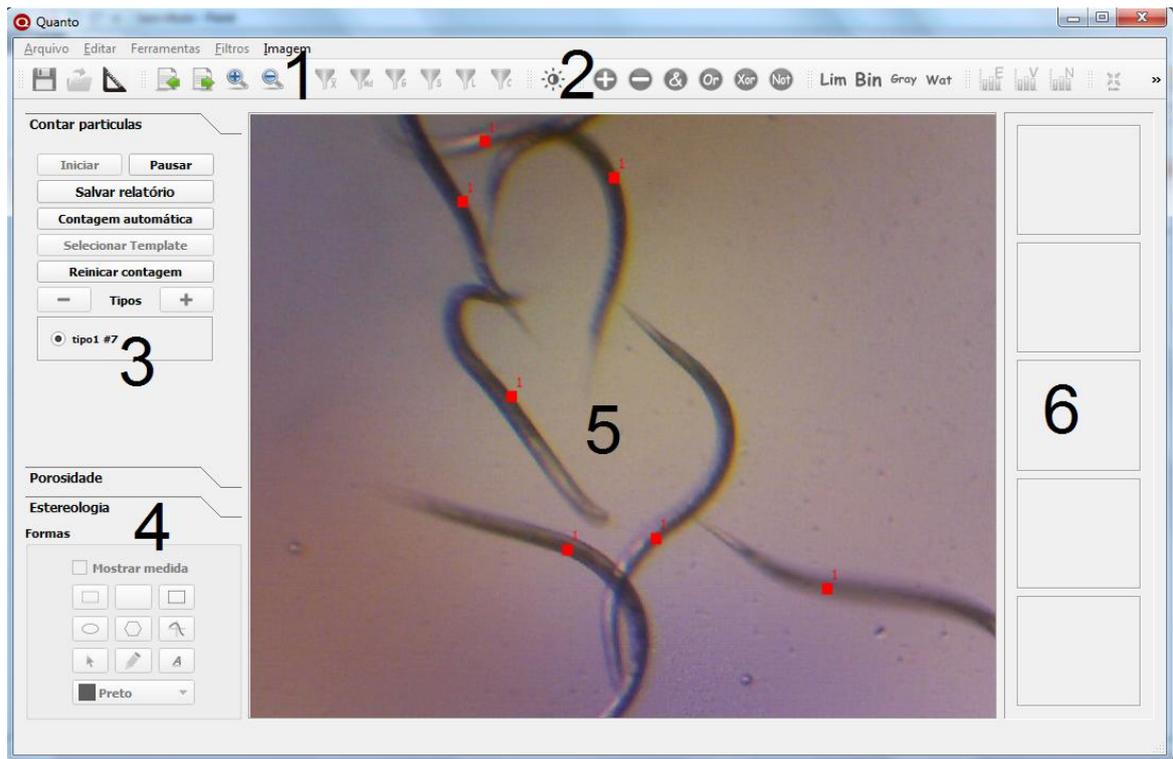


Figura 16 - Interface gráfica do Quanta. Em 1) barra de menu; 2) caixas de ferramentas; 3) painel com lateral de funcionalidades; 4) ferramentas de criação de formas; 5) área de trabalho; 6) painel de *snapshot*.

6. Materiais e Métodos

Os experimentos desenvolvidos nesta pesquisa foram realizados no laboratório de biologia da Faculdade Santa Marcelina (FASM) campus Muriaé, cidade do Estado de Minas Gerais. Os NEPs utilizados foram doados para experimentação pelo Laboratório de Nematologia do CCTA / UENF e o software Quanto desenvolvido e disponibilizado pelo Laboratório de Materiais avançados (LAMAV/ CCT/ UENF).

6.1. Uso do software QuantoNema para estudos de progênie

A progênie reflete a capacidade reprodutiva medida pelo número de juvenis infectantes produzidos.

6.1.1. Multiplicação de nematoides entomopatogênicos

Os nematoides entomopatogênicos foram multiplicados em larvas de insetos hospedeiros da espécie *Tenebrio mollitor*. A espécie de nematoide que foi multiplicada é representada pelo isolados *Heterorhabditis indica* LPP30, espécie amplamente testada em diversos tipos de insetos hospedeiros (Monteiro et al., 2012).

6.1.1.1. Criação de larvas de *Tenebrio mollitor*

O coleóptero do gênero *Tenebrio*, representante típico da família Tenebrionidae, conhecido também como bicho-da-farinha tem hábitos noturnos. Os tenébrios se reproduzem rapidamente em lugares quentes e úmidos, são de fácil manejo.

As larvas de *T. mollitor* foram criadas em laboratório a partir de dieta artificial (400 g de farelo de trigo, 120 g de levedo de cerveja, 200 g de gérmen de trigo,) e mantidas em temperatura controlada a 30°C (figura 17). Na fase adulta, os insetos foram mantidos em potes separados também com dieta para reprodução.



Figura 17. Larvas de *Tenebrio molitor*.

As larvas de *T. molitor* na fase do 5^o instar foram recolhidas dos potes de criação (Figura 18) para utilização como hospedeiras para multiplicação de nematoides entomopatogênicos.



Figura 18. Pote de criação de larvas de *T. molitor* em dieta artificial.

6.1.1.2. Multiplicação de nematoides entomopatogênicos (NEPs)

As larvas de *T. mollitor* foram colocadas em placas de Petri revestidas de papel filtro. Em cada placa foram adicionadas dez larvas de *T. mollitor* (Figura 19) com massa média de 150 mg. Foram utilizadas 10 placas por etapa de multiplicação. Para cada placa foi adicionado um mL de solução com 200 juvenis infectantes (JIs) de nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis indica* LPP30. As placas foram armazenadas em câmara de germinação (BOD) a 25°C e 80% UR por sete dias. Após esta etapa, as larvas mortas foram retiradas das placas buscando-se cadáveres com a coloração uniforme característica de infecção por NEPs.



Figura 19. Larva de *Tenebrio mollitor* infectada por NEPs, seta indica cadáver com coloração típica de infecção.

Os cadáveres foram transferidos para placas de coleta de nematoides denominadas “armadilhas de White modificada” (White, 1927), constituídas por placas de Petri de 9 cm de diâmetro com uma argola de PVC (2,5 cm de diâmetro X 8 mm de altura) e, sobre esta, um pedaço de papel filtro 2,0 x 8,0 cm (Whatman N°1). O papel de filtro foi moldado de modo que suas bordas ficaram em contato com a água destilada contida na placa de Petri e, sobre esta, uma larva cadáver de *T. mollitor*.

As armadilhas de White (Figura 20) foram armazenadas em câmara de germinação (BOD) a 25°C e 80% UR por volta de sete dias. Após cerca de sete dias, JIs migraram para a água contida na placa de Petri (Figura 21) e foram coletados com pipeta e mantidos em garrafas de cultura de células (CORNING) de 50 mL em câmara de germinação a 16°C (Kaya & Stock, 1997).



Figura 20. Armadilhas de White para coleta de nematoides JIs.

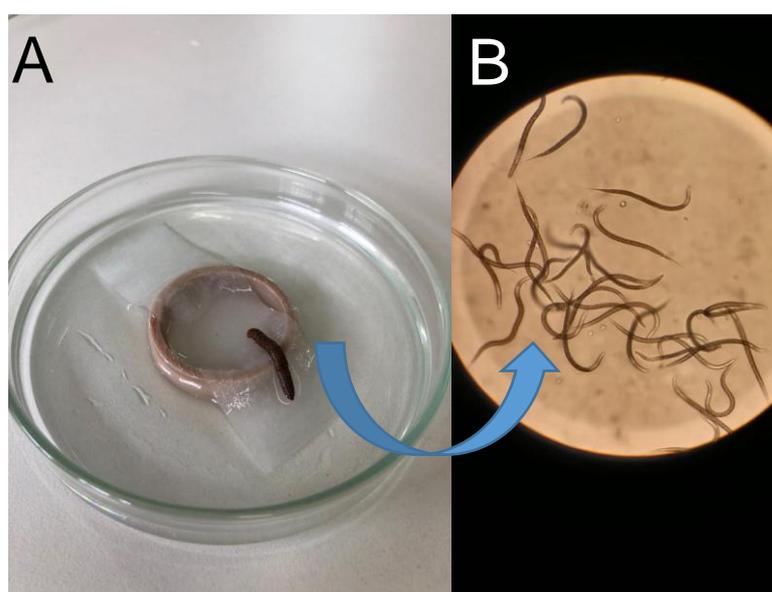


Figura 21. Em A, estrutura de uma armadilha de White e em B, nematoides juvenis infectantes *Heterorhabditis indica* após emergência.

6.1.2. Teste de progênie tradicional

Para a montagem do teste de progênie tradicional no experimento 1, foi utilizado a espécie de nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis indica* LPP30. Utilizou-se como inseto hospedeiro uma larva de *T. molitor* com massa média de 150 mg. Foram adicionadas 10 larvas para cada placa de Petri (9 cm de diâmetro) com 10 repetições. Para cada placa de Petri foi adicionada uma solução de um mL com 200 JIs. As placas foram revestidas com papel filtro no fundo e foram mantidas por três dias em câmara de germinação (BOD) à 25°C, 80% U.R.

Após o período de armazenamento em (BOD), os cadáveres foram transferidos para placas de coleta de nematoides denominadas “armadilhas de White modificada” (White, 1927), que consiste em placas de Petri de 9 cm de diâmetro com uma argola de PVC (2,5 cm de diâmetro X 8 mm de altura) e, sobre esta, uma fita de papel filtro 2,0 x 8,0 cm (Whatman Nº1) que foi adicionado de modo que suas bordas tivessem contato com a água destilada contida na placa de Petri e, sobre esta, um cadáver de *T. molitor*. Durante sete dias, os juvenis infectantes emergiram para a água contida na placa de Petri, e foram coletados com pipeta diariamente durante sete dias e totalizando um volume final padrão para todas as coletas de 70 mL mantidos em Becker de 250 mL em (BOD) à 25°C, 80% U.R. Para contagem dos JIs total ou progênie, foram utilizadas pipetas para coleta de alíquota de 0,1 mL em três repetições visualizadas em microscópio óptico, aumento de 10 x, com uso de lâminas (Figura 22). Durante todo o experimento de teste de progênie tradicional, o tempo de duração foi contabilizado.

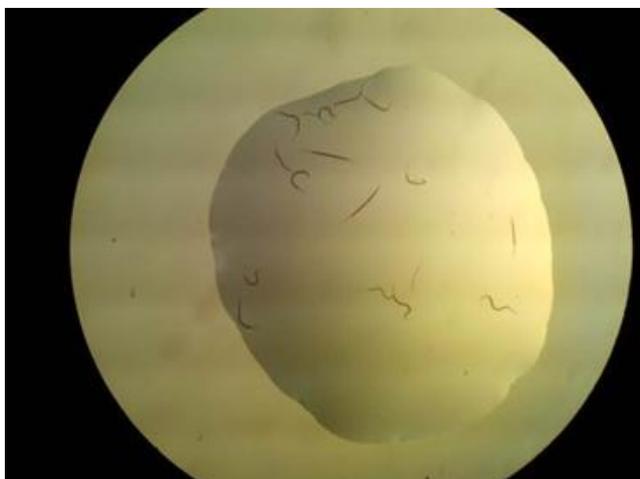


Figura 22. Amostra com JIs para quantificação em progênie através do método tradicional em microscópio.

Para a análise estatística, as variáveis foram testadas quanto à homogeneidade das variâncias (One Way) e à normalidade dos erros (teste de Shapiro-Wilk), em 5% de probabilidade, utilizando-se o Sistema de Análises estatísticas pelo programa SigmaPlot 12.5. A seguir, os dados foram submetidos à Anova e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

6.1.3. Teste de progênie com software QuantoNema

O teste de produção de NEPs com uso do software QuantoNema foi realizado com as mesmas metodologias tradicionais realizada com a progênie tradicional para preparação do processo de contagem.

Para contabilização dos JIs total ou progênie, foram utilizadas pipetas para coleta de alíquota de 0,1 mL em três repetições visualizadas em microscópio óptico com uso de lâminas. A imagem do microscópio óptico foi transmitida para o computador através de uma câmera digital de microscopia (AmScope DM130) pelo software AmScope para arquivamento das imagens das amostras (Figura 23).

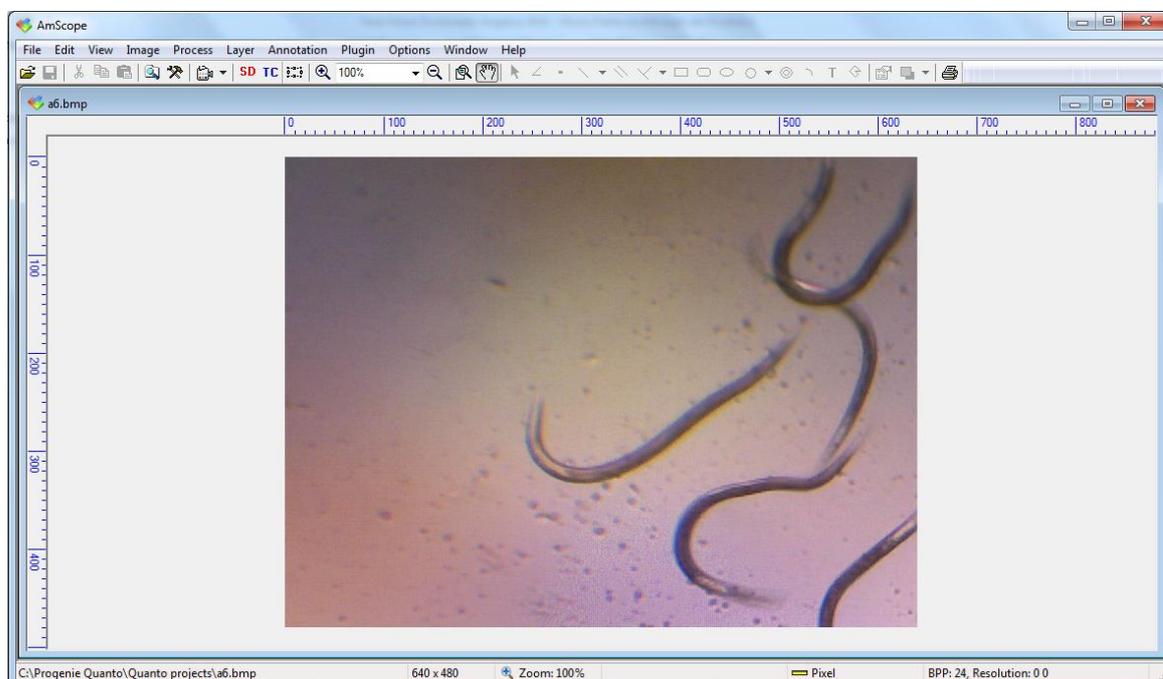


Figura 23. Software da AmScope, projetado para edição de imagens e captura de fotos por câmera digital para microscópio.

Para contagem de nematoides juvenis que emergiram dos cadáveres das amostras em armadilhas de White, foi utilizado o software QuantoNema para marcações automatizadas e manuais, contabilização e arquivamento das imagens editadas.

Após a captura e arquivamento das imagens pelo software AmScope, as imagens foram transmitidas para o software Quanto a partir da seleção do botão “abrir imagem” encontrado na barra de tarefas na área de trabalho do software.

A contagem inicialmente foi realizada automaticamente, para o processo de contagem automática, selecionou-se o botão “iniciar” e em seguida foi selecionado o botão “Contagem Automática”. A partir deste procedimento, abriu-se uma nova janela do software para contagem automatizada. Nesta janela do software, há opções de aumento e diminuição (zoom) da imagem capturada. Há também um botão para selecionar a imagem ou parte dela “Selecionar Template”, que reconhece demais estruturas modelo que são marcadas e contabilizadas automaticamente. Parte de um nematoide foi selecionado com uso desta ferramenta.

Após este procedimento afim de finalizar o processo automatizado, clicou-se no botão “ok” para encaminhar a imagem com reconhecimento automatizado na área de trabalho inicial do software.

Os nematoides que não foram marcados automaticamente pelo software, foram marcados manualmente com uso do cursor de um mouse, as marcações foram completadas e contabilizadas em uma caixa de dados disponível na coluna à esquerda da área de trabalho do software (figura 24).

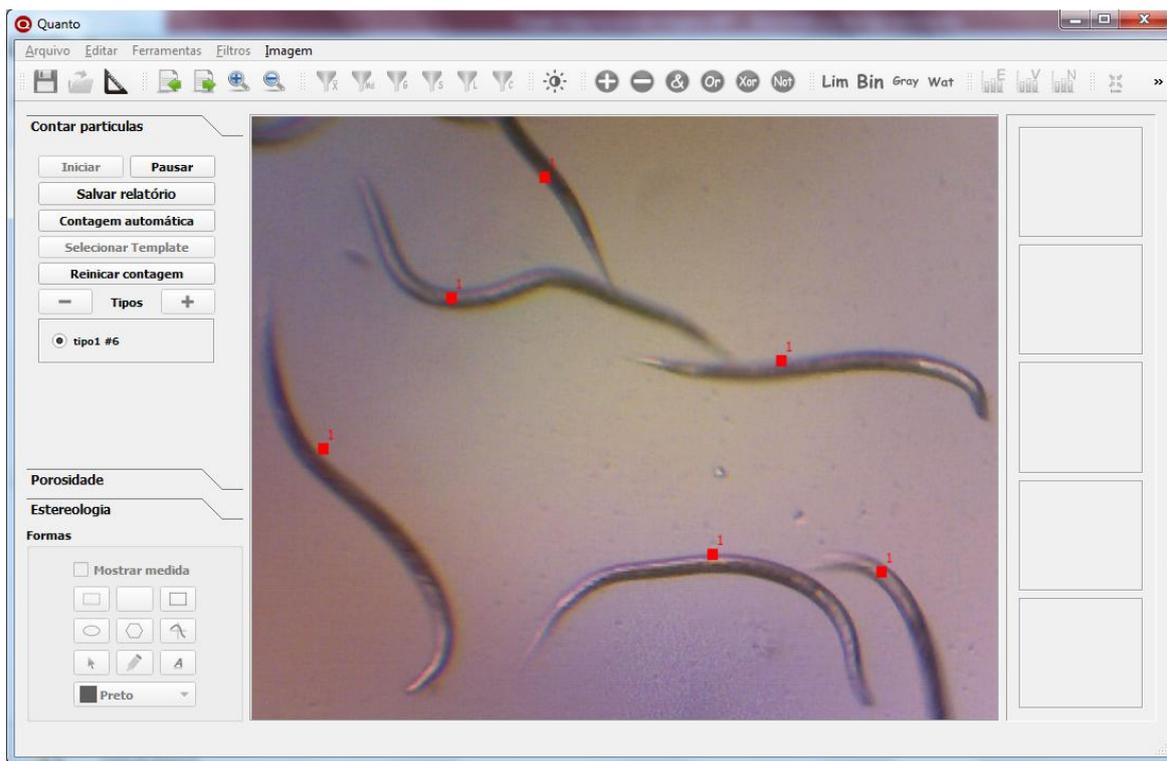


Figura 24. Software QuantoNema com imagem de microscopia. O número 1 indica os nematoides marcados automaticamente e manualmente.

Após o processo total de contagens, as imagens com marcações foram salvas em uma pasta criada pelo usuário que destina automaticamente todas as amostras de imagens editadas pelo software. Os dados contabilizados por números de nematoides e tempo utilizado para a metodologia utilizada foram anotados em planilhas do programa Excel.

O experimento de progênie com uso do software (Figura 25) foi desenvolvido no laboratório de Biologia da FASM com uma equipe de três alunas do curso de Ciências Biológicas, Bárbara Helena de Oliveira Barcaro, Lenimar Aparecida Ribeiro e Mariana Aparecida Fortunato. A contagem de nematoides juvenis com uso do software foi realizada pelas três alunas, totalizando três repetições no tempo. Este mesmo procedimento de contagem para foi realizado pelas três alunas como usuárias do teste de progênie tradicional. Para realização do teste de progênie tradicional e com uso do software, foram realizadas três repetições com contagens das alíquotas, após os resultados obtidos foram realizados cálculos de média em relação ao número de nematoides e ao tempo utilizado na experimentação.



Figura 25. Uso do software QuantoNema acoplado ao microscópio óptico para realização de progênie no Laboratório de Biologia da FASM Muriaé.

Para a análise estatística da progênie com uso do software Quanto, as variáveis foram testadas quanto à homogeneidade das variâncias (One Way) e à normalidade dos erros (teste de Shapiro-Wilk), em 5% de probabilidade, utilizando-se o Sistema de Análises estatísticas pelo programa SigmaPlot 12.5. A seguir, os dados foram submetidos à Anova e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

6.2. Quantificação de ovos de nematoides fitoparasitas

A contagem de ovos de nematoides é uma das metodologias dentro da área da nematologia que auxilia a avaliação da capacidade reprodutiva de fitonematoides e auxilia também a calibração de suspensão para inoculação.

6.2.1. Contagem de ovos pelo método tradicional

Para quantificação de ovos de fitonematóides provenientes de galhas no sistema radicular de plantas (Figura 26), empregou-se o método de Hussey & Barker (1973), modificado por Boneti & Ferraz (1981). As raízes com galhas foram provenientes de tomateiros tomateiro (*Lycopersicon lycopersicum*), cultivar Santa Cruz, plantados na casa de vegetação do CCTA/UENF. As raízes estavam infectadas pelo fitonematóide *Meloidogyne javanica*.



Figura 26. O círculo vermelho indica a localização da galha de nematóide fitoparasita *Meloidogyne javanica* no sistema radicular de um tomateiro proveniente da casa de vegetação CCTA/UENF.

O sistema radicular de um tomateiro (*Lycopersicon lycopersicum*) inicialmente foi cortado em pedaços de 0,5 cm (Figura 27) e com uma porção de 50 g de raízes foi colocada em liquidificador com 200 mL de Hipoclorito de sódio a 0,5% e triturada durante 1 minuto. Desta suspensão, obteve-se uma alíquota de 1 mL distribuída em

lâmina para contagem dos ovos em microscópio óptico. Durante o experimento foram realizadas 10 repetições. Durante a contagem de ovos com o uso de microscópio óptico foi contabilizado o tempo de duração do experimento.

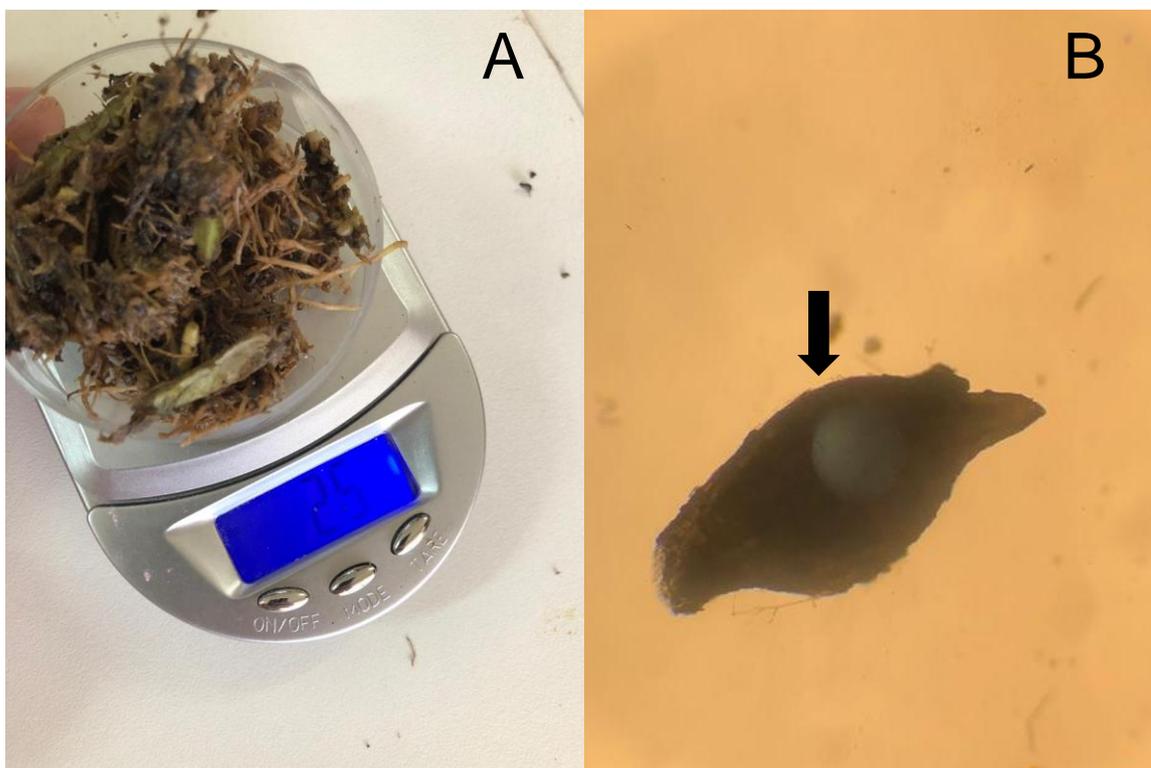


Figura 27. Em A, preparação das raízes para processamento. Em B, seta indica uma galha de nematoide fitoparasita *M. javanica* no sistema radicular tomateiro *L. lycopersicum*

6.2.2. Contagem de ovos com uso de software

Em análise comparativa foi realizado o teste de contagem de ovos com uso do software QuantoNema (figura 28) em relação ao teste tradicional com uso de microscópio óptico. Durante a contagem de ovos utilizando o software acoplado ao microscópio, foi contabilizado o tempo de duração do teste.

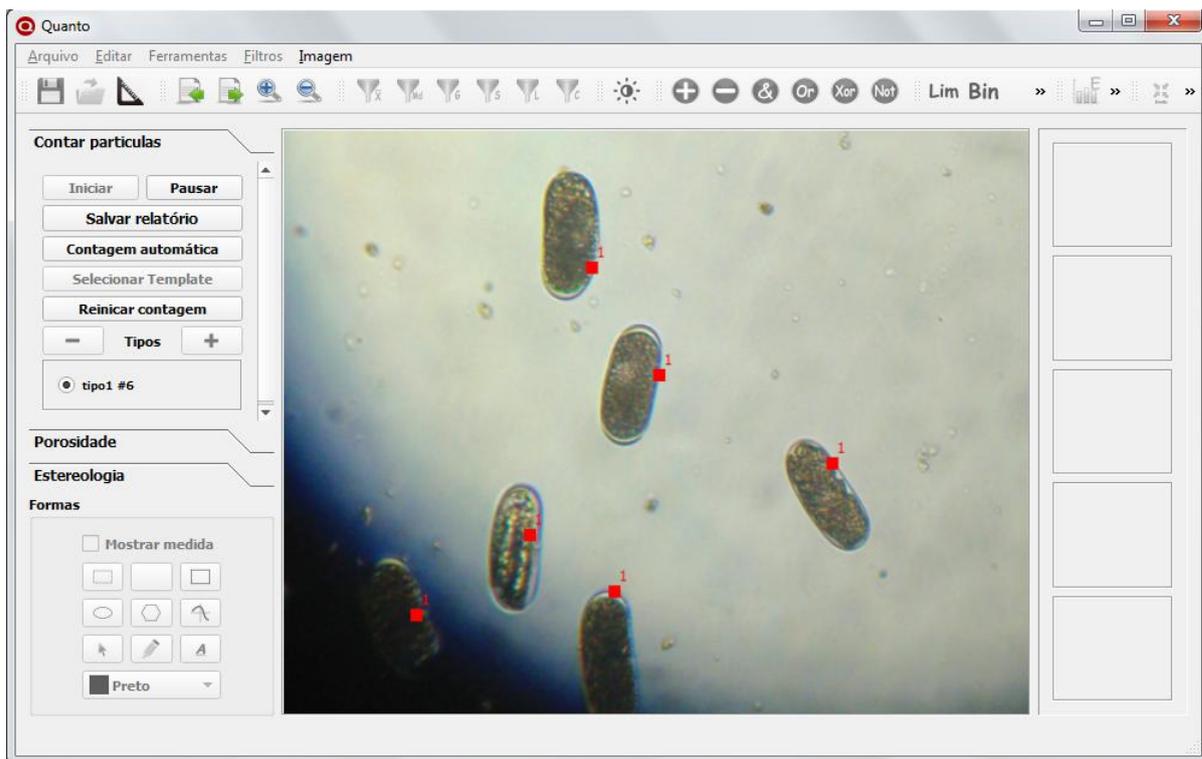


Figura 28. Dashboards do software QuantoNema utilizada para contagem manual de ovos de nematoides.

Após a abertura da imagem capturada pelo software, a contagem inicialmente foi realizada pela opção automática, para dar início ao processo de contagem, selecionou-se o botão “iniciar” e em seguida selecionado o botão “Contagem Automática”. A partir deste procedimento, abre-se uma nova janela do software para contagem automatizada. Nesta janela do software, há opções de aumento e diminuição (zoom) da imagem capturada. Há também um botão para selecionar a imagem ou parte dela “Selecionar Template” (figura 29), que reconhece demais estruturas modelo que são marcadas e contabilizadas automaticamente. Após este procedimento afim de finalizar o processo automatizado, clicou-se no botão “ok” para encaminhar a imagem com reconhecimento automatizado na área de trabalho inicial do software.

Os ovos que não foram marcados automaticamente pelo software por correlação, por fim foram sinalizados e contabilizados manualmente com o curso do mouse. Após o processo total de contagem a imagem com marcações foi salva em uma pasta criada pelo usuário que destina automaticamente todas as amostras capturadas.

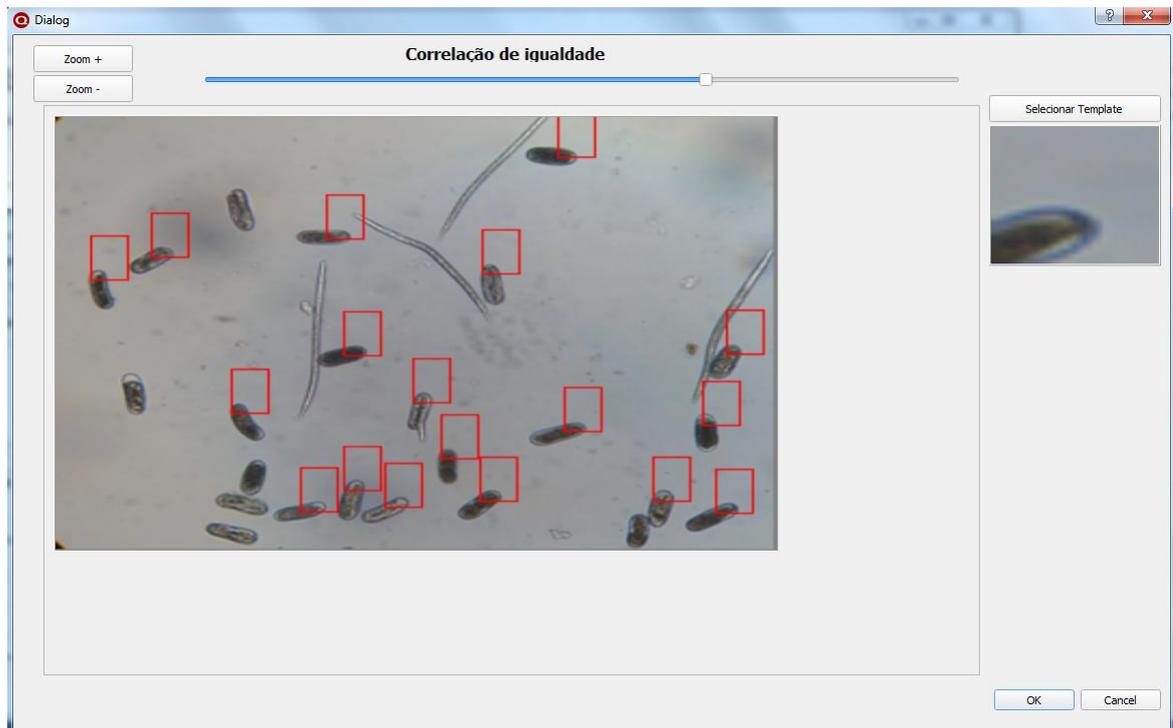


Figura 29. Área de trabalho do software para contagem automática. Ovos marcados automaticamente a partir do modelo selecionado “Selecionar Template”.

6.3. Uso de uma plataforma do software QuantoNema para levantamento de nematofauna

A identificação dos grupos de nematoides (Fitoparasitas, Bacteriófagos, Micófagos e Predadores) foi realizada a partir de uma plataforma do software QuantoNema. Na plataforma do software foi disponibilizado um banco de imagens de acesso para comparar e reconhecer os diferentes grupos de nematoides conforme suas características morfológicas, como por exemplo, a presença de dentes quitinosos, formato do estilete, espessura e comprimento do esôfago, tamanho e espessura do esôfago do nematoide e entre outras características relevantes (Figura 30).

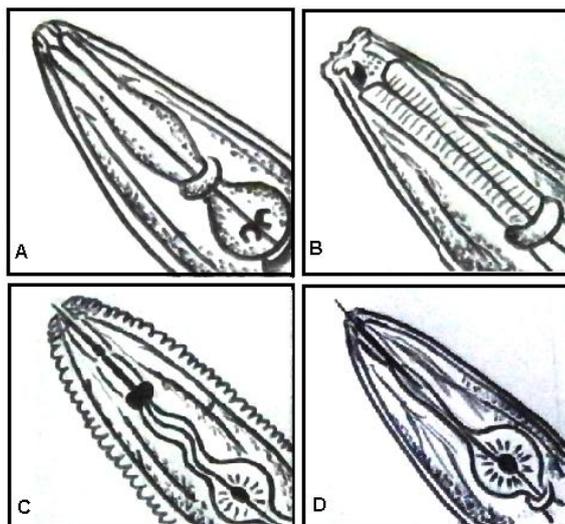


Figura 30 - Os diferentes grupos tróficos. A.Bacteriófago, B.Predador, C.Fitoparasita, D. Micófago. Imagem: Felipe Costa / 2012.

A metodologia utilizada na amostragem de nematoides para levantamento e caracterização da nematofauna neste este, foi realizada pelo processamento de solo pelo método de Jenkins (1964).

A coleta de solo foi realizada em uma área de fragmento de Mata Atlântica no Horto Florestal na Unidade de Conservação Parque Municipal Guido Marlière de Muriaé, Minas Gerais (Figura 31). Foram coletadas seis amostras de solo (300g) e armazenadas em sacos plásticos.

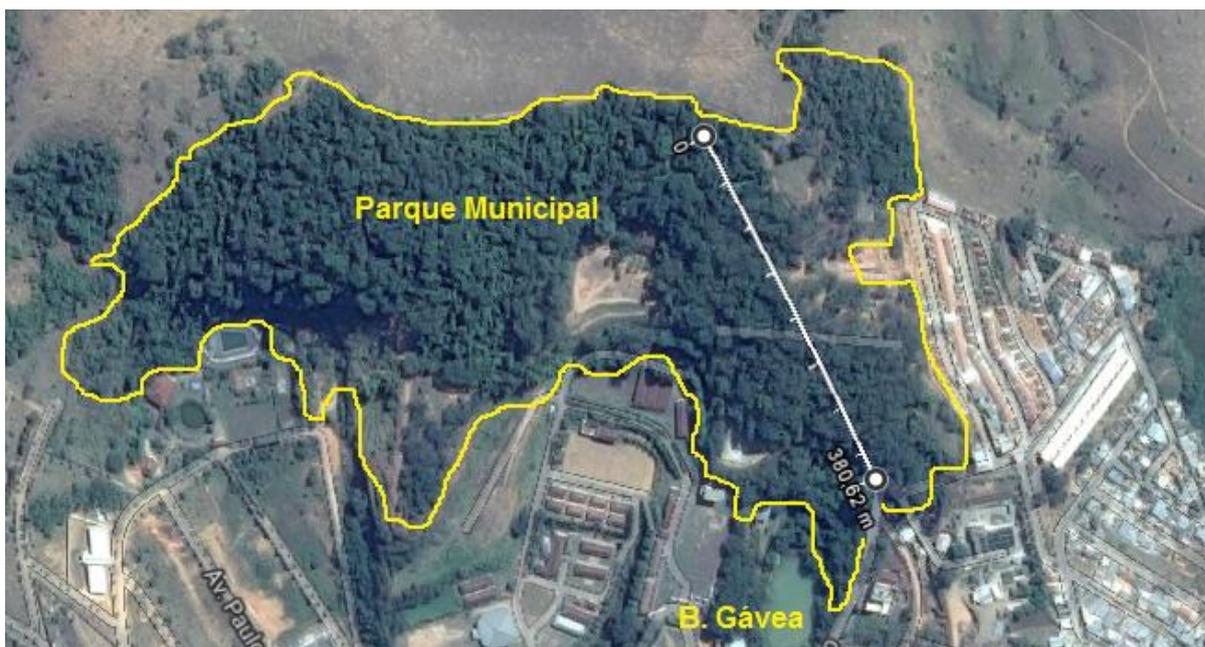


Figura 31. Horto Florestal (Unidade de Conservação – Parque Municipal Guido Marlière), local de coleta das amostras de solo. Muriaé, MG. Fonte: Google Maps 18/10/18.

O processamento das amostras de solo foi realizado na Clínica Fitopatológica do CCTA/UENF. As amostras de solo foram colocadas em um recipiente plástico com volume de 150 mL. Em um recipiente plástico com seis litros de água foi adicionado a amostra de solo para solubilização, após a mistura, a solução passou-se por dois minutos em decantação natural e posteriormente foi peneirada sequencialmente por peneiras de 60 e 500 Mesh.

O material selecionado e solubilizado em água, foi adicionado em tubos de centrífuga. A solução foi centrifugada (2000 rpm / 3 min) e o líquido foi descartado, permanecendo no fundo dos tubos o material decantado (Figura 32). Após este procedimento, os tubos com o material decantado receberam uma solução de sacarose e foram submetidos novamente a uma centrifugação (1000 rpm / 2 min).

Após ao processo de centrifugação, as amostras foram lavadas em peneira de 500 Mesh para reiterada da solução de sacarose. As amostras lavadas foram colocadas em garrafas de Corning totalizando um volume de 50 mL e armazenadas em BOD à 16 °C por dois dias.

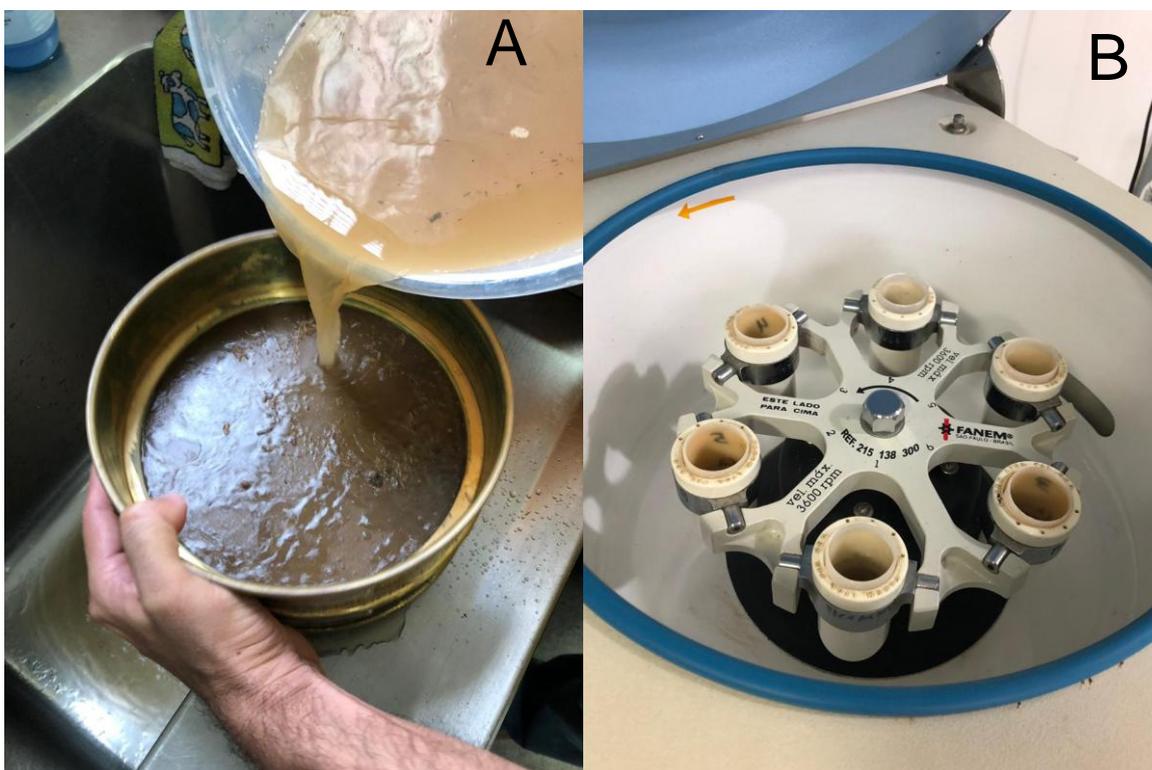


Figura 32. Em A, processo de separação com peneiras de 60 e 500 Mesh. Em B, processo de centrifugação das amostras.

As amostras processadas foram submetidas à análise de microscopia com uso do software QuantoNema para quantificação de nematoides em relação aos diferentes grupos tróficos. Foram realizadas três repetições com alíquotas de 0,5 mL da solução das amostras processadas. O teste de levantamento de nematofauna foi realizado por três alunas do curso de graduação em Ciências Biológicas no laboratório de Biologia da FASM Muriaé.

A área de trabalho do software QuantoNema oferece ferramentas para marcações diretas na imagem capturada da amostra pra identificação e quantificação de nematoides em relação aos grupos tróficos (Figura 33). O software também foi formulado com desenhos morfológicos dos diferentes tipos de nematoides conforme o grupo trófico, permitindo ao usuário uma ferramenta de apoio e referência para identificação da amostra com maior precisão.

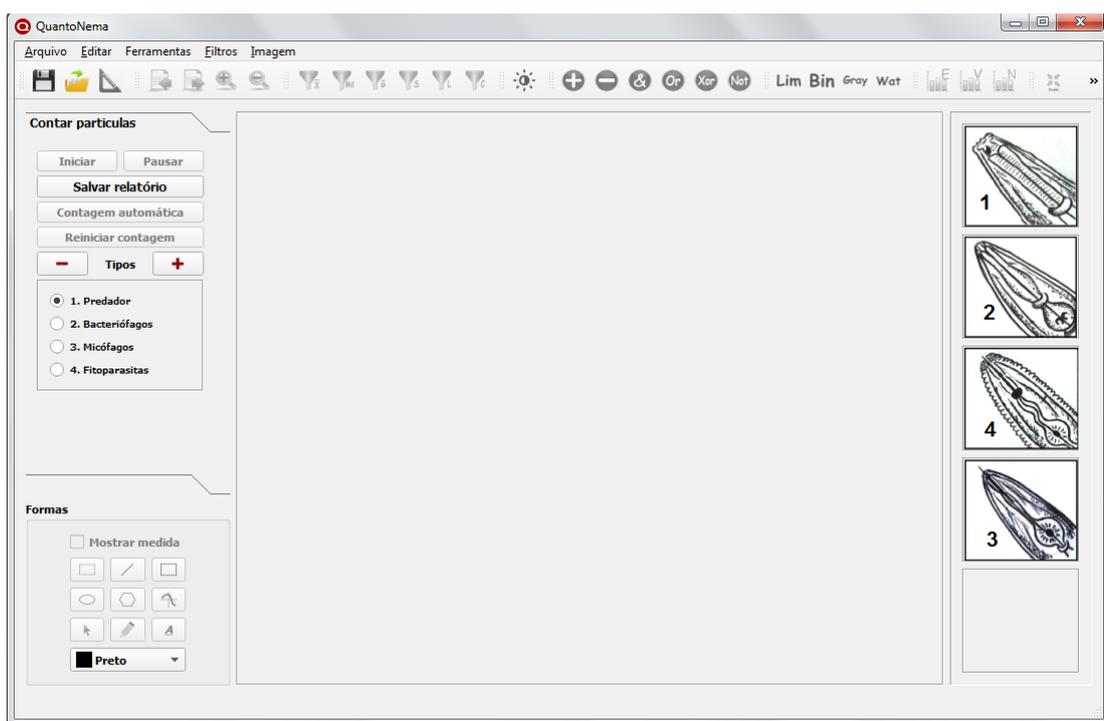


Figura 33. Dashboards do software QuantoNema.

As alíquotas foram distribuídas em lâmina e submetidas à microscopia óptica (aumento de 10 x) para identificação de nematoides. Para visualização no software QuantoNema, uma câmera AmScope foi acoplada na ocular do microscópio e ligada ao computador por cabo USB. As imagens capturadas pelo aplicativo da câmera foram transferidas para área de trabalho do software QuantoNema.

A plataforma do software apresenta diversas ferramentas que auxiliaram para quantificação e reconhecimento dos nematoides em diferentes grupos tróficos. Na área de trabalho à direita, há uma coluna para consulta através de figuras morfológicas dos grupos de nematoides (Predador, Bacteriófago, Fitoparasita e Micófago). Na barra de ferramenta superior o software foi construído para oferecer ferramentas de tratamento da fotografia como a presença de filtros, zoom, brilho e contraste, alteração de imagens, seletor de escalas, ícone para abrir e salvar imagem.

Na barra de ferramentas no lado esquerdo, o software foi construído para oferecer a opção de iniciar as contagens por marcações manuais e por contagem automática. Nesta barra de ferramenta também ofereceu a possibilidade de escolher o grupo de nematoide identificado na amostra, conseqüentemente as marcações realizadas foram computadas no campo dos grupos (Figura 34). Nos casos de erros de marcações, o software oferece a opção de reiniciar contagem a partir de um ícone próprio. Após o processo de contagem e marcações, as amostras foram salvas em pastas abertas pelo próprio software através da seleção do botão “salvar relatório”.

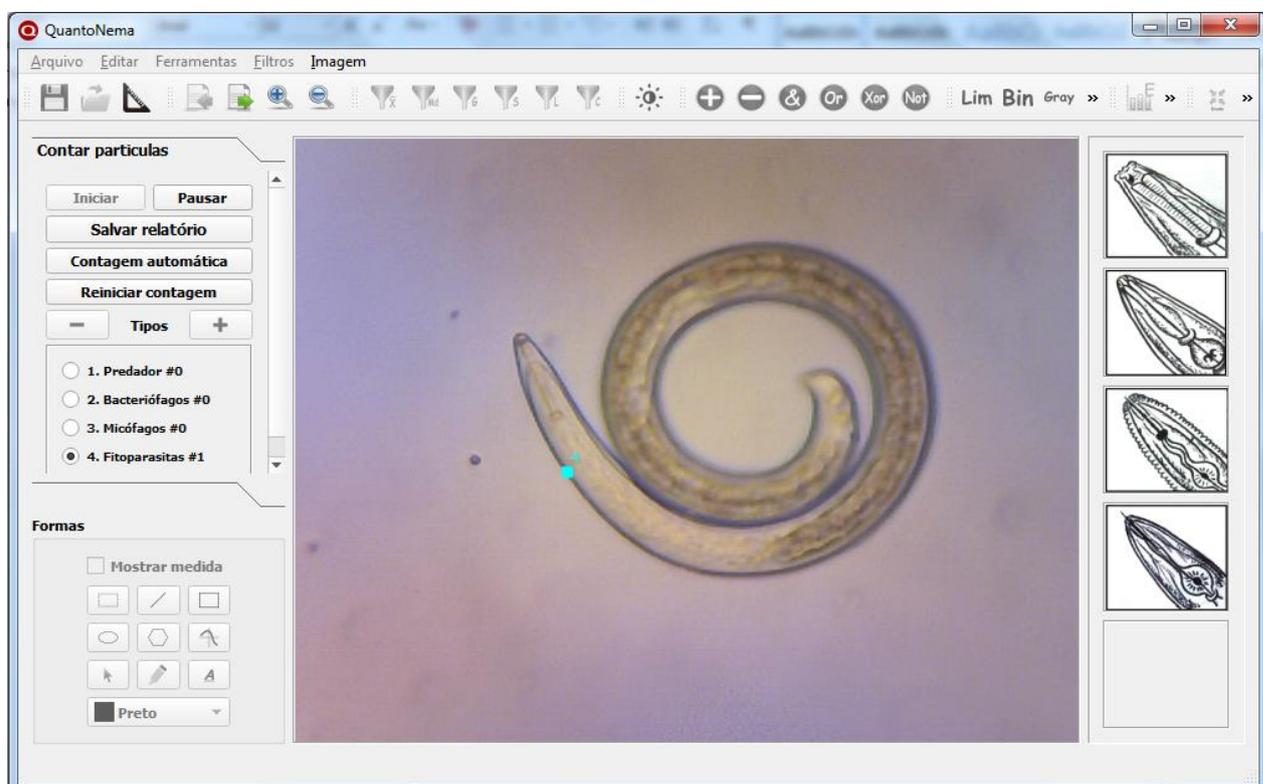


Figura 34. Área de trabalho do software QuantoNema com amostra de um fitonematoide identificado, marcado e contabilizado.

6.4. Avaliação Qualitativa

Após todos os experimentos de progênie, quantificação de ovos de fitonematoides e levantamento de nematofauna utilizando as duas metodologias, tradicional e com uso do software, as alunas do curso de ciências biológicas da FASM realizaram uma descrição pessoal sobre as técnicas desenvolvidas durante o experimento, bem como a experiência de um usuário do software QuantoNema.

7. Resultados e Discussões

7.1. Teste de progênie

7.1.1. Comparação de variância entre os grupos de contagem tradicional

A partir do teste de progênie realizado entre o método tradicional e com uso do software QuantoNema, os resultados das médias foram comparados entre os grupos (repetições) A, B e C. Os grupos foram representados pelos usuários que realizaram a contagem de JIs entre os dois métodos em análise comparativa.

As médias dos números de JIs foram derivadas da contagem por três repetições de alíquotas pelo método tradicional do teste de progênie (Tabela 1).

Número de nematoides JIs – Progênie (Tradicional)		
A	B	C
123	100	40
96	204	44
134	143	151
66	84	110
185	245	198
164	216	148
200	181	238
207	151	221
51	84	154
157	266	165

Tabela 1. Médias obtidas com método tradicional de contagem do número de nematoides JIs em três repetições, A, B e C.

Os dados da tabela 1 correspondem a média do número de JIs obtido das três contagens manuais, estes dados foram submetidos a análise de variância One Way Anova, através do programa estatístico SigmaPlot 12.5. A análise identificou que não há diferenças o suficiente entre os grupos de tratamento. As diferenças de valores podem ser atribuídas a variabilidade amostral.

A média total de JIs obtida foi de 138,3 para o grupo A, 167,4 em B e 146,9 para C. A diferença entre o grupo B em relação ao grupo A foi de 17,4%, e a diferença do grupo B para o grupo C foi de 12,2%, e a diferença entre o grupo A com o grupo C foi de 5,8%.

As alíquotas provieram do mesmo tratamento em ambos grupos em comparação, as variações de médias podem ser oriundas por erros de contagem durante a experimentação. Os JIs quando visualizados em microscopia se locomovem e sobrepõem aos outros nematoides, o que dificulta a identificação e quantificação pelo usuário.

Durante a contagem de JIs o tempo de duração foi contabilizado e listados em tabela (Tabela 2). Os valores do tempo utilizado foram comparados estatisticamente entre os grupos A, B e C. O tempo foi medido em segundos (s).

Tempo médio da quantificação de JIs – Progênie (Tradicional)		
A	B	C
495	480	275
390	866	305
597	257	470
300	480	305
445	417	489
390	291	245
420	240	726
445	270	605
242	560	362
249	256	426

Tabela 2. Valores de tempo (s) em três repetições (A, B e C) durante a contagem de JIs através do método tradicional.

Os valores de tempo entre os grupos A, B e C foram submetidos a análise de variância ONe Way Anova. A análise de comparação de valores identificou que não há presença de diferenças significativas suficiente para excluir a possibilidade de que a diferença seja devida à variabilidade da amostragem aleatória.

O tempo total de duração para o grupo A foi de 3973s, 4117s em B e 4208s para o grupo C. A diferença entre o grupo A com o grupo B foi de 3,5%, entre o grupo A com o grupo C a diferença foi de 5,6% e entre o grupo B com C a diferença foi de 2,2%.

A diferença entre o tempo utilizado para realizar contagem é justificada pelas diferentes habilidades específicas de cada usuário ao manusear as amostras e ao microscópio óptico, além da recontagem por conta de esquecimento da enumeração ou por dúvidas geradas sobre a sobreposição de JIs nas lâminas.

7.1.2. Comparação de variância entre os grupos de contagem com o uso de software QuantoNema

O teste de progênie realizado com uso do software QuantoNema gerou médias foram comparados entre os grupos (repetições) A, B e C. As médias dos números de JIs foram originadas a partir da contagem por três repetições de alíquotas (Tabela 3).

Número de nematoides JIs – Progênie (Software QuantoNema)		
A	B	C
120	186	15
96	147	22
132	66	54
68	21	95
186	186	120
163	110	75
200	77	195
207	122	110
51	53	52
155	206	48

Tabela 3. Médias obtidas com método de contagem do número de JIs através do software QuantoNema em três repetições, A, B e C.

As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento não são grandes o suficiente para excluir a possibilidade de que a diferença seja devida à variabilidade da amostragem aleatória, ou seja, não há diferença estatisticamente significativa.

Os valores da média total de JIs contabilizados para cada grupo foi de 137,8 para o grupo A, 117,4 para o grupo B e 78,6 para o grupo C. A diferença percentual entre os grupos foi de 14,8% entre A e B, 33% entre B e C, e 42,9 % entre A e C.

Em relação aos valores das médias de JIs contabilizados quando comparados entre os grupos A, B e C não apresentaram diferenças estatísticas significativas, portanto os valores possuem uma homogeneidade entre os grupos no teste de progênie. O software ofereceu ferramentas suficiente para que todos processos de contagem de JIs fossem realizados sem comprometer variação de médias entre as alíquotas calculadas e comparações entre as médias dos grupos.

Durante a contagem de JIs com uso do software, o tempo foi cronometrado para medição da duração do experimento de progênie. Os valores de tempo foram listados e comparados entre si em três repetições, representadas pelos grupos A, B e C (Tabela 4).

Tempo médio da quantificação de JIs – Progênie (Software QuantoNema)		
825	1096	1142
603	1230	1260
841	823	1388
537	888	903
1022	1016	1206
909	905	1143
1069	700	1263
1080	1048	1148
474	560	843
868	1337	902

Tabela 4. Médias do tempo (em segundos) em três repetições (A, B e C) durante a contagem de JIs com uso do software QuantoNema.

O valor de tempo total de duração para o grupo A foi de 8228s, do grupo B foi de 9603s em B e do grupo C foi de 11198s. A diferença entre o grupo A com o grupo B foi de 16,7%, entre o grupo A com o grupo C a diferença foi de 36% e entre o grupo B com C a diferença foi de 16,6%.

As diferenças nos valores entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado pelo acaso, neste caso existe uma diferença estatisticamente significativa. Tendo em vista que os dados apresentaram diferenças significativas. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, que pelo qual indicou que o tempo do grupo B variou significativamente em todas repetições a partir do padrão esperado.

O tempo comparado entre os grupos que apresentaram diferenças significativas estão relacionadas às diferentes habilidades desempenhadas pelos usuários em relação a experiência em informática, desenvoltura em manusear o microscópio associado ao computador com uso do software e agilidade motora.

7.1.3. Comparação da quantificação de JIs entre o método tradicional e com uso do software

As médias obtidas do número de JIs dos grupos A, B e C foram comparadas estatisticamente entre os dois métodos de progênie, o tradicional e com o uso do software QuantoNema (Gráfico 1).

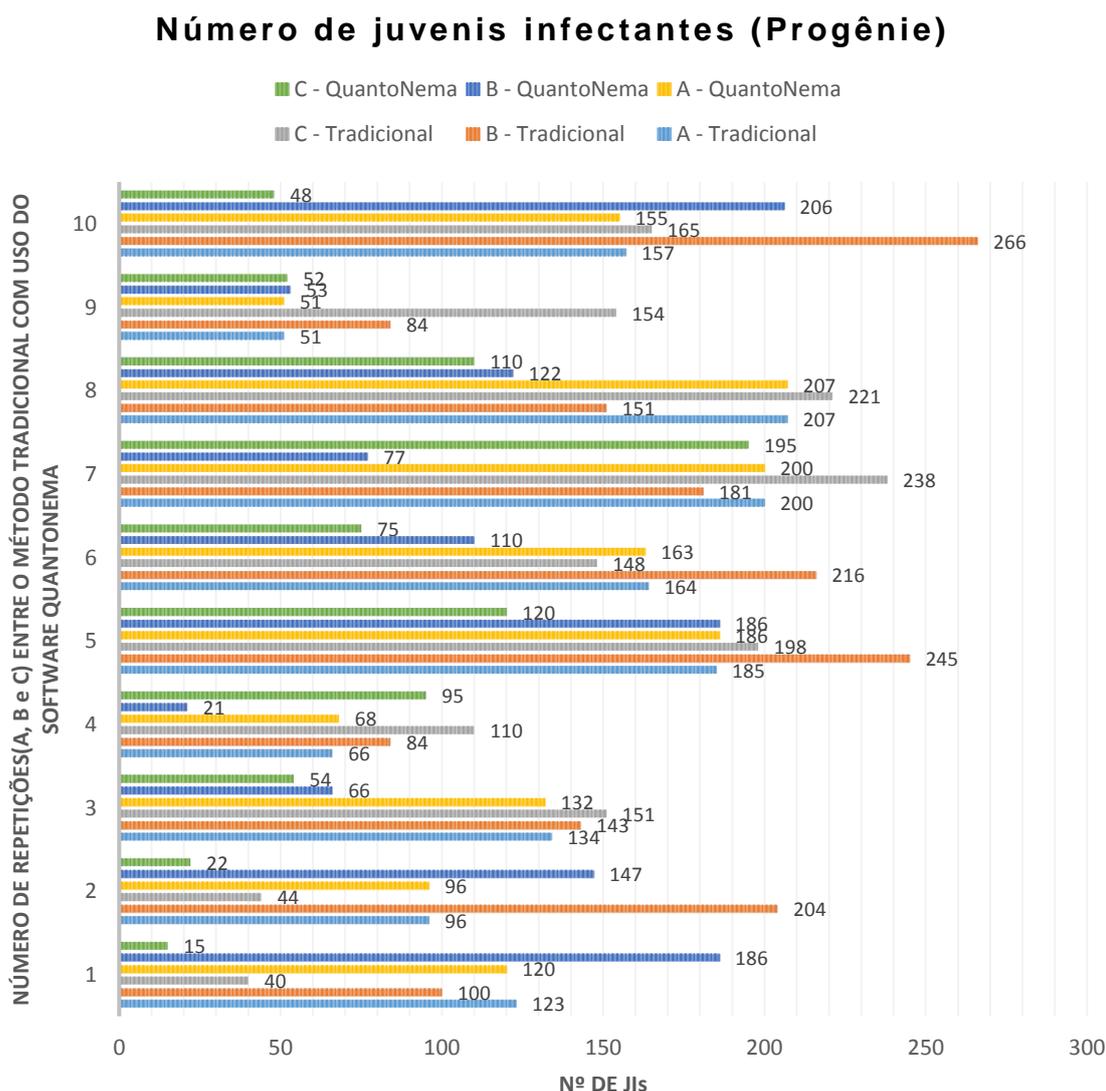


Gráfico 1. Dados comparativos entre as médias do número de JIs entre o método tradicional com uso do software em três repetições (A, B e C), teste de progênie.

Os valores de média de contagem de JIs com o método tradicional e com uso do software, foram submetidos a análise de variância pelo teste de Tukey, o qual indicou que as diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são

maiores do que seria esperado pelo acaso, o que indica a existência de diferença estatisticamente significativa entre todas as repetições.

As médias dos valores de JIs comparadas entre os grupos com comparações estatísticas entre os dois métodos, apresentaram diferenças percentual de 0,4 % entre o método tradicional e software no grupo A. O grupo B obteve uma diferença de 29,9% entre os dois métodos e no grupo C, a diferença foi de 46,5% entre o número de JIs pelo método tradicional com uso do software.

A diferença constatada entre os números de JIs quando compara aos dois métodos, tradicional e software QuantoNema, pode estar relacionada a falha de contagem pelo usuário com o método tradicional.

A contagem de JIs através do método tradicional apresenta fatores que desfavorecem uma contagem coerente, uma vez que os nematoides se movem e podem sobrepor o corpo em outros nematoides, dificultando sua identificação e contabilização. Outro fator que influencia na qualidade da contagem, é a degradação do material visualizado em microscopia que sofre alterações morfológicas e morte dos JIs pela evaporação da amostra nas lâminas, a elevação da temperatura ocorre pelo uso de luz no microscópio.

Em contrapartida, o número de JIs contabilizados com o uso do software, apresenta números quantitativos coesos pelo fato de todos os nematoides da amostra serem fotografados e conseqüentemente marcados. A quantidade de JIs é somada pelo durante o acompanhamento das marcações feita pelo usuário.

Outro benefício que o software proporcionou ao usuário, foi a capacidade de armazenamento das imagens marcadas, que podem ser quantificadas posteriormente, uma vez que todos os dados permanecem armazenados em pastas específicas criadas pelo software QuantoNema. O usuário deste software é favorecido com esta flexibilidade e sem o risco de perder parte de sua pesquisa por problemas causados durante o procedimento de contagem tradicional.

7.1.4. Comparação do tempo de duração para contagem de JIs entre o método tradicional e com uso de software QuantoNema

As médias obtidas do número de JIs dos grupos A, B e C foram comparadas estatisticamente entre os dois métodos de progênie, o tradicional e com o uso do software QuantoNema (Gráfico 2).

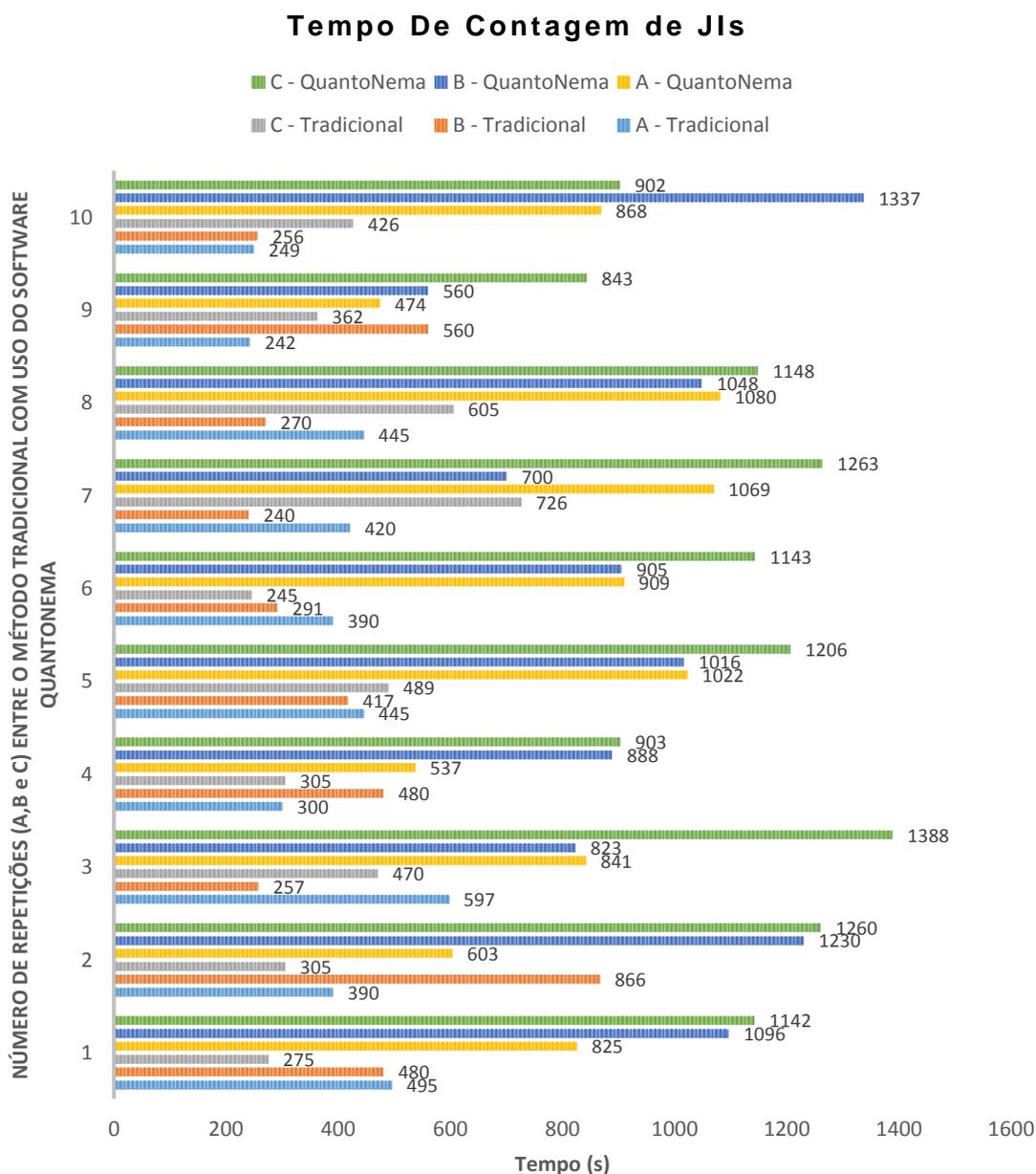


Gráfico 2. Dados comparativos entre as médias do tempo (segundos) de duração para contagem de JIs entre o método tradicional com uso do software em três repetições (A, B e C), teste de progênie.

As medidas de tempo entre a contagem tradicional e com o uso de software dos três grupos, foram submetidos à análise de variância pelo teste de tukey, onde os valores apresentaram-se estatisticamente significativos entre todos os valores de tempo, onde as diferenças nos valores entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado pelo acaso.

A diferença porcentual do tempo utilizado para experimentação do teste de progênie entre o método tradicional e com uso do software QuantoNema foi de 51,8 % entre o grupo A, 57,1% entre o grupo B e 62,4% entre o grupo C.

O menor tempo utilizado para realização de progênie pelo método tradicional em relação ao maior tempo com uso do software, é decorrente pela falta de treinamento e agilidade de um usuário principiante ao manusear ferramentas informatizadas. O software QuantoNema não ofereceu condições para contagem automatizada durante a contabilização de JIs, aumentando o tempo de tratamento das imagens com marcações e arquivamento.

Devido a sua forma cilíndrica alongada, as posições corpóreas apresentadas pelos nematoides são diversas. Isso impede o uso de um nematoide inteiro como template que permita a contagem dos nematoides presentes na imagem. A solução foi escolher uma parte do nematoide como template. As partes mais sugestivas como template são os extremos. Entretanto, o software geralmente contava os nematoides em duplicata. Portanto, em decorrência desses problemas, a contagem automática foi descartada e os nematoides foram contados com o clique do mouse após reconhecimento do operador, o que chamamos de método manual.

O uso do software QuantoNema contribuiu com o teste de progênie a partir do arquivamento de todas as imagens das amostras visualizadas em microscopia, para revisões de dados e tratamento de imagens posteriormente, ferramentas que oferecem suporte para trabalhos futuros com uso dessas imagens. A ferramenta “contagem automatizada” oferecida pelo software não é possível pelo método tradicional, que além de perder amostras após o uso das lâminas a fresco, durante a contagem se o tempo for extenso a amostra tende também a sofrer alterações e até mesmo se perder por desidratação causado por raios luminosos excessivos do microscópio óptico.

O arquivamento das amostras pelo uso do software possibilita ao usuário desenvolver a contagem na ausência do microscópio sem depender do tempo curto de validade das lâminas a fresco.

7.2. Quantificação de ovos de fitonematoides

Os tempos de contagem de ovos pelos métodos tradicional e com uso do software foram medidos e comparados. Entretanto, a quantificação de ovos por meio do software foi contabilizada de duas formas diferentes. Uma delas utilizou o método automático, que faz uso do template, e posteriormente a contagem foi realizada com marcações nas amostras feita pelo operador, chamada de contagem manual com software. O tempo de duração entre esses dois métodos também foram comparados.

O resultado entre os testes de contagens de ovos de fitonematoides (Contagem tradicional e Contagem com uso do software) foram expressos na tabela 5.

Tempo de contagem de ovos										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tradicional	678*	825	665	590	647	709	844	796	688	641
Software Template	568	597	425	393	305	413	547	572	466	396

Tabela 5. Valores do tempo contabilizado entre o teste tradicional e com uso do software QuantoNema. * Valores em segundos (s).

Os dados obtidos pelo tempo utilizado entre os dois métodos de contagem foram submetidos à análise de variância: One way anova pelo programa SigmaPlot 12.5 que resultaram diferença estatisticamente significativa ($P = <0,001$) em todas as dez repetições (Gráfico 3). Os dados foram submetidos pelo teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e aprovado ($P = 0,567$). Todos os procedimentos de comparação múltipla foram emparelhados (teste de Tukey) com comparação de diferença $P <0,050$.

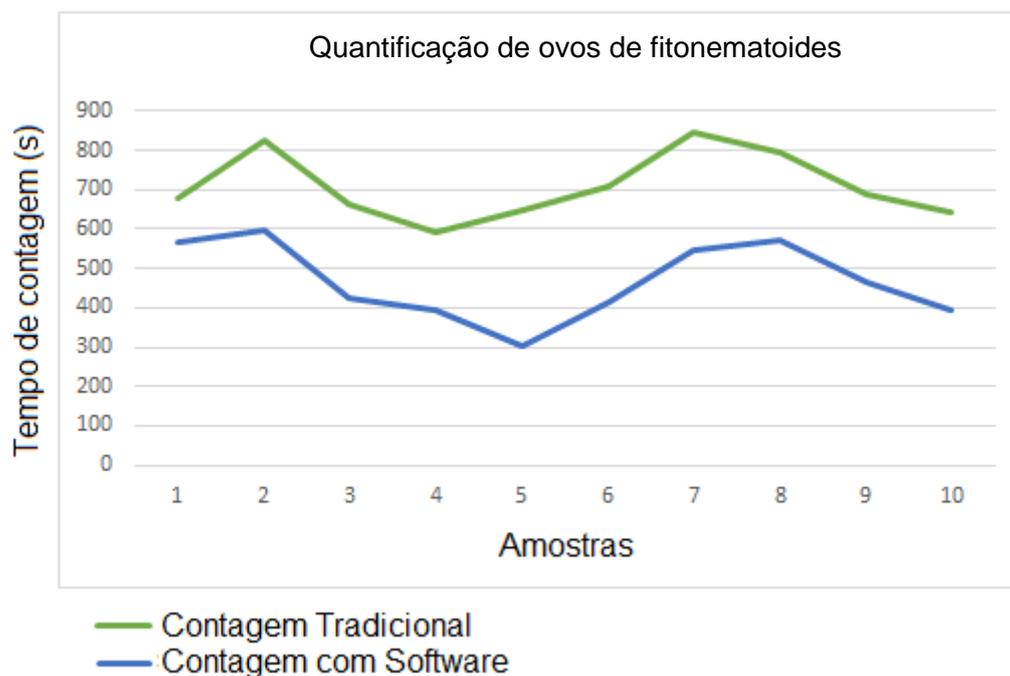


Gráfico 3. Resultados de períodos de tempo (em segundos) da contagem de ovos de fitonematoides entre teste tradicional e com uso de software Quanto.

Os resultados obtidos em análise comparativa entre os dois métodos de contagem (tradicional e com uso do software) estatisticamente se diferem entre si significativamente, isto é, o uso do software viabilizou a pesquisa por proporcionar ao pesquisador benefícios como a redução do tempo de experimentação, o que permite a realização do projeto em tempo mais curto. A redução do tempo de execução de contagem de ovos reduz a exposição da amostra à luz de microscopia, que pode alterar morfológicamente a estrutura visualizada por dessecação, resultado do aquecimento pela luz do microscópio e evaporação da água.

A contagem automatizada dos ovos pelo software QuantoNema com duração de tempo reduzido, proporcionou ao usuário menor exaustão corpórea, bem como o favorecimento de sua ergonomia no trabalho.

O método utilizado de contagem de ovos com uso do software QuantoNema auxiliou a pesquisa também no arquivamento das imagens capturadas pela microscopia, bem como as marcações de contagem automatizadas (figura 35) e conferência de dados de forma manual, um recurso totalmente viável à pesquisa. Todas imagens capturadas e editadas foram salvas em uma pasta criada pela própria

ferramenta que o software disponibiliza para que estudos futuros sirvam de consulta, exemplificação e uso de imagens para revisão de dados.



Figura 35. Operação do software com marcações e quantificação de ovos de nematoides

A partir da quantificação em relação ao número de ovos de *Meloidogyne javanica*, obteve-se o número médio de 288,2 ovos pelo método tradicional na contagem direta com uso do microscópio óptico, e média de 278,1 ovos através da contagem pelo software QuantoNema (Tabela 6). A diferença entre as médias foi de 10,1 ovos, correspondendo à 3,63 % de ovos contabilizados no teste tradicional em relação ao teste com uso do software.

Tipos de Testes	Número de ovos por amostras									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tradicional	187	288	211	278	321	345	309	297	327	319
QuantoNema	179	281	187	265	305	340	295	311	316	302

Tabela 6. Quantificação de ovos entre as amostras pelo método de contagem tradicional e com uso do software QuantoNema.

Os resultados entre as médias obtidas pelo teste tradicional e com uso de software, não tiveram valores significativos estatisticamente em relação às dez amostras de quantificação de ovos (Gráfico 4). Segundo Bruinsma (2013), os valores médios de ovos de *M. javanica* foram em torno de 8620 ovos em tomateiros, os valores podem variar de acordo com o fator de reprodução e quantidade de inoculo. De acordo com Garcia (2006), o valor da média de ovos de *M. javanica* contabilizados pelo método tradicional foi de 5000 ovos. Os valores podem variar por fatores ambientais e quantidade inoculo submetidos aos cultivares. As raízes coletadas na casa de vegetação da CCTA/UENF apresentaram número reduzido de galhas, o que justifica o resultado inferior às médias comparadas com outros testes.

Quantificação de ovos de *M. javanica*

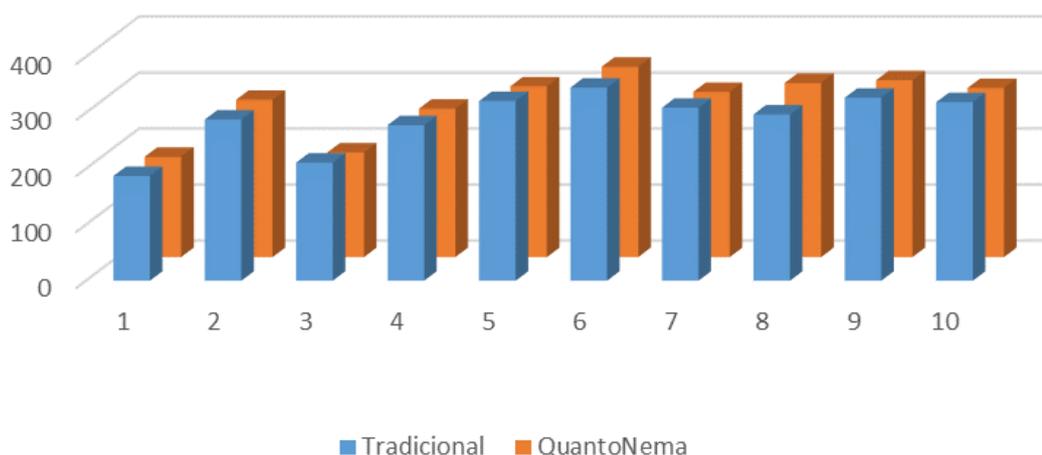


Gráfico 4. Dados comparativos do número de ovos de nematoide *M. javanica* entre os métodos de quantificação tradicional e com uso do software QuantoNema.

A contagem em relação ao número de ovos através do software mesmo com análise não-significativa frente à contagem tradicional, permite ao usuário do software manusear todas as amostras para trabalhos futuros, ou até mesmo a ação de quantificação ser realizada em outro momento, uma vez que as amostras por imagens são armazenadas em pastas.

O uso do software QuantoNema por sua vez apresenta qualidades que permite ao usuário maior flexibilidade em suas pesquisas, frente ao método tradicional em que as amostras se perdem pelo tempo de exposição à luz microscópica, que provoca

deformações e ressecamento dos elementos visualizados, bem como a evaporação da água. Além de não ter acesso aos dados das amostras em trabalhos futuros ou até mesmo possíveis revisões de contagem e identificação.

7.3. Uso do software para Nematofauna

A plataforma criada específica para nematofauna a partir do software QuantoNema favoreceu os resultados obtidos neste experimento. A disponibilização de imagens morfológicas para consulta permitiu que o usuário realizasse as marcações como modelo, até mesmo para aquele pesquisador que não tenha conhecimento prévio em diversidade morfológica de nematoides, o software fornece suporte para consulta.

O software QuantoNema permite fazer marcações nas amostras com seleção entre os diferentes grupos tróficos em que se enquadram os nematoides. O software oferece uma coluna à esquerda com botões de seleção com opções entre os diferentes nematoides. Esses botões oferecem informações do número de nematoides conforme são marcados na imagem visualizada. Outro benefício proporcionado pelo software foi a opção de arquivamento das imagens capturadas e editadas, recurso viável para estudos futuros, ou seja, material disponível como fonte de pesquisa a partir imagens salvas.

O levantamento de nematofauna realizado com uso dos recursos do software QuantoNema apresentou dados com identificação de nematoides do grupo de fitoparasitas, bacteriófagos e predadores (Figura 36). Não foi encontrado nematoide do grupo Micófago.

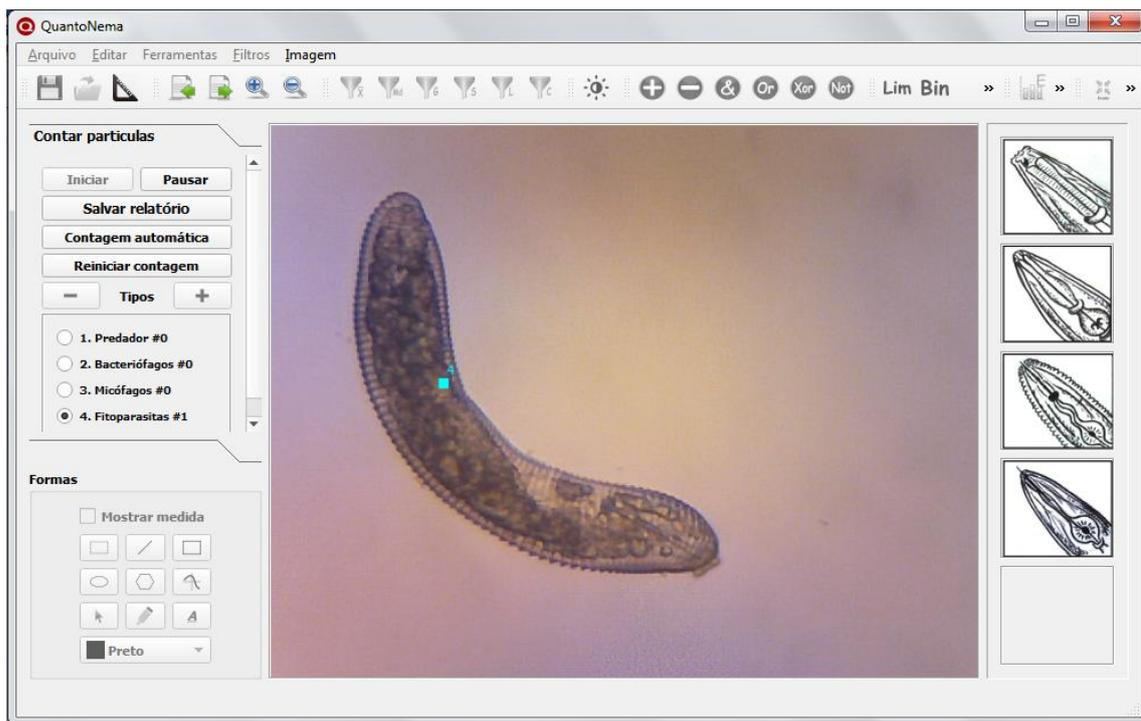


Figura 36. Fitonematoide identificado e marcado através do software QuantoNema.

Predador Bacteriófago Micófago Fitoparasita

Na repetição A, foram identificados sete nematoides bacteriófagos e cinco fitoparasitas, nematoides micófagos e predadores não foram visualizados. Na repetição B, foram reconhecidos três nematoides bacteriófagos, quatro fitoparasitas, um predador e nenhum Micófago. E na repetição C, foram identificados quatro nematoides bacteriófagos, dois fitoparasitas e um predador, não houve identificação de nematoides micófagos. Em nenhuma das amostras processadas e visualizadas no software QuantoNema, foram identificados nematoides micófagos. Os resultados dos números de nematoides entre as seis amostras foram expressos na tabela 7.

Amostras	Aluna A				Aluna B				Aluna C			
	P	B	M	F	P	B	M	F	P	B	M	F
1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
2	0	0	0	1	0	1	0	2	0	1	0	0
3	0	0	0	2	1	0	0	0	0	1	0	0
4	0	2	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
5	0	2	0	2	0	1	0	0	0	0	0	1
6	0	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0

Tabela 7. Número de nematoides identificados por amostra entre os diferentes grupos tróficos (P – Predador, B – Bacteriófago, M – Micófago e F – Fitoparasita) em três repetições A, B e C.

A partir da contagem de nematoides em relação aos diferentes grupos tróficos em seis amostras, obteve-se um total de 51,9 % de nematoides bacteriófagos, 40,7 % de fitoparasitas, 7,4 % de predadores e 0 % de micófitos (Gráfico 5).

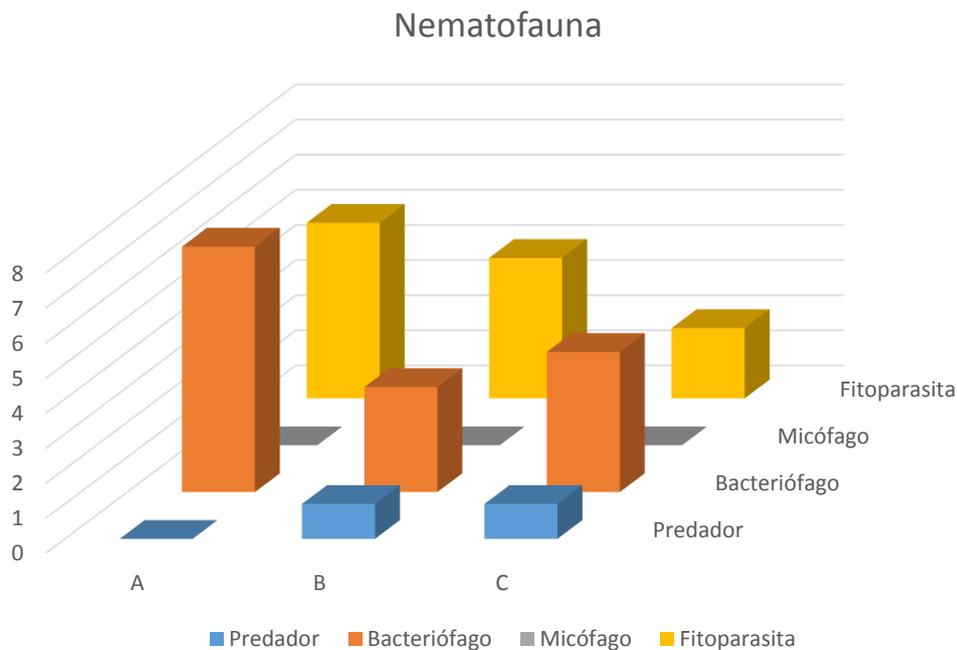


Gráfico 5. Resultados do número de nematoides em diferentes grupos tróficos (Nematofauna) de Mata Atlântica, Muriaé, MG. Em A, B e C repetições representadas por usuárias do software QuantoNema.

A coleta de solo foi realizada em um período de estação seca e em solo de fragmento de Mata Atlântica, o resultado de pouca diversidade entre os grupos e o número reduzido encontrado por amostra pode ser justificado por estes fatores ambientais e ecológicos.

O software QuantoNema utilizado na pesquisa correspondeu aos objetivos esperados em relação aos recursos oferecidos aos usuários, desde aos nematologista até mesmo aos usuário sem experiências em técnicas nematológicas. As figuras de nematoides como modelo foram oferecidas pelo software para realização da classificação dos nematoides em diferentes níveis tróficos, portanto esta ferramenta favoreceu aos usuários o reconhecimento dos nematoides durante as visualizações microscópicas.

As marcações dos nematoides em diferentes níveis tróficos foram contabilizadas pelo software de acordo com a seleção que o usuário escolhia. Após as marcações a imagem editada e contabilizada foi salva em uma pasta específica a partir da seleção da opção “salvar relatório”.

Uma grande vantagem em utilizar o software QuantoNema no experimento de nematofauna, é o oferecimento ao usuário em realizar seu trabalho de contagem, revisões e tratamento das imagens posteriormente à manipulação do experimento com lâminas. O experimento tradicional não permite ao pesquisador dar continuidade das contagens e identificação por conta da perda de material provocado pelo aquecimento da luz do microscópio.

7.4. Resultados Qualitativos

Os experimentos nematológicos foram realizados com a participação de três alunas do curso de Ciências Biológicas da FASM. Após os testes realizados as alunas descreveram relatos sobre a qualidade da pesquisa com uso das ferramentas oferecidas pelo software QuantoNema em relação às metodologias tradicionais nos estudos da nematologia:

O estudo da nematofauna é algo de extrema importância para que se obtenha melhores conhecimentos para estudantes e pesquisadores da área de controle biológico, e dentre outras áreas específicas ao uso e estudo desse grupo de indivíduos. Sendo assim em uma comparação com a metodologia tradicional, onde as visualizações são feitas com auxílio do microscópio, a metodologia a qual se aplica o uso do software torna visível a importância do uso deste para realização de identificação de espécies, bem como visualização ampliada de suas características e quantificação exata do número de ovos e nematoides presentes na amostra, uma vez que, são registrados em foto para serem contabilizado. Facilitando assim todo o processo e também por proporcionar um campo de visão maior. O uso dessa ferramenta mostra-se de extrema relevância para os pesquisadores da área por contribuir para que sejam realizadas melhores análises e armazenamento de dados obtidos, além de ser uma ferramenta simples e de fácil utilização onde é possível criar

pastas diferentes para armazenamento de imagens, além de corrigir possíveis erros de contagem (**Bárbara Helena de Oliveira Barcaro**, aluna da 2ª série do curso de Ciências Biológicas - FASM)

A pesquisa realizada foi de suma importância, pois verificamos a eficiência do teste de progênie, já que ele pode apresentar um número médio de juvenis que são produzidos em uma única larva, oferecendo dados para uma produção futura, e o uso do software que entra como uma ferramenta que auxilia na contagem dos nematoides, por conta do armazenamento de imagens microscópicas que são perdidas pelo método tradicional. Além disso o software contribui para as contagens dos ovos dos nematoides e a identificação de Nematofauna com as imagens armazenadas. Esse teste foi feito em etapas, uma delas foi realizada em microscópio óptico, onde verificou-se a presença de juvenis infectantes e houve a contagem tradicional. A outra parte foi no computador com o software QuantoNema. Nele tivemos uma melhor visualização dos nematoides, pois as imagens ficam armazenadas e facilitam a contagem e a identificação. Por fim, a melhor forma de contar e verificar novas espécies de nematoides é pelo software, pois ele nos oferece uma forma de conter as imagens, onde podemos usá-las como amostras em trabalhos futuros. (**Mariana Aparecida Fortunato**, aluna da 2ª série do curso de Ciências Biológicas – FASM)

Para a realização da contagem dos nematoides utilizamos o software que contribuiu muito para a identificação, o armazenamento das imagens que também auxilia muito na identificação, pois nele temos a imagem microscópica bem nítida desses nematoides o que é um avanço da tecnologia para nos oferecer dados para futuras produções. As imagens salvas também evitam perdas nos métodos de contagem manual. Com as imagens armazenadas fizemos a identificação de nematofauna. O uso do software favoreceu para a contagem dos ovos de nematoides. O teste de progênie é muito importante por apresentar o número médio de nematoides juvenis que são produzidos em uma determinada larva, que utilizamos em nossa pesquisa a larva do *Tenebrio molitor* e isso nos oferece dados para uma produção futura. A pesquisa foi realizada na Faculdade Santa Marcelina em Muriaé e contamos com a orientação do professor Felipe Costa que desenvolveu essa importante ferramenta (software) que nos visa melhorar nas pesquisas com nematoides. (**Lenimar Aparecida Ribeiro**, aluna da 1ª série do curso de Ciências Biológicas - FASM)

8. Conclusões

A experimentação de metodologias nematológicas em análise comparativa pelo método tradicional com o novo método informatizado com uso do software QuantoNema foi totalmente relevante. Durante a pesquisa pode-se concluir que:

- Foi possível realizar o teste de progênie tradicional em análise comparativa com a progênie realizada com uso do software QuantoNema. A comparação de dados entre os grupos A, B e C em relação ao número de nematoides e tempo de experimentação pelo método tradicional não apresentou diferenças significativas. As médias dos números de JIs entre os grupos A, B e C com uso do software também não apresentou diferenças significativas estatisticamente. Mas o teste comparativo do tempo utilizado para realização de progênie entre os grupos, houve diferença significativa em relação ao grupo B, tal diferença está relacionada às diferentes habilidades apresentadas entre os usuários.
- Entre os métodos, tradicional e com uso do software QuantoNema, foi realizada uma comparação dos grupos na contagem do número de nematoides e o tempo de duração do experimento de progênie. Em ambas comparações, os valores apresentaram diferenças significativas em todas as repetições. A diferença entre o número de JIs foi favorecida a partir o uso do software com valores quantificados e armazenados diferentes dos valores obtidos pela contagem tradicional. O tempo de duração para experimentação da progênie com uso do software foi maior significativamente em relação ao tempo utilizado para realizar progênie pelo método tradicional. O uso do software demandou maior tempo por exigir do usuário principiante destreza ao manusear o software, bem como todas informações de mídias, mas o uso do software proporcionou aos usuários ferramentas essenciais, como o arquivamento de imagens para edição, correções e revisões de amostras em trabalhos futuros. O método tradicional limita-se ao tempo de duração das amostras (lâminas a fresco).

- A quantificação de ovos de fitonematoides entre a metodologia tradicional com o uso do software QuantoNema foi realizada. As médias do número de ovos comparadas entre os dois métodos não foram significativas estatisticamente, mas os valores de tempo comparado entre as duas metodologias apresentaram significância. O uso do software QuantoNema acelerou o processo de contagem com utilização da ferramenta “contagem automatizada” em relação ao tempo de duração pelo método tradicional.
- Através do software QuantoNema foi possível realizar o levantamento faunístico de nematoides de acordo com os grupos tróficos (Nematofauna). As ferramentas oferecidas pelo software proporcionaram ao usuário suporte para identificação morfológica dos nematoides a partir de uma galeria de imagens modelo dos diferentes nematoides (Bacteriófago, Fitoparasita, Micófago e Predador). Além deste suporte, o software oferece também ao usuário ferramentas para contabilização e marcação nas imagens entre os diferentes grupos tróficos.

9. Trabalhos Futuros

Como sugestões para trabalhos futuros, citam-se:

- Conduzir estudos para construir ferramentas no software QuantoNema aplicadas à identificação morfológica (morfometria) entre espécies de nematoides entomopatogênicos.
- Conduzir estudos para aperfeiçoamento de ferramentas para correlação na contagem automatizada a partir da morfologia de nematoides.

10. Referências Bibliográficas

ABES: Associação Brasileira das Empresas de Software.

Adams, B. J.; Nguyen, K. B. (2002). Taxonomy and systematics. In: Gaugler, R. (Ed.). Entomopathogenic nematology. New York: CABI Publishing. p.1-33.

Akhurst, R. J., and N. E. Boemare. (1990). Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*, In R. Gaugler and H. K. Kaya (ed.), Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Boca Raton, Fla. p. 75–90.

Amabis, J. M; Martho, G. R. (2009). Biologia dos organismos – 3ª ed. São Paulo: Moderna, ISBN 978-85-16-06331-3,356 p.

Andaló, V.; Nguyen, K.B.; Moino Jr. A. (2006). *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. Nematology, V. 8: p. 853-867.

Barbercheck, M. E., (1992). Effect of soil physical factors on biological control agents of soil insect pests. Florida Entomologist. V. 75: p.539-548.

Blanchette, J. S. (2008). *C++ Gui Programming with Qt 4*. 2 ed. Massachussetts: Prentice Hall, 752p.

Blaxter, M. (2003). Molecular systematics: Counting angels with DNA. Nature, V. 421, n. 421, n. 6919, p. 122-124.

Boneti, j.i.s. & Ferraz, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira 6:553. 1981.

Bradski, G., Kaehler, A. (2008) *Learning OpenCV: computer vision with the OpenCV library*. 1. Ed., Sebastopol: O'Reilly Media, Inc., 576p.

Bruinsma, J.S. (2013) Avaliação de métodos para o estudo da resistência de genótipos de soja a *Meloidogyne javanica* (Treub). Dissertação de mestrado, UFSM, RS.

Carmona, A. I. S. (2008) Software Livre no Limite da Propriedade Intelectual: Uma Breve Apresentação. Santa Catarina, 2009. Monografia (Graduação em Ciências Econômicas) - Universidade Federal de Santa Catarina.

Costa, M. A. (2015). Biocontrole de Nematoides com fungos. Dissertação (mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista- UNESP.

Coull, B. C. (1985). Long term variability of estuarine meiobenthos: na 11 year study. *Marine Ecology Progress Series* 24: p. 205-218.

Courtney, W. D.; Polley, D.; Miller, (1955). V. I. TAF, an improved fixative in nematode technique. *Plant Disease Reporter*, Beltsville, v. 39, p. 570-571.

Cusumano, M. A., Yoffie, D.B. (1999) Software development on Internet time. *Computer*, 32(10):60–69.

Dolinski, C.; Kamitani, F. L.; Machado, I. R.; Winter, C. E. (2008). Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* [online]. vol.103, n.2, p. 150-159. ISSN 0074-0276. doi:10.1590/S0074-02762008000200005.

Eisenback, J. D. (1993). Interactive Multimedia for Teaching Nematology. *Journal of Nematology*, Volume 25, No. 3, September 1993.

Ferraz, L. C. C. B.; Asmus, G. L.; Carneiro, R. G.; Mazaffera, P.; Silva, J. F. V. (2001) *Relações parasito-hospedeiro nas meloidogynoses da soja*. Londrina: Embrapa Soja,

Ferraz, L.C.C.B. (1998). Nematoides entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (Coord.), *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba, FEALQ, p.541-569.

Franklin, M.; Goodey, J. B. (1949). A cotton blue lactophenol technique for mounting plant-parasitic nematodes. *Journal of Helminthology*, London, v. 23, p. 175-178.

Gomes, F. P. (1990) *Curso de estatística experimental*. 13ª ed. Piracicaba: Nobel, 1990. 468 p.

Garcia, M.J.D.M.; Almeida, A.M.; Wilcken, S.R.S.; Fischer, I.H.; Sampaio, A.L.; Jesus, A.M.; Fumis, T. (2008) Reação de maracujazeiro-amarelo 'Afruvec' e 'Maguary' a *Meloidogyne* spp. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 75, p. 235-238.

Grewal, P.S.; Nardo, E.A.B.; Aguilera, M.M. (2001). *Entomopathogenic Nematodes: Potential For Exploration and Use in South America*. *Neotrop. Entomology*. vol.30 no.2 Londrina.

Guimarães, E. R. S. (2016). Quanto, um software para auxiliar a caracterização de imagens. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais) -Campos dos Goytacazes – RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF.

Guimarães, E.R.S.; Costa, F.S.; Silva, A.G.P.; Silva, T.L.G.L.; Cascardo, I.O.G.; Silva, A.C.L,(2016) *Biotecnologia de software em progênie de nematoides entomopatogênicos (NEPs) Heterorhabditis bacteriophora HP88*. 5th International Conference on Sustainable Agriculture. Disponível em: <http://www.simbras-as.com.br/trabalhos-cientificos>

Hodda M (2011) Phylum Nematoda Cobb 1932. In: *Animal Biodiversity: An Outline of Higher-Level Classification and Survey of Taxonomic Richness* (Ed. Zhang Z-Q). *Zootaxa* 3148,63–95.

Ishibashi, N., Kondo, E., (1990). Behavior of infective juveniles. In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (Eds.), *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 139–152.

Kaya, H. K. Soil ecology. In: R. Gaugler; Kaya, K.K. (Eds.). (1990). Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Raton: CRC Press, p.93-116.

Kaya, H. K., Gaugler, R. (1993). Entomopathogenic nematodes. Annu. Rev. Entomologist. 38: 181-206.

Kaya, H. K.; Stock, S. P. (1997). Techniques in insect nematology. In: LACEY, L. (Ed.). Manual of techniques in insect pathology. San Diego: Academic Press, p. 281-324.

Kung, S.P., Gaugler, R., Kaya, H.K (1991) Effects of soil temperature, moisture and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence Journal of Invertebrate Pathology 57: 242-249.

Malan, A.; Waal, J. Y.; Nguyen, K. B.; Tiedt, L.; (2008) *Heterorhabditis safricana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. Nematology, 2008, Vol. 10(3), 381-396.

Minas, R.S. (2012) Caracterização biológica de uma linhagem de nematoide entomopatogênico visando o controle do gorgulho da goiaba (*Conotrachelus psidii*) em dois sistemas de cultivo. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense –UENF, 137 p.

Molina, J. P. A., A. Moino Jr, R. S., Cavalcanti. (2004) Produção in vivo de nematoides entomopatogênicos em diferentes insetos hospedeiros. Arquivos do Instituto Biológico, 71: 347-354.

Monteiro, C.M.O; Prata, M.C.A.; Faza, A.; Batista, E.S.P.; Dolinski, C.M; Furlong, J. (2012). *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) HP88 for biological control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae): the effect of different exposure times of engorged females to the nematodes. Veterinary Parasitology; 185 (2-4) 364-7, 2012 Apr 30.

Negrisola Junior, A. S.; Sarmiento, C. A. V.; Barbosa Negrisola, C. R. C.; Guzzo, E. C. (2012). Desenvolvimento de um software para análise da compatibilidade de nematoides entomopatogênicos (Nematoda: Steinernematidae e Heterorhabditidae) com produtos fitossanitários em laboratório. Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Nguyen, K. B.; Hunt, D. J. (2007). Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts. Brill Leiden-Boston, V.5, 815 p.

Nguyen, K. B.; Shapiro-Ilan, D. I.; Stuart, R. J.; McCoy, C. W.; James, R.R.; Adams, B. J. (2004) *Heterorhabditis mexicana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Tamaulipas, Mexico, and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis* spp. Nematology, Leiden, v. 6 p. 231-244.

Nguyen, K. B.; Smart, G. C. (1995) Morphometrics of infective juveniles of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nemata: Rhabditida). Journal of Nematology, St. Paul, v. 27, p. 206-212.

Nogueira, I.L. (2013) *Desenvolvimento de software para identificação e caracterização de pites de corrosão em cupons*. Tese (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) -Campos dos Goytacazes – RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF.

Oliveira, R. D.L. (2007) Nematofauna associada à cultura do quiabo na região leste de Minas Gerais. Hortic. Bras. [online]. vol.25, n.1, pp.88-93. ISSN 0102-0536.

Open, C. V. (2012). <http://opencv.willowgarage.com/wiki/> em 13/12/2016.

Poinar, J. R., Gaugler. R.; Kaya, Eds, H.K . (1990) G.O biology and taxonomy of Steinernematidae, and Heterorhabditidae in: entomopathogenic nematodes. biocontrol Sci. technol . 6: 477-480.

Rocha, A. R. C.; Maldonado, J. C.; Weber, K. (2001) - Qualidade de Software - São Paulo: Pretice Hall, 2001.

Rodrigues, C. V. M. A., E. M. R. Pedrosa, A. K. S. Oliveira, D. A. H. S. Leitão, And N. J. V. Oliveira. (2010). Vertical distribution of nematode communities associated with sugarcane. *Nematropica* 41:05-11.

Sales, D.D.S. (2014) Desenvolvimento de um software livre para análise de imagens com estereologia quantitativa. Tese (doutorado em engenharia e ciência dos materiais) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 187p.

Santos, E.P.D., Andrade, S.S. (2013) Visualização de Software como Suporte ao Desenvolvimento Centrado em Métricas Orientadas a Objetos. I Workshop Brasileiro de Visualização, Evolução e Manutenção de Software, Brasília – DF.

Seinhorst, J. W. (1959) A rapid method for transfer of nematodes from fixate to anhydrous glycerin. *Nematologica*, Leiden, v. 4, p. 67-69.

Silva, J. F. V.; Mazaffera, P.; Carneiro, R. G.; Asmus, G. L.; Ferraz, L. C. C. B. (2001) Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja. Londrina: Embrapa Soja, Sociedade de Nematologia, 127p.

White, G. F. (1927). A Method for Obtaining Infective Nematode Larvae from Cultures *Science*, Volume 66, Issue 1709, pp. 302-303.

Willianson, V. M.; Hussey, R. S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *The Plant Cell*, v. 8, p. 1735-1745, 1996.

Woodring, J. L., Kaya, H. K. (1998) Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: hand book of biology and techniques. South cooperative Ser. Bulletin Arkans. Agricultural Exp. Stn., Fayetteville., 331: p.88.

Wouts, W. M.; Mráček, M. Z.; Gerdin, S.; Bedding, R. A. (1982) *Neoaplectana* Steiner 1929 a junior synonym of *Steinernema* Travassos (Nematoda: Rhabditida). *Systematic Parasitology*, v. 4, p. 147-154.

Zuckerman, B.M., Jansson, H.B. (1984). Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host-prey recognition. *Ann. Rev. of Phytopathol.* 22:95-114.