



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**ETIOLOGIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE
POPULAÇÕES DE *MELOIDOGYNE* SPP. ASSOCIADAS
À CULTURA DO INHAME NO NORDESTE BRASILEIRO**

Francisco Jorge Carlos de Souza Junior

**Recife – PE
2022**

FRANCISCO JORGE CARLOS DE SOUZA JUNIOR

**ETIOLOGIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE
POPULAÇÕES DE *MELOIDOGYNE* SPP. ASSOCIADAS À
CULTURA DO INHAME NO NORDESTE BRASILEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dra. Elvira Maria Regis Pedrosa

Co-orientadores: Profa. Dra. Rosana Blawid

Profa. Dra. Lílían Margarete Paes Guimarães

**RECIFE – PE
FEVEREIRO - 2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S729e

Souza Junior, Francisco Jorge Carlos de

Etiologia e variabilidade genética de populações de *Meloidogyne* spp. associadas à cultura do inhame no Nordeste brasileiro / Francisco Jorge Carlos de Souza Junior. - 2022.
78 f. : il.

Orientadora: Elvira Maria Regis Pedrosa.

Coorientadora: Rosana Blawid; Lilian Margarete Paes Guimaraes.

Inclui referências.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2022.

1. *Dioscorea cayennensis*. 2. *D. alata*. 3. *D. trifida*. 4. Filogenia. 5. Nematóides das galhas. I. Pedrosa, Elvira Maria Regis, orient. II. Guimaraes, Rosana Blawid; Lilian Margarete Paes, coorient. III. Título

CDD 632

**ETIOLOGIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES
DE *MELOIDOGYNE* SPP. ASSOCIADAS À CULTURA DO
INHAME NO NORDESTE BRASILEIRO**

Francisco Jorge Carlos de Souza Junior

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 14/02/2022.

ORIENTADOR:

Prof. Dra. Elvira Maria Regis Pedrosa (UFRPE)

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Carmem Dolores Gonzaga Santos (UFC)

Profa. Dra. Maria de Fátima Silva Muniz (UFAL)

Profa. Dra. Andressa Cristina Zamboni Machado (IAPAR-EMATER)

Prof. Dr. Jonas Alberto Rios (UFRPE)

A Deus

Ofereço

Aos meus pais, Francisco Jorge Carlos de Souza e Tânia Moreira de Lima Souza, e aos meus avós José Moreira Sobrinho (*in memoriam*) e Isabel Celestina de Lima.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo fim de mais essa etapa, pelos sonhos que se concretizam. Porque Dele, e por meio Dele, e para Ele são todas as coisas.

A meus pais, Jorge e Tânia, meu abrigo seguro, de onde recebi apoio incondicional nessa empreitada. Os primeiros a sonhar tudo isso, agradeço por acreditarem sempre no meu potencial.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia pela realização desde curso e aos professores pelos conhecimentos transmitidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À minha orientadora Prof. Dra. Elvira Pedrosa, pela atenção, dedicada, orientação e ensinamentos. Sempre serei grato

Às minhas co-orientadoras Prof. Dra. Rosana Blawid e Prof. Dra. Lílían Guimarães com conselhos importantes, deste a condução do trabalho até a revisão, com suas sugestões e correções.

Aos meus padrinhos Randy e Francine Rice que me deram todo o apoio do mundo, me incentivando nos momentos que mais precisei.

Aos meus irmãos Janielle e Jonathan Moreira, por todos os conselhos e companheirismo nessa jornada da vida.

Aos meus dois sobrinhos Isabelly e Arthur Moreira.

Ao meu avô José Moreira (*in memorian*), que foi minha principal motivação a seguir nessa carreira, além de ser um exemplo por ter me ensinado o valor de se fazer as coisas da melhor maneira possível.

Um agradecimento especial às minhas queridas amigas Mayara, Angélica, Carol e Lilian companheiras de disciplinas de quem a distância e o tempo nunca vão me separar, pois fazem parte do meu coração!

À equipe do Laboratório de Fitonematologia que estiveram comigo durante toda a execução do trabalho, em especial a Jaime, Liany e Ari.

Aos funcionários Darcy e Romildo pela presteza e atenção.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL	vi
GENERAL ABSTRACT	vii
CAPÍTULO I	9
INTRODUÇÃO GERAL	10
1. A cultura do inhame.....	10
2. Doenças na cultura do inhame.....	12
3. O gênero <i>Meloidogyne</i>	14
Referências Bibliográficas.....	19
CAPÍTULO II	30
Filogenia e distribuição de <i>Meloidogyne</i> spp. associadas a <i>Dioscorea</i> spp. no Brasil	31
CAPÍTULO III	52
Distribuição, prevalência e agressividade dos nematoides das galhas em <i>Dioscorea</i> spp. no Nordeste do Brasil	53
CAPÍTULO IV	68
New data of <i>Meloidogyne arenaria</i> on <i>Dioscorea cayennensis</i> in Brazil	69
CONCLUSÕES GERAIS	77

RESUMO GERAL

O inhame é uma planta herbácea, trepadeira, de ciclo anual, que pertence ao gênero *Dioscorea*. No Brasil, a maior produção de inhame ocorre no Nordeste, destacando-se o estado de Pernambuco como o maior produtor e grande consumidor, mas os estudos e investimentos para essa cultura no país são incipientes. Um dos principais problemas fitossanitários encontrados pelos produtores é a ocorrência de doenças causadas por nematoides, em particular, as meloidoginoses. Contudo, ainda não existem dados no Brasil sobre a diversidade de espécies de *Meloidogyne* na cultura baseados em marcadores moleculares. Os objetivos desse trabalho foram a identificação e determinação da distribuição e prevalência de espécies de *Meloidogyne* associadas à cultura do inhame no Nordeste brasileiro, como também a avaliação da agressividade de *Meloidogyne* spp. na espécie *D. cayennensis*. As coletas das populações de nematoides presentes nas áreas produtoras de inhame foram realizadas em diferentes campos de produção da região Nordeste do Brasil. Na identificação morfológica e enzimática foram realizados cortes perineais e determinação do perfil da esterase. Para identificação molecular foram sequenciados três fragmentos do DNA ribossomal (rDNA) (região D2-D3 do 28S rRNA, ITS, e 18S rRNA) e duas regiões do mtDNA (coxI e coxII-16S). A agressividade foi avaliada em casa de vegetação utilizando 24 isolados de *Meloidogyne* oriundos dos nove estados estudados. Foram identificadas quatro espécies de nematoides das galhas *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. enterolobii* e *M. arenaria*, com prevalência de 36, 33, 18 e 13% das ocorrências associadas a três espécies de inhame *D. cayennensis*, *D. alata* e *D. trifida*, com 53, 42 e 5% dos assinalamentos, respectivamente. Isolados de *M. enterolobii* apresentaram em condições de casa de vegetação agressividade superior às demais espécies avaliadas. Este estudo faz o primeiro relato de *M. enterolobii* em *Dioscorea* spp. no Brasil e, também, o primeiro relato no Brasil da meloidoginose em *D. trifida*. Os resultados mostram que diferentes espécies de *Meloidogyne* estão presentes em todas as áreas de produção de inhame examinadas nos diferentes estados da região e exigem um manejo urgente eficaz desses nematoides.

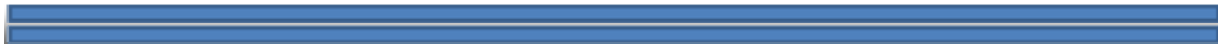
Palavras-chaves: *Dioscorea cayennensis*, *D. alata*, *D. trifida*, filogenia, nematoide das galhas.

GENERAL ABSTRACT

The yam is an herbaceous, climbing plant, with an annual cycle, which belongs to the *Dioscorea* genus. In Brazil, the largest production of yam is in the Northeast, with the state of Pernambuco standing out as the largest producer and consumer, but studies and investments for this culture in the country are incipient. One of the main phytosanitary problems faced by yam producers is the plant-parasitic nematodes, especially the root-knot nematodes. However, no data is available in Brazil on *Meloidogyne* species diversity based on molecular markers in this crop. The objectives of this work were the identification and establishment of the distribution and prevalence of *Meloidogyne* species associated with yam cultivation in Northeast Brazil, as well evaluation of *Meloidogyne* spp. aggressiveness on *D. cayennensis*. Nematodes were sampling from different yam production areas in the Northeast region of Brazil. In morphological and enzymatic characterization perineal cuts and esterase profile were carried out. For molecular identification, three ribosomal DNA (rDNA) fragments (D2-D3 region of 28S rRNA, ITS, and 18S rRNA) and two mtDNA regions (coxI and coxII-16S) were sequenced. The aggressiveness evaluation was carried out under greenhouse with 24 *Meloidogyne* isolates from the nine States screened. Four species of root-knot nematodes *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. enterolobii* and *M. arenaria* were identified, with prevalence of 36, 33, 18 e 13%, associated with three yam species: *D. cayennensis*, *D. alata* and *D. trifida*, with occurrence of 53, 42 and 5%, respectively, in the Northeast of Brazil. The isolates of *M. enterolobii* showed higher aggressiveness than the other evaluated species. This study reports for the first time in Brazil *M. enterolobii* parasitizing *Dioscorea* spp. and the presence of the root-knot nematodes in *D. trifida*. The findings show that different *Meloidogyne* species are present in all yam production areas examined in all States of Northeast Brazil and requires urgent and effective management of these nematodes.

Keywords: *Dioscorea cayennensis*, *D. alata*, *D. trifida*, phylogeny, root-knot nematode.

CAPÍTULO I



Introdução Geral

ETIOLOGIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *MELOIDOGYNE* SPP. ASSOCIADAS À CULTURA DO INHAME NO NORDESTE BRASILEIRO

INTRODUÇÃO GERAL

1. A cultura do inhame

O inhame é uma planta herbácea que pertence ao gênero *Dioscorea* e da família Dioscoreaceae, de ciclo anual formado por mais de 630 espécies identificadas (SENANAYAKE *et al.*, 2011). É o gênero com mais representante da família, com diversas espécies comestíveis, principalmente no continente africano (SANTOS *et al.*, 2006). Dentro de cada espécie há variação na forma das túberas, na cor da polpa e na adaptação ecológica (SOUZA; RESENDE, 2003). O inhame apresenta ramas, sendo uma trepadeira em sua maioria, quando encontra apoio, com produção de túberas imersas no solo (MOURA; SILVA, 2017).

A produção do inhame apresenta crescimento gradual, tanto em nível mundial como em relação ao Brasil. No ano de 2017 a área plantada mundialmente ocupou mais de 8.500 mil hectares, sendo 25.800 hectares ocupados nas regiões produtoras do Brasil, representando quase 0,35% da produção mundial de inhame (FAO, 2019). De origem africana (*D. cayennensis* e *D. rotundata*), o inhame no Brasil é relatado desde o período de colonização portuguesa, pelo trânsito de mercadorias entre a costa africana a caminho da Índia. A espécie *D. cayennensis* é popularmente chamada por “da Costa”, uma referência a uma alusão a localização da costa africana, principal centro de dispersão da cultura (MESQUITA, 2002).

No Brasil, as principais espécies cultivadas são a *D. alata* de origem Asiática, conhecido popularmente como inhame São-Tomé e *D. cayennensis-rotundata* com centro de origem Africana, chamado de Cará da Costa (MESQUITA, 2002). O Brasil é o segundo maior produtor de inhame da América do Sul, com produção de aproximadamente de 250.400 toneladas em 2018 (FAO, 2019). No Brasil as principais espécies cultivadas são do complexo *D. cayennensis* subsp. *rotundata* Poir., *D. alata* L.,

D. trifida L. e *D. esculenta* (Lour.) Burk., usadas na alimentação humana devido ao alto valor nutritivos (LEBOT, 2009).

A região Nordeste é a maior produtora de inhame no Brasil, destacando os estados da Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Sergipe e Maranhão (BRITO *et al.*, 2011). A região do Nordeste apresenta potencial para expansão da cultura, pois apresenta condições edafoclimáticas favoráveis ao cultivo do inhame, além da demanda do mercado interno deste tubérculo (SANTOS, 2002). No Nordeste, o estado de Pernambuco é o maior produtor e consumidor de inhame, destacando os municípios de Bonito, Cupira, Barra de Guabiraba, Amaraji, Goiana, Conde e São Joaquim do Monte (IBGE, 2015). Essa cultura é uma das principais fontes de renda e emprego, influenciando diretamente a agricultura familiar, pois contribui no desenvolvimento rural, sendo considerada uma alternativa sustentável economicamente para os produtores (CARMO, 2002; MESQUISTA, 2002).

O inhame é uma planta de ciclo de cultura anual, com quatro estádios fenológicos, sendo capaz de produzir dois tipos de túberas, de acordo com a época de colheita, que pode ser realizada aos sete meses após o plantio, ou aos nove meses, quando o inhame completa seu ciclo de fisiológico (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

O ciclo da cultura do inhame é dividido inicialmente no estágio de dormência fisiológica, que é o período desde o plantio das túberas até a brotação, variando de 20 a 80 dias. Posteriormente, inicia-se o estágio vegetativo, que é o período da brotação até o início do florescimento, com duração aproximada de 80 a 180 dias. Segue-se o estágio reprodutivo, que é o período desde o início da floração até secagem das flores, dos 180 a 210 dias do plantio. O último estágio é o fisiológico de maturação, que ocorre no momento final da floração até a colheita, período compreendido dentro do intervalo de 180 a 270 dias após o plantio (GOMES *et al.*, 2021).

A propagação do inhame é realizada de forma vegetativa, em que as túberas-semente são cortadas em pedaços com peso de 200g, plantadas com espaçamento de 1,20 x 0,40 m entre plantas, com profundidade de 0,50 m (SILVA *et al.*, 2012).

A cultura do inhame apresenta alto rendimento em condições ideais, quando cultivada em regiões com alta precipitação pluviométrica, faixa de temperaturas entre 24 e 30 °C e umidade relativa do ar de 60 a 90%. O cultivo é recomendado em solos com textura arenosa a argilosa-média, com boa profundidade, boa drenagem, ricos em matéria orgânica e com faixa de pH de 5,5 a 6,5 (SILVA *et al.*, 2007).

A ocorrência de doenças na cultura é um dos principais fatores que interferem na qualidade das túberas, destacando os fitonematoides, que são vermes microscópicos, parasitas obrigatórios de plantas, principalmente os órgãos subterrâneos (AGRIOS, 2005).

2. Doenças na cultura do inhame

Os produtores de inhame enfrentam uma série de dificuldades geradas pela falta de informações técnicas sobre o manejo da cultura, face à escassez de pesquisas em problemas fitossanitários (SIQUEIRA, 2011).

As principais doenças fúngicas na cultura do inhame são ocasionadas por *Curvularia eragrostidis* (P. Henn) Mayer e *Colletotrichum* spp., sendo a queima das folhas (*C. eragrostidis*) considerada a principal doença foliar associada à cultura, com sintomas iniciais na forma de pequenas manchas necróticas foliares que evoluem até atingir grande parte ou toda a folhagem (MENEZES, 2002). A podridão verde, causada por *Penicillium sclerotigenum* Yamamoto, foi relatada no Brasil por Moura *et al.* (1976) em túberas de *Dioscorea* spp., e é a principal doença pós-colheita na cultura. Na literatura há relatos de outros gêneros fúngicos associados ao inhame como *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Rhizopus* sp., *Lasiodiplodia theobromae* Pat., *Muccor circinelloides* Tiegh., *Sclerotium rolfsii* Sacc. (AMUSA *et al.*, 2003).

O inhame pode ser infectado por diversas espécies de vírus, dentre elas, viroses dos gêneros Badnavirus e Potyvirus, considerados os mais importantes, em razão da associação da alta incidência e potencial para provocar prejuízos na produção, com destaque para a ocorrência das espécies *Yam mosaic virus* (YMV) e *Yam mild mosaic virus* (YMMV) (COSTA *et al.*, 2017).

Os nematoides são particularmente importantes porque além de afetarem a planta durante seu desenvolvimento, associam-se a bactérias e fungos dando continuidade aos danos à cultura, mesmo após a colheita (SIQUEIRA, 2011). A presença de fitonematoides reduz a produtividade do inhame, destacando-se *Meloidogyne* spp., *Scutellonema bradys* (Steiner & LeHew) Andrassy e *Pratylenchus* spp. (TESSON, 2004).

Pratylenchus brachyurus (Godfrey) Filipjev & Schuurmans Stekhoven e *P. coffeae* (Zimmermann) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, causadores da casca-preta, principal doença do inhame, atacam túberas-comerciais e túberas-semente de *Dioscorea*

spp. Distribuídos nas diversas áreas produtoras, esses fitopatógenos reduzem significativamente a produtividade da cultura (ANDRADE, 2010; MOURA, 2016).

O gênero *Pratylenchus*, também conhecido como nematoide das lesões radiculares, possui cerca de 104 espécies, ampla gama de hospedeiros e está distribuído geograficamente em áreas de clima tropical e subtropical (ARAYA et al., 2016). Os danos nas túberas acontecem na epiderme, inicialmente, com sintomas discretos abaixo da cutícula com pequenos pontos de coloração amarela ou parda. Com a evolução da doença, os tecidos tornam-se marrons a negros com rachaduras e, em ataques severos, pode ocorrer a total deterioração durante o armazenamento (MOURA, 2006).

A ocorrência de *Pratylenchus* spp. em inhame representa o principal problema fitossanitário devido à permanente disseminação destes nematoides, ocasionada pela comercialização e plantios sucessivos de túberas-sementes contaminadas; pouca resistência das túberas infectadas ao transporte e armazenamento; predisposição das túberas parasitadas às infecções por outros patógenos; dificuldades de controle; e por inviabilizar a comercialização (MOURA, 2006). Além disto, durante o armazenamento, as túberas infectadas perdem peso e organismos secundários podem invadir as lesões provocadas pelo nematoide, causando podridões (BAIMEY et al., 2009).

A doença meloidoginose do inhame é ocasionada por fitonematoides do gênero *Meloidogyne* (Figura 1). Na África Ocidental, especialmente na Nigéria, *Meloidogyne incognita* (Kofoed & White) Chitwood, e *M. javanica* (Treub) Chitwood são comumente relatados a tubérculos de inhame (ONKENDI et al., 2014). Em levantamento realizado por Kolombia et al. (2017), em diferentes áreas de cultivo de *Dioscorea* spp. na Nigéria, foram identificadas as espécies *M. incognita*, *M. javanica*, *M. enterolobii* Yang & Eisenback e *M. arenaria* (Neal) Chitwood.

Figura 1. Sintomas típicos de meloidoginose em túberas de inhame (*Dioscorea* spp.)



Duas espécies desse gênero incidem com maior frequência sobre o inhame no Nordeste do Brasil: *M. incognita* e *M. arenaria*, apresentando alta incidência e severidade nas áreas de produção, ocasionando, em muitos casos, elevados prejuízos à produção e à comercialização. A espécie *M. incognita* é a mais encontrada, provoca danos ao sistema radicular, formação de inúmeras galhas (partes hipertrofiadas), dentro das quais vive como parasita sedentário, formando células gigantes que chegam a cobrir toda a extensão das túberas (MOURA; FREITAS, 1983).

3. O gênero *Meloidogyne*

Os nematoides do gênero *Meloidogyne*, também conhecidos como nematoides das galhas (NG), são os mais economicamente importantes em diferentes culturas, devido à ampla distribuição mundial, resultando em efeitos sobre a qualidade e rendimento das culturas, causando importantes impactos financeiros (MOENS; PERRY; STARR, 2009).

Os nematoides das galhas são parasitas obrigatórios, que se nutrem somente a partir de células vegetais vivas. Embora possam se alimentar de órgãos subterrâneos de plantas, raízes, rizomas, tubérculos e bulbos constituem as principais fontes de alimento. O processo de alimentação reduz a absorção de água e nutrientes pela planta, desfavorecendo a tolerância a outros tipos de estresse, tais como seca (WILLIAMSON; HUSSEY, 1996). O gênero apresenta dominância em regiões de clima temperado e tropicais quentes (MOENS; PERRY; STARR, 2009).

Os nematoides das galhas tiveram seu primeiro relato em 1855, por Berkeley, em raízes de pepino, na Inglaterra (MOURA, 1996). No Brasil, foi relatado apenas em 1878, por C. Jobert. Porém, somente em 1887, Emílio Goeldi atribuiu ao gênero *Meloidogyne* o nematoide associado a raízes de cafeeiro, com sintomas típicos de galhas (FERRAZ; MONTEIRO, 1995).

Os nematoides das galhas pertencem ao Reino Animal, Divisão Bilaterata, Filo Nematoda, Classe Chromadorea, Subclasse Chromadoria, Ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Infraordem Tylenchomorpha, Superfamília Tylenchoidea, Família Meloidogynidae, Subfamília Meloidogyninae, Gênero *Meloidogyne* (FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

Meloidogyne spp. apresentam dimorfismo sexual, as fêmeas se diferenciam dos machos pelo formato aberrante em forma de pera, com mobilidade apenas na região anterior do corpo para alimentação, além da produção média 400 a 500 ovos em uma única matriz gelatinosa, chamada de massa de ovos. Os machos são vermiformes e geralmente não são presentes nas raízes, mas ainda não há explicação clara do seu mecanismo de alimentação (MOENS; PERRY; STARR, 2009).

Em condições ambientais favoráveis ao nematoide, é observado que o número de indivíduos machos em populações partenogenéticas obrigatórias de *Meloidogyne* geralmente é baixo. Porém em condições de estresse, há o fenômeno oposto, com elevada quantidade de machos. Este mecanismo é fundamental para garantir a sobrevivência das fêmeas já estabelecidas nas plantas hospedeiras (FREITAS *et al.*, 2006; FERRAZ; BROWN, 2016). O parasitismo ocasionado por *Meloidogyne* spp. no sistema radicular afeta a fisiologia da planta, principalmente devido ao desvio de nutrientes durante o processo de alimentação do nematoide, além da diminuição da absorção e translocação de água pelas raízes (HUSSEY; WILLIAMSON, 1998).

O gênero *Meloidogyne* contém mais de 100 espécies descritas e cada uma dessas espécies geralmente possui ampla gama de hospedeiros, parasitando aproximadamente 3000 espécimes de plantas (TRUDGILL; BLOK, 2001). Além da diversidade em relação à gama de hospedeiros, há variação na citogenética e no modo de reprodução do nematoide (PERRY; MOENS; STARR, 2009).

A caracterização morfológica ainda é bastante utilizada na classificação e taxonomia em *Meloidogyne* spp. (EISENBACK; HUNT, 2009). A identificação de espécies dos nematoides das galhas apresenta diversas dificuldades, devido à morfologia conservada, morfometria bastante variável, reação ao hospedeiro, variações intraespecíficas, meio de reprodução partenogenética, além da presença de espécies crípticas. Consequentemente, é fundamental o conhecimento da variabilidade dos dados morfológicos e morfométricos em determinadas espécies em diferentes condições edafoclimáticas (HUNT; HANDOO, 2009).

Durante muitos anos, a identificação de espécies de *Meloidogyne* foi realizada principalmente com base nos caracteres morfológicos, por meio de características das fêmeas, machos e juvenis de segundo estágio (EISENBACK; TRIANTAPHYLLOU, 1991), porém tais características apresentam alta variabilidade fenotípica (HUNT; HANDOO, 2009). A identificação ao nível específico, baseada apenas em caracteres morfológicos, além de ser demorada, é pouco precisa (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001) e

dificultada pelo surgimento de populações com configurações atípicas. Posteriormente, fenótipos de isoenzimas foram utilizados para a identificação de muitas espécies de *Meloidogyne* (CARNEIRO; ALMEIDA; QUENEHERVE, 2000), sendo considerados de custo baixo e de ótimos resultados. A premissa básica adotada ao utilizar dados isoenzimáticos é que diferenças na mobilidade de isoenzimas em um campo elétrico são resultantes de diferenças nas sequências de DNA, as quais codificam tais enzimas.

Além da utilização de marcadores isoenzimáticos como os perfis de esterase (EST) e malato desidrogenase (MDH) de fêmeas de *Meloidogyne* por eletroforese em gel de poliacrilamida (CARNEIRO *et al.*, 2000; ESBENSHADE; TRIANTAPHYLLOU, 1991), marcadores moleculares também vêm sendo utilizados na identificação de várias espécies de *Meloidogyne* (BLOK; POWERS, 2009).

O polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) foi uma das primeiras técnicas utilizadas na diagnose molecular de espécies de *Meloidogyne* (CURRAN *et al.*, 1985). Posteriormente, com o surgimento da técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Reação em cadeia da Polimerase), novos métodos de diagnose para o gênero *Meloidogyne* foram desenvolvidos, utilizando primers específicos. Logo, primers para o diagnóstico de diferentes espécies de *Meloidogyne* foram desenvolvidos baseados em regiões conservadas do DNAr (PERRY *et al.*, 2007).

Mais recentemente, as análises filogenéticas começaram a ser realizadas utilizando sequências de DNAr (DNA ribossômico), a pequena subunidade ribossomal (SSU ou 18S) (DE LEY *et al.*, 2002), e a grande subunidade ribossomal (LSU ou 28S) (CASTILLO *et al.*, 2003), e sequências de DNA mitocondrial (DNAm) (TIGANO *et al.*, 2005).

O DNA ribossômico nuclear é atualmente o marcador molecular mais empregado extensivamente na sistemática molecular do gênero *Meloidogyne*. As variações encontradas no DNAr, ou seja, as taxas de mutação observadas entre diferentes genes e espaçadores entre unidade de transcrição resultam em regiões que são úteis nos estudos taxonômicos em *Meloidogyne* (HILLIS; DIXON, 1991). Isso inclui as regiões conservadas e variável das subunidades 18S e 28S, e a região ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Estas três regiões do DNAr são os marcadores moleculares mais comumente empregados nos estudos filogenéticos em *Meloidogyne* spp. (LANDA *et al.*, 2008).

O DNA mitocondrial (DNAm), apesar da aparente baixa diversidade genética entre populações de *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. incognita* (HUGALL *et al.*, 1997; STANTON *et al.*, 1997), possui sequências abrangendo o COI (citocromo c oxidase

subunidade I), que é bastante utilizado na diagnose molecular de espécies de *Meloidogyne* (BLOK *et al.*, 2002; BRITO *et al.*, 2004). O genoma mitocondrial da maioria do nematoides inclui 12 genes codificadores de proteínas, todos componentes da fosforilação oxidativa, o sistema incluindo subunidades do citocromo *c* oxidase (COI-COIII); os 22 RNAs de transferência (RNAt) e dois RNAs ribossomais (RNAr), sendo uma importante fonte de informação genética extra-nuclear (PERRY *et al.*, 2007).

Além disso, há geralmente um região não-codificadora rica em AT, ou uma região com elevados níveis dos nucleotídeos adenina e timina contendo sítio de iniciação para replicação e transcrição. O arranjo de genes no genoma mitocondrial não é único dentro do filo Nematoda. Os nematoides são caracterizados por uma surpreendente variação na ordem dos genes no genoma mitocondrial (PERRY *et al.*, 2007).

A principal função da mitocôndria é liberação de energia gradualmente das moléculas de ácidos graxos e glicose, para produção de calor e moléculas de ATP, mas também participam de atividades ligadas à replicação e transcrição do DNAm (ALBERTS *et al.*, 2004). O sequenciamento de DNAm fornece dados que podem ser empregados nos diversos estudos evolutivos e filogenéticos, por meio de análise comparativa da informação do DNA mitocondrial do nematoide para resolver relações em diferentes níveis de divergência (SULTANA *et al.*, 2013).

O primeiro método de sequenciamento, chamado de método de Sanger (SANGER *et al.*, 1977), foi desenvolvido em 1977, e é utilizado até os dias de hoje (CARRILLO-FASIO *et al.*, 2021; YE *et al.*, 2021). Porém, com o advento do sequenciamento genômico em 2000, as plataformas de sequenciamento, também conhecidas como NGS (*Next-Generation Sequencing*, Sequenciamento de última geração), têm sido bastante utilizadas, devido à capacidade de produzir um elevado volume de pares de bases, sequenciando vários genomas ao mesmo tempo, levando à otimização do tempo por corrida (CARVALHO; SILVA, 2010). É esperado que haja uma tendência nos próximos anos da migração da técnica de padrão, sequenciamento Sanger, para a de NGS (LIU *et al.*, 2012; PHAN *et al.*, 2021).

Apesar dos aspectos negativos do impacto de fitonematoides na cultura do inhame, a identificação de espécies de *Meloidogyne* é realizada por meio de características morfológicas baseadas na configuração perineal de fêmeas e na caracterização bioquímica de perfil de esterase, porém não há trabalhos identificando isolados de *Meloidogyne* na cultura do inhame por meio da taxonomia integrativa com a implementação de marcadores moleculares. Desta forma, permanece a necessidade de

estudos utilizando marcadores moleculares de alta informatividade filogenética para a identificação das espécies de *Meloidogyne* associadas à cultura do inhame na região Nordeste Brasileira, onde nenhum estudo foi desenvolvido para investigação da etiologia dessa doença, uma vez que as estratégias de manejo podem diferir conforme a espécie prevalente, bem como a diversidade destes isolados.

Diante disso, os objetivos desse estudo foram analisar a etiologia e a diversidade genética de populações de *Meloidogyne* na cultura do inhame da região Nordeste do Brasil, gerando informações que possam auxiliar no estabelecimento de um sistema de manejo eficiente do inhame para a doença. Além disso, avaliar a distribuição, agressividade e prevalência de *Meloidogyne* spp. na cultura do inhame na região Nordeste do Brasil e a agressividade de *Meloidogyne* spp. na cultura do inhame (*D. cayennensis*) em condições de casa de vegetação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, P.; GOUZ, Y.J.; AURY, J.; CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E.G.J.; DELEURY, E.; PERFUS-BARBEOCH, L.; ANTHOUARD, V.; ARTIGUENAVE, F.; BLOK, V.C. WINCKER, P. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature biotechnology**, New York, v. 26, n. 8, p. 909, 2008.

AGRIOS, G. **Plant Pathology**. 5th Edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2005. 922p.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**, 4ª edição, Porto Alegre, Artmed, 2004.

ARAYA, T.Z.; PADILLA, W.P.; ARCHIDONA-YUSTE, A.; CANTALAPIEDRA-NAVARRETE, C.; LIÉBANAS, G.; PALOMARES-RIUS, J.; CASTILLO, P. Root-lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae) from Costa Rica with molecular identification of *P. gutierrezi* and *P. panamaensis* topotypes. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 145, p. 973–998, 2016.

ANDRADE, D. E. G. T.; ASSIS, T. C.; SILVA JÚNIOR, W. J.; SILVA, E. J.; SILVA, E. J. Manejo alternativo da casca-preta e da queima das folhas do inhame. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 7, p. 209-223, 2010.

AMUSA, N. A.; ADEGBITE, A. A.; MUHAMMED, S.; BAIYEWU, R. A. Yam diseases and its management in Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 2, n. 12, p. 497-502, 2003.

BAIMEY, H.; COYNE, D.; LABUSCHAGNE, N. Pathogenicity of *Scutellonema bradys* populations from different geographical areas in Benin on yam (*Dioscorea* spp.). **Crop Protection**, Guildford, v. 28, n. 9, p. 715-721, 2009.

BANKEVICH, A., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, New York, v. 10, p. 455-477. 2012.

BLANC-MATHIEU, R. Hybridization and polyploidy enable genomic plasticity without sex in the most devastating plant-parasitic nematodes. **PLoS genetics**, San Francisco, USA, v. 13, n. 6, p. e1006777, 2017.

BLOK, V. C.; POWERS, T. O. Biochemical and molecular identification. n PERRY, R.N.; MOENS, M.; STARR, J.L. **Root-knot nematodes**, Wallingford, UK: CAB International. 2009, p. 99-118.

BLOK, V. C.; WISHART, J.; FARGETTE, M.; BERTHIER, K.; PHILLIPS, M. S. Mitochondrial DNA differences distinguishing *Meloidogyne mayaguensis* from the major species of tropical root-knot nematodes. **Nematology**, London, v. 4, p. 773-781, 2002.

BOLGER, ANTHONY M.; LOHSE, MARC; USADEL, BJOERN. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, London, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

BRITO, J.A.; POWERS, T.O.; MULLIN, P.G.; INSERRA, R.N.; DICKSON, D.W. Morphological and molecular characterization of *Meloidogyne mayaguensis* from Florida. **Journal of Nematology**, Hanover, n.3, v. 36, p. 232-240, 2004.

BRITO, T. T. de; SOARES, L. S.; FURTADO, M. C.; CASTRO, A. A.; CARNELOSSI, M. A. G. Composição centesimal de inhame (*Dioscorea* sp.) in natura e minimamente processado. **Scientia Plena**, Aracaju, v. 7, n. 6, p. 1-7, 2011.

BURKE, M.; BURKE, M.; SCHOLL, E.H.; BIRD, D.M.; SCHAFF, J.E.; COLMAN, S.D.; CROWELL, R.; WINDHAM, E. The plant parasite *Pratylenchus coffeae* carries a minimal nematode genome. **Nematology**, London, UK, v. 17, n. 6, p. 621-637, 2015.

CARMO, C. A. S. **Inhame e taro: sistemas de produção familiar**. Vitória, ES: Incaper, 2002. 289p.

CARNEIRO, R.M.D.; ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 35-44, 2001.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; QUENEHERVE, P. Enzyme phenotype of *Meloidogyne* spp. populations. **Nematology**, London, v. 2, n.6, p:645-654, 2000.

CARRILLO-FASIO, J. A.; ANGÚLO-CASTRO, A.; MARTÍNEZ-GALLARDO, J. Á.; AYALA-TAFOYA, F.; YÁÑEZ-JUÁREZ, M. G.; RETES-MANJARREZ, J. E. Distribution and incidence of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) on pepper in Sinaloa, Mexico. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 46, n. 2, p. 195-200, 2021.

CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes?. **Euphytica**, Wageningen, v. 124, n. 2, p. 193-199, 2002.

CASTILLO, P.; VOVLAS, N.; SUBBOTIN, S.; TROCCOLI, A. A new root-knot nematode, *Meloidogyne baetica* n. sp. (Nematoda:Heteroderidae), parasitizing wild olive in Southern Spain. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n.9, p. 1093-1102, 2003.

COTTON, J.A. LILLEY, C. J.; JONES, L. M.; KIKUCHI, T.; REID, A. J.; THORPE, P.; EVES-VAN DEN AKKER, S. The genome and life-stage specific transcriptomes of *Globodera pallida* elucidate key aspects of plant parasitism by a cyst nematode. **Genome biology**, London, v. 15, n. 3, p. R43, 2014.

COSTA, D. P. et al. Detecção molecular de viroses em inhame cultivado no Recôncavo da Bahia. **MAGISTRA**, Cruz das Almas, v. 28, n. 1, p. 63-73, 2017.

CURRAN, J.; BAILLIE, D.L.; WEBSTER, J.M. Use of restriction fragment length differences in genomic DNA to identify nematode species. **Parasitology**, Cambridge, USA, v. 90, p. 137–144, 1985.

DE LEY, I.T.; VIERSTRAETE, A.; KARSSSEN, G.; MOENS, M.; VANFLETEREN, J. Phylogenetic analyses of *Meloidogyne* small subunit rDNA. **Journal of Nematology**, Hanover, v.34, n.4, p.319-327, 2002.

EISENBACK, J.D.; HUNT, D.J. **General morphology**. In: Perry, R.N.; Moens, N.; Starr, J.L. (Eds). Root-knot Nematodes. CABI North America Office, Cambridge, MA, USA, p. 18-54. 2009.

EISENBACK, J.D.; TRIANTAPHYLLOU, H.H. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In: NICKLE, W.R. **Manual of agricultural nematology**. New York: Marcel Dekker, 1991. p.191-274.

EVES-VAN DEN AKKER, S.; LAETSCH, D.R.; THORPE, P., LILLEY, C.J., DANCHIN, E.G.; DA ROCHA, M.; GRENIER, E. The genome of the yellow potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, reveals insights into the basis of parasitism and virulence. **Genome biology**, London, UK, v. 17, n. 1, p. 124, 2016.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE **UNITED NATIONS/DATABASE, CROP PRIMAR**. Roma. Disponível em:<<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em 16 dez. 2021.

FERRAZ, L.C.C.B.; MONTEIRO, A.R. Nematoides. In: BERGAMIM FILHO, A., KIMATI, H; AMORIM, L. (eds.). **Manual de Fitopatologia**, v.1. 3a ed. Princípios e conceitos. Editora Agronômica, Ceres. Piracicaba, 1995, p.168-201.

FERRAZ, L.C.C.B.; MONTEIRO, A.R. Nematoides. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Eds.). **Manual de**

Fitopatologia. v. 1. Princípios e conceitos. 4a ed. Ceres. Piracicaba-SP. 2011, p. 277-305.

FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L., FERRAZ, S. **Introdução à Nematologia**. 3ª edição. Ed. UFV. Viçosa – MG, 2006

FERRAZ, L.C.C.B.; BROWN, D.J.F. **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. Norma Editora. Manaus, Brasil. 251p. 2016.

GOMES, F. G.; SOARES, G. T.; BRANDÃO, L. **A cultura do inhame**. EMATER-RO. Porto Velho, Brasil. 40p. 2021.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly review of biology**, Chicago, v. 66, n. 4, p. 411-453, 1991.

HUGALL, A.; STANTON, J.; MORITZ, C. Reticulate evolution and the origins of ribosomal internal transcribed spacer diversity in apomictic *Meloidogyne*. **Molecular and Biological Evolution**, Oxford, UK, v.16, p.157-164, 1999.

HUNT D.J.; HANDOO, Z.A. Taxonomy, identification and principal species. In PERRY, R.N.; MOENS, M.; STARR, J.L. **Root-knot nematodes**, Wallingford, UK: CAB International. 2009, p.55-88.

HUSSEY, R. S.; WILLIAMSON, V. M. **Physiological and molecular aspects of nematode parasitism**. In: BARHER, K.R.; PEDERSON, G.A.; WINDHAM, G.L. (Eds). Plant and Nematode Interactions. 1. Ed. v. 36, ASA, Madison, p. 87-108. 1998.

IBGE. **Base de dados**. Disponível em:<<http://www.ibge.org.br>>. Acesso em 16 dez. 2021.

INOUE-NAGATA, A.K., ALBUQUERQUE, L.C., ROCHA, W.B., NAGATA, T. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.116, p.209-211, 2004.

KATOH, K.; TOH, H. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 30, p. 772-780, 2013.

KIKUCHI, T.; Cotton, J.A.; Dalzell, J.J.; Hasegawa, K.; Kanzaki, N.; McVeigh, P.; Otto, T.D. Genomic insights into the origin of parasitism in the emerging plant pathogen *Bursaphelenchus xylophilus*. **PLoS pathogens**, San Francisco, USA, v. 7, n. 9, p. e1002219, 2011.

KOLOMBIA, Y. A. *et al.* Diversity of root-knot nematodes associated with tubers of yam (*Dioscorea* spp.) established using isozyme analysis and mitochondrial DNA-based identification. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 49, n. 2, p. 177, 2017.

LANDA, B.B.; PALOMARES RIUS, J.E.; VOVLAS, N.; CARNEIRO, R.M.D.G.; MALEITA, C.M.N.; ABRANTES, I.M. DE O. Molecular characterization of *Meloidogyne hispanica* (Nematoda, Meloidogynidae) by phylogenetic analysis of genes within the rDNA in *Meloidogyne* spp. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, p. 1104-1110, 2008.

LEBOT V. **Tropical root and tuber crops Cassava, sweet potato, yams and aroids**. CABI, Cambridge, USA. 2009 413p.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 26, n. 5, p. 589-595, 2010.

LIU, L.; LI, Y.; LI, S.; HE, Y.; PONG, R.; LIN, D.; LU, L.; LAW, L. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, New York, p.11, 2012.

LUNT, D.H.; KUMAR, S.; KOUTSOVOULOS, G.; BLAXTER, M.L. The complex hybrid origins of the root knot nematodes revealed through comparative genomics.

PeerJ, San Diego, v. 2, p. e356, 2014.

MENEZES, M. Condições epidemiológicas de doenças fúngicas na cultura do inhame. In: SANTOS, E.S. (Coord.) Simpósio Nacional sobre as culturas do Inhame e do Taro. Simpósio Nacional sobre as culturas do Inhame e do Taro. João Pessoa, v.2, p.50-67, 2002.

MESQUITA, A. S. Inhame e taro: cenários dos mercados internacional, brasileiro e baiano. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 5, n. 2, p. 54-64, 2002.

MIKHEENKO, Alla; SABELIEV, Vladislav; GUREVICH, Alexey. MetaQUAST: evaluation of metagenome assemblies. **Bioinformatics**, London, v. 32, n. 7, p. 1088-1090, 2015.

MOENS, M., PERRY, R.N.; STARR, J.L. *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: PERRY, R.N., MOENS, M.; STARR, J.L. (eds). **Root-knot nematodes**. CABI: Cambridge, USA. 2009, p. 1-17.

MOURA, R. M.; FEITAS, O. M. B. L. Observações sintomatológicas sobre a meloidoginose do inhame (*Dioscorea cayennensis*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.8, n.2, p. 243-249, 1983.

MOURA, R.M., RIBEIRO, G.P. COELHO, R.S.B.; SILVA JÚNIOR, J.N. *Penicillium sclerotigenum* Yamamoto, principal fungo causador de podridão em túbras de inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.), no estado de Pernambuco (Brasil). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.1, p. 67-78, 1976.

MOURA, R. M. Doenças do inhame–da–costa. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, L. E. A. (ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. v. 2. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. p. 477-483.

MOURA, R.M. Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Brasília, DF, v. 4, p. 209-245, 1996.

MOURA, H. N. A.; SILVA, D. C. Avaliação do planejamento experimental no processo de secagem do inhame (*Discorea* spp.). **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, Itapetininga, v. 4, n. 6, 2017.

OLIVEIRA, I. S.; MOURA, R. M.; MAIA, L. C. Considerações sobre a cultura do inhame da costa e podridão-verde, principal causa de perdas durante o armazenamento. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 2, p. 90-106, 2005.

ORION, D.; KRITZMAN, G. 1991. Antimicrobial activity of *Meloidogyne javanica* gelatinous matrix. **Revue de Nématologie**, Bondy, v. 14, n. 4, p. 481-483.

OPPERMAN, C.H. et al. Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: A compact nematode genome for plant parasitism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 105, n. 39, p. 14802-14807, 2008.

ONKENDI, E. M.; KARIUKI, G. M.; MARAIS, M.; MOLELEKI, L. N. The threat of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Africa: A review. **Plant Pathology**, Oxford, v. 63, p. 727–737. 2014.

PHAN, N. T.; BESNARD, G.; OUAZAHROU, R.; SÁNCHEZ, W. S.; GIL, L.; MANZI, S.; BELLAFFIORE, S. Genome sequence of the coffee root-knot nematode *Meloidogyne exigua*. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 53, e2021-65, 2021.

PERRY, R.N., SUBBOTIN, S.A.; MOENS, M. Molecular diagnostics of plant-parasitic nematodes. In: PUNJA, Z., DE BOER, S.H.; SANFAÇON, H. (eds). **Biotechnology and Plant Disease Management**. CABI, Wallingford, UK. p.195-226, 2007.

PHILLIPS, W.S.; PHILLIPS, W.S.; HOWE, D.K.; BROWN, A.M.; EVES-VAN DEN AKKER, S.; DETTWYLER, L.; PEETZ, A.B.; ZASADA, I. A. The draft genome of *Globodera ellingtonae*. **Journal of nematology**, Hanover, USA, v. 49, n. 2, p. 127, 2017.

POWERS, T.O.; HARRIS, T.S. A Polymerase Chain Reaction method for identification of five mayor *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 25, p. 1-6, 1993.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, Washington, USA, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, E. S. DOS; CAZÉ FILHO, J.; LACERDA, J. T. DE; CARVALHO, R. A.; FONTINÉLLI, I. S. C.; SILVA, J. B. DA; BARBOSA, M. M.; CASSIMIRO, C. M. **Inhame e preservação ambiental**. João Pessoa, PB: Embrapa, Emepa, 2006. 6p.

SANTOS, E. S. **Inhame (*Dioscorea* spp.): aspectos básicos da cultura**. João Pessoa, PB: EMEPA-PB, SEBRAE, 1996, 158 p.

SANTOS, E. S. Manejo sustentável da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2., 2002, João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa: EMEPA-PB, 2002. v. 1, p. 181-195.

SANTOS, E. S.; CASÉ FILHO, J.; LACERDA, J. T.; CARVALHO, R. A. Inhame (*Dioscorea* sp.) tecnologia de produção e preservação ambiental. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 1, p. 31-36, 2007.

SENANAYAKE, S.A.; RANAWEERA, K.K.D.S.; BAMUNUARACHCHI, A.I; GUNARATNE, A. Proximate analysis and phytochemical and mineral constituents in four cultivars of yams and tuber crops in Sri Lanka. **Tropical Agricultural Research and Extension**, Matara, v.15, n. 1, p. 32-36, 2011.

SILVA, O. S.; CARVALHO, P. C. L.; MOREIRA, R. F. C.; CARNEIRO, J. L. D. S. **Orientações técnicas para o cultivo do inhame**. Cruz das Almas, BA: Embrapa, 2012, 40p.

SIQUEIRA, M. V. B. M. Yam: a neglected and underutilized crop in Brazil. **Horticultura Brasileira**, Recife, v. 29, n. 1, p. 16-20, 2011.

SOMVANSI, V.S.; TATHODE, M.; SHUKLA, R.N.; RAO, U. Nematode Genome Announcement: A Draft Genome for Rice Root-Knot Nematode, *Meloidogyne graminicola*. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 50, n. 2, p. 111-116, 2018.

SOUZA, J. L.; RESENDE, P. **Manual de horticultura orgânica**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2003. 564p.

STANTON, J.; HUGALL, A; MORITZ, C. Nucleotide polymorphisms and an improved PCR-based mtDNA diagnostic for parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). **Fundamental Applied Nematology**, London, v. 20, p. 261-268, 1997.

SZITENBERG, A. SALAZAR-JARAMILLO, L.; BLOK, V. C.; LAETSCH, D. R.; JOSEPH, S.; WILLIAMSON, V. M.; LUNT, D. H. Comparative genomics of apomictic root-knot nematodes: hybridization, ploidy, and dynamic genome change. **Genome biology and evolution**, Oxford, v. 9, n. 10, p. 2844-2861, 2017.

TAYLOR, A.L.; NETSCHER, C. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Nematologica**, Leiden, v. 20, p. 268-269, 1974.

TESSON, R. **La culture des tubercules dans la mata atlantica: analyse des stratégies de production de l'igname au nord-Est du Brésil**. France: CNEARC/CIRAD, 2004. 132p

TIGANO, M.S.; CARNEIRO, R.M.D.G.; JEYAPRAKASH, A.; DICKSON, D.W.; ADAMS, B. Phylogeny of *Meloidogyne* spp. based on 18S rDNA and the intergenic region of mitochondrial DNA sequence. **Nematology**, London, UK, v. 7, p. 851-862, 2005.

TRUDGILL, D.L.; BLOK, V.C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.39, p.53-77, 2001.

WILLIAMSON, V.M.; HUSSEY, R.S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **Plant Cell**, London, , v. 8, p. 1735-1745, 1996.

YE, W.; KOENNING, S. R.; ZENG, Y.; ZHUO, K.; LIAO, J. Molecular Characterization of an Emerging Root-Knot Nematode *Meloidogyne enterolobii* in North Carolina, USA. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 105, n. 4, p. 819-831, 2021.

ZHENG, J.; PENG, D.; CHEN, L.; LIU, H.; CHEN, F., XU, M., SUN, M. The *Ditylenchus destructor* genome provides new insights into the evolution of plant parasitic nematodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 283, n. 1835, p. 20160942, 2016.

CAPÍTULO II

FILOGENIA E DISTRIBUIÇÃO DE *MELOIDOGYNE* SPP. ASSOCIADAS A *DIOSCOREA* SPP. NO BRASIL

Publicação: **Plant Pathology**
Oxford, Inglaterra
Artigo
JCR = 2,590 / Qualis = A1

Filogenia e distribuição de *Meloidogyne* spp. associadas a *Dioscorea* spp. no Brasil

Francisco Jorge Carlos de Souza Junior¹, Elvira Maria Regis Pedrosa^{1*}, Mayara Castro Assunção¹, Rosana Blawid¹, Lilian Margarete Paes Guimarães¹

¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, PE, Brazil.

*Autor Correspondente: Elvira Maria Regis Pedrosa

Email: elvira.pedrosa@ufrpe.br

RESUMO

A produção da cultura do inhame no Brasil se concentra na região nordeste, onde são cultivadas principalmente as espécies *Dioscorea cayennensis* e *D. alata*, com destaque para os estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Bahia em função da alta produtividade. Um dos problemas na cultura do inhame são os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) que são considerados um dos grupos de fitonematoides mais agressivos e prejudiciais economicamente à cultura, representando um fator limitante na produção e na qualidade das túberas. Porém há poucas informações sobre a etiologia da doença na região Nordeste do Brasil, portanto o objetivo do estudo foi realizar a identificação das espécies de *Meloidogyne* associadas a *Dioscorea* spp. na região nordeste brasileira, bem como determinar a distribuição e prevalência dessas espécies. A identificação foi realizada utilizando caracteres morfológicos, bioquímicos e moleculares. Foram identificadas quatro espécies: *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. enterolobii* e *M. arenaria* associadas a três espécies de inhame: *Dioscorea cayennensis*, *D. alata* e *D. trifida* no nordeste brasileiro, com prevalência de *M. incognita* com 35,5% das ocorrências, seguido por *M. javanica* com registro de 33,3% dos isolados, *M. enterolobii* obteve o assinalamento em 17,7% das amostras e *M. arenaria* identificado em 13,3% das amostras.

Palavras-chave: Detecção molecular; Diversidade; Nematóide das galhas; Taxonomia integrativa; inhame

ABSTRACT

The production of the yam crop in Brazil is concentrated in the northeast region, where *Dioscorea cayennensis* and *D. alata* are mainly cultivated, with emphasis on the states of Paraíba, Pernambuco, Alagoas and Bahia due to their high productivity. One of the problems in the yam crop is root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) which are considered one of the most aggressive and economically harmful phytonematode groups, representing a limiting factor in the production and quality of tubers. However, there is little information about the etiology of the disease in the Northeast region of Brazil, so the objective of the study was to identify the *Meloidogyne* species associated with *Dioscorea* spp. in the Brazilian northeast region, as well as to determine the distribution and prevalence of these species. Identification was performed using morphological, biochemical and molecular characters. Four species were identified: *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. enterolobii* and *M. arenaria* associated with three yam species: *Dioscorea cayennensis*, *D. alata* and *D. trifida* in northeastern Brazil. With a prevalence of *M. incognita* with 35.5% of the occurrences, followed by *M. javanica* with a record of 33.3% of the isolates, *M. enterolobii* was identified in 17.7% of the samples and *M. arenaria* identified in 13.3% of samples.

Keywords: Molecular detection; Diversity; Root-knot nematode; Integrative taxonomy; Yam

INTRODUÇÃO

O inhame (*Dioscorea* spp.) é uma planta da família Dioscoreaceae, com hábito herbáceo e ciclo anual. O gênero *Dioscorea* é formado por aproximadamente 630 espécies, com distribuição na Ásia, África, América Central e América do Sul (Aumsuwan et al., 2016). A cultura do inhame produz tubérculos em seu desenvolvimento vegetativo, com alto valor energético e nutricional utilizado na alimentação de pequenos produtores rurais, também possuem propriedades medicinais (Senanayake et al., 2012; Dantas et al., 2013). A produção e área plantada de inhame vêm expandindo-se ao longo dos anos, registrando-se em 2018 área plantada mundial de aproximadamente 8,500.000 hectares (FAO, 2020).

No Brasil a produção da cultura do inhame se concentra na região nordeste, cultivando principalmente as espécies *Dioscorea cayennensis* Lam e *D. alata* L., com

destaque para os estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Bahia devido à produtividade (Siqueira, 2011; Silva et al., 2012; Mesquita, 2002). Outra importante espécie de *Dioscorea* cultivada no país é *D. trifida* L. que possui centro de origem na América do Sul, com destaque de produção e consumo na região norte do Brasil (Rocha et al., 2020). Em 2019, o Brasil produziu quase 250 mil toneladas de inhame, com aproximadamente 90% da produção nacional produzida na região nordeste (Assis Moura and Silva, 2017; FAO, 2021).

Dentre os problemas fitossanitários que ocorrem na cultura do inhame, há as doenças ocasionadas por nematoides, como a casca preta e a meloidoginose (Oliveira et al., 2005; Seal and Muller, 2007; Siqueira, 2011; Leite and Nascimento, 2018). O nematoide das galhas, pertencente ao gênero *Meloidogyne* Goeldi, é considerado um dos mais importantes para a cultura (Lilley et al., 2012; Moura, 2017). Fitonematoides desse gênero têm ampla distribuição mundial, alto índice de reprodução e agressividade, e são parasitas obrigatórios com hábito sedentário (Moens et al., 2009). Tais características favorecem para que esse grupo de fitonematoides seja o responsável pela diminuição e perda da produtividade na cultura do inhame (Barbosa et al., 2010; Siqueira, 2011).

Existem mais de 100 espécies descritas do gênero *Meloidogyne*, dentre essas, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White), *M. javanica* (Treub.) e *M. arenaria* (Neal) já foram identificadas em levantamento realizado anteriormente na cultura do inhame no Brasil (Hunt and Handoo, 2009; Silva et al., 2016; Moura, 2017). Diante dos prejuízos ocasionados por *Meloidogyne* spp. nessa cultura, é essencial a identificação das espécies de nematoides das galhas, visando o manejo da doença (Coyne et al., 2006). Portanto, o objetivo do estudo foi realizar a identificação das espécies de *Meloidogyne* associadas a *Dioscorea* spp. na região nordeste brasileira, bem como determinar a distribuição e prevalência dessas espécies.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos isolados.

As coletas das populações de nematoides presentes nas áreas produtoras de inhame foram oriundas de diferentes campos de produção da região nordeste do Brasil (Tabela 1). Túberas e solo de áreas infestadas foram coletados e encaminhados ao

Laboratório de Fitonematologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). As populações de *Meloidogyne* spp. foram purificadas e multiplicadas em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Santa Cruz Kada em casa de vegetação, para identificação da espécie.

Caracterização morfológica, bioquímica e molecular de *Meloidogyne* spp.

Cortes perineais foram realizados de acordo com a metodologia de Taylor e Netscher (1974). A determinação do perfil da esterase foi feita de acordo com Carneiro and Almeida (2001), utilizando duas fêmeas por amostra. Após prévia identificação e purificação, para cada isolado foi feita a extração do DNA genômico com o kit AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep (Axygen®), conforme protocolo descrito pelo fabricante, e a qualidade e a quantidade de DNA foram estimadas respectivamente em gel de agarose 0,8% e NanoVue™ (GE Healthcare®). Para identificação molecular foram sequenciados três fragmentos do DNA ribossomal (rDNA) (região D2-D3 do 28S rRNA, ITS, e 18S rRNA) e duas regiões do mtDNA (coxI e coxII-16S). A região D2-D3 do segmento 28S rDNA foi amplificada usando os primers D2A e D3B. A região ITS foi amplificada usando os primers 18S e Vrain2R, enquanto 18S rRNA foi amplificada usando os primers 988F, 1912R, 1813F e 2646R. O gene coxI do mtDNA foi amplificado usando C2F3 e MRH106. A região coxII-16S do mtDNA foi amplificada usando primers JB3 e JB5. As amplificações em PCR foram realizadas em volume final de 25µl, utilizando PCR Master Mix (2X) (Fermentas®) conforme recomendações do fabricante. As reações foram realizadas em termociclador Biocycler MJ 96+ (Biosystems®), detalhes dos protocolos das PCR estão descritos em Powers e Harris (1993). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2% e purificados com o kit AxyPrep™ PCR Cleanup (Axygen®), e posteriormente sequenciados nos dois sentidos com os mesmos primers utilizados na amplificação.

Análises filogenéticas

As sequências consenso foram montadas a partir de duas sequências usando o pacote Staden (Staden et al. 1998). Essas foram utilizadas para uma pesquisa de Blastn em banco de dados de nucleotídeos do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Múltiplos

alinhamentos de sequência foram realizados com a versão online do MAFFT 7, utilizando o método de refinamento iterativo L-INS-i (Kato e Toh 2008, Kato 2013), para cada gene individual e região.

As relações filogenéticas foram realizadas usando as análises da Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB) feitas tanto para os locus individuais como para concatenado. As análises da MV foram realizadas utilizando os programas RAxML-HCP2 v.7.0.4 (Stamatakis et al. 2008) implementadas no CIPRES Portal v.2.0 (<https://www.phylo.org/portal2/home.action>). A análise de inferência bayesiana (IB) foi realizada utilizando os programas RAxML-HCP2 v.7.0.4 (Stamatakis 2006; Stamatakis et al. 2008) e MrBayes v 3.2.1 (Roquist et al. 2012) ambos implementados no Portal CIPRES v. 2.0. O programa MrModeltest 2.3 foi utilizado para buscar o modelo mais adequado de evolução de nucleotídeos de acordo com os parâmetros AICc (Nylander 2004). Os modelos de substituição de nucleotídeos de melhor ajuste foram selecionados usando AICc em jModelTest2 v. 2.1.6 (Darriba et al., 2012, Guindon e Gascuel 2003). No IB a análise foi realizada utilizando o modelo GTR+I+G com quatro cadeias Markov Chain Monte Carlo (MCMC), 5×10^7 gerações com amostragens a cada 1000 gerações. Os primeiros 25% das gerações foram descartados.

Prevalência de espécies de *Meloidogyne*

Baseado no número de populações de cada espécie de *Meloidogyne* identificada, a frequência relativa de cada espécie foi calculada em relação ao número total de isolados e ao número de isolados por área/estado. Os valores de frequências relativas foram expressos em percentagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas 300 populações de *Meloidogyne* spp. associadas a *Dioscorea* spp. provenientes dos nove estados da região nordeste do Brasil, sendo 61 populações do estado de Alagoas, 48 populações do estado do Maranhão, 43 populações do estado de Pernambuco, 39 populações do estado da Bahia, 32 populações do estado de Sergipe, 31 populações do estado da Paraíba, 30 populações do Rio Grande do Norte, dez populações do estado do Ceará e seis populações do estado do Piauí. Posteriormente, foi realizada a

seleção de isolados de diferentes espécies de *Meloidogyne* com base nas características morfológicas e bioquímicas, sendo escolhido a espécie do nematoide em cada espécie vegetal de inhame por estado. Os 45 isolados de *Meloidogyne* spp. selecionados e purificados foram utilizados para a realização da caracterização molecular, conforme Tabela 1.

A análise preliminar utilizando dados moleculares do 18S rRNA de 45 isolados separou quatro haplótipos diferentes (M01-M45), 16 isolados foram representados por três haplótipos e as sequências foram agrupadas para *Meloidogyne* sp.1, 15 isolados em dois haplótipos agrupados nas sequências de *Meloidogyne* sp.2, um haplótipo foi separado para *Meloidogyne* sp.3 com oito isolados e um haplótipo foi separado para *Meloidogyne* sp.4 com seis isolados (Figura 1). Um total de sete isolados representativos dos haplótipos foram escolhidos de cada espécie vegetal para o sequenciamento do locus remanescente e análises subsequentes (Tabela 2).

Os padrões perineais de fêmeas da população de *Meloidogyne* sp. 2 mostraram arco dorsal alto e quadrado, com estrias onduladas dobradas em direção às linhas laterais e ausência de entalhes distintos nas linhas laterais, característico de *M. incognita*. Os padrões perineais das fêmeas de *Meloidogyne* sp. 2 eram arredondados com o arco dorsal baixo, estrias suaves e linhas laterais paralelas destacadas em ambos os lados, típico de *M. javanica*. Os padrões perineais das fêmeas de *Meloidogyne* sp. 3. apresentaram formato oval com arcos dorsais altos, com estrias e as linhas laterais finas. Estas características morfológicas corresponderam à descrição original de *M. enterolobii*. As configurações perineais das fêmeas de *Meloidogyne* sp. 4 apresentaram arco dorsal baixo, arredondado e recuado perto dos campos laterais, com estrias curtas e irregulares, com bifurcação, caraterístico de *M. arenaria*.

Os polimorfismos das bandas de esterase por eletroforese revelaram o fenótipo I1 (Rm 1,0) típico de *M. incognita* nos isolados de *Meloidogyne* sp. 1. Os isolados de *Meloidogyne* sp. 2 apresentaram fenótipo J3 (Rm: 1,0, 1,20, 1,35) característico de *M. javanica*. Constatou-se também a presença de fenótipo M2 (Rm: 0,7 e 0,9), bandas características de *M. enterolobii* nos isolados de *Meloidogyne* sp. 3. Foi observado em *Meloidogyne* sp. 4 o fenótipo A2 (Rm: 1.20, 1.30), típico de *M. arenaria* (Figura 2).

Os isolados selecionados foram distribuídos entre quatro clados bem suportados em análises multilocus da Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB). Árvores multilocais e locus individuais apresentaram topologia semelhante (Figura 3).

Os isolados de *Meloidogyne* de *Dioscorea* spp. foram identificados em quatro espécies: três isolados foram agrupados com o clado *M. incognita* com suporte máximo na análise multilocus IB; outros três isolados agruparam com isolados de *M. javanica*; dois isolados agrupados com o clado *M. arenaria* com alto suporte nas análises multilocus concatenadas de IB; e outros dois isolados agrupados com o clado *M. enterolobii* (Yang and Eisenback). No total, três representantes de *M. incognita*, três de *M. javanica*, dois de *M. arenaria* e dois de *M. enterolobii* foram isolados por inferência dos representantes dos haplótipos.

Portanto, foram identificadas as espécies *M. incognita*, *M. javanica*, *M. enterolobii* e *M. arenaria* associadas a três espécies de inhame: *Dioscorea cayennensis*, *D. alata* e *D. trifida* no nordeste brasileiro (Figura 4), com prevalência de *M. incognita* em 35,5% das ocorrências, seguido por *M. javanica* com registro em 33,3% dos isolados, *M. enterolobii* obteve o assinalamento em 17,7% das amostras e *M. arenaria* identificado em 13,3% das amostras. A espécie *D. cayennensis* registrou 53,3% dos assinalamentos de espécies de *Meloidogyne* em todos os nove estados estudados, seguido por *D. alata* com 42,2% de isolados de toda região nordeste e 4,5% dos registros foram feitos em *D. trifida*, com identificação desta espécie de inhame apenas no estado do Maranhão.

A perda na produção de inhame por espécies dos nematoides das galhas pode se aproximar de 90%, com diminuição do valor de comercialização em até 52% (Nwauzor and Fawole, 1981). *M. incognita* e *M. javanica* são as principais espécies associadas à cultura do inhame, com redução significativamente na produção de tubérculos (Adesiyan and Odihirin, 1978; Mohandas and Ramakrishnan, 1997). Há registro de redução de até 80% na produção de inhame ocasionada por *M. arenaria* em infestação severa (Gao, 1992).

Na literatura, há registro de meloidoginose em *D. trifida* realizado por Humphreys-Pereira et al. (2017) na Costa Rica com o assinalamento de *M. incognita*. No Brasil, foram identificadas duas espécies, *M. incognita* e *M. javanica* em *D. trifida* (Souza Junior et al., não publicado).

No Brasil, *M. enterolobii* é um importante patógeno na cultura da goiabeira na região nordeste, em razão das severas perdas que ocasiona e das quedas de produção, levando à inviabilidade econômica da cultura, em alguns casos (Charchar et al., 2009). Na cultura do inhame só há dois registros de assinalamento de *M. enterolobii*, o primeiro realizado Kolombia et al. (2016) na Nigéria no inhame branco (*Dioscorea rotundata* L.) e o segundo no Brasil em *Dioscorea* spp. registrado por Souza Junior et al. (não publicado).

O registro da ocorrência de *Meloidogyne arenaria* associada à cultura do inhame já foi amplamente realizado, com assinalamentos na Ásia, América Central, Latina, África e Caribe (Schieber and Lassmann 1961; Jenkins and Bird, 1962; Moura, 2006; Moura et al., 2010; Gao et al., 2000; Kolombia et al., 2017; Souza Junior et al., não publicado). No nordeste brasileiro, *M. arenaria* é uma das principais espécies de nematoides das galhas que ocorrem na região (Santos et al., 2007).

Na literatura há relatos da ocorrência de mais de uma espécie de nematoide das galhas em uma única túbera de inhame, como descrito por Kolombia et al. (2017) que verificaram infecção múltipla em 4% de suas amostras com a presença de *M. enterolobii*, *M. incognita* e *M. javanica*. Embora no presente estudo não tenha sido detectada infecção múltipla, foi observado dentro de uma mesma área de amostragem a ocorrência de mais de uma espécie de *Meloidogyne*. Outras espécies desse gênero como *M. hapla* foram relatadas parasitando o inhame em outros países (Kawamura and Hirano, 1961; Park et al., 1998; Kolombia et al., 2016), no entanto, não foram detectadas no presente trabalho.

A relevância em conhecer os impactos que *Meloidogyne* spp. podem exercer sobre a cultura do inhame, bem como suas interações intra e interespecíficas, e sua correta identificação são características fundamentais para que práticas de manejo possam ser adequadamente recomendadas. Diante do exposto, a ocorrência de espécies de *Meloidogyne* em áreas de produção de inhame ressalta sua importância como agente indutor de danos na cultura, contribuindo para redução na produtividade.

Referências

- Adesiyan, S.O. & Odihirin, R.A. (1978) Root-knot nematodes as pests of yams (*Dioscorea* spp.) in southern Nigeria. *Nematologica* 24, 132e134.
- Aumsuwan, P., Khan, S. I., Khan, I. A., Ali, Z., Avula, B., Walker, L. A., & Dasmahapatra, A. K. (2016). The anticancer potential of steroidal saponin, dioscin, isolated from wild yam (*Dioscorea villosa*) root ex tractin invasive human breast cancer cell line MDA-MB-231 *in vitro*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 591, 98–110.
- Charchar, J. M. et al. (2009) Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no estado do Tocantins. *Nematologia Brasileira*, 33(2), 182-186.
- Coyne, D. L., Tchabi, A., Baimey, H., Labuschagne, N., & Rotifa, I. (2006). Distribution and prevalence of nematodes (*Scutellonema bradys* and *Meloidogyne* spp.) on marketed yam (*Dioscorea* spp.) in West Africa. *Field Crops Research*, 96(1), 142-150.
- Gao, Q.K., Zhao, H.H., Xu, M.E., Liu, W.Z. (2000) Preliminary study on the root-knot nematode disease of yam. *Acta Phytopathologica Sinica*, 30,162–165.
- Gao, Q.K. (1992) The observation of occurrence of root knot nematodes on Chinese yam. *Chin. Veg.* 5, 24e25.
- Humphreys-Pereira, D. A., Flores-Chaves, L., Salazar, L., & Gómez-Alpízar, L. (2017). Plant-parasitic nematodes associated with yams (*Dioscorea* spp.) and identification of *Meloidogyne* and *Pratylenchus* species in three yam-growing regions of Costa Rica. *Nematropica*, 47(2), 120-134.

Jenkins, W.R. & Bird, G.W. (1962) Nematodes associated with wild yam, *Dioscorea* sp., with special reference to the pathogenicity of *Meloidogyne incognita*. *Plant Disease Reporter*, 46, 858–860.

Kawamura, T. & Hirano, K. (1961) Host-parasite relationship of northern root-knot nematode (*Meloidogyne hapla* Chitwood) on yam (*Dioscorea batatas* Decne, Tsukunemo). *Japanese Journal of Phytopathology*, 26(1), 7-15.

Kolombia, Y. A. et al. (2016) First report of *Meloidogyne enterolobii* causing tuber galling damage on white yam (*Dioscorea rotundata*) in Nigeria. *Plant Disease*, 100(10), 2173.

Kolombia, Y. A., Karssen, G., Viaene, N., Kumar, P. L., De Sutter, N., Joos, L. & Bert, W. (2017). Diversity of root-knot nematodes associated with tubers of yam (*Dioscorea* spp.) established using isozyme analysis and mitochondrial DNA-based identification. *Journal of Nematology*, 49(2), 177.

Moura, R.M., Carneiro, R.M.D.G., Silva-Lima, S.T., Costa, M.B., Ribeiro, A.R.S. (2010) First report of root-knot nematode on yam ‘São Tomé’ in Brazil. *Nematologia Brasileira*, 34, 178–180.

Moura, R.M. (2006) Principais doenças do inhame-da-costa no nordeste do Brasil. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, 3, 180–199.

Nyczepir, A.P. & Thomas, S.H. (2009) Current and future management in intensive crop production systems. In: Perry, R.N., Moeans, M., Starr, J.L. (Eds.), *Root-knot Nematodes*. CAB International, Wallington UK, pp. 412e435.

Park, S. D. et al. (1998) Occurrence and distribution of plant parasitic nematodes in yam (*Dioscorea batatas*) fields in Korea. *International Journal of Nematology*, 8(2), 141-144.

Rocha, R.N.C., Lopes, R., Buzaglo, A.C., Arruda, M.R., Luadir Gasparotto, L. & Carvalho, A.E.S. (2020) A produção de cará-roxo (*Dioscorea trifida*): efeitos de tamanho do tubérculo-semente. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 22 p.

Santos, E.S. et al. (2007) Inhame (*Dioscorea* sp.) tecnologias de produção e preservação ambiental. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, 1(1), 31-36.

Schieber, E. & Lassmann, D.K. (1961) Root-knot nematode on *Dioscorea* in Guatemala. *Plant Disease Reporter*, 45, 981.

Legendas de figuras

Figura 1. Árvore da Máxima Verossimilhança de isolados de *Meloidogyne* associados a *Dioscorea* spp. inferidas por meio dos alinhamentos dos fragmentos do 18S rRNA. *Xiphinema index* foi usado como *outgroups*. A barra de escala indica o número esperado de substituições por site.

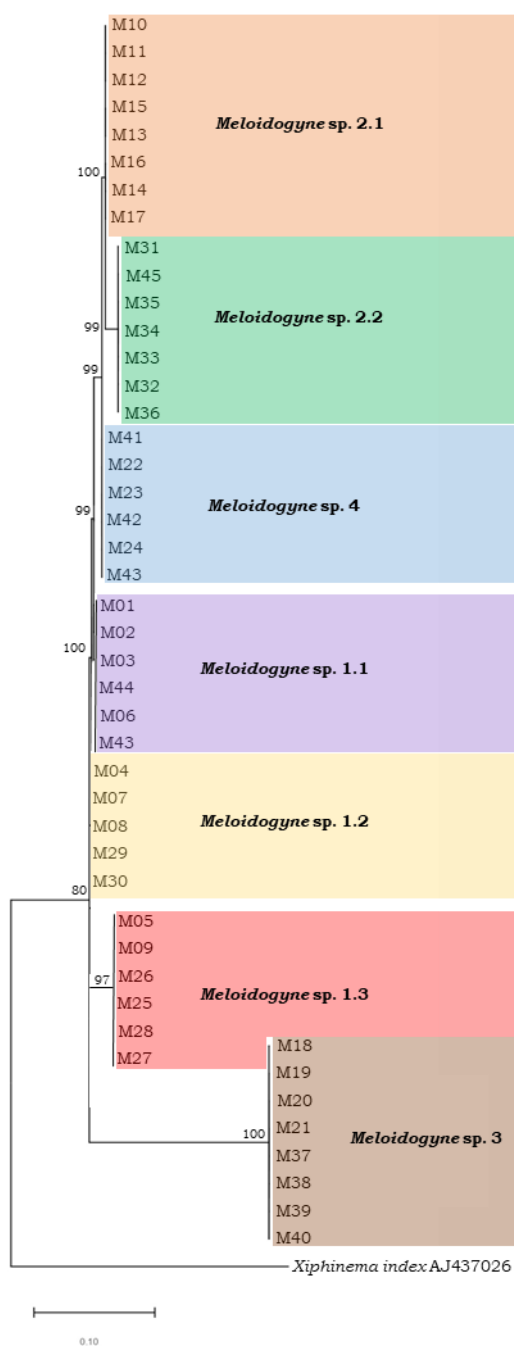


Figura 2. Fenótipos de esterase de populações de *Meloidogyne* spp. isolada da cultura do inhame no Brasil. A) Mj: fenótipo de *M. javanica* (padrão) e Ma: *M. arenaria* com duas bandas. B) Mj: fenótipo de *M. javanica* (padrão) e Mi: *M. incognita* com uma banda. C) B) Mj: fenótipo de *M. javanica* (padrão) e Me: *M. enterolobii* com duas bandas.

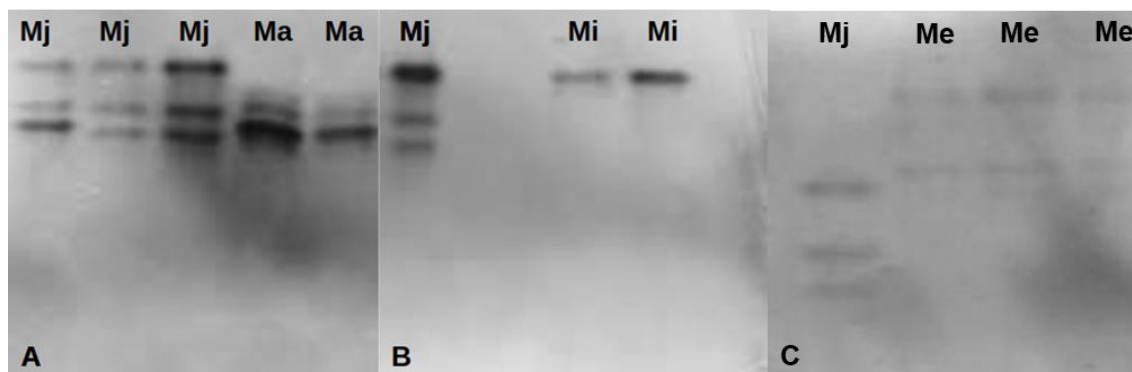


Figura 3. Árvore da Máxima verossimilhança de espécies de *Meloidogyne* inferida por meio da concatenada dos alinhamentos dos fragmentos do DNA ribossomal (rDNA) (região D2-D3 do 28S rRNA, ITS e 18S rRNA) e genes *coxI* e *coxII*. Os valores de suporte de bootstrap ($MV \geq 70$) e os valores de probabilidade posterior IB ($PP \geq 0,95$) são mostrados nos nós. *Xiphinema index* NEM90 e NEM95 foram usados como *outgroups*. A barra de escala indica o número esperado de substituições por site.

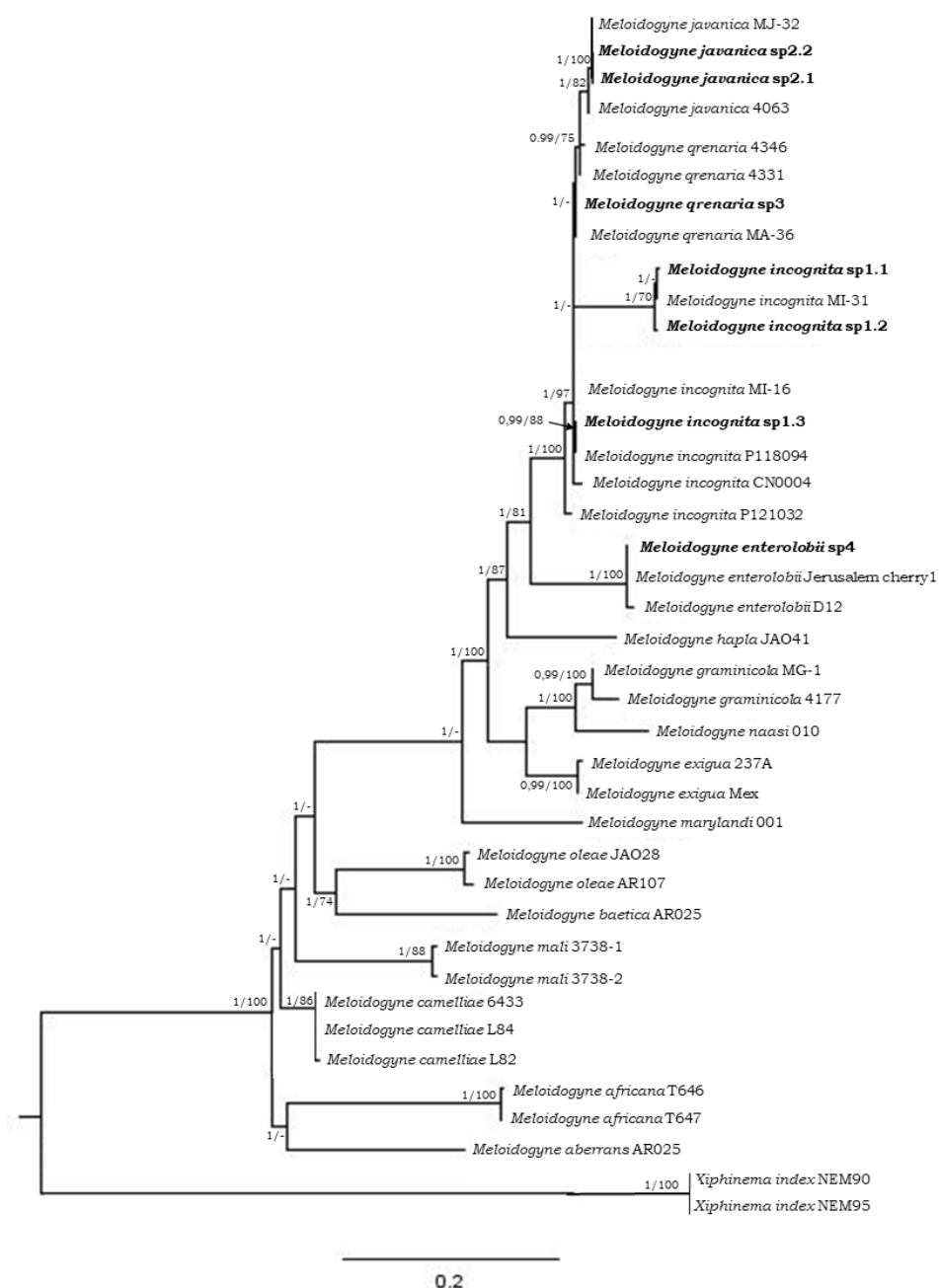


Figura 4. Distribuição de isolados de *Meloidogyne* identificados em *Dioscorea* spp. no nordeste brasileiro.

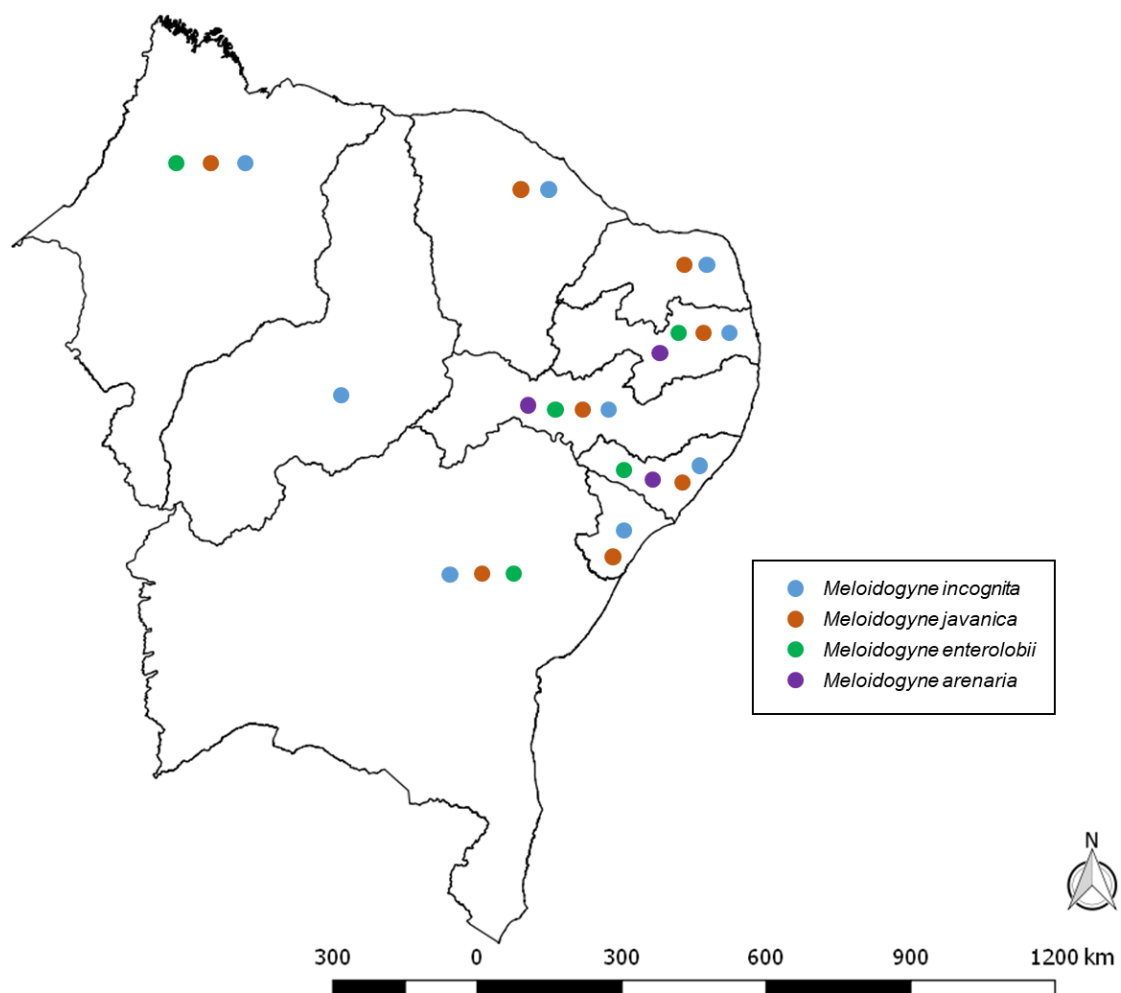


Tabela 1. Isolados de *Meloidogyne* spp. associados a *Dioscorea* spp. no Brasil.

Código de isolados	Espécies de <i>Dioscorea</i>	Espécies de <i>Meloidogyne</i>	Estado
M01	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>	Alagoas
M02	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>	Bahia
M03	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>	Ceará
M04	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>	Maranhão
M05	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>	Paraíba
M06	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>	Pernambuco
M07	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>	Piauí
M08	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>	Rio Grande do Norte
M09	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>	Sergipe
M10	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. javanica</i>	Alagoas
M11	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. javanica</i>	Bahia
M12	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. javanica</i>	Ceará
M13	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. javanica</i>	Maranhão
M14	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. javanica</i>	Paraíba
M15	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. javanica</i>	Pernambuco
M16	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. javanica</i>	Rio Grande do Norte
M17	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. javanica</i>	Sergipe
M18	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. enterolobii</i>	Alagoas
M19	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. enterolobii</i>	Bahia
M20	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. enterolobii</i>	Maranhão
M21	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. enterolobii</i>	Paraíba
M22	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. arenaria</i>	Alagoas
M23	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. arenaria</i>	Paraíba
M24	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. arenaria</i>	Pernambuco
M25	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>	Alagoas
M26	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>	Bahia
M27	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>	Maranhão
M28	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>	Paraíba
M29	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>	Pernambuco
M30	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>	Rio Grande do Norte
M31	<i>D. alata</i>	<i>M. javanica</i>	Alagoas
M32	<i>D. alata</i>	<i>M. javanica</i>	Bahia
M33	<i>D. alata</i>	<i>M. javanica</i>	Maranhão
M34	<i>D. alata</i>	<i>M. javanica</i>	Paraíba
M35	<i>D. alata</i>	<i>M. javanica</i>	Pernambuco
M36	<i>D. alata</i>	<i>M. javanica</i>	Rio Grande do Norte
M37	<i>D. alata</i>	<i>M. enterolobii</i>	Alagoas
M38	<i>D. alata</i>	<i>M. enterolobii</i>	Bahia
M39	<i>D. alata</i>	<i>M. enterolobii</i>	Pernambuco
M40	<i>D. alata</i>	<i>M. enterolobii</i>	Paraíba
M41	<i>D. alata</i>	<i>M. arenaria</i>	Alagoas
M42	<i>D. alata</i>	<i>M. arenaria</i>	Paraíba

M43	<i>D. alata</i>	<i>M. arenaria</i>	Pernambuco
M44	<i>D. trifida</i>	<i>M. incognita</i>	Maranhão
M45	<i>D. trifida</i>	<i>M. javanica</i>	Maranhão

Tabela 2. Lista de isolados de *Meloidogyne* utilizados no trabalho com as informações sobre: hospedeiro, localização e número de acesso no GenBank das sequências gênicas ITS, 28S, 18S, COI1 e COII.

Espécie	Código de acesso	Hospedeiro	Local	GenBank				
				D2-D3	ITS	18S	COII/16S	COI
<i>M. baetica</i>	AR025	<i>Olea europaea</i>	Espanha	MH011971	MH011977	MH011982	MG996756	MG996760
<i>M. exigua</i>	237A	<i>Coffea arabica</i>	Costa Rica	KF993622	-	-	KF993640	-
<i>M. exigua</i>	Mex	<i>Coffea arabica</i>	Costa Rica	KF993623	MK212184	KF993650	KF993634	-
<i>M. hapla</i>	JAO41	<i>Olea europaea</i>	Espanha	MH011972	MH011978	MH011983	MG996757	-
<i>M. naasi</i>	010	<i>Stenotaphrum secundatum</i>	EUA	-	JN241873	JN241842	JN241897	-
<i>M. aberrans</i>	GZ	<i>Actinidia chinensis</i>	China	KU598837	KU598838	KU598836	-	-
<i>M. africana</i>	T646	<i>Coffea arabica</i>	Tanzânia	KY433425	KY433430	-	-	KY433441
<i>M. africana</i>	T647	<i>Coffea arabica</i>	Tanzânia	KY433423	KY433428	KY433422	-	KY433434
<i>M. arenaria</i>	MA-36	<i>Solanum tuberosum</i>	Brasil	MF157436	MF168953	MF157416	-	-
<i>M. arenaria</i>	sp 3	<i>Dioscorea</i> spp.	Brasil					
<i>M. arenaria</i>	4331		Vietnã	MH332655	KU521798	-	MH332685	MH332666
<i>M. arenaria</i>	4346		Vietnã	MH332656	MG773546	-	MK033428	MH332667

Tabela 2. Lista de isolados de *Meloidogyne* utilizados no trabalho com as informações sobre: hospedeiro, localização e número de acesso no GenBank das sequências gênicas ITS, 28S, 18S, COI1 e COII.

<i>M. camelliae</i>	L84	<i>Camellia</i> <i>sasanqua</i>	Itália	-	KF542872	-	-	KF542874
<i>M. camelliae</i>	L82	<i>Camellia</i> <i>sasanqua</i>	Itália	-	KF542871	-	-	KF542873
<i>M. enterolobii</i>	sp 4	<i>Dioscorea</i> spp.	Brasil					
<i>M. enterolobii</i>	Jerusalem cherry1	<i>Solanum</i> <i>pseudocapsicum</i>	Brasil	KX767845	-	-	KX767844	-
<i>M. enterolobii</i>	D12	<i>Cereus</i> <i>hildmannianus</i>	Portugal	-	-	-	MK387171	MK387170
<i>M. graminicola</i>	4177		Vietnã	MH332658	MG773552	-	MH332684	MH332671
<i>M. graminicola</i>	MG-1	<i>Oryza sativa</i>	China	MG273441	-	MG273438	-	MG917042
<i>M. incognita</i>	P118094	<i>Solanum</i> <i>tuberosum</i>	EUA	MF673762	MG194429	AY284621	KX214347	MH128424
<i>M. incognita</i>	P121032	<i>Solanum</i> <i>tuberosum</i>	EUA	MF673761	KT258980	KC875376	MK861920	MH128427
<i>M. incognita</i>	P73085	<i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i>	EUA	-	-	-	-	MH128422
<i>M. incognita</i>	CN0004	<i>Spondias</i> spp.	Brasil	MN661335	MN661332	MN661338	-	-
<i>M. incognita</i>	MI-16	<i>Daucus carota</i>	Brasil	MF157444	MF168965	MF157421	-	-

Tabela 2. Lista de isolados de *Meloidogyne* utilizados no trabalho com as informações sobre: hospedeiro, localização e número de acesso no GenBank das sequências gênicas ITS, 28S, 18S, COI1 e COII.

<i>M. incognita</i>	MI-31	<i>Solanum</i>	Brasil	MF157442	MF168960	MF157425	-	-
		<i>aethiopicum</i>						
<i>M. incognita</i>	sp 1.1	<i>Dioscorea</i> spp.	Brasil					
	sp 1.2	<i>Dioscorea</i> spp.	Brasil					
	sp 1.3	<i>Dioscorea</i> spp.	Brasil					
<i>M. javanica</i>	3936		Vietnã	MG825448	MG773568	-	MK033436	MG825434
<i>M. javanica</i>	3660	<i>Piper nigrum</i>	Vietnã	MG825447	KU356191	-	MK033437	MG825438
<i>M. javanica</i>	4063		Vietnã	MG825449	MG773569	-	MK033438	MG825437
<i>M. javanica</i>	sp 2.1	<i>Dioscorea</i> spp.	Brasil					
<i>M. javanica</i>	sp 2.2	<i>Dioscorea</i> spp.	Brasil					
<i>M. javanica</i>	MJ-32	<i>Abelmoschus</i>	Brasil	MF157449	MF168973	MF157427	-	-
		<i>esculentus</i>						
<i>M. mali</i>	3738-1	<i>Acer palmatum</i>	Japão	JX978226	JX978228	JX978225	KC112913	-
<i>M. mali</i>	3738-2	<i>Acer palmatum</i>	Japão	JX978227	JX978229	-	-	-
<i>M. marylandi</i>	001	<i>Stenotaphrum</i>	EUA	JN019333	JN157853	JN241848	JN241916	-
		<i>secundatum</i>						
<i>M. oleae</i>	AR107	<i>Olea europaea</i>	Espanha	MH011963	MH011973	MH011979	MG996751	MG996758
<i>M. oleae</i>	JAO28	<i>Olea europaea</i>	Espanha	MH011968	MH011974	MH011980	MG996753	-

CAPÍTULO III

**DISTRIBUIÇÃO, PREVALÊNCIA E AGRESSIVIDADE DOS NEMATOIDES
DAS GALHAS EM *DIOSCOREA* SPP. NO NORDESTE DO BRASIL**

Publicação: **Tropical Plant Pathology**

Brasília, DF

Artigo

JCR = 1,488 / Qualis = A4

DISTRIBUIÇÃO, PREVALÊNCIA E AGRESSIVIDADE DOS NEMATÓIDES DAS GALHAS EM *DIOSCOREA* SPP. NO NORDESTE DO BRASIL

Francisco Jorge Carlos de Souza Junior¹, Elvira Maria Regis Pedrosa^{1*}, Rosana Blawid¹, Carmem Dolores Gonzaga Santos², Lilian Margarete Paes Guimarães¹, Mayara Casto Assunção¹

¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, PE, Brazil. ²Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 60356-000, CE, Brazil.

*Autor Correspondente: Elvira Maria Regis Pedrosa

Email: elvira.pedrosa@ufrpe.br

Resumo

A região Nordeste do Brasil é a principal produtora e consumidora de inhame do país. Os nematoides, em particular *Meloidogyne* spp., são um grande risco para a produção da cultura. Sendo assim o objetivo desse estudo foi avaliar a distribuição e prevalência das espécies de *Meloidogyne* associada à cultura do inhame e estabelecer o nível de dano do nematoide em túberas de inhame (*Dioscorea cayennensis*) em casa de vegetação. A incidência e severidade dos sintomas foram avaliados em 300 túberas de diferentes áreas de produção de *Dioscorea* spp. nos estados da região Nordeste brasileira. Foram selecionados 24 isolados de *Meloidogyne* que foram inoculados em mudas de *D. cayennensis* em condições de casa de vegetação. A incidência de sintomas foi de 100% de galhas em todas as túberas examinadas, com diferentes graus de severidade. A espécie com maior ocorrência foi *Meloidogyne incognita* com 51% dos registros em *Dioscorea* spp., seguido por *M. javanica* (29%), *M. enterolobii* (15%) e *M. arenaria* (4%) Isolados de *M. enterolobii* apresentaram níveis de agressividade superiores às demais espécies avaliadas. Este estudo mostra que *Meloidogyne* spp. estão presentes em todas as áreas examinadas de produção da cultura de inhame nos diferentes estados da região e exigem um manejo eficaz de nematoides de inhame na região

Palavras-chave: *Dioscorea*, *Meloidogyne*, sintomas

Abstract

The Northeast region of Brazil is the main producer and consumer of yam in the country. Nematodes, in particular *Meloidogyne* spp., are a major risk to crop production. Therefore, the objective of this study was to evaluate the distribution and prevalence of *Meloidogyne* species associated with yam culture and to establish the level of nematode damage in yam tubers (*Dioscorea cayennensis*) in a greenhouse. The incidence and severity of symptoms were evaluated in 300 tubers from different areas of *Dioscorea* spp. in the states of the Brazilian Northeast region. Twenty-four *Meloidogyne* isolates were selected and inoculated into *D. cayennensis* seedlings under greenhouse conditions. The incidence of symptoms was 100% of galls on all tubers examined, with different degrees of severity. The species with the highest occurrence was *Meloidogyne incognita* with 51% of records in *Dioscorea* spp., followed by *M. javanica* (29%), *M. enterolobii* (15%) and *M. arenaria* (4%). superior aggressiveness of the other evaluated species. This study shows that *Meloidogyne* spp. is present in all yam production areas examined in the different states of the region and requires effective management of yam nematodes in the region

Keywords: *Dioscorea*, *Meloidogyne*, symptoms

INTRODUÇÃO

O inhame (*Dioscorea* spp.) pertence à família Dioscoreaceae, é uma planta de hábito herbáceo, com distribuição em regiões tropical, subtropical e temperada, com prevalência na África, América do Sul e Central e Ásia (AUMSUWAN et al., 2016). No ranking mundial, o Brasil ocupa a 13ª posição, com produção anual de aproximadamente 250 mil toneladas, em uma área de cerca de 26 mil ha e rendimento médio de 9,8 t/ha (FAO, 2018). Nacionalmente, a região nordeste destaca-se como a principal produtora, sendo responsável por 90% do total de inhame produzido no país (ASSIS MOURA; SILVA, 2017). A cultura do inhame possui importância na região nordeste brasileira, principalmente em razão de servir de fonte alimentar para produtores da agricultura familiar (DIAS et al., 2011).

As principais espécies de inhame cultivadas na região nordeste do Brasil em relação ao volume de produção e área de cultivo são *Dioscorea alata* L. e *D. cayennensis* Lam, porém há pequenos cultivos de *D. bulbifera* L. e *D. trifida* L. (DIAS et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2014). Os principais fitonematoides assinalados na cultura do inhame

são: *Scutellonema bradys* (Steiner e Le Hew) Andrásy, *Pratylenchus* spp. (De Man) e *Meloidogyne* spp. (Goeldi) (PINHEIRO et al., 2016).

A ocorrência de nematoides do gênero *Meloidogyne* no inhame no Brasil é um dos principais problemas fitossanitários na cultura, pois, além de reduzir a produtividade, afeta diretamente o produto comercializado (LILLEY et al., 2012; MOURA, 2017). As espécies de *Dioscorea* cultivadas são suscetíveis ao nematoide, consequentemente, as populações de *Meloidogyne* spp. permanecem nas áreas de cultivo da cultura, resultando na inviabilização de novos plantios em razão do aumento populacional desses fitopatógenos (PINHEIRO et al., 2016).

O gênero *Meloidogyne* Goeldi, conhecido como nematoide das galhas, apresenta ampla distribuição mundial, alto índice de reprodução e agressividade, é parasita obrigatório com hábito sedentário (MOENS et al., 2009). Os sintomas causados nas túberas ocasionam deformações nos tubérculos e redução da qualidade (HUMPHREYS-PEREIRA et al., 2014, 2017; KOLOMBIA et al., 2014, 2017).

Apesar da importância econômica da doença, há poucos dados disponíveis do parasitismo de nematoides de galhas em relação à incidência, agressividade e distribuição nas principais áreas de cultivo de inhame do Brasil. Tais informações são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias de manejo de *Meloidogyne* spp. na cultura, visando a redução das perdas de produção. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição, agressividade e prevalência de *Meloidogyne* spp. na cultura do inhame na região Nordeste do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Distribuição e frequência de *Meloidogyne* spp. associadas ao inhame no Nordeste brasileiro

Durante os meses de setembro a dezembro de 2019, 450 amostras constituídas por túberas de inhame com sintomas de meloidoginose foram coletadas em áreas de cultivo nos nove estados brasileiros que formam a região Nordeste. Cada amostra teve registrada as coordenadas geográficas da localização e espécies vegetais de *Dioscorea* spp., sendo posteriormente lavadas e secas na casa de vegetação do Laboratório de Nematologia (LAFNEMA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). A avaliação da severidade dos danos fundamentou-se na escala diagramática desenvolvida por Kolombia et al. (2020), distribuindo notas de 1 a 5, sendo: 1 = atribuído à ausência de sintoma na

superfície da túbera, 2 = sintoma leve (1-25% dos sintomas na superfície da túbera), 3 = sintoma médio (26-50% dos sintomas na superfície da túbera), 4 = sintoma pesado (51-75% dos sintomas na superfície da túbera) e 5 = sintoma grave (> 75% dos sintomas na superfície da túbera).

Os J2 foram extraídos de pequenos fragmentos da casca da túbera pesando 10g de acordo com o método de funil de Baermann otimizado, descrito em Machado e Silva (2019). As suspensões de nematoides obtidas foram mantidas sob refrigeração (4-6°C), realizando-se a contagem dos nematoides em lâminas de Peters, sob microscópio estereoscópio, com média de duas leituras. Os resultados foram computados em número de indivíduos dos nematoides por 10g de túberas. A identificação ao nível de gênero dos nematoides foi feita com chave de identificação de Mai et al., (1996).

Avaliação da agressividade de isolados de *Meloidogyne*

Foram selecionados 24 isolados de *Meloidogyne* obtidos dos nove estados, elegendo-se aqueles que no seu isolamento apresentaram nota 3 na escala diagramática de Kolombia et al. (2020), visando uniformidade dos isolados (Tabela 1). Todos os isolados foram identificados ao nível de espécie utilizando dados morfológicos, bioquímicos e moleculares. As populações puras dos 24 isolados foram multiplicadas em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. ‘Santa Clara’) para serem utilizadas nas inoculações.

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC), com temperatura média de $30^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Túberas sadias de *D. cayennensis* (450-500g) foram utilizadas no ensaio, realizando-se o procedimento desenvolvido por Almeida et al. (2020) para garantir a qualidade fitossanitária das túberas. Posteriormente, as túberas foram plantadas em vasos com capacidade de 8 L com solo previamente esterilizado. Após 30 dias do plantio, mudas de inhame com aproximadamente 10 cm foram inoculadas com 10.000 ovos+J2 individualmente com cada isolados de *Meloidogyne* spp. (Tabela 1). Como testemunha, foi aplicada apenas água destilada nas mudas de inhame. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 25 tratamentos (24 isolados + testemunha) e cinco repetições, totalizando 125 unidades experimentais.

Tabela 1. Isolados de *Meloidogyne* spp. obtidos de áreas de produção de *Dioscorea cayennensis* de diferentes estados da região Nordeste utilizados no experimento.

ISOLADOS	ESPÉCIES	CIDADE/ESTADO	LOCALIZAÇÃO
I1	<i>M. incognita</i>	Goiana, Pernambuco	7° 38' 15" S; 34° 57' 15" O
I2		Conde, Paraíba	7° 18' 36" S; 34° 52' 30" O
I3		Morada Nova, Ceará	5° 6' 37" S; 38° 22' 54" O
I4		Vera Cruz, Rio Grande do Norte	6° 3' 2" S; 35° 26' 29" O
I5		Picos, Piauí	7° 5' 4" S; 41° 29' 15" O
I6		São João dos Patos, Maranhão	6° 29' 26" S; 43° 44' 28" O
I7		São Felipe, Bahia	12° 46' 44" S; 39° 4' 43" O
I8		São Cristóvão, Sergipe	11° 0' 20" S; 37° 13' 32" O
I9		Viçosa, Alagoas	9° 25' 24" S; 36° 13' 17" O
J1	<i>M. javanica</i>	Goiana, Pernambuco	7° 38' 30" S; 34° 57' 11" O
J2		Conde, Paraíba	7° 17' 50" S; 34° 52' 57" O
J3		Morada Nova, Ceará	5° 6' 48" S; 38° 22' 58" O
J4		Vera Cruz, Rio Grande do Norte	6° 1' 46" S; 35° 25' 34" O
J5		São João dos Patos, Maranhão	6° 29' 58" S; 43° 43' 12" O
J6		Maragogipe, Bahia	12° 51' 20" S; 38° 54' 34" O
J7		São Cristóvão, Sergipe	11° 0' 3" S; 37° 13' 0" O
J8		Mar Vermelho, Alagoas	9° 26' 56" S; 36° 23' 58" O
E1	<i>M. enterolobii</i>	Conde, Paraíba	7° 18' 36" S 34° 52' 32" O
E2		Quebrangulo, Alagoas	9° 14' 59" S; 36° 22' 48" O
E3		São Felipe, Bahia	12° 46' 54" S; 39° 4' 42" O
E4		Paraibano, Maranhão	6° 24' 43" S; 43° 59' 42" O
A1	<i>M. arenaria</i>	Goiana, Pernambuco	7° 38' 28" S; 34° 57' 16" O
A2		Mataraca, Paraíba	6° 35' 40" S; 35° 04' 09" O
A3		Atalaia, Alagoas	9° 31' 39" S; 36° 03' 20" O

Após sete meses do plantio, as plantas e túberas foram coletadas para avaliação das seguintes variáveis: biomassa fresca da parte aérea da planta (BFPAP), biomassa seca da parte aérea da planta (BSPAP), peso das túberas (P), nível do sintoma (NS) segundo Kolombia et al. (2020), número de ovos (NO), números de massas de ovos (NMO), fator de reprodução (FR) e número de juvenis de segundo estágio (J2).

Para as variáveis do parasitismo, as túberas foram lavadas em água corrente e secas em casa de vegetação para realização da avaliação do nível dos sintomas segundo a escala diagramática desenvolvida por Kolombia et al. (2020). Posteriormente, as túberas foram transferidas para o Laboratório de Fitopatologia da UFC para pesagem e extração do nematoide. Os nematoides foram extraídos de pequenos fragmentos da casca da túbera pesando 10g segundo método de funil de Baermann otimizado, descrito em Machado e Silva (2019). As suspensões de nematoides obtidas foram mantidas sob refrigeração (4-

6°C), realizando-se a contagem dos nematoides em lâminas de Peters, sob microscópio estereoscópio, com média de duas leituras. Todo o experimento foi realizado duas vezes.

Os dados foram submetidos à análise descritiva, sendo avaliados quanto à distribuição Normal através do teste de aderência à normalidade de Kolmogorov-Smirnov ao nível de 5% de significância e os que apresentaram elevados coeficientes de variação sofreram transformação logarítmica $\log(x+1)$. Posteriormente os dados foram submetidos à análise de variância, e quando significativas a 5%, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se o programa SISVAR (Ferreira, 2014)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Distribuição e frequência de isolados de *Meloidogyne* spp. associadas ao inhame.

Foram isoladas 300 populações de diferentes espécies de *Meloidogyne* provenientes de túberas de inhames de diferentes áreas de produção da cultura da região nordeste brasileira (Tabela 2).

Tabela 2. Números de populações de *Meloidogyne* spp. obtidas de diferentes áreas de cultivo de inhame (*Dioscorea* spp.) na região Nordeste do Brasil.

Estado	<i>Dioscorea</i> spp.	<i>Meloidogyne</i> spp.	Nível do Sintoma*	Quantidade de isolados	
Alagoas	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>	2	6	
			3	5	
	<i>D. alata</i>		2	7	
			3	6	
			4	5	
			5	1	
	<i>D. cayennensis</i>		<i>M. javanica</i>	2	4
				3	2
				4	2
				2	5
		3		2	
		4		1	
	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. enterolobii</i>	2	2	
			3	2	
			5	2	
			2	2	
			3	1	
			5	1	
	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. arenaria</i>	2	2	
			3	1	
			<i>D. alata</i>	2	1

			3	1
			2	2
		<i>D. cayennensis</i>	3	3
			4	1
		<i>M. incognita</i>	5	1
			2	4
		<i>D. alata</i>	3	4
			4	1
			5	1
Bahia		<i>D. cayennensis</i>	2	4
		<i>M. javanica</i>	3	2
		<i>D. alata</i>	2	4
			3	2
			3	1
		<i>D. cayennensis</i>	4	1
		<i>M. enterolobii</i>	5	2
			3	4
		<i>D. alata</i>	4	1
			5	1
		<i>D. cayennensis</i>	2	1
		<i>M. incognita</i>	3	2
		<i>D. alata</i>	2	2
Ceará			3	1
		<i>D. cayennensis</i>	2	1
		<i>M. javanica</i>	3	2
		<i>D. alata</i>	2	1
			2	6
		<i>D. cayennensis</i>	3	6
			4	2
		<i>M. incognita</i>	5	1
			2	5
		<i>D. alata</i>	3	4
			4	2
Maranhão			5	1
		<i>D. cayennensis</i>	2	2
		<i>M. javanica</i>	3	4
		<i>D. alata</i>	2	2
			3	6
		<i>D. cayennensis</i>	4	3
		<i>M. enterolobii</i>	5	4
			2	3
		<i>D. cayennensis</i>	3	2
			4	1
		<i>M. incognita</i>	5	1
			2	2
		<i>D. alata</i>	3	2
			4	2
			5	1
		<i>D. cayennensis</i>	2	1
		<i>M. javanica</i>		

			3	3
			4	2
	<i>D. alata</i>		2	1
			3	3
	<i>D. cayennensis</i>		2	2
		<i>M. enterolobii</i>	3	1
	<i>D. alata</i>		2	1
			3	1
	<i>D. cayennensis</i>		3	1
	<i>D. alata</i>	<i>M. arenaria</i>	3	1
Pernambuco			2	3
			3	3
	<i>D. cayennensis</i>		4	1
		<i>M. incognita</i>	5	1
			2	3
	<i>D. alata</i>		3	3
			4	1
			5	1
			2	2
			3	3
	<i>D. cayennensis</i>		4	1
		<i>M. javanica</i>	5	1
			2	2
	<i>D. alata</i>		3	2
			4	1
			5	1
			2	1
	<i>D. cayennensis</i>		3	2
			4	1
		<i>M. enterolobii</i>	5	1
			2	1
	<i>D. alata</i>		3	1
			5	1
			2	1
	<i>D. cayennensis</i>		3	1
		<i>M. arenaria</i>	4	1
			2	1
	<i>D. alata</i>		3	2
			5	1
			2	2
	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>	3	2
			4	1
			5	1
Rio Grande do Norte			2	2
			3	4
	<i>D. cayennensis</i>		4	1
		<i>M. incognita</i>	5	1
			2	2
	<i>D. alata</i>		3	4

		4	2
		5	1
		2	2
	<i>D. cayennensis</i>	3	2
		4	1
	<i>M. javanica</i>	5	1
		2	3
	<i>D. alata</i>	3	2
		4	1
		5	1
		2	4
	<i>D. cayennensis</i>	3	3
		4	1
	<i>M. incognita</i>	5	2
		2	3
	<i>D. alata</i>	3	3
		4	2
		5	2
Sergipe	<i>D. cayennensis</i>	2	2
	<i>M. javanica</i>	3	6
	<i>D. alata</i>	2	2
		3	2

*Sendo: 1 = atribuído à ausência de sintoma na superfície da túbera, 2 = sintoma leve (1-25% dos sintomas na superfície da túbera), 3 = sintoma médio (26-50% dos sintomas na superfície da túbera), 4 = sintoma pesado (51-75% dos sintomas na superfície da túbera) e 5 = sintoma grave (> 75% dos sintomas na superfície da túbera).

A espécie com maior ocorrência foi *Meloidogyne incognita* com 51% dos registros em *Dioscorea* spp., seguida por *M. javanica* (29%), *M. enterolobii* (15%) e *M. arenaria* (4%) (Tabela 2). A espécie *M. incognita* foi encontrada em todos os nove estados do levantamento deste estudo, *M. javanica* só não foi observada no estado do Piauí, ocorrendo nos demais estados, *M. enterolobii* identificada apenas em quatro estados (Alagoas, Bahia, Maranhão e Paraíba) e *M. arenaria* em três estados (Alagoas, Paraíba e Pernambuco) (Tabela 2). De modo geral, foram observados diferentes níveis de sintomas nas túberas de inhame, com destaque de agressividade para 28 isolados que receberam nota 5, sendo 16 isolados de *M. incognita* de oito estados da região, dez isolados de *M. enterolobii* de cinco estados (Alagoas, Bahia, Maranhão, Pernambuco e Rio Grande do Norte) e dois isolados de *M. javanica* provenientes do estado do Rio Grande do Norte (Tabela 2).

Duas espécies de inhame hospedeiras do nematoides foram observadas: *D. cayennensis*, que hospedou 56,67% dos isolados de *Meloidogyne* obtidos nos nove

estados, e *D. alata*, com 43,33% das ocorrências registradas em oito estados, exceto Piauí (Tabela 2).

A incidência do nematoide das galhas em 100% das principais áreas nordestinas de cultivo de inhame é explicada em razão da utilização de túberas com poucas galhas como material de plantio e, conseqüentemente, fonte principal de inóculo em novos campos (BRIDGE, 1996). Neste estudo, nas túberas examinadas não foi observada a ocorrência de infecção mista com outro gênero de fitonematoides, diferentemente de Kolombia et al. (2020), que registrou, mesmo em baixa densidade, isolados de *Pratylenchus* spp. e *Scutellonema* spp., em alguns casos. Porém, durante o levantamento foi observado algumas túberas com sintomas da casca-preta-do-inhame, ocasionada por tais gêneros, similar à observação feita na Costa Rica (HUMPHREYS-PEREIRA et al., 2017).

Ademais, foi observado que túberas de inhame que não apresentavam sintomas de galhas também continham nematoides, embora em densidades baixas. Portanto, túberas assintomáticas podem estar infectadas, mas para a expressão dos sintomas, uma densidade populacional de nematoides mínima parece necessária (BRIDGE, 1972; COYNE et al., 2012).

Na literatura há relato da ocorrência de mais de uma espécie do nematoide das galhas em uma única túbera de inhame, como relatado por Kolombia et al., (2017) que verificaram infecção múltipla em 4% de suas amostras com a presença de *M. enterolobii*, *M. incognita* e *M. javanica*. Porém, neste levantamento, não foi detectada infecção múltipla, embora dentro de uma mesma área de amostragem tenha ocorrido mais de uma espécie de *Meloidogyne*. Outra espécie desse gênero, a *M. hapla* foi relatada parasitando o inhame em outros países, no entanto, não foram detectadas no presente estudo (KAWAMURA e HIRANO, 1961; PARK et al., 1998; KOLOMBIA et al., 2016).

Na detecção da primeira ocorrência de meloidoginose em *D. alata* em Pernambuco, Moura et al., (2010) identificaram as espécies *M. incognita* e *M. arenaria*. Neste estudo foi observada a espécie *M. arenaria* parasitando *D. cayennensis* e *D. alata*. Portanto é o primeiro relato do parasitismo em *D. cayennensis* para o estado de Pernambuco.

A relevância em conhecer os impactos que *Meloidogyne* spp. podem exercer sobre a cultura do inhame, bem como suas interações intra e interespecíficas, e sua correta identificação são características fundamentais para que práticas de manejo possam ser adequadamente recomendadas. Ainda que sejam conhecidas as conseqüências do

parasitismo de *Meloidogyne* spp. na cultura do inhame, há poucos relatos com relação ao comportamento específico de cada espécie (BRIDGE et al., 2005).

Avaliação da agressividade de isolados de *Meloidogyne*

Os dados das médias das variáveis de desenvolvimento da planta e do nematoide são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios das variáveis biomassa fresca da parte aérea da planta (BFPAP), biomassa seca da parte aérea da planta (BSPAP), peso das túberas (P), nível do sintoma (NS), número de ovos (NO), números de massas de ovos (NMO), fator de reprodução (FR) e número de juvenis de segundo estágio (J2) de isolados de *Meloidogyne* spp. seis meses após a inoculação em *Dioscorea cayennensis*.

TRAT	NO*	NMO*	FR*	J2*	NS*	P*	BFPAP*	BSPAP*
I1	12.874 gh	130,12 bc	1,28 gh	63,22 f	2,0 c	353,90 bcde	155,18 abc	135,01 a
I2	10.914 h	111,08 bc	1,17 h	82,56 cdef	2,0 c	367,94 bcde	180,26 abc	151,42 a
I3	14.276 efgh	124,04 bc	1,42 efgh	79,50 def	2,0 c	352,50 bcde	157,68 abc	132,45 a
I4	22.626 cd	133,64 bc	2,26 cd	86,38 bcdef	2,0 c	332,22 cde	177,82 abc	149,37 a
I5	13.362 gh	142,06 bc	1,33 gh	98,12 bcdef	2,0 c	351,48 bcde	121,52 c	102,08 a
I6	21.401 cd	139,78 bc	2,14 cd	98,14 bcdef	2,0 c	336,80 cde	172,38 abc	129,29 a
I7	13.824 fgh	103,98 bc	1,38 fgh	88,02 bcdef	2,0 c	386,10 bcde	183,36 abc	159,52 a
I8	11.723 h	118,24 bc	1,17 h	92,16 bcdef	2,0 c	407,50 bcd	186,04 abc	158,13 a
I9	17.984 defg	128,92 bc	1,79 defgh	87,68 bcdef	2,0 c	375,24 bcde	131,84 bc	112,06 a
J1	20.227 cde	150,70 bc	2,02 cde	94,88 bcdef	2,0 c	364,30 bcde	170,02 abc	127,52 a
J2	22.625 cd	172,05 b	2,26 cd	100,22 bcdef	2,0 c	349,52 bcde	216,84 abc	184,31 a
J3	19.787 cdef	150,68 bc	1,97 cdef	113,42 abcdef	2,0 c	348,92 bcde	133,48 bc	113,46 a
J4	18.530 defg	147,50 bc	1,85 defg	131,84 abcd	2,0 c	367,08 bcde	204,58 abc	177,98 a
J5	21.923 cd	154,42 bc	2,19 cd	96,06 bcdef	2,0 c	342,26 cde	190,06 abc	161,55 a
J6	14.452 efgh	143,60 bc	1,44 efgh	108,26 abcdef	2,0 c	364,38 bcde	149,98 abc	130,48 a
J7	21.266 cd	143,24 bc	2,12 cd	103,58 abcdef	2,0 c	331,26 cde	183,30 abc	159,47 a
J8	24.998 bc	157,54 b	2,49 bc	108,44 abcdef	2,4 bc	322,18 de	188,00 abc	163,56 a
E1	31.733 a	347,64 a	3,17 a	154,14 a	2,6 bc	305,60 de	228,66 ab	198,93 a
E2	30.129 ab	319,68 a	3,01 ab	138,78 ab	2,2 bc	291,02 e	139,00 abc	120,93 a
E3	29.174 ab	372,70 a	2,91 ab	134,02 ab	2,4 bc	296,38 e	206,36 abc	163,02 a
E4	30.838 ab	341,58 a	3,08 ab	119,50 abcde	3,0 a	313,52 de	175,30 abc	149,01 a
A1	13.681 fgh	119,70 bc	1,36 fgh	84,22 cdef	2,0 c	449,66 ab	198,80 abc	168,98 a
A2	12.511 gh	103,86 bc	1,25 gh	89,24 bcdef	2,0 c	430,52 abc	220,90 abc	192,18 a
A3	14.009 efgh	75,98 cd	1,42 efgh	78,22 ef	2,0 c	431,68 abc	238,50 a	207,50 a
Test	-	-	-	-	1,0 d	527,72 a	232,50 ab	202,28 a
CV	32,25	38,81	25,45	31,42	32,41	38,21	33,66	17,15

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si na coluna pelo teste de Tukey a 5% de significância. CV: Coeficiente de variação.

A média do número de ovos variou de 10.914 a 31.733, com maiores valores registrados nos isolados de *M. enterolobii*, todos acima de 29.000 ovos, seguido por *M. javanica* com valores médios de 20.476 ovos e *M. incognita* e *M. arenaria* com média de

15.442 e 13.400, respectivamente. Todos os isolados inoculados em *D. cayennensis* completaram o ciclo de vida na hospedeira, com multiplicação da população (Tabela 3).

Os valores médios do número de massas de ovos variaram de 372,70 a 75,98. As maiores médias foram registradas nos isolados de *M. enterolobii*, todos com valores médios superiores a 319 massas de ovos, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Os demais isolados de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* apresentaram médias inferiores a isolados de *M. enterolobii*, não diferindo entre si estatisticamente (Tabela 3). As médias do fator de reprodução variaram de 1,17 a 3,17, com maiores valores nos isolados de *M. enterolobii*, com médias superiores a 2,91, seguidos por *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* (Tabela 3).

O número de J2 variou de 63,22 a 154,14. Os maiores valores médios foram registrados em isolados de *M. enterolobii*, seguidos por *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* (Tabela 3).

A classificação sintomatológica das túberas apresentou notas médias variando de 1 a 3. O tratamento E4 registrou a maior nota média no experimento, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, os demais isolados de *M. enterolobii* apresentaram as demais notas acima de 2 juntamente com J8. As demais túberas inoculadas com as espécies *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* registraram notas média de 2 (Tabela 3). A alta ocorrência de *Meloidogyne* spp. é um dos principais problemas para a cultura, pois afeta drasticamente o valor comercial das túberas (Santos; Macêdo, 1998).

O parasitismo por *Meloidogyne* spp. ocasionou de modo geral nas plantas de *D. cayennensis* redução de biomassa. A biomassa fresca da parte aérea da planta apresentou reduções médias de 30% em plantas inoculadas com *M. incognita*, 23% com *M. javanica*, 19% com *M. enterolobii* e 6% em *M. arenaria*, com destaque para o tratamento A3, que teve aumento médio de 3% da biomassa fresca, com diferença estatística dos demais isolados. O tratamento com maior redução foi I5, com 48% de perda de biomassa, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Os demais tratamentos não diferiram, inclusive da testemunha (Tabela 3). A biomassa seca da parte aérea da planta mostrou redução semelhante à observada na BFPAP, com reduções médias de 32% em plantas inoculadas com *M. incognita*, com maiores reduções em I5 e I9, 25% com isolados de *M. javanica*, 22% de *M. enterolobii* e de 6% de *M. arenaria*. Todos os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas significativa para essa variável (Tabela 3).

O peso médio das túberas inoculadas apresentou redução variando de 18% a 45% em relação à testemunha, as maiores reduções foram registradas nos tratamentos com isolados de *M. enterolobii*, todos com queda de peso acima de 40%. As túberas inoculadas com *M. incognita* e *M. javanica* apresentaram redução acima de 30%. Isolados de *M. arenaria* ocasionaram as menores perdas, abaixo de 19%. As maiores reduções foram assinaladas nos tratamentos E2 e E3, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 3). A redução do peso das túberas de inhame infestadas com *Meloidogyne* spp. foi observada por Moura et al. (2005), porém os autores não realizaram quantificação. Na literatura há registro da redução ocasionada por outros fitonematoides, com perda de 30% por *S. bradys* (PINHEIRO et al., 2016). A redução da biomassa das plantas e peso das túberas é explicada pela presença de fitonematoides no sistema radicular, que reduzem a produção da planta com visualização de sintomas de galhas nas túberas (NATALE et al., 2009).

As espécies *M. incognita* e *M. javanica* são de modo geral as espécies com maior distribuição e prevalência na região Nordeste, porém *M. enterolobii* é a espécie mais agressiva, como foi observado tanto em condições de casa de vegetação, como observada no levantamento utilizando a escala diagramática com apresentação de sintomas nível quatro e cinco. Tais informações são importantes tanto para o conhecimento da doença em nível nacional e internacional, com a identificação de agentes causais e a determinação de agressividade, dados este que eram carentes na principal região produtora de inhame do Brasil. Portanto é fundamental a correta diagnose do agente causal em áreas de cultivo de inhame com infestação deste gênero, pois a depender da espécie presente e prevalente, será realizado o manejo eficiente da doença.

CONCLUSÕES

- Quatro espécies de *Meloidogyne* estão associadas à cultura do inhame na região Nordeste brasileira;
- *Meloidogyne incognita* é a espécie mais frequente e com larga disseminação nas áreas produtoras;
- Em condições de casa de vegetação, *M. enterolobii* apresentou elevado grau de agressividade na perda de componentes agrônômicos e parâmetros de parasitismo na cultura do inhame.

REFERÊNCIAS

- Almeida AVDL et al. (2020) Treatment of yam tubers infected by *Scutellonema bradys* with sodium hypochlorite. *Nematropica* 50(1): 29-35.
- Bridge J (1972) Nematode problems with yams (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. *PANS Pest Articles & News Summaries* 18: 89-91.
- Bridge J (1996) Nematode management in sustainable and subsistence agriculture. *Annual review of Phytopathology*, 34(1): 201-225.
- Castro JDC (2019) *Meloidogyne enterolobii* e sua evolução nos cultivos brasileiros. *Informe Agropecuário* 40(306): 41-48.
- Coyne D et al. (2012) Comparison of pathogenicity of geographically separate populations of *Scutellonema bradys* on yam (*Dioscorea* spp.) in West Africa *Nematropica* 35: 181-190.
- Dias JPT et al. (2011) Produção de mudas de *Dioscorea bulbifera* L. em função do tamanho dos propágulos. *Revista Cultivando o Saber* 4(1): 54-61.
- FAOSTAT - Food and Agriculture Organization. Disponível em<<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acessado: 16 dez 2021.
- Ferreira DF (2014) Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia* 38(2): 109-112.
- Humphreys-Pereira DA et al. (2017) Plant-parasitic nematodes associated with yams (*Dioscorea* spp.) and identification of *Meloidogyne* and *Pratylenchus* species in three yam-growing regions of Costa Rica. *Nematropica* 47(2): 120-134.
- Kolombia YA et al. (2017) Diversity of root-knot nematodes associated with tubers of yam (*Dioscorea* spp.) established using isozyme analysis and mitochondrial DNA-based identification. *Journal of Nematology* 49(2): 177.

Kolombia YA et al. (2020) Distribution, prevalence, and severity of damages caused by nematodes on yam (*Dioscorea rotundata*) in Nigeria. *Nematropica* 50(1): 1-18.

Kolombia YA, Karssen G, Viaene N, Kumar PL, Coyne DL, Bert W (2014) Identification and diversity of the root-knot nematodes affecting yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. *Journal of Nematology* 46:190.

Machado ACZ, Silva AS (2019) Extração de nematoides. In: Machado ACZ, Silva AS, Ferraz LCCB (Ed). *Métodos em Nematologia Agrícola*. ed. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Nematologia. pp. 9-12.

Mai WF, Mullin PG, Lyon HH, Loeffle K (1996) *Plant-parasitic nematodes: a pictorial key to genera*. 5 th. Ed. Cornell University Press, Ithaca, 277 p.

Moens M, Perry RN, Starr JL (2009) *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites, In Perry RN, Moens M, Starr JL (Eds), *Root-knot nematodes*, Wallingford: CABI, pp. 1–18.

Moura RM, Oliveira IS, Torres GRDC (2005) Fitonematóides associados ao inhame da costa em seis municípios produtores da Zona da Mata do Estado de Pernambuco, Brasil. *Nematologia brasileira* 29(2): 299-302.

Natale W, Rozane DE, Souza HA, Amorim DA (2009) *Cultura da goiaba: do plantio à comercialização*. Jaboticabal: UNESP. 284p.

Pinheiro BJ, Pereira BR, Madeira RN (2016) Manejo de nematoides na cultura do inhame-cará (*Dioscorea* spp.). Brasília, DF: EMBRAPA.

Santos ESD, Macêdo LDS (1998) Manejo da irrigação, densidade populacional e adubação mineral para a cultura do inhame. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 2: 32-36.

Siqueira MVBM et al. (2014) Water yam (*Dioscorea alata* L.) diversity pattern in Brazil: an analysis with SSR and morphological markers. Genetic resources and crop evolution 61(3): 611-624.

CAPÍTULO IV

MELOIDOGYNE ARENARIA ON DIOSCOREA CAYENNENSIS IN BRAZIL

Publicação: **Revista Caatinga**

Mossoró, RN

Nota submetida

JCR = 0,758 / Qualis = B1

MELOIDOGYNE ARENARIA ON DIOSCOREA CAYENNENSIS IN BRAZIL

FRANCISCO JORGE CARLOS SOUZA JUNIOR², ELVIRA MARIA REGIS PEDROSA^{3*}, MAYARA CASTRO ASSUNÇÃO², LIANY REGINA BEZERRA DE OLIVEIRA SILVA², LILIAN MARGARETE PAES GUIMARÃES², CARMEM DOLORES GONZAGA SANTOS⁴

*Corresponding author

¹Received for publication in mm/dd/aaaa; accepted in mm/dd/aaaa.

²Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil; jorgesouza@alu.ufc.br – ORCID: 0000-0003-2086-9857, mayara_castroa@hotmail.com - ORCID: 0000-0002-3127-7817, lianyregina@gmail.com – ORCID: 0000-0001-8742-7872, lilian.guimaraes@ufrpe.br - ORCID: 0000-0003-1740-6077.

³Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil; elvira.pedrosa@ufrpe.br – ORCID: 0000-0002-0755-8352.

⁴Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza, CE, Brazil; carmelo.ufc@gmail.com – ORCID: 0000-0002-3364-7623.

ABSTRACT – One of the main phytosanitary problems of yellow yam (*Dioscorea cayennensis*) is parasitism by *Meloidogyne* spp. due to the high susceptibility of the crop. In production areas in Northeastern Brazil, tubers with symptoms of parasitism by root-knot nematodes were collected in the city of Goiana. After the collections, the extractions and identification of the nematodes were carried out according to the morphological, biochemical and molecular characters. *Meloidogyne arenaria* was identified through configuring the perineal region, analysis of the isoenzyme esterase, and molecular profile of the ITS and 28S rDNA regions, and the pathogenicity was confirmed by Koch postulates. The recognition of *M. arenaria* parasitizing *D. cayennensis* through molecular biology techniques updates the information about the range species of root-knot nematodes species associated with yellow yam in tropical areas.

Keywords: Molecular biology. Root-knot nematode. Yellow yam. Esterase.

MELOIDOGYNE ARENARIA EM DIOSCOREA CAYENNENSIS NO BRASIL

RESUMO – Um dos principais problemas fitossanitários do inhame amarelo (*Dioscorea cayennensis*) é o parasitismo por *Meloidogyne* spp. devido à alta suscetibilidade da cultura. Em áreas de produção no Nordeste do Brasil, tubérculos com sintomas de parasitismo por nematoides-das-galhas foram coletados na cidade de Goiana. Após as

coletas, foram realizadas as extrações e identificação dos nematoides de acordo com os caracteres morfológicos, bioquímicos e moleculares. *Meloidogyne arenaria* foi identificada através da configuração da região perineal, análise da isoenzima esterase e perfil molecular das regiões ITS e 28S rDNA, e a patogenicidade foi confirmada pelos postulados de Koch. O reconhecimento de *M. arenaria* parasitando *D. cayennensis* por meio de técnicas de biologia molecular atualiza as informações sobre a variedade de espécies do nematoide-das-galhas associada ao inhame amarelo em áreas tropicais.

Palavras-chave: Biologia molecular. Nematoide-das-galhas. Inhame amarelo. Esterase.

INTRODUCTION

The yellow yam 'Da Costa' (*Dioscorea cayennensis* Lam.) belongs to the class of monocots and the family Dioscoreaceae, with herbaceous and climbing habit, the fundamental characteristic for its cultivation, production and feeding is through its vegetative development with the formation of tubers (SENANAYAKE et al., 2012; DANTAS et al., 2013). Due to its wide dispersion, the 'Da Costa' yam is grown mainly in tropical and subtropical regions around the world, prevailing over other species of the genus *Dioscorea* L. (NGO-NGWE et al., 2014). In Brazil, the Northeast region is the largest producer, consumer and trader of yam culture in the country, which plays an important social, cultural and economic role, Pernambuco being one of the highlights in national production (BRITO et al., 2011).

For the culture of yellow yam, the occurrence of diseases becomes a limiting factor of production, mainly those caused by nematodes of the genus *Meloidogyne* spp., also known as gall nematodes (MUDIOPE et al., 2012). Gall nematodes correspond to the most evolved organisms about plant root parasitism, being of great economic importance, ranking first in the world in crop losses (JONES et al., 2013). In general, the decrease in the quantity and/or quality of production is the result of a complex and highly adapted nematode parasitism with almost all plant species, in addition to a wide geographical distribution, although the impact is greater in tropical areas (MOENS; PERRY; STARR., 2009; JONES et al., 2013).

The genus *Meloidogyne* has more than 100 described species, the most frequent in Brazil being associated with the yam culture *M. incognita* (Kofoid and White), *M. javanica* (Treub.) and *M. arenaria* (Neal) (PINHEIRO; PEREIRA; MADEIRA, 2016). In the Northeast of Brazil, *M. incognita* and *M. arenaria* occur with greater assiduity on the yam, presenting high severity in the production areas and causing, in many cases, high

losses to production and commercialization (MOURA; OLIVEIRA; TORRES, 2005). For the identification of *Meloidogyne* spp. it is necessary to apply the integrative taxonomy, based on observations of the morphological characteristics of females, males and J2, of the biochemical characters, through the analysis of the isoenzyme profile; and use of molecular techniques, with the use of markers.

In view of the importance that *Meloidogyne* spp. exercise on crops, the correct diagnosis of species is essential, as well as the distribution in the production areas, being an important tool for the development of efficient management programs. Therefore, it is necessary to integrate conventional methods, based on morphometry, and molecular analyzes.

MATERIAL AND METHODS

In September 2019, samples of *D. cayennensis* tubers with symptoms of parasitism by root-knot nematodes (Fig. 1A-B) were collected in the city of Goiana (7° 38' 28" S 34° 57' 16" W), in Pernambuco state, Brazil. The tubers were processed for nematode extraction according to the method proposed by Coolen and D'Herde (1972). Perineal cuts were made, using 20 females, according to the methodology of Taylor and Netscher (1974). The determination of the esterase profile was made according to Carneiro and Almeida (2001), using one female per sample with 20 repetitions (n = 20).

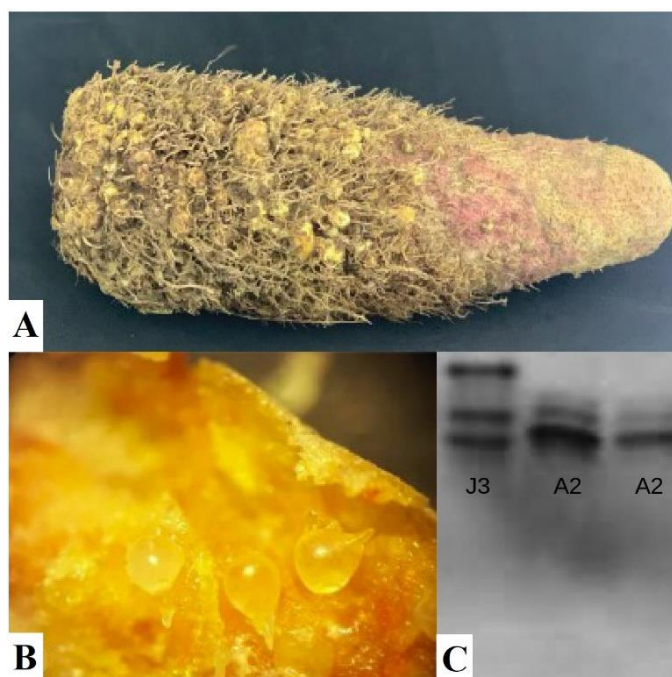


Figure 1. A) Yam tuber with symptoms of *Meloidogyne arenaria*; B) *M. arenaria* females viewed under a stereoscopic microscope; C) Esterase profiles of *M. arenaria* (A2) detected in *Dioscorea cayennensis* and reference isolate *M. javanica* (J3).

Molecular identification was performed through the amplification and sequencing of the D2-D3 regions of the 28S rDNA segment with the primers D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') and D3B (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3') (DE LEY et al., 1999) and ITS with the VRAIN2F (5'-CTTTGTACACACCGCCCGTCGCT-3') VRAIN2R (5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAGGGAATC-3') (VRAIN et al., 1992). PCR amplifications were performed as described in Powers and Harris (1993). The PCR products were visualized on an agarose gel 2%, purified with the kit AxyPrep™ PCR Cleanup (Axygen®) and sequenced in both directions with the same primers used in the amplification.

Sequences of ex-type isolates were used as a reference, obtained from GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) and multiple sequence alignments were performed with the MAFFT (Kato and Toh, 2013) manually adjusted to allow maximum alignment and maximum similarity between sequences. The ambiguously aligned regions were excluded from the analyzes. For each locus alignment, Maximum Likelihood (ML) method were used to infer the phylogenetic relationships among species, using the RAxML-HCP2 v.8.2.8 (STAMATAKIS, 2014) implemented in CIPRES Portal v.2.0 (<https://www.phylo.org/portal2/home.action>) with 1,000 repetitions.

RESULTS AND DISCUSSION

The perineal patterns of *Meloidogyne* females (PE07) population showed a low, flat dorsal arch with smooth and continuous streaks gently folded to the tip of the tail on the lateral line, in addition to a distinct, slightly irregular lateral field.

In females, the body length was $1305.0 \pm 401.5 \mu\text{m}$ (1000.3 - $1750.5 \mu\text{m}$); the stylus measured $23.5 \pm 1.6 \mu\text{m}$ (22.0 - $24.1 \mu\text{m}$) in length; the dorsal esophageal gland orifice (DGO) was $4.8 \pm 0.7 \mu\text{m}$ (3.7 - $5.1 \mu\text{m}$). For J2, the body length was $452.3 \pm 32.2 \mu\text{m}$ (410.2 - $489.6 \mu\text{m}$); stylus length $10.2 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (9.6 - $11.0 \mu\text{m}$); DGO equal to $4.7 \pm 0.7 \mu\text{m}$ (3.2 - $6.2 \mu\text{m}$); tail length = $45.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (44.9 - $46.1 \mu\text{m}$); hyaline tail terminus = $10.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$ (9.9 - $10.5 \mu\text{m}$).

The polymorphisms of the esterase bands by electrophoresis revealed the phenotype A2 (Rm 1,20, 1,30) typical of *M. arenaria* (Fig. 1C). The sequences of the studied rDNA regions were submitted to GenBank (ITS: MT994682 e D2-D3 28S: MT997277). Research at BLAST showed 98% to 97% identity with sequences of *M. arenaria* isolates

from Brazil. Phylogenetic analyzes using MV, placed the *Meloidogyne* (PE07) population isolated from *D. cayennensis* in a clade with the *M. arenaria* sequences from GenBank (Fig. 2).

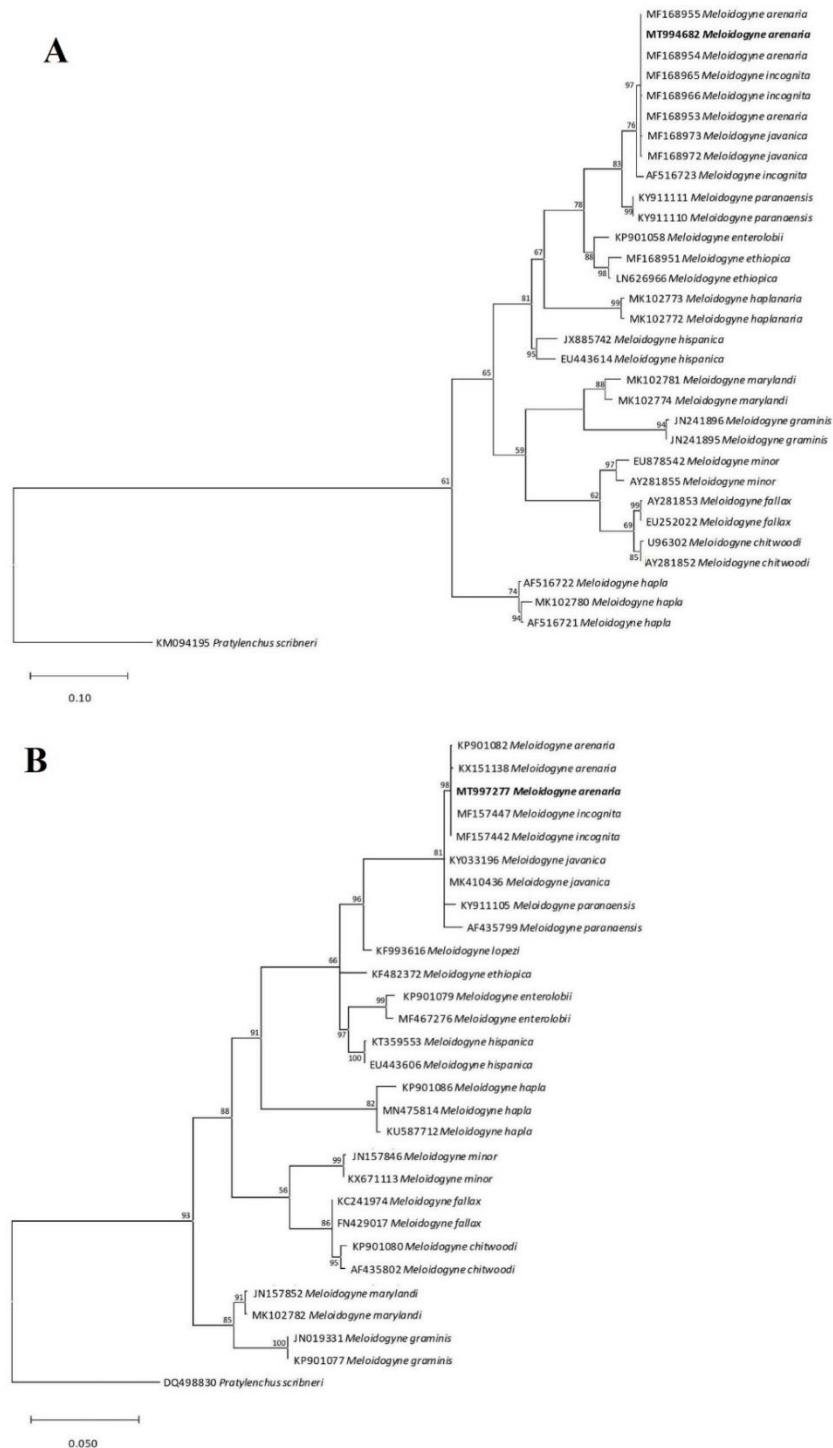


Figure 2. Phylogenetic relationship of *Meloidogyne* species based on sequence alignment of the (A) ITS rDNA region and (B) 28S rDNA D2-D3 expansion fragments. The phylogenetic tree was estimated by Maximum Likelihood. The scale bar indicates the expected number of substitutions per site.

To confirm the pathogenicity of *M. arenaria* (PE07) as the disease causal agent in *D. cayennensis*, seedlings were grown under greenhouse in 8 L pots, containing autoclaved soil. One-month-old seedlings were inoculated with 10,000 eggs/J2 of the PE07 population. Six months after inoculation, roots and tubers exhibited gall symptoms.

Despite *M. arenaria* was reported by Leal and Ponte (1980) and Moura and Freitas (1983) on yellow yam in Brazil, the identification was based on morphological characteristics such as perineal patterns. This is the first record of *M. arenaria* parasitizing *D. cayennensis* using molecular profile of the ITS and 28S rDNA regions, in addition to analysis of the isoenzyme esterase and morphological characterization. The correct species determining is of paramount importance, as this genus cause significant yield losses in several agricultural crops (Ferraz and Brown, 2016). Thus, with the precise diagnosis, the recommended management measures must be more effective.

CONCLUSION

The recognition of *M. arenaria* parasitizing *D. cayennensis* updates information and entails new paradigm about the range species of root-knot nematodes associated with yellow yam in tropical areas.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Foundation for the Support of Science and Technology of the State of Pernambuco and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel for the granting of scholarships.

REFERENCES

- BRITO, T. T. et al. Composição centesimal de inhame (*Dioscorea* sp.) in natura e minimamente processado. **Scientia Plena**, 7: 1-7, 2011.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides das galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, 25: 35-44, 2001.
- COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: STATE AGRICULTURAL AND

ENTOMOLOGY RESEARCH STATION, 1972. 77 p.

DANTAS, T. A. G. et al. Produção do inhame em solo adubado com fontes e doses de matéria orgânica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 17: 1061-1065, 2013.

DE LEY, P. et al. Molecular and morphological characterization of two reproductively isolated species with mirror-image anatomy (Nematoda: *Cephalobidae*). **Nematology**, 1: 591-612, 1999.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. Manaus: NORMA EDITORA, 2016. 268 p.

JONES, J. T. et al. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, 14: 946-961, 2013.

KATOH, K.; TOH, H. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, 30: 772-780, 2013.

LEAL, O. B.; PONTE, J. J. Meloidoginose em túberas de inhame *Dioscorea cayennensis* LAM, destinadas à exportação. **Sociedade Brasileira de Nematologia**, 4: 115-118, 1980.

MOENS, M.; PERRY, R. N.; STARR, J. L. *Meloidogyne* species – a Diverse Group of Novel and Important Plant Parasites. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Ed.). **Root-knot nematodes**. Wallingford, Oxfordshire: CABI, 2009. p. 1-17.

MOURA, R. M.; OLIVEIRA, I. S.; TORRES, G. R. C. Fitonematóides associados ao inhame da costa em seis municípios produtores da Zona da Mata do Estado de Pernambuco, Brasil. **Nematologia Brasileira**, v: 299-302, 2005.

MOURA, R. M.; FREITAS, O. M. L. Observações sintomatológicas sobre a Meloidogynose do inhame (*Dioscorea cayennensis*). **Fitopatologia Brasileira**, 8: 243-249, 1983.

MUDIOPE J. et al. Damage to yam (*Dioscorea* spp.) by root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) under field and storage conditions in Uganda. **Nematropica**, 42: 137-145, 2012.

NGO-NGWE, M. F. S. et al. Nuclear DNA content analysis of four cultivated species of yams (*Dioscorea* spp.) from Cameroon. **Journal of Plant Breeding and Genetics**, 2: 87-95, 2014.

PINHEIRO, J. B.; PEREIRA, R. B.; MADEIRA, N. R. **Manejo de nematoides na cultura do Inhame-cará (*Dioscorea* spp.)**. Brasília: EMBRAPA, 2016. 13 p. (Circular Técnica, 150).

POWERS, T. O.; HARRIS, T. S. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, 25: 1-6, 1993.

SENANAYAKE, S. A. et al. Proximate analysis and phytochemical and mineral constituents in four cultivars of yams and tuber crops in Sri Lanka. **Tropical Agricultural Research and Extension**, 15: 32-36, 2012.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, 30: 1312-1313, 2014.

TAYLOR, A. L.; NETSCHER, C. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Nematologica**, 20: 268-269, 1974.

VRAIN, T. C. et al. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. **Fundamental & Applied Nematology**, 15: 563-573, 1992.

CAPÍTULO V**CONCLUSÕES GERAIS**

CONCLUSÕES GERAIS

- As espécies *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. enterolobii* e *M. arenaria* estão presentes em áreas produtoras de inhame do Nordeste do Brasil, sendo o primeiro relato de *M. enterolobii* em *Dioscorea* spp. no país.
- As espécies de inhame *Dioscorea cayennensis*, *D. alata* e *D. trifida* são cultivadas no Nordeste brasileiro, sendo o primeiro relato no Brasil da meloidoginose em *D. trifida*;
- No Nordeste brasileiro, há prevalência da espécie *M. incognita* com 35,5% das ocorrências, seguido por *M. javanica* com registro de 33,3% dos isolados, *M. enterolobii* (17,7%) e *M. arenaria* (13,3%).
- A espécie *D. cayennensis* registrou 53,3% dos assinalamentos de espécies de *Meloidogyne* em todos os nove estados levantados, seguido por *D. alata* com 42,2% de isolados de toda região nordeste e *D. trifida* com 4,5% dos registros os quais se restringiram ao estado do Maranhão.
- A incidência de sintomas de galhas foi de 100% em todas as túberas examinadas das amostras coletadas, com diferentes graus de severidades.
- Em condições de casa de vegetação, *M. enterolobii* tem elevado grau de agressividade na perda de componentes agrônômicos e parâmetros de parasitismo na cultura do inhame.
- *Meloidogyne* spp. estão presentes em todas as áreas examinadas de produção da cultura de inhame nos diferentes estados da região e exigem um manejo eficaz de nematoides de inhame na região.