



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA/ ÁREA FITOSSANIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA
LABORATÓRIO DE FITONEMATOLOGIA – LAFNEMA

Estágio Supervisionado Obrigatório – ESO

**Relatório Final de atividades do programa Institucional de Bolsas de
Iniciação Científica – PIBIC /FACEPE/ 2020**

**Etiologia, variabilidade genética de populações de *Meloidogyne* spp.
associadas à cultura do Inhame no estado de Pernambuco.**

Liany Regina Bezerra de Oliveira Silva

Recife

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA/ ÁREA FITOSSANIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA
LABORATÓRIO DE FITONEMATOLOGIA – LAFNEMA

**Etiologia, variabilidade genética de populações de *Meloidogyne* spp.
associadas à cultura do Inhame no estado de Pernambuco.**

LIANY REGINA BEZERRA DE OLIVEIRA SILVA

Trabalho de Graduação apresentado à
Universidade Federal Rural de Pernambuco,
como requisito para a conclusão do curso de
Bacharelado em Agronomia sob orientação e
supervisão da Profa. Dra. Elvira Maria Regis
Pedrosa.

Recife

2022

1.INTRODUÇÃO

O gênero *Dioscorea* pertencem à família Dioscoreaceae, conhecida popularmente como inhame ou cará-da-costa, essas espécies apresentam hábito herbáceo e são utilizadas para fins alimentícios por causa da sua alta qualidade nutricional e energética; e medicinais podendo atuar como anti-inflamatório, por exemplo (KIM et al., 2004; SENANAYAKE et al., 2012; DANTAS et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2001; MESQUITA, 2002).). Com mais de 650 espécies descritas, esse gênero é amplamente distribuído pelas regiões do mundo com cerca de 8,9 milhões de hectares cultivados, sendo o Brasil responsável por 0,3% (SANTOS, 2005; GOVAERTS et al., 2007; ZAPPI, 2015; FAO, 2021). Em 2019, o Brasil produziu em torno de 249 mil toneladas de *Dioscorea* spp., e na região Nordeste essa produção correspondeu a aproximadamente 90% da produção nacional (ASSIS MOURA e SILVA, 2017; FAO, 2021). As espécies *Dioscorea cayennensis* (Inhame da costa) e *D. alata* (São Tomé ou cará) são cultivadas na região Nordeste, sendo Pernambuco e Paraíba os principais estados produtores (SIQUEIRA, 2011; SILVA et al., 2012).

Ao longo de seu cultivo e desenvolvimento problemas fitossanitários que ocorrem em campo e estão associados ao parasitismo na cultura do inhame vão influir diretamente na quantidade e qualidade da produção; e dentre esses problemas pode haver queima das folhas através de contaminação fúngica, viroses, doenças como a casca preta e a formação de galhas provocadas por fitonematoides do solo (OLIVEIRA et al., 2005; SEAL e MULLER, 2007; SIQUEIRA, 2011; LEITE e NASCIMENTO, 2018). Com relação aos fitonematoides relacionados, o nematoide-das-galhas pertencente ao gênero *Meloidogyne* Goeldi é considerado um dos mais importantes (LILLEY et al., 2012; MOURA, 2016). 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).

Seu ciclo de vida é composto por seis estádios fenológicos: ovo, quatro estádios juvenis (J1, J2, J3 e J4) e adulto; é no estágio J2 que ocorre a infecção e danos na planta hospedeira, em que o indivíduo penetra nas raízes e induz a formação das galhas devido ao estabelecimento de seu sítio de alimentação a partir da formação de células gigantes (ABAD et al, 2009; VIDAL et al., 2019). A depender das condições do meio, ocorre a diferenciação do indivíduo no estágio J4, se não for favorável a diferenciação é em macho e ele sai da raiz, e se favorável diferencia-se em fêmea, e esta permanece na raiz e continua seu ciclo reprodutivo com a produção de ovos (WILLIAMSON e GLEASON, 2003).

Existem aproximadamente 100 espécies descritas do gênero *Meloidogyne*, dentre essas três se destacam por serem predominantes no Nordeste brasileiro e são as principais espécies causadoras de galhas no inhame, são elas: *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White), *M. javanica* (Treub.) e *M. arenaria* (Neal) (HUNT e HANDOO, 2009; SILVA et al., 2016; MOURA, 2016). No

Nordeste do Brasil, *M. incognita* e *M. arenaria*, ocorrem com maior frequência sobre o inhame, apresentando alta incidência e severidade nas áreas de produção, ocasionando, em muitos casos, elevados prejuízos à produção e à comercialização (MOURA et al., 2005).

A identificação de *Meloidogyne* spp. inicialmente é realizada a partir de características morfológicas de fêmeas, machos e J2; e uma das metodologias para o diagnóstico inicial é a técnica com base no padrão perineal das fêmeas (EISENBACK e HUNT, 2009; CAMPOS e VILLAIN et al., 2018). No entanto, esse método não pode ser aplicado para todas as espécies, devido às falhas comuns que ocorrem na identificação por causa das variações existentes nesse padrão, em que as diferenças entre espécies com regiões perineais semelhantes não são detectadas, como ocorreu na identificação de *M. paranaenses* em *M. incognita* por causa da semelhança no padrão de estrias lisas (CARNEIRO et al., 2004; CARNEIRO e COFCEWICZ, 2008). Mesmo para taxonomistas experientes a identificação de *Meloidogyne* spp. é um desafio devido às suas variações morfológicas intra e interespecíficas (CARNEIRO et al., 2000).

O estabelecimento de um método de controle eficiente e eficaz para fitonematoides requer que sua identificação seja confiável e precisa (CLAPP et al., 2000). A identificação molecular é uma técnica que vem sendo adotada nas ciências agrárias ao longo dos anos pela vantagem de ser mais eficiente, rápida e precisa, e por não sofrer influência de fatores ambientais (GOULÃO e OLIVEIRA, 2001; FALEIRO, 2007; BARCELLOS e HUNGRIA, 2010). Logo, há o desenvolvimento de metodologias mais modernas para a identificação de *Meloidogyne* spp. como eletroforese de isoenzimas, técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction) e utilização de marcadores moleculares (BLOK e POWERS, 2009; EISENBACK e HUNT, 2009, SANTOS et al., 2019).

A aplicação de marcadores moleculares com a técnica da PCR funciona como porta de entrada para estudos envolvendo a variabilidade intraespecífica de *Meloidogyne* spp. (BARROS et al., 2018; SANTOS et al., 2019). Os marcadores moleculares mais utilizados são SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) e AFLP (Amplified fragment length polymorphism), e estes podem determinar a variabilidade intraespecífica existente entre os nematoides das galhas (RANDIG et al., 2002; LAX et al., 2007; CORREA et al., 2014).

Os marcadores ISSR são microssatélites que apresentam alta variabilidade, natureza multialélica, reprodutibilidade e ampla cobertura do genoma (PARIDA et al., 2009). Sua técnica é baseada na PCR com a utilização de apenas um primer (com 16 a 20 pb), de fácil execução, baixo custo e com alto grau de polimorfismo (BORBA et al., 2005; COSTA, 2010). Esses marcadores anelam-se em regiões específicas do genoma e os segmentos de DNA são amplificados por reações simples, produzindo um padrão reprodutivo de segmentos amplificados (REDDY et al., 2002; RODRIGUES, 2010).

Para estudos envolvendo diversidade e variabilidade genética, eles vêm sendo muito utilizados e uma característica relevante é por não necessitarem de informação prévia da

sequência de DNA para que seja amplificado (ZIETKIEWICZ et. al., 1994; BARTH et al., 2002; DOMINGUES et al., 2017). E assim vão dar suporte no estudo da diversidade genética em populações, por meio de perfis de bandas geradas com o auxílio de primers de sequências aleatórias (SANTOS, 2011).

Portanto, a importância em garantir que as espécies de *Meloidogyne* sejam corretamente identificadas por meio de técnicas moleculares, vai induzir diretamente na escolha do método de controle que poderá ser empregado nas áreas infestadas (SILVA et al., 2016). Sendo assim, diante da influência que *Meloidogyne* spp. exerce sobre as culturas, é essencial que a correta identificação seja realizada a fim de descobrir o comportamento da espécie em campo. Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo identificar espécies de *Meloidogyne* associadas ao inhame, coletadas em diferentes regiões produtoras do Estado de Pernambuco.

2.OBJETIVOS

2.1.Geral

Identificar as espécies de *Meloidogyne* spp. que ocorrem em espécies de inhame cultivados no estado de Pernambuco, Brasil, a partir de características morfológicas, com base na configuração perineal de fêmeas, da caracterização bioquímica de perfil de esterase e com marcadores moleculares.

2.2.Específicos

- Determinar a etiologia e a diversidade genética dos isolados obtidos de diferentes áreas de plantio no Estado de Pernambuco.
- Caracterização filogenética de isolados de *Meloidogyne* através de estudos bioquímicos e morfométricos;
- Posicionar filogeneticamente os isolados de *Meloidogyne* em relação a outras espécies do mesmo gênero através de reconstruções filogenéticas multilocus;
- Avaliar a prevalência das espécies de *Meloidogyne* nas diferentes áreas amostradas.
- Mapeamento das espécies de *Meloidogyne* nas diferentes áreas de cultivo. Desta forma, pode-se definir melhores estratégias de controle baseadas nas espécies prevalentes em cada área.
- Estabelecimento e manutenção de uma coleção de isolados de *Meloidogyne* spp. causadores de meloidogynose em inhame na Coleção Nematológica da UFRPE, oriundos

de diferentes regiões produtoras do Estado de Pernambuco. A conservação destes isolados é fundamental no âmbito do presente trabalho e formará uma coleção referência para outros trabalhos desta natureza no Brasil;

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.Local de realização do trabalho

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitonematologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

3.2.Amostragem, extração de populações

As coletas das populações de nematoides presentes nas áreas produtoras da cultura do inhame foram oriundas das cidades de Aliança, Bonito, Condado, Goiana e Recife no Estado de Pernambuco. Raízes e solo de áreas infestadas foram coletados, o material foi acondicionado em duplo saco plástico, devidamente identificado com etiquetas padronizadas, e encaminhado ao Laboratório de Fitonematologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). As amostras foram homogeneizadas e processadas imediatamente para extração, a partir de 300 cm³ de solo e 10 g de raiz, utilizando-se o método da flotação centrífuga (JENKINS, 1964) (Figura 1). As suspensões de fitonematoides obtidas foram mantidas sob refrigeração (4-6°C), realizando-se a contagem dos fitonematoides em lâminas de Peters, sob microscópio estereoscópio, utilizando-se a média de duas leituras. Os resultados foram computados em número de isolados por 300 cm³ de solo e 10 g de raízes. As identificações a nível de gênero dos fitonematoides foram feitas com chave de identificação de Mai et al., (1996).



Figura 1. Extração de fitonematóide pelo método da flotação em centrífuga. (A) Amostra de solo; (B) Agitação mecânica; (C) Conjuntos de peneiras de 20 mesh acoplada sobre outra de 400 mesh; (D) Centrifugação; (E) Eliminação da sacarose; (F) Observação em Lupa.

3.3. Multiplicação e preservação de populações de *Meloidogyne* spp.

Para cada amostra de raízes de inhame com sintomas de galhas de *Meloidogyne*, foi feita a extração de massa de ovos em lupa, visando realizar a inoculação em uma muda de tomate “santa clara” com 21 dias por cada massa de ovos. Para os fitonematoides extraídos do solo e raízes das áreas coletadas foram inoculados em vaso igualmente com tomate “santa clara”, visando obter massa de ovos na planta hospedeira suscetível. Após 45 dias, os tomateiros “santa clara”, inoculados com massas de ovos e com fitonematoides, foi feita a extração para identificação e preservação das populações em tomateiro na casa de vegetação.

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

Os 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 e Almeida (2001), utilizando uma fêmea por amostra. 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 o primers primers D2A e D3B. A região ITS foi amplificada usando os primers 18S e Vrain2R. 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 um volume final de 25 µl, utilizando o 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%. Os produtos de PCR foram purificados com o kit AxyPrep™ PCR Cleanup (Axygen®), e posteriormente sequenciados nos dois sentidos com os mesmos primers utilizados na amplificação. Os sequenciamentos foram realizados pela empresa Ludwig Biotec (Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil).

Sequências de isolados ex-type foram utilizadas como referência e obtidas a partir do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Os alinhamentos múltiplos das sequências foram realizados com o programa MAFFT (KATO e TOH, 2013). Alinhamentos foram ajustados manualmente para permitir o alinhamento máximo e similaridade máxima entre as sequências. Regiões ambiguamente alinhadas foram excluídas das análises. Inferência Bayesiana foi utilizada para reconstrução filogenética. jModelTest v. 0.1.1 (POSADA, 2008) foi utilizado para determinar o

melhor modelo de substituição de nucleotídeos para cada gene utilizando o Critério Bayesiano de Informação corrigido (BICc). O alinhamento com todos os genes concatenados foi particionado, com cada gene e seu referente modelo de substituição de nucleotídeos, e posteriormente submetidos à Análise Bayesiana utilizando o MrBayes v. 3.2.1 (RONQUIST et al. 2012).

3.5. Variabilidade intraespecífica de populações de *Meloidogyne*

O estudo da variabilidade genética de populações de *Meloidogyne* coletadas em áreas de produção de inhame foi realizado por meio de marcadores moleculares ISSR. As reações de amplificação foram realizadas num volume de 13 µL contendo 9 ng de DNA genômico, utilizando as condições de PCR descritas por Carneiro et al. (2008). Nove primers ISSR (Integrated DNA Technologies) foram utilizados: (CA)₈, (AC)₈, (CCA)₅, (CA)₈ CTCT T, (GT)₈YA, (GACA)₄ e (GTC)₆. Os produtos de amplificação foram separados por electroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5% (90 mM Tris-básico, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,3) a uma corrente constante de 100 mA por aproximadamente 3 horas e corado com SYBR Green® e visualizados sob luz UV.

3.6. Diversidade e distribuição das espécies de *Meloidogyne*

Baseado no número de isolados 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/cidade. Os valores de frequências relativas foram expressos em percentagem.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos até o presente momento 60 isolados de *Meloidogyne* spp. na cultura do inhame no Estado de Pernambuco, 40 isolados foram identificados em 2019 sendo 18 isolados de Goiana em quatro áreas, oito de Recife em três áreas, sete isolados de Bonito em duas áreas e sete isolados de Condado em duas áreas. As espécies de *Meloidogyne* foram provenientes de 61,7% de amostras de *Dioscorea cayennensis* e 38,3% de *D. alata* (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Meloidogyne* associado a cultura do inhame coletados no Estado de Pernambuco utilizados no trabalho.

Isolado	Cidade	Área	Hospedeira	Patógeno
1	Goiana	1	<i>Dioscorea alata</i>	<i>M. incognita</i>
2	Goiana	1	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>

3	Goiana	1	<i>Dioscorea cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
4	Goiana	1	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
5	Goiana	1	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>
6	Goiana	2	<i>D. cayennensis</i>	<i>M.javanica</i>
7	Goiana	3	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. arenaria</i>
8	Goiana	3	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. arenaria</i>
9	Goiana	3	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
10	Goiana	3	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
11	Goiana	3	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
12	Goiana	3	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>
13	Goiana	4	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
14	Goiana	4	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
15	Goiana	4	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
16	Goiana	4	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
17	Goiana	4	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
18	Goiana	4	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. javanica</i>
19	Bonito	1	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. arenaria</i>
20	Bonito	1	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. arenaria</i>
21	Bonito	1	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
22	Bonito	1	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
23	Bonito	1	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
24	Bonito	2	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>

25	Bonito	2	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
26	Bonito	3	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
27	Bonito	3	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
28	Bonito	3	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
29	Bonito	3	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
30	Bonito	4	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
31	Bonito	4	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. javanica</i>
32	Bonito	4	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. javanica</i>
33	Bonito	4	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. javanica</i>
34	Bonito	5	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>
35	Bonito	5	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>
36	Aliança	1	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
37	Aliança	1	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
38	Aliança	1	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
39	Aliança	1	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>
40	Aliança	1	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>
41	Aliança	2	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
42	Aliança	2	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
43	Aliança	2	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>
44	Aliança	3	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. arenaria</i>
45	Aliança	3	<i>D. alata</i>	<i>M. arenaria</i>
46	Recife	1	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
47	Recife	1	<i>D. cayennensis</i>	<i>M. incognita</i>
48	Recife	2	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>

49	Recife	2	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>
50	Recife	2	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>
51	Recife	3	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>
52	Recife	3	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>
53	Recife	3	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>
54	Condado	1	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>
55	Condado	1	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>
56	Condado	1	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>
57	Condado	2	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>
58	Condado	2	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>
59	Condado	3	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>
60	Condado	3	<i>D. alata</i>	<i>M. incognita</i>

Três espécies de *Meloidogyne* foram identificadas como *M. arenaria*, *M. incognita* e *M. javanica* através das técnicas de corte perineal e perfil isoenzimático de esterase das amostras (Figura 2). As análises por caracteres morfológicos e bioquímicos das 20 populações das cidades de Aliança e Bonito, para realização da análise molecular e os estudos da variabilidade genética de populações de *Meloidogyne* foi feita por meio de marcadores moleculares ISSR.

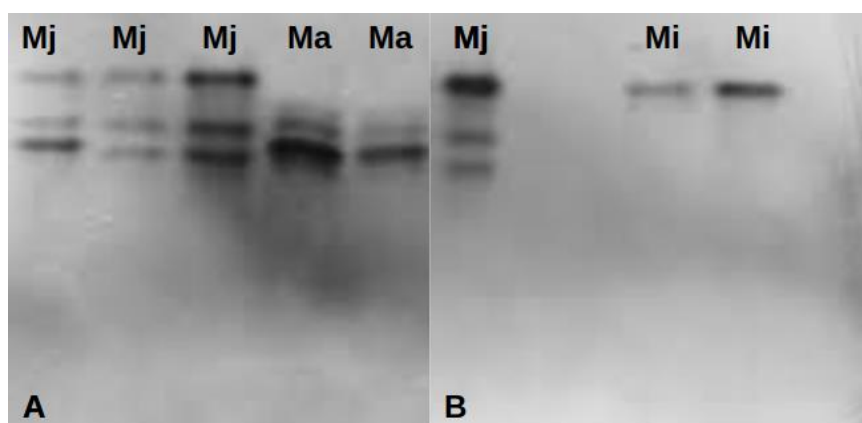


Figura 2. Fenótipos de esterase de populações de *Meloidogyne* spp. isolados da cultura de inhame no Estado de Pernambuco. A) **Mj**: fenótipo de *M. javanica* (padrão) e **Ma**: *M. arenaria* com duas bandas. B) **Mj**: fenótipo de *M. javanica* (padrão) e **Mi**: *M. incognita* com uma banda.

Meloidogyne incognita foi a espécie prevalente com 80% de ocorrência nas áreas produtoras de *Dioscorea* spp. no Estado de Pernambuco, seguida por *M. arenaria* (11,7%) e *M. javanica* com 8,3% (Figura 3). A distribuição de espécies de *Meloidogyne* na cidade de Goiana foi de 78% de *M. incognita* seguida por *M. arenaria* e *M. javanica*, ambas com 11%. Na cidade de Bonito foi verificado 70,6% de *M. incognita*, 17,6% de *M. javanica* e 11,8% de *M. arenaria*. Na cidade de Aliança 70% foram isolados de *M. incognita* e 30% de *M. arenaria*. Nas cidades de Recife e Condado apenas *M. incognita* foi identificada. Dos isolados de *M. incognita* foram obtidos 55,1% de *D. cayennensis* e 44,9% *D. alata*. Já os isolados de *M. arenaria* foram provenientes 83,3% de *D. cayennensis* e 16,7% de *D. alata*. Os isolados de *M. javanica* foram todos oriundos de *D. cayennensis*.

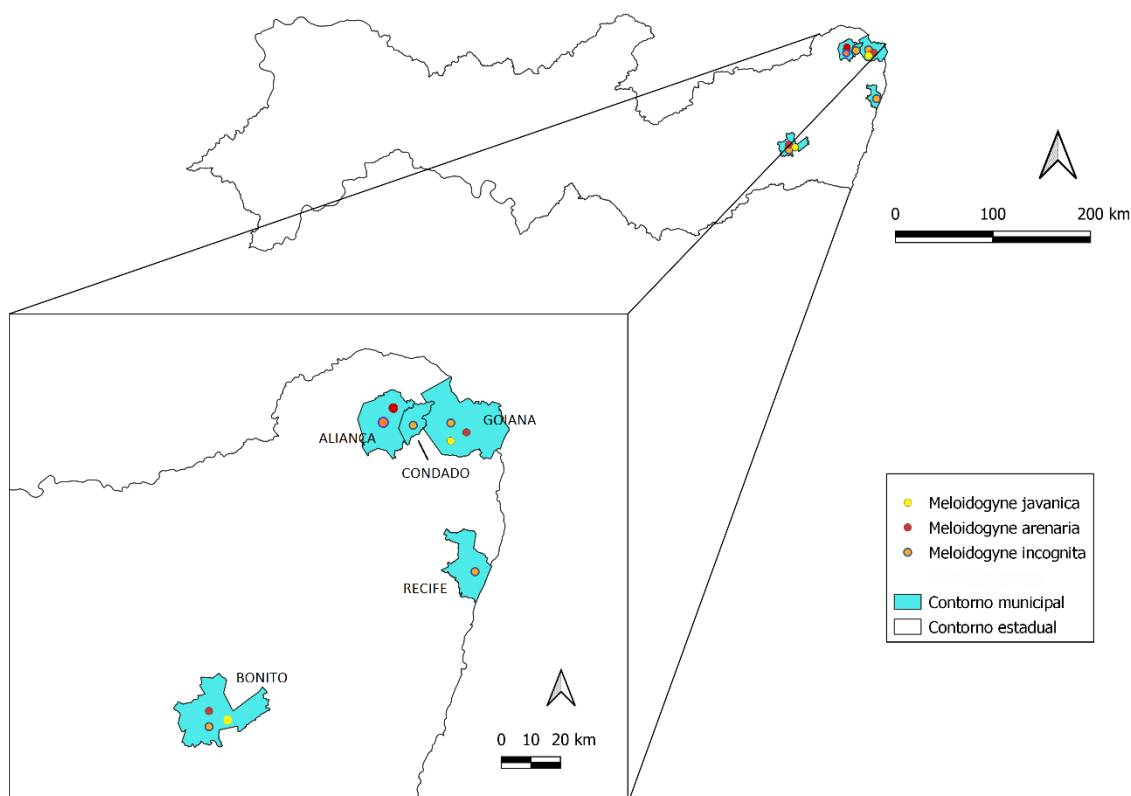


Figura 3. Distribuição de isolados de *Meloidogyne* identificados em túberas de inhame, no Estado de Pernambuco.

Na literatura há relato da ocorrência de mais de uma espécie do nematoide-das-galhas em uma única túbera de inhame, como foi 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, mas já foi observado neste estudo que dentro de uma mesma área de amostragem há a ocorrência de mais de uma espécie de *Meloidogyne*. Outras espécies desse gênero como *M. hapla* e *M. enterolobii* foram relatadas 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 observado 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 consequências de *Meloidogyne* na cultura do inhame, há poucos relatos com relação ao comportamento específico de cada espécie (BRIDGE et al., 2005). Sendo assim, nota-se a importância dos estudos e trabalhos relacionados a identificação, comportamento, variabilidade e diversidade de *Meloidogyne* spp. quanto patógeno na cultura do inhame no Estado de Pernambuco.

5. CONCLUSÕES

- Três espécies de *Meloidogyne* estão associadas à cultura do inhame no Estado de Pernambuco.
- *Meloidogyne incognita* é a espécie mais abundante e distribuída.
- Primeiro relato de *Meloidogyne arenaria* em *Dioscorea cayennensis* no Estado de Pernambuco.

6. DIFICULDADES ENCONTRADAS

Em virtude da pandemia, das restrições impostas e da paralisação das atividades do Laboratório de Fitonematologia, a bolsista não está frequentando o laboratório assiduamente para a realização da identificação das espécies de *Meloidogyne* ocorrentes nos demais municípios do Estado de Pernambuco. A identificação será realizada num período de tempo mais longo que o normal.

7. ATIVIDADES PARALELAS DESENVOLVIDAS PELO BOLSISTA

- Publicação de artigo em periódicos intitulado: Eficiência de diferentes métodos de extração de *Meloidogyne* spp. na cultura da aceroleira (autores: Francisco Jorge Carlos de Souza Junior, Mayara Castro Assunção, Arielena Augusta Rodrigues Mello, Jaime Corbiniano Santos Neto e Liany Regina Bezerra de Oliveira Silva), DOI: <https://doi.org/10.37951/2358-260X.2020v7i2.4713>;
- Publicação de artigo em periódicos intitulado: FIRST REPORT OF *Meloidogyne incognita* PARASITIZING *Momordica charantia* L. IN PERNAMBUCO, BRAZIL (autores: Francisco Jorge Carlos Souza Junior, Mayara Castro Assunção, Liany Regina Bezerra de Oliveira Silva, Jaime Corbiniano Santos Neto e Arielena Augusta Rodrigues Mello), DOI: <https://doi.org/10.28998/rca.v18i2.9772>;

- Publicação de artigo em periódicos intitulado: *Pratylenchus* spp.: Morphological, molecular characterization and population density in banana (*Musa* spp.) in Pernambuco (autores: Mayara Castro Assunção, Francisco Jorge Carlos de Souza Junior, Jaime Corbiniano dos Santos Neto, Arielena Augusta Rodrigues Mello e Liany Regina Bezerra de Oliveira Silva). Magistra: ISSN 2236-4420 - versão on line;
- Participação no evento “Startup Way Federais Club”, promovido pelo Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE);
- Participação no curso “Filogenia Molecular”, promovido pelo laboratório de Biometria Vegetal – Universidade Federal do Espírito Santo (UFES);
- Participação no “II Simpósio de Fitossanidade”, promovido pelo Diretório Acadêmico Livre de Agronomia – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB);
- Participação no curso “Como fazer um artigo em 10 dias”, promovido pelo Ciência Descomplicada;
- Participação no “X Simpósio Sobre Atualidades em Fitopatologia – Fitopatologia no Brasil: Um Panorama de Norte a Sul”, promovido pelo Grupo de Estudos Avançados em Fitopatologia - Universidade Federal de Viçosa (UFV);
- Publicação de resumos simples no “X Simpósio Sobre Atualidades em Fitopatologia – Fitopatologia no Brasil: Um Panorama de Norte a Sul”, promovido pelo Grupo de Estudos Avançados em Fitopatologia - Universidade Federal de Viçosa (UFV);
- Participação no “II Workshop Internacional de Defesa Sanitária Vegetal: Dispersão de Pragas”, realizado pela Universidade Federal de Viçosa (UFV);
- Participação no “III Colóquios em Fitopatologia Tropical”;
- Participação no minicurso “Controle Químico de Doenças de Plantas”, ministrado no III Colóquios em Fitopatologia Tropical;
- Participação no minicurso “Quantificação de Doenças de Plantas”, ministrado no III Colóquios em Fitopatologia Tropical.

8. REFERÊNCIAS

ABAD, P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; ROSSO, M. N.; ENGLER, J. D. A.; FAVERY, B. Invasion, feeding and development. **Root-knot nematodes**, p. 163-181, 2009.

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

BARBOSA, L. F.; AMORIM, E. P. R.; COSTA, V. K. S.; TRINDADE, R. C. P.; PEIXINHO, G. S.; CRUZ, S. J. Efeito de resíduos vegetais sobre *Scutellonema bradys*, agente causal da casca preta do inhame (*Dioscorea* sp.). **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 6, p. 271-279, 2010.

BARCELLOS, F. G.; HUNGRIA, M. Técnicas moleculares aplicadas ao estudo da diversidade e à identificação de bactérias e fungos de interesse agrícola. **Biotecnologia aplicada à agricultura (Figueiredo MVB, Burity HA, Oliveira JA, Santos CERS, et al., eds.). Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 2010.**

BARROS, A. F.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, L. N.; COSTA, S. S.; TERRA, W. C.; LESSA, J. H. Morphological, enzymatic and molecular characterization of root-knot nematodes parasitizing vegetable crops. **Horticultura Brasileira**, v. 36, n. 4, p. 473-479, 2018.

BARTH, S.; MELCHINGER, A. E.; LÜBBERSTEDT, T. H. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 3, p. 495-505, 2002.

BLOK, V.C.; POWERS, O. Biochemical and molecular identification. Root-knot Nematodes. Cambridge: CABI International. p. 98-118, 2009.

BORBA, R. D. S.; GARCIA, M. S.; KOVALESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; CASTELO BRANCO, J. S.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma Westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 4, p. 565-569, 2005.

BRIDGE, J.; COYNE, D. L.; KWOSEH, C. K. Nematode parasites of tropical root and tuber crops (excluding potatoes). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture, 2nd ed.** Wallingford, UK: CAB International, p. 221-258, 2005.

CAMPOS, V. P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee and cocoa. **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**, p. 536-583, 2018.

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.; TIGANO, M.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M. R.; SARAH, J. L. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. **Nematology**, v. 6, n. 2, p. 287-298, 2004.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R.; QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. **Nematology**, v. 2, n. 6, p. 645-654, 2000.

CARNEIRO, R. M. D. G.; COFCEWICZ, E. T. Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In: **Plant-parasitic nematodes of coffee**. Springer, Dordrecht, 2008. p. 87-122.

CLAPP, J. P.; STOEL, C.D. van der; PUTTEN, W.H. van der. Rapid identification of cyst (*Heterodera* spp., *Globodera* spp.) and root-knot (*Meloidogyne* spp.) nematodes on the basis of ITS2 sequence variation detected by PCR-single-strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) in cultures and field samples. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 9, p. 1223-1232, 2000.

CORREA, V. R.; MATTOS, V. S.; ALMEIDA, M. R. A.; SANTOS, M. F. A.; TIGANO, M. S.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R. M. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* and development of a species-specific SCAR marker for its diagnosis. **Plant Pathology**, v. 63, n. 2, p. 476-483, 2014.

COSTA, José Carlos. Utilização de Marcadores ISSR na Caracterização de Cultivares. 2010.

- DANTAS, T. A. G.; ADEMAR P. O.; LOURIVAL, F. C.; DAMIANA, F. S. D.; NATÁLIA, V. S. B.; STÊNIO, A. G. D. Produção do inhamé em solo adubado com fontes e doses de matéria orgânica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 10, p. 1061-1065, 2013.
- DOMINGUES, S. D.; NEVES, A. F. das; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S. Selection of primers for Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) in *Cereus* sp. (Cactaceae). **Revista Biotecnologia & Ciência**, v.6, n.2, p. 46-54, 2017.
- EISENBACK, J.D.; HUNT, D.J. General morphology. Root-knot Nematodes. Cambridge: CABI North America Office, p. 18-54, 2009.
- FALEIRO, Fábio Gelape. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em 26 de Jan de 2021.
- GOULÃO, Luís; OLIVEIRA, Cristina M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v. 122, n. 1, p. 81-89, 2001.
- GOVAERTS, Rafaël; WILKIN, Paul; SAUNDERS, Richard MK. **World Checklist of Dioscorales: Yams and Their Allies**. Royal Botanic Gardens Kew., 2007.
- HUNT, D. J.; HANDOO, Z. A. Taxonomy, identification and principal species. **Root-knot nematodes**, v. 1, p. 55-88, 2009.
- JENKINS, W. R. B. et al. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant disease reporter**, v. 48, n. 9, 1964.
- KATOH, Kazutaka; STANDLEY, Daron M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.
- KAWAMURA, Teinosuke; HIRANO, Kazuya. Host-parasite relationship of northern root-knot nematode (*Meloidogyne hapla* Chitwood) on yam (*Dioscorea batatas* Decne, Tsukunemo). **Japanese Journal of Phytopathology**, v. 26, n. 1, p. 7-15, 1961.
- KIM, M. J.; KIM, H. N.; KANG, K. S.; BAEK, N. I.; KIM, D. K.; KIM, Y. S.; ... & JEAN, B. H. Methanol extract of *Dioscorea* Rhizoma inhibits pro-inflammatory cytokines and mediators in the synoviocytes of rheumatoid arthritis. **International immunopharmacology**, v. 4, n. 12, p. 1489-1497, 2004.
- KOLOMBIA, Y. A.; LAVA KUMAR, P.; CLAUDIUS-COLE, A. O.; KARSSSEN, G.; VIAENE, N.; COYNE, D.; BERT, W. First report of *Meloidogyne enterolobii* causing tuber galling damage on white yam (*Dioscorea rotundata*) in Nigeria. **Plant Disease**, v. 100, n. 10, p. 2173, 2016.

KOLOMBIA, Y. A.; KARSSSEN, G.; VIAENE, N.; KUMAR, P. L.; DE SUTTER, N.; JOOS, L.; ... & BERT, W. Diversity of root-knot nematodes associated with tubers of yam (*Dioscorea* spp.) established using isozyme analysis and mitochondrial DNA-based identification. **Journal of Nematology**, v. 49, n. 2, p. 177, 2017.

LAX, P.; DUEÑAS, J.C.R.; GARDENAL, C.N.; DOUCET, M.E. Assessment of genetic variability in populations of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944) Nematoda: Pratylenchidae) from Argentina. *Nematology*, v.9, p.261-270, 2007.

LEITE, R. P.; NASCIMENTO, L. C. do; OLIVEIRA, M. D. de M. Inoculação de *Curvularia eragrostidis* em inhame (*Dioscorea alata*) cv. São Tomé. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 3, p. 281-282, 2018.

LILLEY, C. J.; DAVIES, L. J.; URWIN, P. E. RNA interference in plant parasitic nematodes: a summary of the current status. **Parasitology**, v. 139, n. 5, p. 630, 2012.

MAI, W. F.; MULLIN, P. G. Plant-parasitic nematodes: a pictorial key to genera Cornell University Press. **Ithaca, NY**, 1996.

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

MOENS, M.; PERRY, R. N.; STARR, J. L. Meloidogyne species—a diverse group of novel and important plant parasites. **Root-knot nematodes**, v. 1, p. 483, 2009.

MOURA, R. M.; OLIVEIRA, I. S.; TORRES, G. R. C. Fitonematoides associados ao inhame da costa em seis municípios produtores da Zona da Mata do Estado de Pernambuco, Brasil. **Nematologia brasileira**, v. 29, n. 2, p. 299-302, 2005.

MOURA, R. M. de; CARNEIRO, R. M. D. G.; DA SILVA-LIMA, S. T.; DA COSTA, M. B.; RIBEIRO, A. R. S. First report of root-knot nematode on yam 'Sao Tomé' in Brazil. **Nematologia Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 178-180, 2010.

MOURA, R. M. de. O GÊNERO *MELOIDOGYNE* E A MELOIDOGINOSE PARTE III-RESENHA HISTÓRICA. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 13, p. 93-144, 2016.

OLIVEIRA, A. P.; FREITAS NETO, P. A.; SANTOS, E.S. Produtividade do inhame em função de fertilização orgânica e mineral e de épocas de colheita. **Horticultura Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 144-147, 2001.

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 Ciências Agrônômicas**, v. 2, p. 90-106, 2005.

- PARIDA, S. K.; KALIA, S. K.; KAUL, S.; DALAL, V.; HEMAPRABHA, G.; SELVI, A.; ... & MOHAPATRA, T. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, n. 2, p. 327-338, 2009.
- PARK, S. D.; KHAN, Z.; KIM, S.; KIM, K.; MIN, K. Occurrence and distribution of plant parasitic nematodes in yam (*Dioscorea batatas*) fields in Korea. **International Journal of Nematology**, v. 8, n. 2, p. 141-144, 1998.
- POSADA, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 25, p. 1253–1256, 2008.
- POWERS, T.O.; HARRIS, T.S. A Polymerase Chain Reaction method for identification of five mayor *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, College Park, v.25, p. 1-6, 1993.
- RANDIG, O.; BONGIOVANNI, M.; CARNEIRO, R. M.; CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. **Genome**, v. 45, n. 5, p. 862-870, 2002.
- REDDY, M. Pradeep; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **euphytica**, v. 128, n. 1, p. 9-17, 2002.
- RODRIGUES, J. F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. mantiqueirae* (Fowlie) van den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; ... & HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic biology**, v. 61, n. 3, p. 539-542, 2012.
- SANTOS, A. H. dos; et al. O Vale do Rio Taia-HY: Levantamento de aráceas e dioscoreáceas comestíveis no litoral norte catarinense. 2005.
- SANTOS, M. F. A. dos. Diversidade de *Meloidogyne incognita* e espécies correlatas como sugerem abordagens morfológicas, biológicas, citológicas e moleculares. 2011.
- SANTOS, M. F. A. dos; STEFANELO, D. R.; DA SILVA MATTOS, V.; BRAGHINI, M. T. SALGADO, S. M. L.; CARNEIRO, R. M. D. G. PRIMEIRO RELATO DE *Meloidogyne izalcoensis* EM CAFEZAL NO ESTADO DE MINAS GERAIS E LEVANTAMENTO DE *Meloidogyne* spp. EM CAFEZEIROS NO TRIÂNGULO MINEIRO. **X Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 2019.
- SEAL, S.; MULLER, E. Molecular analysis of a full-length sequence of a new yam badnavirus from *Dioscorea sansibarensis*. **Archives of virology**, v. 152, n. 4, p. 819-825, 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, pag. 32-36, 2012.

SILVA, J. A.; ADEMAR, P. O.; GIBRAN, S. A.; LOURIVAL, F. C.; ARNALDO, N.P. O.; MARIA A. M. A. Rendimento do inhame adubado com esterco bovino e biofertilizante no solo e na folha. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 3, p. 253-257, 2012.

SILVA, M do C. L. da; SANTOS, C. D. G.; DA SILVA, G. S. Espécies de *Meloidogyne* associadas a vegetais em microrregiões do estado do Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 4, p. 710-719, 2016.

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

TAYLOR, A.L.; NETSCHER, C. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Nematologica**, Leiden, v. 20, p. 268-269, 1974. VIDAL, L. de A. et al. Validação de sequências candidatas de silenciamento gênico de *Meloidogyne incognita*. In: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 10., 2019, Vitória, ES. Pesquisa, inovação e sustentabilidade dos cafés do Brasil. Brasília, DF: Embrapa Café, 2019., 2019.

WILLIAMSON, V. M.; GLEASON, C. A. Plant–nematode interactions. **Current opinion in plant biology**, v. 6, n. 4, p. 327-333, 2003.

ZAPPI, D. C.; FILARDI, F. L. R.; LEITMAN, P.; SOUZA, V. C.; WALTER, B. M.; PIRANI, J. R.; ... & GOMES-KLEIN, V. L. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, n. 2, p. 176-183, 1994.