

**ANDRESSA RODRIGUES FONSECA**

**ESTUDO TAXONÔMICO DE UM NEMATOIDE ANGUÍNÍDEO ASSOCIADO A**  
***Ipomoea cairica***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Dalila Sêni Buonicontro

Coorientadores: Lucas Magalhães Abreu  
Claudio Marcelo G. de Oliveira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS**  
**2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F676e  
2022  
Fonseca, Andressa Rodrigues, 1992-  
Estudo taxonômico de um nematoide anguinídeo associado  
a *Ipomoea cairica* / Andressa Rodrigues Fonseca. – Viçosa, MG,  
2022.

1 tese eletrônica (80 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Dalila Sêni Buonicontro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Fitopatologia, 2022.

Referências bibliográficas: f. 69-80.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.641>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Nematoda em plantas - Classificação. 2. Nematoda -  
Morfologia. 3. Nematoda - Filogenia. 4. Filogenia.  
5. Embriologia. 6. Histopatologia. I. Buonicontro, Dalila Sêni,  
1984-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.  
III. Título.

CDD 22. ed. 632.6257

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

ANDRESSA RODRIGUES FONSECA

ESTUDO TAXONÔMICO DE UM NEMATOIDE ANGUINÍDEO ASSOCIADO A  
*Ipomoea cairica*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 26 de julho de 2022.

Assentimento:

Andressa Rodrigues Fonseca

Andressa Rodrigues Fonseca  
Autora

Dalila Sêni Buonincontro

Dalila Sêni Buonincontro  
Orientadora

*Aos meus pais, Jorge e Dalva*

*Ao meu marido, Bruno*

*Aos meus irmãos e amigos*

*DEDICO.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por estar sempre ao meu lado, dando-me força e saúde para superar os obstáculos da vida.

Ao meu marido e amigo Bruno, pela amizade, companheirismo e amor durante os anos em que estamos juntos.

Aos meus pais Dalva e Jorge, por todo incentivo e apoio durante minha graduação, mestrado e doutorado. Aos meus irmãos João Victor, Jorge Luís, Pedro Henrique, Guilherme, Francisco e Vitória, pelo carinho e amizade.

A minha família, por torcerem sempre por mim, especialmente à minha avó Maria do Carmo que é meu exemplo de vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

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

A minha orientadora professora Dalila, pela orientação, atenção, confiança e amizade. Ao meu coorientador Claudio Marcelo, pela paciência e atenção sempre que precisei.

À Rosana Bessi, pela ajuda com as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Professor Robert Barreto, pela descoberta do nematoide, pelas coletas de material vegetal infectado e por permitir o uso dos equipamentos da Clínica de Doenças de Plantas.

À professora Aristéa Alves Azevedo, pela parceria e por ter colocado o Laboratório de Anatomia Vegetal à minha disposição. Aos estudantes de doutorado

em Botânica, Daniela, Clara e Hugo, e ao estagiário João, pela ajuda com as análises histopatológicas e pela paciência para esclarecer minhas inúmeras dúvidas.

Ao Dr. Pedro H. Dias e Dr. Emanuel Fonseca, pelos ensinamentos e discussões sobre Filogenia e Análise de Delimitação de Espécies.

Ao professor Fabrício Ávila pelo apoio e ao professor Eduardo Mizubuti, por disponibilizarem os equipamentos do Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro e Laboratório de Biologia de Populações, respectivamente.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Nematologia: Amanda, Marcela, Iolanda, Claudio, Arlam, José Neto, Taynara, Emerson, Etiene, Gabriel e Maria Luiza, por toda ajuda e amizade durante o período de doutorado, sem vocês eu não teria conseguido.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, por toda informação e serviços prestados, em especial ao Guilherme, Delfim, Daniel e à Sara pela boa vontade de sempre ajudar.

Aos meus colegas e amigos, pela amizade, apoio e pelos momentos de alegria vividos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

MUITO OBRIGADA!

## **BIOGRAFIA**

ANDRESSA RODRIGUES FONSECA, filha de Jorge Miranda da Fonseca e Dalva Rodrigues de Oliveira, nasceu no dia 05 de fevereiro de 1992, em Manhuaçu, Minas Gerais.

Passou dez anos de sua infância morando no Córrego Pirapetinga, na Zona Rural de Manhumirim, onde iniciou seus estudos na Escola Municipal Assis Brasil e cursou até a segunda série do Ensino Fundamental. A terceira série cursou na Escola Municipal Alfredo Breder e a quarta, foi na Escola Municipal Carolina Júlia Pereira. Da quinta série do Ensino Fundamental ao primeiro ano do Ensino Médio cursou na Escola Municipal Dra. Maria da Conceição de Oliveira Ribeiro. O segundo e o terceiro ano do Ensino Médio cursou no Colégio Santa Teresinha ainda em Manhumirim.

Em 2011, ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, na Zona da Mata Mineira e graduou-se como Engenheira Agrônoma em janeiro de 2016. Em agosto de 2016, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa. Defendeu sua dissertação em julho de 2018. Em agosto de 2018, começou o Doutorado também em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa.

## RESUMO

FONSECA, Andressa Rodrigues, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2022. **Estudo taxonômico de um nematoide anguinídeo associado a *Ipomoea cairica***. Orientadora: Dalila Sêni Buonicontro. Coorientadores: Claudio Marcelo Gonçalves de Oliveira e Lucas Magalhães Abreu.

Neste trabalho, foi feita a identificação de um nematoide frequentemente associado a manchas cloróticas internervais em folhas de corda-de-viola (*Ipomoea cairica*). A identificação foi feita por meio da taxonomia integrativa e também buscou-se esclarecer aspectos do ciclo biológico desse nematoide, que foi nomeado provisoriamente como nematoide foliar de *Ipomoea* (NFI). Foi feita a caracterização morfológica, morfométrica e molecular (amplificação e sequenciamento dos genes nucleares SSU, LSU e ITS e o gene mitocondrial COI) do nematoide. A posição filogenética de NFI foi determinada pelo método de Inferência Bayesiana, usando o concatenamento dos genes SSU, LSU e ITS. Também foi realizada a análise de delimitação de espécies pelo modelo GMYC e método de Yule. Aspectos do ciclo de vida de NFI foram esclarecidos pela determinação da duração da embriogênese e seu modo de parasitismo, pela análise histopatológica de folha de *I. cairica*. Testes de patogenicidade a plantas cultivadas foram feitos a fim de verificar se esse nematoide é capaz de infectar alguma cultura. Ainda, realizou-se a determinação indireta da gama de hospedeiros. NFI possui características como três formas básicas: fêmea semi-obesa, fêmea jovem delgada e macho, com diâmetros máximo de corpo de  $31,4 \pm 6,4$ ,  $15,7 \pm 2$  e  $19,8 \pm 2$   $\mu\text{m}$ , respectivamente. As fêmeas semi-obesas possuem ovário reflexado e útero em quadricolumella. As fêmeas jovens delgadas apresentam ramo genital estendido e não diferenciado. Os machos têm espículas de  $19,8 \pm 2$   $\mu\text{m}$ , bursa leptodera e presença de gubernáculo. Campo lateral com 4 linhas. Região labial destacada para formas adultas e não destacada para formas jovens. Tais características suportam a alocação de NFI na família Anguinidae, mas não nos gêneros até então descritos nesta família. Pela análise filogenética e de delimitação de espécies, foi possível observar que todas as formas do NFI são pertencentes à mesma espécie, e, além disso, possuem valor de suporte alto o suficiente ( $pp=1$ ) para estarem agrupados separadamente dos demais gêneros da família Anguinidae. A embriogênese desse anguinídeo, desde o ovo até o juvenil de primeiro estágio, tem

duração média de cinco dias. NFI induziu alterações celulares no mesofilo como modificações no formato das células, citoplasma granuloso e núcleo aumentado nos parênquimas paliádico e lacunoso, indicando indiretamente um aumento da atividade celular que pode estar acontecendo para suportar a nutrição desse nematoide. Foi possível observar que NFI se aglomerou em galerias formadas no parênquima lacunoso, sendo estas delimitadas pelas nervuras. Não foi possível reproduzir sintomas nas plantas inoculadas artificialmente sob condição de casa de vegetação. Contudo, pela determinação indireta da gama de hospedeiros, verificou-se que além de *I. cairica*, *I. syringifolia* também é hospedeira desse nematoide. Portanto, diante dos resultados dessa pesquisa, a criação de um gênero novo dentro de Anguinidae será proposta para abrigar NFI, que apresenta um hábito parasítico endoparasita migrador.

Palavras-chave: Taxonomia Integrativa. Morfologia. Filogenia. Delimitação de espécies. Embriogênese. Histopatologia.

## ABSTRACT

FONSECA, Andressa Rodrigues, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2022.  
**Taxonomic study of an anguinid nematode associated with *Ipomoea cairica*.**  
Advisor: Dalila Sêni Buonicontro. Co-Advisor: Claudio Marcelo Gonçalves de Oliveira and Lucas Magalhães Abreu.

In this study, the identification of a nematode frequently associated with interveinal chlorotic spots on the leaves of mile-a-minute-vine (*Ipomoea cairica*) was carried out. The identification was made through the integrative taxonomy and we sought to clarify aspects of the biological cycle of this nematode, which was provisionally named as *Ipomoea foliar nematode* (NFI). The morphological, morphometric and molecular characterization (amplification and sequencing of the nuclear genes SSU, LSU and ITS and the mitochondrial gene COI) of the nematode was performed. The phylogenetic position of NFI was determined by the Bayesian Inference method, using the concatenation of SSU, LSU and ITS genes. Species delimitation analysis was also performed using the GMYC model and the Yule method. Aspects of the life cycle of NFI were clarified by determining the duration of embryogenesis and its mode of parasitism, by histopathological analysis of *I. cairica* leaf. Pathogenicity tests on cultivated plants were carried out in order to verify whether this nematode is capable of infecting any crop. Furthermore, the indirect determination of the host range was performed. NFI has characteristics such as three basic forms: semi-obese female, slender young female and male, with maximum body diameters of  $31.4 \pm 6.4$ ,  $15.7 \pm 2$  and  $19.8 \pm 2$   $\mu\text{m}$ , respectively. Semi-obese females have a reflex ovary and quadricolumella uterus. Slender young females have an extended and undifferentiated genital branch. Males have spicules of  $19.8 \pm 2$   $\mu\text{m}$ , a leptodera bursa and the presence of a gubernaculum. Side field with 4 lines. Lip region highlighted for adult forms and not highlighted for young forms. Such features support the allocation of NFI in the Anguinidae family, but not in the genera previously described in this family. Through the phylogenetic and species delimitation analysis, it was possible to observe that all the NFI forms belong to the same species, and, in addition, they have a high enough support value ( $pp=1$ ) to be grouped separately from the other genera of the family. Anguinidae. The embryogenesis of this anguinid, from the egg to the first juvenile stage, takes an average of five days. NFI induced cellular changes in the mesophyll such as changes in cell shape, granular cytoplasm and an enlarged nucleus

in the palisade and spongy parenchyma, indirectly indicating an increase in cellular activity that may be happening to support the nutrition of this nematode. It was possible to observe that NFI agglomerated in galleries formed in the spongy parenchyma, which are delimited by the ribs. It was not possible to reproduce symptoms in plants artificially inoculated under greenhouse conditions. However, through the indirect determination of the host range, it was found that in addition to *I. cairica*, *I. syringifolia* is also a host for this nematode. Therefore, in view of the results of this research, the creation of a new genus within Anguinidae will be proposed to harbor NFI, which has a migratory parasitic endoparasite habit.

Keywords: Integrative Taxonomy. Morphology. Phylogeny. Species Delimitation. Embryogenesis. Histopathology.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. Taxonomia de Anguinidae.....	15
2.2. Posição taxonômica.....	16
2.3. Diagnose de Anguininae .....	16
2.4. Lista de gêneros de Anguininae .....	17
2.5. Distribuição e importância econômica.....	17
2.6. Sintomas.....	18
2.7. Identificação dos gêneros da subfamília Anguininae.....	18
3. OBJETIVOS .....	22
3.1. Geral.....	22
3.2. Específicos .....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Obtenção da população do nematoide .....	22
4.2. Inoculação artificial do NFI em <i>Ipomoea cairica</i> e <i>I. syringifolia</i> .....	22
4.3. Teste de patogenicidade de NFI a plantas cultivadas.....	24
4.3.1. Obtenção das mudas .....	25
4.3.2. Montagem dos experimentos .....	25
4.4. Determinação indireta da gama de hospedeiros do NFI.....	26
4.5. Caracterização morfológica e morfométrica .....	26
4.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	27
4.7. Caracterização molecular.....	28
4.7.1. Extração do DNA .....	28
4.7.2. Amplificação de diferentes regiões genômicas e sequenciamento	28
4.8. Análise Filogenética.....	30

4.9. Análise de Delimitação de Espécies.....	38
4.10. Histopatologia de <i>Ipomoea cairica</i> infectada pelo nematoide foliar de <i>Ipomoea</i> (NFI) .....	38
4.10.1. Diafanização .....	38
4.10.2. Corte histopatológico .....	39
4.11. Período de Embriogênese .....	40
5. RESULTADOS .....	40
5.1. Determinação indireta da gama de hospedeiros do NFI.....	40
5.2. Inoculação artificial do NFI em <i>Ipomoea cairica</i> e <i>I. syringifolia</i> .....	41
5.3. Teste de patogenicidade de NFI a plantas cultivadas.....	42
5.4. Caracterização Morfológica e Morfométrica .....	42
5.5. Análise Filogenética.....	50
5.6. Análise de Delimitação de Espécies.....	53
5.7. Histopatologia de <i>Ipomoea cairica</i> infectada pelo NFI .....	56
5.8. Período de Embriogênese .....	60
6. DISCUSSÃO .....	61
7. CONCLUSÕES .....	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69

## 1. INTRODUÇÃO

Os nematoides parasitas de plantas são temidos por causarem grandes perdas agrícolas. Os que mais se destacam são os endoparasitas de raízes como *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp., *Heterodera* spp. e *Globodera* spp. Existem também fitonematoides que afetam sementes, bulbos e folhas das plantas e também trazem prejuízos aos agricultores, como é o caso de *Anguina tritici* (Steinbuch, 1799) Chitwood, 1935 em grãos de trigo, *Ditylenchus dipsaci* (Khun, 1857) Filipjev, 1936 em mais de 500 espécies de plantas e *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 em arroz (FERRAZ; BROWN, 2016; FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2012; LOPES; FERRAZ, 2016; STURHAN; BRZESKI, 1991). Dentre estes, *Anguina* e *Ditylenchus* são taxonomicamente incluídos na família Anguinidae Nicoll, 1935 (1926), enquanto *Aphelenchoides* pertence à família Aphelenchoididae Skarbilovich, 1947 (SIDDIQI, 2000).

A família Anguinidae abriga nematoides que se alimentam de fungos ou parasitam a parte aérea de plantas (SIDDIQI, 2000). Dentre os 17 gêneros abrigados nessa família (HODDA, 2022), cinco possuem reconhecida importância agrícola, são eles: *Anguina*, *Subanguina*, *Nothanguina*, *Ditylenchus* e *Pterotylenchus*, que afetam principalmente sementes, flores e folhas (SIDDIQI, 2000). Os sintomas induzidos por esses fitonematoides podem variar desde manchas foliares cloróticas ou necróticas e até mesmo galhas. *Anguina tritici* foi o primeiro fitonematoide descrito na história da Nematologia de plantas (FERRAZ; BROWN, 2016; SIDDIQI, 2000). Ele foi descoberto pelo inglês Turbevil Needham em 1743, causando galhas em sementes de trigo. As observações de Needham mostravam que esse nematoide é capaz de resistir a dessecação por anos. Essa estratégia de sobrevivência foi demonstrada para outras espécies da família Anguinidae como *Ditylenchus dipsaci* e *Subanguina chrysopogoni* (BAJAJ et al., 1990; WHARTON; MARSHALL, 2002).

Estudos recentes, baseados na caracterização morfológica, morfométrica e molecular, têm identificado diversas novas espécies de anguinídeos fitoparasitas (KANZAKI et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2013; ZHAO et al., 2011, 2013). Plantas das famílias botânicas atacadas por essas novas espécies são principalmente, Rubiaceae Juss., Fagaceae Dumort., Melastomataceae Juss., Pittosporaceae R., Br. entre outras, sendo a maioria delas composta de plantas invasoras ou de pouca relevância econômica (KANZAKI et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2013; ZHAO et al., 2011, 2013).

Algumas espécies de Anguinidae foram incluídas como potenciais agentes de biocontrole de algumas plantas invasoras, como é o caso de *Ditylenchus drepanocercus* e *Subanguina picridis* (Kirjanova, 1944) Brzeski, 1981 (CAESAR-TONTHAT et al., 1995; SEIXAS et al., 2004a).

A família botânica Convolvulaceae Juss., é composta basicamente por plantas trepadeiras e herbáceas, abriga cerca de 67 gêneros, dentre eles, *Ipomoea* L., e quase 1300 espécies de plantas (“The Plant List”, 2021). A batata-doce, *Ipomoea batatas* (L.) Lam., é a espécie desse gênero com maior relevância econômica por ter grande importância na alimentação humana (SÁNCHEZ; SANTOS; VASILENKO, 2019). Muitas espécies de *Ipomoea* L. têm considerável relevância como plantas ornamentais ou medicinais, como é o caso de *I. alba* L., *I. aquatica* Forssk., *I. cairica* (L.) Sweet, dentre outras (MEIRA et al., 2012; NIMMAKAYALA; VAJJA; REDDY, 2011).

*Ipomoea cairica* (L.) Sweet é uma planta invasora trepadeira de origem desconhecida, mas possivelmente na África ou Ásia tropical (CABI, 2021). Essa espécie de liana está amplamente distribuída pelo mundo e é certamente uma planta daninha de grande importância para a agricultura, pela capacidade de invadir áreas de produção e competir por espaço, luz, água e nutrientes com as plantas cultivadas (AUSTIN; HUÁMAN, 1996; KUMAR; ABBASI; ABBASI, 2018; WEBER; SUN; LI, 2008). Devido a seu hábito de crescimento trepador, essas plantas podem causar grandes problemas nas operações de colheita e beneficiamento de sementes, porque seus ramos ainda verdes causam embuchamento das máquinas colhedoras que atrasam o processo e danificam o grão (BARRETO, 2019). Estudos recentes vêm apontando o potencial alelopático de *I. cairica* em decorrência da presença de constituintes químicos produzidos por esta planta, que podem ser fitotóxicos a plantas cultivadas presentes no mesmo ambiente (MA et al., 2020). Alguns desses compostos são alcaloides, esteróis, flavonoides, taninos, fenóis, entre outros (SRIVASTAVA; SHUKLA, 2015). Embora *I. cairica* não tenha sido alvo de programa de controle biológico, essa abordagem de manejo merece atenção.

Populações de *I. cairica*, foram encontradas pelo professor Robert Barreto no campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), apresentando manchas cloróticas internervais, sintomas que podem ser induzidos por diferentes patógenos ou mesmo por deficiências nutricionais, sendo, portanto, uma limitação em se chegar a um

diagnóstico apenas pela observação desse sintoma. Folhas com sintomas foram levadas para a Clínica de Doenças de Plantas/UFV onde foi detectada a presença de nematoides associados às lesões, se tratando do primeiro relato de nematoide foliar parasitando *I. cairica*. O professor Robert Barreto apresentou esse nematoide ao Laboratório de Nematologia/UFV onde iniciou-se um estudo taxonômico detalhado para a sua identificação a nível de gênero e espécie. Com base na análise morfológica prévia, essa espécie foi identificada como pertencente à família Anguinidae.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Taxonomia de Anguinidae**

A taxonomia de nematoides inicialmente baseava-se na análise comparativa de características morfológicas e hábitos alimentares para a identificação e classificação desses organismos. No entanto, atualmente, esses estudos têm levado em consideração uma combinação de informações genotípicas, fenotípicas e filogenéticas, conhecida como taxonomia integrativa ou polifásica (SUBBOTIN; WAEYENBERGE; MOENS, 2013; VOVLAS et al., 2008, 2011). Após essa recente mudança na taxonomia, não somente de nematoides, grupos de indivíduos que possuem caracteres morfológicos distintos e, que por esse motivo, eram classificados como pertencentes a espécies diversas, foram reclassificados como pertencentes à mesma espécie em razão das informações moleculares adicionais (SUBBOTIN et al., 2003; VOVLAS et al., 2008). A análise taxonômica integrativa é essencial para mitigar erros de identificação, visto que a identificação baseada apenas em caracteres morfológicos pode dificultar uma identificação acurada, já que estes caracteres são muito influenciados por variações do ambiente (SUBBOTIN; WAEYENBERGE; MOENS, 2013).

A taxonomia da família Anguinidae Nicoll, 1935 possui notórias inconsistências, como por exemplo, para o gênero *Ditylenchus* Filipjev, 1936, que se mostra polifilético em diversos estudos (OLIVEIRA et al., 2013; YAGHOUBI et al., 2018; ZHAO et al., 2013), indicando a inadequação da classificação baseada unicamente em caracteres morfológicos, que seriam convergentes, o que faz necessária a revisão desse gênero (SUBBOTIN; WAEYENBERGE; MOENS, 2013). Nesta revisão são apresentadas informações sobre as características morfológicas e biológicas de cada gênero incluído na família Anguinidae, reunindo gêneros recentemente propostos e que ainda

não foram incluídos em estudos taxonômicos recentes da família, apresentando assim uma visão global e atualizada da família.

## 2.2. Posição taxonômica

A família Anguinidae abriga nematoides que se alimentam de fungos ou parasitam a parte aérea, bulbos e órgãos tuberosos das plantas e não possuem uma fase do ciclo de vida entomopatogênica (SIDDIQI, 2000). O nome Anguinidae foi proposto originalmente para substituir Anguilluliniidae Baylis e Daubney, 1926. A família Anguilluliniidae abrigava também gêneros como *Heterodera* Schmidt, 1871, *Tylenchulus* Cobb, 1913 e *Aphelenchus*, Bastian, 1865 e com a mudança de nomenclatura estes foram transferidos para outras famílias ou outras ordens mais apropriadas (FORTUNER; MAGGENTI, 1987). Anguinidae é composta por 2 subfamílias, Anguininae Nicoll, 1935 e Halenchinae Jairajpuri e Siddiqi, 1969, 17 gêneros e 188 espécies (HODDA, 2022). Halenchinae possui um único gênero, *Halenchus* Cobb, 1933.

De Ley e Blaxter (2002) fizeram uma reclassificação do Filo Nematoda baseada na morfologia e filogenia de SSU do DNA ribossômico, sendo que o posicionamento de Anguininae ficou então:

- Filo **Nematoda** Potts, 1932
  - Classe **Chromadorea** Inglis, 1983
    - Subclasse **Chromadoria** Pearse, 1942
      - Ordem **Rhabditida** Chitwood, 1933
        - Subordem **Tylenchina** Thorne, 1949
          - Infraordem **Tylenchomorpha** De Ley e Blaxter, 2002
            - Superfamília **Sphaerularioidea** Lubbock, 1861
              - Família **Anguinidae** Nicoll, 1935 (1926)
                - Subfamília **Anguininae** Nicoll, 1935 (1926)

## 2.3. Diagnose de Anguininae

Nematoides incluídos na subfamília Anguininae podem ser fitoparasitas ou micófagos, apresentam fêmeas delgadas ou semi-obesas, com corpo levemente arqueado ou espiralado quando relaxados. Possuem procorpo cilíndrico, metacorpo muscular ou não muscular. As glândulas esofagianas podem ser ensacadas em bulbo basal ou estendendo-se sobre o intestino, dorsalmente ou sublateralmente. Há

ausência de aba vulvar (exceto em *Pterotylenchus* Siddiqi e Lenne, 1984), o aparelho reprodutor da fêmea é monodelfo-prodélfico com ovário podendo ser estendido ou reflexado e com oócitos em fileiras ou arranjados sobre uma ráquis. Há presença de saco pós-uterino bem desenvolvido, mas ausente em *Diptenchus* Khan Chawla e Seshadri, 1969. No útero, a Crustaforméria é arranjada em quadricolumella ou em múltiplas células. Nos machos, há a presença de gubernáculo (exceto em *Nothanguina* Whitehead, 1959) e bursa (SIDDIQI, 2000).

#### 2.4. Lista de gêneros de Anguininae

***Anguina*** Scopoli, 1777

***Diptenchus*** Khan Chawla e Seshadri, 1969

***Ditylenchus*** Filipjev, 1936

***Ficotylus*** Davies et al., 2009

***Indoditylenchus*** Sinha, Choudhury e Baqri, 1985

***Litylenchus*** Zhao et al., 2011

***Nothanguina*** Whitehead, 1959

***Nothotylenchoides*** Handoo, 1980

***Nothotylenchus*** Thorne, 1941

***Orrina*** Brzeski, 1981

***Palaeoanguina*** Poinar, 2011 – Fóssil em âmbar dominicano

***Pseudhalenchus*** Tarjan, 1958

***Pterotylenchus*** Siddiqi e Lenne, 1984

***Safianema*** Siddiqi, 1980

***Subanguina*** Paramonov, 1967

***Zeatylenchus*** Zhao et al., 2013

#### 2.5. Distribuição e importância econômica

Os nematoides incluídos na subfamília Anguininae estão distribuídos por quase todos os continentes, exceto na Antártida (Quadro 1). Os gêneros com os nematoides de maior importância econômica são *Anguina*, *Subanguina*, *Nothanguina*, *Ditylenchus* e *Pterotylenchus*. Esta importância econômica está relacionada com o número de plantas hospedeiras que eles possuem, sua ampla distribuição geográfica e capacidade que alguns possuem de sobreviver por longos períodos em estado de

anidrobiose, dificultando a adoção de medidas de controle que sejam eficientes (CARES; SANTOS; TENENTE, 2008; CARES; TENENTE, 2007; KRALL, 1991; STURHAN; BRZESKI, 1991). Um gênero de anguinídeo recentemente descrito é um patógeno foliar emergente que está se tornando de grande importância econômica, *Litylenchus* (HANDOO; KANTOR; CARTA, 2020). Os nematoides desse gênero causam doenças em árvores (*Fagus grandifolia* Ehrh. *Fagus crenata* Hulme) e arbustos (*Coprosma repens* A. Rich.), sendo a subespécie *Litylenchus crenatae mccannii* Handoo, Li, Kantor, Bauchan, McCann, Gabriel, Yu, Reed, Koch, Martin, and Burke, 2020 muito agressiva à *F. grandifolia* (CARTA et al., 2020). Os sintomas observados incluem esverdeamento internerval, espessamento e clorose nas folhas, afinamento do dossel e mortalidade (CARTA et al., 2020). Esse nematoide já foi encontrado nos Estados Unidos (Ohio, Pensilvânia, Nova York, Connecticut, Nova Jersey, Rhode Island e Oeste da Virginia), no Canadá (Ontário), no Japão e na Nova Zelândia (HANDOO; KANTOR; CARTA, 2020; KANZAKI et al., 2019; ZHAO et al., 2011).

## 2.6. Sintomas

Os nematoides da subfamília Anguininae infectam plantas e induzem sintomas como manchas cloróticas foliares entre nervuras, galhas em folhas, flores, sementes, hastes e raízes, encurtamento de entrenós, engrossamento de caules, entre outros (SUBBOTIN et al., 2004). Como exemplos de anguinídeos causadores de galhas, pode-se citar *Anguina* spp. que geralmente causam galhas em sementes, podendo também causar galhas em flores, folhas e hastes das plantas; *Subanguina radicularis* (Greeff, 1872) Paramonov, 1967 que é capaz de formar galhas nas raízes de *Poa annua* L. e *Pterotylenchus* sp. na haste das plantas de *Desmodium ovalifolium* (SIDDIQI, 2000). Por outro lado, dentre os causadores de manchas foliares, tem-se *Zeatylenchus pittosporum*, Zhao, Davies, Alexander e Riley, 2013, *Ditylenchus drepanocercus* Goodey, 1953 e *Litylenchus coprosma*. Mais exemplos podem ser consultados no Quadro 1.

## 2.7. Identificação dos gêneros da subfamília Anguininae

Para auxiliar na identificação dos nematoides apresentados, um quadro foi proposto com as principais características diagnósticas para os gêneros da subfamília Anguininae (Quadro 1).

Diante da detecção de um nematoide anguinídeo associado a *I. cairica* (L.) Sweet, um estudo taxonômico desse nematoide, de sua biologia, sua interação com a *I. cairica*, gama de hospedeiros, foi conduzido e os resultados são aqui apresentados. Esse nematoide foi nomeado provisoriamente como nematoide foliar de *Ipomoea* (NFI).

**Quadro 1.** Morfologia comparativa entre gêneros da subfamília Anguininae (DAVIES et al., 2009; FORTUNER e MAGGENTI, 1987; SIDDIQI, 2000; ZHAO et al., 2011; ZHAO et al., 2013). (+) indica presença da característica, (-) indica ausência da característica, (*sin.*) indica os gêneros sinônimos, segundo SIDDIQI, 2000. Os gêneros destacados em negrito são considerados válidos por SIDDIQI, 2000, sendo também indicadas suas respectivas sinonímias.

Gênero	Sintoma na planta: Galha	Fêmea	Columella	Ráquis	Flaps vulvar (epiptygma)	Saco pós-uterino	Bulbo mediano	Bulbo basal	Nº de linhas no campo lateral	Póro excretor	Gubernácululo	Bursa	Formato da cauda	Ovário	Hospedeiros	Local	Descrição
nematoide foliar de <i>Ipomoea</i> (NFI)	-	Delgada e Semi-obesa	4 x 4	-	-	+	muscular	Não ensacado, sobrepõe dorsalmente	4	Posterior ao anel nervoso	+	Leptodera	Conoide	Reflexado	<i>Ipomoea cairica</i> e <i>I. syringifolia</i>	Brasil	Caracterizado neste estudo
<b>Anguina</b> <i>sin.</i> "Angvina", "Anguillulina", "Paranguina"	+ (sementes, hastes, folhas e inflorescência)	Semi-obesa, espiral	multicelular	+	-	+	não-muscular ou muscular	Ensacado ou Sobrepõe dorsalmente	variável	Posterior ao anel nervoso	+	Leptodera	Conoide	Reflexado	gramíneas	Europa, Ásia, América do Norte, Oceania, África do Sul.	Scopoli, 1777
<i>Diptenchus</i>	Não informado	Delgada	4 x 4	-	-	-	muscular	Ensacado	5	Na base da faringe	+	Leptodera	Cônica	Reflexado	<i>Vitis vinifera</i>	Índia	Khan, Chawla & Seshadri, 1969
<b>Ditylenchus</b> <i>sin.</i> "Anguillulina"	+ / - (também é micófago)	Delgada	4 x 4 ou multicelular	-	-	+	não-muscular ou muscular	Ensacado ou leve sobreposição dorsal	4 ou 6	Posterior ao anel nervoso	+	Leptodera ou Pelodera	Conoide alongada à filiforme	Estendido	450 espécies de plantas: <i>Dipsacus fullonum</i> , <i>Miconia</i> spp., Alho, etc	Europa, América, África, Ásia e Oceania	Filipjev, 1936
<i>Ficotylus</i>	-	Delgada	4x4	-	-	+	não muscular (ausência de válvulas)	Sobrepõe dorsalmente	2 ou 4	Posterior ao anel nervoso	+	Pelodera ou Leptodera	Conoide alongada	Estendido	<i>Ficus colubrina</i> e, <i>Ficus congesta</i>	Costa Rica, Austrália	Davies et al., 2009
<i>Indoditylenchus</i>	Não informado (mangueiras)	Delgada	Não avaliado	-	-	+	Não informado na descrição	Ensacado	4	5-7 diâmetro da cabeça anterior ao bulbo mediano	+	Leptodera	Conoide alongada	Estendido	? (mangue)	Índia	Sinha, Choudhury & Baqri, 1985

<i>Litylenchus</i>	<i>L. coprosma</i> (-) <i>L. crenatae</i> (+)	Delgada e Semi- obesa	4 x 4	-	-	+	não- muscular ou muscular	Ensacado	4 ou 6	Posterior ao anel nervoso	+	Pelodera	Conoide	Estendi do ou Reflexa do	<i>Coprosma repens</i> <i>Fagus crenata</i> Blume, <i>F. grandifolia</i>	Nova Zelândia Japão, EUA, Canadá	Zhao et al., 2011
<i>Nothanguina</i>	+ (folhas, bainha de folhas, hastes e inflorescências)	Semi- obesa, espiral	multi- celular	+	-	+	-	Ensacado ou pequena sobreposi ção dorsal	Não informa do	Posterior ao anel nervoso	-	Leptodera	Conoide	Não informa do	<i>Andropogon pertusus</i>	Índia	Whitehead, 1959
<b><i>Nothotylenchus</i></b> <i>sin.</i> <i>"Boleodoroides"</i> , <i>"Boleodorus"</i>	-	Delgada	4 x 4	-	-	+	não- muscular (ausência de válvulas)	Ensacado ( <i>offset</i> ao intestino)	4 ou 6	Posterior ao anel nervoso	+	Leptodera	Conoide alongada	Estendi do	Alfafa, trevo vermelho, beterraba e morango	EUA, Japão, Índia, Irã	Thorne, 1941
<i>Orrina</i>	+	Delgada	4 x 4	-	-	+	-	Leve sobreposi ção dorsal	4	não claro	+	Leptodera	Conoide	Estendi do	<i>Solanum elaeagnifolium</i>	EUA, Índia, México	Brzeski , 1981
<i>Pseudhalenchus</i>	Não avaliado	Delgada	4 x 4	-	-	+	muscular	sobrepõe dorsalme nte	4	Posterior ao anel nervoso	+	Leptodera	Conoide alongada	Estendi do	Citrus	EUA	Tarjan, 1958
<i>Pterotylenchus</i>	+ (haste)	Delgada	4 x (8- 9)	-	+	+	-	sobrepõe dorsalme nte	4	Posterior ao anel nervoso	Não avaliado (♂ desconhe cido)	Não avaliado (♂ desconhe cido)	Conoide alongada	Estendi do	<i>Desmodium ovalifolium</i> Wall.	Colômbia	Siddiqi & Lenné, 1984
<i>Safianema</i>	- (também é micófago)	Delgada	4 x 4	-	-	+	muscular	sobrepõe lateralme nte	6	Posterior ao anel nervoso	+	Leptodera	Conoide alongada à filiforme	Estendi do	Carvalho (rizosfera)	Inglaterra	Siddiqi, 1980
<b><i>Subanguina</i></b> <i>sin.</i> <i>"Afrina"</i> , <i>"Caconema"</i> , <i>"Cynipanguina"</i> , <i>"Heteroanguina"</i> , <i>"Mesoanguina"</i>	+ (folhas, flores, raízes)	Delgada e Semi- obesa	4 x (8- 12)	-	-	+	muscular	Ensacado ou sobrepõe dorsalme nte	Múltipla s	Posterior ao anel nervoso	+	Leptodera	Conoide	Reflexa do	Gramíneas: <i>Poa annua</i> <i>Agropyron repens</i>	Europa, Ásia, Oceania, América	Paramo nov, 1967
<i>Zeatylenchus</i>	-	Delgada e Semi- obesa	4 x 4	-	-	+	não- muscular	2 bulbos terminais, ensacado s ou com sobreposi ção dorsal	3	Na direção dos nódulos do estilete retraído	+	Leptodera	Conoide	Estendi do	<i>Pittosporum tenuifolium</i> <i>Pittosporum crassifolium</i>	Nova Zelândia	Zhao et al., 2013

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Realizar estudo taxonômico do nematoide anguinídeo associado a *I. cairica* empregando a taxonomia integrativa. Determinar se esse nematoide é o agente causal das manchas cloróticas observadas em *I. cairica* e esclarecer aspectos da biologia desse nematoide.

#### 3.2. Específicos

- Realizar a caracterização morfológica, morfométrica e molecular desse nematoide anguinídeo.
- Determinar o seu relacionamento filogenético com outras espécies abrigadas na família Anguininae.
- Realizar estudo histopatológico em plantas de *I. cairica* infectadas por esse nematoide anguinídeo.
- Determinar a duração da embriogênese desse anguinídeo.

### 4. MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1. Obtenção da população do nematoide

Plantas de *I. cairica* naturalmente infectadas foram coletadas no campus da UFV onde o nematoide foi encontrado (20°46'05,8"S/42°52'15,6"O). Para extrair os espécimes, folhas de *I. cairica* foram cortadas em pedaços de 2 a 5 mm e imersas em água destilada por 2 a 4 h (modificado de FANELLI et al., 2018), para que os nematoides se movessem para fora do tecido foliar. Em seguida, estes foram observados sob o microscópio estereoscópico e utilizados para a caracterização morfológica, morfométrica, molecular e demais estudos descritos a seguir. Adicionalmente, foi feito um levantamento da ocorrência do anguinídeo infectando *I. cairica* no campus da UFV. Para isso, plantas que apresentaram sintomas de mancha angular clorótica foram coletadas e submetidas à extração como descrito acima. Todos os locais de coleta foram georreferenciados.

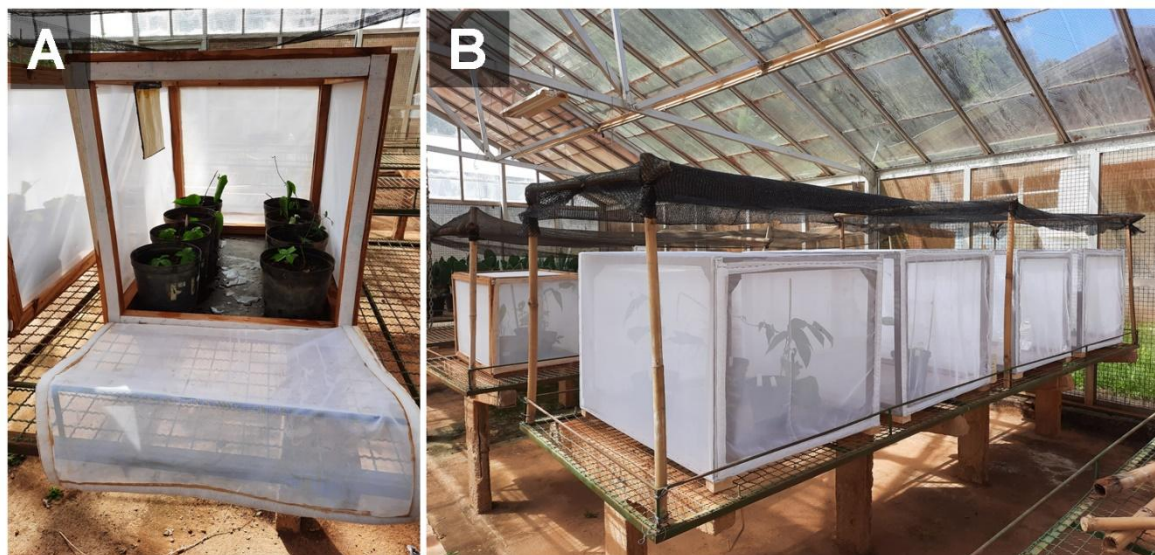
#### 4.2. Inoculação artificial do NFI em *Ipomoea cairica* e *I. syringifolia*

Para verificar se o NFI é o agente causal da mancha foliar observada em *I. cairica* e em *I. syringifolia*, dois métodos de inoculação artificial foram testados: por aspersão (ORR; ABERNATHY; HUDSPETH, 1975; ROBINSON; ORR; ABERNATHY, 1978) e deposição do inóculo (ORR; ABERNATHY; HUDSPETH, 1975). Para isso,

foram preparadas mudas de *I. cairica* e *I. syringifolia* obtidas por meio de estaquia de material coletado em local de ocorrência do nematoide (TOGNON; PETRY, 2012). Vasos de dois litros foram utilizados contendo uma mistura de solo, areia e substrato estéreis na proporção de 1:2:1 (v / v). No caso da aspersão, folhas jovens de corda-de-viola expandidas, foram perfuradas com o auxílio de uma agulha hipodérmica previamente autoclavada. Em seguida, as mesmas folhas foram pulverizadas manualmente com borrifador doméstico, nas faces adaxial e abaxial, com uma suspensão aquosa de nematoides (ovos, juvenis, machos e fêmeas) calibrada para 500 e 1000 indivíduos em 2 mL para *I. cairica* e *I. syringifolia*, respectivamente. No método de deposição, os nematoides (juvenis e adultos) foram pescados e transferidos para frascos do tipo Syracuse contendo 30 µL água destilada. Com uma agulha estéril, foram feitos furos nas folhas sadias. Cada espécie de planta recebeu no total 60 nematoides. Para *I. cairica*, dois folíolos por planta foram inoculados, sendo que cada folíolo recebeu 30 espécimes do anguinídeo, sobre as perfurações recobertas por um pedaço de algodão de 0,02 g, umedecido com 170 µL de água destilada. Para *I. syringifolia*, uma folha por planta foi inoculada com 60 espécimes do anguinídeo, que foram depositados sobre as perfurações cobertas por um pedaço de algodão de 0,04 g umedecido com 370 µL de água destilada.

Nos dois métodos, as plantas recém-inoculadas foram mantidas em câmara de nevoeiro por 48h, após esse período, as mesmas foram transferidas para casa de vegetação, onde a temperatura e a umidade relativa do ar foram registradas diariamente. Na casa de vegetação, as mudas foram mantidas em gaiolas de madeira forradas com tecido (Figura 1A), para proteção contra insetos transmissores de vírus. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, em esquema de parcelas subdivididas, sendo as parcelas: plantas inoculadas e não inoculadas; as subparcelas: espécies de *I. cairica* e *I. syringifolia*; e as subsubparcelas: os métodos de inoculação aspersão e deposição. Os vasos com as testemunhas foram borrifados igualmente com 2 mL de água destilada. A unidade experimental foi constituída de uma planta por vaso. O experimento foi repetido duas vezes. A temperatura e umidade relativa do ar foram coletadas nos horários mais quentes do dia. A temperatura mínima média foi de 18 °C ( $\pm 1,7$ ) e a máxima de 36 °C ( $\pm 2,1$ ). A média da umidade relativa do ar variou de 49 % ( $\pm 4,9$ ) a 79 % ( $\pm 4,0$ ). A avaliação dos sintomas foi realizada diariamente, folhas de *I. cairica* e *I. syringifolia*

que apresentaram sintomas de mancha angular foram coletadas e submetidas a extração conforme descrito no item 4.1. Os espécimes recuperados tiveram sua morfologia comparada à população inicialmente inoculada para a confirmação do agente etiológico da doença.



**Figura 1.** Teste de patogenicidade do NFI a plantas cultivadas. **(A)** Gaiola onde as plantas foram mantidas antes e depois da inoculação. **(B)** Experimento sendo conduzido em casa de vegetação. Cada bancada representou uma parcela: plantas inoculadas e plantas não inoculadas. Dentro de cada gaiola havia uma planta de cada espécie: *Ipomoea cairica*, arroz, fava e batata-doce.

#### 4.3. Teste de patogenicidade de NFI a plantas cultivadas

A patogenicidade de NFI a plantas cultivadas também foi avaliada para se determinar se esse nematoide teria potencial de limitar o cultivo de alguma cultura com importância econômica. Segundo SUBBOTIN et al. (2004), os nematoides da família Anguinidae possuem gama de hospedeiros restrita a poucas famílias botânicas, por isso optou-se por avaliar a hospedabilidade de plantas proximoamente relacionadas à hospedeira original ao NFI. Foram selecionadas para isso a batata-doce (*Ipomoea batatas*), a única espécie de *Ipomoea* com importância econômica (“The Plant List”, 2021), o arroz (*Oryza sativa*) e fava (*Vicia faba*), estes últimos por serem descritos na literatura como hospedeiros de outros anguinídeos filogeneticamente próximos ao NFI (IBRAHIM; PERRY, 1993; KEPENEKCI; ÖKTEN, 1997; VOVLAS et al., 2011). *Ipomoea syringifolia* não foi utilizada neste experimento porque ela só foi encontrada em local de ocorrência do nematoide, dificultando assim, a produção das mudas saudáveis para a inoculação.

#### 4.3.1. Obtenção das mudas

As mudas de batata-doce foram formadas a partir do enraizamento de ramas em bandejas de isopor de 128 células contendo substrato “Tropstrato HT Hortaliças”. As mudas permaneceram em bandejas até atingirem de dois a três pares de folhas definitivas. Após esse período, as mesmas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade para 2 L, contendo uma mistura de solo, substrato e areia na proporção de 1:1:2 (v/v). A fava “*Vicia faba*” e o arroz cv. “*Primavera*” foram semeados diretamente em vasos de 2 L preenchidos com a mesma proporção de solo, substrato e areia que foram usados para a batata-doce. As mudas foram mantidas em casa de vegetação dentro de gaiolas de madeira forradas com tecido (Figura 1B), para proteção contra insetos, até a inoculação.

#### 4.3.2. Montagem dos experimentos

As mudas produzidas como descritas anteriormente foram inoculadas quando atingiram de 4 a 6 folhas expandidas. Devido ao ciclo de cada cultura ser diferente, algumas mudas precisaram ser podadas antes da inoculação. A inoculação foi feita pelo método da aspersão (item 4.2). A concentração do inóculo foi calibrada para 1.000 nematoides (juvenis e adultos) em 2 mL de água destilada. Foram utilizadas duas testemunhas: testemunha positiva que consistiu na inoculação de plantas de *I. cairica* com a mesma concentração de inóculo preparada para as demais, e testemunha negativa, que foi a inoculação de cada espécie de planta com água destilada. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, em esquema de parcelas subdivididas, sendo as parcelas: plantas inoculadas e não inoculadas, e as subparcelas: quatro espécies de plantas (*I. cairica*, arroz, fava e batata-doce). Os vasos com as testemunhas negativas foram borrifados igualmente com 2 mL de água destilada. A unidade experimental foi constituída de uma planta por vaso. O experimento foi repetido duas vezes. As plantas foram observadas diariamente, durante 30 dias, para a documentação do aparecimento e progressão dos sintomas. A temperatura e umidade relativa do ar foram coletadas nos horários mais quentes do dia. A temperatura mínima média foi de 21 °C ( $\pm 2,7$ ) e a máxima de 41 °C ( $\pm 2,5$ ). A média da umidade relativa do ar variou de 38 % ( $\pm 7,9$ ) a 64 % ( $\pm 5,1$ ). Após esse período, as folhas sintomáticas foram coletadas e submetidas a extração como descrito no item 4.1.

#### 4.4. Determinação indireta da gama de hospedeiros do NFI

Coletas de material vegetal provenientes de plantas pertencentes a diferentes famílias botânicas foram feitas nos locais de ocorrência natural do anguinídeo. Foram coletadas parte aérea de plantas que apresentavam sintomas de manchas foliares cloróticas. Uma parcela das amostras coletadas foi reservada para a identificação botânica e o restante utilizado na extração do nematoide. Os nematoides foram extraídos conforme descrito no item 4.1. Para a confirmação da presença do nematoide em questão, os espécimes foram observados sob microscópio de luz e a caracterização morfológica e molecular realizada como descrito nos itens 4.5 e 4.7.

#### 4.5. Caracterização morfológica e morfométrica

Os nematoides obtidos como descrito anteriormente foram pescados sob microscópio estereoscópico individualmente da suspensão e transferidos para lâminas de vidro para microscopia contendo uma gota de água. As lâminas foram cobertas por lamínulas, as bordas seladas com esmalte e examinadas imediatamente. Os diferentes estádios de desenvolvimento do anguinídeo (fêmeas jovens, fêmeas maduras e machos) foram utilizados para o estudo morfológico e morfométrico, com o auxílio de um microscópio de luz OLYMPUS BX53 com uma câmera de captura de imagens acoplada e processadas no programa Olympus cellSens Dimension v.1.17. As estruturas mensuradas foram: comprimento do corpo ( $L$ ), tamanho total do estilete e do cone do estilete, comprimento da gônada e de sua parte reflexada, tamanho da cauda, das espículas e do gubernáculo, comprimento do saco pós-uterino, diâmetro máximo do corpo, largura do corpo na região da cloaca ou ânus e da vulva, diâmetro máximo do bulbo mediano, dos lábios, altura dos lábios, diâmetro do corpo na região dos nódulos do estilete, distância da extremidade anterior do corpo até o centro do bulbo mediano, comprimento entre a vulva e a extremidade anterior do corpo, distância da abertura da glândula esofagiana dorsal até os nódulos do estilete, distância entre a extremidade anterior do corpo e o anel nervoso, distância entre a região anterior e o poro excretor e entre a vulva até o ânus. Com base nessas medidas, foram calculados os seguintes índices:  $a$  (razão entre  $L$  e o diâmetro máximo do corpo),  $c$  (razão entre  $L$  e o comprimento da cauda),  $c'$  (razão entre o comprimento da cauda e o diâmetro do corpo na região do ânus),  $V\%$  (razão entre a distância da extremidade anterior do corpo até a vulva/ $L$ , em percentagem),  $T\%$  (distância entre a abertura da cloaca até a extremidade anterior do testículo/ $L$ , em percentagem),  $m\%$

(comprimento do cone do estilete/comprimento total do estilete, em percentagem), s (comprimento total do estilete/diâmetro do corpo na região dos nódulos do estilete), razão entre o diâmetro e a altura dos lábios, razão entre o comprimento do saco pós-uterino e o diâmetro do corpo na região da vulva e razão entre o comprimento do saco pós-uterino e a distância da vulva ao ânus (%) (SIDDIQI, 2000). Em adição, os caracteres morfológicos e morfométricos observados foram comparados com espécies morfológicamente semelhantes.

#### **4.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP). A preparação dos nematoides consistiu em 6 etapas: extração, fixação, desidratação, secagem, montagem da amostra e metalização (EISENBACK, 2003). Então, os nematoides foram extraídos conforme o item 4.1, utilizando recipientes de vidro de 1,9 cm de diâmetro, que continham 1 mL de água gelada, mantidos em banho de gelo. O conjunto foi armazenado em geladeira (4 °C) por 15 min ou até que os nematoides ficassem relaxados.

Para a fixação de proteínas, usando uma capela, iniciou-se com a adição de três gotas de glutaraldeído 4% em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Progressivamente, foram adicionadas três gotas deste fixador a cada 15 min até se completar o volume total de 2 mL, mantendo sempre na geladeira entre os intervalos. Os nematoides foram armazenados em solução fixadora por 24 h em geladeira dentro de frascos hermeticamente fechados. Em seguida, os nematoides foram transferidos para pequenas peneiras plásticas de 1 cm de diâmetro. Essas mini peneiras foram acomodadas dentro de recipientes de vidro para que permitissem a troca de soluções sem perda de nematoides. Para a fixação de lipídeos, foi adicionada uma mistura de tetróxido de ósmio (1 %) e tampão de cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2. Após 24 h, a solução foi retirada com pipeta e descartada.

Na etapa de desidratação, foi utilizado álcool etílico diluído em série 5, 10, 20, 25, 50, 75, 90, 95 e 100%. O álcool foi aplicado na amostra e deixado por 15 a 20 min em cada série até a concentração máxima. O recipiente foi mantido em geladeira durante os intervalos. Após a desidratação, a amostra foi secada em secador de ponto

crítico (Baltec EM CPD 300). A montagem da amostra foi feita sobre um “*stub*” metálico com fita adesiva dupla face. Os espécimes foram posicionados cuidadosamente sobre a fita adesiva com as estruturas de interesse voltadas para cima para facilitar a observação. Para observar a região labial e a ponta da cauda dos nematoides vistos do topo, foi colocado um pedaço de fio de cabelo como base para acomodá-los, formando um ângulo de inclinação com o “*stub*”.

Por fim, foi feita a metalização dos espécimes. Para isso, as amostras montadas sobre o “*stub*” foram transferidas para a câmara de metalização (Baltec MED 010) onde ocorreu a deposição de partículas de ouro sobre os nematoides. Em seguida, as amostras foram observadas ao microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-IT300LV).

#### **4.7. Caracterização molecular**

##### **4.7.1. Extração do DNA**

Para a extração do DNA, dez nematoides (pertencentes ao mesmo estágio de desenvolvimento) foram transferidos para microtubos de 0,2 mL contendo 18 µL de tampão para PCR 1X (Promega) (DE JESUS et al., 2016). Após, aproximadamente cinco microesferas de vidro (425-600 µm, Sigma-Aldrich) por microtubo foram adicionadas. Os microtubos foram acomodados no disruptor de tecidos (TissueLyser II, Qiagen) e colocados para agitar por 30 seg a uma frequência de 30 Hz. Por fim, foram adicionados 2 µL de proteinase K (Sigma-Aldrich) na concentração de 100 µg/mL (DE JESUS et al., 2016), e as amostras foram incubadas no termociclador com a seguinte programação: 60 °C por 60 min, 95 °C por 15 min e 15 °C por 2 min. O DNA extraído foi armazenado em freezer a -20 °C até ser utilizado em reações de amplificação por PCR.

##### **4.7.2. Amplificação de diferentes regiões genômicas e sequenciamento**

As seguintes regiões genômicas foram caracterizadas: a região SSU (subunidade menor do RNA ribossômico), a expansão D2-D3 da região LSU (subunidade maior do RNA ribossômico) e o espaçador de transcrito interno (ITS) do genoma nuclear, e o gene COI (citocromo C oxidase, subunidade I) do genoma mitocondrial. Para tal, foram usadas as combinações de primers mostradas no Quadro 2. As reações de PCR foram montadas em 25 µL de reação final contendo 12,5 µL de Go Taq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega), 0,25 µL (10 µM) de cada

primer, 1  $\mu$ L do extrato de DNA e 11  $\mu$ L água estéril e livre de nuclease para completar o volume da reação. Uma reação sem DNA foi incluída como controle negativo. As condições de amplificação das diferentes regiões do DNA foram as seguintes: desnaturação a 95 °C por 2 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 55 °C (para os primers D2A/D3B), 46,1 °C (para primers 1096F/1912R), 54,3 °C (para os primers 1813F/2646R), 53 °C (para os primers COI-F1/COI-R2) e 61 °C (para os primers S18F/S26R) por 30 s e extensão a 72 °C por 45 s. A extensão final foi feita a 72 °C por 5 min. Após a amplificação, 2  $\mu$ L do produto da PCR foram utilizados para corrida eletroforética em gel de agarose a 1 % e em tampão 1X TBE (Tris-Borato-EDTA). O tampão de carregamento foi preparado em três etapas: primeiro, preparou-se o corante que foi constituído de 6,25 mL de glicerol 80%, 1 mL de azul de bromofenol 1%, 0,1 mL de tris-HCl 1M, pH=8,0, e 2,65 mL de água mili-Q; depois, o GelRed™ (Biotium) foi diluído em água mili-Q na proporção 1:499; por último, foi feita a mistura de GelRed™ diluído com o corante (1:2). O resultado da amplificação foi comparado com o marcador molecular de 1Kb (Promega) e o gel, visualizado em um transiluminador de luz UV (Kasvi). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), conforme recomendação do fabricante e então enviados para o sequenciamento.

**Quadro 2.** Conjuntos de primers utilizados para amplificação da subunidade menor do RNA ribossomal (SSU), expansão D2-D3 da subunidade maior do RNA ribossomal (LSU), espaçador de transcrito interno (ITS) e subunidade I da citocromo oxidase (COI).

Região alvo	Primer	Sequência 5' >> 3'	Referência
rDNA-SSU	1096F	GGTAATTCTGGAGCTAATAC	(HOLTERMAN et al., 2006)
	1912R	TTTACGGTCAGAACTAGGG	(HOLTERMAN et al., 2006)
	1813F	CTGCGTGAGAGGTGAAAT	(HOLTERMAN et al., 2006)
	2646R	GCTACCTTGTTACGACTTTT	(HOLTERMAN et al., 2006)
rDNA-LSU	D2A	ACAAGTACCGTGAGGGAAAGT	(NUNN, 1992)
	D3B	TGCGAAGGAACCAGCTACTA	(NUNN, 1992)
rDNA-ITS	S18F	TTGATTAGGTCCCTGCCCTTT	(MAREK et al., 2005)
	S26R	TTTCACTCGCCGTTACTAAGG	(MAREK et al., 2005)
mtCOI	COI-F1	CCTACTATGATTGGTGGTTTTGGTAATTG	(KANZAKI; FUTAI, 2002)
	COI-R2	GTAGCAGCAGTAAAATAAGCACG	(KANZAKI; FUTAI, 2002)

#### 4.8. Análise Filogenética

As sequências obtidas pelo sequenciamento foram curadas no programa Bioedit Sequence Aligment Editor (HALL, 2012) e comparadas com as sequências de outras espécies semelhantes, selecionadas de acordo com o programa de pesquisa de homologias BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) no banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Além de sequências de representantes da subfamília Anguininae, foram utilizadas sequências de espécies da família Tylenchidae (*Atetylenchus* sp., *Coslenchus* sp., *Filenchus* sp.) e da família Psilenchidae (*Psilenchus* sp.), porque de acordo com o teste de homologias BLAST, estes eram semelhantes ao NFI. As sequências utilizadas tanto nas análises filogenéticas quanto na de delimitação de espécies (item 4.9) estão listadas nos Quadros 4, 5 e 6. Os alinhamentos entre as sequências homólogas foram feitos no

programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis X (MEGA X) (TAMURA et al., 2013). Após isso, as sequências alinhadas foram curadas no programa online Gblocks v.0.91b (CASTRESANA, 2000) que tem a finalidade de eliminar posições mal alinhadas e regiões divergentes em alinhamentos múltiplos, ao mesmo tempo que minimiza a perda de sítios informativos (Quadro 3). O modelo de substituição de bases foi determinado usando o programa JModelTest2 v.2.1.6 (DARRIBA et al., 2012) sob o critério de informação de Akaike corrigido (AICc) (SUGIURA, 1978), sendo os modelos selecionados GTR+I+G, GTR+I+G e GTR+G, para SSU, LSU e ITS, respectivamente. O teste de homogeneidade de partição (partition homogeneity test – PHT) entre as sequências SSU, LSU e ITS foi feito por meio do programa PAUP v.4.0a (CUMMINGS, 2004). Os genes (SSU, LSU e ITS) foram concatenados empregando o programa R v.4.2 (R CORE TEAM, 2022). A reconstrução filogenética foi inferida por Inferência Bayesiana no programa MrBayes v.3.2.7a disponível no CIPRES *Science Gateway* v.3.3 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). Cada análise foi executada utilizando simultaneamente duas corridas com quatro cadeias de 15 milhões de gerações cada. As cadeias de Markov (MCMC - Monte Carlo Markov Chains) foram amostradas a intervalos de 1.000 gerações com descarte (“*burn-in*”) de 25 % das árvores geradas. Para determinar as probabilidades posteriores, usou-se 25 % das árvores consenso geradas. A possível falta de convergência entre as cadeias foi verificada no programa Software Tracer v.1.7.0 (RAMBAUT et al., 2018). A visualização das árvores consensos foi feita por meio do programa FigTree v.1.4.4 (RAMBAUT, 2009) e a edição das mesmas foi realizada no programa online Interactive Tree Of Life (iToL) v.6 (<https://itol.embl.de>) e no programa de edição de imagens Inkscape v.0.92.5 (<https://inkscape.org/pt-br/release/inkscape-0.92/?latest=1>).

**Quadro 3.** Comprimento das sequências, em pares de bases (pb), antes (Original) e depois de curada no Gblocks v.0.91b para cada alinhamento múltiplo (SSU, LSU e ITS). A porcentagem do alinhamento original conservada pelo programa está indicada entre parênteses.

Região alvo	Tamanho da sequência	
	Original	Curada no Gblocks
<b>SSU</b>	1804 pb	756 pb (41 %)
<b>LSU</b>	869 pb	611 pb (70 %)
<b>ITS</b>	1399 pb	532 pb (38 %)

**Quadro 4.** Informações das sequências de SSU do DNA ribossômico utilizadas neste estudo. Os táxons *Heteroanguina* spp. e *Mesoanguina* spp. são considerados sinônimos de *Subanguina* spp. por Siddiqi (2000).

Espécie	Nº de acesso	Isolado	Localidade	Hospedeiro	Publicação
nematoide foliar de <i>Ipomoea</i> (NFI)	ainda serão depositadas	ainda serão depositadas	Brasil	<i>I. cairica</i> e <i>I. syringifolia</i>	caracterizado neste estudo
<i>Atetylenchus cf. graminus</i>	MN807626, MN807627	AQ06_1, AQ07_1	Irã	Rizosfera de plantas selvagens	Hosseinvand et al., 2020
<i>Coslenchus rafiqi</i>	MK039733, MK039734	"fafu01" e "fafu02"	China	Pântano, solo de gramíneas	Qiao et al., 2019
<i>Ditylenchus acantholimonis</i>	MW577172	Yz	Irã	Rizosfera de <i>Acantholimon</i> sp.	Aliverdi; Pourjam; Pedram, 2021
<i>Ditylenchus dipsaci</i>	KJ492934	CA02	Canadá	Cebola	Qiao et al., 2016
<i>Ditylenchus drepanocercus</i>	JQ429768	CA46	Brasil	<i>Miconia calvescens</i>	Oliveira et al., 2013
<i>Ditylenchus gallaeformans</i>	JQ429767	CA45	Brasil e Costa Rica	<i>Miconia</i> spp.	Oliveira et al., 2013
<i>Ditylenchus gigas</i>	HQ219211	Noc08	Itália	Feijão fava	Vovlas et al., 2011
<i>Ditylenchus gilanicus</i>	MG742324, MG835411	-	Irã	<i>Fagus orientalis</i>	Yaghoubi et al., 2018
<i>Ditylenchus halictus</i>	AY589297	199	Alemanha	<i>Halictus sexcintus</i> (abelha) e <i>Monilinia fructicola</i>	Giblin-Davis et al., 2010
<i>Ditylenchus oncogenus</i>	KF612017	C70	Italia	<i>Sonchus bulbosus</i>	Vovlas et al., 2016
<i>Ditylenchus stenurus</i>	KX400575	RH-2017	Irã	Rizosfera de videira	Esmaeili et al., 2017
<i>Ditylenchus weischeri</i>	MG383943	PG-(33-AB)	Canada	<i>Cirsium arvense</i>	Madani; Tenuta, 2018
<i>Ficotylus congestae</i>	EU018049	460	Austrália	<i>Ficus congesta</i>	Davies et al., 2009
<i>Ficotylus laselvae</i>	EU018050	579	Costa Rica	<i>Ficus colubrinae</i>	Giblin-Davis et al., 2014
<i>Filenchus annulatus</i>	JQ814880	3T08B11	Irã	Rizosfera de <i>Prunus</i> sp.	Atighi et al., 2013
<i>Litylenchus coprosma</i>	GU727546	-	Nova Zelândia	<i>Coprosma repens</i>	Zhao et al., 2011
<i>Litylenchus crenatae</i>	LC383723	LC_Marioka	Japão	<i>Fagus crenata</i>	Kanzaki et al., 2019

<i>Nothotylenchus andrassy</i>	MG025825	RH-2018	Irã	<i>Sphagnum</i> sp. (musgo)	Jalalinasab; Hosseini; Heydari, 2018
<i>Nothotylenchus phoenixae</i>	KX549317	RH-2017	Irã	Rizosfera de <i>Phoenix dactylifera</i> (palmeira)	Esmaeili; Heydari; Ye, 2017
<i>Psilenchus hilarulus</i>	EU915488	-	Espanha	Rizosfera de videira	Palomares-Rius, et al., 2009
<i>Zeatylenchus pittosporum</i>	JQ586255	NNCNZ 275	Nova Zelândia	<i>Pittosporum tenuifolium</i>	Zhao et al., 2013
<i>Aphelenchoides besseyi</i> (outgroup)	MK291493	57	EUA	<i>Fragaria × ananassa</i> (morango)	Oliveira et al., 2019

**Quadro 5.** Informações das sequências de LSU do DNA ribossômico utilizadas neste estudo. Os táxons *Heteroanguina* spp. e *Mesoanguina* spp. são considerados sinônimos de *Subanguina* spp. por Siddiqi (2000).

Espécie	Nº de acesso	Isolado	Localidade	Hospedeiro	Publicação
nematoide foliar de <i>Ipomoea</i> (NFI)	ainda serão depositadas	ainda serão depositadas	Brasil	<i>I. cairica</i> e <i>I. syringifolia</i>	caracterizado neste estudo
<i>Anguina obesa</i>	KX385109	"Juvenile2"	Irã	<i>Alopecurus mysuroides</i> Huds.	Mobasseri et al., 2017
<i>Atetylenchus</i> ef. <i>graminius</i>	MN807621, MN807622	AQ06, AQ07	Irã	Rizosfera de plantas selvagens	Hosseinvand et al. 2020
<i>Coslenchus rafiqi</i>	MK039729, MK039730	"fafu01" e "fafu02"	China	Pântano, solo de gramineas	Qiao et al., 2019
<i>Ditylenchus acantholimonis</i>	MW577171	Yz	Irã	Rizosfera de <i>Acantholimon</i> sp.	Aliverdi; Pourjam; Pedram, 2021
<i>Ditylenchus dipsaci</i>	MG676657.1	KHA806_2016-4	Japão	<i>Phlox subulata</i>	Ikuyo et al., 2018
<i>Ditylenchus drepanocercus</i>	JQ429772	CD930	Brasil	<i>Miconia calvescens</i>	Oliveira et al., 2013
<i>Ditylenchus gallaeformans</i>	JQ429771	CA122	Brasil e Costa Rica	<i>Miconia</i> spp.	Oliveira et al., 2013
<i>Ditylenchus gigas</i>	HQ219217	Noc08	Itália	Feijão fava	Vovlas et al., 2011
<i>Ditylenchus gilanicus</i>	MG742325	-	Irã	<i>Fagus orientalis</i>	Yaghoubi et al., 2018

<i>Ditylenchus halictus</i>	AY589364	199	Alemanha	<i>Halictus sexcintus</i> (abelha) e <i>Monilinia fructicola</i>	Giblin-Davis et al., 2010
<i>Ditylenchus oncogenus</i>	KF612015	C70	Italia	<i>Sonchus bulbosus</i>	Vovlas et al., 2016
<i>Ditylenchus stenurus</i>	KX400577	RH-2017	Irã	Rizosfera de videira	Esmaeili et al., 2017
<i>Ditylenchus weischeri</i>	MG551892	PG-(33-AB)	Canada	<i>Cirsium arvense</i>	Madani; Tenuta, 2018
<i>Ficotylus congestae</i>	EU018047	460	Austrália	<i>Ficus congesta</i>	Davies et al., 2009
<i>Ficotylus laselvae</i>	EU018048	579	Costa Rica	<i>Ficus colubrinae</i>	Giblin-Davis et al., 2014
<i>Filenchus annulatus</i>	JQ005017	3T08B11	Irã	Rizosfera de <i>Prunus</i> sp.	Atighi et al., 2013
<i>Litylenchus coprosma</i>	KY679564	NNCNZ3255	Nova Zelândia	<i>Coprosma repens</i>	Zhao et al., 2011
<i>Litylenchus crenatae</i>	LC383725	"Lc_Morioka"	Japão	<i>Fagus crenata</i>	Kanzaki et al., 2019
<i>Nothotylenchus andrassy</i>	MG025824	RH-2018	Irã	<i>Sphagnum</i> sp. (musgo)	Jalalinasab; Hosseini; Heydari, 2018
<i>Nothotylenchus medians</i>	OL622064, OL622065	427, 428, 429	Canadá	<i>Artiplex</i> sp.	Munawar et al., 2022
<i>Nothotylenchus persicus</i>	KT149799	-	Irã	Rizosfera de videira	Esmaeli et al., 2016
<i>Nothotylenchus similis</i>	OL622062, OL622063	D1, D2, D3	Canadá	gramíneas	Munawar et al., 2022
<i>Orrina phyllobia</i>	KT192617, KT192618	GTOMX1, GTOMX2	México	<i>Solanum elaeagnifolium</i>	Gómez et al., 2016
<i>Pterotylenchus cecidogenus</i>	MW208689, MW208690	1, 2	Colômbia	<i>Desmodium ovalifolium</i>	Velandia et al., 2021
<i>Psilenchus hilarulus</i>	EU915489	-	Espanha	Rizosfera de videira	Palomares-Rius, et al., 2009
<i>Subanguina radiculicola</i>	LT714118, LT714119	clone 172_11, clone 172_13	Escócia	<i>Dryas octopetala</i>	Fanelli et al., 2018
<i>Zeatylenchus pittosporum</i>	JQ586256	ZQZ-2012	Nova Zelândia	<i>Pittosporum tenuifolium</i>	Zhao et al., 2013
<i>Aphelenchoides besseyi</i> (outgroup)	MK294342	57	EUA	<i>Fragaria × ananassa</i> (morango)	Subbotin et al., 2020

**Quadro 6.** Informações das sequências de ITS do DNA ribossômico utilizadas neste estudo. Os táxons *Heteroanguina* spp. e *Mesoanguina* spp. são considerados sinônimos de *Subanguina* spp. por Siddiqi (2000).

<b>Espécie</b>	<b>N° de acesso</b>	<b>Isolado</b>	<b>Localidade</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Publicação</b>
nematoide foliar de <i>Ipomoea</i> (NFI)	ainda serão depositadas	ainda serão depositadas	Brasil	<i>I. cairica</i> e <i>I. syringifolia</i>	caracterizado neste estudo
<i>Afrina wevelli</i>	AF396317	-	África do Sul	<i>Eragrostis curvula</i>	Subbotin et al., 2004
<i>Anguina agropyri</i>	AF396355	-	Estonia	<i>Elumus repens</i>	Subbotin et al., 2004
<i>Anguina agrostis</i>	AF396344	-	Russia	<i>Agrostis capillaris</i>	Subbotin et al., 2004
<i>Anguina askenasyi</i>	AF396337	-	Estonia	<i>Calliergonella cuspidata</i>	Subbotin et al., 2004
<i>Anguina australis</i>	AF396334	-	Australia	<i>Ehrharta longeflora</i>	Subbotin et al., 2004
<i>Anguina funesta</i>	AF396347	-	Australia	<i>Lolium rigidum</i>	Subbotin et al., 2004
<i>Anguina graminis</i>	AF396351	-	Russia	<i>Festuca rubra</i>	Subbotin et al., 2004
<i>Anguina microlaenae</i>	AF396333	-	Australia	<i>Microlaena stipoides</i>	Subbotin et al., 2004
<i>Anguina obesa</i>	KX385107 KX385108	Female1 e Juvenile1	Irã	<i>Alopecurus mysuroides</i> Huds.	Mobasser et al., 2017
<i>Anguina phalaridis</i>	AF396352	-	Estonia	<i>Phleum phleoides</i>	Subbotin et al., 2004
<i>Anguina tritici</i>	AF396354	-	Australia	<i>Triticum aestivum</i>	Subbotin et al., 2004
<i>Ditylenchus dipsasi</i> "A"	AF396319	-	Estonia	<i>Trifolium pratense</i>	Subbotin et al., 2004
<i>Ditylenchus dipsasi</i> "B"	AF396323	-	Marrocos	<i>Vicia faba</i>	Subbotin et al., 2004
<i>Ditylenchus dipsaci</i> "C"	AF396322	-	Russia	<i>Cirsium setosum</i>	Subbotin et al., 2004
<i>Ditylenchus dipsaci</i> "D"	KJ567148	CA02	Canadá	Cebola	Qiao et a., 2016
<i>Ditylenchus drepanocercus</i>	JQ429774	CA46	Brasil	<i>Miconia calvescens</i>	Oliveira et al., 2013
<i>Ditylenchus gallaeformans</i>	JQ429779	CA47	Brasil e Costa Rica	<i>Miconia</i> spp.	Oliveira et al., 2013
<i>Ditylenchus gigas</i>	HQ219232 HQ219233	Noc08 clone I7, Noc08 clone I1	Itália	Feijão fava	Vovlas et al., 2011

<i>Ditylenchus halictus</i>	EF627047	199	Alemanha	<i>Halictus sexcintus</i> (abelha) e <i>Monilinia fructicola</i>	Giblin-Davis et al., 2010
<i>Ditylenchus laurae</i>	KX389268	FK308	Polônia	<i>Potamogeton perfoliatus</i>	Skwiercz et al., 2017
<i>Ditylenchus oncogenus</i>	KF612016	C70	Italia	<i>Sonchus bulbosus</i>	Vovlas et al., 2016
<i>Ditylenchus stenurus</i>	KX400576	RH-2017	Irã	Rizosfera de videira	Esmaeili et al., 2017
<i>Ditylenchus weischeri</i>	MG386845	PG-(33-AB)	Canadá	<i>Cirsium arvense</i>	Madani; Tenuta, 2018
<i>Heteroanguina caricis</i>	AF396311	-	Estonia	<i>Carex acuta</i>	Subbotin et al., 2004
<i>Heteroanguina ferulae</i>	AF396324	-	Tadjiquistão	<i>Ferula jaeschkeana</i>	Subbotin et al., 2004
<i>Heteroanguina graminophila</i>	AF396315	-	Russia	<i>Calamagrostis neglecta</i>	Subbotin et al., 2004
<i>Litylenchus coprosma</i>	GU727548	-	Nova Zelândia	<i>Coprosma repens</i>	Zhao et al., 2011
<i>Litylenchus crenatae</i>	LC383724	"Lc_Morioka"	Japão	<i>Fagus crenata</i>	Kanzaki et al., 2019
<i>Mesoanguina mobilis</i>	AF396331	-	Australia	<i>Arctotheca calendula</i>	Subbotin et al., 2004
<i>Mesoanguina moxae</i>	AF396314	-	Russia	<i>Artemisia rubripes</i>	Subbotin et al., 2004
<i>Mesoanguina picridis</i>	AF396329	-	Tadjiquistão	<i>Acroptilon repens</i>	Subbotin et al., 2004
<i>Nothotylenchus andrassy</i>	MG025826	RH-2018	Irã	<i>Sphagnum</i> sp. (musgo)	Jalalinasab; Hosseini; Heydari, 2018
<i>Nothotylenchus medians</i>	OL622071	42-1	Canadá	<i>Artiplex</i> sp.	Munawar et al., 2022
<i>Nothotylenchus phoenixae</i>	KX549318	RH-2017	Irã	Rizosfera de <i>Phoenix dactylifera</i> (palmeira)	Esmaeili; Heydari; Ye, 2017
<i>Nothotylenchus similis</i>	OL622068 OL622069	D1, D2	Canadá	gramíneas	Munawar et al., 2022
<i>Orrina phyllobia</i>	KT192615 KT192616	GTOMX1, GTOMX2	México	<i>Solanum elaeagnifolium</i>	Gómez et al., 2016
<i>Subanguina radicolata</i>	LT714110 LT714111	clone 171_6, clone 171_7	Escócia	<i>Dryas octopetala</i>	Fanelli et al., 2018
<i>Zeatylenchus pittosporum</i>	JQ586257	ZQZ-2012	Nova Zelândia	<i>Pittosporum tenuifolium</i>	Zhao et al., 2013
<i>Aphelenchoides besseyi</i> (outgroup)	MT271861	CD2415	EUA	<i>Fragaria × ananassa</i> (morango)	Subbotin et al., 2020

#### 4.9. Análise de Delimitação de Espécies

A delimitação de espécies foi feita pelo método de verossimilhança – *Generalized Mixed Yule Coalescent* (GMYC) (PONS et al., 2006). O modelo de GMYC usa uma árvore ultramétrica para inferir o ponto de transição (ou limiar) entre eventos de especiação (Processos de Yule) e eventos intraespecíficos (Processo de coalescência). Isso é possível, uma vez que os processos de especiação ocorrem em uma taxa muito menor do que eventos coalescentes. A árvore filogenética ultramétrica foi inferida por meio de uma análise Bayesiana com genes concatenados (regiões genômicas SSU, LSU e ITS) no programa BEAST2 v.2.6.6 (BOUCKAERT et al., 2019). Assim como para análise filogenética, o melhor modelo de substituição nucleotídica, foi determinado usando o programa JModelTest2 v.2.1.6 (DARRIBA et al., 2012) por meio do critério de informação de Akaike corrigido (AICc) (SUGIURA, 1978), sendo os modelos selecionados os mesmos utilizados para a análise filogenética. Foi utilizado o Processo de Yule com limiar único e relógio molecular estrito como “*priors*” na análise. Foram rodadas três cadeias de  $10^6$  passos com amostragens a cada  $10^3$  passos. As primeiras  $10^3$  árvores foram descartadas como “*burn-in*”. A possível falta de convergência entre as cadeias foi verificada no programa Software Tracer v.1.7.0 (RAMBAUT et al., 2018), garantindo-se que o tamanho efetivo da amostra fosse maior que 200. A distribuição posterior de árvores foi resumida utilizando o algoritmo de cladogramas de máxima credibilidade e essa visualizada no programa TreeAnnotator v.2.6.7 (BOUCKAERT et al., 2019). Por último, a árvore de maior credibilidade foi utilizada como entrada para a análise de delimitação de espécies no GMYC implementado no pacote “*splits*” (EZARD et al., 2022) no R v.4.2.

#### 4.10. Histopatologia de *Ipomoea cairica* infectada pelo nematoide foliar de *Ipomoea* (NFI)

Folhas de *I. cairica* sadias e infectadas foram coletadas e preparadas para diafanização e corte histopatológicos. As folhas infectadas foram coletadas em locais de ocorrência natural do nematoide.

##### 4.10.1. Diafanização

Para a diafanização, as folhas foram cortadas em pedaços de 2 cm e deixadas imersas em álcool 50% por 24h, depois, as amostras foram passadas para o álcool 70% e armazenadas em temperatura ambiente até o processamento. Em placas de Petri, as folhas foram mergulhadas em hidróxido de sódio a 5% e incubadas em estufa

a 60 °C por 2 h (Adaptado de ARNOTT, 1959). Após esse período, foram feitas 4 lavagens com água destilada a cada 30 min durante 2 h. Para clarear o tecido foliar, as folhas foram deixadas em hipoclorito de sódio comercial a 10%. Após clarificação, foram feitas mais 3 lavagens a cada dez minutos durante 30 min. As amostras foram transferidas para o álcool 50% por no mínimo 15 min. Depois, foi feita a coloração com fucsina alcoólica até o tecido foliar estar completamente corado. Para retirar o excesso de corante, as amostras foram lavadas em álcool 50% até que o líquido ficasse transparente (VASCO et al., 2014). Por fim, as folhas foram montadas entre lâminas e lamínulas, e como meio de montagem foi utilizada gelatina glicerínada. As lâminas montadas foram analisadas em fotomicroscópio (modelo AX70 TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) e a captura das imagens foi feita em câmera digital acoplada (modelo AxioCam HRc - Zeiss).

#### **4.10.2. Corte histopatológico**

Para os cortes, amostras de folhas foram fixadas em FAA (formaldeído – ácido acético – álcool 50%, 1:1:18) por 72h (Adaptado de JOHANSE N, 1940). Durante esse período, elas foram mantidas em dessecador sob vácuo para a retirada do ar e uma completa fixação. As amostras fixadas foram desidratadas em série crescente de etanol (50, 60, 70, 85 e 95%). Para isso, as mesmas foram lavadas em álcool 50%, transferidas para o álcool 60% e mantidas sob vácuo por 1h. Em seguida, foram mergulhadas em álcool 70% e deixadas armazenadas em temperatura ambiente até o término do processamento. A etapa final da desidratação foi feita pela troca do álcool 70% para 85%, e 85% para 95% sob vácuo por 2h em cada troca. Na etapa de pré-infiltração, as folhas foram transferidas para uma mistura de álcool 95% e resina pura ativada (Leica Histo-resin) (1:1), e deixadas *overnight* sob vácuo. Posteriormente, na etapa de infiltração, foi feita a troca de solução das amostras para resina pura ativada (Leica Histo-resin) e as mesmas foram armazenadas em geladeira por 2 semanas. Durante esse período, as amostras foram submetidas a vácuo por 2 h todos os dias. Para a confecção de lâminas permanentes, as amostras foram emblocadas em uma mistura de resina (Leica Histo-resin) e endurecedor (15:1), e incubadas em estufa a 36 °C por 7 dias, ou até notar que a resina polimerizou. Em seguida, as mesmas foram desemblocadas, afixadas em bloquinhos de madeira e armazenadas em sílica-gel até o corte. Então, foram realizados cortes transversais, longitudinais e paradérmicos, com 5 µm de espessura, usando micrótomo rotativo manual (American Optical

Spencer 820). Por fim, os cortes obtidos, foram corados com Azul de Toluidina (0,05%, pH 4,7) por 10 min (O'BRIEN; MCCULLY, 1981). As lâminas foram montadas em meio Permount® para a observação e captura de imagens em fotomicroscópio (modelo AX70 TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com câmera digital acoplada (modelo AxioCam HRc - Zeiss).

#### **4.11. Período de Embriogênese**

Os ovos utilizados nesse experimento foram obtidos de folhas de *I. cairica* naturalmente infectadas e foram extraídos conforme descrito no item 4.1. Para separar os nematoides dos restos vegetais, a suspensão foi passada por uma peneira plástica de uso doméstico e recolhida em béquer. Sob o microscópio de luz, com o auxílio de um estilete (seringa e agulha contendo um cílio humano afixado na extremidade) e de uma micropipeta, fêmeas semi-obesas grávidas e ovos em diferentes estádios foram pescados e succionados, respectivamente, e transferidos para placa de microtitulação de fundo chato com 96 poços. Em cada poço da placa foi adicionado 200 µL de tampão fosfato de sódio (83 mL de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O a 2,26% e 17 mL de NaOH a 2,52%) de modo que cada poço recebeu uma fêmea grávida ou um ovo. A placa foi vedada com filme plástico de PVC e mantida no escuro sob temperatura ambiente. A cada 24 h, as fêmeas grávidas e os ovos foram observados para registrar a evolução do desenvolvimento embrionário desde a oviposição até a eclosão dos juvenis. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com 12 repetições e a unidade experimental foi cada poço com uma fêmea ou um ovo.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Determinação indireta da gama de hospedeiros do NFI**

No local de ocorrência natural do nematoide, foram coletadas *Ipomoea alba* L. *I. syringifolia*, *Momordica charantia* L. (melão-de-São-Caetano) e *Solanum americanum* Mill. (maria-pretinha) que apresentavam manchas cloróticas nas folhas (Quadro 7). Após extração, foram recuperados nematoides somente a partir das manchas foliares de *I. alba* e *I. syringifolia*. O NFI foi identificado associado somente a *I. syringifolia* (Quadro 8; Figuras 3; 6; 7B; 8). Já em *I. alba* foi identificada a presença apenas de *Aphelenchoides* sp. (dados não apresentados). Das amostras de *M. charantia* e *S. americanum* não se obteve nenhum nematoide após a extração. No entanto, na suspensão obtida foi possível constatar a presença de ácaros que podem

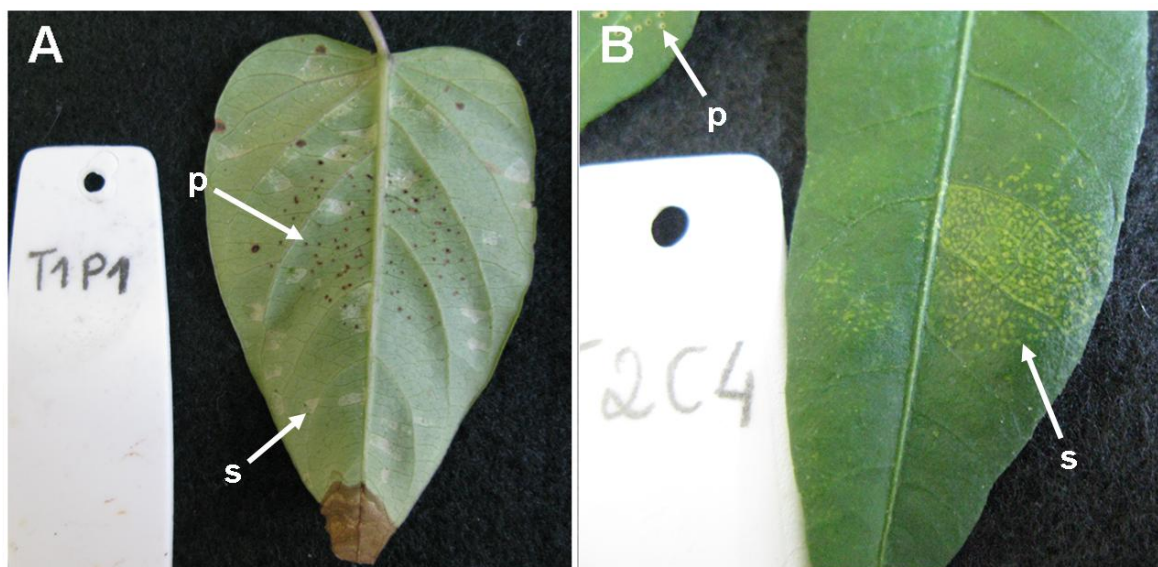
ser os responsáveis pelas lesões cloróticas observadas em *M. charantia* e *S. americanum*. Um espécime de *I. syringifolia* foi depositado no Herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa sob o código de VIC 55622, sendo que o depósito de *I. cairica* ainda será realizado.

**Quadro 7.** Plantas coletadas para a determinação indireta da gama de hospedeiros. NFI representa o nematoide foliar da *Ipomoea*.

Planta	Coordenada do local de coleta	Nematoide
<i>Ipomoea alba</i>	20°46'05,8"S/42°52'15,6"O	<i>Aphelenchoides</i> sp.
<i>I. syringifolia</i>	20°46'05,8"S/42°52'15,6"O	NFI
<i>Momordica charantia</i>	20°46'05,8"S/42°52'15,6"O	ausente
<i>Solanum americanum</i>	20°46'05,8"S/42°52'15,6"O	ausente

## 5.2. Inoculação artificial do NFI em *Ipomoea cairica* e *I. syringifolia*

Os primeiros sintomas foram observados entre o 10º e o 15º dia após a inoculação (dai). Após 30 dai, as plantas sintomáticas foram submetidas à extração, e a partir delas foram recuperados nematoides em todos os tratamentos, inclusive em plantas tratadas com água destilada. O número de nematoides recuperados variou de 43 a 2438 espécimes, incluindo juvenis e adultos, e de 11 a 1137 ovos, não havendo correlação alguma entre o número recuperado e o tratamento aplicado. Foi possível observar também, que as manchas foliares induzidas pelo NFI apareceram em diferentes pontos na folha, não coincidindo com a região dos ferimentos causados pela agulha estéril (Figura 2). Na tentativa de cumprir os 'Postulados de Koch', o ensaio foi repetido utilizando apenas mudas de *I. cairica*, preparadas a partir de material coletado em locais isentos do patógeno e nenhuma planta apresentava sintomas. Para *I. syringifolia*, o único lugar no município de Viçosa onde essa espécie foi encontrada, é o local de ocorrência do nematoide, dificultando a obtenção de material para formação de mudas isentas do patógeno. As temperaturas e umidades relativas coletadas para esse segundo ensaio foram semelhantes as do primeiro, mostrando que a limitação para ocorrência da doença foi a procedência do material utilizado para a confecção das mudas.



**Figura 2.** Inoculação artificial de *Ipomoea cairica* e *I. syringifolia* por dois métodos: aspersão e deposição. **(A)** Folha de *I. syringifolia* coletada 30 dias após a inoculação (dai). Os sintomas cloróticos são observados em diversos pontos da folha. **(B)** Folíolo de *I. cairica* sintomático coletado 30 dai. Pode-se observar que a perfuração com agulha foi feita em outro folíolo. **p** = danos causados pelas perfurações feitas com a agulha durante a inoculação; **s** = manchas cloróticas internervais.

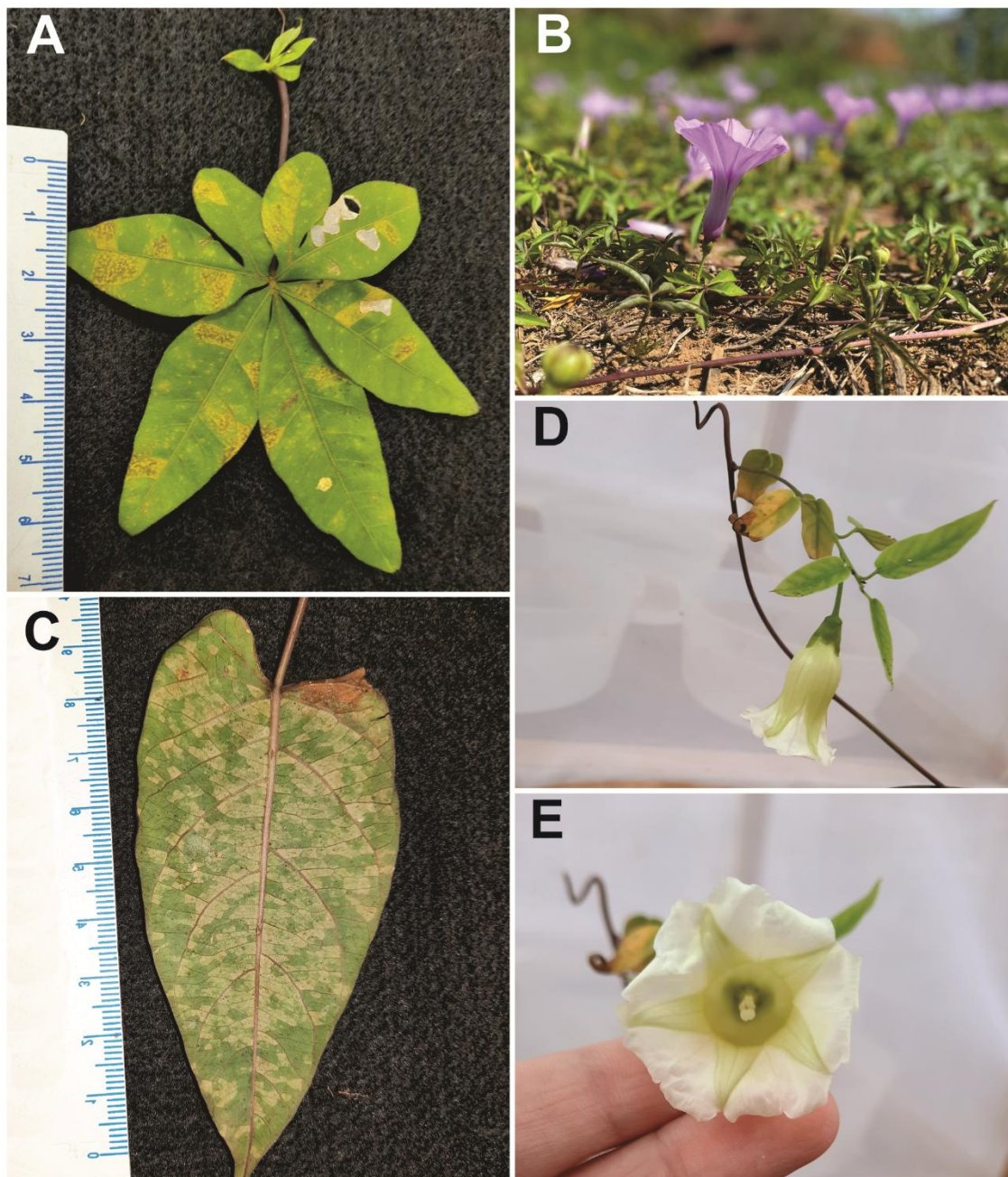
### 5.3. Teste de patogenicidade de NFI a plantas cultivadas

Não foi observado sintoma clorótico delimitado pelas nervuras em nenhum dos tratamentos. Em algumas folhas foram vistas manchas amarelas circulares, mas ao serem submetidas a extração, não foram recuperados nematoides.

### 5.4. Caracterização Morfológica e Morfométrica

#### HOSPEDEIRO E LOCALIDADE

Folhas de *Ipomoea cairica*, contendo sintomas cloróticos delimitados pelas nervuras que evoluem para pontuações necróticas (Figuras 3A-B), foram coletadas no campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil, nas seguintes coordenadas: 20°46'05,8"S/42°52'15,6"O; 20°45'56,8"S/42°52'13,6"O; 20°46'19,8"S/42°52'29,3"O e 20°45'15,5"S/42°52'23,5"O. Foram encontradas plantas de *I. syringifolia* (Figuras 3C-E) com sintomas semelhantes aos causados pelo anguinídeo em *I. cairica* e, ao realizar-se a extração, constatou-se a presença de um nematoide associado às lesões semelhante ao encontrado atacando *I. cairica*. Nematoides obtidos da *I. syringifolia* foram também investigados.



**Figura 3.** Sintomas do nematoide foliar em *Ipomoea cairica* e *I. syringifolia* coletadas no campo. **A:** Sintomas cloróticos e necróticos entre nervuras em folhas de *I. cairica*; **B:** Flor de *I. cairica*; **C:** Sintoma clorótico entre nervuras em *I. syringifolia*, face abaxial da folha; **D:** Flor de *I. syringifolia* em visão lateral e, **E:** Flor de *I. syringifolia* em visão frontal.

MORFOLOGIA DOS NEMATOIDES EXTRAÍDOS DE *Ipomea cairica* e *I. syringifolia**Fêmea Semi-obesa*

Corpo fusiforme, semi-obesa, levemente arqueada quando morta pelo calor. Região labial destacada, lisa e de menor diâmetro que o restante do corpo (Figuras 4A; 5A; 5B). Estilete robusto, composto por um cone esclerotizado de aproximadamente 2/3 do comprimento total do estilete e com nódulos arredondados na base. Saída da glândula esofagiana dorsal logo abaixo dos nódulos do estilete ( $1,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ) (Quadro 8). Esôfago tilencoide, com um procorpo delgado facilmente distinguido do metacorpo, este último é arredondado, muscular e com válvulas centrais. Glândulas esofagianas sobrepondo-se dorsalmente ao intestino (Figura 5A). Anel nervoso circundando o ístmo. Junção esôfago-intestino difícil de ser visualizada. Poro excretor localizado posterior ao anel nervoso. Hemizonídeo não visível. Campo lateral com predominância de 4 linhas na porção central do corpo (Figura 4B), podendo variar nas extremidades. Cauda conoide com uma projeção afilada na ponta, semelhante a um apêndice (Figura 4C). Crustaforméria composta por 4 colunas com 4 células, formando uma quadricolumella (Figura 5D). Saco pós-uterino curto (PUS/VA= $11,4 \pm 1,7 \%$ ) (Quadro 8; Figura 5E). Alguns espécimes possuem uma extensão hialina da cutícula revestindo a cauda. Ausência de aba vulvar (Figuras 4E; 5E), sendo a vulva posicionada em 77% do comprimento total do corpo (Quadro 8). Gônada monodelfa, prodelfa. Ovário longo reflexado e com 2-3 flexuras (Figura 5F), podendo atingir a altura do bulbo mediano. Oócitos arranjados em fileira de 1 célula, não dispostos sob uma ráquis. Útero pode conter um único ovo.

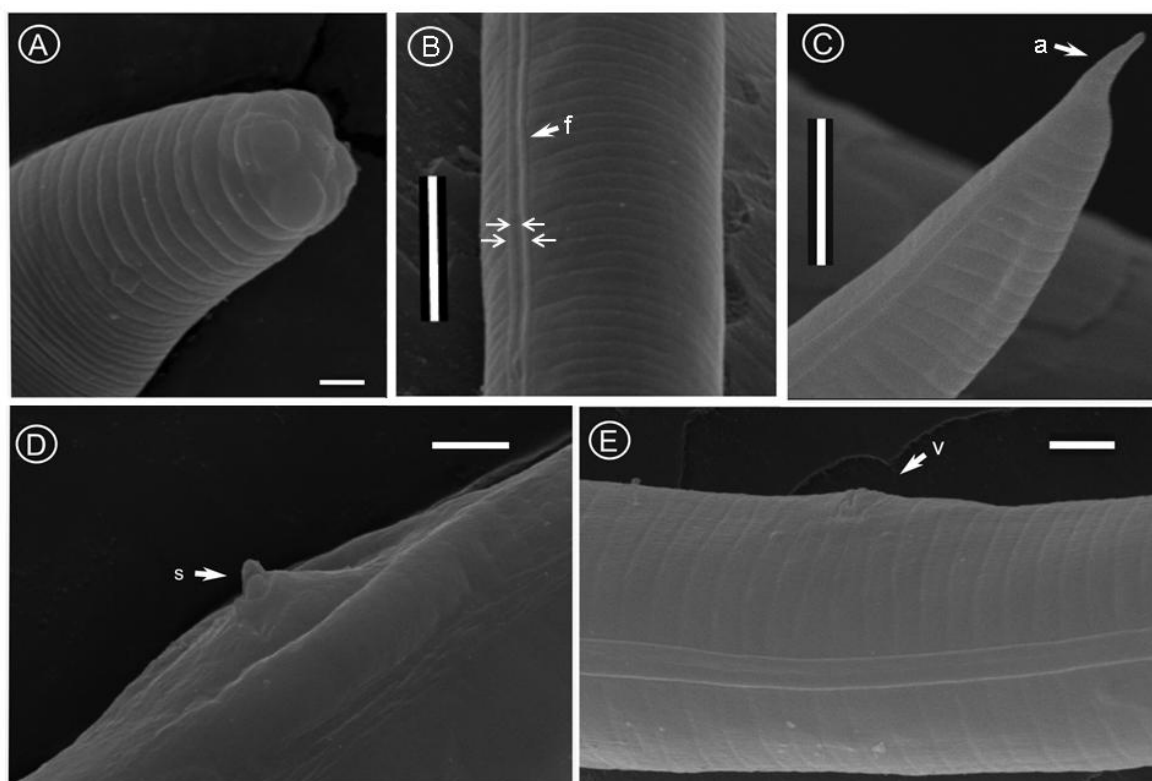
*Fêmea imatura*

Morfologia semelhante à fêmea semi-obesa, exceto em: corpo delgado, região labial não destacada, plana e lisa, com estrutura cefálica indistinta (Figura 5C). Em algumas fêmeas, foi possível observar ramo reprodutivo anterior curto, estendido com a crustaforméria ainda em diferenciação, em outras, o ramo genital ainda não estava diferenciado.

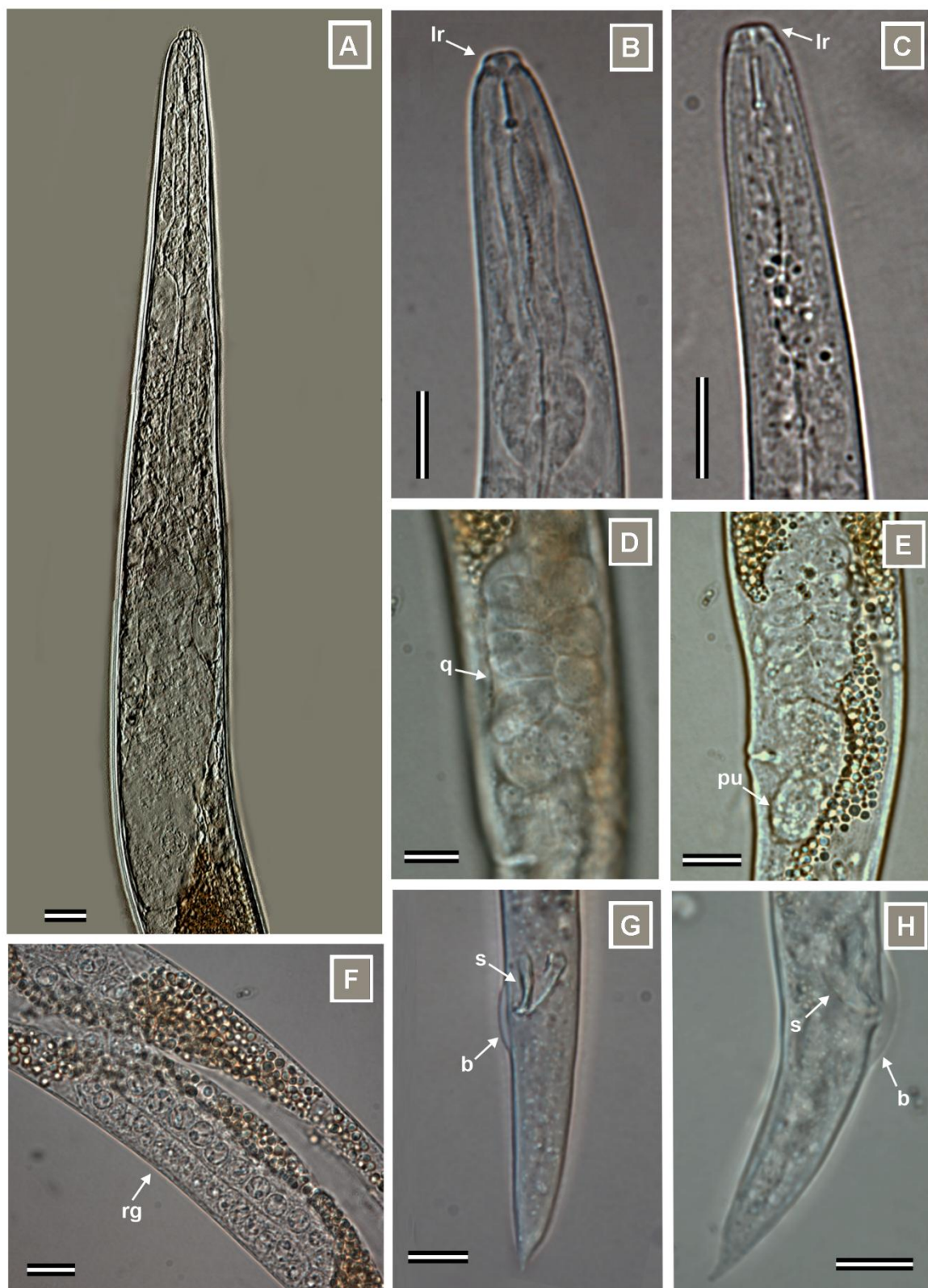
*Macho*

Corpo fusiforme, região labial lisa e destacada do restante do corpo. Estilete robusto contendo nódulos arredondados na base. Saída da glândula esofagiana

dorsal localizada logo abaixo dos nódulos do estilete. Esôfago tilencoide, com procorpo estreito. Bulbo mediano arredondado muscular com válvulas evidentes. Anel nervoso circunscrevendo o ístmo. As glândulas esofagianas ficam soltas, sobrepondo-se dorsalmente ao intestino. A junção do esôfago-intestino é de difícil visualização. Campo lateral com predominância de 4 linhas longitudinais. Poro excretor posterior ao anel nervoso. Sistema reprodutivo monórquio, espermatócitos não dispostos sob uma ráquis. Testículo longo variando de estendido à reflexado. Espículas com as lâminas separadas em pares e arqueadas, sendo essas retraídas no interior do corpo ficando apenas a sua ponta à mostra (Figuras 4D; 5H). Gubernáculo simples, arqueado. Bursa adanal, do tipo leptodera (Figuras 5G-H). Cauda conoide, contendo uma projeção semelhante à um apêndice. Em machos jovens, região labial não destacada do restante do corpo, ramo genital curto ou não diferenciado e bursa ausente.



**Figura 4.** Morfologia do nematoide extraído de *Ipomea cairica* e *I. syringifolia* em microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A) Região labial da fêmea semi-obesa. (B) Linhas do campo lateral. (C) Ponta da cauda. (D) Espículas. (E) Vulva. f = linhas do campo lateral, a = apêndice, s = espícula, v = vulva. Barras: A (1 µm), B e C (5 µm) e D e E (2 µm).



**Figura 5.** Morfologia do nematoide foliar de *Ipomoea* em microscopia de luz. **(A)** Sobreposição dorsal do esôfago sobre o intestino em fêmea semi-obesa extraída de *Ipomoea cairica*. **(B)** Região labial de fêmea semi-obesa e **(C)** de fêmea jovem extraídas de *I. cairica*. **(D)** Quadricolumella de fêmea semi-obesa extraída de *I. cairica*. **(E)** Saco pós-uterino de fêmea semi-obesa extraída de *I. syringifolia*. **(F)** Parte reflexada do ovário de fêmea semi-obesa extraída de *I. cairica*, destacando as flexuras. **(G)** Visão frontal e **(H)** lateral da cauda de machos extraídos de *I. syringifolia* e *I. cairica*, respectivamente. **lr** = região labial, **q** = quadricolumella, **pu** = saco pós-uterino, **rg** = gônada reflexada, **s** = espículas e **b** = bursa. Barras: 10  $\mu$ m.

**Quadro 8.** Caracterização morfométrica do nematoide foliar extraído de *Ipomoea cairica* e *I. syringifolia*. Todas as medidas estão em “ $\mu\text{m}$ ”, exceto as razões e percentagens.

	<i>Ipomoea cairica</i>			<i>I. syringifolia</i>	
	Macho	Fêmea		Macho	Fêmea
		Semi-obesa	Delgada		Semi-obesa
n	20	20	20	5	5
L	575 $\pm$ 60 (469-698)	636 $\pm$ 95 (496-911)	500 $\pm$ 39 (441-575)	561 $\pm$ 53 (505-636)	600 $\pm$ 44 (547-661)
a	29,3 $\pm$ 3,4 (22,7-36,1)	20,6 $\pm$ 2,7 (15,2-26,2)	32,1 $\pm$ 3,7 (25,1-39,1)	31,3 $\pm$ 3,1 (27,4-35,6)	23,2 $\pm$ 3,5 (20,5-28,5)
c	13,7 $\pm$ 1,6 (12,0-18,8)	19,1 $\pm$ 2,4 (15,6-23,2)	16,6 $\pm$ 1,5 (14,8-20,9)	13,9 $\pm$ 0,7 (13,0-14,7)	15,8 $\pm$ 1,1 (14,3-16,7)
c'	3,2 $\pm$ 0,3 (2,7-3,8)	2,5 $\pm$ 0,3 (2,2-3,2)	3,0 $\pm$ 0,3 (2,4-3,5)	3,2 $\pm$ 0,5 (2,7-4,0)	3,4 $\pm$ 0,3 (3,0-3,7)
V ou T	71,3 $\pm$ 9,2 (49,0-82,9)	77,6 $\pm$ 2,2 (73,7-80,9)	77,2 $\pm$ 1,0 (75,4-79,8)	64,8 $\pm$ 10,1 (47,3-72,7)	76,5 $\pm$ 2,6 (72,6-79,5)
m	63,0 $\pm$ 4,5 (50,6-68,1)	61,7 $\pm$ 6,4 (45,1-72,2)	64,4 $\pm$ 4,3 (57,7-72,0)	61,2 $\pm$ 2,6 (57,1-64,0)	62,6 $\pm$ 5,9 (56,6-71,6)
s	1,1 $\pm$ 0,1 (0,8-1,2)	1,0 $\pm$ 0,1 (0,8-1,2)	1,2 $\pm$ 0,1 (0,9-1,5)	1,1 $\pm$ 0,1 (1,0-1,3)	1,0 $\pm$ 0,1 (0,9-1,1)
Diâmetro máximo do corpo	19,8 $\pm$ 2 (17,0-24,8)	31,4 $\pm$ 6,4 (23,7-52,2)	15,7 $\pm$ 2,0 (13,7-22,1)	18,0 $\pm$ 1,3 (16,4-19,7)	26,4 $\pm$ 4,8 (20,1-32,2)
Diâmetro dos lábios	4,4 $\pm$ 0,3 (4,0-5,1)	4,5 $\pm$ 0,4 (3,9-5,4)	4,3 $\pm$ 0,3 (3,8-4,8)	4,4 $\pm$ 0,4 (4,2-5,0)	4,8 $\pm$ 0,3 (4,4-5,2)
Altura dos lábios	2,1 $\pm$ 0,4 (1,0-2,6)	2,3 $\pm$ 0,3 (1,7-2,7)	1,9 $\pm$ 0,2 (1,6-2,4)	1,8 $\pm$ 0,3 (1,5-2,3)	1,9 $\pm$ 0,3 (1,7-2,4)
Diâmetro dos lábios / Altura dos lábios	2,3 $\pm$ 0,6 (1,7-4,0)	2,0 $\pm$ 0,3 (1,5-2,7)	2,3 $\pm$ 0,3 (1,9-2,8)	2,6 $\pm$ 0,5 (1,8-3,1)	2,5 $\pm$ 0,4 (2,0-3,0)
Comprimento do cone do estilete	5,4 $\pm$ 0,4 (4,6-6)	5,6 $\pm$ 0,7 (3,7-6,7)	5,8 $\pm$ 0,3 (5,3-6,3)	5,4 $\pm$ 0,1 (5,2-5,5)	5,7 $\pm$ 0,4 (5,2-6,2)
Comprimento total do estilete	8,6 $\pm$ 0,4 (7,9-9,3)	9,0 $\pm$ 0,7 (7,9-9,6)	9,1 $\pm$ 0,7 (7,7-10,2)	8,8 $\pm$ 0,5 (8,3-9,3)	9,0 $\pm$ 0,2 (8,6-9,2)
Diâmetro do corpo na região dos nódulos do estilete	8,3 $\pm$ 0,8 (7,1-10,5)	8,9 $\pm$ 0,7 (7,1-10,3)	7,4 $\pm$ 0,6 (6,8-9,3)	8,0 $\pm$ 0,4 (7,3-8,3)	8,8 $\pm$ 0,7 (8,0-9,9)
Distância da extremidade anterior do corpo até o centro do bulbo mediano	39,9 $\pm$ 2 (35,2-42,8)	44,7 $\pm$ 4,1 (34,4-53)	46,5 $\pm$ 2,2 (42,5-51,7)	40,2 $\pm$ 1,2 (38,9-41,6)	40,9 $\pm$ 1,6 (38,5-43)
Diâmetro máximo do bulbo mediano	8,1 $\pm$ 0,7 (6,8-9,5)	9,5 $\pm$ 1 (8,0-11,5)	7,3 $\pm$ 0,6 (6,1-8,3)	8,8 $\pm$ 0,3 (8,5-9,3)	9,7 $\pm$ 0,6 (9,2-10,6)
Distância do anel nervoso até a extremidade anterior	50,6 $\pm$ 2 (49,2-52)	56,9 $\pm$ 3,7 (50,7-61,9)	56,0 $\pm$ 3,2 (50,4-58,4)	0,0 $\pm$ 0 (0-0)	0 $\pm$ 0 (0-0)
Distância do poro excretor até a extremidade anterior	70,2 $\pm$ 7,8 (54,1-82,1)	75,7 $\pm$ 6,9 (68,1-89,9)	71,0 $\pm$ 4,5 (65,5-82,6)	72,1 $\pm$ 3,4 (68,6-76,1)	76,1 $\pm$ 7,8 (70,5-81,6)
Comprimento da gônada	395 $\pm$ 64 (251-481)	278 $\pm$ 49 (210-362)	95,2 $\pm$ 41,6 (54,4-185,1)	366 $\pm$ 81 (239-462)	301 $\pm$ 29 (280-322)
Comprimento da parte reflexada do ovário	48,2	100 $\pm$ 58 (38-216)	0 $\pm$ 0 (0-0)	0 $\pm$ 0 (0-0)	0 $\pm$ 0 (0-0)
Diâmetro do corpo na região da cloaca ou ânus	13,5 $\pm$ 1,1 (11,3-15,8)	13,1 $\pm$ 1,1 (11,2-14,7)	10,3 $\pm$ 0,6 (9,3-11,0)	12,6 $\pm$ 0,8 (11,5-13,4)	11,3 $\pm$ 1,1 (10,2-12,6)
Comprimento da cauda	42,2 $\pm$ 3,9 (36,3-49,7)	32,1 $\pm$ 2,8 (26,9-35,5)	30,5 $\pm$ 3,4 (26,3-37,5)	40,5 $\pm$ 3,6 (36,0-45,8)	38,0 $\pm$ 1,3 (36,4-40,0)
Comprimento da espícula	14,5 $\pm$ 0,9 (13,1-16,9)	♂	♂	15,0 $\pm$ 0,7 (14,0-15,7)	♂
Comprimento do gubernáculo	4,4 $\pm$ 0,5 (3,3-5,9)	♂	♂	4,3 $\pm$ 0,3 (3,8-4,5)	♂

Diâmetro do corpo na região da vulva	♀	26,4 ± 5,7 (19,6-42,6)	13,9 ± 1,1 (12,3-17,2)	♀	22,8 ± 4,6 (17,6-27,8)
Distância da vulva ao ânus	♀	106,5 ± 12,2 (94,5-136,2)	84,6 ± 8,5 (73,8-103,3)	♀	102,4 ± 13,1 (90,0-120,5)
Comprimento do saco pós-uterino	♀	10,6 ± 2,6 (8,6-15,4)	8,5 ± 1,2 (7,7-9,4)	♀	12,3 ± 1,9 (10,0-14,6)
Comprimento do saco pós-uterino/Diâmetro do corpo na região da vulva	♀	0,4 ± 0,1 (0,3-0,6)	0,54 ± 0,13 (0,45-0,63)	♀	0,5 ± 0,04 (0,5-0,6)
Comprimento do saco pós-uterino/Distância da vulva ao ânus (%)	♀	11,4 ± 1,7 (9,7-13,8)	8,99 ± 1,63 (7,83-10,14)	♀	11,9 ± 2,9 (10,2-16,2)
Distância entre a extremidade anterior do corpo até a vulva	♀	494 ± 78 (395-716)	386 ± 31 (334-434)	♀	460 ± 42 (397-500)
Distância da abertura da glândula esofagiana dorsal até os nódulos do estilete	1,8 ± 0,3 (1,1-2,5)	1,9 ± 0,3 (1,5-2,5)	1,6 ± 0,2 (1,1-2,1)	1,5 ± 0,2 (1,3-1,9)	1,4 ± 0,3 (1,0-1,7)

n = número de nematoides mensurados; L = comprimento do corpo; a = L / diâmetro máximo do corpo; c = L / comprimento da cauda; c' = comprimento da cauda / diâmetro do corpo na região do ânus ou cloaca; V (%) = distância entre a extremidade anterior do corpo até a vulva / L; T (%) = distância entre a abertura da cloaca até a extremidade anterior do testículo / L; m (%) = comprimento do cone do estilete / comprimento total do estilete; s = comprimento total do estilete / diâmetro do corpo na região dos nódulos do estilete.

## DIAGNOSE E RELACIONAMENTO

Este anguinídeo, denominado preliminarmente como o nematoide foliar da *Ipomoea* (NFI), é causador de manchas foliares cloróticas delimitadas pelas nervuras em *Ipomoea cairica* e *I. syringifolia*, não induz a formação de galhas. O NFI pertence à família Anguinidae por: 1) parasitar a parte aérea das plantas; 2) possuir três formas básicas (fêmea semi-obesa, fêmea jovem delgada e macho); 3) ter região labial formada por seis lóbulos parcialmente fundidos; 4) possuir um estomatoestilete robusto com nódulos na base; 5) apresentar esôfago composto por um procorpo estreito, metacorpo muscular com válvulas aparentes, seguido de um longo ístmo e glândulas esofagianas não ensacadas, às quais sobrepõem-se dorsalmente ao intestino; 6) sistema reprodutivo das fêmeas sendo monodelfo-prodélfico e possuindo espermateca oblonga ocasionalmente com espermatozoides; 7) apresentar quadricolumella e saco pós-uterino; 8) macho possuir espícula constituída por duas lâminas, gubernáculo e uma bursa adanal; 9) ter cutícula delicadamente estriada, o campo lateral possui 4 linhas no meio do corpo podendo coalescer nas extremidades; e 10) ter a ponta da cauda caracterizada por um apêndice tanto nos machos quanto nas fêmeas.

Dentre os 17 gêneros incluídos na família Anguinidae (HODDA, 2022), cinco possuem fêmea semi-obesa ou 'obesa' como o nematoide foliar da *Ipomoea* (NFI): *Anguina* spp., *Litylenchus* spp., *Nothanguina* spp., *Subanguina* spp. e *Zeatylenchus* spp. Diferente de NFI, *Anguina* spp. apresenta uma crustaforméria multi-celular, possui os oócitos alinhados em uma ráquis e induz galhas em seus hospedeiros (SIDDIQI, 2000). Além disso, o comprimento e o diâmetro do corpo das fêmeas semi-obesas de *Anguina* spp., a exemplo de *A. obesa* Mobasser, Pedram, Pourjam e Bertozzi, 2017 são muito maiores que os observados em NFI (1516-2564  $\mu\text{m}$  e 72-164  $\mu\text{m}$  vs. 496-911  $\mu\text{m}$  e 20,1-52,2  $\mu\text{m}$ , respectivamente) (MOBASSERI et al., 2017). Já *Nothanguina* spp., possui crustaforméria multi-celular, oócitos alinhados em uma ráquis e induz formação de galhas, diferentemente de NFI. Além disso, *Nothanguina* spp. possui um esôfago com bulbo mediano não diferenciado e machos sem gubernáculo (SIDDIQI, 2000). Em comparação a *Litylenchus* spp., ambos possuem crustaforméria composta de 4x4 células e oócitos não dispostos sobre uma ráquis, mas diferem entre si porque *Litylenchus* spp. possui glândulas esofagianas ensacadas e machos com bursa pelodera (ZHAO et al., 2011), enquanto o NFI possui glândulas esofagianas sobrepondo-se ao intestino e bursa leptodera. Fêmeas semi-obesas de *Litylenchus coprosma* possuem cauda maior que o observado no NFI (48,3-76,5  $\mu\text{m}$  vs. 26,9-40,0  $\mu\text{m}$ ) (ZHAO et al., 2011). *Subanguina* spp. possuem diversas características em comum com o NFI, como por exemplo, bulbo mediano muscular com válvulas aparentes, ovário reflexado, espícula com gubernáculo e bursa leptodera, porém possui uma columella multicelular com 4x(8-12) células e também induz galhas em seus hospedeiros (SIDDIQI, 2000), enquanto o NFI tem quadricolumella (4x4 células) e não induz galhas. *Subanguina picridis* apresenta espícula e gubernáculo com dimensões diferentes das encontradas em NFI (30-37  $\mu\text{m}$  e 10-11  $\mu\text{m}$  vs. 13,1-16,9  $\mu\text{m}$  e 3,3-5,9  $\mu\text{m}$ , respectivamente) (POURJAM; BERT, 2006). *Zeatylenchus* spp., assim como o NFI, não induzem galhas, não possuem um ovário disposto sobre uma ráquis e possui uma quadricolumella, porém o primeiro apresenta um bulbo mediano não muscular, possui 3 incisuras no campo lateral, saída do poro excretor posicionado na altura dos nódulos do estilete e ovário estendido (ZHAO et al., 2013), enquanto o NFI apresenta bulbo mediano muscular, 4 incisuras no campo lateral, saída do poro excretor posterior ao anel nervoso e ovário reflexado. *Zeatylenchus pittosporum* possui diferenças morfométricas das observadas em NFI,

como o diâmetro do corpo na região do ânus e comprimento do saco pós-uterino das fêmeas semi-obesas (7,3-8,6  $\mu\text{m}$  e 15,7-26,4  $\mu\text{m}$  vs. 10,2-14,7  $\mu\text{m}$  e 8,6-15,4  $\mu\text{m}$ , respectivamente) (ZHAO et al., 2013). Diante dessas diferenças significativas encontradas, constata-se que morfologia e sintomatologia já fornecem evidências suficientes para a distinção taxonômica do NFI dentro da família Anguinidae.

### 5.5. Análise Filogenética

Para este estudo foi feita a caracterização molecular de quatro regiões genômicas: SSU, LSU, ITS e COI. Por falta de número suficiente de sequências em bancos de dados para comparação, a inferência filogenética foi implementada para apenas três regiões (SSU, LSU e ITS). No entanto, a região do gene COI foi sequenciada e será depositada em um banco de dados para análises futuras.

As sequências utilizadas para a reconstrução filogenética foram obtidas no banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Todas as sequências são provenientes de artigos publicados por taxonomistas de fitonematoides. Como *outgroup*, foram utilizadas sequências de *Aphelenchoides besseyi* com os seguintes números de acesso: MK291493 (18S), MK294342 (28S) e MT271861 (ITS).

No teste de homogeneidade de partição (comando 'hpart' no PAUP), o p-valor foi 0,38100, indicando que SSU + LSU + ITS são congruentes e podem ser usados combinados. A reconstrução filogenética foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) usando sequências concatenadas com 67 taxa contendo 1899 caracteres (SSU: 756 pb, LSU: 611 pb e ITS: 532 pb), exceto gaps. Na árvore, as sequências dos nematoides associados a *I. cairica* e a *I. syringifolia*, das diferentes formas (macho, fêmea jovem e fêmea semi-obesa) agruparam-se no mesmo clado (destacado em amarelo), mas separados de outros anguinídeos (Figura 6). Este clado possui alto valor de suporte (pp=1) e atesta que os anguinídeos das duas *Ipomoea* são pertencentes à mesma espécie. Em adição, o NFI é mais proximamente relacionado a três espécies, *D. drepanocercus*, *Z. pittosporum* e *D. gallaeformans* Oliveira, Santin, Seni, Dietrich, Salazar, Subbotin, Mundo-Ocampo, Goldenberg & Barreto, 2013 (clado externo destacado em azul) sendo que, o NFI, um ramo-irmão de *D. drepanocercus*. Isso evidencia que NFI é próximo filogeneticamente de duas outras espécies que também foram descritas ou relatadas no Brasil, *D. gallaeformans* e *D. drepanocercus*

(OLIVEIRA et al., 2013; SEIXAS et al., 2004b). Análises filogenéticas por IB também foram realizadas empregando-se os genes individuais e os resultados foram similares aos obtidos pela análise de genes concatenados (dados não apresentados).

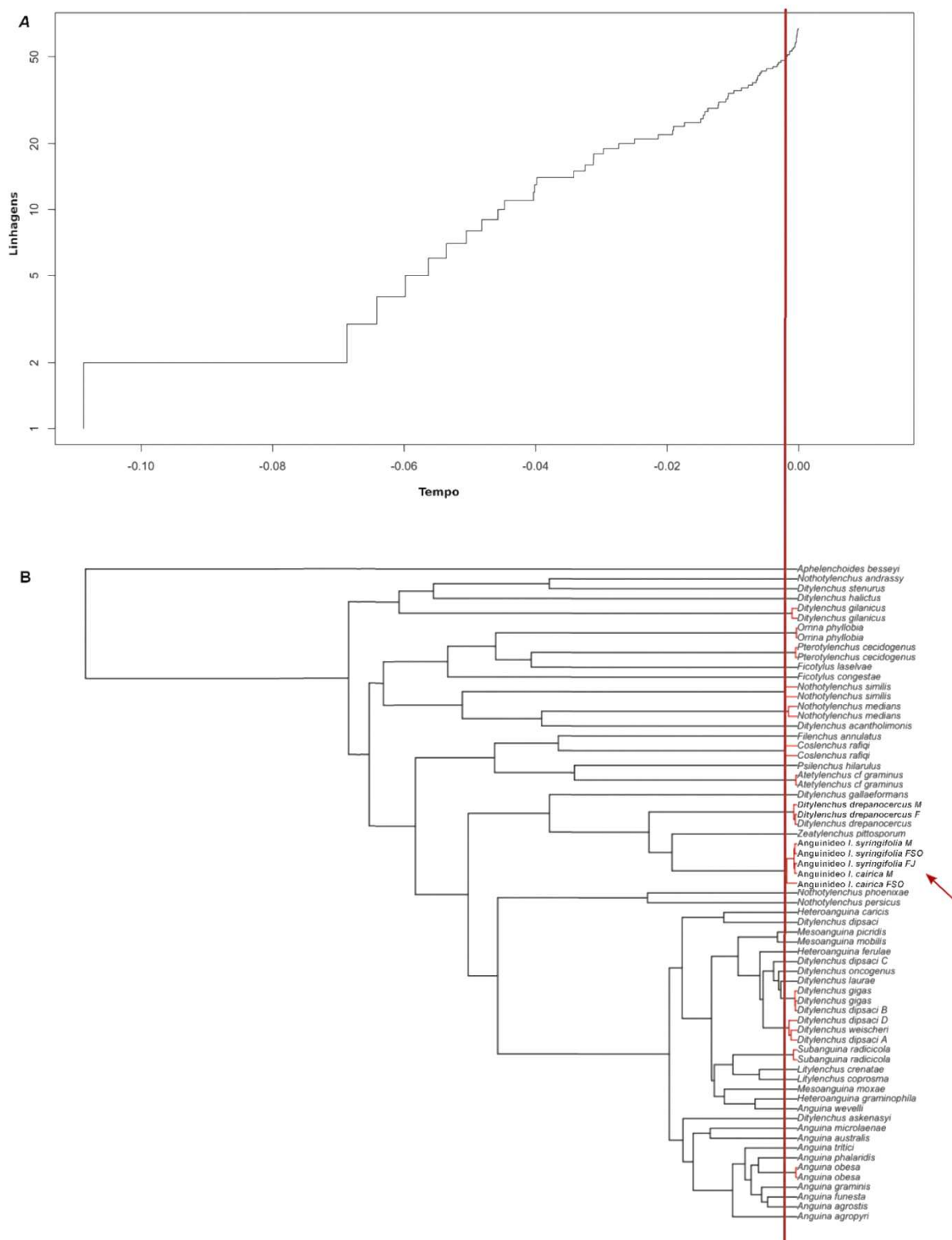
Devido à curiosa proximidade filogenética entre o NFI e *D. drepanocercus* previamente relatado no Brasil, análises moleculares e morfológicas complementares àquelas realizadas por SEIXAS et al. (2004b) foram conduzidas, mas apenas as sequências foram utilizadas neste estudo (Figuras 6; 7 e 8). Em resumo, *D. drepanocercus* descrito por GOODEY (1953) possui metacorpo muscular, glândulas esofagianas ensacadas e um apêndice em forma de 'foice' na ponta da cauda tanto de machos quanto de fêmeas. Já o nematoide relatado no Brasil possui metacorpo não muscular, glândulas esofagianas sobrepondo-se dorsalmente ao intestino e o apêndice em forma de 'foice' não foi observado nos machos. Esses resultados evidenciam um provável erro de identificação da população relatada no Brasil por SEIXAS et al. (2004b), identificada como *D. drepanocercus*.



**Figura 6.** Árvore filogenética de nematoides da família Anguinidae baseada em genes concatenados (SSU, LSU e ITS) inferida por Inferência Bayesiana. Valores de probabilidade posterior menores que 0,9 foram omitidos na árvore. Os modelos de substituição obtidos pelo critério de informação de Akaike corrigido (AICc) foram GTR+I+G para SSU e LSU, e, GTR+G para ITS. **M** = macho, **F** = fêmea, **FSO** = fêmea semi-obesa e **FJ** = fêmea jovem. *Heteroanguina* spp. e *Mesoanguina* spp. são considerados sinônimos de *Subanguina* spp. por Siddiqi (2000).

## 5.6. Análise de Delimitação de Espécies

Para a análise de delimitação de espécies, uma árvore ultramétrica com genes concatenados foi gerada pelo método de Inferência Bayesiana. Posteriormente, foi aplicado o modelo GMYC por processos de Yule para identificar eventos de especiação com uso de limiar único. Nas Figuras 7 e 8, o limiar representado pela linha vermelha nos dá a informação de quais são os eventos de especiação e quais são os eventos intraespecíficos. Eventos que estão à esquerda da linha vermelha, são eventos de especiação. Eventos que estão à direita da linha vermelha são eventos intraespecíficos. Dessa forma, o modelo de limiar único identificou 47 eventos de especiação resultando em 48 OTUs (Operational Taxonomic Units) que podem ser visualizadas na Figura 7A, onde cada degrau representa um evento de cladogênese. Na Figura 7B, os ramos na cor vermelha provenientes de um mesmo nó, indicam organismos da mesma espécie. Na Figura 8, cada barra verde indica uma espécie diferente, e é possível observar um grande clado formado pelo nematoide extraído de *Ipomoea* spp., isso é visto também na Figura 7, indicado pela seta vermelha, confirmando que anguinídeo extraídos de *I. cairica* e *I. syringifolia* são da mesma espécie. Para *Ditylenchus drepanocercus*, as OTUs também foram agrupadas juntas com a sequência obtida do GenBank, representando a mesma espécie (Figuras 7; 8).



**Figura 7.** Delimitação de espécies de Anguinidae pelo modelo GMYC (*Generalized Mixed Yule Coalescent*). **(A)** Gráfico apresenta o acúmulo de linhagens ao longo do tempo. Cada degrau no gráfico representa um evento de cladogênese. **(B)** Árvore ultramétrica concatenada gerada pelo método de Inferência Bayesiana no software BEAST2 com o modelo GMYC (likelihood = -0,002055979) que foi otimizado utilizando o pacote SPLITS do aplicativo R. Eventos que estão à esquerda da linha vermelha, indicam eventos de especiação. Eventos que estão à direita da linha vermelha são eventos intraespecíficos. Os ramos na cor vermelha provenientes de um mesmo nó, representam uma mesma espécie. **M** = macho, **FSO** = fêmea semi-obesa, **FJ** = fêmea jovem. Seta indica o clado onde estão os nematoides de *I. cairica* e de *I. syringifolia*, mostrando que eles pertencem a mesma espécie. *Heteroanguina* spp. e *Mesoanguina* spp. são considerados sinônimos de *Subanguina* spp. por Siddiqi (2000).



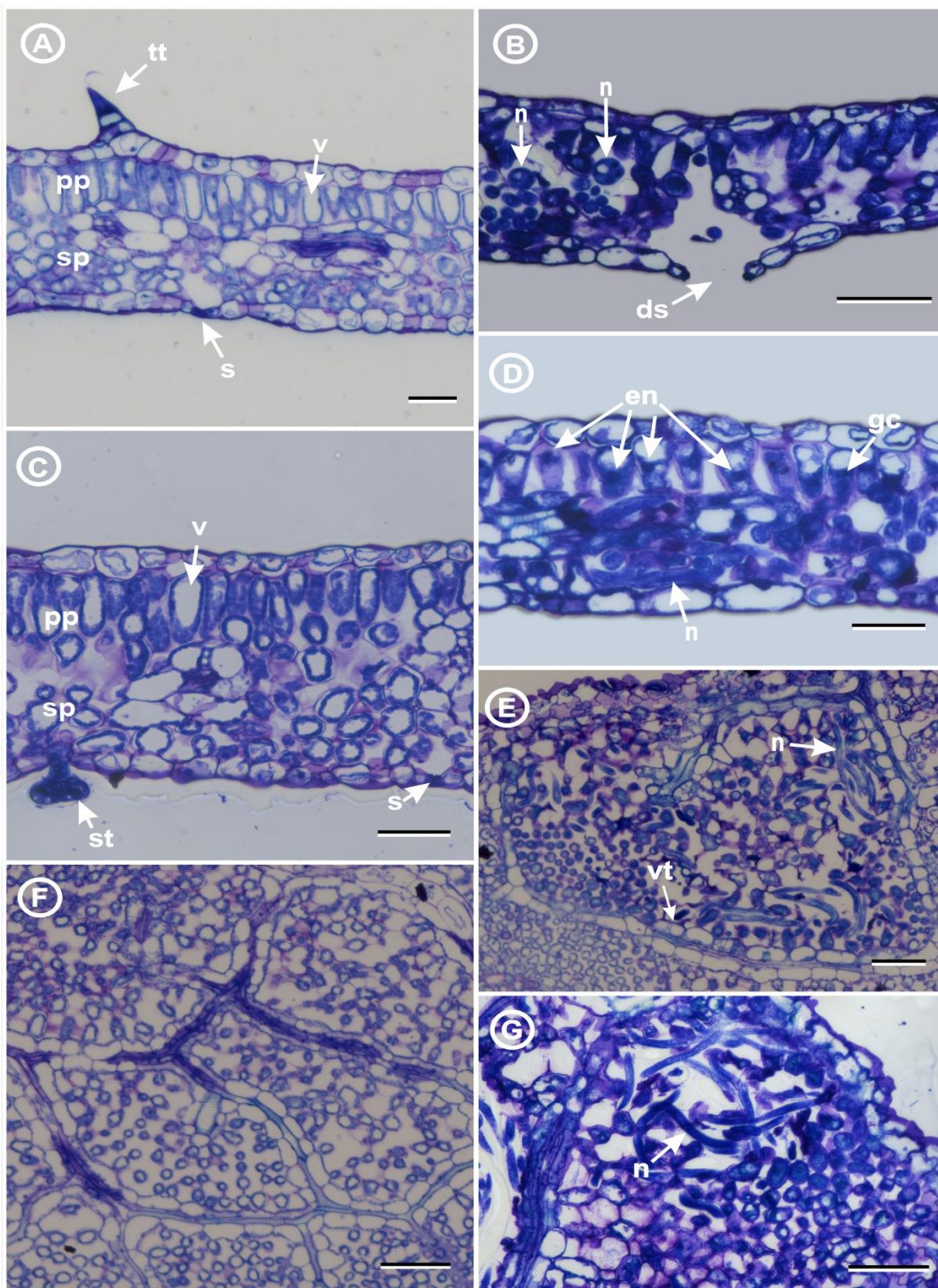
### 5.7. Histopatologia de *Ipomoea cairica* infectada pelo NFI

Folhas de *I. cairica* possuem epiderme uniestratificada (Figuras 9; 10), com dois tipos de tricomas pluricelulares: tricomas tectores, de formato alongado, encontrados nas margens das folhas e nervuras (Figuras 9A; 10C) e tricomas secretores, com pedúnculo curto distribuídos por toda a lâmina foliar (Figuras 9C; 10B; 10C). A maior densidade de tricomas foi encontrada em folhas mais jovens, ainda em expansão. Os estômatos (Figura 10B) são do tipo paracítico, ou seja, possuem duas células subsidiárias paralelas ao maior eixo das células-guarda e podem ser encontrados nas duas faces da folha (folha anfiestomática), estando em maior densidade na face abaxial. O mesofilo é dorsiventral, ou seja, o parênquima paliçádico é encontrado apenas na face adaxial da folha (Figuras 9A-D). As células do parênquima possuem um grande vacúolo, que as deixam hialinas (Figuras 9A; 9C) com cloroplastos parietais. Acompanhando as nervuras, existem células da bainha do feixe que são clorofiladas e possuem formato alongado (Figura 10A).

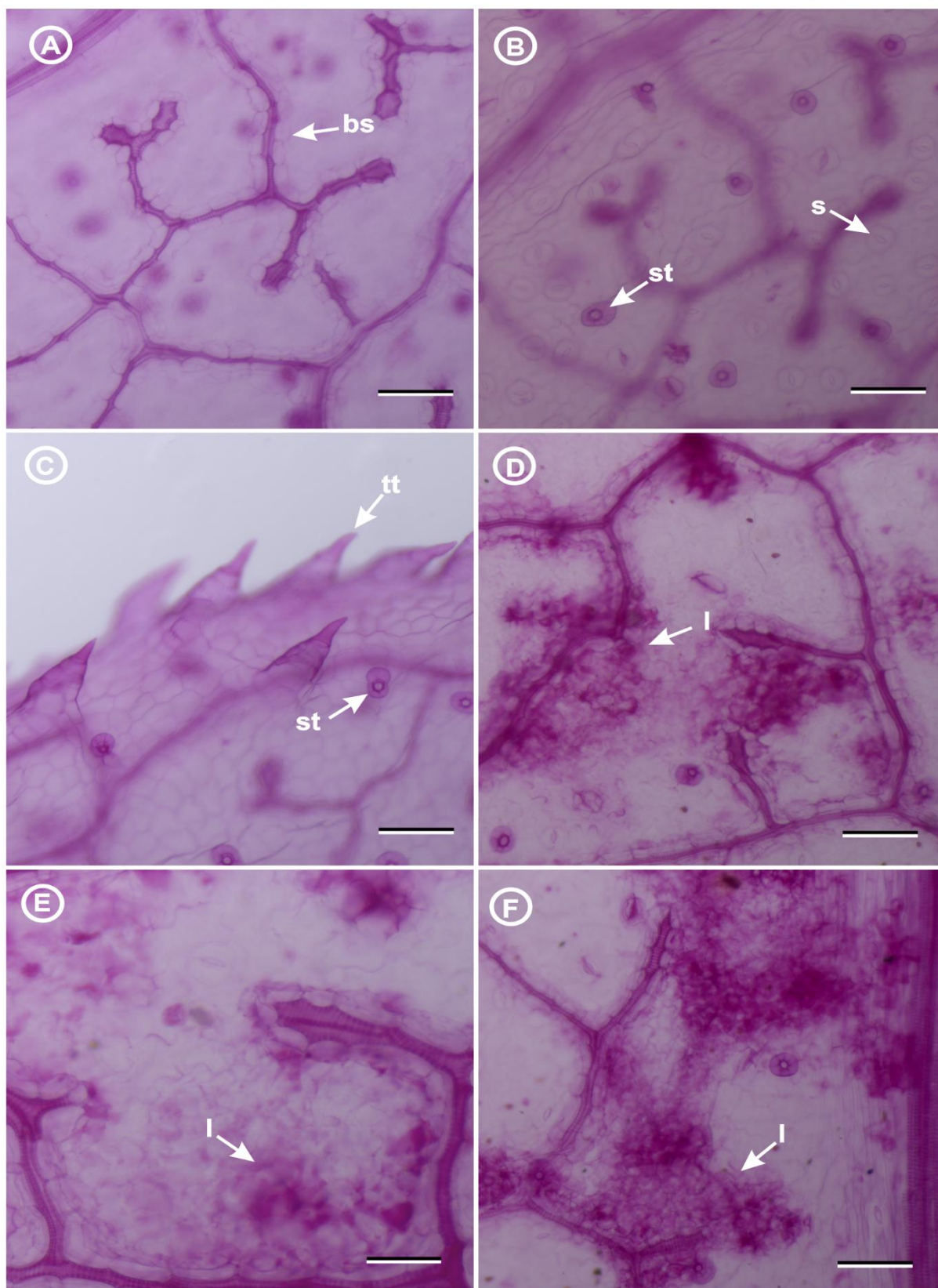
Em folhas de plantas infectadas, foi possível encontrar os nematoides nos espaços intercelulares, na região do parênquima lacunoso (Figuras 9D; 9E; 9G). Esse espaço ocupado pelo nematoide estava completamente alterado, sendo possível observar galerias que podem ter surgido pelo rompimento de algumas células do parênquima lacunoso (Figura 9B). As células que restaram do parênquima lacunoso e paliçádico, ao redor dos nematoides, apresentavam formato e conteúdo modificados. O formato alongado e a disposição das células, maior eixo perpendicular à superfície, no paliçádico (Figura 9A; 9C) foram modificados para uma forma irregular e desorganizada. O conteúdo celular hialino em decorrência de um grande vacúolo, tornou-se condensado e granuloso (Figuras 9B; 9D). Observou-se também o tamanho aumentado dos núcleos (Figura 9D) e modificações celulares localizadas sempre entre uma nervura e outra (Figuras 9E e G). Além disso, as lesões celulares foram frequentemente encontradas próximas de um ou mais estômatos e esses, por sua vez com alterações (Figura 9B).

Na análise da diafanização de folhas sadias não foi observada nenhuma alteração no tecido foliar (Figuras 10A-C), mas as lâminas da diafanização das folhas doentes (Figuras 10D-F) mostraram regiões coradas de rosa escuro que podem indicar lesões causadas pela alimentação do nematoide. Nas folhas doentes, não foi

possível visualizar nenhum espécime de anguinídeo dentro do tecido (Figuras 10D-F).



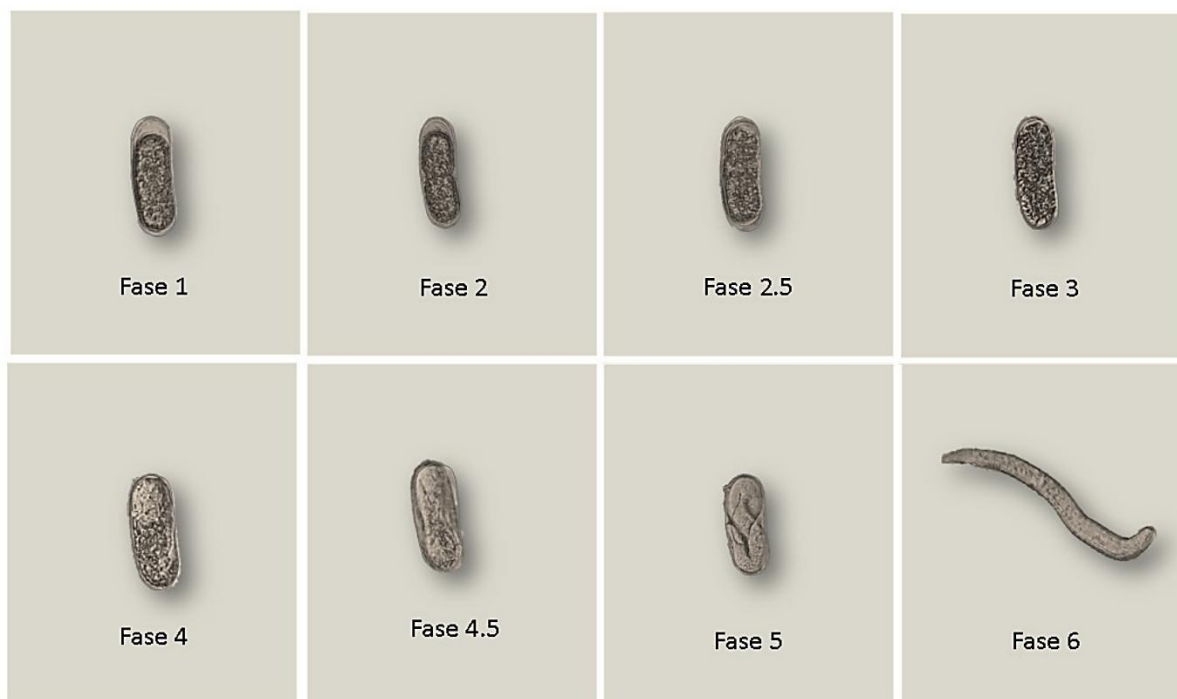
**Figura 9.** Cortes histopatológicos de folhas de *Ipomoea cairica*, corados com azul de toluidina. (A) Corte transversal da folha sadia e (B) folha doente, (C) corte longitudinal da folha sadia e (D) folha doente, (E- G) cortes paradérmicos da folha doente (E e G) e da folha sadia (F). tt = tricoma tector, st = tricoma secretor, s = estômato, v = vacúolo hialino, pp = parênquima paliçádico, sp = parênquima lacunoso, ds = estômato rompido, en = núcleo celular aumentado, gc = citoplasma granular, n = nematoide e vt = nervuras delimitando os nematoides. Barras: A, C e D (50 µm); B, E, F e G (100 µm).



**Figura 10.** Folhas diafanizadas de *Ipomoea cairica*, coradas com fucsina alcoólica. **(A)** Superfície de folha sadia no plano da nervura, **(B)** no plano do tricoma e estômato, na face abaxial. **(C)** Borda da folha sadia. **(D-F)** Superfície de folhas doentes. **bs** = célula da bainha do feixe, **st** = tricoma secretor, **tt** = tricoma tector, **s** = estômato e **l** = lesão causada pelo nematoide. Barras: A, B, C, D e F (100  $\mu$ m); E (50  $\mu$ m).

## 5.8. Período de Embriogênese

Para se determinar a duração da fase de embriogênese do NFI, tentativas foram feitas para acompanhar o desenvolvimento completo do ovo desde a fase inicial até a eclosão do juvenil, mas sem sucesso, porque, em alguma etapa antes do nematoide eclodir, observava-se o aparecimento de cavidades ou bolhas no interior do ovo, notando-se que estes não estavam mais viáveis e que o desenvolvimento embrionário havia sido interrompido por algum fator desconhecido. Desta forma, optou-se pela montagem de ensaios em que ovos em diferentes etapas da embriogênese foram selecionados e analisados ao longo do tempo. Em estágio inicial de desenvolvimento, os ovos possuíam formato de bastonete com uma célula e um núcleo (Fase 1) (Figura 11), podendo variar de reto a ligeiramente arqueado, medindo, em média, 17 x 49 µm. Esses ovos evoluíram para a fase de duas células (Fase 2) (Figura 11) em um período de 2 a 3 h após a oviposição. Na primeira avaliação, 24 h após a montagem da placa (a.m.p.), observou-se que os ovos estavam em divisão celular (Fase 2.5) (Figura 11), apresentando de 8 a 12 células. Já na segunda avaliação, 48 h a.m.p., os ovos estavam na fase de mórula (Fase 3) (Figura 11), com múltiplas células, difíceis de serem contabilizadas individualmente. Às 72 h a.m.p., os ovos se encontravam na etapa de blástula ou gástrula (Fase 4) (Figura 11), em que no interior do ovo pode ser observado uma diferenciação no tecido, sendo de dois tipos: um aglomerado de células escuras e uma parte mais clara semelhante a blastocele. Às 96 h a.m.p., foi possível observar a fase de “*tadpole*” (Fase 4.5) (Figura 11), em que o ovo continha em seu interior um juvenil de primeiro estágio (J1) ainda não completamente desenvolvido. Na avaliação seguinte, iniciou-se o período pós-embrionário, às 120 h a.m.p., em algumas repetições, foi possível observar o J1 bem formado e, em outras, o juvenil de segundo estágio (J2) com o estilete já visível (Fase 5) (Figura 11), forçando a casca do ovo para a eclosão. Às 144 h a.m.p., foram encontrados os J2 eclodidos do ovo (Fase 6) (Figura 11). Portanto, por volta de 5 dias após a oviposição têm-se a embriogênese com a formação do J1 e 24 h depois é possível obter o nematoide vermiforme J2 fora do ovo.



**Figura 11.** Embriogênese do nematoide da *Ipomoea*. Fase 1: ovo contendo 1 célula; Fase 2: ovo com 2 células; Fase 2,5: ovo com 8 a 12 células; Fase 3: ovo em mórula ou múltiplas células; Fase 4: ovo em blástula ou gástrula; Fase 4,5: ovo em “tadpole” ou com um juvenil de primeiro estágio (J1) ainda não completamente desenvolvido; Fase 5: ovo com o J1 ou juvenil de segundo estágio (J2) prestes a eclodir; e, Fase 6: juvenil de segundo estágio recém-eclodido.

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi descrita e caracterizada uma nova espécie de nematoide da família Anguinidae associada a *Ipomoea cairica* e *I. syringifolia*. A espécie apresenta três formas adultas: fêmea semi-obesa, fêmea jovem delgada e macho. A análise filogenética e a delimitação de espécies pelo modelo GMYC, método de Yule, evidenciaram que os espécimes encontrados associados a *I. cairica* e *I. syringifolia* representam a mesma espécie e que esta não se agrupou a nenhum dos clados representantes dos demais gêneros de anguinídeos. Esses achados corroboram a análise morfológica comparativa, que indicou que esse nematoide possui caracteres taxonômicos distintos aos descritos para os gêneros abrigados em Anguinidae. Contudo, dentre os 17 gêneros abrigados na família Anguinidae (HODDA, 2022), não há sequências de nucleotídeos disponíveis nos bancos de dados, nem relacionadas com alguma publicação, para oito desses gêneros. Há incerteza sobre as reais afinidades entre os taxa em Anguinidae. Segundo HODDA (2022), para *Ditylenchus* spp. e *Nothotylenchus* spp. (os gêneros com maior número de espécies descritas,

com 89 e 55 espécies, respectivamente), há sequências de DNA apenas para 12 e 5 representantes desses táxons no banco de dados do NCBI, respectivamente. Essa carência de informação para a família Anguinidae mantém incertezas sobre as relações filogenéticas entre os táxons dessa família e por consequência o uso dessas informações para auxiliar na delimitação de espécies. Há também uma baixa resolução para alguns dos clados e indicações de que alguns táxons sejam parafiléticos (*Anguina* spp. e *Mesoanguina* spp. e *Heteroanguina* spp., que são sinonimizados a *Subanguina* spp. por SIDDIQI, 2000) e polifiléticos (*Ditylenchus* spp. e *Nothotylenchus* spp.). Esse *status*, combinado com a presença de caracteres morfológicos convergentes no grupo, permanecem como sérios obstáculos para uma classificação apropriada de anguinídeos.

Na árvore filogenética, observou-se que o NFI foi mais proximamente relacionado a *D. drepanocercus*, seguido posteriormente de *Z. pittosporum* e então *D. gallaeformans*, sendo duas dessas espécies também descritas no Brasil, *D. drepanocercus* (SEIXAS et al., 2004b) e *D. gallaeformans* (OLIVEIRA et al., 2013), com as quais agrupou-se em um clado separado dos demais anguinídeos. Isso também foi comprovado por Shokoohi et al. (2018) que, ao proporem a espécie *Ditylenchus sarvarae*, por meio da análise por Inferência Bayesiana da região 28S do DNA ribossômico, reconheceram quatro grupos moleculares de *Ditylenchus*: (I) *D. destructor* Thorne, 1945, *D. persicus* Esmaeili, Heydari, Castillo e Palomares-Rius, 2017, *D. halictus* Giblin-Davis, Erteld, Kanzaki, Ye, Zeng, e Center e *D. sarvarae*; (II Shokoohi, Iranpour, Peneva, Elshishka, Fourie e Swart, 2018) *D. phyllobius* Cuda, Parker, Goodson, Gillmore, 1998; (III) *D. gallaeformans* e *D. drepanocercus*; e, (IV) *D. dipsaci*, *D. gigas* Vovlas, Troccoli, Palomares-Rius, De Luca, Liébanas, Landa, Subbotin e Castillo e *D. oncogenus* Vovlas, Troccoli, Palomares-Rius, De Luca, Cantalapiedra-Navarrete, Liébanas, Landa, Subbotin e Castillo, 2015. As espécies brasileiras tiveram afinidade e foram separadas em um mesmo grupo (grupo III). Esses resultados podem indicar linhagens isoladas geograficamente que acabaram se especializando em parasitar hospedeiros diferentes daqueles encontrados em outros continentes. Com o isolamento geográfico, cruzamentos entre populações relacionadas deixam de acontecer, isso resulta em uma alteração na frequência dos alelos, ficando estas populações cada vez mais divergentes entre si, resultando em uma especialização intra ou interespecífica (NORTON; NIBLACK, 1991).

Pela inferência filogenética apresentada neste estudo, *Ditylenchus* spp. seria um grupo polifilético, o que reforça a conclusão de outros estudos (OLIVEIRA et al., 2013; YAGHOUBI et al., 2018; ZHAO et al., 2013). Isso também foi consistente entre a análise individual das três diferentes regiões genômicas (SSU, LSU e ITS) empregadas neste estudo (dados não apresentados). Essas três regiões genômicas não tiveram resolução suficiente para separar *Ditylenchus* spp. em um grupo monofilético. Isso seria um reflexo do uso de marcadores moleculares com pouco sinal filogenético aliado ao limitado número de sequências disponíveis, ou mesmo devido à complexidade do processo evolutivo dessas linhagens, resultando em um relacionamento filogenético ainda incerto entre os anguinídeos (SUBBOTIN et al., 2004, 2006).

A instabilidade na classificação de táxons em Anguinidae reflete a extensiva presença de caracteres morfológicos convergentes entre as linhagens abrigadas nos diferentes gêneros dessa família, sendo necessário uma reanálise de muitos desses, já que várias descrições taxonômicas foram baseadas apenas em caracteres morfológicos sendo frequentemente pouco informativas, o que dificulta o reconhecimento de tais táxons (KHAN, 1965; PRICE; FISHER; KERR, 1979; VAN DEN BERG, 1986). Em adição, há dificuldades no acesso às descrições antigas, o que limita sobremaneira a realização de estudos taxonômicos dos anguinídeos. Assim, claramente nota-se que há uma urgência na revisão taxonômica dos táxons abrigados em Anguinidae. Neste sentido, o emprego da taxonomia polifásica, que integra dados morfológicos, morfométricos, moleculares, gama de hospedeiros, distribuição geográfica, dentre outras informações, para a delimitação de espécies (SUBBOTIN; WAEYENBERGE; MOENS, 2013) pode auxiliar nos esclarecimentos das inconsistências taxonômicas existentes nesse grupo de nematoides. A revisão taxonômica da família Anguinidae é uma obra em construção. Visando aumentar a resolução da taxonomia desse grupo, é preciso ampliar a representatividade de táxons de Anguinidae nos bancos de dados de sequências de nucleotídeos, incluindo a busca por outros marcadores moleculares. A coleta e sequenciamento de amostras representativas é indispensável. Um gene que vem sendo muito utilizado em construções filogenéticas para outras famílias de nematoide é o gene mtCOI (citocromo oxidase I), mas, para os anguinídeos ainda não tem sido explorado, mesmo para as espécies mais comuns e importantes economicamente.

O NFI foi identificado infectando apenas *I. cairica* e *I. syringifolia*. O fato dele causar manchas cloróticas em plantas do mesmo gênero pode indicar uma especificidade desse anguinídeo a plantas da família Convolvulaceae, ou mesmo do gênero *Ipomoea*. A gama de hospedeiros estreita é comum em outros anguinídeos, que possuem uma preferência alimentar por plantas do mesmo grupo ou de grupos taxonômicos proximamente relacionados (SUBBOTIN, et al., 2004). Por exemplo, *Anguina* spp. predominantemente ataca plantas da subfamília Pooideae (Poaceae) (SUBBOTIN, et al., 2004). Acredita-se que tais nematoides tenham coevoluído com as suas hospedeiras em um processo chamado de 'coespeciação', em que ocorre a especiação em paralelo de duas espécies que interagem entre si, que teria resultado em uma gama de hospedeiras restrita a poucas famílias botânicas (SUBBOTIN, et al., 2004).

Não foi possível a reprodução dos sintomas induzidos naturalmente por NFI, após a inoculação artificial em *I. cairica* e *I. syringifolia*. Houve uma inconsistência de resultados, em que no primeiro experimento, apareceram sintomas típicos da doença em todos os tratamentos, inclusive em plantas tratadas com água destilada, já em um segundo experimento, nenhuma planta apresentou sintomas. Isso pode ser resultado do uso de plantas coletadas no local de ocorrência do nematoide no primeiro ensaio, podendo estas já estarem previamente infectadas mesmo não apresentando sintomas. Foram várias tentativas de inoculação para a reprodução dos sintomas, mas nenhuma foi bem-sucedida. O aparecimento dos sintomas no primeiro experimento, em pontos diferentes dos ferimentos causados pela agulha estéril, mostra que os furos podem não ser necessários para a penetração desse nematoide, ou que eles penetram pelos ferimentos e se locomovem dentro do tecido até encontrarem um local para iniciar a infecção. O mais provável é que eles penetrem de forma ativa, por aberturas naturais como estômatos, e próximo desses locais de penetração eles iniciem a infecção, evidenciado também pela análise histopatológica. Esses resultados indicam que o método de inoculação adotado pode não ter sido eficiente ou que as condições de temperatura e umidade as quais as plantas foram submetidas após a inoculação, não foram adequadas para a penetração e o estabelecimento do nematoide no interior dos tecidos do hospedeiro, limitando a incidência da doença. Além disso, ao fazer a inoculação pelo método da aspersão, todos os estádios de vida do nematoide foram utilizados, mas como não se sabe se há ou não um estágio

infectivo específico, pode ser que as proporções de ovos, machos, fêmeas semi-obesas e fêmeas jovens inoculadas, não tenham sido suficientes para o início da infecção.

Os sintomas cloróticos angulares causados por NFI foram vistos nas cordas-de-viola a campo, tanto em folhas jovens quanto em folhas mais velhas, diferente do que SEIXAS et al. (2004b) mencionaram para *D. drepanocercus*. Estes autores relataram que os sintomas induzidos por *D. drepanocercus* em *M. calvescens* DC. eram vistos nas folhas mais velhas. Assim, para avaliar se há diferenças estruturais entre folhas jovens e folhas velhas de *I. cairica*, que poderiam favorecer a penetração do nematoide em um ou outro estágio da folha, uma análise histopatológica na região da gema da planta está sendo realizada para investigar se a penetração do NFI na gema é limitada ou se o estabelecimento da infecção ocorre a partir de tecidos meristemáticos, de forma que o progresso da doença acompanhe o desenvolvimento foliar, trazendo entendimento sobre a penetração e o ciclo de vida desse anguinídeo.

A análise histopatológica mostrou que NFI se estabelece nos espaços intercelulares da folha e induz modificações no formato e disposição das células. O citoplasma de células afetadas se torna condensado e granuloso e os núcleos aumentam de tamanho, que podem indicar um aumento da atividade celular, fazendo com que essas células estejam funcionando como um dreno para a nutrição do nematoide. Essas modificações celulares também foram observadas por VOVLAS et al. (2016) que descreveram alterações celulares e de tecido resultantes do ataque de *Ditylenchus oncogenus* em caule e folha de *Sonchus bulbosus* (L.) N.Kilian e Greuter. Nas cavidades subepidérmicas, onde os nematoides se alojavam, os autores observaram que o citoplasma das células adjacentes àquelas por onde o nematoide estava se alimentando, estava granulado com núcleos e nucléolos hipertrofiados.

Os resultados da histopatologia permitem concluir que o NFI é um endoparasita migrador, que possivelmente se locomove pelos filmes d'água sobre a planta até chegar ao local de penetração onde tem início a infecção. No interior do tecido, NFI não se move a longas distâncias, isso pode explicar a observação dos sintomas cloróticos sempre delimitados pelas nervuras. Não foram observadas hiperplasia nem hipertrofia das células, nem a presença de célula especializada de alimentação, à semelhança daquelas induzidas por nematoides sedentários. Acredita-se que as alterações celulares observadas ocorram porque o nematoide insere o estilete, induz

o aumento da atividade celular drenando nutrientes das células da planta hospedeira até o completo esgotamento celular e depois passe a se alimentar em uma outra célula, onde acontece o mesmo processo. Essa hipótese é baseada na observação de grandes cavidades onde o nematoide se encontra, às quais apresentavam indícios de morte celular. A destruição dos estômatos próximos aos locais onde NFI foram encontrados pode indicar uma interconexão com o ambiente externo, permitindo que os nematoides saiam e entrem nas folhas com facilidade para colonizar outros locais ou o mesmo local de penetração.

Neste estudo foi analisada também a embriogênese de NFI, e por meio de observações microscópicas, pôde-se perceber que desde a oviposição até a eclosão do J2 são gastos em média 6 dias em temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C). No decorrer das avaliações, foi observado que alguns ovos se desenvolveram quase que completamente (até a Fase 4.5) no interior do corpo da fêmea, sem que ela o ovipositasse. Isso provavelmente não é um evento da biologia natural do nematoide, porque não foi encontrado ovo em estágio avançado de desenvolvimento em nenhuma fêmea semi-obesa grávida recém extraída. Essa anomalia pode ter sido induzida pela sensibilidade osmótica que o NFI apresenta em tampões e até mesmo em água, ficando as fêmeas semi-obesas grávidas sob condições não favoráveis à sobrevivência a longo prazo, impedindo que esses ovos fossem ovipositados. Todo o ciclo de vida do anguinídeo da *Ipomoea* parece ocorrer no interior da folha, porque todas as suas formas de vida foram encontradas no tecido foliar. Para uma melhor compreensão da biologia desse nematoide em seu hospedeiro, ainda é necessário que se faça a elucidação de seu ciclo de vida. É preciso esclarecer se há um estágio infectivo específico que inicia a infecção da planta hospedeira e quais estratégias que o NFI utiliza para resistir a condições desfavoráveis ou à ausência da planta hospedeira.

Algumas condições climáticas, como baixas temperaturas e precipitação pluviométrica, provocam uma queda na população dos anguinídeos, que necessitam ter estratégias de sobrevivência para resistirem à essas condições desfavoráveis (STURHAN; BRZESKI, 1991). Tais observações apontam para a provável sobrevivência desses em estádios quiescentes, que os permitem sobreviver em tais condições desfavoráveis. Há vários relatos de Anguinidae que empregam a anidrobiose para sobreviver a dessecação por anos, como é o caso de juvenis de

segundo estágio de *Anguina tritici* (Steinbuch, 1799) Filipjev, 1936, *A. agrostis* (Steinbuch, 1799) Filipjev, 1936, *A. graminis* (Hardy, 1850) Filipjev, 1936 e *A. australis* Steiner, 1940, e juvenis de quarto estágio de *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936, *Orrina phyllobia* (Thorne, 1934) Brzeski, 1981 e diversas espécies de *Subanguina* Paramonov, 1967 (PRESTON; BIRD, 1987; RILEY; SHEDLEY; SIVASITHAMPARAM, 2001; SIDDIQI, 2000). Para investigar se o nematoide foliar de *Ipomoea* possui um comportamento semelhante, folhas de *I. cairica* e de *I. syringifolia* foram herborizadas, coletadas e armazenadas entre folhas de jornais até secarem, e extrações foram feitas semanalmente para observar se o NFI possui a capacidade de entrar em anidrobiose (dados não apresentados). A primeira avaliação foi feita sete dias depois da coleta das folhas e os nematoides obtidos já estavam mortos e com o corpo desidratado sendo difícil distinguir em qual estágio eles se encontravam. Por outro lado, folhas em senescência foram coletadas e a presença de ilhas de sintomas angulares amarelo-esverdeadas foram observadas, e ao submetê-las a extração, foram encontrados nematoides ativos. Acredita-se que o NFI mantém um grupo de células das plantas ativo para nutri-lo, resultando nesse fenótipo amarelo-esverdeado nos locais onde ele se encontra, mesmo com a folha já em estágio de senescência. Esses resultados podem indicar que eles não possuem a capacidade de sobreviver a dessecação ou, se possuem, algum fator exógeno ainda é desconhecido, como estímulos do ambiente, que é determinante para a retomada da atividade. Em contrapartida, o NFI mostrou-se bastante tolerante a baixas temperaturas. Ao ser deixado em geladeira, a 4 °C, em solução tampão fosfato de sódio (0,12 M, pH=7,3), espécimes vivos foram recuperados, mesmo após 10 dias de avaliação (dados não apresentados).

Apesar de tais informações ainda não esclarecerem como o NFI sobrevive durante o inverno e na ausência de seus hospedeiros, já podem apontar a direção para estudos futuros sobre a biologia e ecologia desse nematoide. Mesmo que todas as formas de vida do anguinídeo da *I. cairica* e *I. syringifolia* sejam encontradas nas folhas das plantas, não se deve descartar a hipótese de que essa sobrevivência possa ocorrer em outras partes da planta ou no interior de insetos vetores. Segundo SEIXAS et al. (2004b), injúrias causadas por insetos podem estar associadas às manchas foliares induzidas por *Ditylenchus drepanocercus* em folhas de *Miconia calvescens*. De modo similar, lesões claramente causadas por alguns artrópodes estavam

comumente associadas a *I. cairica* e *I. syringifolia* infectadas pelo NFI. Em adição, foi observado que em alguns locais de coleta, as folhas sintomáticas de *Ipomoea* spp. foram mais frequentemente encontradas em partes altas das plantas, não sendo encontradas folhas sintomáticas muito próximas ao solo, reforçando que pode haver uma correlação entre os locais onde geralmente permanecem os insetos que se alimentam das folhas e a infecção causada pelo NFI. Algumas espécies dos gêneros *Sychnotylenchus* e *Neoditylenchus* possuem uma associação com inseto, podem estar sob os élitros do besouro em estágio *dauer* ou em excrementos do mesmo (SIDDIQI, 2000). Esses nematoides são conhecidos como “*Ditylenchus-like*” e pertencem a família Sychnotylenchidae Paramonov, 1967, são micófagos, não são encontrados em ambientes livres do inseto, mas possuem uma morfologia muito semelhante aos nematoides da família Anguinidae (SIDDIQI, 2000). Investigações futuras, buscando esclarecer se haveria interação do NFI com algum inseto são necessárias, já que, caso isso seja confirmado, NFI deverá ser alocado para a família Sychnotylenchidae, ao invés de Anguinidae, visto que a principal diferença entre estas famílias é o relacionamento dos nematoides pertencentes a Sychnotylenchidae com inseto (SIDDIQI, 2000). Diante dessas observações, mais estudos devem ser conduzidos para elucidar se há associação das lesões causadas pelos insetos com os sintomas cloróticos induzidos pelo NFI, bem como se esse nematoide possui alguma estratégia de sobrevivência como diapausa, quiescência ou mesmo estágio *dauer*.

## 7. CONCLUSÕES

- O NFI é uma espécie de anguinídeo ainda não descrita na literatura, conforme revelado pelas análises morfológica, morfométrica, filogenética e de delimitação de espécies.
- Tanto as características morfológicas quanto o relacionamento filogenético e o método de delimitação de espécies, GMYC, sustentam a criação de um novo gênero dentro de Anguininae para abrigar o NFI.
- NFI tem hábito de parasitismo do tipo endoparasita migrador;
- A duração da embriogênese até a eclosão do juvenil de primeiro estágio foi de aproximadamente 5 dias.

- Os métodos de inoculação (aspersão e deposição) e/ou a concentração de inóculo, não foram adequados para reprodução de sintomas de NFI após inoculação de *I. cairica* e *I. syringifolia*, nas condições testadas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIVERDI, S.; POURJAM, E.; PEDRAM, M. Description of *Ditylenchus acantholimonis* n. sp. (Rhabditida: Anguinidae) from Iran, a morphological and molecular phylogenetic study. **Nematology**, v. 24, n. 1, p. 109-118, 2021.

ARNOTT, H. J. Leaf clearings. **Turttox News**, v. 37, n. 8, p. 337-347, 1959.

ATIGHI, M. R.; POURJAM, E.; PEREIRA, T. J.; OKHOVVAT, S. M.; ALIZADA, B. A.; MUNDO-OCAMPO, M.; BALDWIN, J. G. Redescription of *Filenchus annulatus* (Siddiqui & Khan, 1983) Siddiqui, 1986 based on specimens from Iran with contributions to the molecular phylogeny of the Tylenchidae. **Nematology**, v. 15, n. 2, p. 129-141, 2013.

AUSTIN, D. F.; HUÁMAN, Z. A Synopsis of *Ipomoea* (Convolvulaceae) in the Americas. **Taxon**, v. 45, p. 3-38, 1996.

BAJAJ, H. K.; DABUR, K. R.; PARUTHI, I. J.; BHATTI, D. S. Description and biology of *Subanguina chrysopogoni* sp. n. (nematoda), a parasite of *Chrysopogon fulvus* (gramineae) in Haryana, India. **Nematologica**, v. 36, p. 55–72, 1990.

BARRETO, L. F. **Interferência de *Ipomoea grandifolia* na cultura do milho**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2019.

BOUCKAERT, R.; VAUGHAN, T. G.; BARIDO-SOTTANI, J.; DUCHÊNE, S.; FOURMENT, M.; GAVRYUSHKINA, A.; DRUMMOND, A. J. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. **PLoS computational biology**, v. 15, n. 4, 2019.

**CABI - Invasive Species Compendium**. Disponível em: <<https://www.cabi.org/isc>>. Acesso em: 4 fev. 2021.

CAESAR-TONTHAT, T. C.; DYER, W. E.; QUIMBY, P. C.; ROSENTHAL, S. S. Formulation of an endoparasitic nematode, *Subanguina picridis* Brzeski, a biological control agent for Russian knapweed, *Acroptilon repens* (L.) DC. **Biological Control**, v. 5, p. 262–266, 1995.

CARES, J. E.; SANTOS, J. R. P.; TENENTE, R. C. V. Taxonomia de nematóides de sementes, bulbos e caules-parte II. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 16, p. 39-84, 2008

CARES, J. E.; TENENTE, R. C. V. Taxonomia de nematóides de sementes, bulbos e caules - Parte I. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 15, p. 69-98, 2007

CARTA, L. K.; HANDOO, Z. A.; LI, S.; KANTOR, M.; BAUCHAN, G.; MCCANN, D.; GABRIEL, C. K.; YU, Q.; REED, S.; KOCH, J.; MARTIN, D.; BURKE, D. J. Beech leaf disease symptoms caused by newly recognized nematode subspecies *Litylenchus crenatae mccannii* (Anguinata) described from *Fagus grandifolia* in North America. **Forest Pathology**, v. 50, n. 2, p. 1–15, 2020.

CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular biology and evolution**, v. 17, n. 4, p. 540–552, 2000.

CUMMINGS, M. P. PAUP\* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other Methods)). In: Hancock, J. M. and Zvelebil, M. J. (ed.). **Dictionary of Bioinformatics and Computational Biology**. John Wiley & Sons. p.662, 2004.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, v. 9, n.8, 772-772, 2012.

DAVIES, K.; YE, W.; GIBLIN-DAVIS, R.; THOMAS, W. K. *Ficotylus congestae* gen. n., sp. n. (Anguinata), from *Ficus congesta* (Moraceae) sycones in Australia. **Nematology**, v. 11, n. 1, p. 63–75, 2009.

DE JESUS, D. S.; OLIVEIRA, C. M. G.; ROBERTS, D.; BLOK, V.; NEILSON, R.; PRIOR, T.; BALBINO, H. M.; MACKENZIE, K. M.; OLIVEIRA, R. D. L. A Morphological and molecular characterisation of *Aphelenchoides besseyi* and *A. fujianensis*

(Nematoda: Aphelenchoididae) from rice and forage grass seeds in Brazil. **Nematology**, v. 18, n. 3, p. 337–356, 2016.

DE LEY, P.; BLAXTER, M. Systematic position and phylogeny. In: **The biology of nematodes**. CRC Press, p. 1-30, 2002.

EISENBACK, J. D. **Nematology: Laboratory Investigation: Morphology and Taxonomy**. Mactode Publications, 2003.

ESMAEILI, M.; HEYDARI, R.; YE, W. Description of a new anguinid nematode, *Nothotylenchus phoenixae* n. sp. (Nematoda: Anguinidae) associated with palm date trees and its phylogenetic relations within the family Anguinidae. **Journal of Nematology**, v. 49, n. 3, p. 268, 2017.

ESMAEILI, M.; HEYDARI, R.; ZIAIE, M.; YE, W. Morphological and molecular characterisation of *Ditylenchus stenurus* n. sp. (Nematoda: Anguinidae) from western Iran. **European Journal of Plant Pathology**, v. 149, n. 3, p. 533-542, 2017.

ESMAELI, M.; HEYDARI, R.; CASTILLO, P.; PALOMARES-RIUS, J. E. *Nothotylenchus persicus* n. sp. (Nematoda: Anguinidae) from Kermanshah province, Iran. **Nematology**, v. 18, n. 1, p. 29-37, 2016.

EZARD, T.; FUJISAWA, T.; BARRACLOUGH, T. G. SPLITS: Species' limits by threshold statistics (2009). <https://r-forge.r-project.org/projects/splits/>. Accessed 14 June 2022.

FANELLI, E.; TROCCOLI, A.; VOVLAS, N.; BLAND, K.; DE LUCA, F. Histopathology of *Dryas octopetala* leaves co-infected by *Subanguina radicola* and *Aphelenchoides* sp . and molecular characterization of the nematodes. **European Journal Plant Pathology**, v. 150, p. 287–296, 2018.

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

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S. Nematoides como patógenos de plantas. In: ZAMBOLIN, L.; JESUS J. R. W. C.; PEREIRA, O. L. **O essencial da fitopatologia: agentes causais**. Viçosa, Suprema Gráfica e Editora. p. 89–128, 2012.

FORTUNER, R.; MAGGENTI, A. R. A reappraisal of Tylenchina (Nemata). 4 . The family Anguinidae Nicoll, 1935 (1926). **Revue de Nématologie**, v. 10, n. 2, p. 163–176, 1987.

GIBLIN-DAVIS, R. M.; ERTELD, C.; KANZAKI, N.; YE, W.; ZENG, Y.; CENTER, B. J. *Ditylenchus halictus* n. sp. (Nematoda: Anguinidae), an associate of the sweat bee, *Halictus sexcinctus* (Halictidae), from Germany. **Nematology**, v. 12, n. 6, p. 891-904, 2010.

GIBLIN-DAVIS, R. M.; KANZAKI, N.; DAVIES, K. A.; YE, W.; ZENG, Y.; CENTER, B. J.; ESQUIVEL, A.; POWERS, T. O. *Ficotylus laselvae* n. sp. (Tylenchomorpha: Anguinidae) associated with *Ficus colubrinae* in Costa Rica. **Nematology**, v. 16, n. 10, p. 1139-1151, 2014.

GÓMEZ, E. M.; SUÁREZ, A. R; OJEDA, J. C.; GÓMEZ, D. M. Identification and phylogenetic analysis of the leaf-galling nematode *Orrina phyllobia* affecting *Solanum elaeagnifolium* Cav. in Guanajuato, Mexico. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 34, n. 2, p. 184-199, 2016.

GOODEY, T. On two new species of nematodes associated with leaf-blotch in *Evodia roxburghiana* an Indian evergreen tree. **Thapar Commemoration Volume**, p. 96–104, 1953.

HALL, T. **BIOEDIT: Biological sequence alignment editor**, 2012. Disponível em: <<https://bioedit.software.informer.com/Download-grátis/>>

HANDOO, Z.; KANTOR, M.; CARTA, L. Taxonomy and identification of principal foliar nematode species (*Aphelenchoides* and *Litylenchus*). **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1–31, 2020.

HODDA, M. Phylum Nematoda: a classification, catalogue and index of valid genera, with a census of valid species. **Zootaxa**, v. 5114, n. 1, p. 1–289, 2022.

HOLTERMAN, M.; VAN DER WURFF, A.; VAN DEN ELSEN, S.; VAN MEGEN, H.; BONGERS, T.; HOLOVACHOV, O.; BAKKER, J.; HELDER, J. Phylum-Wide Analysis of SSU rDNA Reveals Deep Phylogenetic Relationships among Nematodes and Accelerated Evolution toward Crown Clades. **Molecular Biology and Evolution**, v.

23, n. 9, p. 1792–1800, 2006.

HOSSEINVAND, M.; ESKANDARI, A.; CASTILLO, P.; PALOMARES-RIUS, J. E.; GHADERI, R. Systematic position of the genus *Atetylenchus* Khan, 1973 (Nematoda: Tylenchidae) with description of two new species. **Nematology**, v. 22, n. 10, p. 1155-1167, 2020.

IBRAHIM, S. K.; PERRY, R. N. Desiccation survival of the rice stem nematode *Ditylenchus angustus*. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 16, n. 1, p. 31–38, 1993.

IKUYO, Y.; KABIR, M. F.; OZAWA, S.; KOIKE, Y.; ISHIGURO, H.; HASEGAWA, K. Characterisation and pathogenicity of *Ditylenchus dipsaci* isolated from *Phlox subulata* in Japan. **Nematology**, v. 20, n. 8, p. 811-814, 2018.

JALALINASAB, P.; HOSSEINI, M. N.; HEYDARI, R. *Nothotylenchus andrassy* n. sp. (Nematoda: Anguinidae) from Northern Iran. **Journal of Nematology**, v. 50, n. 2, p. 219-228, 2018.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York, McGraw-Hill, 1940.

KANZAKI, N.; FUTAI, K. A PCR primer set for determination of phylogenetic relationships of *Bursaphelenchus* species within the xylophilus group. **Nematology**, v. 4, n. 1, p. 35–41, 2002.

KANZAKI, N.; ICHIHARA, Y.; AIKAWA, T.; EKINO, T.; MASUYA, H. *Litylenchus crenatae* n. sp. (Tylenchomorpha: Anguinidae), a leaf gall nematode parasitising *Fagus crenata* Blume. **Nematology**, v. 21, n. 1, p. 5–22, 2019.

KEPENEKCI, İ.; ÖKTEN, M. E. Beypazarı (Ankara) ilçesinde havuç ile münavebeye giren domates ekiliş alanlarında saptanan nematod türleri: IV. *Coslenchus* (Nemata: Tylenchidae) ve *Safianema* (Nemata: Anguinidae). **Bitki Koruma Bülteni**, v. 37, n. 3–4, p. 91–99, 1997.

KHAN, S. H. *Nothotylenchus acutus* n. sp. and *N. basiri* n. sp. (Nematoda: Nothotylenchinae) from North India. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 32, n. 1, p. 90–93, 1965.

KRALL, E. L. Wheat and Grass Nematodes: *Anguina*, *Subanguina*, and Related Genera. In: Nickle, W. (ed.). **Manual of Agricultural Nematology**. New York, Marcel Dekker. p. 721-760, 1991.

KUMAR, M. R.; ABBASI, T.; ABBASI, S. A. Invasiveness and Colonizing Ability of *Ipomoea carnea* Jacq. and Attempts at its Management. **Nature Environment and Pollution Technology**, v. 17, n. 3, p. 767–775, 2018.

LOPES, E. A.; FERRAZ, S. Importância dos fitonematoides na agricultura. **Diagnose de Fitonematoides**, p. 1–13, 2016.

MA, H.; CHEN, Y.; CHEN, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, T.; HE, H. Comparison of allelopathic effects of two typical invasive plants: *Mikania micrantha* and *Ipomoea cairica* in Hainan island. **Nature Research**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.

MADANI, M.; TENUTA, M. Molecular Characterization and Phylogeny of from in the Prairie Provinces of Canada. **Journal of Nematology**, v. 50, n. 2, p. 163-182, 2018.

MAREK, M.; ZOUHAR, M.; RYSANEK, P.; HAVRANEK, P. Analysis of ITS sequences of nuclear rDNA and development of a PCR-based assay for the rapid identification of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Nematoda: Anguinidae) in plant tissues. **Helminthologia**, v. 42, n. 2, p. 49–56, 2005.

MEIRA, M.; SILVA, E. P. D.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 682-713, 2012.

MOBASSERI, M.; PEDRAM, M.; POURJAM, E.; BERTOZZI, T. Description of a new species of seed-gall nematode, *Anguina obesa* n. sp. (Nematoda: Anguinidae) from northern Iran, and its phylogenetic relations with other species and genera. **European Journal of Plant Pathology**, v. 148, n. 2, p. 423–434, 2017.

MUNAWAR, M.; RAHMAN, A. U.; CASTILLO, P.; YEVTUSHENKO, D. P. Morphological and Molecular Characterization of *Nothotylenchus medians* and *N. similis* (Nematoda: Anguinidae) from Southern Alberta, Canada. **Horticulturae**, v. 8, n. 1, p. 74, 2022.

NIMMAKAYALA, P.; VAJJA, G.; REDDY, U. K. *Ipomoea*. In: **Wild crop relatives: genomic and breeding resources**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 123-132, 2011.

NORTON, D. C.; NIBLACK, T. L. Biology and Ecology of Nematodes. In: Nickle, W (ed.). **Manual of Agricultural Nematology**. New York, Marcel Dekker. p. 47-72, 1991.

NUNN, G. B. **Nematode molecular evolution: an investigation of evolutionary patterns among nematodes based upon DNA sequences**. Tese de Doutorado. University of Nottingham, UK, 1992.

OLIVEIRA, C. J.; SUBBOTIN, S. A.; ÁLVAREZ-ORTEGA, S.; DESAEGER, J.; BRITO, J. A.; XAVIER, K. V.; FREITAS, L. G.; VAU, S.; INSERRA, R. N. Morphological and molecular identification of two Florida populations of foliar nematodes (*Aphelenchoides* spp.) isolated from strawberry with the description of *Aphelenchoides pseudogoodeyi* sp. n. (Nematoda: Aphelenchoididae) and notes on their bionomics. **Plant Disease**, v. 103, n. 11, p. 2825-2842, 2019.

OLIVEIRA, R. D. L.; SANTIN, Â. M.; SENI, D. J.; DIETRICH, A.; SALAZAR, L. A.; SUBBOTIN, S. A.; MUNDO-OCAMPO, M.; GOLDENBERG, R.; BARRETO, R. W. *Ditylenchus gallaeformans* sp. n. (Tylenchida: Anguinidae) – a neotropical nematode with biocontrol potential against weedy Melastomataceae. **Nematology**, v. 15, n. 2, p. 179–196, 2013.

ORR, C. C.; ABERNATHY, J. R.; HUDSPETH, E. B. *Nothanguina phyllobia*, a nematode parasite of silverleaf nightshade. **Plant Disease Reporter**, v. 59, n. 5, p. 416–418, 1975.

PALOMARES-RIUS, J.; SUBBOTIN, S. A.; LIEBANAS, G.; LANDA, B. B.; CASTILLO, P. *Eutylenchus excretorius* Ebsary & Eveleigh, 1981 (Nematoda: Tylogorinae) from Spain with approaches to molecular phylogeny of related genera. **Nematology**, v. 11, n. 3, p. 343-354, 2009.

PONS, J.; BARRACLOUGH, T. G.; GOMEZ-ZURITA, J.; CARDOSO, A.; DURAN, D. P.; HAZELL, S.; KAMOUN, S.; SUMLIN, W. D.; VOGLER, A. P. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. **Systematic Biology**, v. 55, n. 4, p. 595–609, 2006.

POURJAM, E.; BERT, W. *Aprutides guidettii* Scognamiglio, 1974 (Nematoda: Aphelenchoididae) and *Subanguina picridis* (Kirjanova, 1944). **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 8, n. 4, p. 331–342, 2006.

PRESTON, C. M.; BIRD, A. F. Physiological and morphological changes associated with recovery from anabiosis in the dauer larva of the nematode *Anguina agrostis*. **Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 125–133, 1987.

PRICE, P. C.; FISHER, J. M.; KERR, A. On *Anguina funesta* n. sp. and its association with *Corynebacterium* sp., in infecting *Lolium rigidum*. **Nematologica**, v. 25, n. 1, p. 76–85, 1979.

QIAO, K.; BAI, M.; HE, Y.; CHEN, J.; XIAO, S.; CHENG, X.; LIU, G.; BRAUN-MIYARA, S.; QING, X. Description of *Labrys fuzhouensis* sp. n. and first record of *Coslenchus rafiqi* (Nematoda: Tylenchidae) from China. **Nematology**, v. 21, n. 7, p. 693-708, 2019.

QIAO, Y.; YU, Q.; BADISS, A.; ZAIDI, M. A.; PONOMAREVA, E.; HU, Y.; YE, W. Paraphyletic genus *Ditylenchus* Filipjev (Nematoda, Tylenchida), corresponding to the *D. triformis*-group and the *D. dipsaci*-group scheme. **ZooKeys**, n. 568, p. 1, 2016.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria R Foundation for Statistical Computing, , 2022. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>

RAMBAUT, A. **FigTree**, 2009. Disponível em: <<https://www.softpedia.com/get/Science-CAD/FigTree-AR.shtml>>

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J.; XIE, D.; BAELE, G.; SUCHARD, MA. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic Biology**, v. 67, n. 5, p. 901-904, 2018.

RILEY, I. T.; SHEDLEY, D.; SIVASITHAMPARAM, K. Anhydrobiosis and reproduction in *Anguina australis*. **Australasian Plant Pathology**, v. 30, n. 4, p. 361–364, 2001.

ROBINSON, A. F.; ORR, C. C.; ABERNATHY, J. R. Distribution of *Nothanguina phyllobia* and Its Potential as a Biological Control Agent for Silver-leaf Nightshade. **Journal of Nematology**, v. 10, n. 4, p. 362–366, 1978.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3 : Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics Applications Note**, v. 19, n. 12, p. 1572–1574, 2003.

SÁNCHEZ, C.; SANTOS, M.; VASILENKO, P. Batata-doce branca, roxa ou alaranjada? Avaliação qualitativa e nutricional. **Vida Rural**, v. 1847, p. 30-32, 2019.

SEIXAS, C. D. S.; BARRETO, R. W.; FREITAS, L. G.; MAFFIA, L. A.; MONTEIRO, F. T. *Ditylenchus drepanocercus* (Nematoda), a potential biological control agent for *Miconia calvescens* (Melastomataceae): host-specificity and epidemiology. **Biological Control**, v. 31, p. 29–37, 2004a.

SEIXAS, C. D. S.; BARRETO, R. W.; FREITAS, L. G.; MONTEIRO, F. T.; OLIVEIRA, R. D. L. *Ditylenchus drepanocercus* rediscovered in the Neotropics causing angular leaf spots on *Miconia calvescens*. **Journal of Nematology**, v. 36, n. 4, p. 481–486, 2004b.

SHOKOOHI, E.; IRANPOUR, F.; PENEVA, V.; ELSHISHKA, M.; FOURIE, H.; SWART, A. *Ditylenchus sarvarae* sp. n. (Tylenchina: Anguinidae) from Iran. **Zootaxa**, v. 4399, n. 2, p. 197–206, 2018.

SIDDIQI, M. R. **Tylenchida Parasites of Plants and Insects**. 2nd. ed. New York, CABI Publishing, 2000.

SKWIERCZ, A. T.; KORNOBIS, F. W.; WINISZEWSKA, G.; PRZYBYLSKA, A.; OBREŃPALSKA-STĘPŁOWSKA, A.; GAWLAK, M.; SUBBOTIN, S. A. *Ditylenchus lauræ* sp. n. (Tylenchida: Anguinidae) from Poland—a new species of the *D. dipsaci* complex associated with a water plant, *Potamogeton perfoliatus* L. **Nematology**, v. 19, n. 2, p. 197-209, 2017.

SRIVASTAVA, D.; SHUKLA, K. *Ipomoea cairica*: a medicinal weed with promising health benefits. **International Journal of Information Research and Review**, v. 2, n. 5, p. 687–694, 2015.

STURHAN, D.; BRZESKI, M. W. Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. In: Nickle, W. (ed.). **Manual of agricultural nematology**. New York, Marcel Dekker. p. 423-464, 1991.

SUBBOTIN, S. A.; KRALL, E. L.; RILEY, I. T.; CHIZHOV, V. N.; STAELENS, A.; DE LOOSE, M.; MOENS, M. Evolution of the gall-forming plant parasitic nematodes (Tylenchida: Anguinidae) and their relationships with hosts as inferred from Internal Transcribed Spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 30, p. 226–235, 2004.

SUBBOTIN, S. A.; OLIVEIRA, C. J.; ÁLVAREZ-ORTEGA, S.; DESAEGER, J. A.; CROW, W.; OVERSTREET, C.; LEAHY, R.; VAU, S.; INSERRA, R. N. The taxonomic status of *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 (Nematoda: Aphelenchoididae) populations from the southeastern USA, and description of *Aphelenchoides pseudobesseyi* sp. n. **Nematology**, v. 23, n. 4, p. 381-413, 2020.

SUBBOTIN, S. A.; STURHAN, D.; CHIZHOV, V. N.; VOVLAS, N.; BALDWIN, J. G. Phylogenetic analysis of Tylenchida Thorne, 1949 as inferred from D2 and D3 expansion fragments of the 28S rRNA gene sequences. **Nematology**, v. 8, n. 3, p. 455–474, 2006.

SUBBOTIN, S. A.; WAEYENBERGE, L.; MOENS, M. Molecular Systematics. In: PERRY, R.; MOENS, M. (eds.). **Plant Nematology**. 2nd. ed. Wallingford, CAB International, p. 40–72, 2013.

SUBBOTIN, S.; STURHAN, D.; RUMPENHORST, H. J.; MOENS, M. Molecular and morphological characterisation of the *Heterodera avenae* species complex (Tylenchida: Heteroderidae). **Nematology**, v. 5, n. 4, p. 515–538, 2003.

SUGIURA, N. Further analysts of the data by akaike's information criterion and the finite corrections. **Communications in Statistics-theory and Methods**, v. 7, n. 1, p. 13–26, 1978.

TAMURA, K.; TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

**The Plant List**. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 1 fev. 2021.

TOGNON, G. B.; PETRY, C. Estaquia de *Ipomoea cairica* (L.) Sweet. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 470–475, 2012.

VAN DEN BERG, E. *Anguina guizotiae* sp. n. from Ethiopia with a redescription of *A. australis* Steiner, 1940 (Nematoda: Anguinidae). **Phytophylactica**, v. 18, n. 1, p. 11–16, 1986.

VASCO, A.; THADEO, M.; CONOVER, M.; DALY, D. C. Preparation of samples for leaf architecture studies, a method for mounting cleared leaves. **Applications in Plant Sciences**, v. 2, n. 9, p. 1–4, 2014.

VELANDIA, O.; MESTIZO, Y.; MEDINA, H. C.; RIASCOS-ORTIZ, D.; DE AGUDELO, F. V.; SARRIA, G. A. Characterization of in cover crop from oil palm plantations in central Colombia. **Journal of Nematology**, v. 53, n. 1, p. 1-14, 2021.

VOVLAS, N.; SUBBOTIN, S. A.; TROCCOLI, A.; LIÉBANAS, G.; CASTILLO, P. Molecular phylogeny of the genus *Rotylenchus* (Nematoda, Tylenchida) and description of a new species. **Zoologica Scripta**, v. 37, n. 5, p. 521–537, 2008.

VOVLAS, N.; TROCCOLI, A.; PALOMARES-RIUS, J. E.; DE LUCA, F.; CANTALAPIEDRA-NAVARRETE, C.; LIÉBANAS, G.; LANDA, B. B.; SUBBOTIN, S. A.; CASTILLO, P. A new stem nematode, *Ditylenchus oncogenus* n. sp. (Nematoda: Tylenchida), parasitizing sowthistle from Adriatic coast dunes in southern Italy. **Journal of Helminthology**, v. 90, n. 2, p. 152–165, 2016.

VOVLAS, N.; TROCCOLI, A.; PALOMARES-RIUS, J. E.; DE LUCA, F.; LIÉBANAS, G.; LANDA, B. B.; SUBBOTIN, S. A.; CASTILLO, P. *Ditylenchus gigas* n. sp. parasitizing broad bean: a new stem nematode singled out from the *Ditylenchus dipsaci* species complex using a polyphasic approach with molecular phylogeny. **Plant Pathology**, v. 60, n. 4, p. 762–775, 2011.

WEBER, E.; SUN, S. G.; LI, B. Invasive alien plants in China: diversity and ecological insights. **Biol Invasions**, v. 10, n. 8, p. 1411–1429, 2008.

WHARTON, D. A.; MARSHALL, A. T. Changes in surface features during desiccation of the anhydrobiotic plant parasitic nematode *Ditylenchus dipsaci*. **Tissue & Cell**, v. 34, n. 2, p. 81–87, 2002.

YAGHOUBI, A.; POURJAM, E.; YE, W.; CASTILLO, P.; PEDRAM, M. Description and molecular phylogeny of *Ditylenchus gilanicus* n. sp. (Nematoda: Anguinidae) from

northern forests of Iran. **European Journal of Plant Pathology**, v. 152, n. 3, p. 735–746, 2018.

ZHAO, Z. Q.; DAVIES, K.; ALEXANDER, B.; RILEY, I. T. *Litylenchus coprosma* gen. n., sp. n. (Tylenchida: Anguinata), from leaves of *Coprosma repens* (Rubiaceae) in New Zealand. **Nematology**, v. 13, n. 1, p. 29-44, 2011.

ZHAO, Z. Q.; DAVIES, K. A.; ALEXANDER, B. J. R.; RILEY, I. T. *Zeatylenchus pittosporum* gen. n., sp. n. (Tylenchida: Anguinata), from leaves of *Pittosporum tenuifolium* (Pittosporaceae) in New Zealand. **Nematology**, v. 15, p. 197–212, 2013.