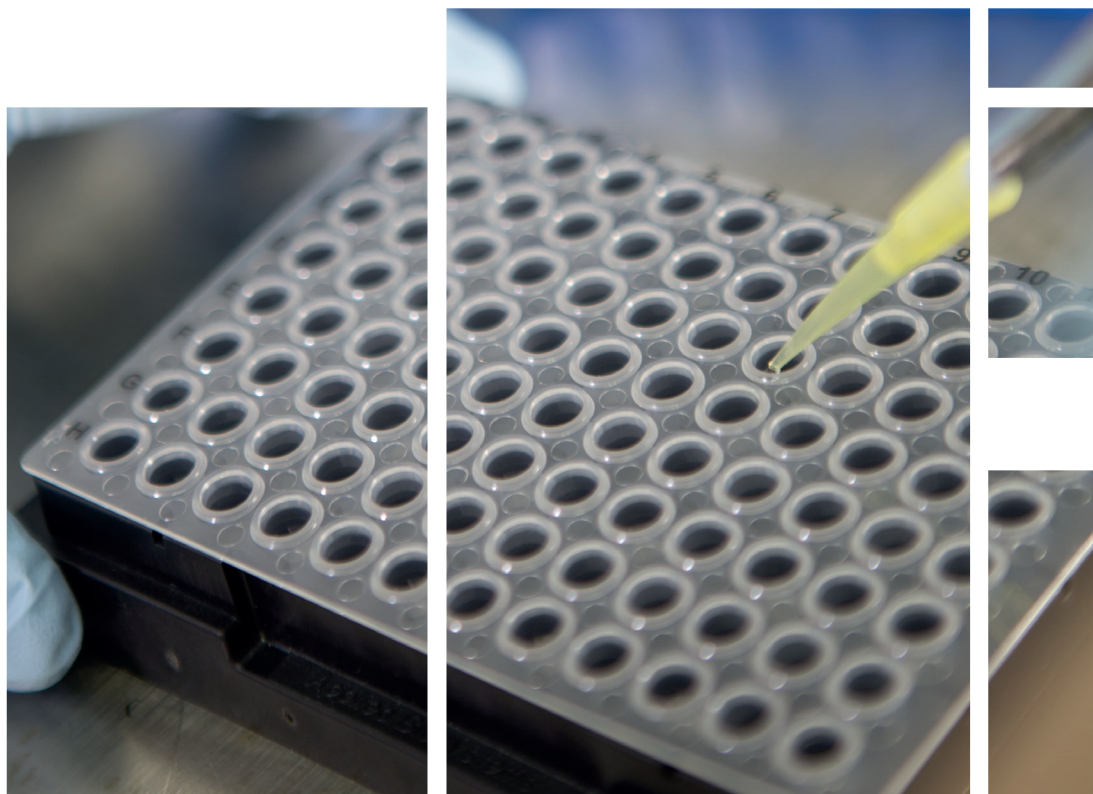


Baixa Similaridade Genética de
Populações de *Pratylenchus brachyurus*
em Solos do Cerrado Brasileiro



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
401**

**Baixa Similaridade Genética de
Populações de *Pratylenchus brachyurus*
em Solos do Cerrado Brasileiro**

*Maria Cristina Rocha Cordeiro
Alexandre Moura Cintra Goulart (in memoriam)*

Esta publicação encontra-se disponível gratuitamente
no link: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/?initQuery=t>

Embrapa Cerrados
BR 020, Km 18, Rod. Brasília / Fortaleza
Caixa Postal 08223
CEP 73310-970, Planaltina, DF
Fone: (61) 3388-9898
www.embrapa.br/cerrados
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações da Unidade

Presidente
Lineu Neiva Rodrigues

Secretário-executivo
Gustavo José Braga

Secretária
Alessandra Silva Gelape Faleiro

Membros
*Alessandra Silva Gelape Faleiro;
Alexandre Specht; Edson Eyji Sano;
Fábio Gelape Faleiro;
Jussara Flores de Oliveira Arbues;
Kleber Worsley Souza;
Maria Madalena Rinaldi;
Shirley da Luz Soares Araújo*

Revisão de texto
Margit Bergener L. Guimarães

Supervisão editorial
Jussara Flores de Oliveira Arbues

Normalização bibliográfica
Shirley da Luz Soares Araújo

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica e tratamento de imagens
Renato Berlim Fonseca

Foto da capa
Tomas May (CTAA)

Impressão e acabamento
Alexandre Moreira Veloso

1ª edição
1ª impressão (2022): 30 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Cerrados

C794b Cordeiro, Maria Cristina Rocha.

Baixa similaridade genética de populações de *Pratylenchus brachyurus* em solos do Cerrado brasileiro / Maria Cristina Rocha Cordeiro, Alexandre Moura Cintra Goulart (in memoriam). – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2022.

17 p. (Boletim de Pesquisa Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Cerrados, ISSN 1676-918X, ISSN on-line 2176-509X, 401).

1. Nematóide. 2. Diversidade genética. 3. Produtividade. I. Cordeiro, Maria Cristina Rocha. II. Título. III. Série.

CDD (21 ed.) 632.6257

Shirley da Luz Soares Araújo (CRB-1/1948)

© Embrapa, 2022

Sumário

Introdução.....	7
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	10
Conclusões.....	14
Agradecimentos.....	14
Referências	14

Baixa Similaridade Genética de Populações de *Pratylenchus brachyurus* em Solos do Cerrado Brasileiro

Maria Cristina Rocha Cordeiro¹

Alexandre Moura Cintra Goulart (**in memoriam**)²

Resumo – O nematoide das lesões radiculares (NLR) *Pratylenchus brachyurus* afeta diferentes culturas agrônomicas com perdas significativas de produtividade no Brasil. Este nematoide ocorre em áreas de soja nos estados do Mato Grosso, de Goiás, Tocantins, entre outros. O manejo de *P. brachyurus* inclui sua identificação precisa, realizada por morfologia e morfometria. No entanto, o trabalho de identificação é demorado e requer um profissional especializado, pois há poucos caracteres diagnósticos, há uma alta plasticidade morfológica entre as espécies de *Pratylenchus* e algumas descrições taxonômicas são incompletas. Alternativas para um diagnóstico eficaz e mais rápido têm sido estudadas com metodologias que envolvem o uso de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e PCR Quantitativo (qPCR). Para isso, é importante conhecer, em primeira mão, o nível de similaridade genética das populações. A metodologia Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)-DNA Polimórfico Amplificado Randomicamente (PCR-RAPD) permite estimar a variabilidade e similaridade genética em populações de *P. brachyurus*. Este estudo teve como objetivo estimar a similaridade genética que ocorre entre populações de *P. brachyurus* no Brasil utilizando PCR-RAPD. Os resultados mostram que a similaridade genética das populações estudadas variou de 28,9% a 50,6%, o que demonstra, em geral, uma baixa similaridade. Além disso, podem ocorrer variações no coeficiente de similaridade genética em populações de uma mesma região.

Termos para indexação: nematoide; diversidade genética; perdas de produtividade; RAPD.

¹ Bióloga, doutora em Ciências (Biologia Molecular), pesquisadora da Embrapa Cerrados Planaltina, DF

² Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia (Fitopatologia), pesquisador da Embrapa Cerrados Planaltina, DF

Low Genetic Similarity in Populations of *Pratylenchus brachyurus* in Brazilian Savannah Soils

Abstract – The root lesion nematode (RLN) *Pratylenchus brachyurus* affects different agronomic crops with significant productivity losses in Brazil. This nematode occurs in soybean areas in the states of Mato Grosso, Goiás, Tocantins, and others. The management of *P. brachyurus* involves its precise identification, which is carried out by morphology and morphometry. However, it is a time-consuming job which requires a specialized professional because there are few diagnostic characters, the morphological plasticity among *Pratylenchus* species is high and some taxonomic descriptions are incomplete. Alternatives for effective and faster diagnosis have been studied using methodologies that involve the use of Polymerase Chain Reaction (PCR) and qPCR. These alternatives involve knowing at first hand, the level of genetic similarity of the populations. The Polymerase Chain Reaction-Random Amplified Polymorphic DNA (PCR-RAPD) methodology allows estimating the genetic variability and similarity in *P. brachyurus* populations. This study aims to estimate the genetic similarity that occurs between Brazilian populations of *P. brachyurus* using PCR-RAPD. The results demonstrate that the genetic similarity of the studied populations ranged from 28.9% to 50.6%, thereby showing, in general, a low genetic similarity. In addition, differences in similarity can also occur in populations from the same region.

Index terms: nematode; genetic diversity; productivity losses; RAPD.

Introdução

Os nematoides das lesões radiculares (NLR) *Pratylenchus* spp. são assim denominados, pois penetram o tecido da raiz onde promovem muitas lesões. Estas lesões propiciam infecções secundárias no tecido radicular, especialmente fúngicas, que debilitam ainda mais a planta hospedeira (Lordello, 1988). Estes nematoides promovem não somente a perda de produtividade da planta, mas uma alteração em seu desenvolvimento normal, podendo levar até a sua morte. São conhecidas cerca de 97 diferentes espécies no gênero *Pratylenchus* distribuídas largamente em regiões frias, temperadas e tropicais do mundo e, assim, possuem um amplo espectro de hospedeiros como cereais, frutíferas, plantas ornamentais (Yu et al., 2012).

Na região do Cerrado Brasileiro, a espécie que tem se destacado é o *P. brachyurus*, especialmente por seu impacto com perdas de produtividade, da ordem de 10% a 30%, no estado do Mato Grosso, presente, especialmente, em áreas de produção de soja (Faleiro et al., 2012; Franchini et al., 2014; Lima et al., 2015; Chowdhury; Yan, 2021). Além da cultura da soja, também produz danos na cultura do café (Oliveira; Harakava, 2009; Bell et al., 2018).

Para o bom manejo das áreas infestadas por *P. brachyurus*, é necessária a sua identificação, sendo esta, uma etapa crucial. A identificação de *P. brachyurus* é realizada por um trabalho preciso de morfologia e morfometria. Porém, uma dificuldade que se apresenta é que este tipo de identificação demanda muito tempo e necessita de um especialista, pois, existem poucas informações morfológicas e morfométricas diferenciadoras entre as espécies do gênero. Além disso, estas características podem se sobrepor ou, pode ser encontrada uma alta plasticidade entre as espécies (Payan; Dickson, 1988). Também, questões como informações taxonômicas incompletas são relatadas (Janssen et al., 2017a, b). Estratégias para superar essa dificuldade, como os estudos com hospedeiras específicas e isoenzimas, com o intuito de discriminar as populações dos nematoides, já foram utilizadas (Payan; Dickson, 1988; Andrés et al, 2000; Abrantes et al., 2004). Porém, estas estratégias não foram totalmente efetivas.

O estudo da similaridade e variabilidade genética das populações de *P. brachyurus* ao nível molecular, utilizando metodologias como a PCR ou qPCR, permite conhecer o grau de diversidade que pode ser encontrada

nas populações para auxiliar em estratégias para diagnósticos moleculares efetivos e mais rápidos, superando as dificuldades atuais da identificação morfológica. A análise da similaridade e variabilidade genética constitui o primeiro passo, pois uma alta diversidade genética representará maior dificuldade para a seleção de um marcador genético que reconheça diferentes populações do nematoide. Torna-se necessário testar um número maior de primers para a identificação de uma sequência barcode (código de barras) espécie-específica.

A metodologia da PCR-RAPD permite estimar a variabilidade e similaridade genética que pode ser encontrada nas populações do *P. brachyurus*.

Este estudo teve como objetivo estimar a similaridade genética que pode ocorrer entre as populações de *P. brachyurus* na região do Cerrado do Brasil com a utilização da PCR-RAPD.

Material e Métodos

Onze populações de *P. brachyurus* foram obtidas em diferentes regiões geográficas de solos do Cerrado brasileiro nos anos de 2010 e 2011 (Tabela 1). Os nematoides foram purificados de raízes e solos infestados conforme a metodologia de Coolen e D'herde (1972) e Jenkins (1964) respectivamente. Cada população foi identificada por morfometria em microscópio ótico para constituir uma amostra relacionada com a fazenda de origem. Entre 50 e 100 nematoides de cada população foram utilizados para extrair o DNA segundo o protocolo descrito por Costa (2004) e quantificado em Nanodrop ND 2000. A análise de RAPD foi realizada utilizando-se 13 primers diferentes (OPA 3, OPA 20, OPB 6, OPB 9, OPB 17, OPD 7, OPD 16, OPE 11, OPE20, OPF 12, OPG5, OPG8, OPG19) (Tabela 2).

Tabela 1. Populações de *Pratylenchus brachyurus* de solos do Cerrado brasileiro.

População	Cultivo hospedeiro	Região de coleta
1	Milho	Fazenda Mandaguari, Água Fria, GO
2	Feijão	Fazenda Vereda, Buritis, MG
3	Soja	Fazenda Xanxerê, Correntina, BA

Continua...

Tabela 1. Continuação.

População	Cultivo hospedeiro	Região de coleta
4	Soja	Fazenda Vale do Arrojado, Correntina, BA
5	Soja	Fazenda Santa Helena, Correntina, BA
6	ND	Fazenda Santa Amélia, São João da Aliança, GO
7	Soja	Fazenda Vale do Arrojado, Correntina, BA
8	Milho	Fazenda Mandaguari, Água Fria, GO
9	Soja	ND
10	Soja	ND
11	Soja	Embrapa Cerrados, Brasília, DF

ND = não determinado

Tabela 2. Primers utilizados na análise de RAPD.

Primer	Sequência 10 mer (5' ► 3')
OPA3	AGT CAG CCA C
OPA20	GTT GCG ATC C
OPB6	TGC TCT GCC C
OPB9	TGG GGG ACT C
OPB17	AGG GAA CGA G
OPD7	TTG GCA CGG G
OPD16	AGG GCG TAA G
OPE11	GAG TCT CAG G
OPE20	AAC GGT GAC C
OPF12	ACG GTA CCA G
OPG5	CTG AGA CGG A
OPG8	TCA CGT CCA C
OPG 19	GTC AGG GCAA

As reações continham: 15 ng DNA; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP; 0,4µM Operon primers; 1U Taq polymerase em 13 µl. O programa do PCR foi: 94 °C por 2 min. (desnaturação inicial); 94 °C por 15 seg. + 35 °C por 30 seg. + 72 °C por 1,5 min. (x39) (polimerização de cadeia e extensão); 72 °C por 6 min.; 4 °C (fim). Os fragmentos amplificados na PCR foram observados em eletroforese

em gel de agarose a 1,2%. Os géis foram preparados em TBE (Tris-Borato 100 mM, pH 8,3; EDTA 2 mM) com 0,5 µg/ml de brometo de etídio conforme o protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). As corridas eletroforéticas foram realizadas a ~80 V e fotodocumentada pelo Sistema EDAS 120 (Kodak). Os fragmentos amplificados em PCR-RAPD e observados em géis correspondentes a bandas bem definidas de cada amostra, por cada primer, foram selecionados manualmente e, o resultado dos 13 primers combinados foram analisados com o pacote Bionumerics na modalidade GelCompar II (Applied Maths, v.6.0). O resultado foi expresso pelo coeficiente de similaridade Dice com o método de agrupamento utilizando o algoritmo Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) com 1% de tolerância e otimização. A espécie *P. jaheni* foi utilizada como um outgroup na análise.

Resultados e Discussão

Onze diferentes populações do nematoide *P. brachyurus* coletadas em oito diferentes locais que representam diferentes fazendas de produção de soja, milho e feijão foram analisadas do ponto de vista da similaridade genética. Um destes locais constitui uma área experimental da Embrapa Cerrados. Os fragmentos amplificados em PCR-RAPD e bem definidos em gel de agarose 1,2% (Figura 1) foram selecionados manualmente, e combinados para a análise de similaridade. Como controle da reprodutibilidade do sistema da PCR-RAPD foram selecionados aleatoriamente dois primers para amostragem em duplicata, tendo sido observado reprodutibilidade entre eles.

O resultado da análise de similaridade das diferentes populações de *P. brachyurus* com cerca de 800 bandas (monomórficas e polimórficas) totais utilizando o coeficiente de similaridade Dice e o método de agrupamento com o algoritmo UPGMA com 1% de tolerância e otimização demonstrou que, as populações apresentam de 28,9% a 50,6% de similaridade genética (Figura 2), ou seja, uma baixa similaridade genética. A espécie *P. jaheni* que foi adicionada à análise como um outgroup apresentou uma similaridade genética de até 23% em relação às populações de *P. brachyurus*.

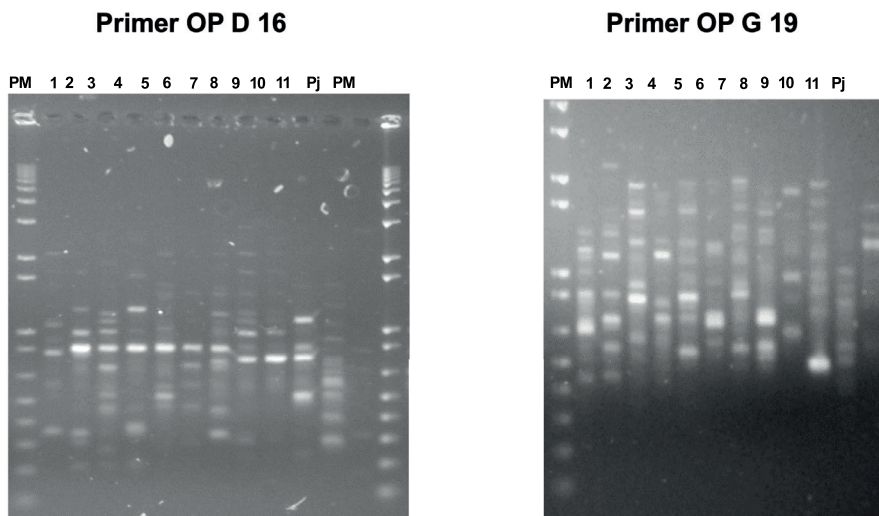


Figura 1. Resolução de bandas obtidas na análise de RAPD em gel de agarose 1,2% corados com brometo de etídio 0,5 µg/ml com a utilização dos primers OP D 16 e OP G 19 em 11 populações de *Pratylenchus brachyurus* e uma amostra de *P. jaheni* (Pj) (outgroup). PM- Marcador de peso molecular 1 kb.

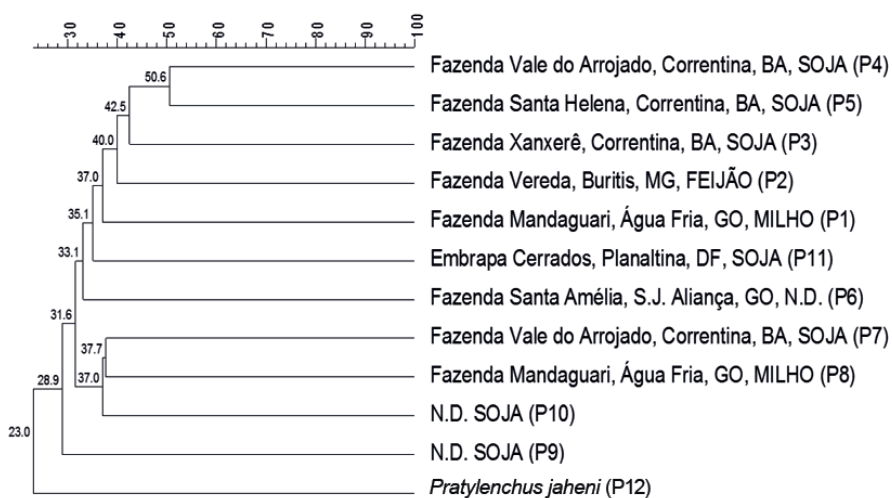


Figura 2. Análise de similaridade genética do nematoide *Pratylenchus brachyurus* utilizando o método de agrupamento com o algoritmo UPGMA com 1% de tolerância e otimização a partir da análise de RAPD com os primers OPA3, OPA20, OPB6, OPB9, OPB17, OPD7, OPD16, OPE11, OPE20, OPF12, OPG5, OPG8, OPG 19 (Operon, Inc.). A espécie *P. jaheni* foi colocado na análise como um outgroup.

Foi observado um decréscimo na similaridade das populações apresentadas na Figura 2, de 50,6% a 28,9% entre as populações nesta ordem: populações 4 e 5 > população 3 > população 2 > população 1 > população 11 > população 6 > populações 7, 8 e 10 > população 9. Neste resultado, também pode ser observado que, as populações 1 e 8 de milho e, as populações 4 e 7 de soja são agrupadas distantes, apesar de terem sido coletadas na mesma fazenda.

A população 8 agrupa com a população 7, próxima da população 10, enquanto a população 1 agrupa próxima às populações 2, 3, 4, 5. A população 4 agrupa com a população 5 e, a população 7 agrupa com a população 8. Além disso, a população 7 é aquela agrupada mais distante das demais coletadas nas três fazendas da região de Correntina, BA (populações 3, 4 e 5). Ou seja, pode ocorrer populações de *P. brachyurus* com diferentes similaridades genéticas, portanto diferentes geneticamente, em uma mesma fazenda ou região. Este fato pode influenciar o controle efetivo deste nematoide, pois, havendo populações geneticamente diferentes, pode ser possível que apresentem diferentes taxas de reprodução, agressividade, preferências de hospedeiros entre outras características do nematoide. Porém, estudos complementares são necessários para avaliar esta situação com mais precisão.

A baixa similaridade genética observada nos resultados infere uma possível variabilidade intra-específica na espécie *P. brachyurus* citada por Payan e Dickson (1988). Bakooie et al. (2012) e Tuyet et al. (2014) também relataram variações na variabilidade genética em populações de *P. vulnus* e *P. coffeae*, respectivamente, utilizando RAPD-PCR. Em *P. vulnus*, foi estimada em 45%.

A similaridade genética relatada neste trabalho com a utilização do PCR-RAPD não demonstra haver relação com fatores geográficos ou de plantas hospedeiras, mas apontou a possibilidade de haver populações geneticamente diferentes dentro de uma mesma área produtora. Porém, dada a dissimilaridade genética destes patógenos, os estudos de diagnóstico molecular com sequências *barcodes* específicas, em indivíduos e populações diferentes (Oliveira et al., 2011; Janssen et al., 2017a, b) devem contemplar também uma integração de metodologias como a identificação morfométrica, as análises de preferência de hospedeiros e da agressividade das populações, uma análise filogenética e, utilizando populações de diferentes locais.

Dessa maneira, estes estudos contribuem para um diagnóstico molecular efetivo e mais rápido para o nematoide *P. brachyurus*, de maneira a superar as dificuldades atuais da identificação morfológica acima supracitadas, bem como para práticas para o efetivo manejo do fitonematoide.

Alternativas para o diagnóstico molecular mais rápido e efetivo têm sido estudadas com a utilização de diferentes metodologias. Alguns exemplos dessas metodologias incluem o DNA Polimórfico Amplificado Randomicamente (RAPD-DNA)-Sequência Caracterizada por Região Amplificada (SCAR) (RAPD-SCAR), que constitui uma variação do RAPD, no qual, se amplifica uma sequência específica selecionada neste; o Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)-Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Restrito (PCR-RFLP), que realiza uma digestão com enzimas de restrição do fragmento amplificado em PCR. Nesse caso, se utiliza na PCR uma sequência do gene Espaçador Transcrito Interno (ITS) do gene ribossomal. Outras estratégias incluem a amplificação de sequências específicas como sequências relacionadas com DNA satélite; genes de mitocôndria como o da citocromo oxidase e outros genes em PCR. As metodologias mais promissoras incluem a PCR convencional e/ou a qPCR (PCR quantitativo) utilizando primers específicos e incluem diferentes espécies no gênero na análise, bem como, o *P. brachyurus* (Al-Banna et al., 1997; Waeyenberge et al., 2000; Machado et al., 2007; Oliveira; Harakava, 2009; Yan et al., 2012; Yu et al., 2012; Mokriani et al., 2013; Palomares-Rius et al., 2014; Baidoo et al., 2017; Huang; Yan, 2017; Janssen et al., 2017a; Bell et al., 2018; Kawanobe et al., 2019; Hodson et al., 2021; Chowdhury; Yan, 2021).

Este trabalho representou o primeiro passo para um diagnóstico molecular do *P. brachyurus* com a utilização de sequências barcodes específicas. Demonstrou que, diferentes populações deste fitopatógeno podem ter de 28,9% a 50,6% de similaridade genética, ou seja, existe uma variabilidade genética intraespecífica. Por isso, são necessários trabalhos subsequentes para a identificação de sequências barcodes, que possam reconhecer estas populações para a sua identificação precisa, rápida, e que superem as dificuldades atuais da identificação morfométrica. Também são importantes estudos que incluam uma seleção de uma abundância de genes e primers específicos. Apesar disso, o benefício de um diagnóstico rápido e preciso deste fitopatógeno de grande importância na agricultura brasileira representa uma estratégia promissora para auxiliar seu manejo no campo.

Conclusões

A similaridade genética das populações do *P. brachyurus* analisadas em PCR-RAPD variou de 28,9% a 50,6%.

Existe uma baixa similaridade genética entre as 11 populações de *P. brachyurus* estudadas.

A análise PCR-RAPD demonstrou também que é possível observar diversidade genética entre populações coletadas em uma mesma fazenda, região e cultivo.

Agradecimentos

O Dr. Alexandre Moura Cintra Goulart, engenheiro-agrônomo, nematologista, pesquisador da Embrapa Cerrados, especialista na identificação taxonômica do *Pratylenchus*, faleceu inesperadamente em maio de 2014. A menção de sua autoria constitui um humilde tributo a ele. Os autores agradecem ao William de Mattos Araújo, analista de laboratório que apoiava os trabalhos do Dr. Alexandre Moura Cintra Goulart, pelo seu excelente trabalho de assistência técnica no laboratório de Nematologia da Embrapa Cerrados. Este trabalho foi financiado pelo projeto SEG/Embrapa intitulado Caracterização de Danos e Estratégias de Manejo Integrado de Nematoides das Lesões Radiculares (*Pratylenchus* spp.) em Sistemas Agrícolas no Cerrado (2010-2014).

Referências

- ABRANTES, I. M. de O.; SANTOS, M. C. V.; da CONCEIÇÃO, I. L. P. M.; CUNHA, M. J. M.; SANTOS, S. N. A. Biochemical and molecular characterization of plant-parasitic nematodes. **Phytopathologia Mediterranea.**, v. 43, n. 2, p. 232-258, 2004. DOI: https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1741
- AI-BANNA, L.; WILLIAMSON, V.; GARDNER, S. L. Phylogenetic analysis of nematodes of the genus *Pratylenchus* using nuclear 26S rDNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 94-DOI: 102, 1997. DOI: 10.1006/mpev.1996.0381
- ANDRÉS, M. F.; PINOCHET, J.; HERNANDEZ-DORREGOC, A.; DELIBES, A. Detection and analysis of inter- and intraspecific diversity of *Pratylenchus* spp. using isozyme markers. **Plant Pathology** v. 49, n. 5, p. 640-649, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00485.x>

- BAIDOO, R.; YAN, G.; NAGACHANDRABOSE, S. Development of real-time PCR assay for direct identification and quantification of *Pratylenchus penetrans* in soil. **Plant Disease**, v. 101, n. 8, p. 1432-1441, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0117-RE>
- BAKOOIE, M.; POURJAM, E.; JAVARAN, M. J. Investigation on Iranian *Pratylenchus vulnus* populations by morphological and molecular marker (RAPD- PCR). **Journal of Agricultural Technology**, v. 8, v. 1, p. 219-231, 2012.
- BELL, A. C.; ATKINSON, H. J.; ANDRADE, A. C.; NGUYEN, H. X.; SWIBAWA, I. G.; LILLEY, C. J.; McCARTHY, J.; URWIN, P. E. A high-throughput molecular pipeline reveals the diversity in prevalence and abundance of *Pratylenchus* and *Meloidogyne* species in coffee plantations. **Phytopathology**, v. 108, n. 5, p. 641-650, 2018. DOI: 10.1094/PHYTO-10-17-0343-R.
- CHOWDHURY, I. A.; YAN, G. Development of real-time and conventional PCR assays for identifying a newly named species of root-lesion nematode (*Pratylenchus dakotaensis*) on soybean. **International Journal of Molecular Science**, v. 22, n. 11, p. 1- 17, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22115872>
- COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. **Belgian**: Belgian State of Nematology and Entomology Research Station, 1972. 77 p.
- COSTA, D. C. Variabilidade patogênica e genética de *Radopholus similis* em bananeira no Brasil. Universidade de Brasília. 2004. 156 f. Tese (Doutorado)- Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2004.
- OLIVEIRA, C. M. G. de; MONTEIRO, A. R.; BLOK, V. C. Morphological and molecular diagnostics for plant-parasitic nematodes: working together to get the identification done. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 2, p. 65-73, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1982-56762011000200001>
- FALEIRO, V. O.; FARIAS NETO, A. L.; BORGES, D. C.; SILVA, J. F.; DIAS, W. P.; RAMOS JUNIOR, E. U.; SILVA NETO, S. Reação de cultivares de soja a *Pratylenchus brachyurus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 6., 2012, Cuiabá. **Soja: integração nacional e desenvolvimento sustentável: anais**. Brasília, DF: Embrapa; Londrina: Embrapa Soja, 2012. 1 CD-ROM.
- FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; DIAS, W. P.; RAMOS JUNIOR., E. U.; SILVA, J. F. V. Perda de produtividade da soja em área infestada por nematoide das lesões radiculares na região médio norte do Mato Grosso. In: BERNARDI, A. C. de C.; NAIME, J. de M.; RESENDE, A. V. de; BASSOI, L. H.; INAMASU, R. Y. (ed.). **Agricultura de precisão: resultados de um novo olhar**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2014. p. 274-278.
- HODSON, A. K.; CICHETTO, A.; FIERRO, F. A. Real time PCR assays to detect and quantify the nematodes *Pratylenchus vulnus* and *Mesocriconema xenoplax*. **Crop Protection**, v.145, p. 1-8, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105617>
- HUANG, D.; YAN, G. Specific detection of root-lesion nematode *Pratylenchus sribneri* using conventional and real-time PCR. **Plant Disease**, v. 101, n. 2, p. 359-365,2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-16-1013-RE>
- JANSSEN, T.; KARSSSEN, G.; ORLANDO, V.; SUBBOTIN, S. A.; BERT, W. Molecular characterization and species delimiting of plant-parasitic nematodes of the genus *Pratylenchus* from the *penetrans* group (Nematoda:Pratylenchidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 117, p. 30-48, 2017a. DOI: 10.1016/j.ympev.2017.07.027.

- JANSSEN, T.; KARSSSEN, G.; COUVREUR, M.; WAEYENBERGE, L.; BERT, W. The pitfalls of molecular species identification: a case study within the genus *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae). **Nematology**, v.19, n. 10, p. 1179-1199, 2017b. DOI: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183107139>
- JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v. 48, n. 9, p. 692, 1964. DOI: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19650801105>
- LIMA, F. D. O.; SANTOS, G. R.; NOGUEIRA, S. R.; SANTOS, P. R. R.; CORREA, V. R. Population dynamics of the root-lesion nematode, *Pratylenchus brachyurus*, in soybean fields in Tocantins state and its effect to soybean yield. **Nematropica**, v. 45, n. 2, p. 170-177, 2015.
- KAWANOBE, M.; TOYOTA, K.; UCHIHARA, H.; TAKAE, M. Developing a real-time PCR diagnostic method for a potential threat to chrysanthemum, *Pratylenchus dianthus*. **Journal of Nematology**, v. 51, p. 1-11, 2019. DOI: 10.21307/jofnem-2019-043
- LORDELLO, L. G. E. **Nematóides das Plantas cultivadas**. São Paulo: Nobel, 1988. 197 p.
- MACHADO, A. C. Z.; FERRAZ, L. C. C. B.; OLIVEIRA, C. M. G. de. Development of a Species-Specific Reverse Primer for the Molecular Diagnostic of *Pratylenchus brachyurus*. **Nematropica**, v. 37, n. 2, p. 249-257, 2007. DOI: <https://journals.flvc.org/nematropica/article/view/64430>
- MOKRINI, F.; WAEYENBERGE, L.; VIAENE, N.; ANDALOUSSI, F. A.; MOENS, M. Quantitative detection of the root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans*, using qPCR. **Europa Journal Plant Pathology**, v. 137, p. 403-413, 2013. DOI 10.1007/s10658-013-0252-1
- OLIVEIRA, C. M. G.; KUBO, R. K.; HARAKAVA, R. Diagnose de *Pratylenchus* spp. de Cafezais Paulistas pela Aplicação da Tecnologia do Código de Barras do DNA. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 6., 2009, Vitória. **Resumos expandidos**. Brasília, DF: Embrapa Café.
- PALOMARES-RIUS, J. E.; GUESMI, I.; HERRIGUE-RAOUANI, N.; CANTALAPIEDRA-NAVARRETE, C.; LIÉBANAS, G.; CASTILLO, P. Morphological and molecular characterisation of *Pratylenchus oleae* n. sp. (Nematoda: Pratylenchidae) parasitizing wild and cultivated olives in Spain and Tunisia. **Europa Journal Plant Pathology**, v. 140, p. 53-67, 2014. DOI: 10.1007/s10658-014-0443-4
- AYAN, L. A.; DICKSON, D. W. Host Specificity of four Populations of *Pratylenchus brachyurus*. **Annals of Applied Nematology**, v. 2, p. 140-143, 1988.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. Harbor: Cold Spring, 1989.
- TUYET, N. T.; WAEYENBERGE, L.; ELSEN, A.; NHI, H. H.; WAELE, D. D. Molecular characterisation of *Pratylenchus coffeae* populations from Vietnam. **Russian Journal of Nematology**, v. 22, n. 2, p. 121-130, 2014.
- WAEYENBERGE, L.; RYSS, A.; MOENS, M.; PINOCHET, J.; VRAIN, T. C. Molecular characterisation of 18 *Pratylenchus* species using rDNA Restriction Fragment Length Polymorphism. **Nematology**, v. 2, n. 2, p. 135-142, 2000.
- YAN, G.; SMILEY, R. W.; OKUBARA, P. A. Detection and Quantification of *Pratylenchus thornei* in DNA Extracted from Soil Using Real-Time PCR. **Phytopathology**, v.102, n. 1, p. 14-22, 2012. DOI: 10.1094/PHYTO-03-11-0093.

YU, Y. T.; LIU, H. L.; ZHU, A. G.; ZHANG, G.; ZENG, L. B.; XUE, S. D. A Review of Root Lesion Nematode: Identification and Plant Resistance. **Advances in Microbiology**, v. 2; p. 411-416, 2012.

Embrapa

Cerrados

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

CGPE: 017997